



# Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA  
INORGÁNICA

Unidad docente de Química Inorgánica

**NANOSISTEMAS DENDRÍTICOS DE ESTRUCTURA  
CARBOSILANO DE DIFERENTES TOPOLOGÍAS PARA  
SU APLICACIÓN EN BIOMEDICINA**

DOCTORADO EN QUÍMICA FINA

Memoria presentada en la Universidad de Alcalá para  
optar al grado de Doctor en Química por la Licenciada:

**SILVIA MORENO PINILLA**

Realizada bajo la dirección del Dr. Rafael Gómez  
Ramírez y M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz Fernández.



**RAFAEL GÓMEZ RAMÍREZ**, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá y

**M<sup>a</sup> ÁNGELES MUÑOZ FERNÁNDEZ**, Directora del laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón,

**Certifican:**

Que la presente Memoria titulada “**Nanosistemas dendríticos de estructura carbosilano de diferentes topologías para su aplicación en biomedicina**” ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá con nuestra inmediata dirección e informamos favorablemente y autorizamos su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, a 22 de Febrero de 2016.

Fdo. Dr. Rafael Gómez  
Ramírez

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Ángeles  
Muñoz Fernández



**MANUEL GÓMEZ RUBIO**, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá

**Certifica:**

Que la presente Memoria titulada “**Nanosistemas dendríticos de estructura carbosilano de diferentes topologías para su aplicación en biomedicina**” ha sido realizada por la Licenciada Silvia Moreno Pinilla en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá y dirigida por el Dr. Rafael Gómez Ramírez y por la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz Fernández y da su conformidad para la presentación de la misma como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, a 22 de Febrero de 2016.

Fdo. Prof. Dr. Manuel Gómez Rubio



## **AGRADECIMIENTOS**

La ilusión que le ponemos a las cosas es el motor de nuestros sueños, es cierto, que para alcanzar cualquier meta es necesario pasar por obstáculos y derrotas ocasionales, pero todo lo que merece la pena en esta vida, exige un sacrificio. He puesto mucho de mi parte en este proyecto, pero llegado este momento, te das cuenta que todo esto no hubiera sido posible sin la confianza, apoyo y comprensión de las personas que me han acompañado a lo largo de este tiempo. Por fin, tengo la oportunidad de poder agradecerlos.

En primer lugar gracias a Rafa, por tu paciencia, dedicación, motivación y confianza en mí. A M<sup>o</sup> Ángeles, por darme la oportunidad de conocer otra parte de la ciencia, y sobre todo por confiar en que una química puede sobrevivir en un laboratorio de biomedicina, una estancia breve pero intensa. Y a Javi, fuiste el primero que me animó a conocer este mundo y darme la oportunidad de pertenecer a tu grupo, gracias. Sois excelentes jefes de grupo, pero sin duda sois mejores personas, gracias por haberme enseñado tanto.

Continúo con aquellas personas indispensables para el grupo, que siempre están para escucharnos y ayudarnos. A Paula, por ser siempre mi jefa encubierta, me enseñaste mis primeros pinitos en el laboratorio, pero ante todo, gracias por nuestras largas charlas. A Sánchez-Nieves, gracias por ser como eres, por ese humor especial que me hace tanto reír y por tus grandes consejos de química, no seríamos nadie sin ti.

Ahora toca a toda mi gente del laboratorio, gracias por ser mi apoyo incondicional en mi día a día durante tanto tiempo, habéis sufrido mis risas, mis lágrimas, mis nervios, mi locura, ¡todas las facetas de la princess! A Juanma, por ser mi compañero de principio a fin. Hemos crecido como científicos juntos, siempre serás el listo y yo la trabajadora. A Camino, me faltan líneas, muchas veces pienso donde nació nuestra conexión brutal y no lo sé, pero te admiro como persona, como científica y sobre todo como amiga ¡te quiero! A Marina, por el cariño y la confianza que siempre has depositado en mí, siempre serás como mi hermana mayor. A Mayte, sé que no me perdonarás el cambio de bando en la comida, pero estuve contigo el tiempo suficiente como para saber que molabas. A Carlos, mi

amigo desde el minuto uno de conocernos, allá donde vayamos ¡que tiemblen! A Cornelia, siempre te tuve cariño, pero después de Rusia ¡te quiero! A la Maroto, mi gemela rubia, aunque al principio te quisiste escapar, finalmente has sido mía, sigue luchando por tus sueños, puedes conseguir todo lo que te propongas. A Tania, mi canaria, desde que llegaste siempre te vi especial, ese don para ver las cosas desde otra perspectiva y que tanto me ha ayudado ¡no cambies! A Isa, quizás la más tímida de los Atrevid@s, pero siempre tienes una sonrisa que ofrecer, y eso me encanta, vas a llegar muy lejos. A María Fernández, el gran ejemplo de que a veces las primeras impresiones fallan, yo pensando que eras borde y eres de lo más adorable que he conocido, vales muchísimo. A Gabriel, empezaste conmigo y no escapaste, algo haría bien, confío plenamente en que sacaras una tesis estupenda. A María, que eres de las peques y llegamos al grupo a la vez, te he visto evolucionar y sé que llegarás lejos. A Andrea, te fuiste y volviste, me hubiera encantado coincidir más contigo, pero sé que lo harás genial. Y por último, a los más peques pero grandes personas, Natalia, Tamara y Jorge, os deseo todo lo mejor.

A algunos ya no os veo, pero el agradecimiento es el mismo. A Carlos García, intentaré siempre estar a la altura para que no te metas conmigo, eres especial pero me encanta. A Bea por ser simplemente tú, tu tesis fue la primera que vi y dije: ¡yo quiero! A Sandra, compartí poco tiempo contigo, pero suficiente para saber que quería seguir alguno de tus pasos. A Marta y Elena, porque cuando llegue me abrumasteis por todo lo que sabíais, me habéis enseñado mucho, os irá bien allá donde vayáis.

Y dar las gracias al resto de becarios y doctores del departamento con los que he compartido laboratorio, comidas y prácticas, esta etapa no hubiera sido igual sin cada uno de vosotros.

También durante este tiempo me han dado la oportunidad de realizar diferentes estancias que me han hecho desarrollarme como científica y por supuesto, como persona.

De mi estancia en Toulouse me lleve una gran experiencia personal y unos amigos excepcionales, tanto que necesitaría unas cuantas páginas más para poder

describirlo todo. A Pedro, por ser mi salvador desde el primer momento que llegué. A Miquel, jamás olvidaré nuestras risas en la cena, no volveremos a esa casa. A Joseju, mi triple J, estoy segura que nos encontraremos en otro sitio, te echo de menos. A Nabil, Hanna, Jeremy, Nidia, Cyrille, *the lab and my staying wouldn't be the same without you all. I hope we meet again soon!*

Ahora a por la gente del Hospital, gracias a todos por haberme hecho sentir una más, y por lo que me habéis enseñado cada uno, que es mucho. A Pilar, que decirte que no sepas, me llevo una amiga y una farmacéutica de excelencia, has hecho fácil lo difícil, quedan pocas personas como tú, así que por favor no cambies. A Rafa, mi boss, gracias por esos ratos tan divertidos en el labo, por nuestras largas conversaciones y por esa confianza ciega en mí ¡te adoro! A Quique, te fuiste, pero siempre serás mi mentor, y eres de las personas que sabes que allá donde vaya siempre será el mejor, ¡sigue así! A José Luis, por tu habilidad para sacarme los colores con tanta facilidad y hacer todo más fácil. A Dani, por tus mensajes estrella por todo el laboratorio que me alegraba cada día. A Carlos, porque poca gente dice gracias con tanto salero como tú, siempre serás de mis yogurines favoritos. Los del otro lado, ojala hubiera estado más tiempo con vosotros, pero las cañas y algunas comidas que he compartido con vosotros, me han bastado para llevarme una cosa de cada uno de vosotros. A Marta, lo poco que he visto de ti, me encanta, mucha suerte en tu nueva etapa. Laura (Miguel), pareces seria, pero ná de ná, eres genial, llegarás lejos. A Miguel, quien me iba a decir que echaría de menos nuestras conversaciones. A Chusa, gracias por ayudarme en mis experimentos y hacerlos más amenos cada día. A Paula, por tu alegría y simpatía, tenemos tardes de Latina pendientes. Al resto Maribel, Begoña, Susana, Mabela, Marjorie, Santi, Irene, Isabel, Coral, Rafa Correa, Jacobo, Jorge, ha sido genial conocerlos.

Hasta ahora he mencionado a la gente excepcional que me ha permitido conocer este mundo y esta etapa de mi vida, pero ahora es el turno de la gente que es parte de mí, que me han visto crecer y evolucionar.

A mis amigas, simplemente gracias a todas por valorarme como lo hacéis. A las Supernenas (Ana, Bea, , Lorena, Natalia y Noemí), sois uno de los grandes pilares de mi vida, habéis vivido todo lo bueno y no tan bueno de este camino,

gracias por entenderme como soy y aun así, siempre habéis permanecido a mi lado. A Elo, mi doctora preferida, porque tú fuiste una de las que me animo a seguir este camino, a que tenía que hacer algo diferente. Gracias por mantenerte ahí a pesar de las circunstancias, significas mucho para mí, que no se te olvide. A mis compis de carrera, Cris y Noelia, sois de esas personas que cuando os veo se me para el tiempo, ¡mis dos tesoros de la UAH! A esas personitas que han llegado a mi vida más tarde, pero no por ello menos importantes, Miriam e Isa, porque conseguís que me olvide de mis agobios y disfrute la vida de otra forma, os adoro.

Gracias a toda mi familia en general, abuelos, tíos y primos, porque os quiero. Pero en particular, a mis padres, por ser los principales promotores de mis sueños, a los que debo todo lo que soy, y siempre lucharé para que cada día podáis estar orgullosos de mí. Gracias por confiar y creer en mí a pesar de mis inseguridades, y por enseñarme cada día a crecer como persona. A mi hermano, porque cuando te pones serio (pocas veces), no hay persona que te de mejores consejos que tú. Y aunque tu estado natural es vacilarme, pocas personas me valoran como tú, te quiero. A mi cuñada, y a los tres tesoros que me has dado (David, Dorian y Daniel), eres como una hermana para mí, mi querido hermano no podía haber elegido mejor. Y a los peques, porque me encantaría ser vuestro ejemplo a seguir, y que siempre os sintáis orgullosos de vuestra tita, os quiero.

Y por último, ¿qué ha significado esta etapa para mí? Aquellas personas que más me conocen, saben que siempre he luchado con toda mi ilusión para conseguir mis metas y mejorar cada día, pero siempre con miedos e inseguridades, sentimientos que impiden que creas en ti misma y no disfrutes plenamente de las cosas buenas. Sin embargo, en estos últimos años, he aprendido a caerme y levantarme con más fuerza, a valorar los pequeños detalles, a darme cuenta que tengo mucho que aprender, pero también mucho que ofrecer, que si se quiere, se puede. Puedo decir que me siento satisfecha y con ganas para luchar por el siguiente reto. Conseguir sentirme así, no lo he hecho yo sola, así que de nuevo, GRACIAS.

*Si tienes un sueño y crees en él, corres el riesgo de  
que se convierta en realidad.*

(Walt Disney)



# ÍNDICE

---



**ÍNDICE GENERAL**

	<b>Páginas</b>
-----	
<b>ÍNDICE</b>	i
-----	
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS</b>	xiii
<b>ÍNDICE DE SISTEMAS PRECURSORES</b>	xvii
<b>ÍNDICE DE COMPUESTOS</b>	xxi
<b>PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS</b>	xxv
INTRODUCCIÓN	
OBJETIVOS Y DISTRIBUCIÓN DE LA MEMORIA	
-----	
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	1
-----	
<b>1.1 ESTRUCTURAS DENDRÍTICAS .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Sistemas polidispersos .....	4
1.1.2 Sistemas monodispersos .....	12
<b>1.2 AVANCES EN EL DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS DENDRÍTICOS</b>	
<b>.....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Mono y heterofuncionalización .....	18
1.2.2 Aplicación de las cuñas dendríticas .....	20
<b>1.3 APLICACIONES .....</b>	<b>33</b>
1.3.1 Sistemas dendríticos como transportadores .....	33
1.3.2 Sistemas dendríticos como agentes terapéuticos <i>per se</i> .....	35
1.3.3 Sistemas dendríticos como agentes diagnóstico .....	37
<b>1.4 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>40</b>
-----	

**CAPÍTULO 2. POLÍMEROS HIPERRAMIFICADOS IÓNICOS DE NATURALEZA CARBOSILANO 45**

---

**2.1 INTRODUCCIÓN .....47**

2.1.1 Conceptos generales de los polímeros hiperramificados .....47

2.1.2 Polímeros hiperramificados basados en átomos de silicio.....48

2.1.3 Estrategias sintéticas para la obtención de polímeros basados en átomos de silicio funcionalizados con grupos iónicos en la periferia .....51

2.1.4 Presentación y objetivos del Capítulo .....54

2.1.5 Nomenclatura .....54

2.1.6 Aspectos generales de la caracterización de los sistemas carbosilano sintetizados en este Capítulo .....56

**2.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS HIPERRAMIFICADOS BASADOS EN MATRICES CARBOSILANO ....58**

2.2.1 Procedimiento sintético .....58

2.2.2 Caracterización estructural.....60

**2.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MATRICES POLIMÉRICAS CON GRUPOS IÓNICOS EN LA PERIFERIA .....68**

2.3.1 Funcionalización de la matriz polimérica con grupos iónicos a través de la reacción de hidrosililación .....68

2.3.1.1 Polímeros hiperramificados precursores 68

2.3.1.2 Polímeros hiperramificados catiónicos a través de la reacción de hidrosililación 69

2.3.1.3 Polímeros hiperramificados aniónicos a través de la reacción de hidrosililación 73

2.3.2 Funcionalización de las matrices poliméricas con grupos iónicos a través de la reacción de adición “click” tiol-eno .....75

2.3.2.1 Polímeros hiperramificados catiónicos a través de la reacción de adición “click” tiol-eno	75
2.3.2.2 Polímeros hiperramificados aniónicos con grupos carboxilato a través de la reacción de adición “click” tiol-eno	82
2.3.2.3 Polímeros hiperramificados aniónicos con grupos sulfonato a través de la reacción de adición “click” tiol-eno	85
<b>2.4 ESTUDIO DE OTRAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....</b>	<b>88</b>
2.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	88
2.4.2 Potencial $\zeta$ .....	90
2.4.3 Estudio del carácter anfifílico mediante medidas de tensión superficial.	91
<b>2.6 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>94</b>
-----	
<b>CAPÍTULO 3. DENDRÍMEROS ESFÉRICOS HÍBRIDOS CONSTRUIDOS MEDIANTE METODOLOGÍA “ONION-PEEL”</b>	<b>97</b>
-----	
<b>3.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>99</b>
3.1.1 Construcción de sistemas híbridos.....	99
3.1.2 Presentación y objetivos del Capítulo.....	105
3.1.3 Nomenclatura .....	105
3.1.4 Aspectos generales de los sistemas precursores y sintetizados en este Capítulo.....	106
<b>3.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN .....</b>	<b>108</b>
3.2.1 Aspectos generales de la síntesis y caracterización de los esqueletos basados en átomos de fosforo .....	108
3.2.2 Aspectos generales de la síntesis y caracterización de las cuñas dendríticas precursoras de naturaleza carbosilano.....	110

3.2.2.1 Dendrones carbosilano con un grupo -NH <sub>2</sub> en el punto focal	111
3.2.2.2 Dendrones carbosilano con un grupo OH en el punto focal	117
3.2.2.3 Dendrones carbosilano con el monómero viológeno en el punto focal	118
<b>3.3 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS HÍBRIDOS FÓSFORO-CARBOSILANO.....</b>	<b>129</b>
3.3.1 Síntesis y caracterización de dendrímeros esféricos neutros .....	129
3.3.1.1 Reacciones de condensación y reducción del grupo imina	130
3.3.1.2 Reacción de sustitución	135
3.3.2 Síntesis y caracterización de los dendrímeros esféricos catiónicos .....	137
<b>3.4 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS HÍBRIDOS FÓSFORO-VIOLÓGENO-CARBOSILANO .....</b>	<b>148</b>
3.4.1 Síntesis y caracterización de los dendrímeros esféricos con grupos amino periféricos protegidos.....	148
3.4.2 Síntesis y caracterización de los dendrímeros esféricos catiónicos .....	151
<b>3.5 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>156</b>

---

## **CAPÍTULO 4. DENDRONES IÓNICOS DE NATURALEZA CARBOSILANO CON EL LIGANDO DO3A EN EL PUNTO FOCAL 159**

---

<b>4.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>161</b>
4.1.1 Sistemas bifuncionalizados .....	161
4.1.2 Presentación y objetivos del Capítulo.....	166
4.1.3 Nomenclatura .....	166
4.1.4 Aspectos generales de la caracterización de los sistemas precursores y sintetizados en este Capítulo .....	167

**4.2 CUÑAS DENDRÍTICAS FUNCIONALIZADAS CON EL LIGANDO DO3A EN EL PUNTO FOCAL Y GRUPOS IÓNICOS EN LA PERIFERIA**  
**169**

4.2.1 Intentos sintéticos para preparar sistemas catiónicos con el ligando DOTA en el punto focal.....	169
4.2.2 Síntesis y caracterización de las cuñas carbosilano precursoras.....	172
4.2.3 Síntesis y caracterización de las cuñas carbosilano funcionalizadas con grupos iónicos en la periferia .....	177
4.2.3.1 Síntesis y caracterización de las cuñas carbosilano aniónicas	177
4.2.3.2 Síntesis y caracterización de las cuñas carbosilano catiónicas	186
4.2.4 Estudio de los modos de coordinación.....	192
4.2.4.1 Valoración potenciometría	192
4.2.4.2 Espectroscopia de UV-VIS	193
4.2.4.3 Resonancia de espin electrónico (RSE)	199
4.2.5 Síntesis y caracterización de los diferentes complejos metálicos de cobre.....	207

**4.3 BIBLIOGRAFÍA .....211**

**CAPÍTULO 5. APLICACIONES BIOMÉDICAS** **215**

**5.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....217**

5.1.1 Sistemas dendríticos catiónicos en aplicaciones biomédicas.....	217
5.1.1.1 Sistemas catiónicos como agentes terapéuticos	217
5.1.1.2 Sistemas catiónicos como agentes de transporte	220
5.1.2 Sistemas dendríticos aniónicos en aplicaciones biomédicas .....	225
5.1.3 Presentación y objetivos del capítulo .....	227

<b>5.2 SISTEMAS CATIONICOS COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS</b>	<b>229</b>
.....	
5.2.1 Polímeros hiperramificados .....	229
5.2.2 Sistemas híbridos .....	233
5.2.3 Dendrones bifuncionalizados .....	238
5.2.4 Conclusiones de este apartado .....	239
<b>5.3 SISTEMAS CATIONICOS COMO AGENTES DE TRANSFECCIÓN</b>	<b>241</b>
.....	
5.3.1 Polímeros hiperramificados .....	242
5.3.2 Sistemas híbridos .....	242
5.3.2.1 Dendrímeros híbridos fósforo-carbosilano	242
5.3.2.2 Dendrímeros híbridos fósforo-viológeno-carbosilano	253
5.3.3 Dendrones bifuncionalizados .....	266
5.3.3.1 Biocompatibilidad	267
5.3.3.2 Estudios de la formación de nanoconjugados	267
5.3.4 Conclusiones de este apartado .....	272
<b>5.4 SISTEMAS ANIÓNICOS COMO AGENTES ANTIVIRALES FRENTE AL VIH</b>	<b>274</b>
.....	
5.4.1 Polímeros hiperramificados .....	274
5.4.1.1 Biocompatibilidad	275
5.4.1.2 Ensayos de inhibición	277
5.4.2 Dendrones bifuncionalizados .....	280
5.4.2.1 Biocompatibilidad	281
5.4.2.2 Ensayos de inhibición	282
5.4.2.3 Mecanismo de acción	285
5.4.3 Conclusiones del apartado .....	292

---

<b>5.5 PERSPECTIVAS DE FUTURO .....</b>	<b>293</b>
<b>5.6 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>294</b>
-----	
<b>CAPÍTULO 6. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>299</b>
-----	
<b>6.1 MÉTODOS Y TÉCNICAS INSTRUMENTALES .....</b>	<b>301</b>
6.1.1 Condiciones generales de trabajo.....	301
6.1.2 Técnicas instrumentales .....	301
<b>6.2 MATERIALES UTILIZADOS .....</b>	<b>306</b>
6.2.1 Reactivos y materiales empleados en el procedimiento sintético .....	306
6.2.2 Sistemas de purificación .....	306
6.2.3 Cultivos celulares primario y líneas celulares.....	307
6.2.4 Fármacos utilizados como controles .....	308
6.2.5 ARN de interferencia (siRNA) .....	309
<b>6.3 ENSAYOS BIOMÉDICOS Y MEDIDAS BIOFÍSICAS .....</b>	<b>310</b>
6.3.1 Capacidad antibacteriana .....	310
6.3.2 Viabilidad celular .....	311
6.3.3 Infección con aislados virales .....	312
6.3.4 Ensayos de inhibición de la infección por el VIH y su mecanismo de acción .....	312
6.3.5 Formación de dendriplex y el estudio de sus propiedades biofísicas....	315
6.3.6 Ensayos de citotoxicidad, hematoxicidad y cambios morfológicos.....	318
6.3.7 Estudios biofísicos de la interacción con HSA .....	319
6.3.8 Análisis estadísticos .....	321
<b>6.4 DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES .....</b>	<b>322</b>

6.4.1 Métodos sintéticos.....	322
6.4.1.1 Protocolo 1: Reacciones de hidrotiolación de dobles enlaces	322
6.4.1.2 Protocolo 2: Desprotonación de los grupos $-NR_2 \cdot HCl$	323
6.4.1.3 Protocolo 3: Reacciones de cuaternización de sistemas que contienen grupos $-NMe_2$ terminales	323
6.4.1.4 Protocolo 4: Transformación del grupo acrilato en grupo carboxilato	324
6.4.1.5 Protocolo 5: Reacciones de condensación	324
6.4.1.6 Protocolo 6: Reacciones de reducción de un enlace imina	324
6.4.1.7 Protocolo 7: Desprotección de aminas $-NHBoc$ para generar grupos amonio $-NH_3Cl$	325
6.4.1.8 Protocolo 8: Cambios de contraión	325
6.4.2 Síntesis y caracterización de los sistemas dendríticos .....	325
6.4.2.1 Síntesis y caracterización del monómero $AB_2$ y la matriz polimérica (1-3)	325
6.4.2.2 Síntesis y caracterización de polímeros hiperramificados catiónicos mediante hidrosililación (4-7)	328
6.4.2.3 Síntesis y caracterización de la matriz polimérica funcionalizada con grupos vinilo en la periferia (8)	330
6.4.2.4 Síntesis y caracterización de polímeros hiperramificados catiónicos mediante adición tiol-eno (9-13)	331
6.4.2.5 Síntesis y caracterización de polímeros hiperramificados aniónicos mediante adición tiol-eno (14-19)	334
6.4.2.6 Síntesis y caracterización de diferentes cuñas dendríticas (20-33)	337
6.4.2.7 Síntesis y caracterización de los dendrímeros híbridos neutros fósforo-carbosilano (34-42)	346
6.4.2.8 Síntesis y caracterización de los dendrímeros híbridos catiónicos fósforo-carbosilano (43-52)	352
6.4.2.9 Síntesis y caracterización de los sistemas híbridos neutros fósforo-viológeno-carbosilano (53-54)	357

6.4.2.9 Síntesis y caracterización sistemas híbridos catiónicos fósforo-viologen-carbosilano (55-58)	359
6.4.2.10 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano (Cyclen) $G_nV_m$ (59-61)	361
6.4.2.11 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano [DO3A(O <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> ] $G_nV_m$ (62-64)	363
6.4.2.12 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano [DO3A(O <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> ] $G_n(SCOOMe)_m$ (65-67)	365
6.4.2.13 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano DO3A $G_n(SCOONa)_m$ (68-70)	367
6.4.2.14 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano [DO3A(O <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> ] $G_n(SSO_3Na)_m$ (71-73)	369
6.4.2.15 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano DO3A $G_n(SSO_3Na)_m$ (74-76)	371
6.4.2.16 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano [DO3A(O <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> ] $G_n(SNMe_2.HCl)_m$ (77-79)	372
6.4.2.17 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano [DO3A(O <sup>t</sup> Bu) <sub>3</sub> ] $G_n(SNMe_2)_m$ (80-82)	374
6.4.2.18 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano DO3A $G_n(SNMe_2)_m$ (83-85)	376
6.4.2.19 Síntesis y caracterización de los complejos metálicos de cobre (86-91)	378
<b>6.5 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>380</b>
-----	
<b>CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES</b>	<b>381</b>
-----	
<b>CAPÍTULO 8. SUMMARY AND CONCLUSIONS</b>	<b>389</b>
-----	
<b>8.1 INTRODUCTION .....</b>	<b>391</b>
<b>8.2 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>393</b>
8.2.1 Hyperbranched polymers .....	393
8.2.1.1 Synthesis and characterization	393

8.2.1.2 Biomedical applications	395
8.2.2 Hybrid dendrimers.....	397
8.2.2.1 Synthesis and characterization of spherical dendrimers	398
8.2.2.2 Biomedical applications	402
8.2.3 Carbosilane dendrons with DO3A at the focal point.....	404
8.2.3.1 Synthesis and characterization	404
8.2.3.2 Biomedical applications	406
<b>8.3 CONCLUSIONS .....</b>	<b>408</b>
<b>8.4 BIBLIOGRAPHY .....</b>	<b>412</b>

---

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A continuación se muestra una ordenación alfabética de las abreviaturas que aparecen a lo largo de esta Memoria, con el objetivo de facilitar el seguimiento de los Capítulos, Tablas, Esquemas y Figuras incluidas en ella.

### *Abreviatura*

### *Nombre completo*

18-C-6	18-corona-6
$\lambda$	Longitud de onda
$\delta$	Desplazamiento químico (RMN)
$\tau$	Tiempo de relajación (RSE)
A	Absorbancia, Alilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
Ar	Aromático
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNpi, siARN	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
AZT	Zidovudina (Antiviral VIH)
Boc	terc-Butiloxicarbonilo
bpt	Bipirámide trigonal
°C	Grados Celsius
Anal.	Análisis
c	Cuadruplete
Calc./Exp.	Calculado/experimental
CBS	Carbosilano
CD4	Glicoproteína expresada por algunas células T y células dendríticas
CD <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo deuterado
Cel.	Células
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CMB	Concentración mínima bactericida
CMC	Concentración micelar crítica
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CNTs	Nanotubos de carbono
Col.	Colaboradores
CT	Tomografía computarizada
CXCR4/CCR5	Receptor de quimiocina de tipo 4/ de tipo 5

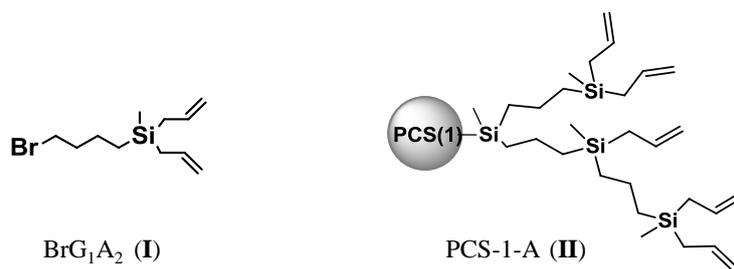
Cy	Ciclen
d	Doblete
D	Unidad dendrítica
D <sub>2</sub> O	Agua deuterada
DB	Grado de ramificación ( <i>Degree of branching</i> )
DBP	Dendrímero basado en átomos de fósforo
DC	Dicroísmo circular
DCM	Diclorometano
DMPA	2,2-Dimetoxi-2-fenilacetofenona
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DOTA	N,N',N'',N'''-tetracarboximetil-1,4,7,10-tetraazociclododecano
DOX	Doxorrobucina
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC/EC <sub>50</sub>	Concentración efectiva a la que se logra un valor porcentual n de inhibición
ELISA	Enzyme-Linked InmunoSorbent Assay
Et <sub>3</sub> N	Trietilamina
Et <sub>2</sub> O	Dietil éter
FITC	Fluoresceína
g, mg, µg	Gramo, miligramo, microgramo
g	Factor de desdoblamiento (RSE)
G <sub>n</sub>	Generación dendrítica
gp	Glicoproteína
HEC-1A	Línea celular derivada de adenocarcinoma humano
HPBs	Polímeros hiperramificados
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
IRM	Imagen de resonancia magnética
L	Unidad lineal
L, mL, µL	Litro, mililitro, microlitro
LMCT/MLCT	Transferencia de carga del ligando al metal/del metal al ligando
m	Multiplete (RMN), masa
M, mM, µM	Molar, milimolar, micromolar
M	Metal
m/z	Masa/carga
MCC	Medio de cultivo completo
Me	Grupo metilo (RMN)

MeOD	Metanol deuterado
MS	Espectrometría de masas
MTT	Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NI	No infectado
NPs	Nanopartículas metálicas
NT	No tratado
PAMAM	Dendrímeros poliamido
PBS	Disolución tampón salina de fosfatos
PCS-1	Matriz polimérica carbosilano
PCS-2	Matriz polimérica con anillos aromáticos en su estructura
PEG	Polietilenglicol
PET	Tomografía de positrón de electrones
pH	Logaritmo negativo de la concentración de $^+H$
Pht	Ftalimida
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
POSS	Poliedros oligoméricos silsequioxanos
PPI	Dendrímeros poli(propilenimina)
ppm	Partes por millón
[Pt]	Catalizador de Karsted
QAS	Sales de amonio cuaternarias
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSE	Resonancia de espín electrónico
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singlete (RMN)
S	Vía tiol-eno
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños
Si	Dendrímeros derivados de $SiCl_4$ o vía hidrosililación
Sida	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
t	Triplete (RMN)
T, t.a.	Temperatura, Unidad terminal, temperatura ambiente
T-20	Fuzeon (antiviral VIH)
TARGA	Terapia antirretroviral de gran actividad
THF	Tetrahidrofurano
TEM	Microscopia de emisión electrónica
TFA	Ácido trifluoroacético

T <sub>g</sub>	Temperatura de transición vítrea
TOCSY	Espectroscopia de correlación total (RMN)
Tol	Tolueno
Trp	Triptófano
UV-VIS	Ultravioleta-visible
V	Volumen, Vinilo
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VHS	Virus del Herpes Simple
X	Grupo funcional periférico
Y	Punto focal
z	Carga

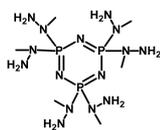
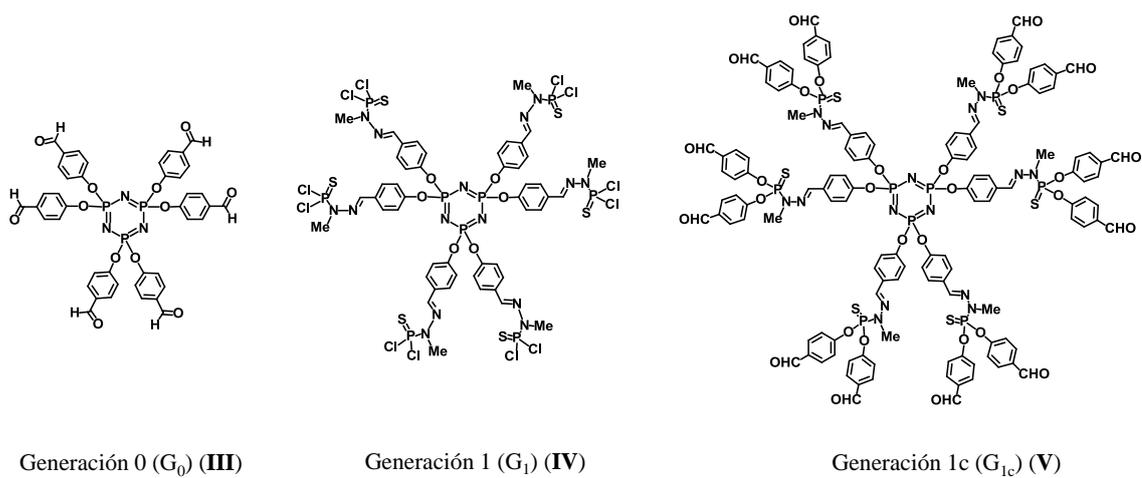
## SISTEMAS PRECURSORES

## CAPÍTULO 2

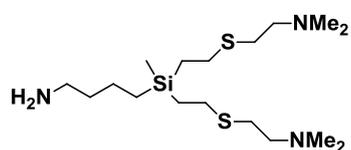


## CAPÍTULO 3

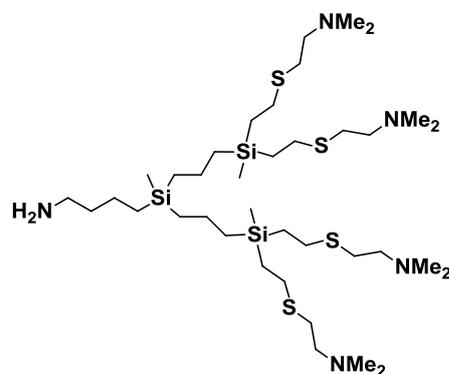
## a) Núcleos basados en átomos de fósforo

 $\text{N}_3\text{P}_3(\text{NMeNH}_2)_6$  (VI)

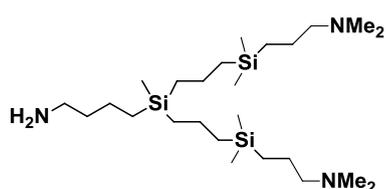
b) Dendrones de tipo carbosilano



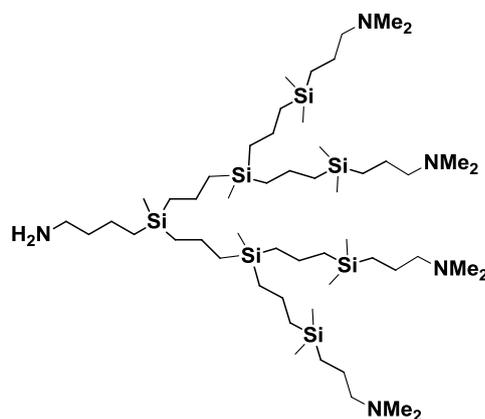
$\text{NH}_2\text{G}_1(\text{SNMe}_2)_2$  (VII)



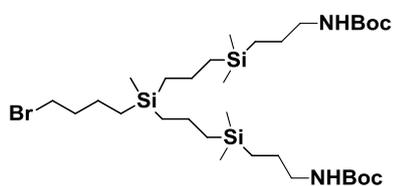
$\text{NH}_2\text{G}_2(\text{SNMe}_2)_4$  (VIII)



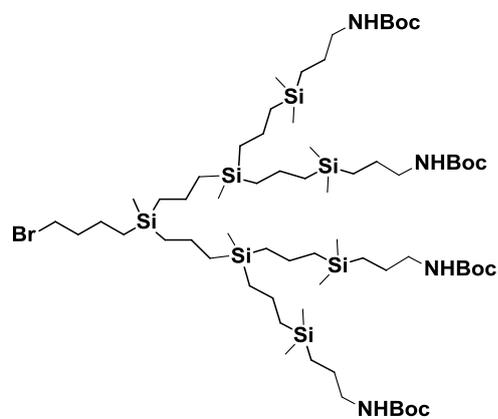
$\text{NH}_2\text{G}_1(\text{SiNMe}_2)_2$  (IX)



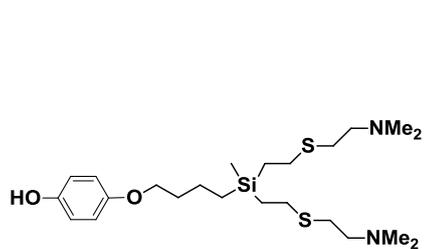
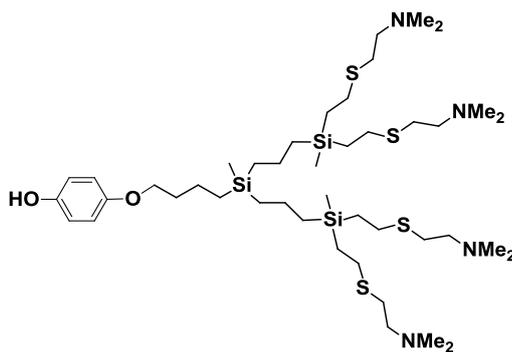
$\text{NH}_2\text{G}_2(\text{SiNMe}_2)_4$  (X)



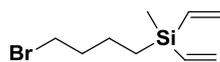
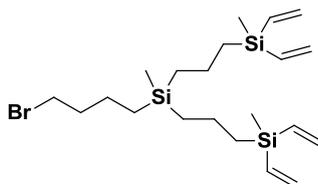
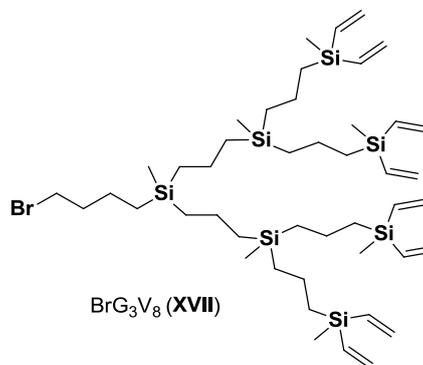
$\text{BrG}_1(\text{SiNHBoc})_2$  (XI)



$\text{BrG}_2(\text{SiNHBoc})_4$  (XII)

OH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-G<sub>1</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (XIII)OH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-G<sub>2</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>4</sub> (XIV)

## CAPÍTULO 4

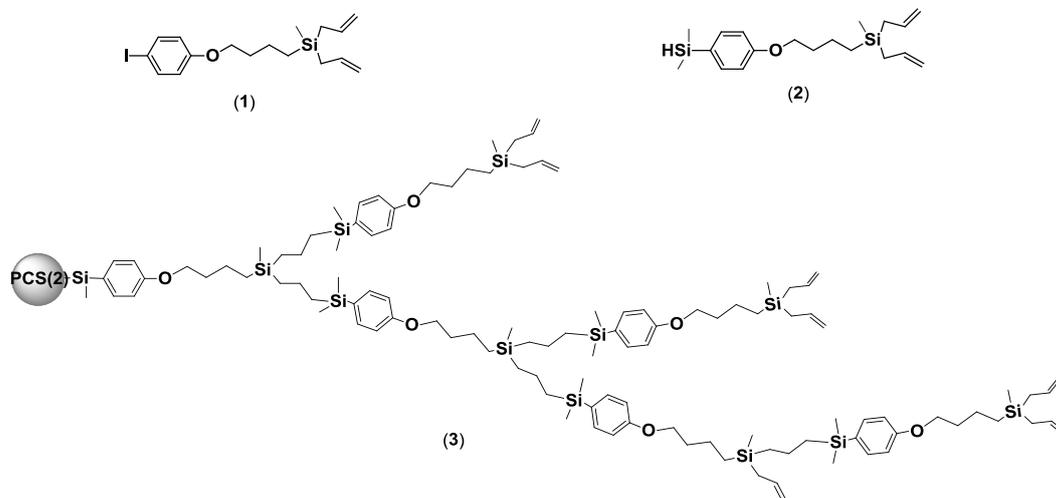
BrG<sub>1</sub>V<sub>2</sub> (XV)BrG<sub>2</sub>V<sub>4</sub> (XVI)BrG<sub>3</sub>V<sub>8</sub> (XVII)



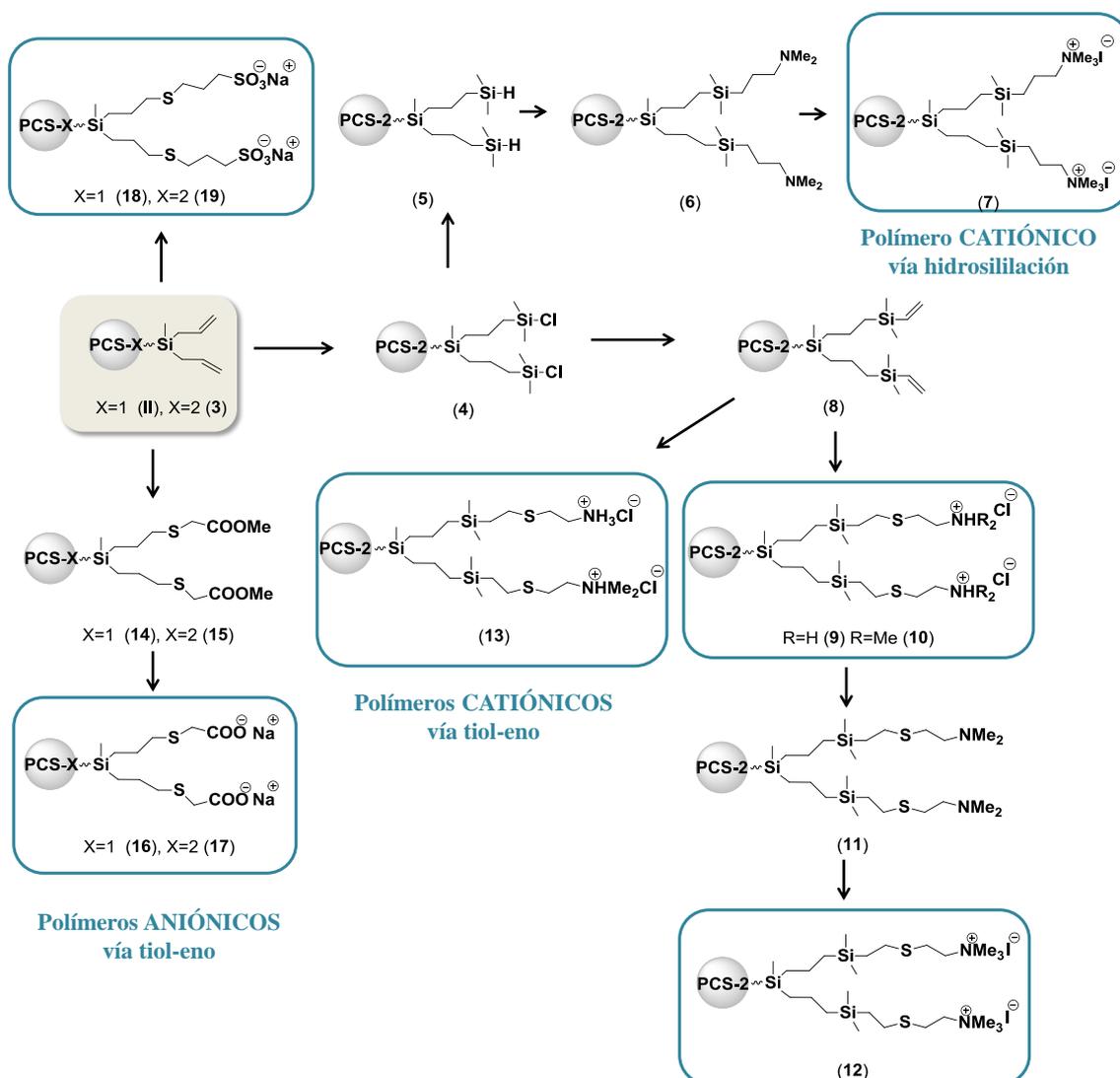
# ÍNDICE DE COMPUESTOS

## CAPÍTULO 2

### a) Matriz polimérica

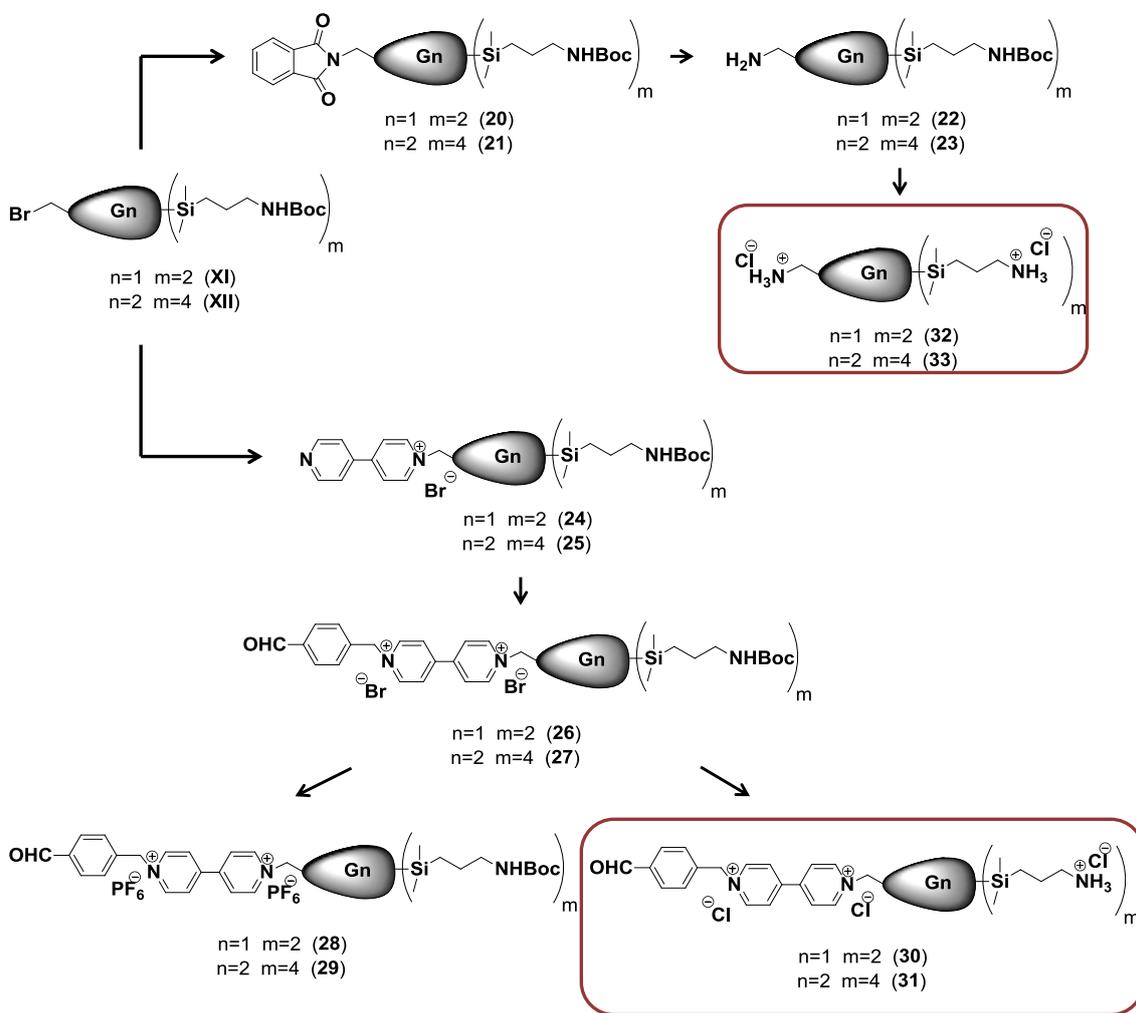


### b) Funcionalización de las matrices

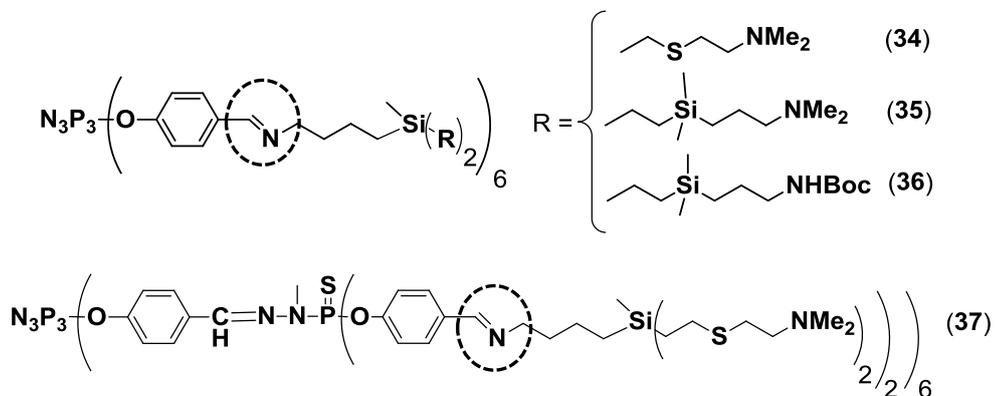


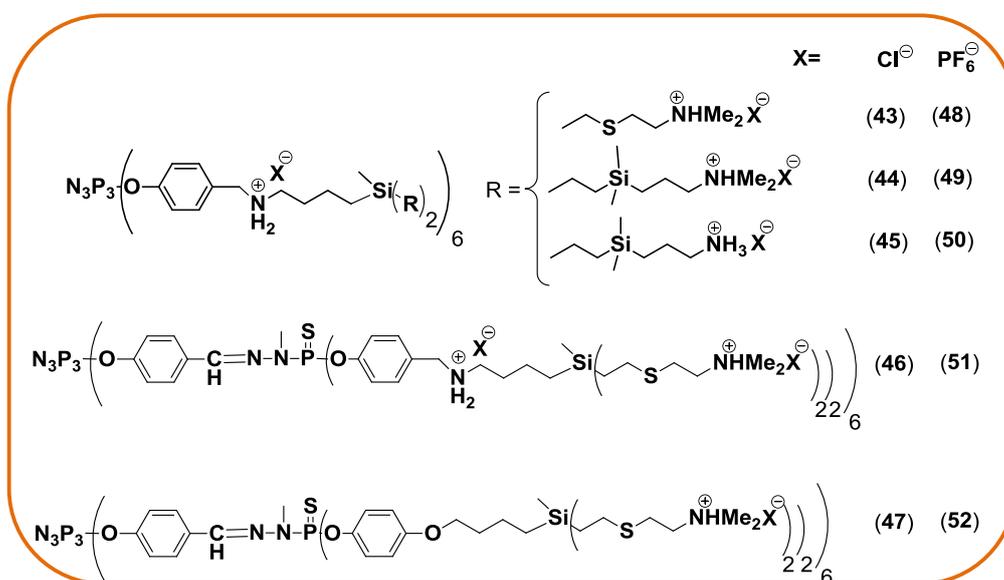
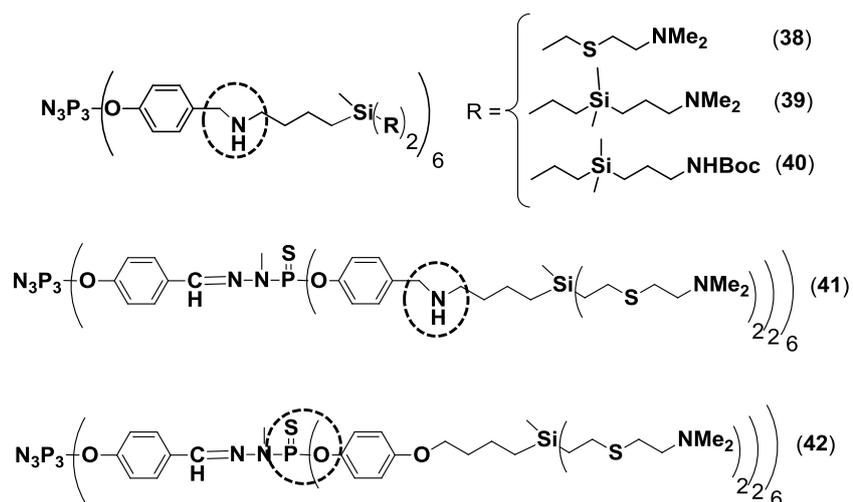
**CAPÍTULO 3**

*c) Cuñas de tipo carbosilano*

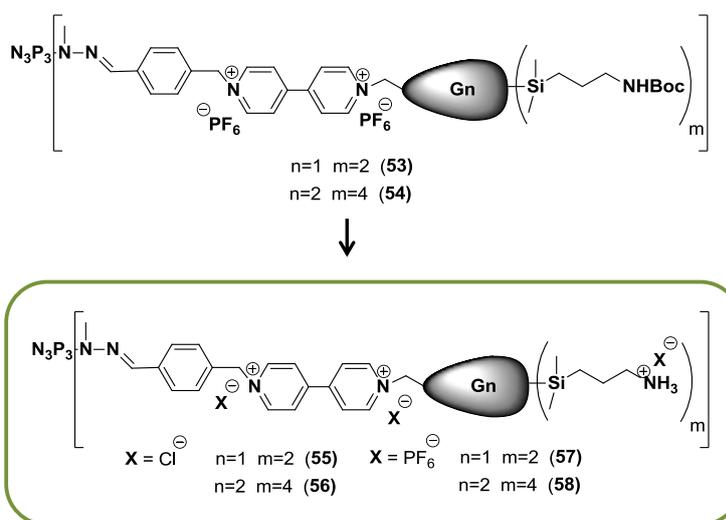


*d) Dendrímeros híbridos fósforo-carbosilano*

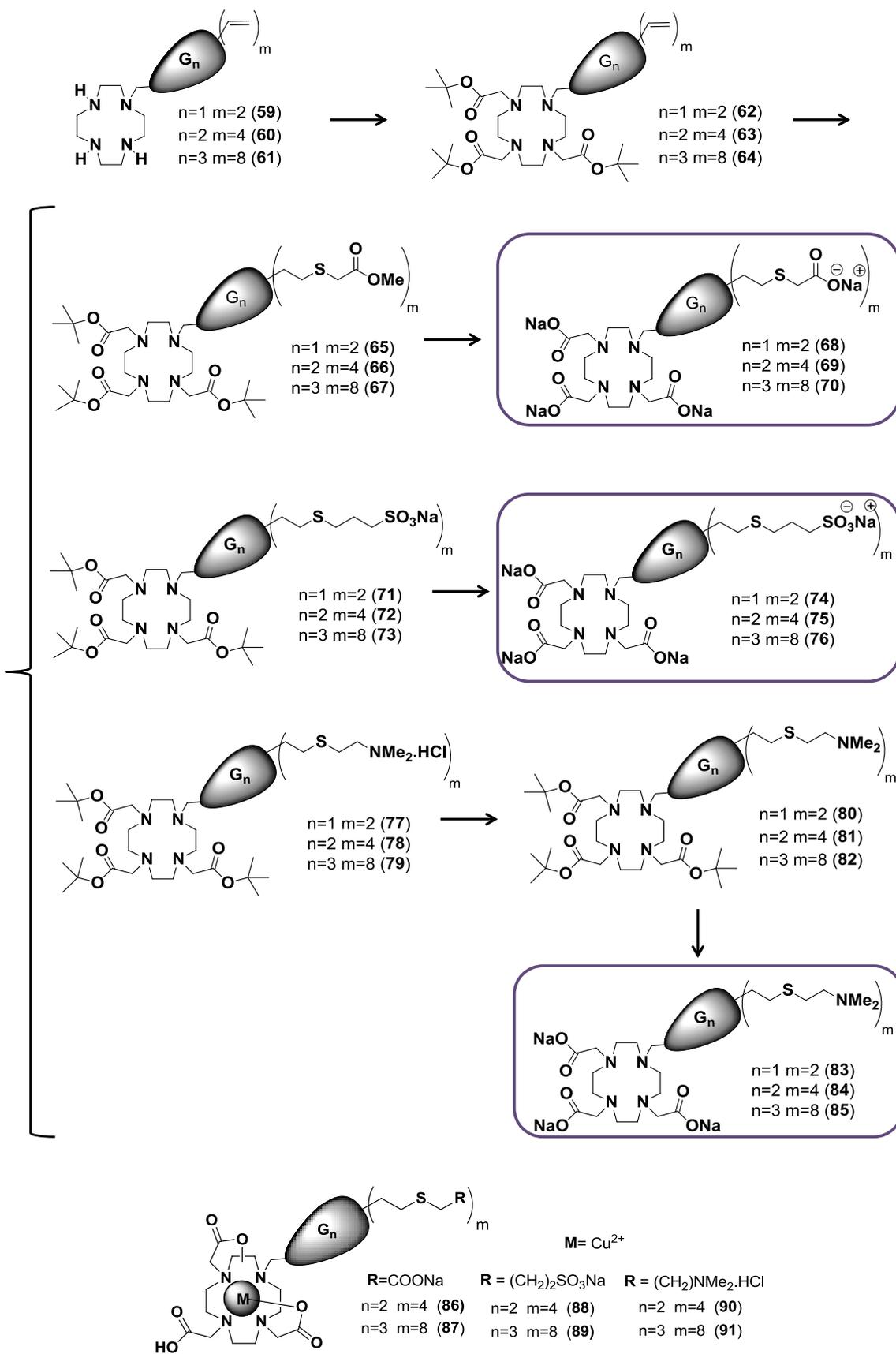




e) *Dendrimeros híbridos fósforo-viológeno-carbosilano*



CAPÍTULO 4



## **PRESENTACIÓN**

En las últimas tres décadas se recogen multitud de trabajos acerca de la síntesis, caracterización y aplicabilidad de los denominados sistemas dendríticos. El interés por dichas macromoléculas se produjo sobre todo por la posibilidad de situar muchos grupos funcionales cercanos, los cuales pueden ser posteriormente modificados. Este tipo de compuestos ha atraído la atención tanto de la investigación básica como de la investigación orientada a aplicaciones tecnológicas. Por ello, nuestro grupo de investigación lleva un tiempo centrando sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos sistemas dendríticos de estructura carbosilano, que posean aplicaciones en el ámbito de la biomedicina. En concreto, a través de la introducción de grupos iónicos en la periferia dendrítica se ha avanzado hacia la preparación de compuestos con actividad biocida, con propiedades antivirales, así como agentes de transporte no viral de ácidos nucleicos y como transportadores de fármacos.

El trabajo recogido en esta Tesis Doctoral se encuadra dentro de los esfuerzos realizados por explorar nuevas estrategias sintéticas capaces de generar nuevos sistemas dendríticos (polímeros hiperramificados, dendrímeros híbridos y cuñas dendríticas bifuncionalizadas) que puedan actuar en diferentes aplicaciones biomédicas. Este trabajo es fruto de un proyecto de investigación del grupo BioInDen de la Universidad de Alcalá, en el que han colaborado el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá, el grupo de Inmunobiología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid), el Departamento de Biofísica de la Universidad de Łódz (Polonia), el Laboratorio de Resonancia de Espín Electrónico, del Departamento de Ciencias de la Tierra, la Vida y el Medio Ambiente (DiSTeVA) de la Universidad de Urbino (Italia) y el Instituto de Biología Química y Medicina Fundamental (ICBFM) de la Rama Siberiana de la Academia de Ciencias Rusa, en Novosibirsk (Rusia).

Parte de este trabajo se realizó en una estancia pre-doctoral realizada por la autora de esta Memoria en el laboratorio de Toulouse, bajo la dirección de los profesores Jean-Pierre Majoral y Anne-Marie Caminade (ver Capítulo 3). La

realización de una estancia de tres meses de duración, es una condición necesaria según la normativa vigente que rige los estudios de doctorado internacional.

## **OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta la experiencia demostrada de nuestro grupo de investigación en la síntesis de macromoléculas dendríticas, junto con el interés en la búsqueda de nuevas terapias y tratamientos para combatir diversas enfermedades, los objetivos de este proyecto son los siguientes:

### ➤ **Objetivo general**

Sintetizar y caracterizar nuevos sistemas dendríticos solubles en agua de estructura carbosilano de diferentes topologías con grupos iónicos periféricos, y evaluar su actividad como agentes de transporte no viral así como agentes terapéuticos.

### ➤ **Objetivos particulares**

- I.** Sintetizar y caracterizar nuevos polímeros hiperramificados iónicos a través de diferentes metodologías sintéticas y comparar sus propiedades biomédicas con sus dendrímeros análogos.
- II.** Diseñar un procedimiento sintético para preparar sistemas híbridos mediante una estrategia “*onion-peel*”, con la finalidad de buscar sinergias entre las prestaciones biomédicas demostradas por cada bloque de construcción.
- III.** Sintetizar y caracterizar dendrones de tipo carbosilano conteniendo el ligando DOTA en el punto focal y diferentes grupos iónicos en la periferia que puedan generar solubilidad al sistema o incluso proporcionen una actividad terapéutica.
- IV.** Introducir diferentes metales en el ligando DOTA que puedan proporcionar sinergias o funciones complementarias con los grupos funcionales periféricos en diferentes aplicaciones biomédicas, tales como diagnóstico o actividad antibacteriana y antiviral.

## DISTRIBUCIÓN DE LA MEMORIA

El trabajo realizado en cada una de estas etapas se describirá en la Memoria de acuerdo a la siguiente distribución:

En el **Capítulo 1** se hace una breve revisión general sobre las diferentes estructuras dendríticas, el avance en el diseño sintético de nuevos sistemas de éste tipo, así como sus aplicaciones biomédicas más relevantes.

En el **Capítulo 2** se aborda en primer lugar la síntesis y caracterización de una nueva matriz polimérica con unidades aromáticas en su estructura. A continuación se recoge la síntesis y caracterización estructural de polímeros iónicos a través de reacciones de hidrosililación o *click* tiol-eno.

En el **Capítulo 3** se aborda la síntesis y caracterización de nuevos dendrímeros híbridos. En primer lugar, sistema fósforo carbosilano, y en segunda lugar, se introduce un tercer bloque de construcción, el fragmento viológeno.

En el **Capítulo 4** se aborda la síntesis y caracterización de dendrones carbosilano bifuncionalizados, los cuales poseen el ligando DO3A en el punto focal y diferentes grupos iónicos en la periferia. Posteriormente se han estudiado los modos de coordinación de los diferentes sistemas sintetizados utilizando cobre como sonda.

En el **Capítulo 5** se presentan los ensayos biomédicos realizados para cada tipo de sistema abordado en los capítulos anteriores. Principalmente se han estudiado como agentes antibacterianos, agentes transfectantes y antivirales frente a la infección por VIH.

En el **Capítulo 6** se describen las preparaciones de los nuevos compuestos preparados, así como las condiciones generales de trabajo experimental y las técnicas de identificación estructural y análisis.

En el **Capítulo 7** a modo de conclusiones se destacan los resultados más relevantes de este trabajo.

Finalmente, y de acuerdo con la normativa vigente que rige los estudios de doctorado internacional, se añade un resumen en inglés del trabajo presentado y las conclusiones extraídas del mismo (**Summary and Conclusions**).

La **Bibliografía** empleada en cada uno de los Capítulos se puede encontrar al final de los mismos.

# **CAPÍTULO 1**

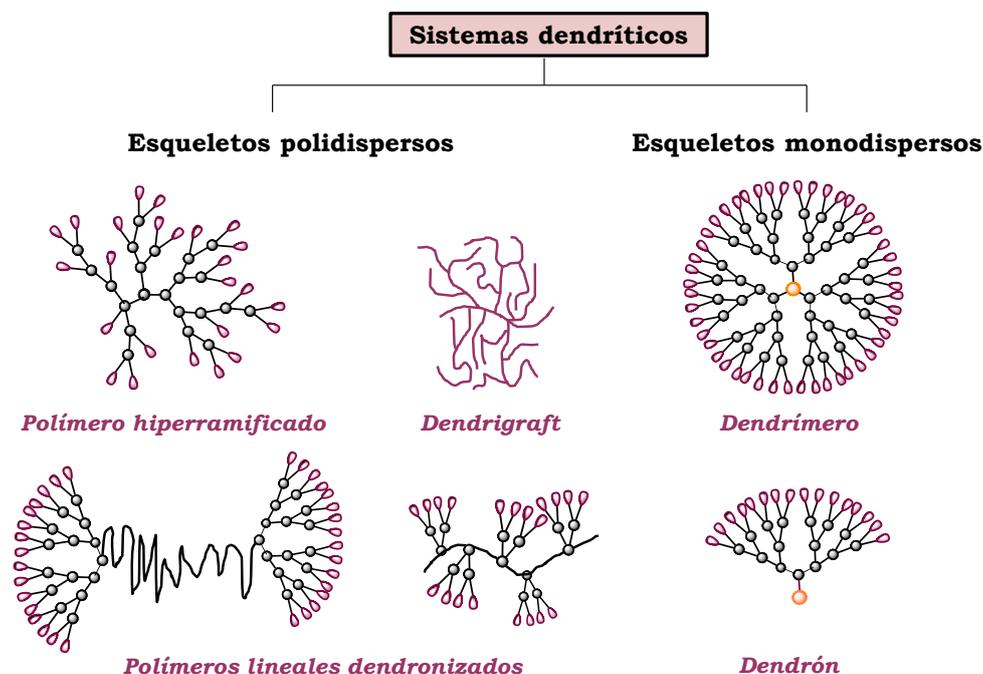
---

## **INTRODUCCIÓN**



## 1.1 ESTRUCTURAS DENDRÍTICAS

Durante las últimas tres décadas se han publicado multitud de trabajos acerca de la síntesis, caracterización y aplicabilidad de los denominados sistemas dendríticos. Estas macromoléculas son de tamaño nanoscópico y aspecto arborescente, y presentan unas propiedades con un potencial que no se encuentran en otros materiales, tales como una alta densidad, baja viscosidad, y un gran número de grupos funcionales terminales, los cuales pueden ser posteriormente modificados. La primera síntesis de este tipo de sistemas esféricos y globulares se publicó en 1978 por Vögtle,<sup>1</sup> quien denominó a este nuevo tipo de sistemas “moléculas cascada” haciendo alusión a su síntesis iterativa.



**Figura 1.1** Estructura simplificada de los diferentes sistemas dendríticos.

Dentro de los sistemas dendríticos hay diferentes subconjuntos. Todos ellos se caracterizan por poseer un alto grado de ramificación, pero se diferencian en el grado de ordenación de su esqueleto. Se pueden dividir fundamentalmente en dos grupos principales: (i) esqueletos polidispersos, donde se encuentran los polímeros hiperramificados, dendrigrfts y polímeros dendronizados, y (ii)

esqueletos monodispersos tales como los dendrímeros y dendrones (Figura 1.1). En particular, los polímeros dendronizados se consideran una situación intermedia debido a su síntesis semi-controlada, se construyen mediante la incorporación de dendrones sobre un polímero lineal polidisperso. Por esta razón, esta familia se incluirá dentro de las aplicaciones de los dendrones, la cual se tratará en detalle más adelante (ver apartado 1.2.2).

### 1.1.1 Sistemas polidispersos

Si una determinada aplicación requiere una gran cantidad de producto y/o una elevada funcionalidad, pero no una alta precisión estructural, se pueden proponer sistemas dendríticos polidispersos como una alternativa viable y económica frente a los derivados monodispersos.

#### *a) Polímeros hiperramificados*

Estos sistemas se sintetizan de forma sencilla, generalmente en un único paso de reacción. Sin embargo, el control en la precisión de su peso molecular y sus ramas es limitado, obteniéndose moléculas irregulares y polidispersas.

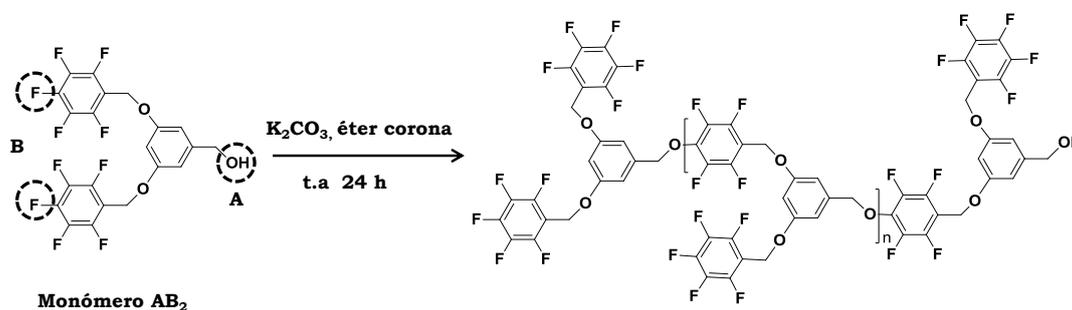
Ya en 1952, Flory propuso la teoría de que polímeros altamente ramificados podían ser preparados mediante una simple condensación de monómeros  $AB_x$ ,<sup>2</sup> pero se tuvo que esperar hasta 1988 para que Kim y Webster publicaran la primera síntesis intencionada de un verdadero polímero hiperramificado.<sup>3</sup>

Existe una gran variedad de rutas sintéticas para obtener sistemas de este tipo, pero éstas se pueden dividir en dos categorías principales. La primera incluye estrategias sintéticas con un único tipo de monómero  $AB_x$  y la segunda consiste en procedimientos sintéticos donde se pueden utilizar más de un tipo de monómeros. Las metodologías sintéticas más significativas son:

#### *I. Policondensación de monómeros $AB_x$*

A modo de ejemplo, se propone la síntesis de un polímero ramificado altamente fluorado a partir de la policondensación de un monómeros  $AB_2$  (Esquema 1.1). La policondensación consiste en la sustitución nucleófila entre el

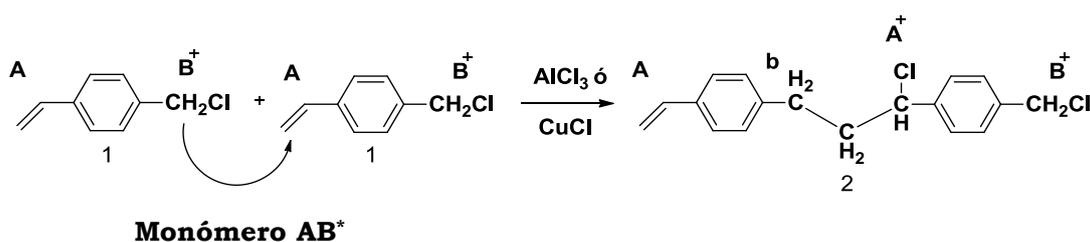
alcohol bencílico y el derivado fluorado en presencia de carbonato de potasio y éter corona.<sup>4</sup>



**Esquema 1.1** Ejemplo de síntesis de un polímero hiperramificado mediante una reacción de policondensación de un monómero AB<sub>2</sub>.

## II. Polimerización mediante auto-condensación de grupos vinilo (SCVP)

Este tipo de reacciones consiste en utilizar monómeros de tipo AB\*, dónde B\* es un grupo capaz de iniciar la polimerización mediante la adición al grupo vinilo A. En el Esquema 1.2 se muestra la reacción de iniciación, dónde se genera un dímero con dos sitios activos (A\* y B\*) y un doble enlace (A). A partir de esta especie, tanto A\* como B\* pueden reaccionar con otro grupo vinilo de otra molécula (monómero o polímero), obteniéndose así el polímero hiperramificado.<sup>5</sup>



**Esquema 1.2** Ejemplo de la etapa de iniciación para la síntesis de un polímero hiperramificado mediante una reacción de tipo SCVP.

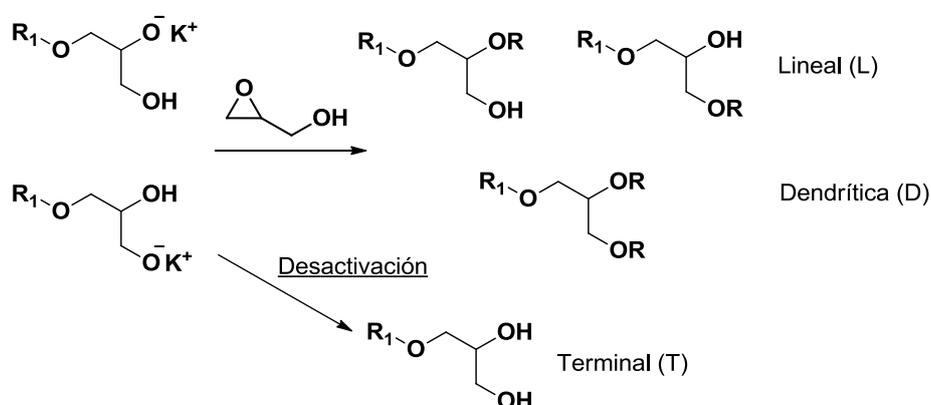
### III. Polimerización hiperramificada mediante apertura de anillo (ROMBP)

Aquí se propone la polimerización del monómero glicidol para generar un polímero hiperramificado. Para ello, se debe utilizar un fotoiniciador adecuado y una adicción lenta del glicidol para favorecer las ramificaciones (Esquema 1.3).<sup>6</sup>

Etapa de iniciación



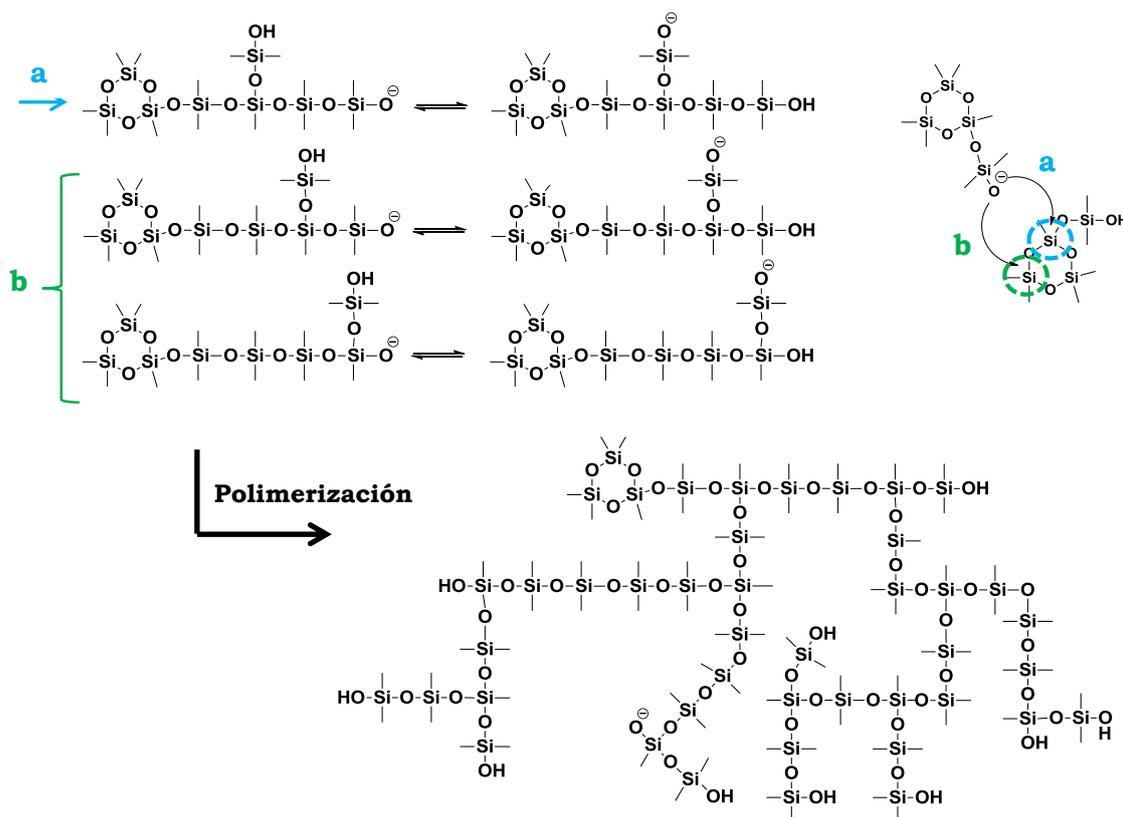
Etapa de propagación



**Esquema 1.3** Ejemplo de síntesis de un polímero hiperramificado mediante una reacción de tipo ROMBP.

### IV. Polimerización mediante transferencia de protones (PTP)

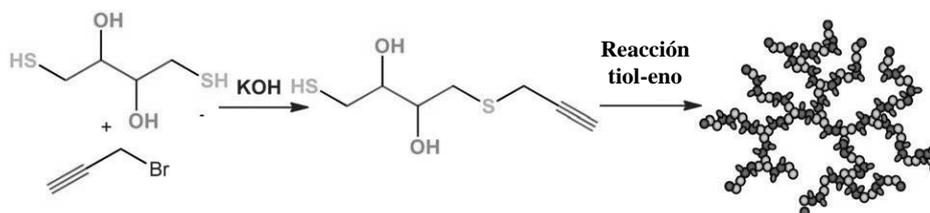
Este tipo de reacción es similar a las polimerizaciones por apertura de anillo descritas en el apartado anterior. La principal diferencia entre ellas es que la base utilizada en este caso presenta un catión de mayor tamaño (superbase). Esto favorece la transferencia rápida de protones dando lugar a un gran número de equilibrios, produciéndose como consecuencia un mayor número de ramificaciones (Esquema 1.4).<sup>7</sup>



**Esquema 1.4** Ejemplo de síntesis de un polímero hiperramificado mediante una reacción de tipo PTP.

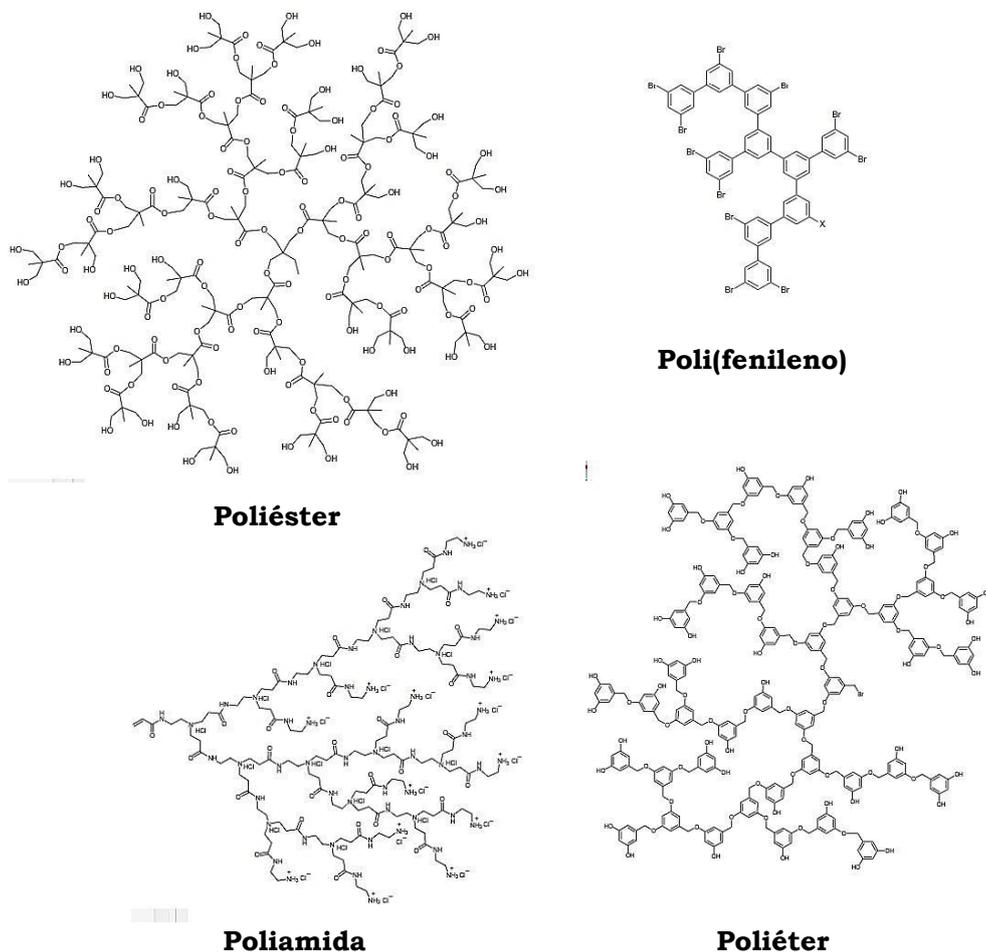
### V. Polimerización mediante reacciones click

Actualmente, se pueden encontrar muchos trabajos donde se están utilizando diferentes reacciones click para generar interesantes polímeros hiperramificados.<sup>8</sup> En el Esquema 1.5 se muestra un ejemplo dónde utilizan un derivado con dos grupo tiol y otro derivado con un grupo alquino para llevar a cabo una reacción tiol-ino.<sup>9</sup>



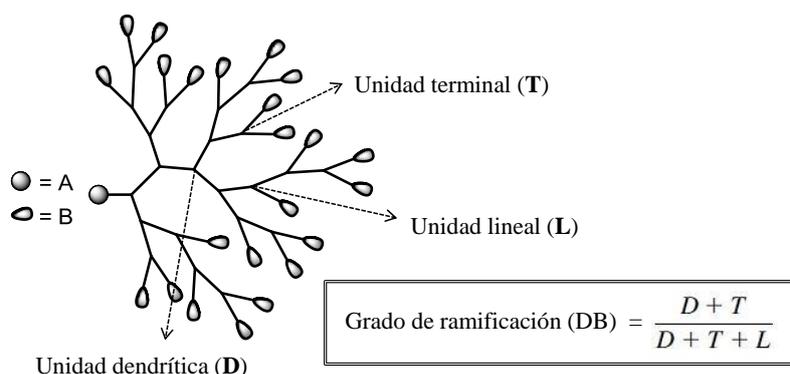
**Esquema 1.5** Ejemplo de síntesis de un polímero hiperramificado mediante el uso de la reacción click tiol-ino.

Algunos ejemplos de polímeros hiperramificados son del tipo poli(fenilenos),<sup>10</sup> policarbosilanos,<sup>11</sup> poliamidas,<sup>12</sup> poliésteres<sup>13</sup> o poliéteres<sup>14</sup> (Figura 1.2), los cuales han sido sintetizados por las diferentes estrategias sintéticas anteriormente mencionadas.



**Figura 1.2** Diferentes esqueletos de polímeros hiperramificados.

El grado de ramificación (*degree of branching*, DB) y la distribución de sus pesos moleculares son parámetros clave para la caracterización de este tipo de sistemas. El parámetro DB está relacionado con la estructura del polímero y con el número de grupos terminales presentes. Por ejemplo, para polímeros basados en monómeros de tipo AB<sub>2</sub>, el valor de DB se calcula utilizando la ecuación de Frey,<sup>15</sup> para la cual es necesario conocer el número de unidades terminales (T), lineales (L) y dendríticas (D) del polímero obtenido (Figura 1.3).



**Figura 1.3** Estructura simplificada de un polímero hiperramificado y cálculo del parámetro DB.

Existen trabajos donde ha sido posible modificar este parámetro simplemente variando las condiciones de reacción,<sup>16</sup> ya que el DB está íntimamente relacionado con las propiedades del sistema. Algunas de las propiedades dependientes son la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), el grado de cristalinidad, la capacidad de encapsulación, la fuerza mecánica y biocompatibilidad, entre otras.<sup>17</sup> Por lo que se puede diseñar un polímero con un determinado grado de ramificación para obtener distintas propiedades.

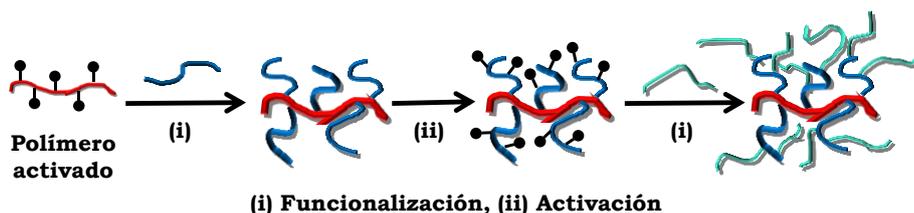
### *b) Dendrigrafts*

Los dendrigrafts son los últimos sistemas dendríticos que han sido descubiertos, y por ello, es el subconjunto menos explorado en la actualidad. Estas macromoléculas generalmente son más grandes que los dendrímeros, ya que en cada etapa de crecimiento se amplifican drásticamente el número de grupos superficiales, aumentando notablemente el tamaño del polímero. La estrategia sintética empleada para la construcción de este tipo de sistemas es similar a la de un dendrímero. Igualmente, se utilizan pasos iterativos, considerando cada etapa de crecimiento como una generación, con la diferencia que en este caso en vez de introducir monómeros, se introducen oligómeros u otros polímeros. Esto permite introducir en cada etapa diferentes tamaños de polímeros. Los primeros trabajos fueron publicados en 1991, casi paralelamente por el grupo de Tomalia<sup>18</sup> y el de Gauthier y Möller.<sup>19</sup>

Estos sistemas pueden ser sintetizados mediante tres estrategias diferentes:

### I. Estrategia *grafting onto*

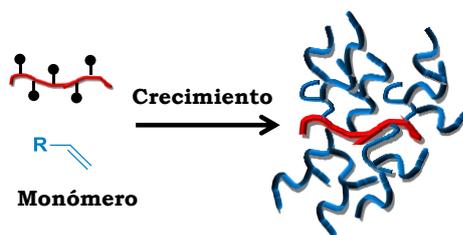
Se trata de una metodología divergente, en la cual se introducen sitios de acoplamiento en un polímero lineal y luego se van acoplando los distintos polímeros. Esta síntesis permite que la estructura de estos sistemas sea totalmente caracterizada en términos de peso molecular, ya que se puede conocer el número de cadenas laterales introducidas en cada generación, y la separación media entre los puntos de ramificación. Por esta razón, es la ruta más ampliamente utilizada.



**Esquema 1.6** Síntesis de dendrigrafts mediante la estrategia *grafting onto*.

### II. Estrategia *grafting from*

Este tipo de estrategia también se basa en un método divergente, pero en este caso, se introducen sitios de iniciación en el polímero lineal, y desde esos puntos por adición de monómero se logra el crecimiento de las cadenas. La caracterización completa en este caso no es posible, ya que no se puede conocer el número de cadenas laterales introducidas.

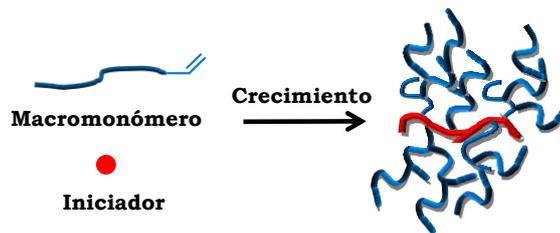


**Esquema 1.7** Síntesis de dendrigrafts mediante la estrategia *grafting from*.

### III. Estrategia *grafting through*

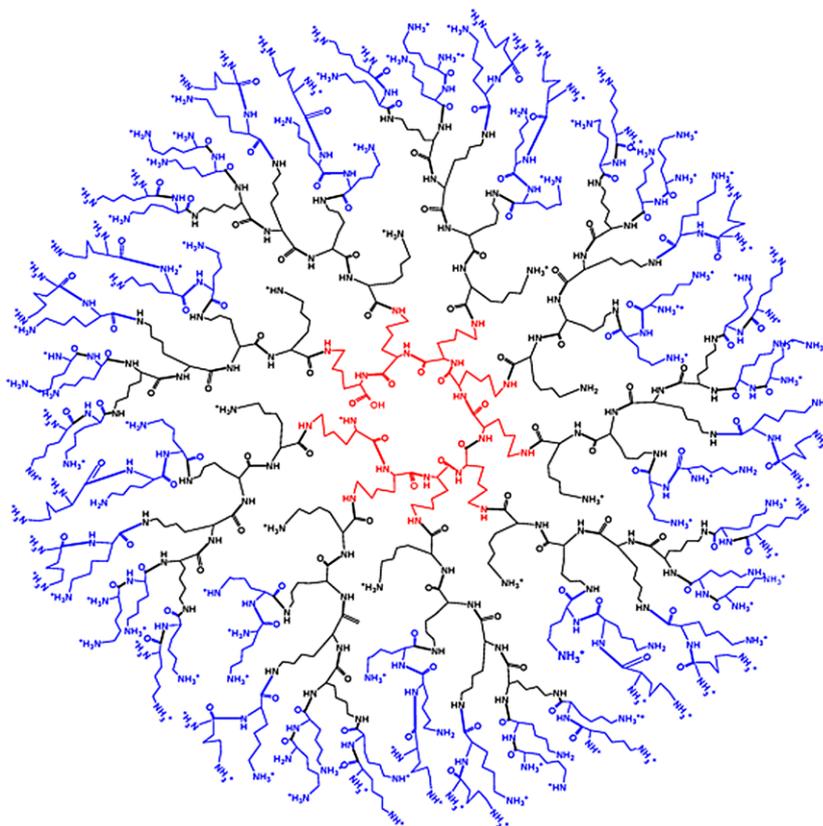
Esta metodología se basa en una síntesis convergente, la cual se realiza en un paso de reacción, similar a los polímeros hiperramificados. Para ello, se

necesita un monómero bifuncionalizado, el cual mediante sucesivas reacciones de acoplamiento, va generando la molécula ramificada.<sup>20</sup>



**Esquema 1.8** Síntesis de dendrigrafts mediante la estrategia *grafting through*.

Los ejemplos más representativos son los denominados Combburst (PEOX)<sup>18</sup> y los poliestirenos arborescentes.<sup>19</sup> Los dendrigrafts basados en poli-L-lisina han tenido gran impacto sobre todo en el campo de la biomedicina (Figura 1.4).<sup>21</sup>

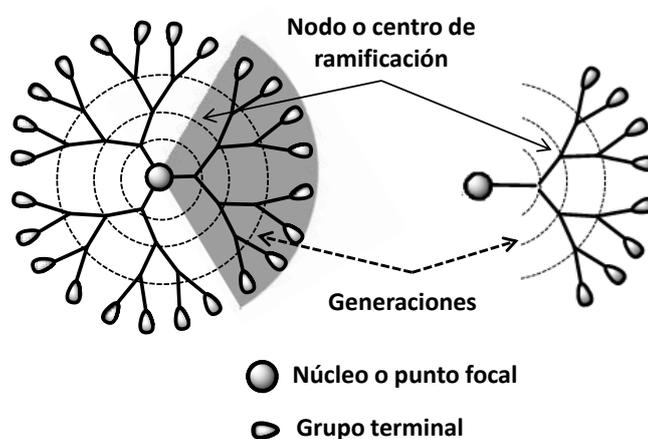


**Figura 1.4** Ejemplo de un dendrigraft de poli-L-lisina.

### 1.1.2 Sistemas monodispersos

Dentro de esta familia se pueden diferenciar dos tipos de topologías, los dendrímeros y los dendrones, siendo la principal diferencia su disposición estructural (Figura 1.5). Los dendrímeros se generan desde un núcleo en todas las direcciones con unidades repetidas, dando lugar a estructuras tridimensionales, monodispersas y globulares. En cambio, los dendrones se construyen desde un punto focal en una única dirección, dando lugar a una estructura tridimensional que se asemeja a una cuña, por lo que también son denominados cuñas dendríticas. Estos dos términos, dendrón y cuña dendrítica, serán utilizados en el texto indistintamente para referirse a este tipo de compuesto dendrítico de ahora en adelante.

Estos dos tipos de derivados de manera global presentan las mismas características, aplicaciones y rutas de síntesis, por lo que serán detalladas de forma conjunta. Además, por su topología, los dendrones se pueden considerar como un fragmento de un dendrímero.



**Figura 1.5** Estructura esquematizada de un dendrímero y un dendrón.

Estos sistemas poseen tres componentes fundamentales en su estructura:<sup>22</sup>

- i. Un núcleo multifuncional en el caso de los dendrímeros, el cual puede ser la unidad de ramificación o poseer una función específica. En el caso

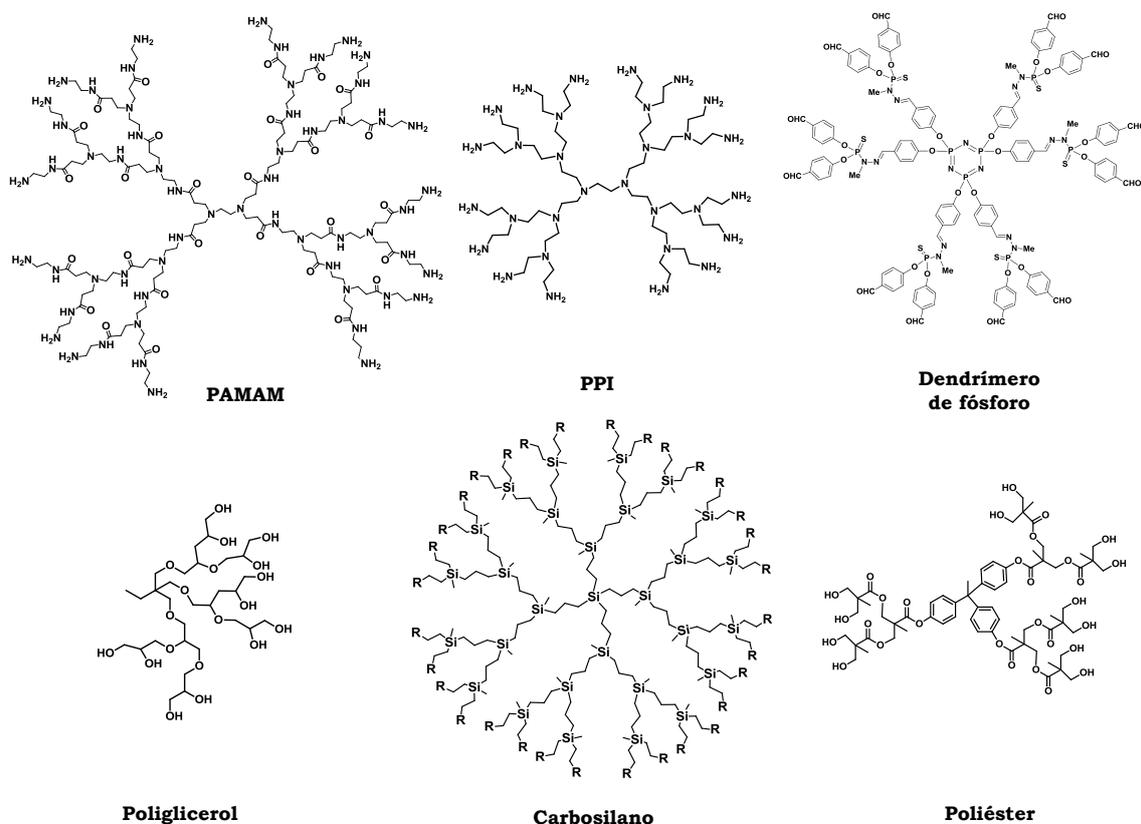
particular de los dendrones éste se denomina punto focal, el cual puede ser un grupo funcional o una molécula de interés.

- ii. Una estructura interna altamente ramificada que se puede dividir en distintas capas según van apareciendo los puntos de ramificación. A medida que se va construyendo el dendrímero, se genera una molécula similar a la anterior con un mayor número de grupos terminales. Con el fin de poder distinguir estas moléculas análogas surge el término generación, que hace referencia al número de veces que se repite el proceso de aumentar el número de funciones de la molécula, es decir, el de número de ramificaciones. Esta estructura interna, junto al núcleo, será la responsable de la flexibilidad o rigidez y en general, de la topología de la molécula.
- iii. Los grupos terminales. La naturaleza de los grupos funcionales periféricos son los que van a determinar en gran medida la solubilidad y la futura aplicación de estas macromoléculas. La multivalencia debida a la presencia de este número de grupos puede ofrecer sinergias, también conocida como efecto dendrítico o efecto “cluster”,<sup>23</sup> que supone un aumento de la actividad mayor que la suma del efecto de cada grupo funcional aislado.

Es importante destacar que la flexibilidad de la estructura interna de los dendrímeros puede determinar la disposición de los grupos terminales. Dendrímeros formados por cadenas muy flexibles permiten que las ramas puedan doblarse hacia el interior dendrítico evitando que los grupos funcionales se encuentren expuestos hacia la periferia (efecto denominado en inglés como *back-folding*), impidiendo así la formación de huecos en su estructura o la obtención de moléculas con una superficie homogénea.<sup>24</sup> Sin embargo, en aquellos dendrímeros con estructuras internas más rígidas al limitarse el plegamiento de las ramas hacia el interior de la molécula, los grupos periféricos se encuentran totalmente expuestos hacia la superficie dendrítica.<sup>25</sup>

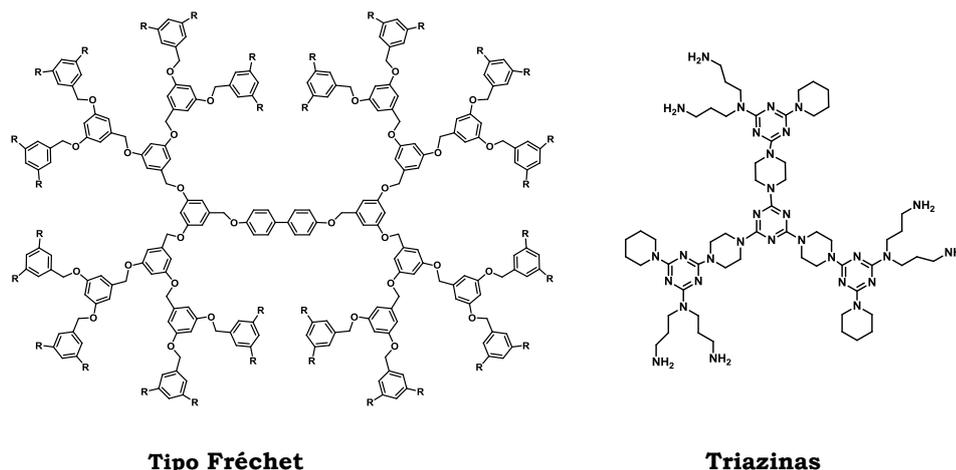
En la actualidad, se puede encontrar un amplio abanico de dendrímeros con diferentes esqueletos internos que han demostrado propiedades interesantes en diversos campos de la ciencia.

Algunos de los dendrímeros mas estudiados son los basados en poli(amidoamina) o PAMAM,<sup>26</sup> poli(propilenimina) o PPI,<sup>27</sup> carbosilano,<sup>28</sup> dendrímeros de fósforo,<sup>29</sup> poliglicerol<sup>30</sup> o poliéster<sup>31</sup> (Figura 1.6). Estos dendrímeros presentan un esqueleto interno altamente flexible.



**Figura 1.6** Ejemplos de dendrímeros y dendrones con esqueletos internos flexibles.

Sin embargo, se han diseñado otros tipos de dendrímeros que apuestan por una estructura más rígida (Figura 1.7), los cuales normalmente se consiguen mediante la introducción de anillos aromáticos. Los más conocidos son los de tipo Fréchet,<sup>32</sup> o los basados en triazinas.<sup>33</sup>



**Figura 1.7** Ejemplos de dendrímeros con esqueletos internos rígidos.

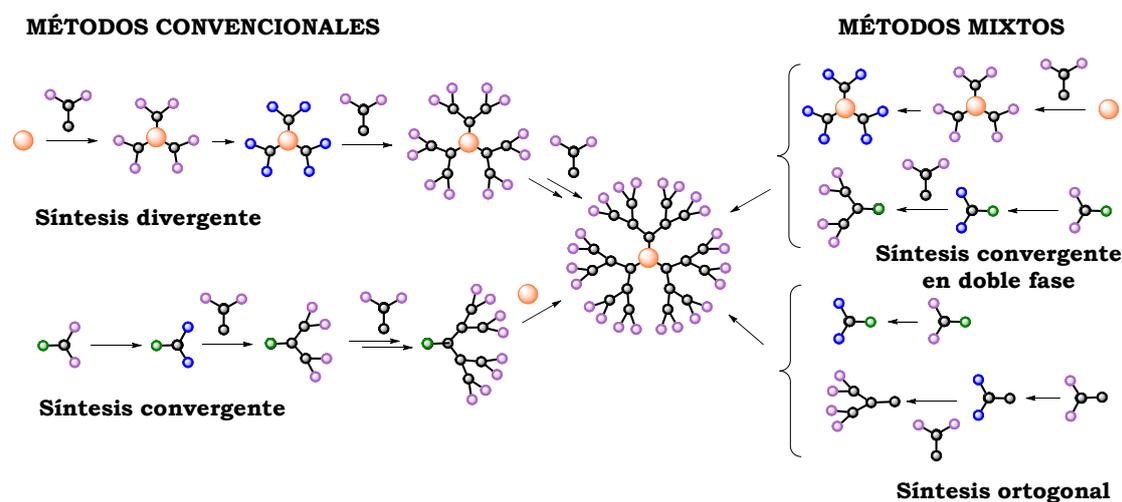
Los sistemas dendríticos pueden ser construidos mediante una amplia variedad de rutas sintéticas. Es muy importante que las reacciones implicadas en su construcción sean rápidas, eficientes y que no precisen métodos de purificación demasiado complejos, de manera que su repetición permita acceder a sistemas de generaciones superiores con relativa sencillez y rendimientos adecuados.

Las principales estrategias por las cuales se construye el esqueleto dendrítico son dos: divergente y convergente, además de diversas combinaciones de las mismas, denominadas metodologías mixtas o de síntesis acelerada (Esquema 1.9).<sup>34</sup>

La síntesis divergente es una metodología en la que, partiendo de un núcleo multifuncional, se llevan a cabo los pasos de reacción necesarios para el crecimiento del dendrímero, e ir así aumentando la generación. Es decir, la estructura se va construyendo partiendo del interior y acercándose al exterior. Las principales ventajas de la síntesis divergente son la obtención de un esqueleto de gran tamaño, que permite la separación del producto final de los monómeros utilizados en el proceso de reacción, así como la utilización de reacciones iterativas que pueden permitir, en un principio, la automatización del proceso. Sin embargo, la utilización de la metodología divergente facilita la aparición de defectos en la estructura dendrítica producidos al no completarse la

reacción en la periferia. Ello se debe a la saturación de la superficie en generaciones superiores o al plegamiento de las ramas hacia el interior pudiendo ocultar los grupos y por ello dificultar la reactividad de los mismos.

La metodología convergente consiste en el acoplamiento de dendrones a un determinado núcleo, construyéndose así la macromolécula dendrítica de fuera hacia dentro. Esta metodología permite la funcionalización eficaz de dendrímeros evitando la formación de defectos y la utilización de grandes excesos de monómeros para que se complete la reacción. Sin embargo, la síntesis de dendrímeros aplicando esta metodología está limitada a bajas generaciones, pues el alto impedimento estérico en las generaciones superiores dificulta el acoplamiento final al núcleo dendrítico.



**Esquema 1.9** Métodos de síntesis de estructuras dendríticas.

Los inconvenientes encontrados en las metodologías clásicas, han forzado la aparición de nuevas estrategias sintéticas que puedan subsanar, al menos parcialmente, los problemas encontrados para las mismas.<sup>35</sup>

Entre dichas metodologías se puede destacar la síntesis convergente en doble fase, la cual combina las metodologías convergente y divergente. En estos procesos, se hacen reaccionar un dendrímero de baja generación con una cuña que contiene un punto reactivo capaz de unirse a dicho dendrímero, obteniéndose así un crecimiento de la esfera dendrítica más rápido.

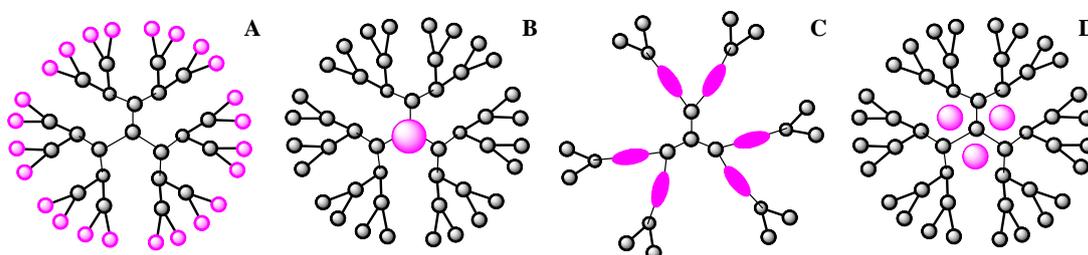
Otra alternativa es la denominada síntesis ortogonal, que consiste en la utilización de dos unidades ya ramificadas con grupos complementarios que pueden utilizarse para la construcción del dendrímero mediante la adición sucesiva de la una a la otra.

## 1.2 AVANCES EN EL DISEÑO DE NUEVOS SISTEMAS DENDRÍTICOS

### 1.2.1 Mono y heterofuncionalización

Las primeras publicaciones sobre dendrímeros tenían un objetivo puramente sintético, en ellas se proponían diversas vías para alcanzar altas generaciones. Sin embargo, en un periodo relativamente corto se consiguió la modificación química de estos sistemas dotándoles de una función específica, obteniéndose los denominados dendrímeros funcionales.

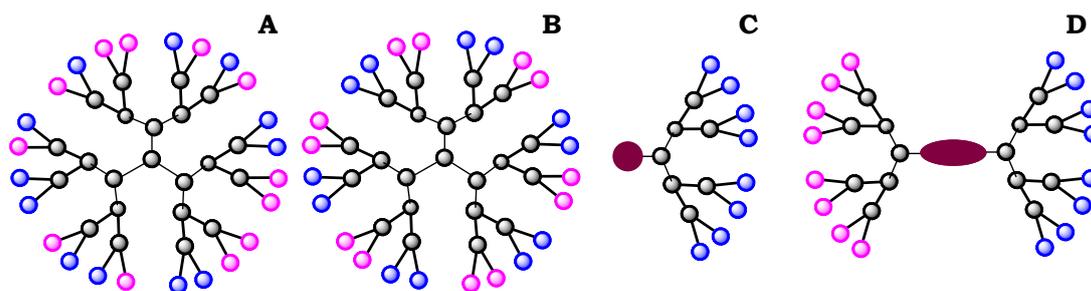
En la bibliografía se pueden encontrar diferentes ejemplos de funcionalización de dendrímeros. Generalmente lo más comúnmente empleado es la introducción de diferentes grupos funcionales en la periferia.<sup>36</sup> Sin embargo, debido a que la naturaleza del núcleo y de las ramas internas influyen en el comportamiento y en las propiedades de estos sistemas, también se encuentran situaciones donde se le ha otorgado la funcionalidad en el núcleo,<sup>37</sup> en las ramas<sup>38</sup> o incluso mediante la encapsulación de diferentes moléculas según su aplicación (Figura 1.8).<sup>39</sup>



**Figura 1.8** Posibles alternativas de funcionalización: A) en la periferia, B) en el núcleo, C) en las ramas y D) encapsulación mediante interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas o electroestáticas.

En los últimos años se ha ido un paso más allá, avanzando en el diseño de los denominados sistemas heterofuncionalizados, es decir, en la introducción de múltiples funciones en un misma macromolécula.

Para conseguir este tipo de derivados hetero o bifuncionalizados se usan principalmente cuatro estrategias (Figura 1.9):



**Figura 1.9** Estrategias para conseguir sistemas heterofuncionalizados: A) híbrido de distribución estadística, B) híbrido de distribución controlada, C) cuña dendrítica y D) tipo Janus.

I. Introducción de diferentes grupos en la periferia mediante un método estadístico (random). El número de grupos que se obtiene de cada uno depende de los equivalentes de cada reactivo que se hayan utilizado.<sup>40</sup>

II. Introducción de diferentes grupos en la periferia mediante un método estrictamente controlado. Este caso es bastante más complejo que el anterior, se trata de un reto sintético que requiere el desarrollo apropiado de grupos funcionales en la periferia que reaccionen de forma secuencial mediante el uso de diferentes reacciones químicas. Deben ser ortogonales, es decir, no interferir entre sí, para conseguir el control total del número de moléculas incorporadas y su ubicación precisa.<sup>41</sup>

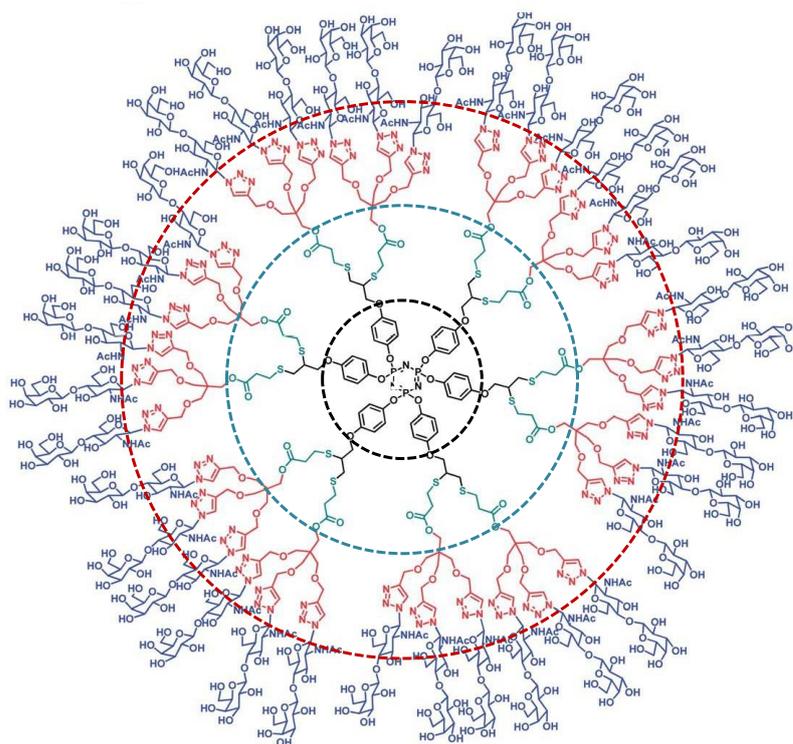
III. Utilización de cuñas dendríticas, lo que permite introducir un grupo de interés en el punto focal y otros diferentes en la periferia de forma controlada.<sup>42</sup>

IV. Unión de dos o más dendrones con diferentes grupos periféricos, diferentes topologías o generaciones, dando lugar a los denominados dendrímeros tipo Janus. Este tipo de sistemas se explicarán con más detalle en el siguiente apartado (apartado 1.2.2).

Recientemente se han publicado trabajos dónde se propone una nueva alternativa de heterofuncionalización denominada “*onion-peel*”. Esta síntesis implica la incorporación de diferentes bloques de construcción mediante un método ortogonal. En cada capa o generación se puede introducir bloques de

diferente naturaleza, proporcionándole al sistema diferentes características a lo largo del esqueleto.

Un trabajo interesante recogido en la bibliografía científica es el realizado por el grupo de Roy, en el cual se introducen esqueletos de diferente naturaleza, rigidez y número de ramificaciones, para finalmente funcionalizarlos en la periferia con azúcares para su uso en diferentes aplicaciones en biomedicina (Figura 1.10).<sup>43</sup>



**Figura 1.10** Ejemplo de dendrímero funcionalizado mediante la metodología “onion-peel”.

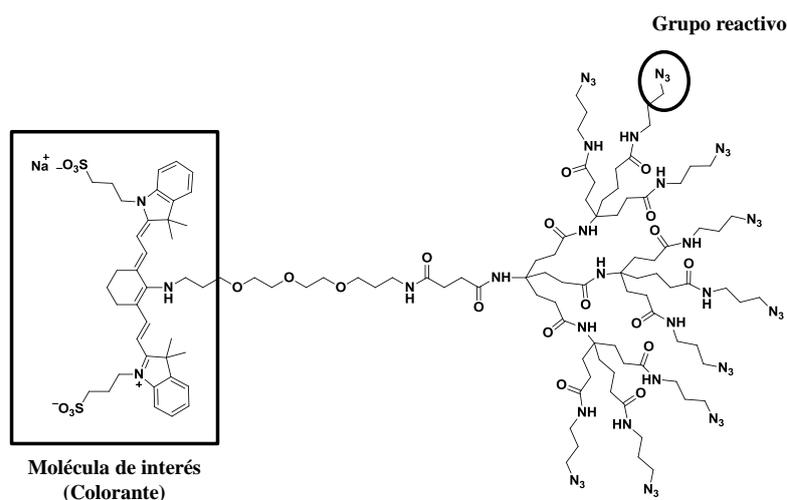
### 1.2.2 Aplicación de las cuñas dendríticas

Los dendrones han surgido como una geometría dendrítica alternativa que permite la obtención de moléculas monodispersas heterofuncionalizadas. Poco a poco, su relevancia como moléculas independientes a los dendrímeros ha ido aumentando debido a su utilización en aspectos muy variados como el autoensamblaje, en la posibilidad de introducir en el punto focal moléculas de interés e incluso en la modificación de multitud de materiales.

### a) Diseño de nuevas topologías

En la bibliografía, lo más común es encontrar dendrones funcionalizados en la periferia, principalmente con grupos que les confieran una mejor solubilidad y biocompatibilidad. Pero además, presentan en el punto focal una variedad de grupos reactivos que permiten jugar con su reactividad, ya sea para introducir moléculas que les confieran un valor añadido, o grupos que puedan reaccionar con la superficie de materiales modificando así sus propiedades.<sup>44</sup>

Los trabajos que generan mayor interés son aquellos que combinan ambas propiedades, en los cuales se introduce una molécula de interés en el punto focal como por ejemplo un colorante con propiedades excelentes para estudios de imagen, y en la periferia se dejan grupos reactivos para introducir otras moléculas según la aplicación deseada (Figura 1.11).<sup>45</sup>



**Figura 1.11** Dendron de tipo poliamida funcionalizado con cianina (colorante) en el punto focal.

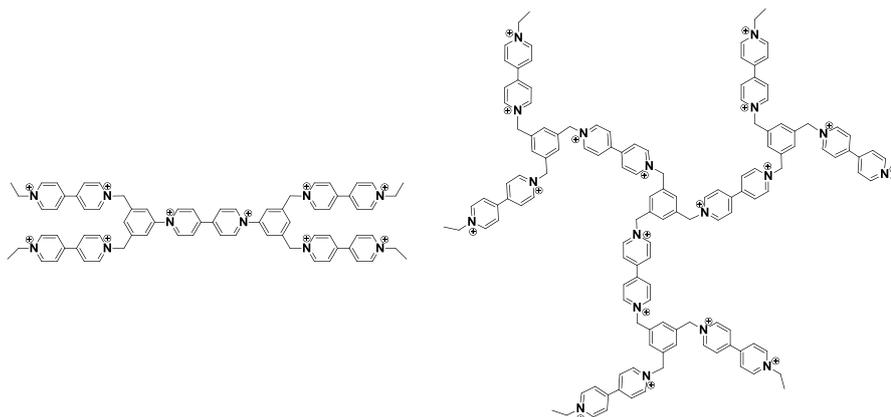
Por otra parte, la unión de dos dendrones puede dar lugar a dos tipos de dendrímeros:

#### I. Dendrímeros tipo bow tie

Este tipo de sistemas consiste en la unión de dos dendrones idénticos. Así, estas macromoléculas presentan una topología diferente con respecto a la

situación esférica tradicional de los dendrímeros, lo que permite comparar la influencia de la topología en diversas propiedades.

Un trabajo publicado por De Clercq estudia estructuras dendríticas de diferentes topologías basadas en viológeno (Figura 1.12), observándose una influencia en la toxicidad y actividad antiviral de estos sistemas en función de su topología.<sup>46</sup>



**Figura 1.12** Comparación de topologías dendríticas en sistemas tipo viológeno.

## II. Dendrímeros tipo Janus

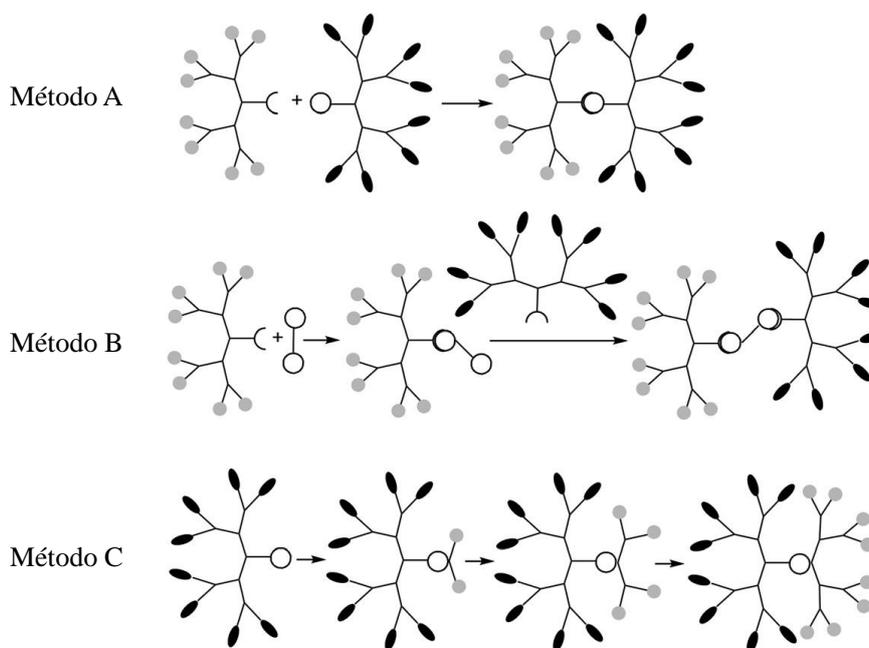
Este tipo de sistemas consiste en la unión de dos dendrones diferentes, otorgándole una bifuncionalidad al sistema. La estrategia sintética en este caso es más compleja, ya que hay que estudiar con precaución la compatibilidad de los grupos funcionales de ambos dendrones. Un aspecto importante es encontrar un balance entre las dos funcionalidades de la molécula, es decir, que cada una tenga el número de grupos adecuado para realizar su función. Para asegurar esto, generalmente se suelen utilizar generaciones altas.

Los derivados tipo Janus se pueden obtener mediante tres metodologías sintéticas (Esquema 1.10):<sup>47</sup>

- *Método A*: Acoplamiento directo entre dos dendrones diferentes que poseen funciones complementarias en el punto focal.
- *Método B*: Acoplamiento previo a un núcleo. Esta alternativa consiste en la reacción entre un primer dendrón y un núcleo multifuncional (al

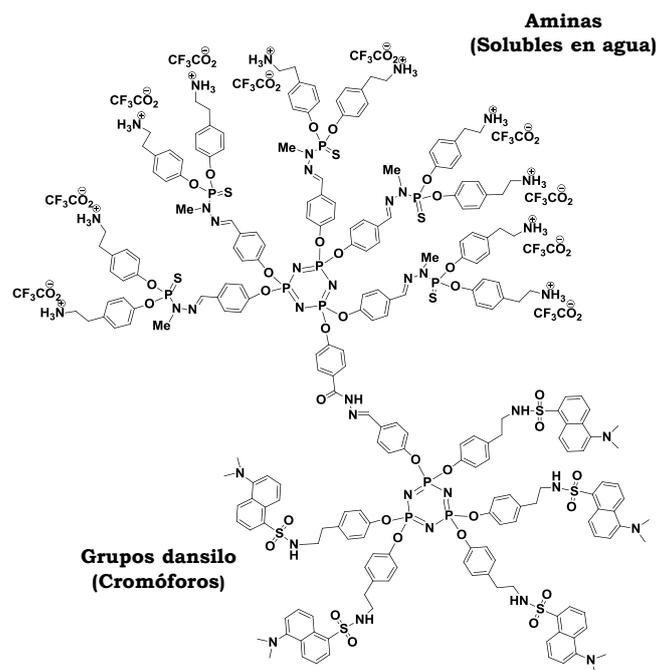
menos bifuncional) de manera controlada, y posteriormente en las posiciones restantes, se introduce un segundo dendrón diferente.

- *Método C*: Crecimiento de un nuevo dendrón a partir del punto focal de una cuña dendrítica mediante un proceso divergente.



**Esquema 1.10** Principales métodos sintéticos esquematizados para la preparación de dendrímeros tipo Janus.

Un ejemplo es el publicado por el grupo de Majoral, en el cual utilizan dendrones funcionalizados en la periferia con grupos dansilo por un lado, y por el otro con aminas terciarias. En este sistema se compensan cinco grupos cromóforos, suficientes para su uso en imagen, frente a diez grupos amina cuaternizadas, las cuales son las responsables de proporcionar a la molécula la solubilidad en agua necesaria para su aplicación en biomedicina (Figura 1.13).<sup>48</sup>



**Figura 1.13** Ejemplo de un dendrímero basado en átomos de fósforo de tipo Janus.

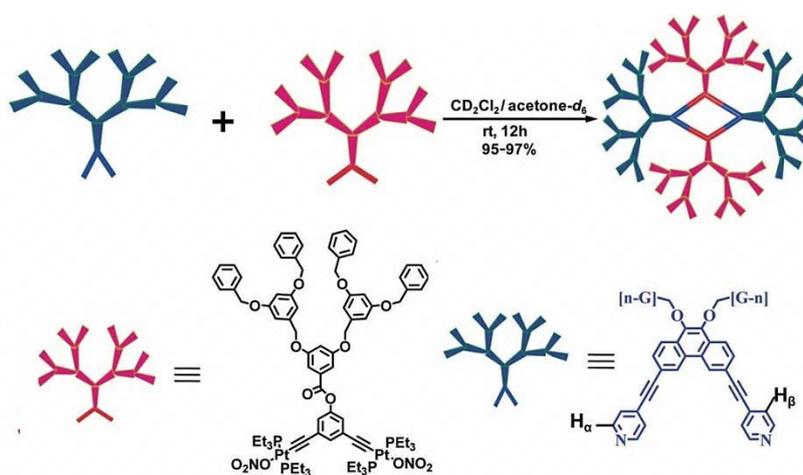
Nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo de Royo también ha estudiado este tipo de sistemas. Se han preparado dendrímeros tipo Janus que proporcionan por un lado una parte hidrofóbica debido al esqueleto carbosilano y por otro lado, cadenas PEG que generan un ambiente hidrofílico. Estos sistemas han demostrado ser menos tóxicos que sus análogos individuales, y forman nanoconjugados con siRNA más débiles, ambas características son propiedades importantes para su utilización como transportadores de material nucleico.<sup>49</sup>

### *b) Química supramolecular*

Las cuñas dendríticas surgen también como una alternativa importante y novedosa para el auto-ensamblaje. La construcción de arquitecturas supramoleculares mediante interacciones no covalentes se ha convertido en uno de los temas más atractivos dentro de la química moderna. Generalmente, se trabaja con interacciones no covalentes, tales como enlaces de hidrógeno, iónica, dador-aceptor,  $\pi$ - $\pi$ , van der Waals, etc. Dichas interacciones juegan un papel

esencial durante el proceso de auto-ensamblaje supramolecular. Esta metodología ofrece considerables ventajas sintéticas como la necesidad de pocos pasos sintéticos, y una construcción fácil y rápida de los productos deseados.

Un método eficaz para este tipo de síntesis es el uso de complejos organometálicos rígidos. La coordinación de este tipo de moléculas permite construir sistemas con geometrías, tamaños y formas perfectamente definidas (Esquema 1.11).<sup>32</sup>

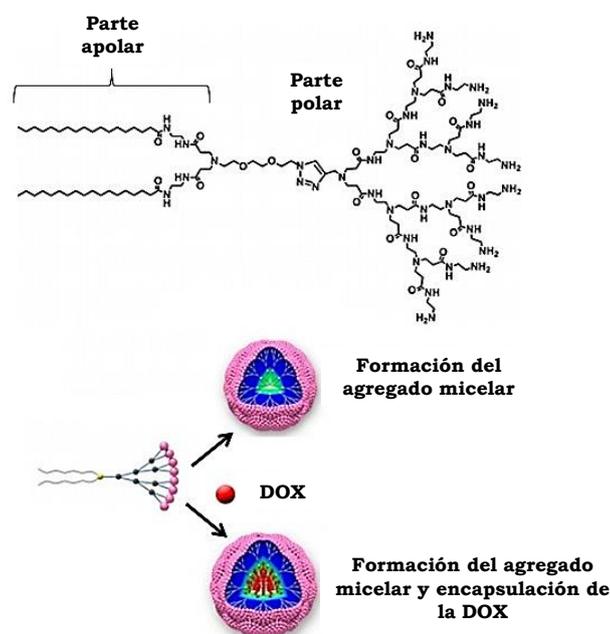


**Esquema 1.11** Construcción de un dendrímero mediante química supramolecular.

Otra estrategia que ha avanzado en los últimos años es la síntesis de dendrones anfifílicos, que debido a su naturaleza se auto-ensamblan formando agregados nanoscópicos supramoleculares como micelas o vesículas entre otros (dendrimerosomas). Estos agregados han mostrado nuevas propiedades interesantes sobre todo en el campo de la biomedicina.

Un sistema anfifílico posee una parte apolar, generalmente debido a la presencia de ácidos grasos en el punto focal, y otra parte polar, proporcionado por los grupos funcionales o el esqueleto dendrítico. Este tipo de moléculas tienen la estructura ideal para formar agregados supramoleculares en disoluciones acuosas, los cuales dejan la parte apolar hacia el interior y la parte polar hacia la disolución. En esa parte apolar se genera un espacio que permite encapsular moléculas de interés biológico.

Un ejemplo es la encapsulación de doxorubicina (DOX), un agente antitumoral, de la que existen trabajos de investigación que demuestran una mejora de la eficacia del fármaco, y una disminución de su toxicidad y resistencia (Figura 1.14).<sup>50</sup>



**Figura 1.14** Ejemplo de preparación de agregados micelares y encapsulación de la DOX.

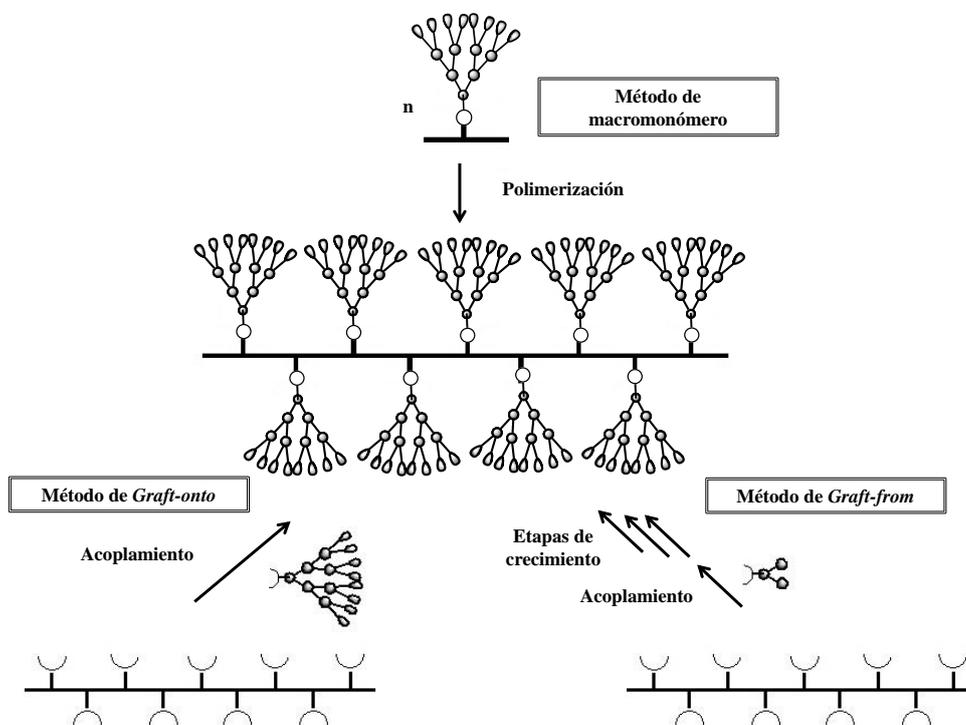
Recientemente, también se han diseñado sistemas anfifílicos que poseen una cadena de polietilenglicol (PEG) en el punto focal y la parte apolar viene dada por el esqueleto dendrítico o por los grupos de la periferia. Este tipo de sistemas forman agregados supramoleculares diferentes a los anteriormente mencionados, ya que la cadena queda hacia la disolución y el esqueleto dendrítico hacia el interior. Estos sistemas son muy atractivos ya que permiten introducir de forma covalente fármacos en la periferia, quedando encapsulados al formar la micela, obteniéndose liberaciones más controladas y mejores resultados.<sup>51</sup>

### c) *Polímeros dendronizados*

Estos sistemas consisten en dendrones anclados a lo largo de una cadena principal polimérica polidispersa, por ello se dice que son preparados mediante

una metodología semi-controlada. Se les denomina “polímeros peine” debido a la disposición de los dendrones, la cual se asemeja a la de los dientes de un peine.<sup>52</sup>

Estos sistemas se preparan principalmente por tres tipos de rutas sintéticas (Esquema 1.12):



**Esquema 1.12** Estrategias sintéticas para la obtención de polímeros dendronizados.

### *I. Estrategia graft-onto*

Se introduce el dendrón de la generación deseada al polímero lineal por una reacción de acoplamiento.

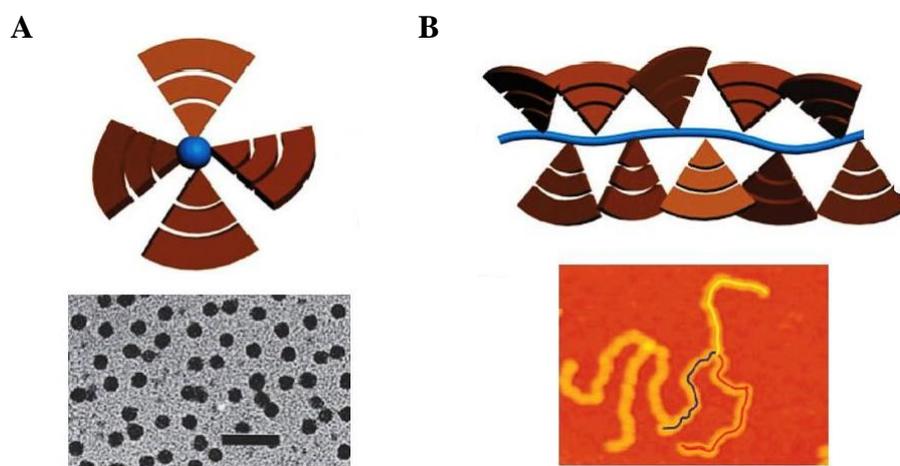
### *II. Estrategia graft-from*

Se introduce la parte reactiva del dendrón, y una vez formado el polímero dendronizado se va creciendo el dendrón mediante pasos iterativos hasta llegar al tamaño deseado.

### *III. Método de macromonómero*

Es el más utilizado, en este caso se sintetiza un monómero con el dendrón, y luego se construye el polímero lineal mediante una reacción de polimerización.

La morfología que adquieren los polímeros dendronizados es su característica más importante y lo que les diferencia principalmente de los dendrímeros tradicionales. Mientras que la disposición de un dendrímero es esférica, estos sistemas debido a la repulsión estérica que presentan las cuñas dendríticas se van colocando en forma de cilindro, asemejándose a la apariencia de un gusano. Este tipo de morfología depende de muchos factores, entre ellos podemos destacar la generación y estructura del dendrón, el espaciador entre el polímero lineal y el dendrón, y la naturaleza y propiedades del polímero lineal. La longitud de estas moléculas puede llegar fácilmente a cientos de nanómetros (Figura 1.15).<sup>53</sup>



**Figura 1.15** Morfología e imagen TEM de A) dendrímero y B) polímero dendronizado.<sup>53</sup>

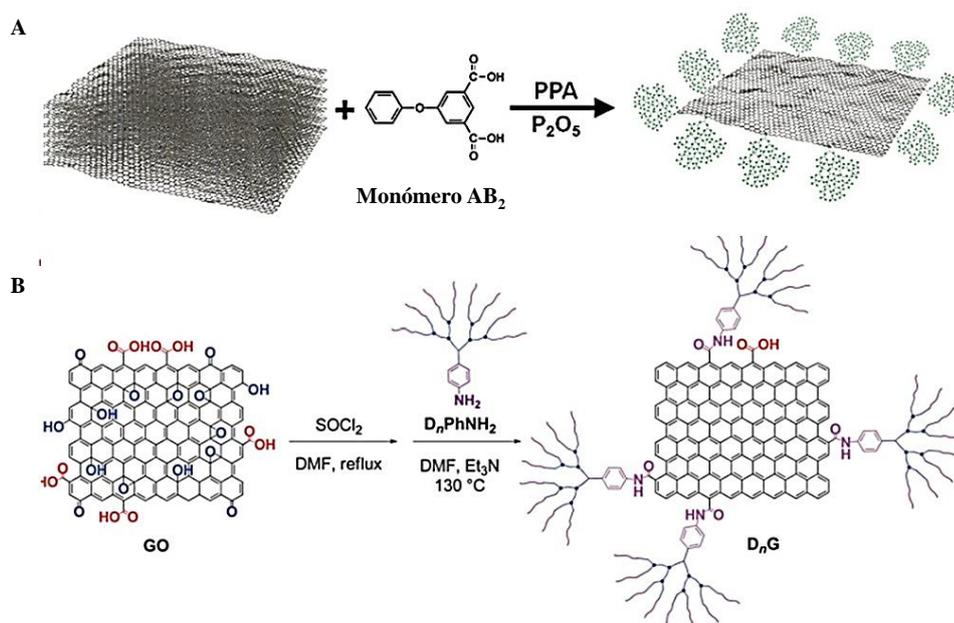
***d) Modificación de materiales nanoestructurados y superficies***

Debido a las propiedades que han demostrado poseer las cuñas dendríticas, se han elegido como excelentes candidatas para la modificación de materiales nanoestructurados con el objetivo de mejorar sus características.<sup>54</sup> Los nanomateriales modificados con este tipo de sistemas presentan bajas viscosidades que facilitan su manipulación y procesamiento. Además, la presencia de numerosos grupos terminales, mejoran sus solubilidades y la posibilidad de introducir otros grupos funcionales de interés.<sup>55</sup>

En la bibliografía científica se encuentra una gran versatilidad en la modificación de materiales, por lo que aquí se van a recoger algunos de los ejemplos más novedosos y estudiados.<sup>56</sup>

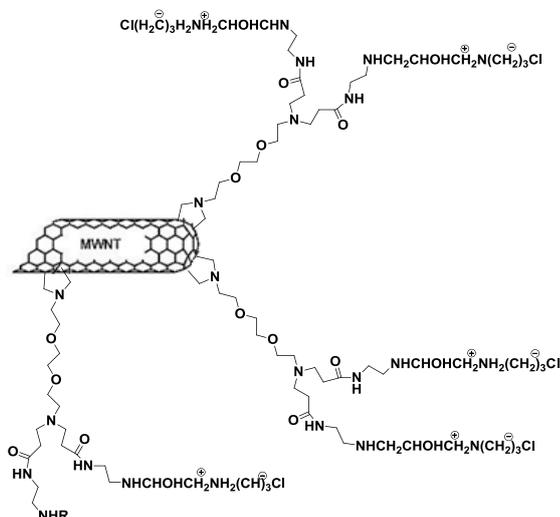
El grafeno es un material recién surgido que tiene fascinado a científicos y a la industria debido a sus fantásticas propiedades: es transparente, flexible, extraordinariamente resistente, impermeable, económico y conduce la electricidad mejor que ningún otro metal conocido. El grafeno es una lámina extremadamente delgada compuesta de carbono (sólo tiene un átomo de grosor). El principal obstáculo en la actualidad es que aún no es posible fabricar grafeno a gran escala. La reducción de óxido de grafeno se ha propuesto como una posible alternativa. Sin embargo, el problema radica en las fuertes interacciones entre láminas, produciéndose el apilamiento entre las hojas de grafeno.

Se ha observado como la funcionalización de este material con polímeros dendríticos dificulta el reapilamiento de las hojas de grafeno, aumenta su solubilidad en una variedad de disolventes orgánicos, y además refuerza curiosamente la conductividad eléctrica en volumen con una estructura dendrítica apropiada (Esquema 1.13).<sup>55</sup>



**Esquema 1.13** Ejemplo de funcionalización de grafeno con A) polímeros hiperramificados y B) cuñas dendríticas.

En los últimos años se han publicado un gran número de trabajos acerca de los nanotubos de carbono, los cuales poseen unas excepcionales propiedades químicas, ópticas, mecánicas y eléctricas.<sup>57</sup> Estas características los hacen materiales muy prometedores en los ámbitos de conversión de energía solar, electrónica, sensores y actualmente son objeto de multitud de investigaciones en aplicaciones biológicas.<sup>58</sup> Se han descrito diversos métodos para su funcionalización que les hace muy atractivos para su aplicación como nanotransportadores y como agentes para el tratamiento de enfermedades infecciosas y cáncer.<sup>59</sup>

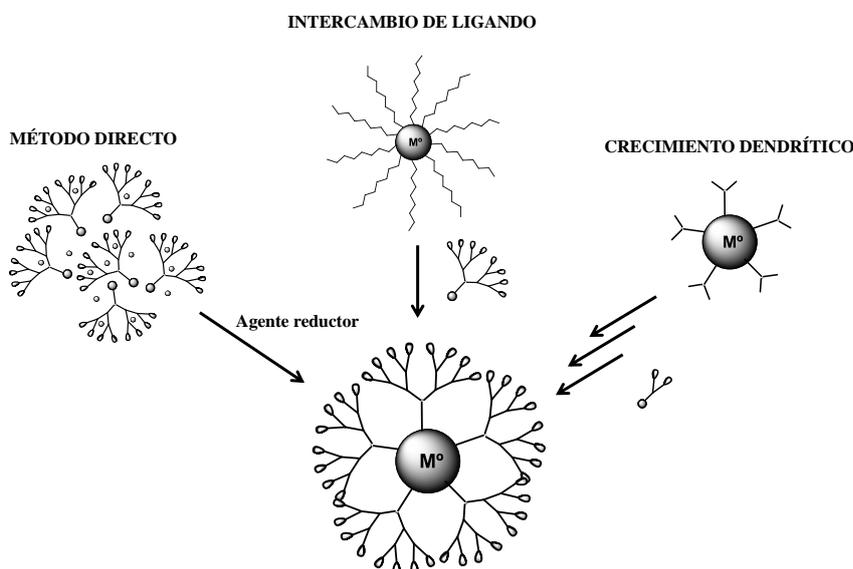


**Figura 1.16** Ejemplo de funcionalización de nanotubos de carbono con un dendron tipo PAMAM para liberación de material genético.

Normalmente, éstos se funcionalizan a través de la unión química de dendrones a la superficie por reacción entre los grupos terminales del nanotubo y el punto focal del dendrón (Figura 1.16),<sup>60</sup> aunque también se han descrito casos en los que se crece el dendrón sobre la superficie del nanotubo<sup>61</sup> o en los que el dendrón se une por interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los anillos aromáticos presentes en su estructura y las paredes del nanotubo.<sup>62</sup>

Actualmente también las nanopartículas metálicas son un área de intensa investigación científica, debido a su amplia variedad de aplicaciones potenciales en los campos biomédicos, ópticos y electrónicos. Generalmente son de forma

esférica, con dimensiones entre 1 y 100 nm. Lo más importante en estos sistemas es encontrar métodos de síntesis que permitan obtener nanopartículas estables en disolución, con tamaños y formas reproducibles. Hay tres estrategias sintéticas para la obtención de estas macromoléculas (Esquema 1.14):



**Esquema 1.14** Síntesis general de nanopartículas dendronizadas.

### I. Método directo

Es una estrategia que se basa en la utilización de dendrones previamente preparados capaces de generar la nanopartícula modificada *in situ*.<sup>63</sup>

### II. Intercambio de ligando

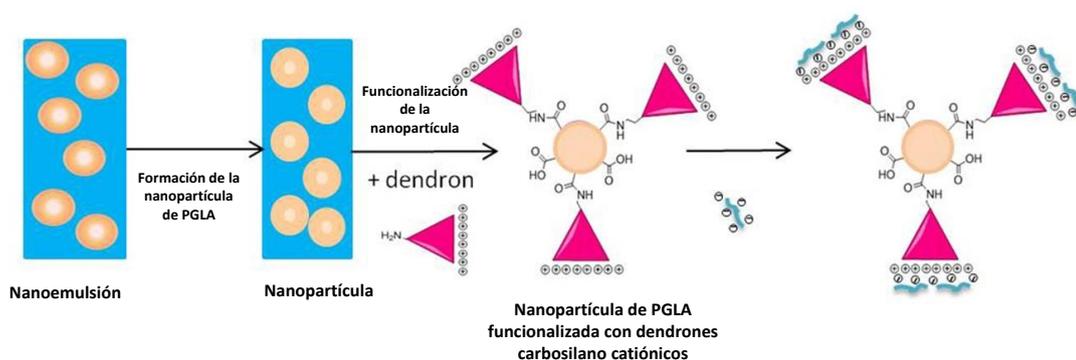
Otra alternativa es utilizar nanopartículas preformadas y obtener el sistema deseado por desplazamiento de los ligandos superficiales por dendrones.<sup>64</sup>

### III. Crecimiento dendrítico

En este caso, se parte de nanopartículas preformadas que contienen grupos funcionales reactivos en la superficie, los cuales permiten anclar dendrones ya sintetizados mediante un enlace covalente o anclar un monómero sobre el que se genere el crecimiento dendrítico.<sup>65</sup>

Las nanopartículas de metales nobles (oro,<sup>66</sup> plata<sup>67</sup>), óxido de hierro<sup>68</sup> y paladio,<sup>69</sup> son las que más ampliamente se han sintetizado y estudiado.

Otro tipo de nanopartículas no metálicas utilizadas son las de sílice<sup>70,71</sup> y las de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA). Aquí se muestra un ejemplo en el cual nanopartículas de PLGA se han funcionalizado con dendrones catiónicos tipo carbosilano, que permiten unir electrostáticamente a la superficie oligonucleótidos antisentido con los que se pueden realizar estudios de silenciamiento de genes (Esquema 1.15).<sup>72</sup>



**Esquema 1.15** Ejemplo de dendronización de nanopartículas poliméricas basadas en PLGA.

### 1.3 APLICACIONES EN BIOMEDICINA

Los esfuerzos iniciales en el campo de las estructuras dendríticas fueron centrados en la síntesis y caracterización. Posteriormente, debido a sus propiedades anteriormente expuestas, estas estructuras se están utilizando en multitud de aplicaciones como sensores,<sup>73</sup> en catálisis,<sup>74,75</sup> en conversión de energía<sup>68,76</sup> y en los últimos años sobre todo en el campo de la biomedicina.<sup>77-79</sup> Debido a que esta Memoria está centrada en las aplicaciones biomédicas, en este apartado se realiza una revisión más extensa de este campo.

Actualmente se necesitan desarrollar nuevos medicamentos, sobre todo para combatir las resistencias a las terapias tradicionales y proporcionar nuevos diseños de fármacos. Los sistemas dendríticos se están utilizando a varios niveles, como agentes transportadores de biomoléculas, como agentes terapéuticos por sí mismos, y más recientemente como agentes de diagnóstico.

#### 1.3.1 Sistemas dendríticos como transportadores

Hoy en día, se conocen numerosas moléculas bioactivas. Sin embargo, la gran mayoría de estas moléculas no llegan al ensayo clínico debido a que son incapaces de alcanzar con eficacia al tejido celular donde podría ejercer su efecto terapéutico.<sup>80</sup>

Los sistemas dendríticos pueden ayudar a entregar un fármaco a sus dianas específicas y lograr el efecto terapéutico deseado, o simplemente mejorar la solubilidad. Para ello se han utilizado varias estrategias (Figura 1.17):

##### *1. Unión electrostática entre el fármaco y el sistema dendrítico*

Esta estrategia es útil para fármacos iónicos, dependiendo de su naturaleza catiónica o aniónica se utilizará un sistema dendrítico u otro. La unión a estos fármacos debe ser lo suficientemente débil como para una vez transportado al tejido diana el fármaco sea liberado para poder realizar su función terapéutica.

Un ejemplo es el trabajo realizado por el grupo de D'Emanuele, en el cual se observa como un dendrímero tipo PAMAM de cuarta generación interacciona

con hasta cuarenta moléculas de ibuprofeno incrementando su solubilidad notablemente.<sup>81</sup>

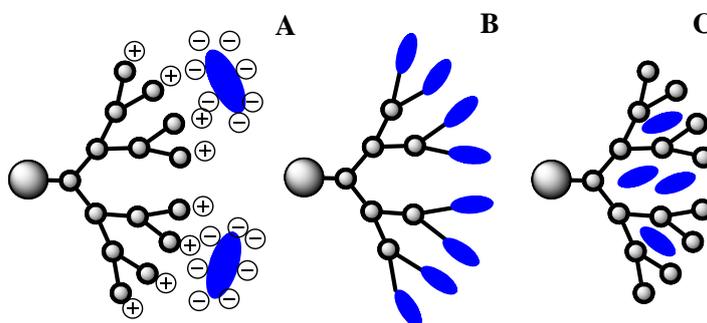
## II. Unión covalente entre el fármaco y el sistema dendrítico

Para poder utilizar esta metodología el fármaco debe tener algún grupo reactivo que permita unirlo al dendrímero, y al mismo tiempo que ese grupo no esté involucrado en su acción terapéutica o que pueda recuperarse en condiciones adecuadas.

Un ejemplo es la unión covalente de la hormona dexametasona (corticoide hidrofóbico) a un dendrímero PAMAM. Este conjugado mejora la actividad antiinflamatoria con respecto al fármaco libre.<sup>82</sup>

## III. Encapsulación del fármaco mediante interacciones hidrofóbicas

Esta alternativa es utilizada sobre todo cuando hay problemas de solubilidad, ya que es uno de los principales retos en la investigación farmacéutica. Muchos fármacos son rechazados debido a que son poco solubles en agua y por ello presentan una baja biodisponibilidad. Los sistemas dendríticos han mejorado la solubilidad de fármacos como el ketoprofeno, un fármaco antiinflamatorio no esteroide que por sí mismo no es soluble en agua produciendo problemas gastrointestinales. Los resultados experimentales muestran que ketoprofeno en presencia de un dendrímero tipo poliamidoamina (PAMAM) mejora su solubilidad, y por consiguiente, su eficacia.<sup>83</sup>



**Figura 1.17** Estrategias más utilizadas en el transporte de fármacos: A) interacción electrostática, B) interacción covalente y C) interacción hidrofóbica.

Un caso especial, es el uso de sistemas dendríticos como agentes transfectantes. En este caso transportan material genético al interior celular, produciéndose cambios efectivos en las células. El vector ideal para la transfección debe presentar una alta eficiencia, no ser inmunogénico, no tóxico, y biodegradable o que se excrete a tiempos largos de circulación en la sangre. A pesar de que se pueden encontrar multitud de trabajos, los resultados más recientes son los publicados por el grupo de Cheng, que se basan en dendrímeros PAMAM fluorados los cuales muestran una excelente eficacia de transfección de genes en varias líneas celulares y una biocompatibilidad superior en comparación con otros sistemas ya descritos<sup>84</sup>

### **1.3.2 Sistemas dendríticos como agentes terapéuticos *per se***

Debido a la presencia de múltiples grupos funcionales, éstas macromoléculas tienden a presentar una mayor solubilidad, reactividad y capacidad para unirse o interaccionar con diversos grupos de moléculas o sistemas biológicos, pudiéndose producir una acción terapéutica dónde la multivalencia es una propiedad a estudiar. En este apartado se mencionan los más estudiados.

#### ***a) Agentes antibacterianos***

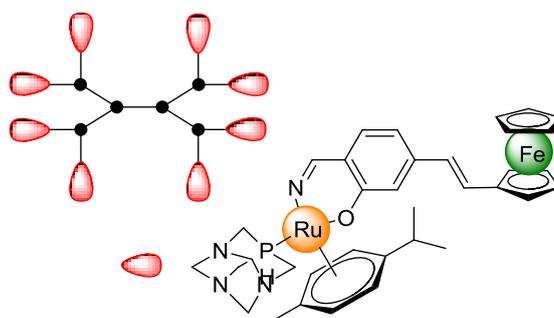
Los primeros trabajos en los que obtuvieron buenas actividades antibacterianas fueron utilizando dendrímeros catiónicos.<sup>85</sup> En general, el mecanismo de acción de este tipo de sistemas consiste en la adhesión y daño de la membrana bacteriana aniónica y provocar así la lisis bacteriana. Sin embargo, estos compuestos suelen generar altas toxicidades. Para mejorar su biocompatibilidad, algunos se han funcionalizado con cadenas PEG para esconder las cargas positivas lo que no modifica su eficacia,<sup>86</sup> o incluso se han estudiado sistemas aniónicos los cuales sorprendentemente también presentan buenas actividades.<sup>87</sup> Materiales nanoestructurados como nanopartículas de plata dendronizadas también han demostrado excelentes resultados como agentes antibacterianos.<sup>88</sup>

**b) Agentes antivirales**

Estas macromoléculas también han sido investigadas por sus propiedades antivirales, principalmente sistemas aniónicos<sup>89</sup> y glicodendrimeros.<sup>90</sup> En el caso particular del VIH, se ha demostrado que compiten por los sitios de unión que usan distintos virus para entrar en la célula, es decir, son capaces de inhibir la infección del virus en etapas tempranas.<sup>91</sup> Esta capacidad será expuesta con mayor extensión en el capítulo de aplicaciones biomédicas.

**c) Agentes antitumorales**

Sistemas dendríticos decorados con complejos organometálicos se han utilizado en varios campos de la biomedicina y como tratamiento de diferentes enfermedades, como por ejemplo el cáncer.<sup>92</sup>



**Figura 1.18** Ejemplo de sistema dendrítico bimetalico con actividad antitumoral.<sup>93</sup>

Debido al descubrimiento del *cis*-platino como terapia contra el cáncer, los primeros dendrimeros funcionalizados para ser empleados como agentes antitumorales se basaban en platino.<sup>94</sup> Posteriormente, se han propuesto otros metales como cobre<sup>95</sup> o rutenio<sup>96</sup> que presentan menor toxicidad, o incluso sistemas bimetalicos.<sup>97</sup>

**d) Agentes frente a enfermedades neurodegenerativas**

Los dendrimeros han demostrado ser capaces de interferir *in vitro* en la formación de las estructuras fibrilares amiloides típicamente relacionados con la aparición y el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer.<sup>98</sup> Además, en este tipo de enfermedades se ha observado que se produce un incremento de iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , etc), y que su

eliminación parece inhibir la formación de placas amiloides anteriormente mencionadas. Por ello, se han utilizado dendrímeros que poseen agentes quelantes capaces de retirar dichos metales, mostrando excelentes actividades frente a este tipo de enfermedades.<sup>99</sup>

*e) Agentes antioxidantes*

En nuestro organismo se dan multitud de reacciones de oxidación produciéndose las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden provocar daños significativos en las estructuras celulares. Sin embargo, hay casos dónde se produce un incremento de estas moléculas, dando lugar a una situación de estrés oxidativo, la cual está asociada a la patogénesis de multitud de enfermedades, tales como daños cardiovasculares, cáncer o enfermedades neurodegenerativas. Los agentes antioxidantes son los encargados de inhibir estas reacciones y eliminar los radicales libres que se generan. Los sistemas dendríticos que han demostrado capacidad antioxidante, generalmente son agentes reductores, como por ejemplo los polifenoles.<sup>100</sup>

### **1.3.3 Sistemas dendríticos como agentes de diagnóstico**

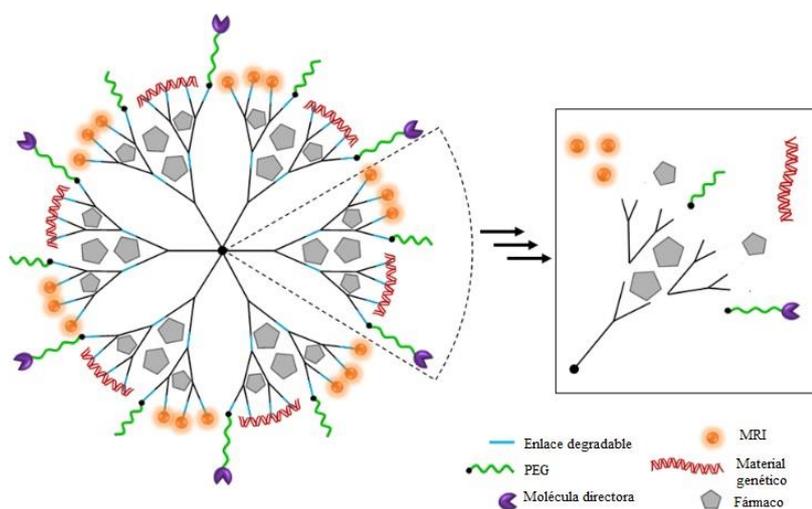
Una detección temprana de la enfermedad permite elegir entre un mayor abanico de terapias, lo que repercute en una mayor posibilidad de recuperación del paciente. Uno de los métodos de diagnóstico más utilizados hoy en día es la imagen por resonancia magnética (IRM), que es una técnica de imagen no invasiva que permite distinguir entre diferentes tipos de tejidos. Los agentes de contraste más utilizados son complejos de gadolinio ( $Gd^{3+}$ ). Sin embargo, los complejos formados son de bajo peso molecular y se excretan fácilmente.

En este campo, los dendrímeros pueden aportar numerosas ventajas: (i) el aumento de peso molecular del complejo dendrítico hace que el gadolinio sea más difícil de excretar, lo que le permite aumentar el tiempo que permanece en el cuerpo, (ii) en una misma molécula se puede introducir varios centros metálicos y (iii) aunque el dendrímero en sí mismo no tiene capacidad para modificar los tiempos de relajación de protones contiguos, se cree que su elevado peso

molecular colabora alterando las características de gadolinio, lo que incrementa sensiblemente la calidad de la imagen.<sup>101</sup>

Otra técnica de imagen no invasiva muy utilizada es la tomografía de positrón de electrones (PET), en la cual se emplean otros metales como cobre<sup>102</sup> o galio.<sup>103</sup>

Como se ha mostrado a lo largo de este capítulo hay un gran trabajo en el desarrollo de estos sistemas, pero en la actualidad los avances de la nanotecnología están centrados en preparar sistemas multifuncionales (Figura 1.19). Se trata de preparar en una misma macromolécula, un sistema que permita la detección, el seguimiento y el tratamiento de una enfermedad al mismo tiempo. Son los denominados sistemas teragnósticos.<sup>104</sup>



**Figura 1.19** Ejemplo de sistema multifuncional para aplicaciones biomédicas.

Al igual que cualquier nuevo fármaco, estos sistemas deben poseer ciertas características básicas antes de poder dar el paso a la fase clínica. Aunque el número de polímeros dendríticos que han conseguido pasar a la clínica es pequeño, se pueden encontrar algunos ejemplos que proporcionan esperanza para seguir estudiando este tipo de sistemas para su uso en diagnóstico y tratamiento. A continuación, se muestran algunos de los sistemas que han sido utilizados en clínica:

-Un dendrímero tipo PAMAM, utilizado como herramienta de diagnóstico para pacientes con isquemia miocárdica, una enfermedad cardíaca causada por la falta del flujo de sangre al corazón.<sup>105</sup>

-Un dendrímero PLL polianiónico (VivaGel (SPL7013, Starpharma)), estudiado como agente antiviral capaz de inhibir las infecciones por el VIH-1 y el HSV-2,<sup>106</sup> y más recientemente en vaginosis bacteriana.<sup>107</sup>

-Un dendrímero polilisina con un núcleo de ácido trimésico y 24 grupos quelantes con gadolinio en la periferia (Gadomer-17 (SH L 643a, Schering)), el cual ha mostrado buenos resultados como agente de contraste.<sup>108</sup>

## 1.4 BIBLIOGRAFIA

- (1) Buhleier, E. W., W.; Vogtle, F. *Synthesis-Stuttgart* **1978**.
- (2) Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2718.
- (3) Kim, Y. H.; Webster, O. W. *Polym. Prepr.* **1988**, *29*, 310.
- (4) Quast, M. J.; Mueller, A. J. *Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2014**, *52*, 985.
- (5) Yan, D.; Mueller, A. H. E.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **1997**, *30*, 7024.
- (6) Sunder, A.; Hanselmann, R.; Frey, H.; Muelhaupt, R. *Macromolecules* **1999**, *32*, 4240.
- (7) Paulasaari, J. K.; Weber, W. P. *Macromolecules* **2000**, *33*, 2005.
- (8) Zheng, Y.; Li, S.; Weng, Z.; Gao, C. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4091.
- (9) Han, J.; Zheng, Y.; Zhao, B.; Li, S.; Zhang, Y.; Gao, C. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 4387/1.
- (10) Morgenroth, F.; Mullen, K. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15349.
- (11) Yu, Z.; Zhou, C.; Li, R.; Zhan, J.; He, G.-m.; Xia, H.-p.; Ding, M.-t. *Gongneng Cailiao* **2010**, *41*, 1113.
- (12) Hobson, L. J. *Chem. Commun.* **1997**, 2067.
- (13) Hawker, C. J.; Lee, R.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4583.
- (14) Chang, H. T.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2313.
- (15) Wilms, D.; Stiriba, S. E.; Frey, H. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 129.
- (16) Yan, D.; Mueller, A. H. E.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **1997**, *30*, 7024.
- (17) Zhu, Q.; Wu, J.; Tu, C.; Shi, Y.; He, L.; Wang, R.; Zhu, X.; Yan, D. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5777.
- (18) Tomalia, D. A.; Hedstrand, D. M.; Ferritto, M. S. *Macromolecules* **1991**, *24*, 1435.
- (19) Gauthier, M.; Moeller, M. *Macromolecules* **1991**, *24*, 4548.
- (20) Teertstra, S. J.; Gauthier, M. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, *29*, 277.
- (21) Romestand, B.; Rolland, J.-L.; Commeyras, A.; Coussot, G.; Desvignes, I.; Pascal, R.; Vandenabeele-Trambouze, O. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1169.
- (22) Patel, R. M.; Gajjar, D. G.; Patel, H. N.; Patel, P. M. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res.* **2014**, *5*, 94.
- (23) Tomalia, D. A. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 264.
- (24) Scherrenberg, R.; Coussens, B.; van Vliet, P.; Edouard, G.; Brackman, J.; de Brabander, E.; Mortensen, K. *Macromolecules* **1998**, *31*, 456.
- (25) Rosenfeldt, S.; Dingenouts, N.; Potschke, D.; Ballauff, M.; Berresheim, A. J.; Muellen, K.; Lindner, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 109.
- (26) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.
- (27) Wörner, C.; Mülhaupt, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1993**, *32*, 1306.
- (28) Rasines, B.; Sánchez-Nieves, J.; Maiolo, M.; Maly, M.; Chonco, L.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 12733.

- (29) Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *Catal. Met. Complexes* **2011**, *37*, 265.
- (30) Lee, H.; Ooya, T. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12263.
- (31) Twibanire, J. A. K.; Bruce Grindley, T. *Polymers* **2014**, *6*, 179.
- (32) Han, Q.; Li, Q. J.; He, J.; Hu, B.; Tan, H.; Abliz, Z.; Wang, C. H.; Yu, Y.; Yang, H. B. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9660.
- (33) Enciso, A. E.; Abid, Z. M.; Simanek, E. E. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4635.
- (34) Fritz Vögtle, G. R. a. N. W. In *WILEY-VCH* 2009.
- (35) Walter, M. V.; Malkoch, M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4593.
- (36) Ornelas, C.; Ruiz Aranzaes, J.; Cloutet, E.; Alves, S.; Astruc, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 872.
- (37) Maes, W.; Dehaen, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4719.
- (38) Wang, L.; Kiemle, D. J.; Boyle, C. J.; Connors, E. L.; Gitsov, I. *Macromolecules* **2014**, *47*, 2199.
- (39) Tekade, R. K.; Kumar, P. V.; Jain, N. K. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 49.
- (40) Mullen, D. G.; Fang, M.; Desai, A.; Baker, J. R., Jr.; Orr, B. G.; Holl, M. M. B. *ACS Nano* **2010**, *4*, 657.
- (41) Luo, K.; Liu, G.; She, W.; Wang, Q.; Wang, G.; He, B.; Ai, H.; Gong, Q.; Song, B.; Gu, Z. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7951.
- (42) Cheng, Z.; Xu, P.; Guo, B.; Qiu, Y.; Fan, H.; Chang, X.; Ren, B. *Ionics* **2015**, *21*, 1489.
- (43) Sharma, R.; Naresh, K.; Chabre, Y. M.; Rej, R.; Saadeh, N. K.; Roy, R. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4321.
- (44) Fuentes-Paniagua, E.; Pena-González, C. E.; Galán, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Sánchez-Nieves, J. *Organometallics* **2013**, *32*, 1789.
- (45) Ornelas, C.; Lodescar, R.; Durandin, A.; Canary, J. W.; Pennell, R.; Liebes, L. F.; Weck, M. *Chem. - Eur. J.* **2011**, *17*, 3619.
- (46) Asaftei, S.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3480.
- (47) Caminade, A.-M.; Laurent, R.; Delavaux-Nicot, B.; Majoral, J. P. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 217.
- (48) Fuchs, S.; Pla-Quintana, A.; Mazeres, S.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4751.
- (49) Sánchez-Nieves, J.; Fransen, P.; Pulido, D.; Lorente, R.; Muñoz-Fernández, M. A.; Albericio, F.; Royo, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 43.
- (50) Wei, T.; Chen, C.; Liu, J.; Liu, C.; Posocco, P.; Liu, X.; Cheng, Q.; Huo, S.; Liang, Z.; Fermeglia, M.; Pricl, S.; Liang, X. J.; Rocchi, P.; Peng, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 2978.
- (51) Rosenbaum, I.; Harnoy, A. J.; Tirosh, E.; Buzhor, M.; Segal, M.; Frid, L.; Shaharabani, R.; Avinery, R.; Beck, R.; Amir, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 2276.
- (52) Schluter, A. D.; Rabe, J. P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 864.
- (53) Chen, Y.; Xiong, X. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5049.

- (54) Kono, K. *Polym. J.* **2012**, *44*, 531.
- (55) Soleyman, R.; Adeli, M. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 10.
- (56) Parat, A.; Bordeianu, C.; Dib, H.; Garofalo, A.; Walter, A.; Begin-Colin, S.; Felder-Flesch, D. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 977.
- (57) Sarangdevot, K.; Sonigara, B. S. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7*, 916.
- (58) Mundra, R. V.; Wu, X.; Sauer, J.; Dordick, J. S.; Kane, R. S. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *28*, 25.
- (59) Wong, B. S.; Yoong, S. L.; Jagusiak, A.; Panczyk, T.; Ho, H. K.; Ang, W. H.; Pastorin, G. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65*, 1964.
- (60) Herrero, M. A.; Toma, F. M.; Al-Jamal, K. T.; Kostarelos, K.; Bianco, A.; Da Ros, T.; Bano, F.; Casalis, L.; Scoles, G.; Prato, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9843.
- (61) Maggini, L.; Toma, F. M.; Feruglio, L.; Malicka, J. M.; Da Ros, T.; Armaroli, N.; Prato, M.; Bonifazi, D. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 5889.
- (62) Bahun, G. J.; Adronov, A. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, *48*, 1016.
- (63) Srisombat, L. O.; Park, J. S.; Zhang, S.; Lee, T. R. *Langmuir* **2008**, *24*, 7750.
- (64) Woehrle, G. H.; Brown, L. O.; Hutchison, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2172.
- (65) Boisselier, E.; Salmon, L.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Chem. Commun.* **2008**, 5788.
- (66) Rapakousiou, A.; Djeda, R.; Grillaud, M.; Li, N.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Organometallics* **2014**, *33*, 6953.
- (67) Ning, D.; Zhang, H.; Zheng, J. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, 717-718, 29.
- (68) Ghobril, C.; Popa, G.; Parat, A.; Billotey, C.; Taleb, J.; Bonazza, P.; Begin-Colin, S.; Felder-Flesch, D. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9158.
- (69) Torigoe, K.; Watanabe, Y.; Endo, T.; Sakai, K.; Sakai, H.; Abe, M. *J. Nanopart. Res.* **2010**, *12*, 951.
- (70) Abu-Reziq, R.; Alper, H.; Wang, D.; Post, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5279.
- (71) Martinez, A.; Fuentes-Paniagua, E.; Baeza, A.; Sánchez-Nieves, J.; Cicuendez, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; González, B.; Vallet-Regi, M. *Chemistry*. **2015**, *21*, 15651.
- (72) Fornaguera, C.; Grijalvo, S.; Galán, M.; Fuentes-Paniagua, E.; de la Mata, F. J.; Gómez, R.; Eritja, R.; Caldero, G.; Solans, C. *Int. J. Pharm.* **2015**, *478*, 113.
- (73) Tuerp, D.; Nguyen, T. T.; Baumgarten, M.; Muellen, K. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 282.
- (74) Bagul, R. S.; Jayaraman, N. *Inorg. Chim. Acta* **2014**, *409*, 34.
- (75) Kumar, V. K. R.; Krishnakumar, S.; Gopidas, K. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, *2012*, 3447.
- (76) Schulz, G. L.; Mastalerz, M.; Ma, C. Q.; Wienk, M.; Janssen, R.; Baeuerle, P. *Macromolecules* **2013**, *46*, 2141.
- (77) Mintzer, M. A.; Grinstaff, M. W. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 173.
- (78) Noor, A.; Mahmood, W.; Afreen, A.; Uzma, S. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *4*, 1509.

- (79) Mohammad, S.; Gupta, S.; Farooqui, S.; Srivastava, S. *World J. Pharm. Res.* **2015**, *4*, 923.
- (80) Ghosh, S.; Chakraborty, P.; Chakrabarti, A.; Ghosh, M.; Mandal, A.; Saha, P.; Mukherjee, A.; Acharya, S.; Ray, M. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 6631-6642.
- (81) Milhem, O. M.; Myles, C.; McKeown, N. B.; Attwood, D.; D'Emanuele, A. *Int. J. Pharm.* **2000**, *197*, 239.
- (82) Choi, J. S.; Ko, K. S.; Park, J. S.; Kim, Y. H.; Kim, S. W.; Lee, M. *Int. J. Pharm.* **2006**, *320*, 171.
- (83) Cheng, Y.; Xu, T.; Fu, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1390.
- (84) Wang, M.; Liu, H.; Li, L.; Cheng, Y. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4053/1.
- (85) Ortega, P.; Copa-Patiño, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A.; Soliveri, J.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3264.
- (86) López, A. I.; Reins, R. Y.; McDermott, A. M.; Trautner, B. W.; Cai, C. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 1148.
- (87) Meyers, S. R.; Juhn, F. S.; Griset, A. P.; Luman, N. R.; Grinstaff, M. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14444.
- (88) Haase, H.; Fahmi, A.; Mahltig, B. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 1146.
- (89) Sepúlveda-Crespo, D.; Serramia, M. J.; Tager, A. M.; Vrbanac, V.; Gómez, R.; De La Mata, F. J.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A. *Nanomedicine* **2015**, *11*, 1299.
- (90) Han, S.; Kanamoto, T.; Nakashima, H.; Yoshida, T. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 1061.
- (91) Sepúlveda-Crespo, D.; Lorente, R.; Leal, M.; Gómez, R.; De la Mata, F. J.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A. *Nanomedicine* **2014**, *10*, 609.
- (92) Govender, P.; Therrien, B.; Smith, G. S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 2853.
- (93) Govender, P.; Lemmerhirt, H.; Hutton, A. T.; Therrien, B.; Bednarski, P. J.; Smith, G. S. *Organometallics* **2014**, *33*, 5535.
- (94) Jansen, B. A. J.; Van der Zwan, J.; Reedijk, J.; Den Dulk, H.; Brouwer, J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1429.
- (95) El Brahmī, N.; El Kazzouli, S.; Mignani, S. M.; Essassi, E. M.; Aubert, G.; Laurent, R.; Caminade, A.-M.; Bousmina, M. M.; Cresteil, T.; Majoral, J. P. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 1459.
- (96) Govender, P.; Renfrew, A. K.; Clavel, C. M.; Dyson, P. J.; Therrien, B.; Smith, G. S. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 1158.
- (97) Zhao, X. X.; Loo, S.-C. J.; Lee, P. P. F.; Tan, T. T. Y.; Chu, C.-K. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 105.
- (98) Benseny-Cases, N.; Klementieva, O.; Cladera, J. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 211.
- (99) Lakatos, A.; Zsigo, E.; Hollender, D.; Nagy, N. V.; Fueloep, L.; Simon, D.; Bozso, Z.; Kiss, T. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 1302.
- (100) Lee, C. Y.; Nanah, C. N.; Held, R. A.; Clark, A. R.; Huynh, U. G. T.; Maraskine, M. C.; Uzarski, R. L.; McCracken, J.; Sharma, A. *Biochimie* **2015**, *111*, 125.
- (101) Bryson, J. M.; Reineke, J. W.; Reineke, T. M. *Macromolecules* **2012**, *45*, 8939.

- (102) Xiao, Y.; Hong, H.; Javadi, A.; Engle, J. W.; Xu, W.; Yang, Y.; Zhang, Y.; Barnhart, T. E.; Cai, W.; Gong, S. *Biomaterials* **2012**, *33*, 3071.
- (103) Manzoni, L.; Belvisi, L.; Arosio, D.; Bartolomeo, M. P.; Bianchi, A.; Brioschi, C.; Buonsanti, F.; Cabella, C.; Casagrande, C.; Civera, M.; De Matteo, M.; Fugazza, L.; Lattuada, L.; Maisano, F.; Miragoli, L.; Neira, C.; Pilkington-Miksa, M.; Scolastico, C. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1084.
- (104) Leiro, V.; García, J. P.; Tomas, H.; Pego, A. P. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1182.
- (105) Singh, P.; Moll, F., III; Lin, S. H.; Ferzli, C.; Yu, K. S.; Koski, R. K.; Saul, R. G.; Cronin, P. *Clin. Chem.* **1994**, *40*, 1845.
- (106) McGowan, I.; Gómez, K.; Bruder, K.; Febo, I.; Chen, B. A.; Richardson, B. A.; Husnik, M.; Livant, E.; Price, C.; Jacobson, C. *AIDS* **2011**, *25*, 1057.
- (107) Paull, J. R. A.; Fairley, J. K.; Price, C. F.; Lewis, G. R.; Starpharma Pty Ltd., Australia . **2012**, p 50pp.
- (108) Herborn, C. U.; Barkhausen, J.; Paetsch, I.; Hunold, P.; Mahler, M.; Shamsi, K.; Nagel, E. *Radiology* **2003**, *229*, 217.

## **CAPÍTULO 2**

---

# **POLÍMEROS HIPERRAMIFICADOS IÓNICOS DE NATURALEZA POLICARBOSILANO**



## 2.1 INTRODUCCIÓN

Los polímeros hiperramificados (de sus siglas en inglés, HPBs) como ya se ha comentado con anterioridad, son una subfamilia de los materiales dendríticos. Estos sistemas presentan una estructura irregular en comparación con los dendrímeros, pero forman igualmente geometrías globulares tridimensionales que contienen multitud de grupos funcionales en la periferia, proporcionándole de esta forma propiedades similares.

El número de artículos acerca de estos sistemas ha aumentado considerablemente desde 1990, debido a la evolución en su síntesis y en la posibilidad de su modificación para diferentes aplicaciones (Figura 2.1).<sup>1</sup>

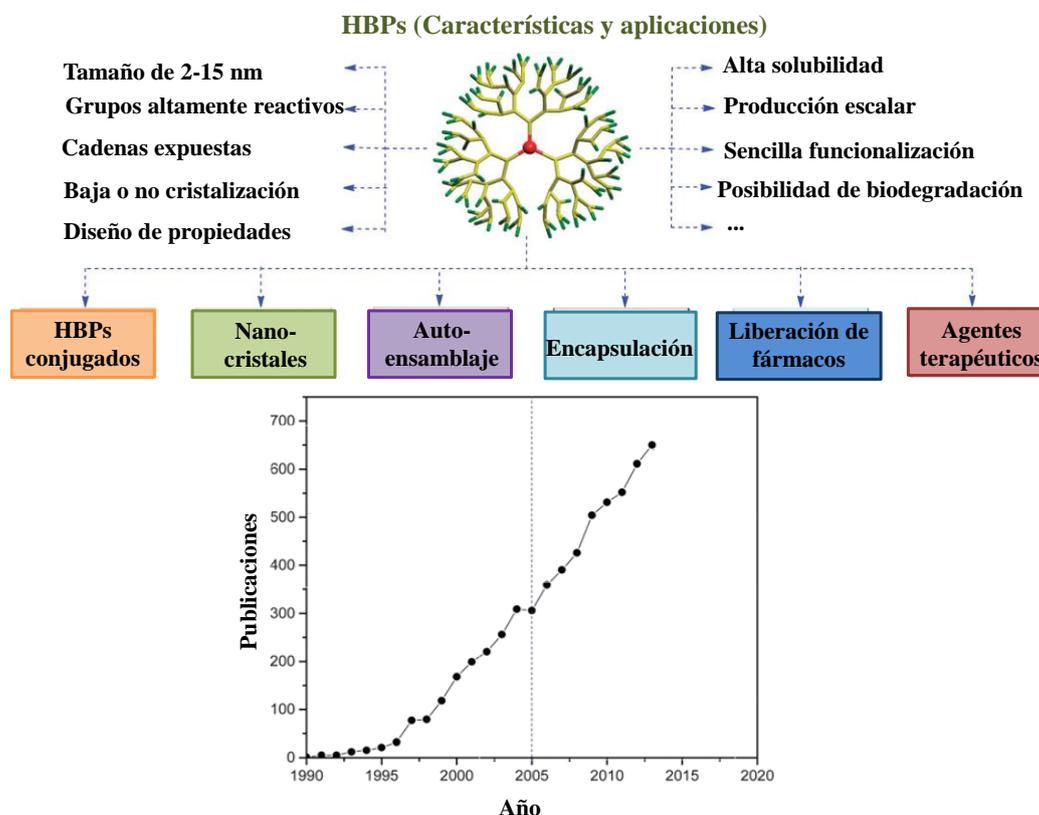


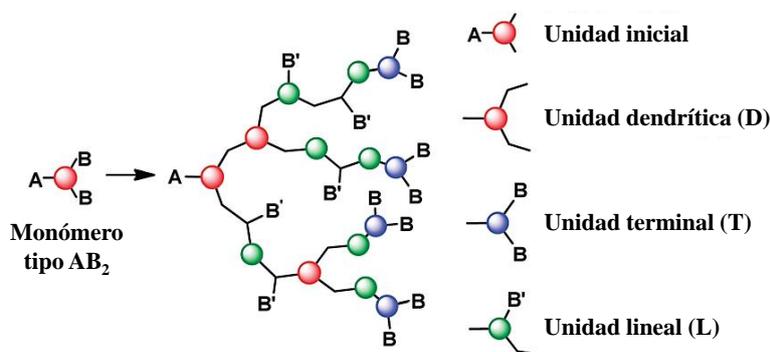
Figura 2.1 Características y aplicaciones generales de los polímeros hiperramificados.

### 2.1.1 Conceptos generales de los polímeros hiperramificados

Existen una alta variedad de estrategias para sintetizar este tipo de sistemas, pero una de las rutas sintéticas más utilizadas es la polimerización descrita por Flory (Figura 2.2). Consiste en la condensación de monómeros de tipo  $AB_x$ ,

dando lugar a macromoléculas de alto peso molecular con un gran número de grupos funcionales en la superficie.<sup>2</sup> El monómero  $AB_x$  debe intentar cumplir ciertos requisitos para que la reacción se encuentre lo más cerca posible de la reacción ideal:

- ✓ **A** debe reaccionar selectivamente con **B** en presencia de un catalizador o tras un proceso de activación.
- ✓ Los grupos funcionales del mismo tipo (**B**) deben tener la misma reactividad.
- ✓ Deben evitarse las reacciones secundarias (isomerizaciones, entrecruzamientos, etc.) que limiten el crecimiento del polímero.



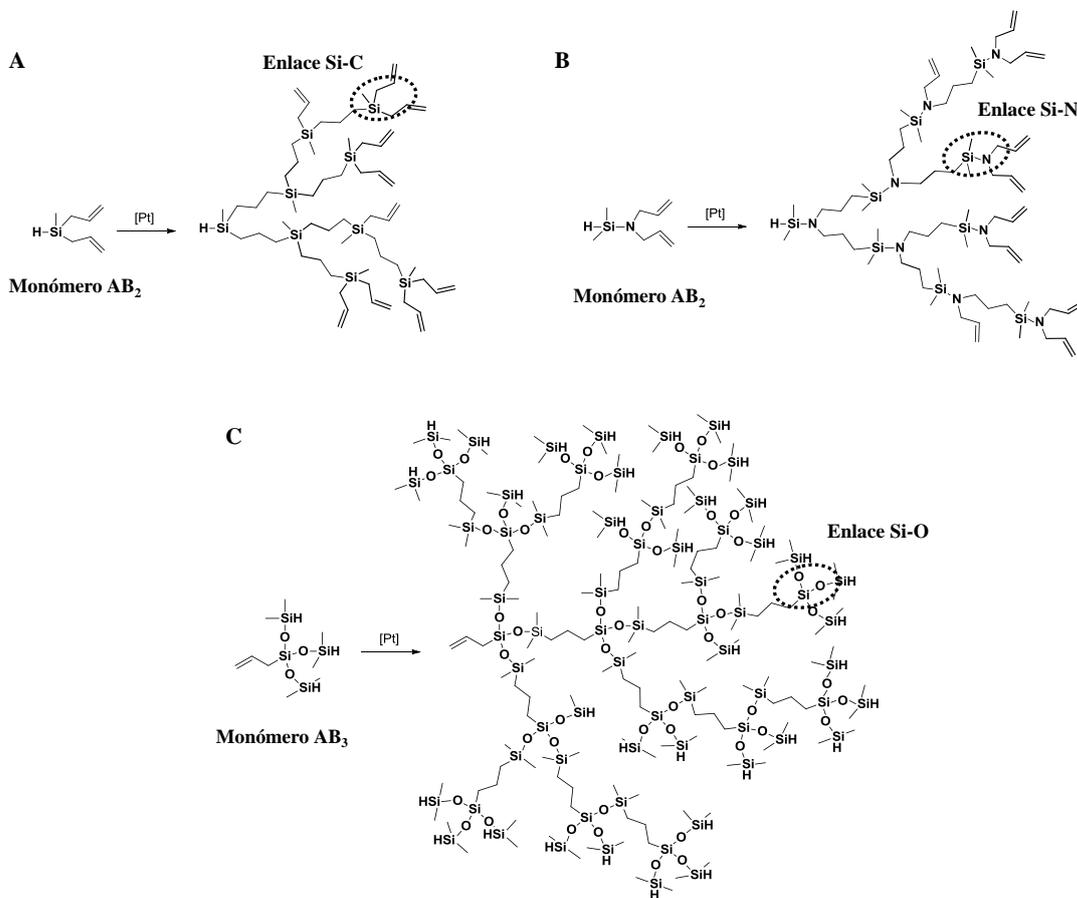
**Figura 2.2** Polimerización de monómeros tipo  $AB_2$ .

Los principales parámetros que definen a este tipo de sistemas son el grado de ramificación (DB) y la polidispersidad. En la actualidad, el reto sintético es producir polímeros hiperramificados con estructuras bien controladas, las cuales presentan altos grados de ramificación y estrechas polidispersidades. Es decir, obtener estructuras similares a los dendrímeros, pero sin sacrificar las ventajas de su síntesis, sobre todo la posibilidad de escalar su producción.<sup>3</sup>

### 2.1.2 Polímeros hiperramificados basados en átomos de silicio

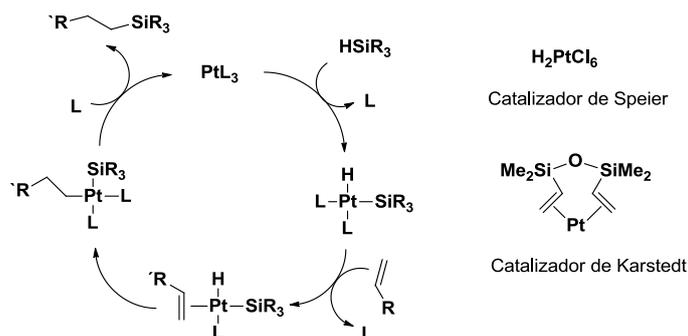
En particular, los polímeros hiperramificados basados en átomos de silicio han atraído gran interés, debido a sus estructuras y propiedades únicas incluyendo baja viscosidad, alta flexibilidad y multifuncionalidad. Se han

sintetizado policarbosilanos,<sup>4</sup> policarbosiloxanos<sup>5</sup> y más recientemente policarbosilazanos<sup>6</sup> (Figura 2.3).



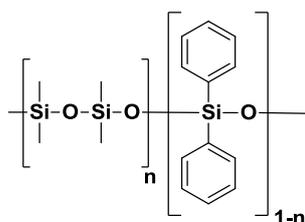
**Figura 2.3** Ejemplos de polímeros hiperramificados basados en diferentes esqueletos de silicio: A) policarbosilano, B) policarbosilazano y C) policarbosiloxano.

Este tipo de polímeros son sintetizados normalmente mediante una reacción sencilla de hidrosililación, utilizando complejos de platino como catalizadores. Los catalizadores más utilizados son el de Speier y Karstedt, siendo éste último el más activo (Esquema 2.1). Desafortunadamente, el uso de estos catalizadores conduce a algunas reacciones secundarias, principalmente isomerizaciones (adición Markonikov).



**Esquema 2.1** Mecanismo de la reacción de hidrosililación.

El grupo de Mathias publicó por primera vez la síntesis de polisiloxanos en 1991,<sup>7</sup> polímeros interesantes debido a los enlaces hidrolizables que contienen. Estructuras que presentan este tipo de enlace biodegradable se han explorado ampliamente en el campo de la biomedicina.<sup>8</sup> Estos sistemas son altamente flexibles, pero su enlace Si-O les confiere una menor estabilidad respecto a otros sistemas que se comentarán a continuación. Por este motivo, han recibido gran atención derivados en los cuales se han introducido grupos aromáticos, ya que se mejoran la estabilidad térmica y sus propiedades mecánicas (Figura 2.4).<sup>9</sup>



**Figura 2.4** Ejemplo de un copolímero hiperramificado con unidades aromáticas en su estructura.

El grupo de Muzafarov en 1993 presentó la primera síntesis de los polímeros de naturaleza policarbosilano.<sup>10</sup> Estos polímeros se caracterizan por presentar un esqueleto flexible y altamente lipofílico en comparación con la hidrofilia que presentan otros sistemas, como por ejemplo los tipo poliamina o poliglicerinas, además de una gran estabilidad química y térmica.<sup>11</sup>

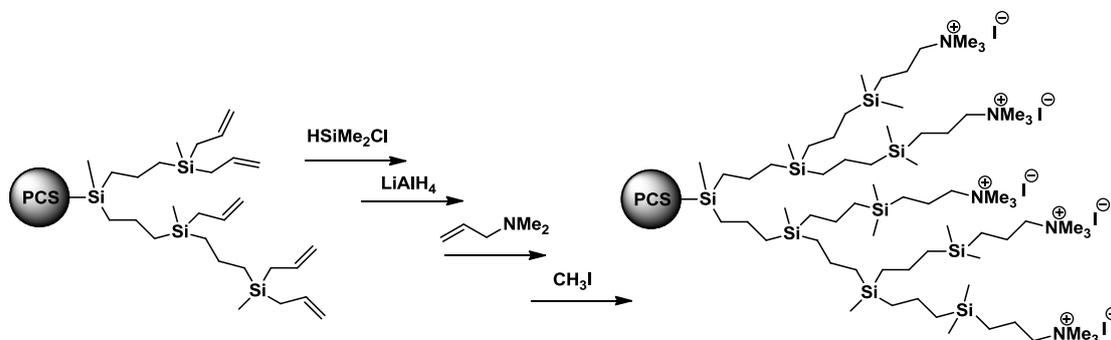
### 2.1.3 Estrategias sintéticas para la obtención de polímeros basados en átomos de silicio funcionalizados con grupos iónicos en la periferia

Para aplicaciones biomédicas es necesario utilizar sistemas principalmente solubles en medios acuosos, por lo que un esqueleto carbosilano precisa una periferia cargada que le confiera dicha solubilidad en agua. Sin embargo, la lipofilia de su esqueleto interno le confiere propiedades deseables para este tipo de aplicaciones, como por ejemplo una mayor facilidad para atravesar membranas biológicas.

Con ayuda de diversas colaboraciones, nuestro grupo de investigación ha centrado su atención en el estudio de diferentes estructuras dendríticas de naturaleza carbosilano funcionalizados en la periferia con grupos iónicos para diversas aplicaciones biomédicas. Principalmente se han estudiado como agentes antibacterianos,<sup>12,13</sup> como vehículos de transporte de material génico<sup>14</sup> y como agentes antivirales.<sup>15</sup>

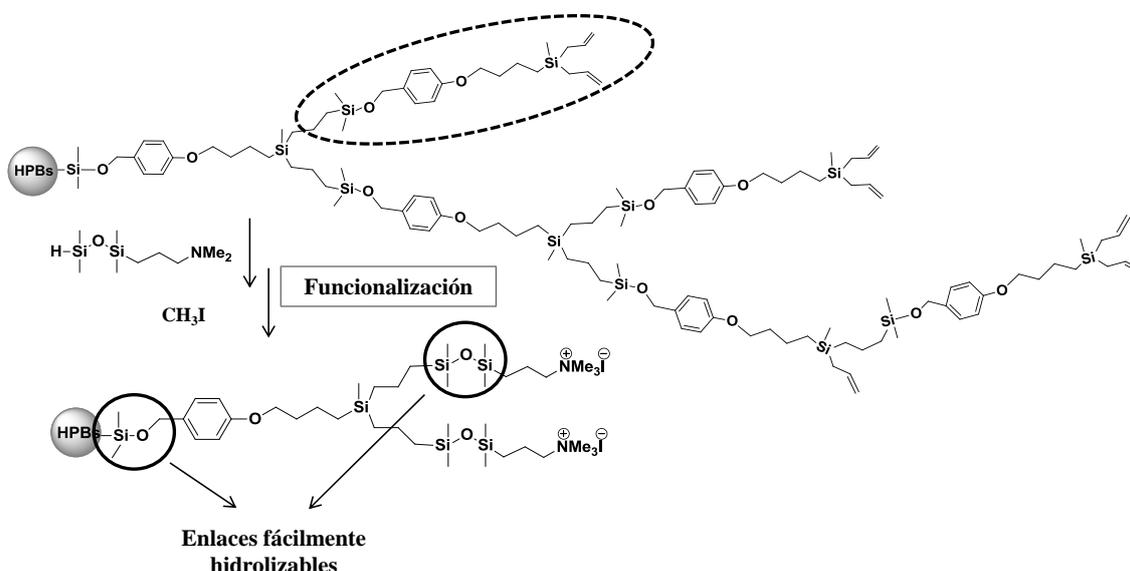
El conocimiento adquirido ha sido trasladado a los polímeros hiperramificados de tipo carbosilano que también presentan características importantes en el campo de la biomedicina.

El primer trabajo publicado abordaba la funcionalización de una matriz puramente carbosilano con grupos amino y amonio mediante reacciones de hidrosililación, obteniéndose sistemas con capacidad antibacteriana (Esquema 2.2).<sup>16</sup>



**Esquema 2.2** Ejemplo de la síntesis de HPBs con grupos catiónicos en la periferia.

Continuando en ésta línea de investigación, en otro trabajo se recoge la síntesis de una nueva matriz de naturaleza carbosiloxano. La presencia de enlaces Si-O en la estructura permite su hidrólisis en disolventes próticos que puede ser útil para diversas aplicaciones, tales como encapsulación o liberación controlada de fármacos. La funcionalización de las unidades terminales con diversas aminas se llevó a cabo usando reacciones de hidrosililación. Sin embargo, este tipo de sistemas resultaron ser demasiado inestables frente a la hidrólisis para su utilización en aplicaciones biomédicas.<sup>17</sup>



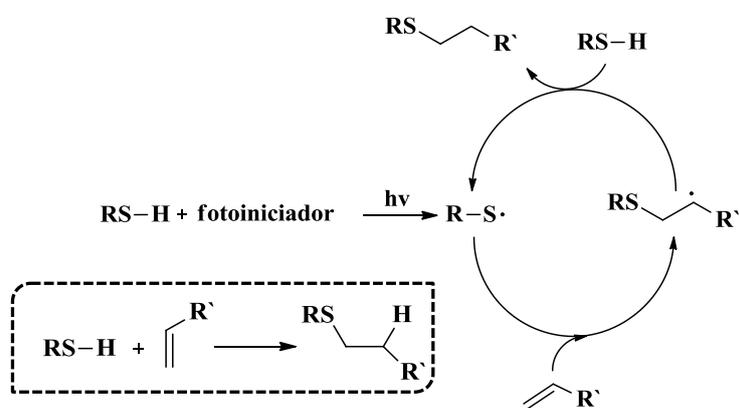
**Esquema 2.3** Síntesis de un polímero hiperramificado con enlaces susceptibles de hidrólisis en su estructura.

La ruta sintética empleada en ambas matrices, presenta ciertos inconvenientes tales como procesos laterales de isomerización de los dobles enlaces que impiden el crecimiento de la cadena, así como condiciones de reacción en las que son necesarias altas temperaturas. Por ello, la utilización de las reacciones conocidas como *click chemistry* podría facilitar estos procedimientos sintéticos y hacer más versátil la funcionalización. En los últimos años, la química tiol-eno como ejemplo de click chemistry, se ha utilizado cada vez más en la funcionalización de diferentes sistemas dendríticos debido a que se trata de una síntesis sencilla y sobre todo muy versátil.<sup>18</sup>

El mecanismo de la reacción es radicalario (Esquema 2.4) y consta de distintas etapas:

- i. Iniciación: formación del radical tiol en presencia de un catalizador.
- ii. Propagación: adición del radical tiol al doble enlace para formar un intermedio radicalico que posteriormente abstrae un hidrógeno de otra molécula de tiol para dar el producto deseado.
- iii. Terminación: posibles procesos de acoplamiento de radicales.

En concreto la reacción click tiol-eno, se utiliza para describir la reacción entre un grupo tiol y un doble enlace.



**Esquema 2.4** Mecanismo general de la reacción click tiol-eno.

Una de las principales ventajas de este tipo de reacción es su versatilidad, se puede realizar en diversos disolventes, con una amplia variedad de reactivos y en diferentes condiciones de reacción, obteniéndose altos rendimientos, bajos porcentajes de subproductos, facilitando de este modo su purificación.

HBP's con varios núcleos, tales como poli (éster-amida)s,<sup>19</sup> poliéteres,<sup>20</sup> poliamidoaminas<sup>21</sup> y polisiloxanos,<sup>22</sup> se han sintetizado o modificado a través de la química tiol-eno. Con respecto a HBP's de naturaleza carbosilano no se ha encontrado ningún ejemplo en la bibliografía científica.

### 2.1.4 Presentación y objetivos del Capítulo

En el **Capítulo 2** se presenta la síntesis y caracterización química de una nueva matriz polimérica de naturaleza carbosilano, en la cual se ha introducido grupos aromáticos en su estructura con el objetivo de mejorar su estabilidad térmica y otras propiedades físico-químicas.<sup>11</sup> Este nuevo sistema y otro similar sin unidades aromáticas, son funcionalizados a través de diferentes metodologías con grupos iónicos (carboxilato, sulfonato y aminas terciarias) en su periferia.

El objetivo general es estudiar si estos sistemas pueden suponer una alternativa a sus dendrímeros análogos, los cuales han demostrado poseer excelentes propiedades biomédicas.

Los objetivos de este Capítulo 2 son los que se enumeran a continuación:

- ✓ Sintetizar y caracterizar una nueva matriz polimérica basada en átomos de silicio con unidades aromáticas en su estructura.
- ✓ Sintetizar y caracterizar polímeros hiperramificados basados en átomos de silicio funcionalizados con grupos iónicos en la periferia mediante reacciones de hidrosililación.
- ✓ Sintetizar y caracterizar polímeros hiperramificados basados en átomos de silicio funcionalizados con grupos iónicos en la periferia mediante adición click tiol-eno.
- ✓ Evaluar los sistemas catiónicos sintetizados como agentes antibacterianos y de transfección (ver Capítulo 5).
- ✓ Evaluar los sistemas aniónicos sintetizados como agentes antivirales (ver Capítulo 5).

### 2.1.5 Nomenclatura

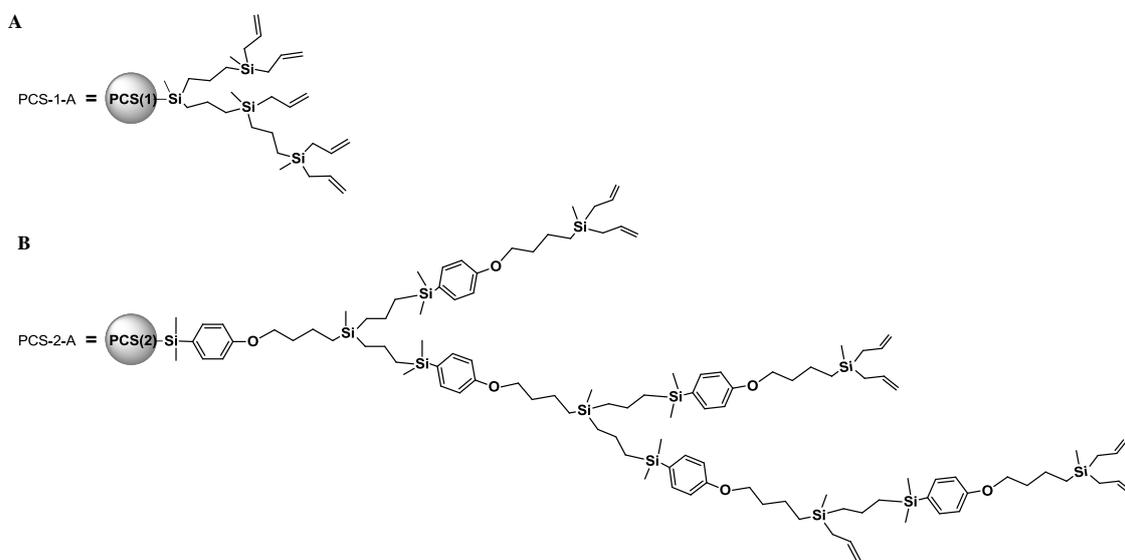
Con el fin de facilitar la lectura del Capítulo, se simplifican los nombres de los compuestos de acuerdo con la siguiente nomenclatura, ya que debido a la complejidad estructural de estas macromoléculas no es sencillo nombrarlas de acuerdo a los criterios de la IUPAC.

**a) Nomenclatura de las matrices poliméricas**

En la Figura 2.5 se muestra de modo esquemático la estructura del esqueleto carbosilano de estos sistemas. A lo largo del Capítulo se utilizarán dos tipos de matrices poliméricas terminadas en grupos alilo (A) (Figura 2.5):

A) Una matriz puramente carbosilano (PCS-1-A)

B) Una matriz carbosilano en la cual se ha introducido anillos aromáticos en su estructura (PCS-2-A)

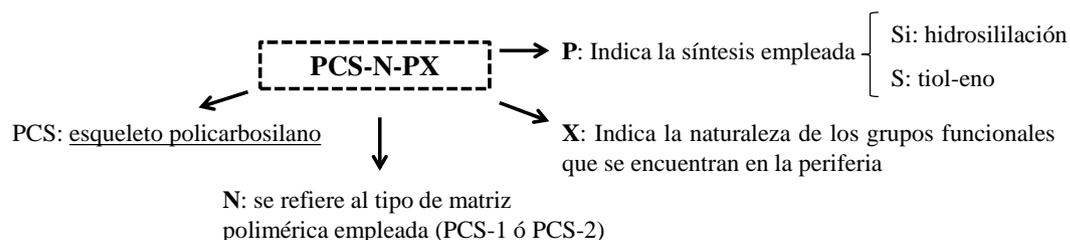


**Figura 2.5** Esqueleto de las matrices poliméricas utilizadas.

La elección de estos sistemas permitirá comprobar diferencias de comportamiento en función de su tamaño, rigidez y número de ramas generadas por ambos monómeros.

**b) Nomenclatura de los polímeros funcionalizados**

En este Capítulo se presenta la síntesis de diversos polímeros hiperramificados funcionalizados con distintos grupos, en los cuales se utilizara la nomenclatura recogida en la Figura 2.6:



**Figura 2.6** Nomenclatura de los polímeros funcionalizados.

### 2.1.6 Aspectos generales de la caracterización de los sistemas carbosilano sintetizados y presentados en este Capítulo

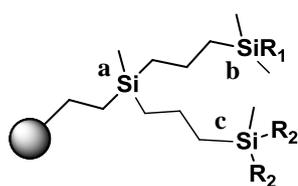
Las principales técnicas empleadas para la caracterización de los compuestos sintetizados y descritos en este Capítulo han sido la espectroscopia de RMN multinuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ) y multidimensional (1D, 2D), cromatografía de exclusión de tamaños acoplada a un detector de dispersión de luz multiángulo (SEC-MALS), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y potencial  $\zeta$ . Los datos completos se encuentran en el apartado experimental de esta Memoria, tras la descripción detallada de la síntesis de cada producto.

Al ser la estructura dendrítica de naturaleza repetitiva, el desplazamiento químico en espectroscopia de RMN de los átomos internos de los polímeros será prácticamente independiente. Por ello, en la discusión de la caracterización por RMN de los compuestos funcionalizados tan sólo se comentarán las señales correspondientes a la periferia, al ser las que se verán afectadas durante los procesos de funcionalización.

Con el fin de reducir repeticiones en la caracterización estructural de los diferentes sistemas, a continuación se comentan las principales señales en espectroscopia de RMN de  $^{29}\text{Si}$  del esqueleto carbosilano de los polímeros sintetizado en este Capítulo.

En el espectro de RMN de  $^{29}\text{Si}$  para los polímeros PCS-1-A y PCS-2-A se observaban tres señales que se asignaban a los tres entornos posibles del silicio (terminal, lineal y dendrítico), la incorporación de los grupos funcionales

modifica el espectro mostrando dos señales únicamente que se asigna a las unidades dendríticas (a) y luego otra donde se solapan las unidades terminales y lineales funcionalizadas (b y c) (Figura 2.7). En todos los polímeros funcionalizados la caracterización de los átomos de silicio se ha llevado a cabo a través de un experimento bidimensional HMBC de  $^1\text{H}$ - $^{29}\text{Si}$ .



Tipo de Si en la estructura		RMN de $^{29}\text{Si}$ (ppm)
<b>a</b>		1 - 1.6
<b>b</b>	$\text{R}_1 = \text{Cl}$	31
	$\text{R}_1 = \text{H}$	-14.1
	$\text{R}_1 = (\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2$	1.9
	$\text{R}_1 = (\text{CH}_2)_3\text{NMe}_3\text{I}$	2.4
	$\text{R}_1 = \text{CH}=\text{CH}_2$	-6.4
<b>c</b>	$\text{R}_1 = (\text{CH}_2)_2\text{S}\approx$	$\approx 3$
	$\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	0.9
	$\text{R}_2 = (\text{CH}_2)_3\text{S}\approx$	$\approx 2.5$

**Figura 2.7** Desplazamientos aproximados en espectroscopia de RMN de  $^{29}\text{Si}$  del esqueleto dendrítico de los polímeros sintetizados.

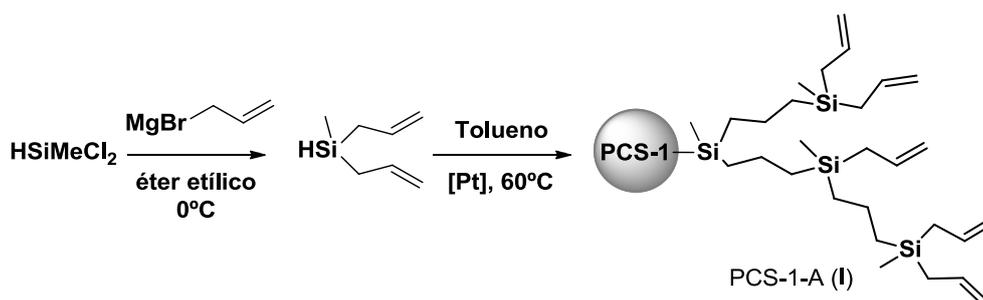
## 2.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS HIPERRAMIFICADOS BASADOS EN MATRICES CARBOSILANO

En este Capítulo se va a trabajar con dos tipos de matrices poliméricas. Por un lado, una matriz de naturaleza carbosilano, en la que se comentará brevemente su síntesis, estando su caracterización ampliamente detallada en la literatura.<sup>4,16</sup> Por otro lado, una matriz nueva en la cual se incluyen anillos aromáticos. En este caso, se explicará detalladamente su síntesis y caracterización.

### 2.2.1 Procedimiento sintético

#### a) *Matriz carbosilano (PCS-1-A)*

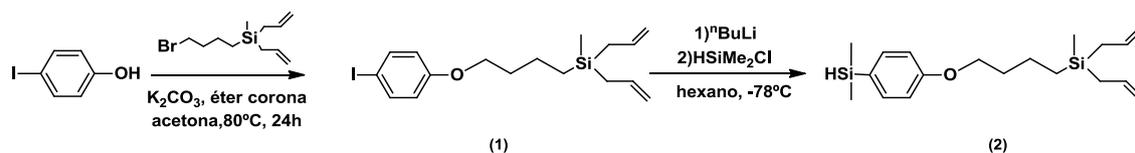
La matriz carbosilano PCS-1-A se ha preparado por una reacción de polimerización a partir del monómero AB<sub>2</sub> metildialilsilano siguiendo el método descrito en la bibliografía (Esquema 2.5).<sup>16</sup>



**Esquema 2.5** Esquema sintético para la preparación del polímero PCS-1-A (I) descrito en bibliografía.

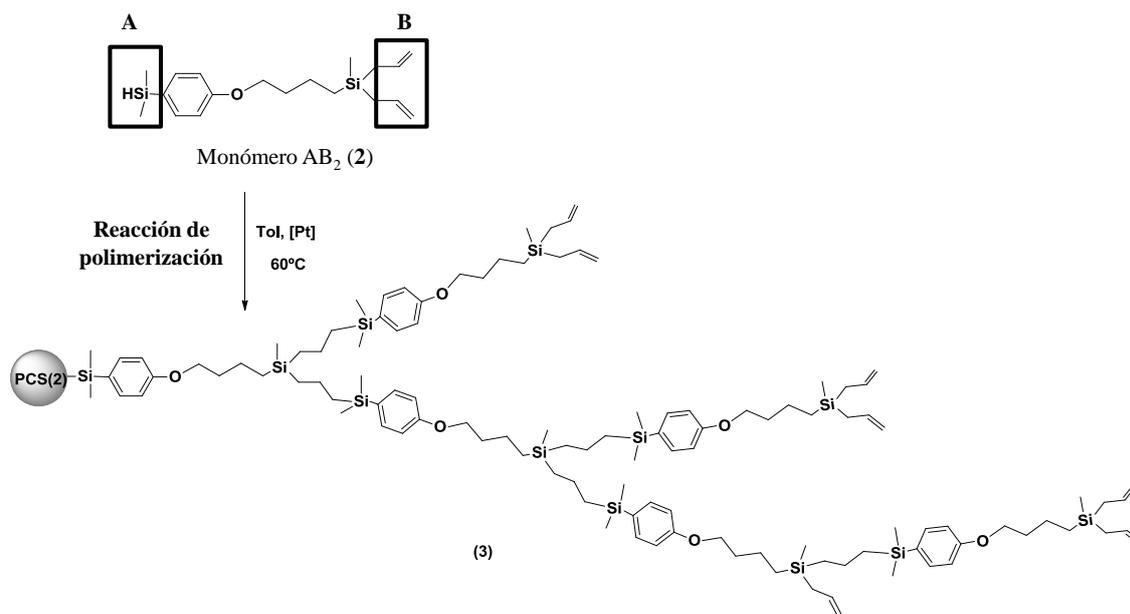
#### b) *Matriz carbosilano con anillos aromáticos en su estructura (PCS-2-A)*

El monómero de tipología AB<sub>2</sub> precursor del polímero hiperramificado, se prepara en dos etapas de síntesis (Esquema 2.6). La primera tiene lugar entre 4-yodofenol y  $\text{Br}(\text{CH}_2)_4\text{SiMe}(\text{C}_3\text{H}_5)_2$  (**II**)<sup>23</sup> en presencia de carbonato de potasio, éter corona y utilizando acetona como disolvente a  $80^\circ\text{C}$  durante una noche, para originar el compuesto  $\text{I-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2)_4\text{SiMe}(\text{C}_3\text{H}_5)_2$  (**1**). La formación del nuevo enlace  $\text{-CH}_2\text{O-}$  se confirma por resonancia magnética nuclear, observándose un singlete a 3.93 ppm en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .



**Esquema 2.6** Síntesis del monómero  $AB_2$  de partida (2).

La segunda etapa consiste en añadir  $^nBuLi$  gota a gota sobre una disolución del compuesto **1** en hexano a  $-78^\circ C$ , dejar que la reacción progrese durante 1 hora y a continuación añadir el  $HSiMe_2Cl$ , dando lugar al derivado  $H-SiMe_2-C_6H_4-O-(CH_2)_4SiMe(C_3H_5)_2$  (**2**). En el espectro de RMN de  $^1H$  para el compuesto **2** se observa la aparición de un doblete a 0.29 ppm debido a los dos grupos metilo unidos al átomo de Si, y un multiplete en torno a 4.38 ppm característico del enlace Si-H. Ambos compuestos se obtienen como aceites incoloros, estables y solubles en los disolventes orgánicos habituales.



**Esquema 2.7** Síntesis de la matriz polimérica de naturaleza carosilano con grupos alilo terminales PCS-2-A (**3**).

La síntesis de la matriz polimérica se lleva a cabo por una reacción de policondensación del monómero **2**, utilizando el catalizador de Karstedt y tolueno como disolvente. Se eligió  $60^\circ C$  como la temperatura más adecuada para realizar la polimerización en base a otros sistemas similares.<sup>17</sup> Mediante

espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  fue posible seguir la polimerización, a través de la desaparición de la señal característica del grupo Si-H, observándose que transcurridas 24 horas la reacción se había completado. Así, se obtiene el polímero de naturaleza PCS-2-A (**3**) como un aceite viscoso de color marrón (Esquema 2.7).

### 2.2.2 Caracterización estructural

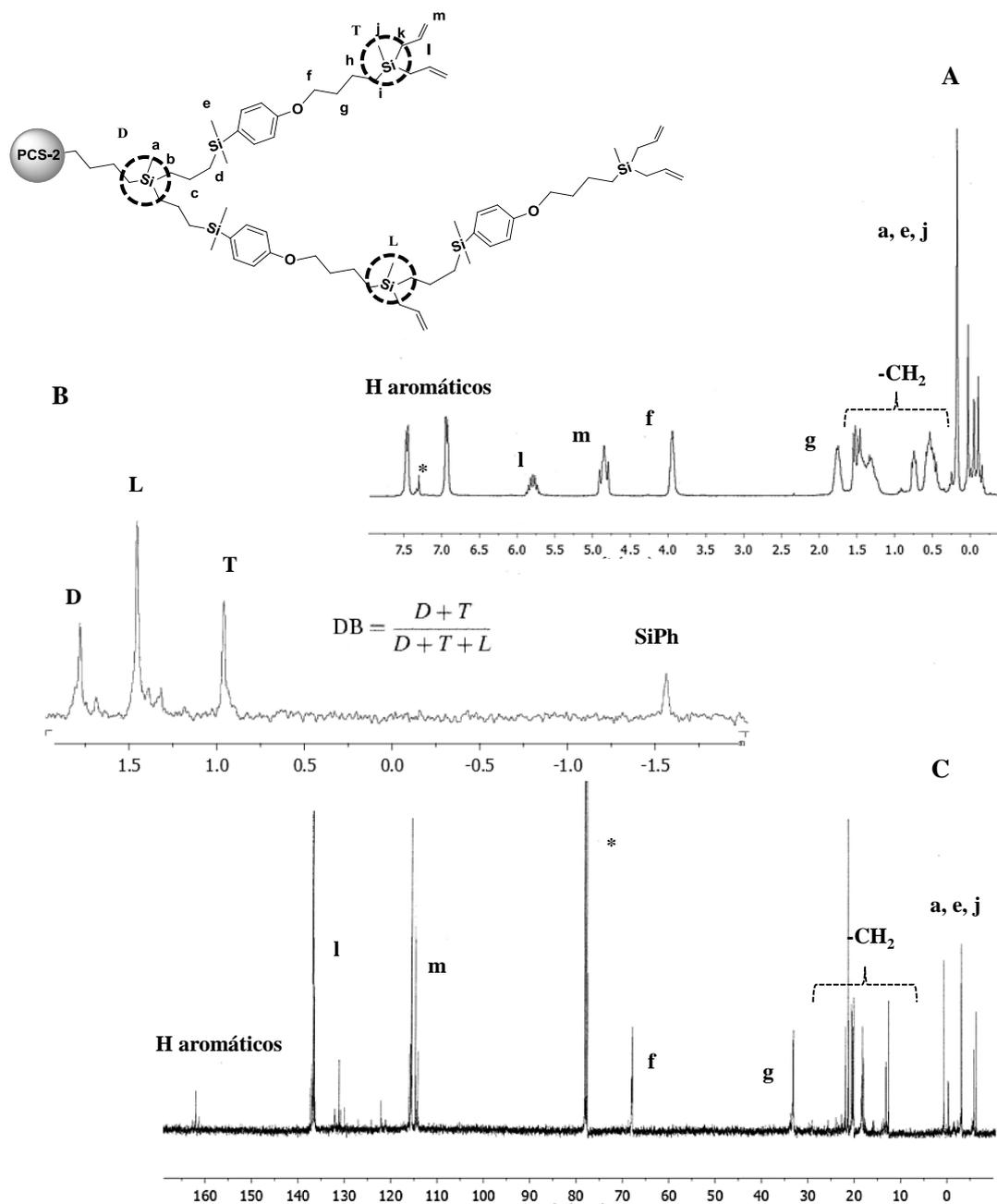
La matriz PCS-2-A (**3**) se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$ , y por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC-MALS). Otras propiedades físico-químicas de las matrices y sus derivados se detallarán en el apartado 2.4 realizándose un estudio comparativo.

#### a) *Espectroscopia de resonancia magnética nuclear*

Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos concuerdan con la estructura propuesta para el polímero **3**.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  muestra dos dobletes a 7.26 y 6.85 ppm correspondientes a los protones aromáticos. Para la nueva cadena alquílica formada  $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}-$  en el proceso de hidrosililación, se observa un multiplete a 1.34 ppm para el grupo metileno central y dos multipletes a 0.50 y 0.70 ppm para los grupos metilenos unidos directamente al átomo de silicio. Para la cadena  $-\text{ArOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}-$  se observan señales entre 1.34-1.56 ppm para los grupos metileno en posición  $\beta$  al átomo de silicio solapada con las señales características de los  $\text{CH}_2$  mencionados anteriormente. Los grupos más próximos al átomo de oxígeno como  $-\text{OCH}_2-$  y  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$  aparecen a 3.92 y a 1.78 ppm respectivamente. Para el grupo alilo terminal, se observa un doblete a 1.50 ppm debido al grupo metileno unido directamente a silicio y dos multipletes en torno a 4.88 ( $\text{CH}=\text{CH}_2$ ) y 5.77 ( $\text{CH}=\text{CH}_2$ ) ppm para los protones olefínicos. Por último, para los grupos metilo unidos directamente al átomo de silicio se observa un intervalo entre -0.02 - -0.07 correspondientes a los distintos grupos  $\text{SiMe}$  y a 0.21 ppm para el fragmento  $\text{SiMe}_2$  (Figura 2.8).

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$  se observa un conjunto de señales para los diferentes grupos metilenos, en las que se puede distinguir los más internos en la zona de 17.6 a 21.8 ppm, y a 65.4 para el fragmento  $-\text{OCH}_2-$ . Los átomos de carbono olefínicos aparecen a 113.3 y 134.5 ppm. Por último, se pueden observar los átomos de carbono aromáticos a 114.5 y 128.6 ppm, el  $\text{C}_{\text{ipso}}$  enlazado al SiAr a 129.4 ppm y el  $\text{C}_{\text{ipso}}$  enlazado al O-Ar a campo más bajo en torno a 158.7 ppm.



**Figura 2.8** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$ , B) RMN de  $^{29}\text{Si}$  y C) RMN de  $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$  del polímero **3**. \* $\text{CDCl}_3$

El espectro de RMN de  $^{29}\text{Si}$  para el polímero **3** muestra a campo alto tres señales a 1.7, 1.4 y 0.9 ppm (Figura 2.8). Debido a que el polímero se ha preparado a partir de un monómero  $\text{AB}_2$ , estas señales pueden ser asignadas a los tres entornos que el átomo de silicio puede adoptar y que denominamos unidad dendrítica (D,  $\delta = 1.7$  ppm), unidad lineal (L,  $\delta = 1.4$  ppm) y unidad terminal (T,  $\delta = 0.9$  ppm).<sup>24</sup> Además, se puede observar una señal a -4.3 ppm correspondiente al átomo de silicio unido directamente al anillo aromático.

**b) Grado de ramificación (DB)**

El grado de ramificación (DB) es un parámetro clave para la caracterización de este tipo de sistemas, el cual está controlado por la reactividad de los grupos funcionales y puede ser calculado de una forma sencilla con la ecuación de Frey como ya se ha comentado (Figura 2.7).<sup>25</sup> Es un parámetro estadístico que cuando se encuentra en torno a 0.5, se puede asignar a un alto grado de ramificación, y que la reactividad de A y de B han sido similares.<sup>2</sup> Los diferentes entornos químicos de los átomos de silicio mostrados en el espectro de RMN de  $^{29}\text{Si}$  para las unidades D, L y T y el valor de sus integrales permiten determinar el número de ramas de cada tipo que presenta cada matriz y de esta forma poder calcular su DB.<sup>11</sup>

A la temperatura de 60°C el valor de DB para PCS-2-A es de 0.44, mientras que para su análogo PCS-1-A es de 0.60. Aunque este estudio para la matriz PCS-1-A ya estaba descrito, se comprobó que el polímero generado por nuestro grupo estaba en consonancia con lo descrito en la bibliografía.<sup>16,26</sup>

**Tabla 2.1** Grado de ramificación del polímero **3** en función de la temperatura.

T (°C) de Polimerización	L (%)	D (%)	T (%)	DB
60	56.5	22.0	21.5	<b>0.44</b>
80	48.1	16.8	35.1	<b>0.59</b>
100	42.9	10.7	46.4	<b>0.34</b>

En el caso del polímero **3** se evaluó la influencia de la temperatura en esta propiedad (Tabla 2.1). Se observa como el grado de ramificación se ve influenciado por la temperatura, ya que a 100°C el valor de este parámetro se aleja bastante de lo descrito en bibliografía para este tipo de sistemas cuando ha reaccionado todo A,<sup>27</sup> y también en el espectro se observa un mayor porcentaje de isomerización del grupo alilo.<sup>28</sup>

Como temperatura óptima de polimerización se eligió 60°C debido a dos razones: (i) a dicha temperatura se observa el valor más próximo del parámetro DB a 0.5 y (ii) en estas condiciones no se detecta ninguna señal correspondiente a un proceso de isomerización. Esto asegura mantener un número adecuado de grupos funcionales en la periferia susceptibles de ser posteriormente modificados, ya que la isomerización del doble enlace impide el crecimiento de la cadena polimérica.

***c) Cromatografía de exclusión de tamaños acoplada a un detector de dispersión de luz multiángulo (SEC-MALS)***

En colaboración con la Dra. Pilar Tarazona del departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá, se determinaron mediante SEC-MALS las distribuciones de pesos moleculares, los pesos moleculares promedios en peso ( $M_w$ ) y promedio en número ( $M_n$ ), así como los índices de polidispersidad ( $PDI = M_w/M_n$ ).

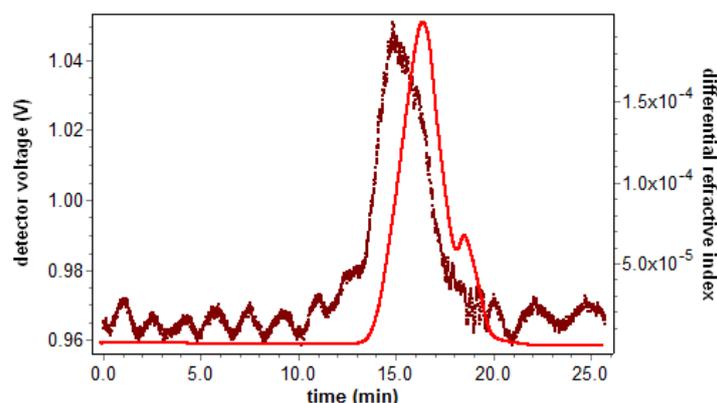
La utilización conjunta del detector de dispersión de luz multiángulo (MALS) y el de índice de refracción (IR) en el equipo de cromatografía de exclusión de tamaños, permite medir las intensidades de luz dispersadas a distintos ángulos, así como la concentración para cada volumen de elución y obtener pesos moleculares absolutos de polímeros, sin necesidad de calibrado.

El detector de índice de refracción proporciona una señal que es proporcional a la concentración de la muestra, mientras que la obtenida por el detector de dispersión de luz es proporcional a la concentración y al peso molecular del polímero analizado. Por ello, los cromatogramas obtenidos con los detectores para muestras polidispersas son diferentes. Cuanto mayor es la

diferencia entre los máximos de las curvas obtenidas por RI y MALS, mayor es la polidispersidad del polímero.

Es conocido que la temperatura influye en la reacción de polimerización, de manera que al aumentar la temperatura, se obtienen sistemas más polidispersos y de mayor peso molecular. Por ejemplo, en sistemas carboxi-carbosilano con enlaces Si-O en su estructura (Figura 2.3) las menores PDI se obtiene a 60°C,<sup>16</sup> hecho que refuerza la elección de esta temperatura como la más adecuada para realizar la polimerización.

En la Figura 2.9 se muestra el cromatograma obtenido por ambos detectores para la polimerización realizada a 60°C para el polímero PCS-2-A (3), mientras que en la Tabla 2.2 se recogen los datos obtenidos para las matrices PCS-1-A y PCS-2-A.



**Figura 2.9** Cromatograma obtenido para una polimerización a 60°C del polímero 3.

**Tabla 2.2** Datos obtenidos por SEC-MALLS para las dos matrices carboxilano analizadas.

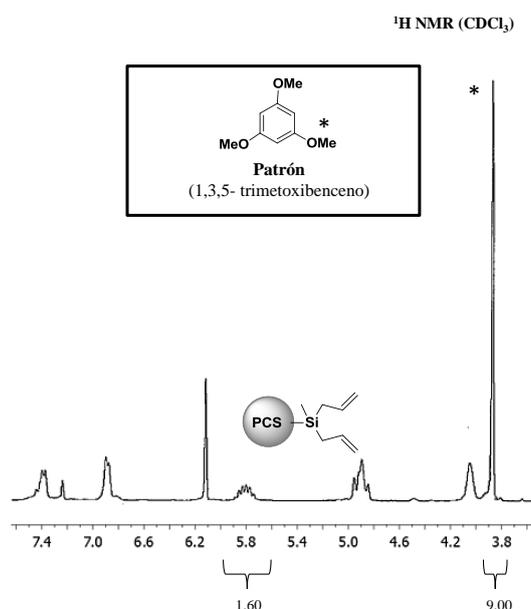
	$10^3$ Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	$10^3$ Mn (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI (Mw/Mn)
PCS-1-A (I) <sup>16</sup>	$6.5 \pm 0.1$	$2.8 \pm 0.1$	2.3
PCS-2-A (3)	$5.4 \pm 0.1$	$3.7 \pm 0.1$	1.4

Se puede concluir, que la introducción de un anillo aromático en la estructura del polímero hiperramificado disminuye el peso molecular promedio del polímero obtenido y su polidispersidad en relación al HPB que no contiene unidades aromáticas PCS-2-A (**3**). El valor obtenido de polidispersidad para esta nueva matriz (PDI = 1.4) está cercano al estudiado para un dendrímero carbosilano de segunda generación (PDI = 1.1) (Figura 2.11).<sup>23</sup>

#### d) Cuantificación de grupos funcionales en la periferia

Para conocer el número de grupos funcionales promedio que presentan estos nuevos sistemas, se realizó su cuantificación mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  con ayuda de un patrón interno (1,3,5-trimetoxibenceno).

En un tubo de RMN se pesó una cantidad conocida de patrón y de polímero, y a continuación se registró el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$  y se calcularon las correspondientes integrales (Figura 2.10). Mediante este método se puede conocer el número de grupos alilo por mg de polímero. Una vez conocido el número de grupos alilo, haciendo uso del peso molecular promedio obtenido por SEC-MALS, se puede determinar el número de grupos funcionales promedio que posee cada sistema (Tabla 2.3).

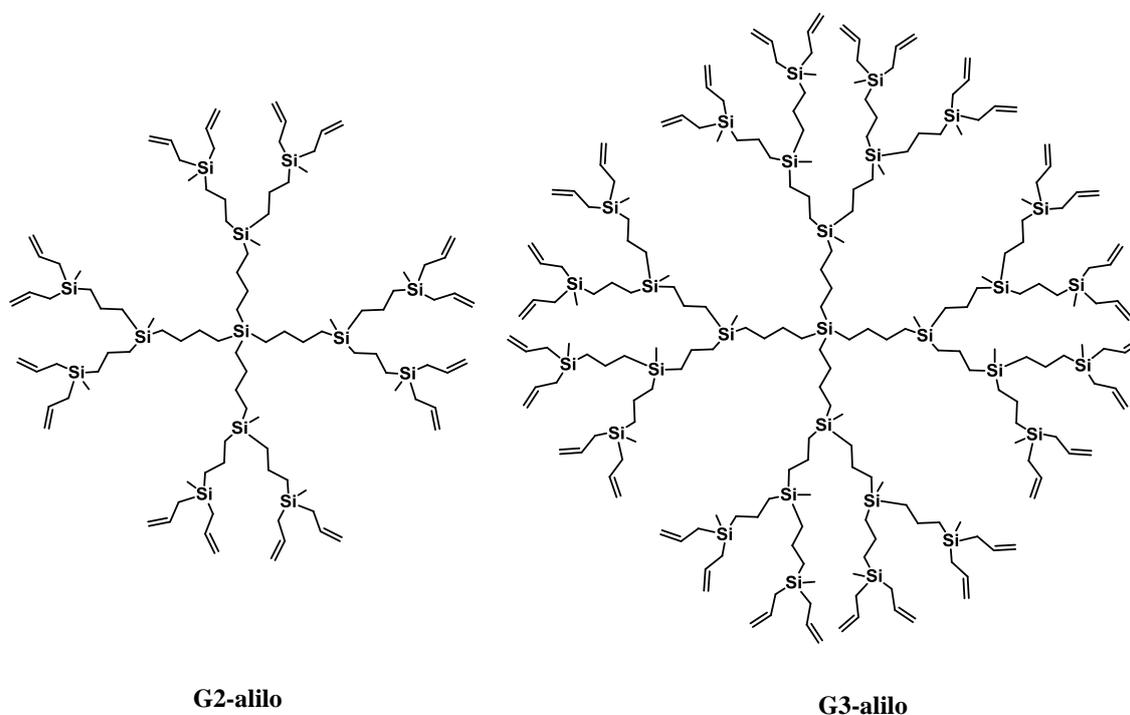


**Figura 2.10** Ejemplo de la cuantificación de grupos alilos terminales de la matriz PCS-2-A (**3**).

Se realizó el mismo cálculo para la matriz PCS-1-A, lo que permitió realizar una comparación de los sistemas poliméricos sintetizados y observar la influencia del número de grupos funcionales.

**Tabla 2.3** Datos obtenidos en la cuantificación de grupos alilos en la periferia de HPBs y su comparación con dendrímeros tipo carbosilano.

	Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	Grupos alilo/mg de polímero	Nº grupos funcionales
PCS-1-A	6500	5.08. 10 <sup>-6</sup>	<b>33</b>
PCS-2-A (3)	5400	3.08. 10 <sup>-6</sup>	<b>16</b>
G2-Alilo	1707		<b>16</b>
G3-Alilo	4191		<b>32</b>



**Figura 2.11** Representación estructural de dendrímeros de segunda y tercera generación de tipo carbosilano.

Estos estudios demuestran que la matriz **3** presenta aproximadamente 16 grupos funcionales en la periferia, mientras que la matriz PCS-1-A presenta un valor promedio de 33 grupos funcionales, similares a un dendrímero carbosilano de segunda y tercera generación, respectivamente.

De los datos mostrados en la Tabla 2.3 se pueden deducir varios aspectos. Por un lado, se puede observar que la matriz PCS-1-A duplica el número de grupos periféricos con respecto a PCS-2-A (**3**), pero su peso sólo se ve aumentado alrededor del 20%. Esto podría sugerir para la matriz **3** una superficie menos densa en grupos funcionales en comparación con el polímero PCS-1-A.

Por otro lado, si se comparan ambas matrices con dendrímeros análogos (Figura 2.10), se observa que el tamaño del dendrímero esférico con igual número de grupos es menor, lo que puede implicar que en los polímeros los grupos estén más separados. Además, en los polímeros debido a su topología, es bien conocido que no todos los grupos están igualmente disponibles. Por tanto, si la actividad de estos sistemas está regida por el número de grupos funcionales, quizás la menor disposición de dichos grupos podría influir en la misma.

## 2.3 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS MATRICES POLIMÉRICAS CON GRUPOS IÓNICOS EN LA PERIFERIA

### 2.3.1 Funcionalización de la matriz polimérica con grupos iónicos a través de reacciones de hidrosililación

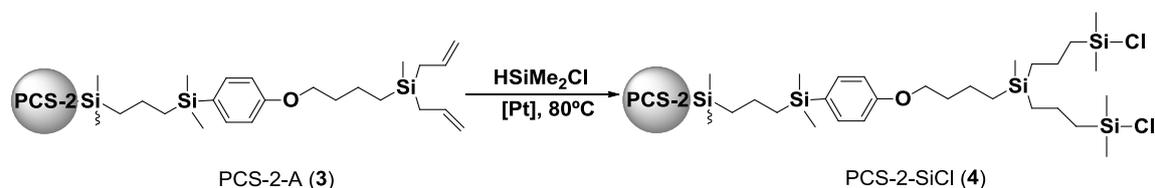
En este apartado solo se va a detallar la síntesis y caracterización estructural mediante espectroscopia de RMN de los diferentes sistemas. Un estudio más detallado de otras propiedades físico-químicas se tratará en el siguiente apartado (apartado 2.4).

#### 2.3.1.1 Polímeros hiperramificados precursores

La metodología empleada para la funcionalización requiere varias etapas de reacción. Así, la hidrosililación de los grupos alilo con  $\text{HSiMe}_2\text{Cl}$  conduce a la formación de enlaces Si-Cl terminales, que mediante tratamiento con  $\text{AlLiH}_4$  se transforman a enlaces Si-H.<sup>23</sup> A partir de estos sistemas, se pueden obtener los sistemas catiónicos y aniónicos como se detallan a continuación.

#### Procedimiento sintético

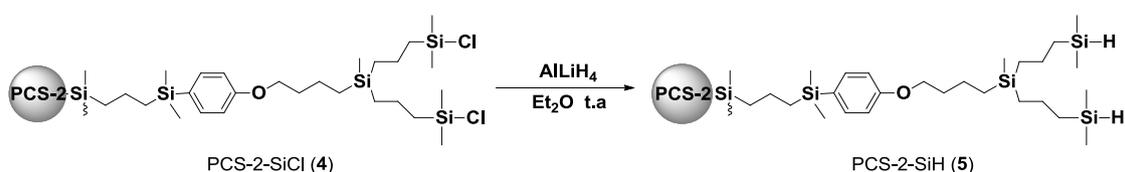
La reacción de hidrosililación de los grupos alilo de PCS-2-A (**3**) se lleva a cabo en exceso de  $\text{HSiMe}_2\text{Cl}$  y en presencia del catalizador de Karstedt a  $80^\circ\text{C}$  durante 48 horas (Esquema 2.8). Mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  se comprobó que la reacción había terminado debido a la ausencia de señales en la zona olefínica del espectro. El PCS-2-SiCl (**4**) se obtiene como un aceite soluble en disolventes orgánicos habituales. El enlace Si-Cl es sensible al aire y a la humedad, por ello es necesario almacenarlo bajo argón.



**Esquema 2.8.** Síntesis del polímero hiperramificado con grupos Si-Cl terminales (**4**).

Mediante el cálculo de diferencia de pesada entre la matriz clorada y la matriz que presenta grupos alilo terminales se puede determinar el número de moles de Si-Cl incorporados. Estos moles se utilizaron para calcular la cantidad de reductor que se necesita en el siguiente paso de la funcionalización.

La reducción de los enlaces Si-Cl a Si-H se lleva a cabo mediante la adición lenta y en frío del polímero **4** sobre una disolución de  $\text{AlLiH}_4$  en dietil éter (Esquema 2.9). Por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  se comprobó que la reacción había terminado por desaparición de la señal a 0.38 ppm debida a los dos grupos metilo unidos al Si-Cl, y por la aparición del multiplete característico del enlace Si-H a 3.82 ppm. El polímero PCS-2-SiH (**5**) se obtiene como un aceite soluble en diferentes disolventes orgánicos.



**Esquema 2.9** Síntesis del polímero hiperramificado con grupos Si-H terminales (**5**).

### Caracterización estructural

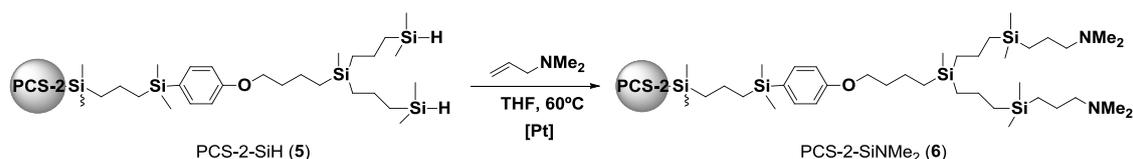
Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos concuerdan con las estructuras propuestas para los polímeros **4** y **5**. Debido a la extensión del trabajo y a la similitud que presentan con otros compuestos descritos en bibliografía y sintetizados en el grupo de investigación con anterioridad,<sup>23,16</sup> éstas especies intermedias no se han descrito con detalle en este apartado (ver parte experimental).

#### **2.3.1.2 Polímeros hiperramificados catiónicos a través de la reacción de hidrosililación**

##### Procedimiento sintético

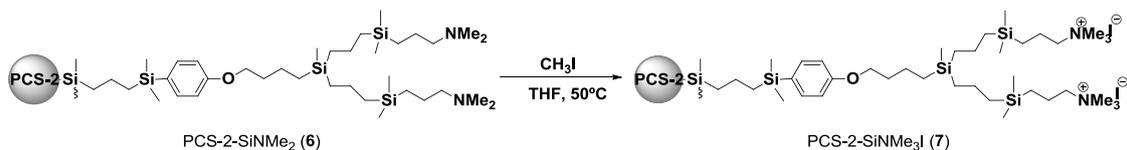
La funcionalización de la periferia con grupos amino se realiza a través de la reacción del polímero **5** disuelto en la mínima cantidad de THF con un exceso

de N,N-alildimetilamina y en presencia del catalizador de Karstedt a 60°C (Esquema 2.10). El seguimiento de la reacción se lleva a cabo mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , observando la desaparición de la señal a 3.82 ppm correspondientes al enlace Si-H, y la aparición de una nueva señal a 2.20 ppm que se asigna a los protones de los grupos  $-\text{NMe}_2$  que solapan con la señal correspondiente al grupo metileno adyacente  $-\text{CH}_2\text{NMe}_2$ . El derivado PCS-2-SiNMe<sub>2</sub> (**6**) se obtiene como un aceite gris claro estable y soluble en los disolventes orgánicos habituales.



**Esquema 2.10** Funcionalización de la matriz polimérica carbosilano con grupos amino terminales (**6**).

Para obtener un polímero soluble en agua o en disolventes polares, debido a la lipofilia del esqueleto carbosilano, se necesitan grupos cargados en la periferia que proporcionen dicha solubilidad. Para ello, el tratamiento de los grupos amino terminales del polímero **6** con MeI en THF a 50°C durante 12 horas, da lugar al correspondiente polímero catiónico con grupos amonio terminales PCS-2-SiNMe<sub>3</sub>I (**7**) (Esquema 2.11). Mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  se comprobó que la reacción había terminado por el desplazamiento de la señal asignada a los grupos metilo del grupo amino de 2.20 ppm a 3 ppm. El polímero **7** se obtiene como un sólido blanco pulverulento estable al aire y soluble en disolventes polares como DMSO y H<sub>2</sub>O.

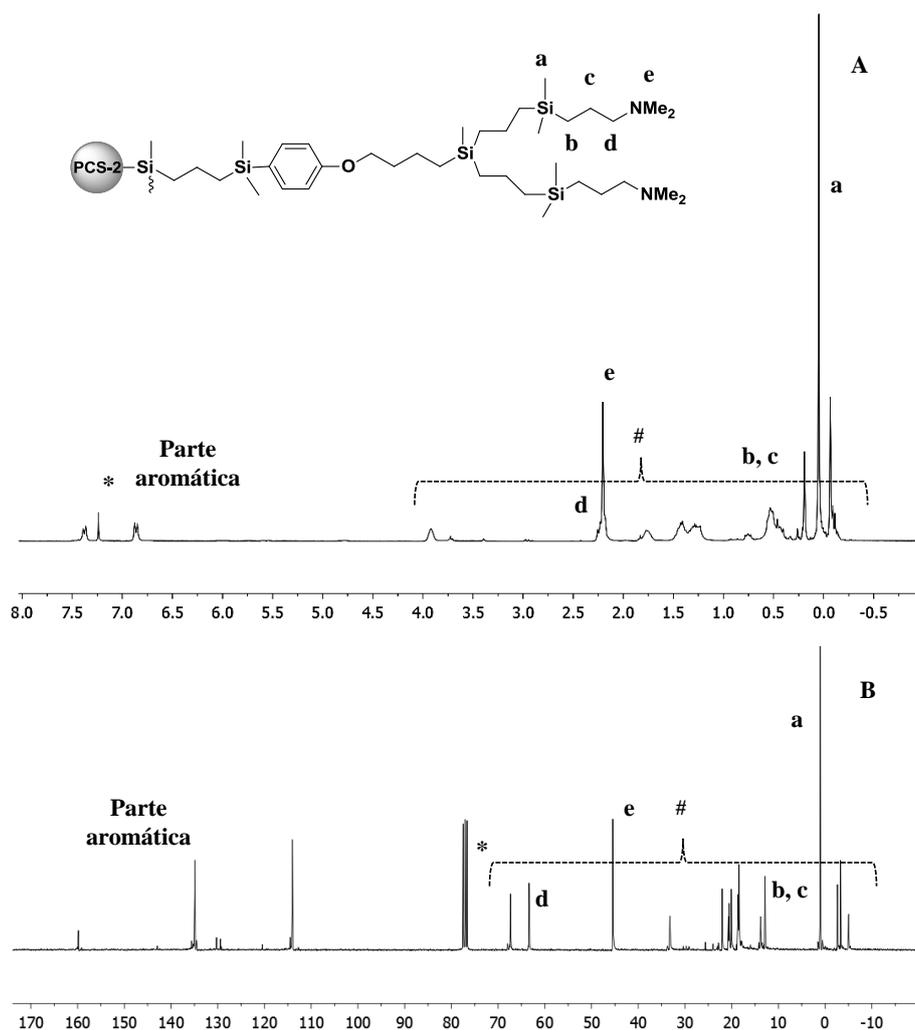


**Esquema 2.11** Síntesis de la matriz polimérica carbosilano con grupos amonio terminales (**7**).

### Caracterización estructural

Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos concuerdan con las estructuras propuestas para los polímeros **6** y **7**. La estructura interna de la matriz polimérica no se ve alterada por la funcionalización de los grupos alilos y presenta los mismos desplazamientos químicos que en el polímero **3** tanto en RMN de  $^1\text{H}$  como de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ . Por ello, en este apartado se describe únicamente las señales correspondientes a las ramas externas de la matriz.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes al polímero **6** fueron realizados en  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.



**Figura 2.12** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto PCS-2-SiNMe<sub>2</sub> (**6**). \* $\text{CDCl}_3$  y #esqueleto carbosilano.

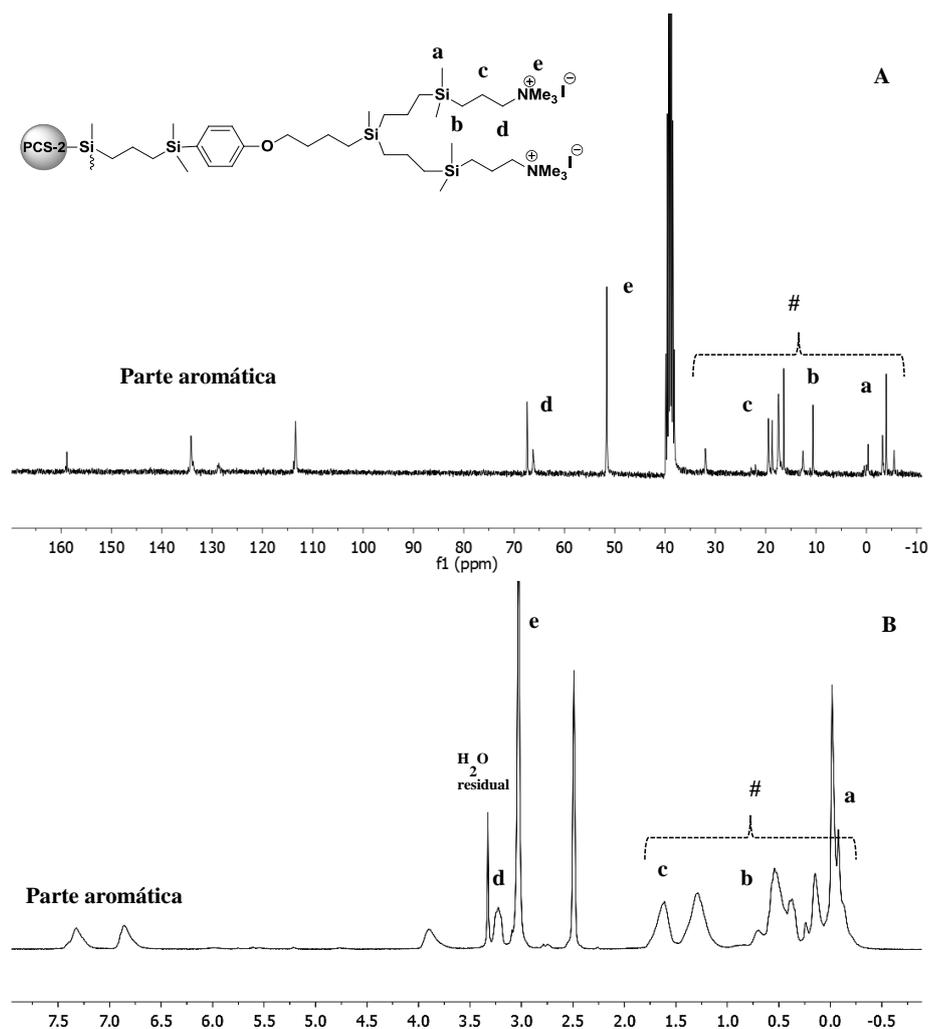
El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  muestra para el fragmento  $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$  una señal a 2.20 ppm donde solapan los protones de los grupos metilo y del grupo metileno unido directamente al átomo de nitrógeno, y dos multipletes a 1.41 y 0.53 ppm para el grupo metileno central y el unido directamente al átomo de silicio de la nueva cadena formada.

Por otra parte, el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  se caracteriza por presentar una señal a 12.8 ppm, correspondiente al grupo metileno unido a silicio, a 22.0 ppm para el grupo metileno central y a 63.4 ppm correspondiente al unido directamente al nitrógeno. Por último, se observa otra señal a 45.4 ppm para los grupos metilo  $-\text{NMe}_2$  (Figura 2.12).

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes al polímero **7** fueron realizados en  $\text{DMSO-}d_6$  como disolvente. Debido a la carga positiva situada sobre el átomo de nitrógeno que ejerce un mayor efecto desapantallante, se observa el desplazamiento de algunas señales a frecuencias más altas.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el polímero **7** las señales más características aparecen a 3.02 ppm para los grupos metilo unidos al átomo de nitrógeno y a 3.21 ppm correspondiente al grupo metileno.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  se encuentra el mismo efecto, por lo que se observa como las dos señales correspondientes a los fragmentos anteriores se desplazan a 49.8 y a 66.1 ppm, respectivamente (Figura 2.13).

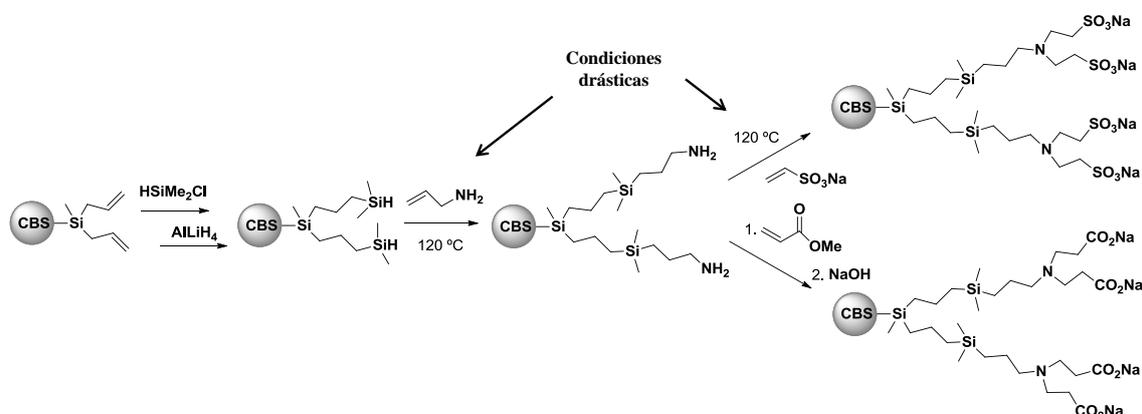


**Figura 2.13** Espectros de A) RMN de <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} y B) RMN de <sup>1</sup>H del compuesto PCS-2-SiNMe<sub>3</sub>I (7). \*DMSO-*d*<sub>6</sub> y # esqueleto carbosilano.

### 2.3.1.2 Polímeros hiperramificados aniónicos a través de la reacción de hidrosililación

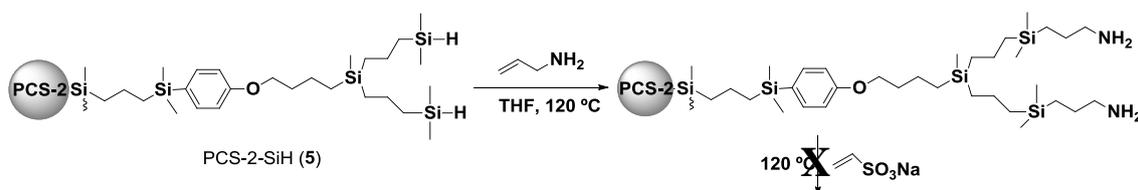
Para la funcionalización de la periferia con grupos aniónicos se siguió la ruta sintética empleada por el grupo de investigación para funcionalizar dendrímeros esféricos de naturaleza carbosilano. Consiste en la funcionalización de la periferia dendrítica a través de la reacción de hidrosililación de alilamina con los grupos SiH terminales del sistema dendrítico. La adición tipo Michael de la amina primaria resultante sobre vinilsulfonato o sobre vinilmetacrilato y el posterior tratamiento de este último con hidróxido de sodio proporcionaron los

sistemas decorados con grupos sulfonato y carboxilato respectivamente (Esquema 2.12).<sup>29</sup>



**Esquema 2.12** Síntesis de dendrímeros de naturaleza carbosilano con grupos sulfonato y carboxilato en la periferia.

A partir del sistema PCS-2-A se pudo preparar el polímero precursor funcionalizado con grupos amino  $-NH_2$  en la periferia en las mismas condiciones anteriormente descritas. Sin embargo, al realizar la adición tipo Michael con ambos reactivos, la reacción no se completaba (Esquema 2.13), por lo que este procedimiento fue abandonado.



**Esquema 2.13** Intento de la funcionalización de la matriz polimérica con grupos sulfonatos mediante hidrosililación.

Ya en los dendrímeros esféricos, para obtener los productos deseados se necesitan condiciones de reacción drásticas, con elevados tiempos de reacción y altas temperaturas.<sup>29</sup>

### 2.3.2 Funcionalización de las matrices poliméricas con grupos iónicos a través de la reacción de adición “click” tiol-eno

La metodología empleada fue la “click” tiol-eno. Esta reacción contribuye favorablemente a la formación de especies altamente funcionales de forma rápida y con elevados rendimientos debido a que no requiere condiciones específicas de reacción.

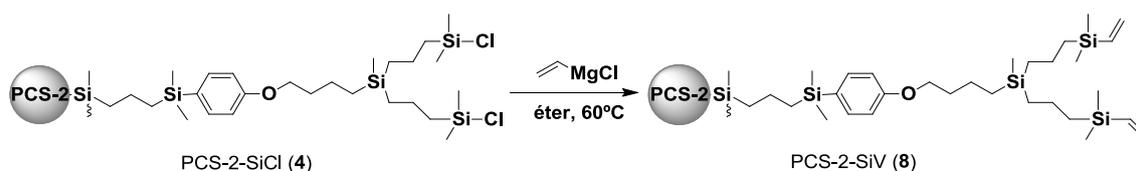
En el caso de los polímeros aniónicos la reacción entre el grupo tiol y los grupos alilos periféricos progresa adecuadamente. Sin embargo, la reacción análoga con los derivados tiol catiónicos no consigue finalizar, aun añadiendo exceso de reactivos o aumentando los tiempos de reacción. Por ello, se prepararon polímeros con grupos vinilos en la periferia, los cuales son más reactivos. En el caso de los polímeros aniónicos se utilizaron ambas matrices, PCS-1-A y PCS-2-A (**3**). Sin embargo, para los derivados catiónicos, solo fue funcionalizada la matriz **3**, ya que la funcionalización de la matriz PCS-1-A ya ha sido descrita en un trabajo previo.<sup>30</sup>

#### 2.3.2.1 Polímeros hiperramificados catiónicos a través de la reacción de adición “click” tiol-eno

##### Procedimiento sintético

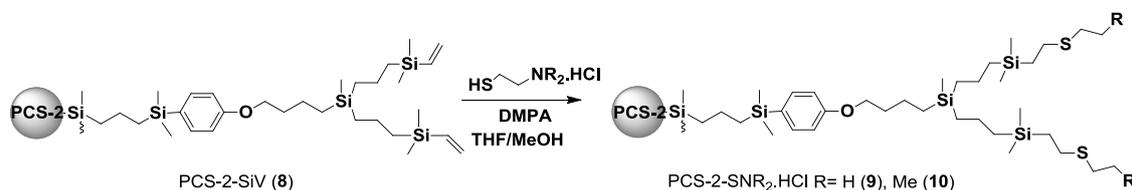
Como ya se ha comentado anteriormente la funcionalización vía tiol-eno con grupos catiónicos es eficaz si la matriz posee grupos vinilos, por tanto, el primer paso es incorporar a la matriz **3** dichos grupos en la superficie.

Para ello, sobre el polímero PCS-2-SiCl (**4**) se realiza una reacción de alquenilación con grupos vinilos. Esta reacción se lleva a cabo en las mismas condiciones que se describen en bibliografía para sistemas similares, obteniéndose el polímero PCS-2-SiV (**8**) como un aceite amarillo, soluble en disolventes orgánicos habituales y estable al aire (Esquema 2.14).<sup>31</sup> El estudio del producto por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H confirma que la reacción se ha completado cuando desaparece el singlete a 0.38 ppm correspondiente a los grupos metilo unidos al átomo de Si del fragmento -SiCl.



**Esquema 2.14** Síntesis del polímero con grupos vinilo terminales (**8**).

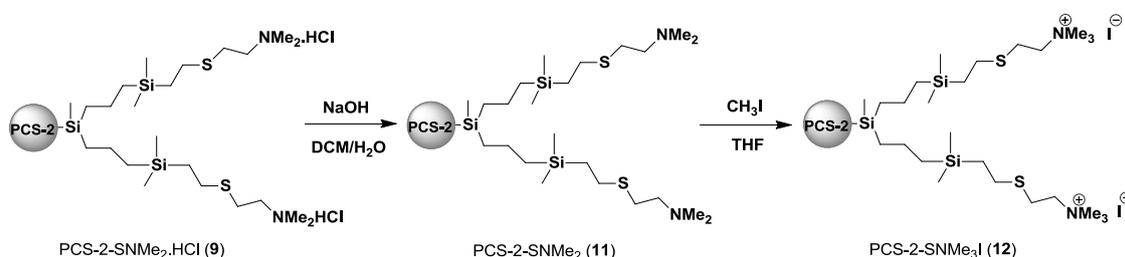
Una vez preparado el polímero con grupos vinilo, se procedió a realizar su funcionalización. Para ello, se han utilizado los siguientes derivados tiol-amina,  $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NHMe}_2\text{Cl}$  y  $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3\text{Cl}$ . La reacción se lleva a cabo en una mezcla de disolventes THF/MeOH en presencia de un fotoiniciador, 2,2-dimetoxifenilacetofenona (DMPA) bajo atmósfera inerte. La adición del fotoiniciador y del correspondiente tiol se realiza en dos tiempos dado que estudios anteriores en nuestro laboratorio muestran que la reacción en un solo paso es menos favorable, necesita mayores tiempos de reacción y un mayor porcentaje de exceso del derivado tiol (Esquema 2.15). La reacción se mantiene bajo irradiación UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) durante 4 horas. La purificación de la matriz funcionalizada con grupos amonio terminales, se realiza mediante nanofiltración con una membrana de 500 Da de peso molecular. Las trazas de fotoiniciador ocluidas en la estructura polimérica se eliminan mediante precipitación en éter. Así, se obtienen los polímeros  $\text{PCS-2-SNR}_2\cdot\text{HCl}$  ( $\text{R}=\text{H}$  (**9**) y  $\text{R}=\text{Me}$  (**10**)) como sólidos amarillos muy higroscópicos solubles en disolventes próticos (MeOH,  $\text{H}_2\text{O}$ ).



**Esquema 2.15.** Síntesis de los polímeros con grupos amonio terminales (**9 y 10**).

La cuaternización con HCl origina sistemas que dependen del pH del medio, por lo que el número de cargas positivas podría variar. Por ello, se procedió a obtener grupos amonio sin presencia de enlaces N-H.

En primer lugar, se neutraliza el polímero **10** con NaOH en una mezcla agua/DCM, extrayendo en la fase orgánica el polímero neutro PCS-2-SNMe<sub>2</sub> (**11**) como un aceite incoloro soluble en disolventes orgánicos. A continuación, el tratamiento de los grupos amino terminales del polímero **11** con MeI en THF a 50°C durante 12 horas, da lugar al correspondiente polímero catiónico PCS-2-SNMe<sub>3</sub>I (**12**) con grupos amonio terminales (Esquema 2.16). Mediante espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H se comprobó que la reacción había terminado por el desplazamiento de la señal asignada a los grupos metilo del grupo amino de 2.20 ppm a 3.00 ppm en ambos polímeros. El derivado **12** se obtiene como un sólido amarillento soluble en disolventes polares como agua y DMSO.

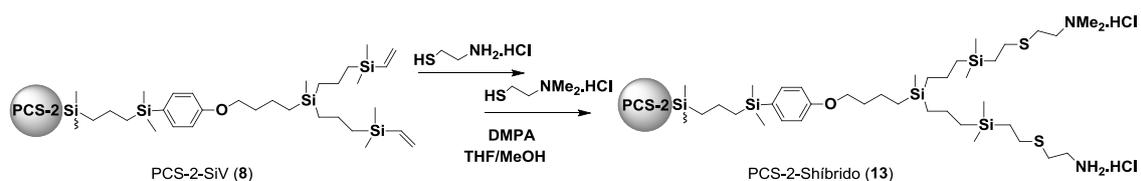


**Esquema 2.16** Síntesis de los polímeros con grupos amino (**11**) y amonio (**12**) terminales.

Conocida la reactividad para introducir en la superficie del polímero grupos funcionales vía reacción tiol-eno, se estudió la posibilidad de generar polímeros híbridos. Es decir, polímeros que contengan por un lado grupos -NH<sub>2</sub> que permitan introducir moléculas de interés como grupos cromóforos, y por otro lado, grupos -NMe<sub>2</sub> que tras su posterior cuaternización proporcionen a la molécula la solubilidad en agua necesaria para su aplicación en biomedicina.

De esta manera, se procedió a sintetizar un polímero híbrido, en el cual el 20% de los grupos vinilo se funcionalizarían con el derivado tiol HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl (**B**) y el resto con el compuesto tiol HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NHMe<sub>2</sub>Cl (**A**). Así, se hace reaccionar en primer lugar el polímero vinílico **8** con el reactivo **B** durante 2 horas en presencia del fotoiniciador, transcurrido este tiempo se adiciona la cantidad necesaria de tiol-amina **A** y fotoiniciador para hacerlos reaccionar con el resto de grupos vinilo aún sin funcionalizar (Esquema 2.17).

A través de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  se comprobó que la reacción había finalizado transcurridas las 4 horas debido a la desaparición de los desplazamientos correspondientes a los grupos vinilo. La integral de las señales determinaron que se había introducido un 22% del compuesto  $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_3\text{Cl}$  (**B**) y un 78% del  $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NHMe}_2\text{Cl}$  (**A**). Así se obtiene el polímero híbrido  $\text{PCS-2-S}(\text{NMe}_2\text{HCl})_x(\text{NH}_3\text{Cl})_y$  (**13**) (dónde  $x = 78\%$  e  $y = 22\%$  de los grupos terminales) como un sólido amarillo soluble en disolventes polares.



**Esquema 2.17** Síntesis del polímero híbrido (**13**).

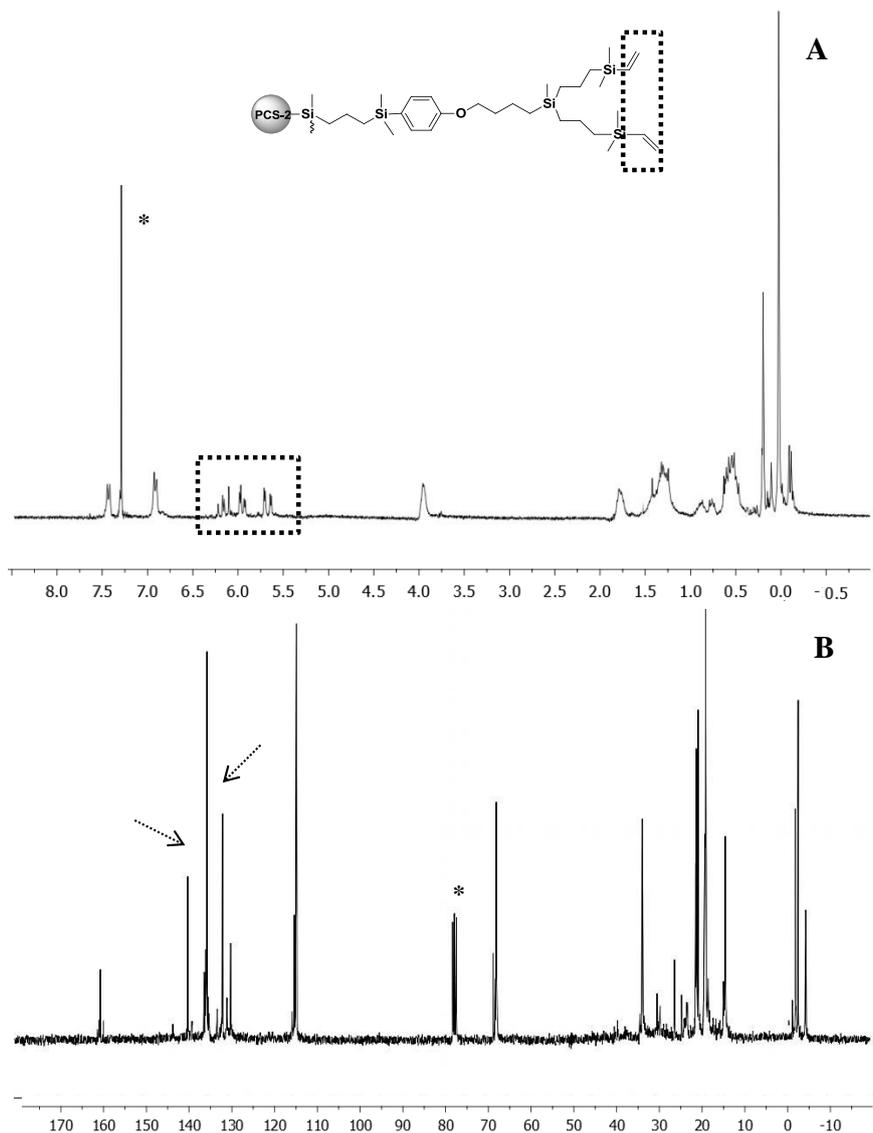
### Caracterización estructural

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes al polímero **8** se realizaron en  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observan las señales correspondientes tanto a los grupos vinilo terminales como a las cadenas alquílicas internas  $\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{Si}$ . Se observan dos multipletes a 6.00 y 5.60 ppm característicos de las cadenas vinílicas terminales. Los protones de las cadenas alquílicas aparecen como dos multipletes, uno a 0.57 ppm para los grupos metileno unidos al átomo de Si y otro a 1.28 ppm para el fragmento metileno central. Por último, para el grupo metilo del fragmento  $-\text{SiMe}_2-$  se observa a 0.19 ppm (Figura 2.14).

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  se observan las señales pertenecientes a los átomos de carbono correspondientes al fragmento vinilo periférico, que aparecen a 131.2 y 139.4 ppm para el carbono externo e interno, respectivamente.

Para el átomo de Si externo unido a los grupos vinilo terminales se observa una señal a -6.5 ppm mientras que la de los átomos de Si internos unidos a las cadenas alquílicas aparece en torno a 1.0 ppm.

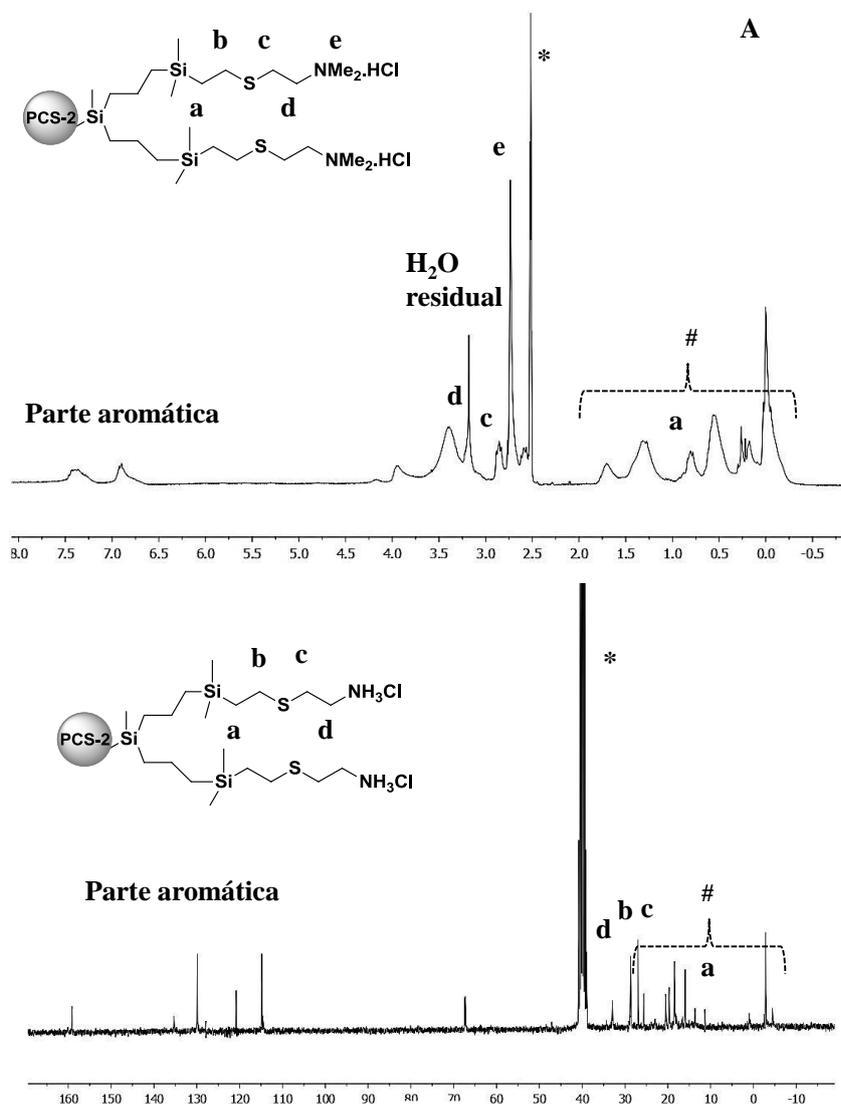


**Figura 2.14** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto PCS-2-SiV (**8**).

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes a los polímeros **9** y **10** fueron realizados en  $\text{DMSO-}d_6$  como disolvente.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observan cuatro señales correspondientes a los grupos metileno del nuevo fragmento introducido  $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ . El más cercano al átomo de silicio se observa a 0.85 ppm, los unidos a azufre a 2.56 y 2.71 ppm. Y por último, a 3.18 o 2.91 ppm para los unidos al átomo de nitrógeno dependiendo si el grupo metileno está unido a  $\text{NMe}_2\text{HCl}$  o  $\text{NH}_3\text{Cl}$ , respectivamente.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  se observa una señal a 41.3 ppm correspondiente al grupo amino  $\text{NMe}_2$  y otra señal a 55.3 ó 39 ppm asignada al grupo metileno unido directamente al átomo de nitrógeno de los fragmentos  $\text{NMe}_2\text{HCl}$  o  $\text{NH}_3\text{Cl}$ , respectivamente (Figura 2.15).

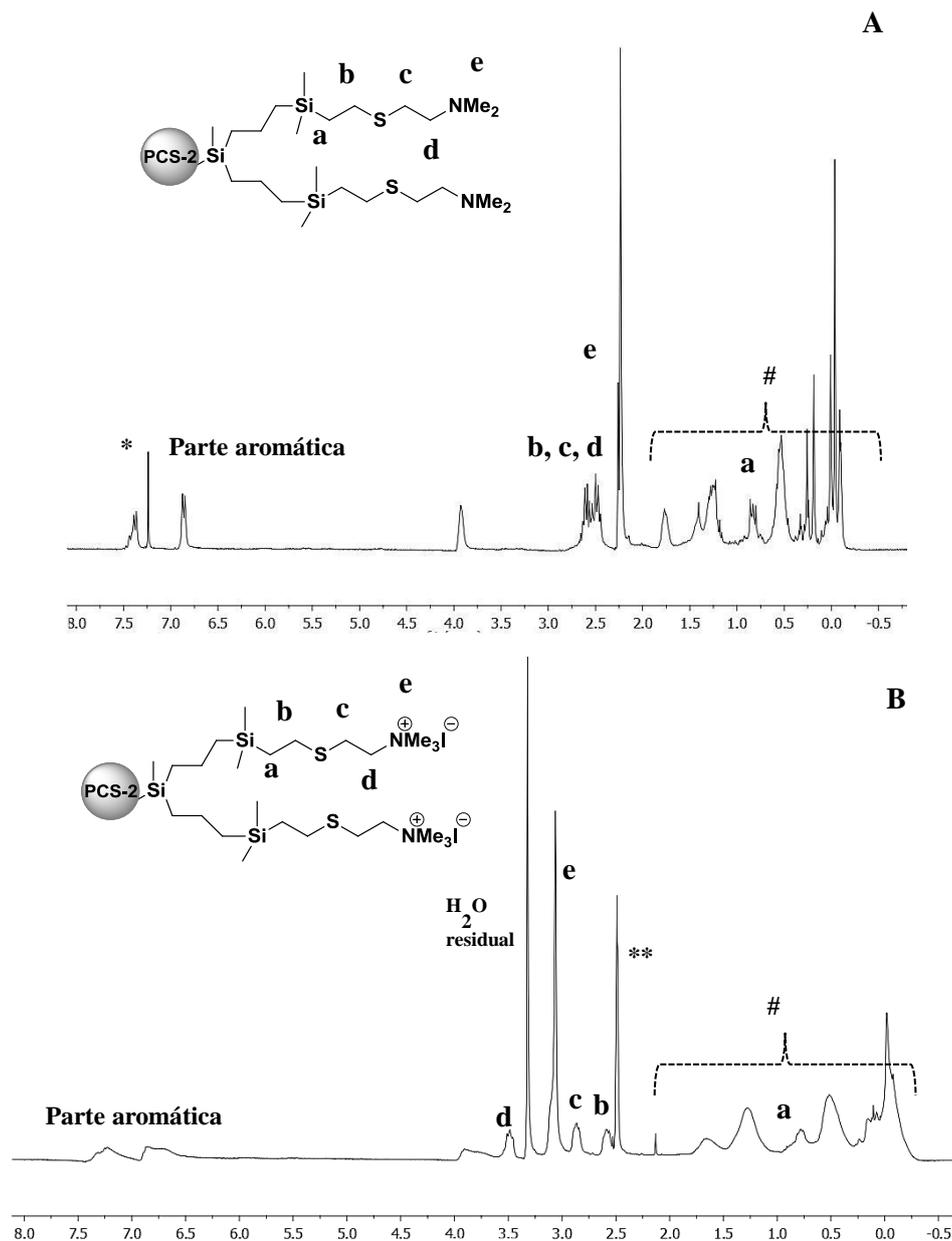


**Figura 2.15** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **10** y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto **9**. \* $\text{DMSO-}d_6$  y #esqueleto carbosilano.

En el espectro RMN de  $^{29}\text{Si}$  se observa la desaparición de la señal correspondiente al silicio unido a los grupos vinilo a -6.5 ppm y la aparición de una nueva señal a 2.5 ppm perteneciente a los átomos de silicio que se han funcionalizado.

Y por último, en el espectro de RMN de  $^{15}\text{N}$  se detecta una señal a  $-338.2$  ppm o  $-342.4$  correspondientes a los fragmentos  $-\text{NMe}_2\text{HCl}$  o  $-\text{NH}_3\text{Cl}$ , respectivamente.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondiente al polímero neutro **11** y al polímero catiónico **12** fueron realizados respectivamente en  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{DMSO-}d_6$  como disolvente.



**Figura 2.16** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de A) compuesto **11** y B) compuesto **12**.

\* $\text{CDCl}_3$ , \*\* $\text{DMSO-}d_6$  y # esqueleto carbosilano.

Las señales correspondientes a las ramas externas del polímero neutro **11** son similares al polímero **8**, tan solo los grupos metileno y metilo unidos al átomo de nitrógeno aparecen a frecuencias más bajas.

En el caso del polímero catiónico **12** debido a la carga positiva situada sobre el átomo de nitrógeno que ejerce un mayor efecto desapantallante, se observa el desplazamiento de algunas señales a frecuencias más altas. Este comportamiento se comprueba en el desplazamiento de los grupos metilo unidos al átomo de nitrógeno, los cuales aparecen a 3.04 y a 51.6 ppm en los espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  (Figura 2.16).

Sin embargo, como era de esperar, en el espectro de RMN de  $^{15}\text{N}$  se detecta una señal a -352.1 ppm para el polímero neutro, y un desplazamiento a -330.0 ppm para el polímero catiónico.

En el caso del polímero híbrido **13**, su caracterización estructural es la combinación de los espectros registrados para los compuestos **9** y **10** como consecuencia de la presencia de ambos tipos de grupos amonio.

### **2.3.2.2 Polímeros hiperramificados aniónicos con grupos carboxilato a través de la reacción de adición “click” tiol-eno**

#### Procedimiento sintético

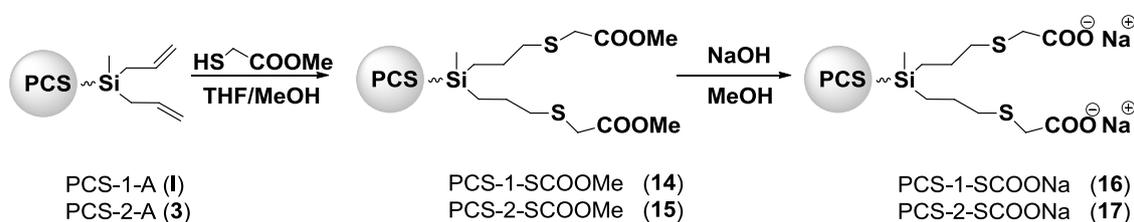
La metodología desarrollada para la obtención de los compuestos deseados se basó en la descrita por Rissing y Son para la funcionalización de tetravinilsilano.<sup>32</sup>

La obtención de polímeros funcionalizados con grupos carboxilato necesita de una primera preparación de los polímeros neutros precursores funcionalizados con el derivado éster correspondiente.

La síntesis de los polímeros precursores se realiza mediante la introducción del derivado tiol metiltioglicolato. La reacción se lleva a cabo en una mezcla de disolventes metanol/THF bajo irradiación UV durante 4 horas (Esquema 2.18). El seguimiento del avance de estas reacciones se realiza mediante espectroscopia RMN de  $^1\text{H}$ , observándose la desaparición de las señales correspondientes a los

grupos alilo. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de exclusión de tamaños en THF, obteniéndose los polímeros PCS-1-SCOOME (**14**) y PCS-2-SCOOME (**15**) como aceites marrones solubles en disolventes orgánicos.

El tratamiento de los polímeros **14** y **15** con un exceso de hidróxido de sodio en metanol proporciona los polímeros aniónicos correspondientes PCS-1-SCOONa (**16**) y PCS-2-SCOONa (**17**) (Esquema 2.18). La reacción es seguida por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , completándose cuando desaparece el singlete a 3.01 ppm correspondiente al grupo metilo del éster. Se purifica mediante ultrafiltración con una membrana de  $M_{\text{WCO}} = 1000$ , obteniéndose los polímeros **16** y **17** como sólidos amarillos solubles en agua.



**Esquema 2.18** Síntesis de los polímeros con grupos éster (**14** y **15**) y carboxilato (**16** y **17**) en la periferia.

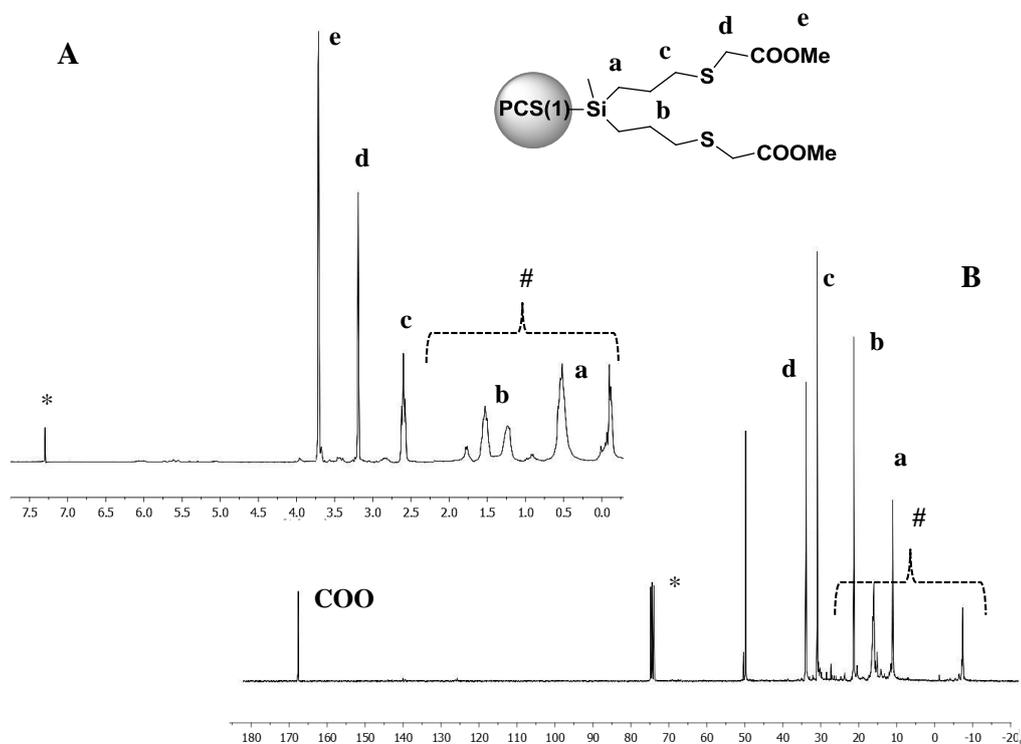
### Caracterización estructural

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes a los polímeros precursores **14** y **15** fueron realizados en  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  confirma la formación de la nueva cadena - $\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{SCH}_2\text{COOMe}$ , donde se observa un triplete a 2.63 ppm correspondiente al grupo metileno unido al átomo de azufre - $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ -, y dos singletes a 3.20 y 3.67 ppm para el grupo metileno y el grupo metilo respectivamente pertenecientes al fragmento - $\text{SCH}_2\text{COOMe}$ .

Mediante un experimento HSQC  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$  se asignó la resonancia a 36.5 ppm para el grupo metileno y a 52.4 ppm para el grupo metilo del grupo éster (Figura 2.17) en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

La incorporación del tiol modifica el espectro RMN de  $^{29}\text{Si}$  mostrando dos señales, una a 1.67 ppm que se asigna a las unidades dendríticas y otra a 2.50 ppm, donde se solapan las unidades terminales y lineales funcionalizadas.

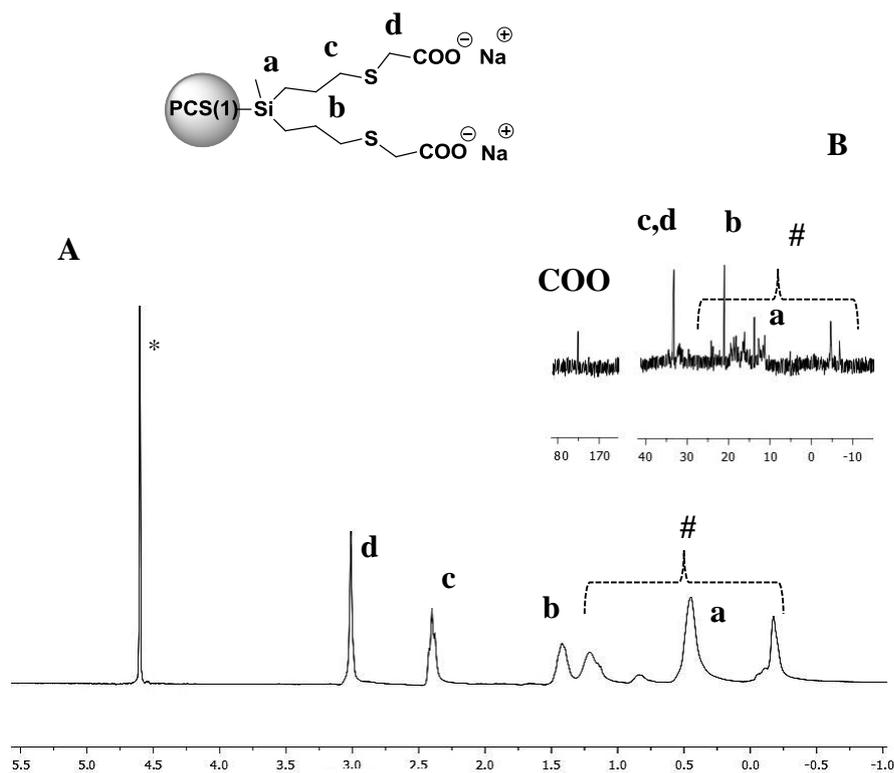


**Figura 2.17** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto PCS-1-SCOOMe (**14**). \* $\text{CDCl}_3$  y #esqueleto carbosilano.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes a los polímeros aniónicos **16** y **17** se realizaron en  $\text{D}_2\text{O}$  como disolvente.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  las señales correspondientes al grupo COOMe en los derivados neutros desaparecen y aparece el singlete a 3.01 ppm correspondiente al grupo metileno unido directamente al grupo carbonilo y se desplaza de 2.50 ppm a 2.41 ppm el otro grupo metileno unido al átomo de azufre.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  se observa el grupo carbonilo a 183.9 ppm (Figura 2.18).



**Figura 2.18** Espectros de A) RMN de <sup>1</sup>H y B) RMN de <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} del compuesto PCS-1-SCOONa (16). \*D<sub>2</sub>O y # esqueleto carbosilano.

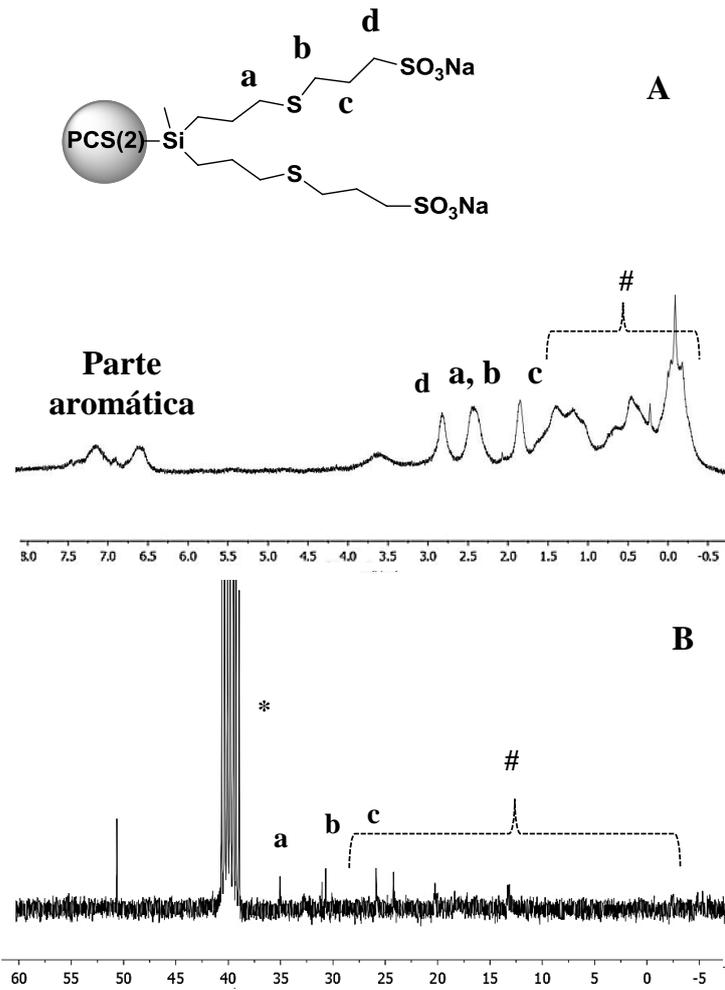
### 2.3.2.3 Polímeros hiperramificados aniónicos con grupos sulfonato a través de la reacción de adición “click” tiol-eno

#### Procedimiento sintético

Los dendrímeros decorados con grupos sulfonato se prepararon de manera directa por adición del derivado tiol comercial que contiene la sal sódica del ácido sulfónico, basándose igualmente en la metodología desarrollada por Rissing y Son.<sup>32</sup>

Anteriormente, esta estrategia sintética había sido empleada en nuestro grupo de investigación para la funcionalización de otros sistemas carbosilano, y en las condiciones indicadas se provocaba la precipitación del dendrímero de partida como un agregado de aspecto gomoso, disminuyendo mucho el rendimiento final del proceso. Con el fin de mejorar el rendimiento, la cantidad necesaria del derivado tiol y fotoiniciador se divide en cuatro partes, las cuales se





**Figura 2.19** Espectros de A) RMN de <sup>1</sup>H y B) RMN de <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} del compuesto PCS-2-SSO<sub>3</sub>Na (19). \* DMSO-*d*<sub>6</sub> y # esqueleto carbosilano.

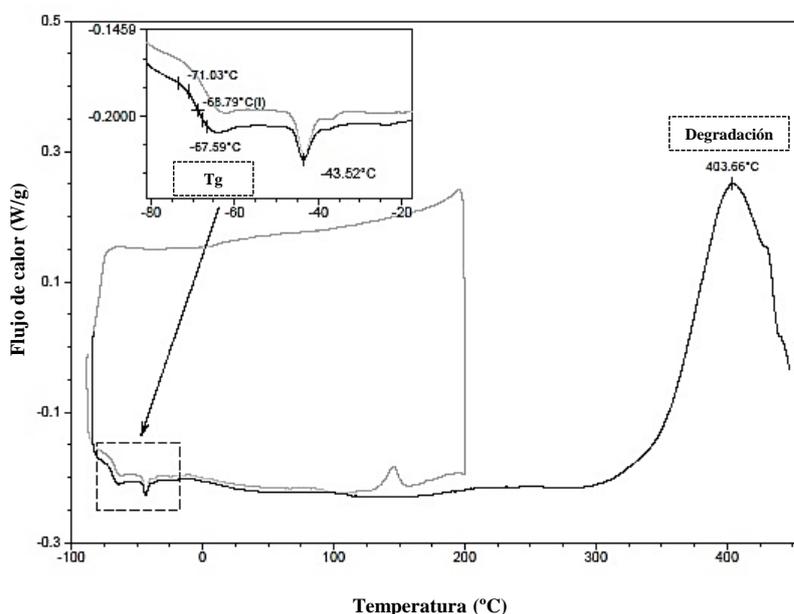
## 2.4 ESTUDIO DE OTRAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

### 2.4.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Debido a la estructura tan ramificada de estos sistemas, son materiales prácticamente amorfos, siendo la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) una de las propiedades térmicas más importantes a determinar. La  $T_g$  se encuentra muy influenciada por la composición del polímero y su ramificación, pero sobre todo da una idea de la flexibilidad del polímero sintetizado.<sup>34</sup>

Para la matriz **3** se determinó un valor de  $T_g$  de  $-69^\circ\text{C}$  y una temperatura de degradación a  $404^\circ\text{C}$ . Con estos datos, se puede decir que este sistema presenta una gran flexibilidad y estabilidad térmica debido a su composición y estructura (Figura 2.20).

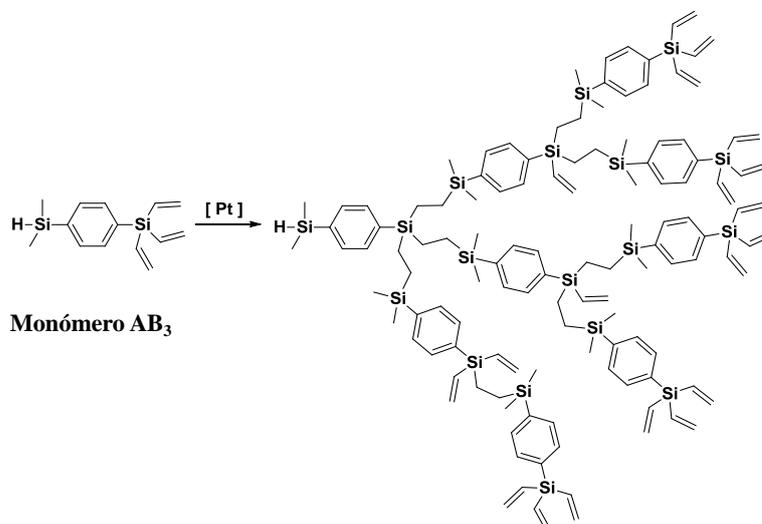
Para la matriz PCS-1-A el dato descrito en bibliografía es  $T_g = -91.5^\circ\text{C}$ .<sup>35</sup> Si se comparan los datos de ambas matrices, se observa que la introducción de grupos aromáticos provoca un descenso de la flexibilidad del sistema.



**Figura 2.20** DSC del polímero PCS-2-A (3).

En la Figura 2.21 se describe un monómero similar a los precursores de PCS-1-A y PCS-2-A. El polímero obtenido presenta un valor de  $T_g = 12^\circ\text{C}$ , lo que indica que es un sistema más rígido que los que se han estudiado.<sup>11</sup> Es

importante mencionar que la gran diferencia observada en este ejemplo, puede ser consecuencia de la naturaleza del monómero AB<sub>3</sub> que genera un sistema más congestionado y como consecuencia menos flexible.



**Figura 2.21** Ejemplo de un polímero hiperramificado preparado a partir de un monómero  $\text{HSiMe}_2(\text{C}_6\text{H}_6)\text{Si}(\text{CHCH}_2)_3$ .

Se deduce que la introducción del anillo aromático aporta rigidez al sistema, pero en el caso de PCS-2-A, la presencia de una cadena alifática le confiere una excelente flexibilidad.

Se han determinado las  $T_g$  de todos los polímeros funcionalizados con el fin de evaluar la variación de la misma al introducir diferentes grupos periféricos en la matriz polimérica.

En la Tabla 2.4 se observa para ambas matrices que la incorporación de grupos neutros ( $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ,  $-\text{NMe}_2$ ,  $-\text{COOMe}$ ) disminuye ligeramente la  $T_g$ , pero no afecta en gran medida a la flexibilidad de los sistemas. Sin embargo, cuando se introducen grupos iónicos, el polímero debe encontrarse más congestionado, y las repulsiones electroestáticas hacen que también disminuya su movilidad, lo que se traduce en un aumento de la  $T_g$ . Los valores de  $T_g$  para los derivados aniónicos no se pudieron registrar.

**Tabla 2.4** Datos obtenidos de DSC para los polímeros hiperramificados funcionalizados.

Compuestos	T <sub>g</sub> (°C)	Compuestos	T <sub>g</sub> (°C)
Matriz PCS-1		Matriz PCS-2	
PCS-1-A	-91.5 (a)	PCS-2-A (3)	-69.0
PCS-1-SiNMe <sub>2</sub>	(c)	PCS-2-SiNMe <sub>2</sub> (6)	-59.0
PCS-1-SiNMe <sub>3</sub> I	(c)	PCS-2-SiNMe <sub>3</sub> I (7)	-6.9
PCS-1-SiV	-60.8 (b)	PCS-2-SiV (8)	-60.6
PCS-1-SCOOMe (14)	-54.2	PCS-2-SCOOMe (15)	-59.6
PCS-1-SCOONa (16)	No observado	PCS-2-SCOONa (17)	No observado
PCS-1-SSO <sub>3</sub> Na (18)	No observado	PCS-2-SSO <sub>3</sub> Na (19)	No observado
PCS-1-SNH <sub>2</sub> .HCl	-17.9 (b)	PCS-2-SNH <sub>2</sub> .HCl (9)	-25.7
PCS-1-SNMe <sub>2</sub> .HCl	-40.1 (b)	PCS-2-SNMe <sub>2</sub> .HCl (10)	-35.5
PCS-1-SNMe <sub>2</sub>	-59.0 (b)	PCS-2-SNMe <sub>2</sub> (11)	-56.0
PCS-1-SNMe <sub>3</sub> I	-21.0 (b)	PCS-2-SNMe <sub>3</sub> I (12)	-28.3

(a) Descrito en bibliografía.<sup>36</sup>

(b) Pertenecientes a otros trabajos del grupo de investigación.

(c) Datos no encontrados en bibliografía.

Esta propiedad parece dependiente de las interacciones entre los grupos funcionales. Sin embargo, es complicado encontrar un razonamiento adecuado que permita dar concordancia a todos los datos obtenidos. Por el contrario, sí se puede observar que la presencia de anillos aromáticos en su estructura no afecta a la movilidad de los sistemas, tan solo presenta una influencia en la estabilidad térmica de los derivados.

### 2.4.2 Potencial $\zeta$

El potencial  $\zeta$  es una técnica que mide 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 va a ser un número positivo en el caso de que la carga superficial sea positiva, y negativo cuando sea negativa. En general se considera que una partícula es inestable si su potencial  $\zeta$  se sitúa entre -30 y +30 mV. Este hecho se debe a que cuando una disolución tiene un potencial  $\zeta$  bajo las partículas tienden a agregarse. Por el contrario, si el potencial

$\zeta$  en valor absoluto es grande, las partículas se repelen unas a otras y, por tanto, no se agregan.

Para confirmar la naturaleza iónica de la superficie de estos sistemas se realizaron las medidas de potencial  $\zeta$  a temperatura ambiente (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5** Datos obtenidos de potencial  $\zeta$  para los polímeros hiperramificados iónicos.

Compuestos	Potencial Z	Compuestos	Potencial Z
<b>Matriz PCS-1</b>		<b>Matriz PCS-2</b>	
PCS-1-SiNMe <sub>3</sub> I (a)	69	PCS-2-SiNMe <sub>3</sub> I (7)	66
PCS-1-SCoONa (16)	-57.8	PCS-2-SCoONa (17)	-47.4
PCS-1-SSO <sub>3</sub> Na (18)	-55.8	PCS-2-SSO <sub>3</sub> Na (19)	-72.3
PCS-1-SNH <sub>2</sub> .HCl (a)	60.1	PCS-2-SNH <sub>2</sub> .HCl (9)	60.7
PCS-1-SNMe <sub>2</sub> .HCl (a)	52.3	PCS-2-SNMe <sub>2</sub> .HCl (10)	56.0
PCS-1S-NMe <sub>3</sub> I (a)	52.8	PCS-2-SNMe <sub>3</sub> I (11)	59.6
PCS-1-Shíbrido (a)	78.1	PCS-2-Shíbrido (12)	72.2

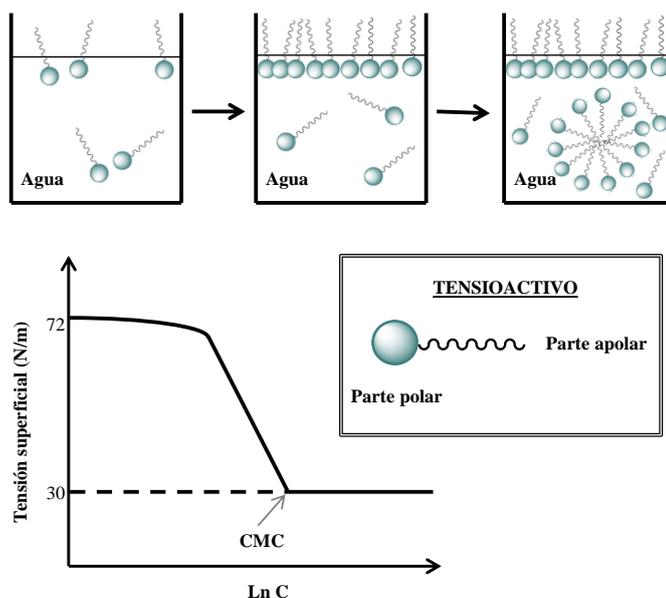
(a) Pertenecientes a otros trabajos del grupo de investigación.

Estos valores tan solo permiten afirmar con seguridad que estos sistemas presentan una superficie catiónica o aniónica, y que forman partículas estables.

### 2.4.3 Estudio del carácter anfifílico mediante medidas de tensión superficial

Cuando la estructura molecular de un compuesto es tal que su molécula contiene partes solubles en agua y otras insolubles, el comportamiento del compuesto frente al disolvente cambia, ya que no se distribuyen uniformemente en el disolvente, es lo que se conoce como un tensioactivo.

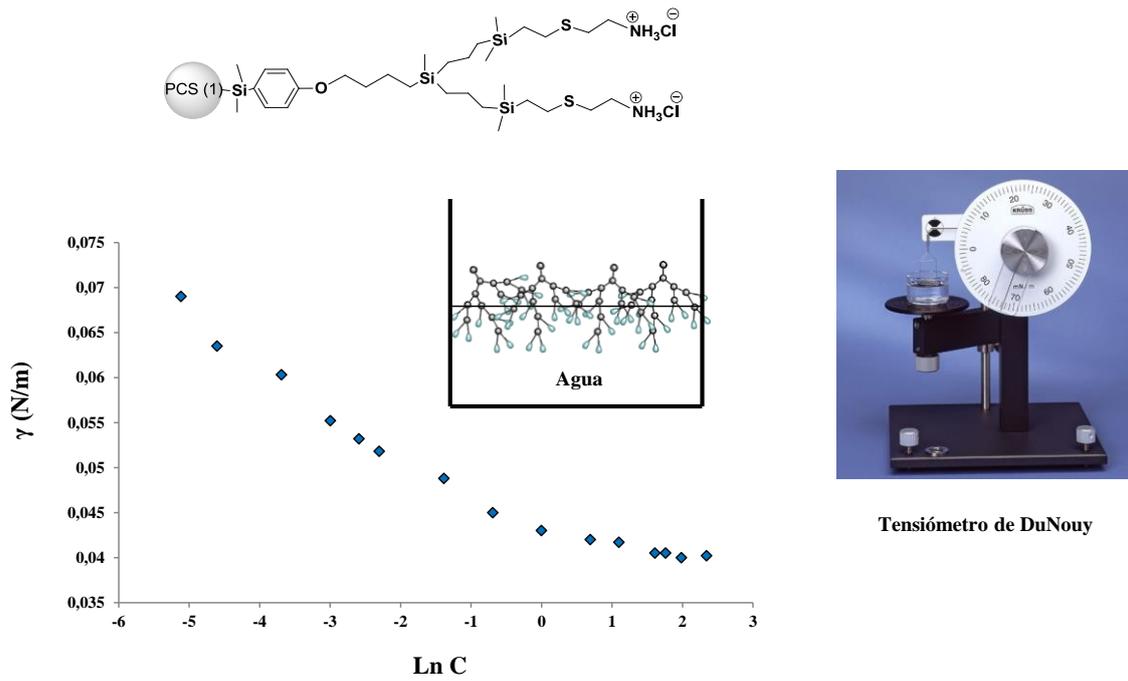
Los tensioactivos, debido a su naturaleza anfifílica, disminuyen la tensión superficial del agua en concentraciones por debajo de la concentración en la cual éste ha cubierto la totalidad de la superficie. Por encima de esta concentración las moléculas del tensioactivo se dirigen hacia al interior del líquido formando agregados de moléculas sencillas denominadas micelas, las cuales facilitan su solubilidad en agua. La formación de estos agregados provoca cambios bruscos en diversas propiedades fisicoquímicas del medio (conductividad, presión osmótica, turbidez o tensión superficial). A esta concentración a la cual se produce este cambio se le llama concentración micelar crítica (CMC) (Figura 2.22).



**Figura 2.22** Esquema de la formación de micelas.

Los sistemas presentados en esta Memoria presentan una parte polar (grupos iónicos) y otra apolar (esqueleto carbosilano), es decir, presentan una naturaleza anfifílica. Por este motivo, ha sido interesante estudiar el comportamiento de los polímeros iónicos y ver su comportamiento en disolución acuosa. Para ello, se realizaron medidas de tensión superficial a distintas concentraciones utilizando el tensiómetro de DuNouy (Figura 2.23).

Al incrementar la concentración del sistema, se observa un descenso de la tensión superficial del agua, lo que indica que los polímeros se van colocando en la superficie, con los grupos iónicos orientados hacia la disolución acuosa y la parte apolar hacia fuera. Sin embargo, no se observa un cambio brusco en la tensión superficial, y por tanto, no se puede definir una CMC. Esto indica que una vez que se ha saturado la superficie, estos sistemas no presentan una estructura que les permita formar agregados micelares, impidiendo mejorar su solubilidad en agua y provocando su precipitación.



**Figura 2.23** Representación gráfica del carácter anfílico de polímero sintetizado PCS-2-SNH<sub>3</sub>Cl (9).

Para que se produzca la formación de agregados micelares, los sistemas deben presentar una determinada estructura que facilite dicha agregación, y estos sistemas no parecen presentar una estructura adecuada.<sup>37</sup>

## 2.6 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Zheng, Y.; Li, S.; Weng, Z.; Gao, C. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 4091.
- (2) Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2718.
- (3) Shi, Y.; Graff, R. W.; Cao, X.; Wang, X.; Gao, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, *54*, 7631.
- (4) Drohmann, C.; Moller, M.; Gorbatshevich, O. B.; Muzafarov, A. M. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2000**, *38*, 741.
- (5) Seino, M.; Hayakawa, T.; Ishida, Y.; Kakimoto, M. A. *Macromolecules* **2006**, *39*, 8892.
- (6) Zhang, G. B.; Fan, X. D.; Kong, J.; Liu, Y. Y.; Wang, M. C.; Qi, Z. C. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 541.
- (7) Mathias, L. J.; Carothers, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4043.
- (8) Ulery, B. D.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T. *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* **2011**, *49*, 832.
- (9) Day, G. M.; Hibberd, A. I.; Habsuda, J.; Sharp, G. J. *ACS Symp. Ser.* **2003**, *838*, 127.
- (10) Muzafarov, A. M.; Gorbatshevich, O. B.; Rebrov, E. A.; Ignat'eva, G. M.; Chenskaya, T. B.; Myakushev, V. D.; Bulkin, A. F.; Papkov, V. S. *Vysokomol. Soedin., Ser. A Ser. B* **1993**, *35*, 1867.
- (11) Yoon, K.; Son, D. Y. *Macromolecules* **1999**, *32*, 5210.
- (12) Fuentes-Paniagua, E.; Hernández-Ros, J. M.; Sánchez-Milla, M.; Camero, M. A.; Maly, M.; Pérez-Serrano, J.; Copa-Patiño, J. L.; Sánchez-Nieves, J.; Soliveri, J.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1256.
- (13) Rasines, B.; Hernández-Ros, J. M.; de las Cuevas, N.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Dalton Trans.* **2009**, 8704.
- (14) Perise-Barrios, A. J.; Jiménez, J. L.; Dominguez-Soto, A.; de la Mata, F. J.; Corbi, A. L.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Controlled Release* **2014**, *184*, 51.
- (15) Arnaiz, E.; Vacas-Córdoba, E.; Galán, M.; Pion, M.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A.; de la Mata, F. J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2014**, *52*, 1099.
- (16) Ortega, P.; Cobaleda, B. M.; Hernández-Ros, J. M.; Fuentes-Paniagua, E.; Sánchez-Nieves, J.; Tarazona, M. P.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5238.
- (17) Ortega, P.; Moreno, S.; Tarazona, M. P.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Eur. Polym. J.* **2012**, *48*, 1413.
- (18) Lowe, A. B. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17.
- (19) Bao, Y.; He, J.; Li, Y. *Polymer* **2012**, *53*, 145.
- (20) Yu, Z. Q.; Cui, M. M.; Yan, J. J.; You, Y. Z. *Sci. China: Chem.* **2010**, *53*, 1663.
- (21) Trey, S. M.; Nilsson, C.; Malmstroem, E.; Johansson, M. *Prog. Org. Coat.* **2010**, *68*, 151.

- (22) Xue, L.; Wang, D.; Yang, Z.; Liang, Y.; Zhang, J.; Feng, S. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 1050.
- (23) Sánchez-Nieves, J.; Ortega, P.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9203.
- (24) Hoelter, D.; Burgath, A.; Frey, H. *Acta Polym.* **1997**, *48*, 30.
- (25) Wilms, D.; Stiriba, S. E.; Frey, H. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 129.
- (26) Zhang, G.-B.; Kong, J.; Fan, X.-D.; Li, X. G.; Tian, W.; Huang, M.-R. *Appl. Organomet. Chem.* **2009**, *23*, 277.
- (27) Yan, D.; Mueller, A. H. E.; Matyjaszewski, K. *Macromolecules* **1997**, *30*, 7024.
- (28) Harrod, J. F.; Chalk, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 1776.
- (29) Rasines, B.; Sánchez-Nieves, J.; Maiolo, M.; Maly, M.; Chonco, L.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 12733.
- (30) Tesis Fin de Grado en Químicas de Tania Lozano de la Cruz, Alcalá de Henares, **2012**.
- (31) Fuentes-Paniagua, E.; Pena-González, C. E.; Galán, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Sánchez-Nieves, J. *Organometallics* **2013**, *32*, 1789.
- (32) Rissing, C.; Son, D. Y. *Organometallics* **2008**, *27*, 5394.
- (33) Galán, M.; Sánchez Rodríguez, J.; Jiménez, J. L.; Relloso, M.; Maly, M.; de la Mata, F. J.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3222.
- (34) Zhu, Q.; Wu, J.; Tu, C.; Shi, Y.; He, L.; Wang, R.; Zhu, X.; Yan, D. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 5777.
- (35) Dvornic, P. R.; Lenz, R. W. *Macromolecules* **1992**, *25*, 3769.
- (36) Zhang, G. B.; Kong, J.; Fan, X. D.; Li, X. G.; Tian, W.; Huang, M. R. *Applied Organometallic Chemistry* **2009**, *23*, 277.
- (37) Hsu, H.J.; Sen, S.; Pearson, R. M.; Uddin, S.; Kral, P.; Hong, S. *Macromolecules* **2014**, *47*, 6911.



## CAPÍTULO 3

---

# DENDRÍMEROS ESFÉRICOS HÍBRIDOS CONSTRUIDOS MEDIANTE METODOLOGÍA “ONION-PEEL”

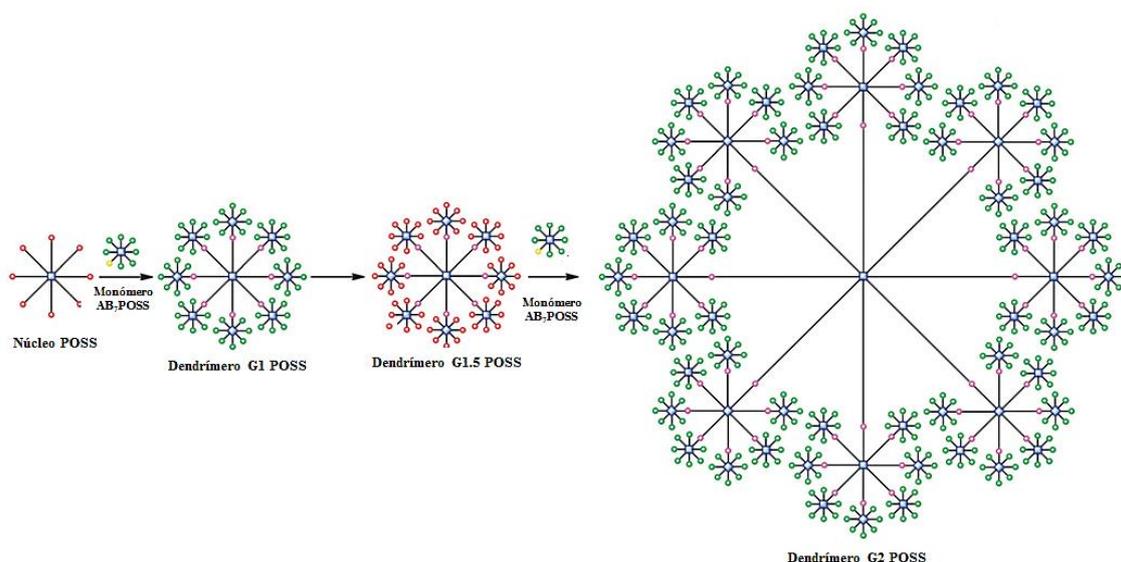


### 3.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

#### 3.1.1 Construcción de sistemas híbridos

Debido a las excelentes propiedades que presentan los dendrimeros sobre todo en el campo de la biomedicina, han aumentado considerablemente las exigencias para obtener estas macromoléculas de una forma más rápida y eficaz. Por ello, durante un largo período, los investigadores se han centrado en diseñar nuevas estrategias sintéticas para producir estos sistemas con rendimientos más altos, menos pasos de reacción, y de manera más económica.<sup>1-3</sup>

Una de las alternativas orientadas hacia la construcción acelerada de estos sistemas, es el método de la doble etapa convergente.<sup>4</sup> Esta metodología presenta el inconveniente de que necesita etapas de protección y desprotección. Dicha complicación se mejoró más tarde utilizando bloques de construcción y realizando un acoplamiento ortogonal.<sup>5,6</sup> Un ejemplo de ello es la síntesis en tres pasos de un dendrimer POSS (poliedros oligoméricos silsequioxanos) que contiene 392 grupos terminales (Esquema 3.1).<sup>7</sup>

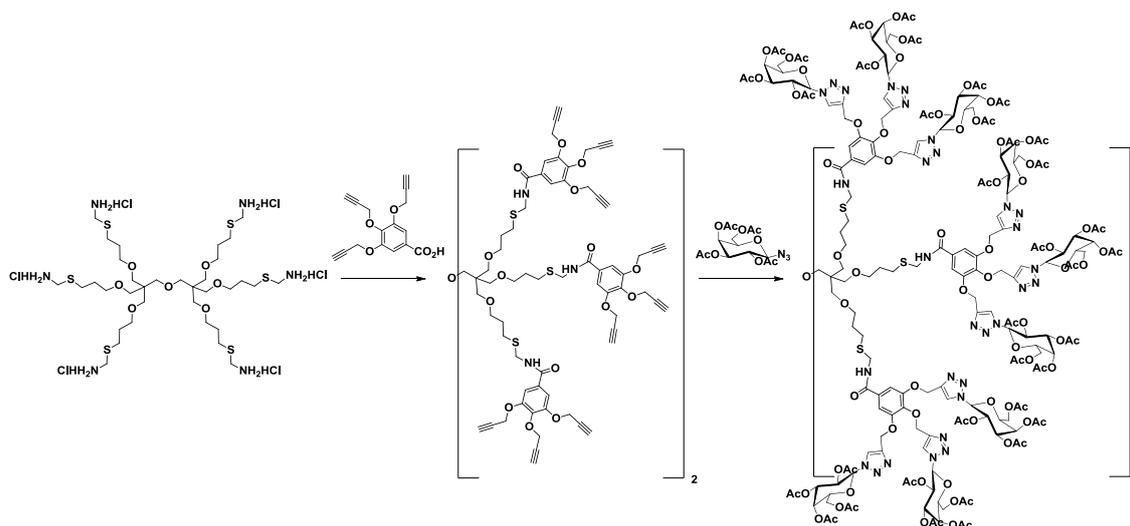


**Esquema 3.1** Ejemplo de la síntesis de un dendrimer POSS mediante una metodología ortogonal.

Esta metodología permite preparar los dendrímeros tradicionales de forma más rápida. Además esta síntesis ortogonal se puede aplicar para generar sistemas heterofuncionalizados o los denominados sistemas híbridos, y poder diseñar una gran diversidad de estructuras dendríticas de interés biológico.

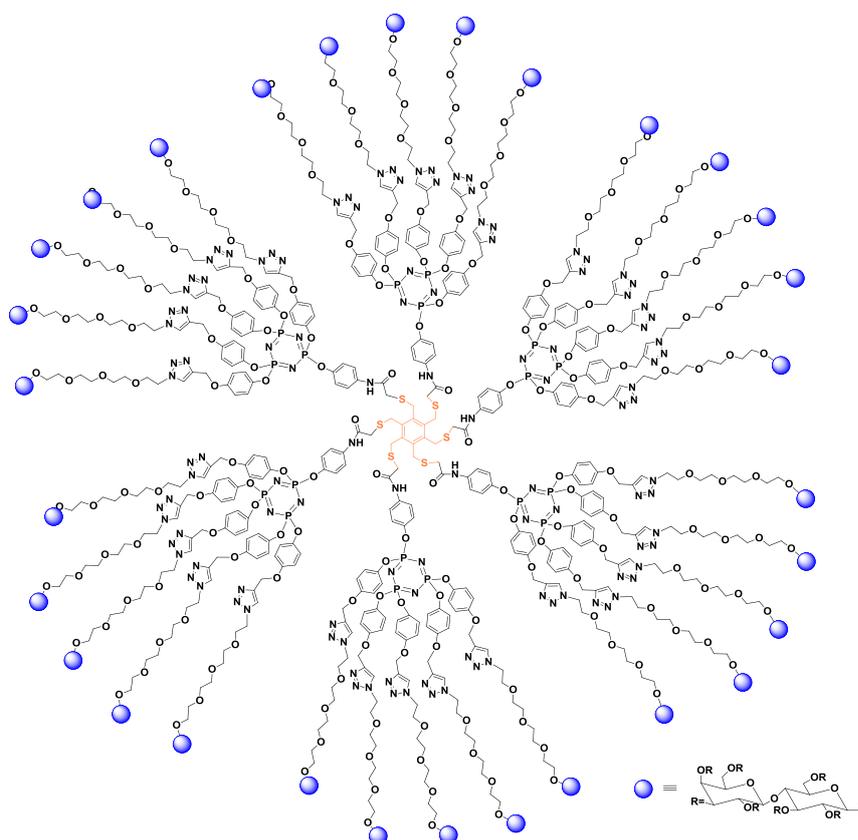
En este Capítulo se denomina sistemas híbridos a aquellos que contienen una mezcla de esqueletos de diferente naturaleza. A partir de este tipo de dendrímeros, surgió una nueva estrategia sintética denominada “*onion-peel*” (mediante capas de cebolla), la cual consiste en la construcción de dendrímeros híbridos mediante un método convergente utilizando diferentes bloques de construcción. Una combinación de reacciones químicas sucesivas altamente eficientes y versátiles se utilizan para formar las distintas capas heterogéneas, entre las cuales podemos destacar esterificación y reacciones click.<sup>8</sup>

El primer grupo en proponer esta estrategia fue el dirigido por Roy, que preparan glicodendrímeros utilizando diferentes monómeros o dendrones en cada capa del crecimiento dendrítico.<sup>9,10</sup> Los glicodendrímeros han demostrado un gran potencial como agentes antibacterianos, biosensores, en vacunas, en la administración de fármacos y como agentes de transfección (Esquema 3.2).<sup>11,12</sup>



**Esquema 3.2** Síntesis de un glicodendrímero mediante la metodología sintética “*onion-peel*”.

A partir de ahí, en la bibliografía científica se encuentran trabajos recientes de sistemas similares sintetizados mediante la misma metodología. Así, otro ejemplo, es un dendrímtero con un núcleo basado en átomos de azufre, las ramas conteniendo fragmentos del tradicional dendrímtero de fósforo, y grupos PEG y azúcares en la periferia (Figura 3.1).<sup>13</sup>

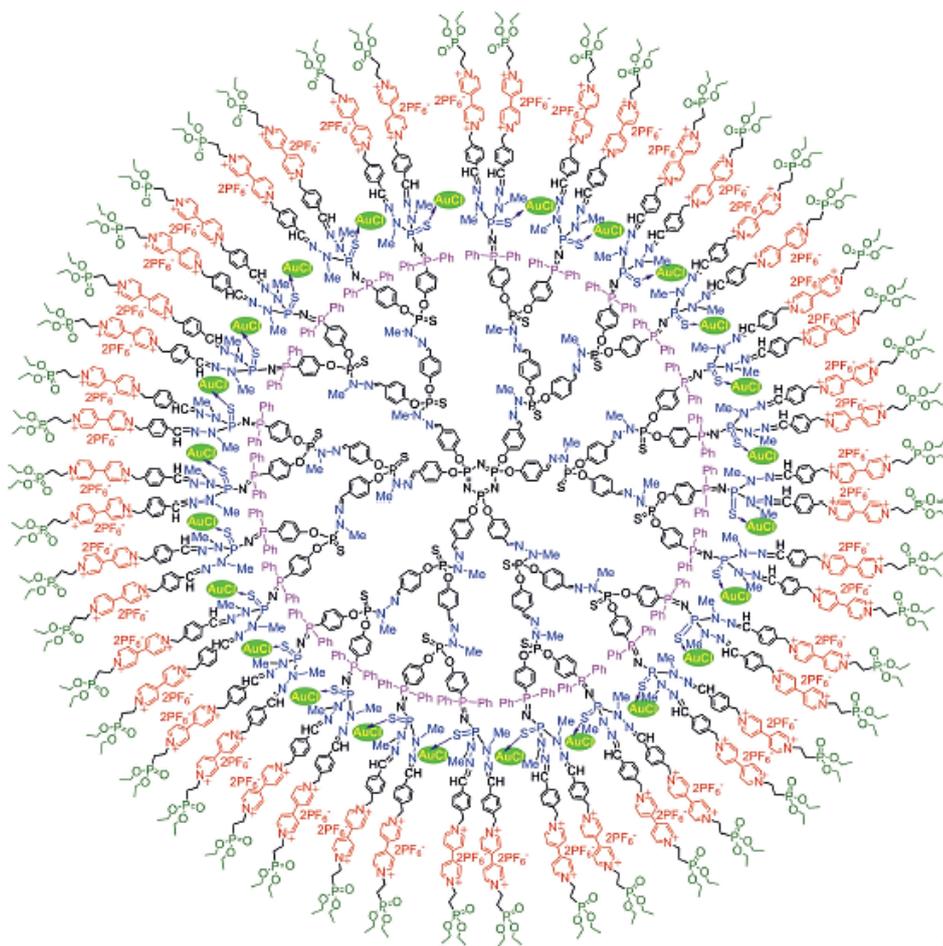


**Figura 3.1** Ejemplo de un glicodendrímtero híbrido construido mediante una metodología sintética “*onion-peel*”.

Los dendrímteros preparados mediante esta metodología suelen ser macromoléculas de gran tamaño. Se suelen elegir núcleos y bloques de construcción con elevadas funcionalidades, lo que da lugar a dendrímteros con un alto número de grupos periféricos. Además, con cada bloque de construcción se puede introducir una función específica, ofreciendo la posibilidad de estudiar efectos sinérgicos.

Un grupo que está apostando en los últimos años por esta alternativa es el grupo de Majoral y Caminade. Hay varios trabajos publicados, pero uno de los

más recientes es un sistema en el cual cada capa heterogénea presenta una función determinada (Figura 3.2): (i) el esqueleto más interno se basa en el tradicional dendrímero de fósforo, (ii) la segunda capa consiste en monómeros con un tipo de fósforo que permite la coordinación regioselectiva de átomos de Au, (iii) la siguiente capa consta de monómeros denominados viológeno, el cual posee interesantes propiedades biomédicas y (iv) en la periferia presenta grupos fosfonato, los cuales han demostrado ser bastante biocompatibles.<sup>14</sup>



**Figura 3.2** Ejemplo de un dendrímero híbrido, en el cual cada capa heterogénea presenta una función determinada.

### 3.1.2 Presentación y objetivos del Capítulo

En este **Capítulo 3** se presenta la síntesis de nuevos sistemas híbridos catiónicos preparados mediante una estrategia “*onion-peel*”. Se han utilizado diferentes bloques de construcción:

*a) Núcleos multifuncionales basados en átomos de fósforo*

Los dendrímeros basados en átomos de fósforo han sido ampliamente utilizados en catálisis, materiales y en biomedicina.<sup>15,16</sup> En particular, sistemas catiónicos basados en este tipo de esqueleto han demostrado interesantes propiedades biológicas siendo principalmente utilizados como agentes antimiloides<sup>17</sup> y como transportadores.<sup>18</sup>

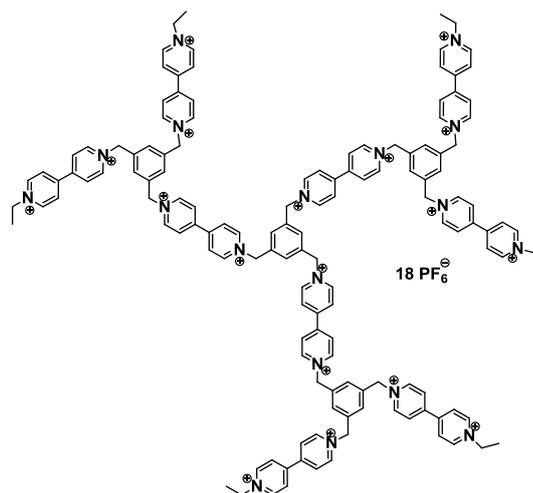
*b) Dendrones de tipo carbosilano*

Dendrímeros y dendrones catiónicos de tipo carbosilano han sido empleados principalmente en biomedicina, demostrando un gran potencial principalmente como agentes antibacterianos<sup>19</sup> y agentes de transfección.<sup>20</sup>

*c) Monómero viológeno*

Las sales de 4,4'-bipiridilo, denominadas también como derivados del viológeno, han sido principalmente usadas como herbicidas, presentando un alto riesgo para la salud humana ya que inducen la formación de radicales libres proporcionando una elevada toxicidad.<sup>21</sup> Sin embargo, cuando el viológeno forma parte de una estructura dendrítica, varias propiedades biomédicas mejoran, tales como la citotoxicidad, hematoxicidad y la actividad antibacteriana y antiviral.<sup>22,23</sup>

En la bibliografía científica, se pueden encontrar dendrímeros policatiónicos que se han sintetizados utilizando el derivado viológeno como bloque de construcción (Figura 3.3). Estos sistemas muestran excelentes propiedades como antivirales, principalmente contra el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).<sup>23,24</sup>



**Figura 3.3** Estructura de un dendrímero basado en monómeros viológeno.

El objetivo general de ésta capítulo, es la síntesis de sistemas híbridos catiónicos con diferentes bloques de construcción con la finalidad de buscar sinergias entre las prestaciones demostradas por cada bloque de construcción.

Los objetivos de este Capítulo 3 son:

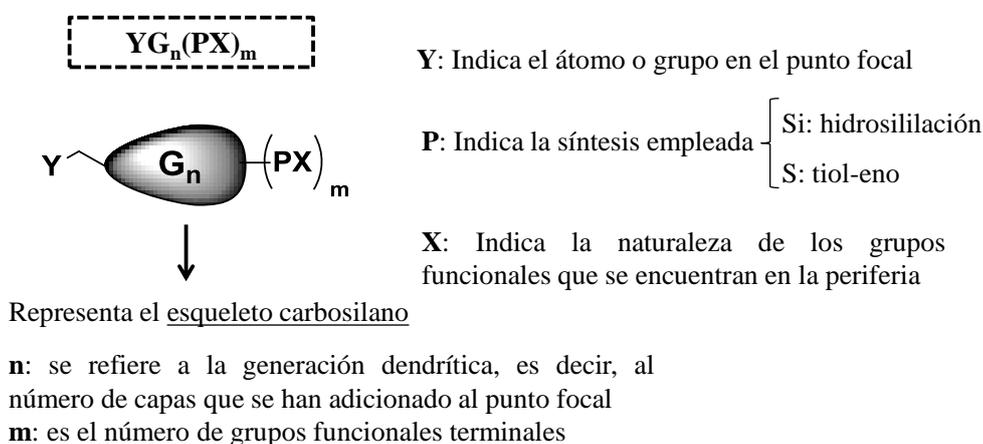
- ✓ Sintetizar y caracterizar dendrones carbosilano con diferentes grupos reactivos en el punto focal y grupos amino en la periferia para ser utilizados como bloques de construcción.
- ✓ Sintetizar y caracterizar dendrímeros esféricos híbridos catiónicos, con un esqueleto basado en átomos de fósforo polifuncional en el interior y dendrones de tipo carbosilano en la periferia.
- ✓ Sintetizar y caracterizar dendrímeros esféricos híbridos catiónicos, con un núcleo polifuncional de átomos de fósforo, viológeno en las ramas y dendrones carbosilano en la periferia.
- ✓ Evaluar los sistemas catiónicos sintetizados como agentes antibacterianos y de transfección, y establecer una comparativa con los bloques de construcción individualmente (ver Capítulo 5).

### 3.1.3 Nomenclatura

Antes de continuar con la descripción de la síntesis de los sistemas híbridos, conviene aclarar la terminología que se utilizará a lo largo de la presente Memoria, ya que debido a la complejidad estructural de estas macromoléculas no es sencillo nombrarlas de acuerdo a los criterios de la IUPAC.

Se va a trabajar con dos tipos de topologías:

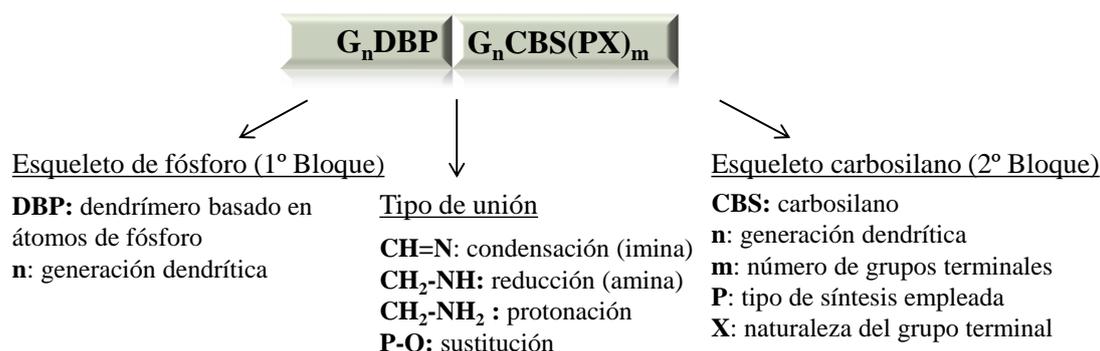
Dendrones carbosilano: En este Capítulo se utilizan diferentes cuñas dendríticas, en las que se usa la nomenclatura de los dendrones bifuncionalizados descrita en la Figura 3.4.



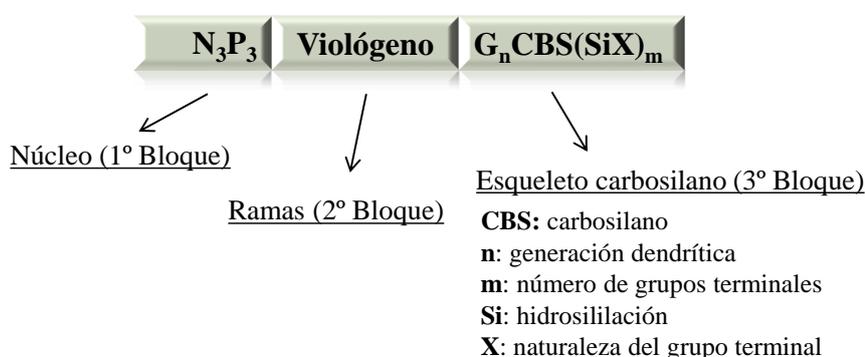
**Figura 3.4** Nomenclatura de los dendrones bifuncionalizados.

Dendrímeros híbridos. Estos sistemas se nombran según se va generando el dendrímero híbrido, por bloques de construcción. Para estos derivados se utiliza la nomenclatura de los dendrímeros híbridos descrita en la Figura 3.5.

**Dendrímeros fósforo-carbosilano**



**Dendrímeros fósforo-viológeno-carbosilano**



**Figura 3.5** Nomenclatura de los dendrímeros híbridos esféricos.

**3.1.4 Aspectos generales de la caracterización de los sistemas precursores y sintetizados descritos en este Capítulo**

Las principales técnicas empleadas para la caracterización de los compuestos sintetizados y descritos en este Capítulo han sido la espectroscopia de RMN multinuclear (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>29</sup>Si, <sup>31</sup>P) y multidimensional (1D y 2D), espectrometría de masas y análisis elemental cuando ha sido posible. Los datos completos se encuentran en el apartado experimental de esta Memoria, tras la descripción detallada de la síntesis de cada producto.

La periferia de los sistemas híbridos neutros presenta un perfil muy similar a los dendrones carbosilano precursores. Por ello, a continuación se comentan las principales señales en espectroscopia de RMN del esqueleto carbosilano y de la

periferia de los dendrones utilizados en este Capítulo. De este modo, para evitar repeticiones innecesarias, en la caracterización estructural de los nuevos sistemas sintetizados se comentará principalmente las señales que corroboren el acoplamiento entre los diferentes bloques de construcción.

**Tabla 3.1** Señales características en espectroscopia de RMN de los sistemas precursores y sintetizados utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.

	Fragmento	Señal	RMN de $^1\text{H}$ (ppm)	RMN de $^{13}\text{C}$ { $^1\text{H}$ } (ppm)	RMN de $^{29}\text{Si}$ (ppm)
Esqueleto dendrítico		a, e	1.3 - 1.5	17 - 20	1-1.7
		b, d, f	0.5 - 0.6	17 - 20	
		c	(-0.1) - 0	(-6) - (-5)	
		g	0.05	-3.5	
Periferia		a	0.87	14.5	3.0
		b		29.8	
		c	2.40-2.65	27.6	
		d		59.1	
		e	2.23	45.1	
		a	0.47	12.8	1.8
		b	1.34	22.0	
		c	2.17	63.4	
	a	0.47	12.4	1.9	
	b	1.26	15		
	c	3.04	43.6		

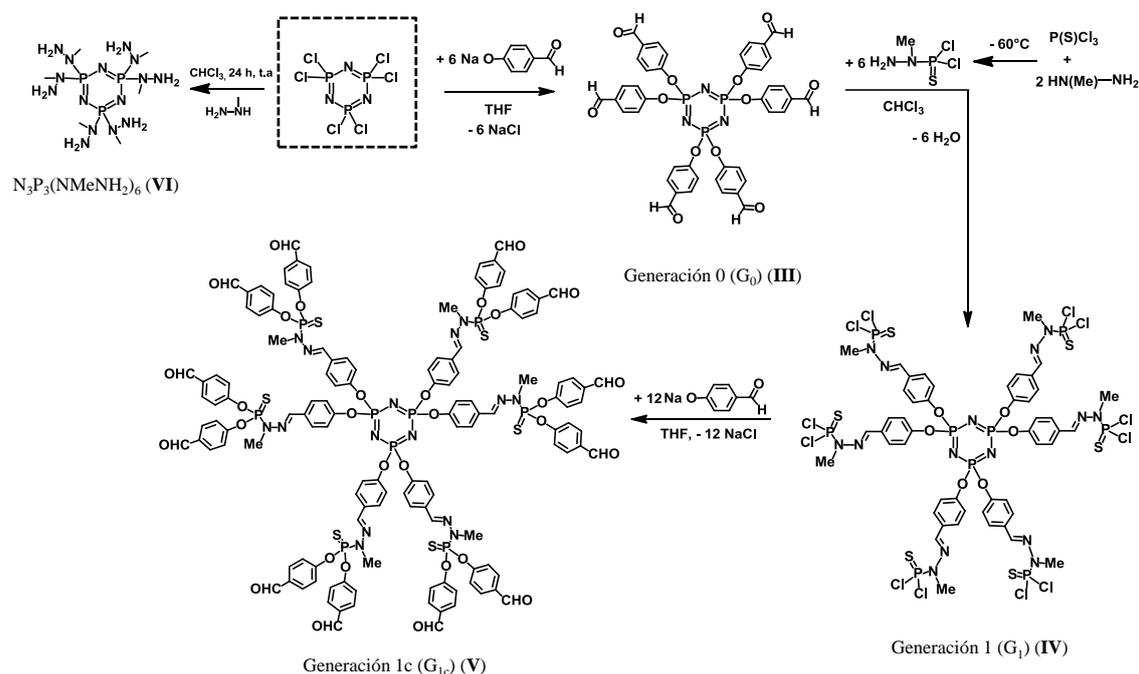
## 3.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN

### 3.2.1 Aspectos generales de la síntesis y caracterización de los esqueletos basados en átomos de fósforo

#### Procedimiento sintético

La síntesis de los dendrímeros de fósforo se basa en la repetición de dos etapas consecutivas: (i) sustitución nucleófila y (ii) condensación. Este tipo de dendrímeros son preparados a partir de un núcleo hexafuncional  $N_3P_3Cl_6$ .<sup>25</sup>

Los dendrímeros utilizados en este trabajo  $G_0(CHO)_6$  (III),  $G_1(PCl_2)_6$  (IV) y  $G_{1c}(CHO)_{12}$  (V), se muestran en el esquema 3.3. Se sigue la nomenclatura perteneciente al grupo de Majoral y Caminade, donde las generaciones se nombran  $n = 1, 2$ , etc, cuando el dendrímero presenta grupos P-Cl terminales, y  $n = 0, 1c, 2c$ , etc, cuando el dendrímero presenta grupos aldehído terminales.



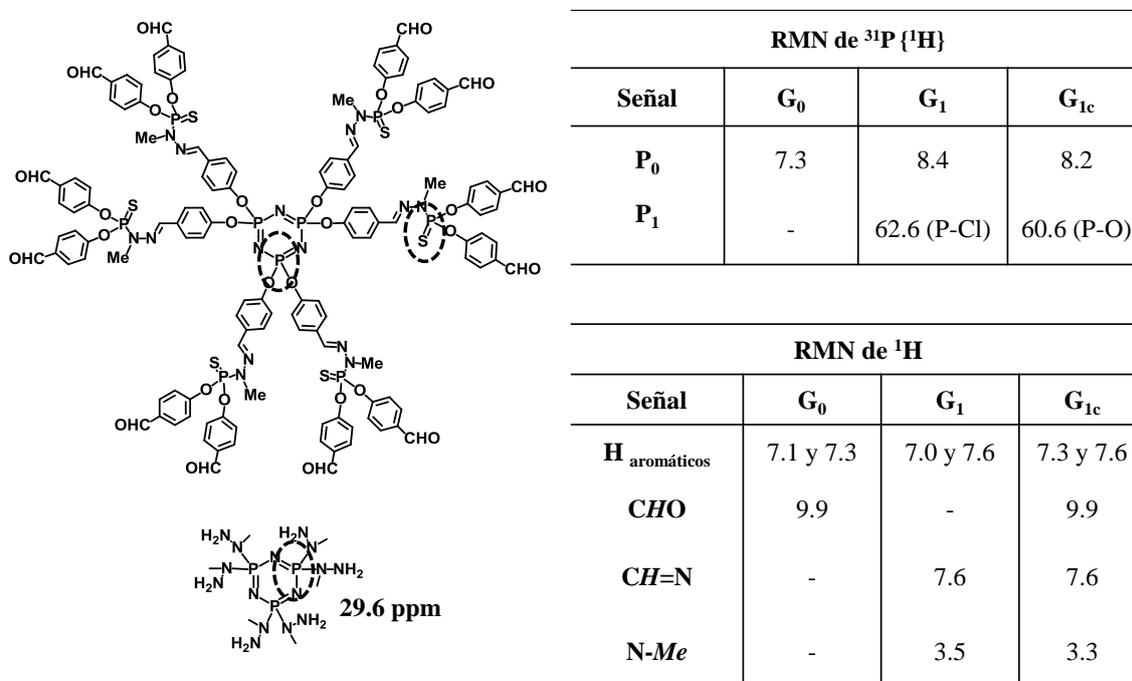
**Esquema 3.3** Síntesis general de los dendrímeros de fósforo.

También se utilizó otro núcleo hexafuncional  $N_3P_3(NMeNH_2)_6$  (VI), el cual se prepara a partir del mismo núcleo que los sistemas anteriores (Esquema 3.3).

La síntesis del núcleo  $N_3P_3(NMeNH_2)_6$  descrita por el grupo de Toulouse se basa en una reacción de sustitución de una diamina, obteniéndose un núcleo hexafuncional con grupos amino reactivos.<sup>26</sup> La síntesis y purificación de estos sistemas está optimizada para obtener únicamente la reacción de monosustitución.

### Caracterización estructural

Los dendrimeros utilizados están descritos,<sup>25</sup> pero para realizar un seguimiento correcto de las reacciones posteriores, conviene tener en cuenta las señales más características de estos sistemas en espectroscopia de RMN.



**Figura 3.6** Señales más características de los dendrimeros de fósforo precusores en espectroscopia de RMN.

La propiedad más interesante de estos dendrimeros es el control en la síntesis y en la pureza mediante espectroscopia de RMN de  $^{31}P$  { $^1H$ }.<sup>25,27</sup> Estos sistemas constan estructuralmente de dos tipos de fósforos: ( $P_0$ ) correspondiente al núcleo de la estructura dendrítica y ( $P_1$ ) correspondiente a la primera generación del sistema. Éste último presenta desplazamientos diferentes según se

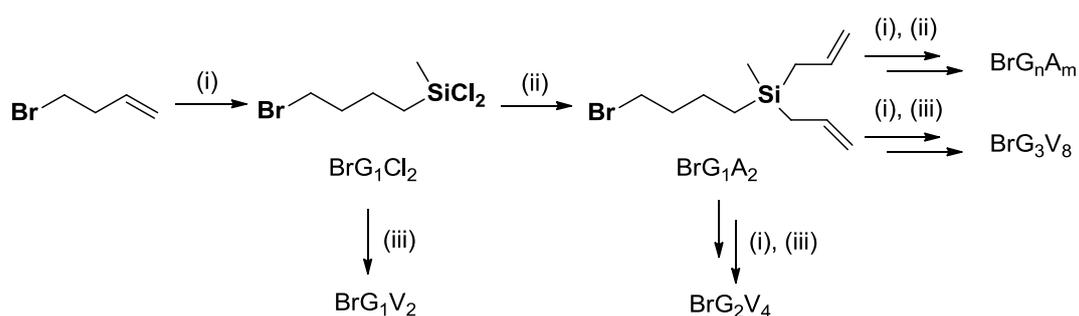
encuentra funcionalizado con enlaces P-Cl o con enlaces P-O provenientes de la incorporación de un grupo aldehído (Figura 3.6).

Asimismo, en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  es característica la señal correspondiente a los fragmentos aromáticos y la señal del grupo aldehído.

### 3.2.2 Aspectos generales de la síntesis y caracterización de las cuñas dendríticas precursoras de naturaleza carbosilano

La primera síntesis de un dendrón de estructura carbosilano la describió van Heerbeek en el año 1999 con el objetivo de lograr la preparación de dendrímeros con un núcleo que contuviera grupos amina.<sup>28</sup> El método de síntesis es el empleado tradicionalmente en la preparación de dendrímeros carbosilano esféricos, alternando reacciones de hidrosililación y de adición de un derivado magnesiano.<sup>29</sup>

En nuestro grupo de investigación se utilizan cuñas carbosilano similares que se construyen mediante el mismo procedimiento sintético, pero con la diferencia de que en cada ramificación se obtienen dos grupos (Esquema 3.4).<sup>30</sup> También se han sintetizado las mismas cuñas pero terminadas en grupos vinilo, para sistemas que necesitan grupos más reactivos. Los sistemas se crecen igual pero en el último paso de alquenilación, se usa cloruro de vinilmagnesio.<sup>31</sup>



**Esquema 3.4** Síntesis de dendrones carbosilano. i) HSiMeCl<sub>2</sub>, [Pt], t.a.; ii) bromuro de alilmagnesio, Et<sub>2</sub>O, reflujo 4-6 horas; iii) cloruro de vinilmagnesio, Et<sub>2</sub>O, reflujo 4-6 horas.

Se han utilizado dos generaciones, con 2 y 4 grupos, respectivamente. Se descartó una generación mayor ( $G_3$ ) debido a su gran tamaño e impedimento estérico.

Se han utilizado dendrones con diferentes grupos reactivos en el punto focal. Estos grupos son elegidos dependiendo de la reacción requerida para realizar el acoplamiento a los diferentes núcleos basados en átomos de fósforo y generar los diferentes sistemas híbridos deseados. Los dendrones preparados se pueden dividir en tres grupos:

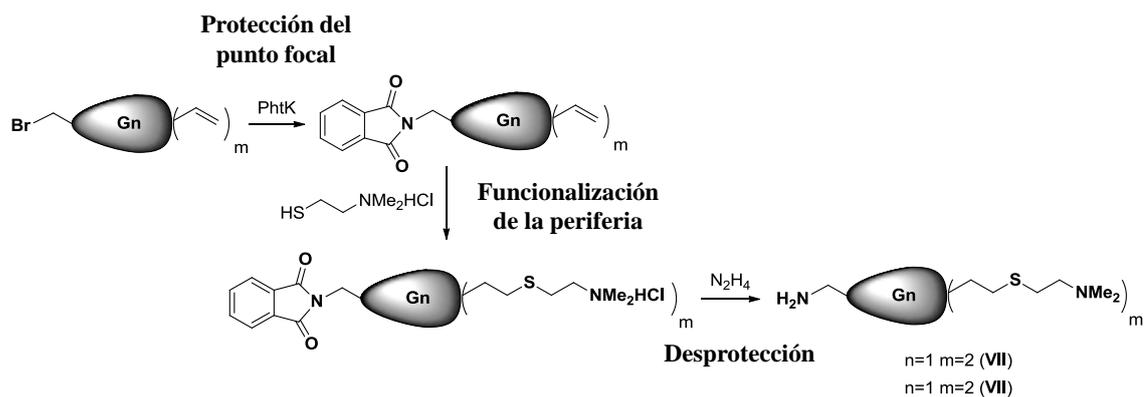
- a) Dendrones con un grupo  $-NH_2$ , utilizados en reacciones de condensación.
- b) Dendrones con un grupo  $-OH$ , utilizados en reacciones de sustitución.
- c) Dendrones con un fragmento viológeno derivatizado con un grupo aldehído, utilizados en reacciones de condensación.

### 3.2.2.1 Dendrones carbosilano con un grupo $-NH_2$ en el punto focal

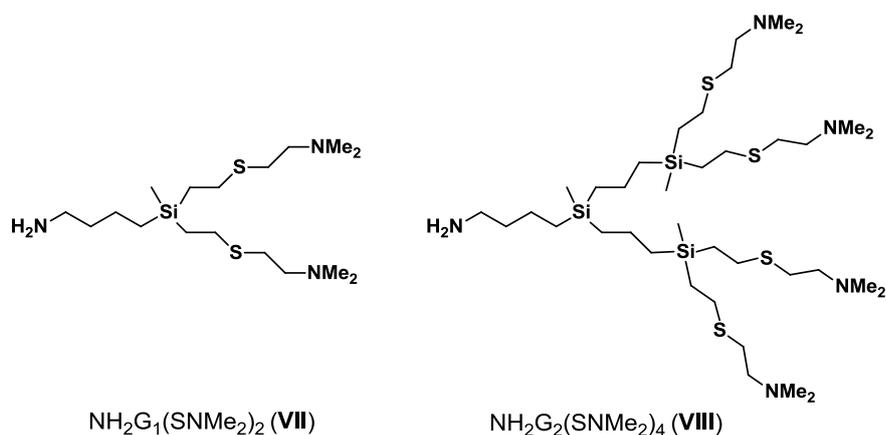
El objetivo es preparar dendrones con un grupo  $-NH_2$  en el punto focal y grupos amina en la periferia, para generar finalmente grupos amonio. Para ello, se necesitó la protección del punto focal, ya que el átomo de bromo de estos sistemas no es compatible con dicha funcionalización. En este caso se han utilizado tres tipos de cuñas dendríticas diferentes:

*a) Dendrones funcionalizados en la periferia con grupos  $-NMe_2$  mediante reacción click tiol-eno*

Para preparar estos sistemas se protege el punto focal con un grupo ftalimida, y posteriormente se realiza la funcionalización vía click tiol-eno, partiendo de cuñas con grupos vinilo en la superficie. Una vez finalizada la funcionalización, se desprotege el punto focal obteniéndose los dendrones deseados  $NH_2G_n(SNMe_2)$  ( $n=1$ ,  $m=2$  (**VII**);  $n=2$ ,  $m=4$  (**VIII**)) (Esquema 3.5) (Figura 3.7).<sup>31</sup>



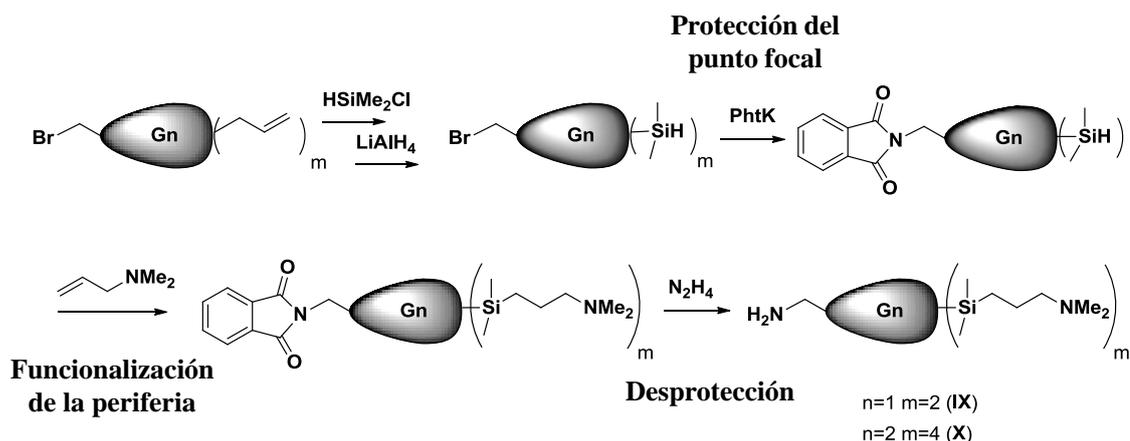
**Esquema 3.5** Síntesis de los dendrones precursores con grupos amino en el punto focal y en la periferia.



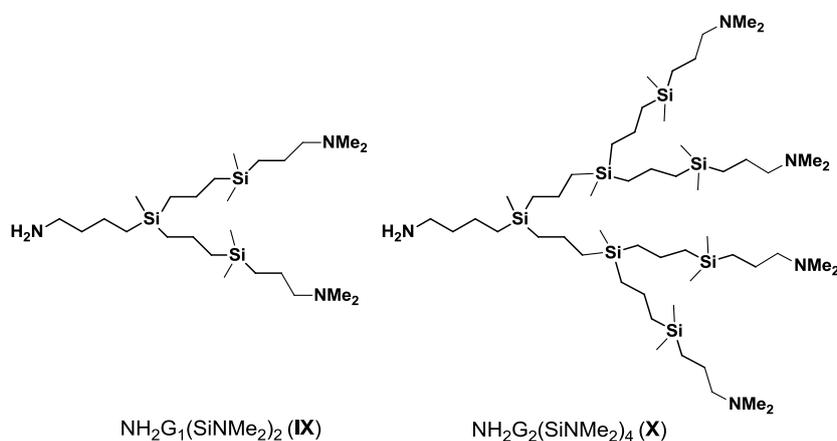
**Figura 3.7** Representación estructural de los dendrones  $\text{NH}_2\text{G}_n(\text{SNMe}_2)_m$  (VII-VIII).

*b) Dendrones funcionalizados en la periferia con grupos  $-\text{NMe}_2$  mediante reacción de hidrosililación*

En este caso, antes de realizarse la protección del grupo focal es necesaria la funcionalización de la periferia con grupos Si-H, ya que el grupo ftalimida no es compatible con la reducción utilizando  $\text{AlLiH}_4$ . Posteriormente, se realiza la reacción de hidrosililación de la amina correspondiente y por último, la desprotección del punto focal, para obtener los dendrones deseados  $\text{NH}_2\text{G}_n(\text{SiNMe}_2)$  ( $n=1, m=2$  (IX);  $n=2, m=4$  (X)) (Esquema 3.6) (Figura 3.8).<sup>32</sup>



**Esquema 3.6** Síntesis de los dendrones precusores con grupos amino en el punto focal y la periferia.



**Figura 3.8** Representación estructural de los dendrones  $\text{NH}_2\text{G}_n(\text{SiNMe}_2)_m$  (IX-X).

**c) Dendrones funcionalizados en la periferia con grupos -NHBoc mediante reacción de hidrosililación**

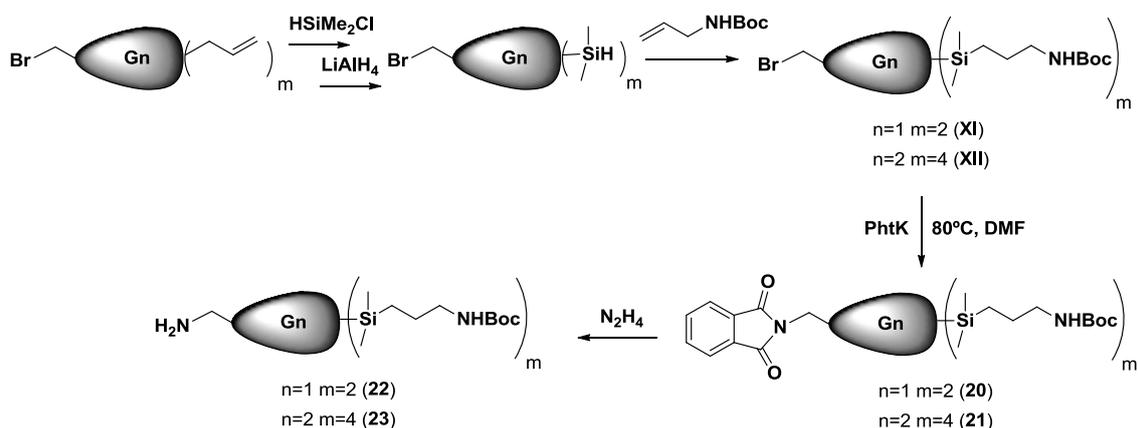
En este caso, las cuñas no se habían preparado con anterioridad, por lo que se detalla su síntesis y caracterización.

Procedimiento sintético

Para la síntesis de estas cuñas se han utilizado los precursores  $\text{BrG}_n(\text{SiNHBoc})_m$  (XI y XII), los cuales se preparan de forma similar a los anteriormente descritos (Esquema 3.7).<sup>33</sup> En este caso, la presencia de un átomo de bromo en el punto focal es compatible con la reacción de hidrosililación y con la presencia de grupos amino en la periferia, debido a que se encuentran

protegidos. La utilización del grupo ftalimida no fue como grupo protector, sino para generar los sistemas deseados con un grupo amino en el punto focal.

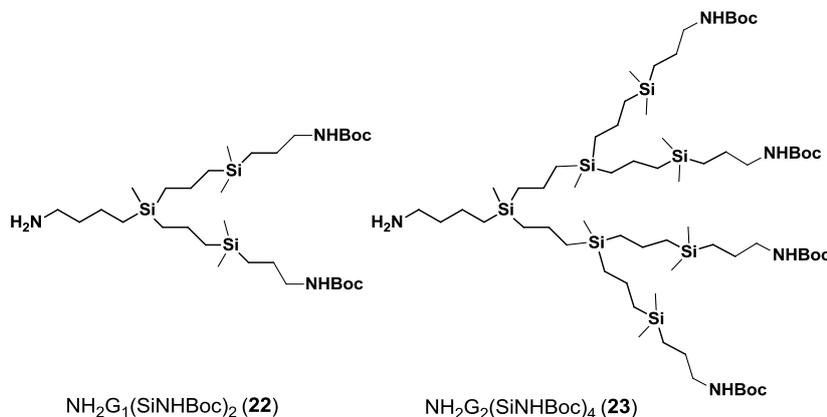
Para ello, se adiciona ftalimida potásica a una disolución de los dendrones precursores  $\text{BrG}_n(\text{SiNHBoc})_m$  (**XI** y **XII**) en DMF, y se mantiene bajo agitación constante a  $80^\circ\text{C}$  durante una noche. La reacción se siguió por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  mediante la desaparición de la señal a 3.39 ppm correspondiente al fragmento  $-\text{CH}_2\text{Br}$ , y la aparición de una nueva a 3.65 ppm correspondiente al grupo metileno unido al grupo ftalimida (Esquema 3.7). Estos sistemas son purificados mediante una extracción con diclorometano, obteniéndose así los dendrones  $\text{PhtG}_n(\text{SiNHBoc})_m$  ( $n=1, m=2$  (**20**);  $n=2, m=4$  (**21**)) como aceites amarillos con buenos rendimientos.



**Esquema 3.7** Síntesis de los dendrones precursores (**XI** y **XII**) con un grupo bromo en el punto focal y aminas protegidas en la periferia, y así como los derivados sucesivos **20-23**.

El siguiente paso es la desprotección del punto focal, la cual se realiza con hidracina en metanol a  $80^\circ\text{C}$  durante 18 horas. La reacción se siguió por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  mediante la desaparición de la señal a 3.65 ppm correspondiente al grupo metileno unido al grupo ftalimida, y por la aparición de un triplete a 2.66 ppm atribuida al grupo metileno unido directamente al grupo amino del punto focal. Los derivados son purificados mediante el mismo procedimiento que los dendrones anteriores, obteniéndose los sistemas

$\text{NH}_2\text{G}_n(\text{SiNHBoc})_m$  ( $n=1, m=2$  (**22**);  $n=2, m=4$  (**23**)) como aceites amarillos con rendimientos moderados (Esquema 3.7 y Figura 3.9).



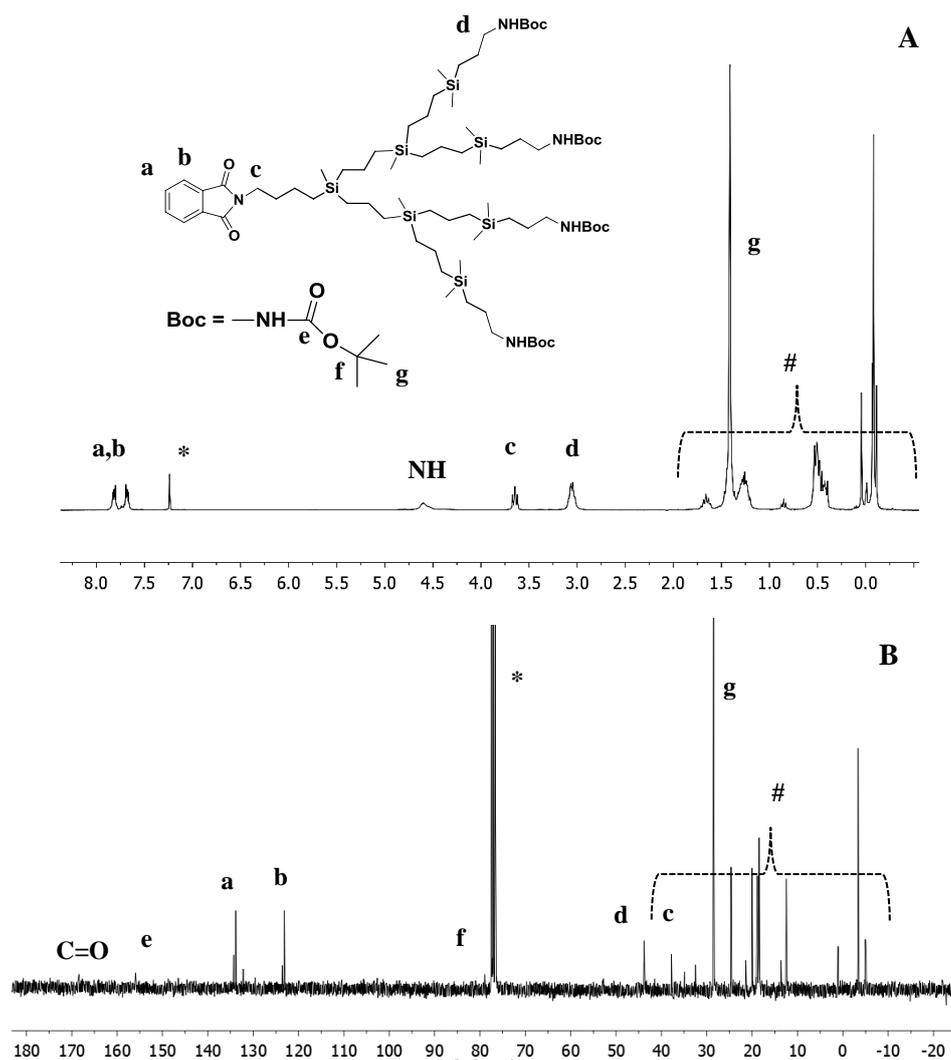
**Figura 3.9** Representación estructural de los dendrones  $\text{NH}_2\text{G}_n(\text{SiNHBoc})_m$  (**22-23**).

### Caracterización estructural

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  correspondientes a los sistemas **20-23** se realizaron en  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.

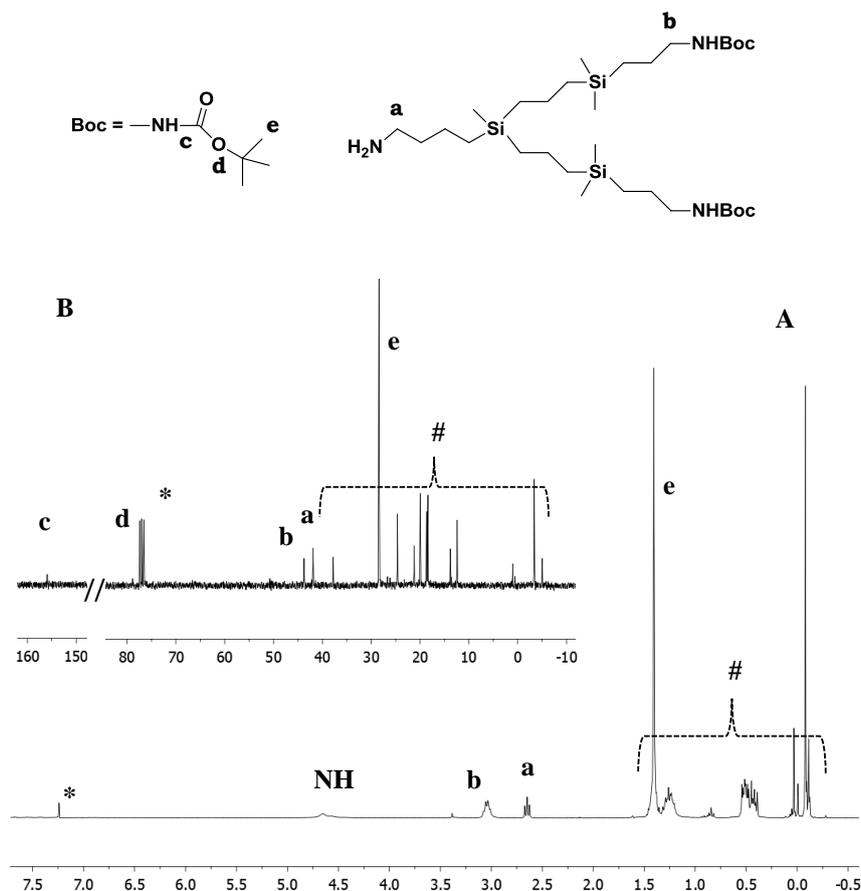
Para los sistemas **20** y **21**, en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se puede observar la incorporación del grupo protector ftalimida en la zona aromática a 7.68 y 7.82 ppm, y por el grupo metileno unido directamente a átomo de nitrógeno a 3.65 ppm.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ , el mencionado grupo metileno aparece a 37.8 ppm, y la parte aromática se observa a 123.2 y 133.8 ppm, el átomo de  $\text{C}_{\text{ipso}}$  a 132.2 ppm y el grupo carbonilo a 168.5 ppm (Figura 3.10). En estos sistemas también es característico el grupo *tert*-butilo, donde se puede observar la señal de los grupos metilo a 1.47 y a 28.5 ppm en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  respectivamente. Además, en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  se observa el carbono cuaternario a 79.0 ppm y el grupo carbonilo a 156.0 ppm.



**Figura 3.10** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto  $\text{PhtG}_2(\text{SiNHBoc})_4$  (**21**). #Esqueleto CBS y \* $\text{CDCl}_3$ .

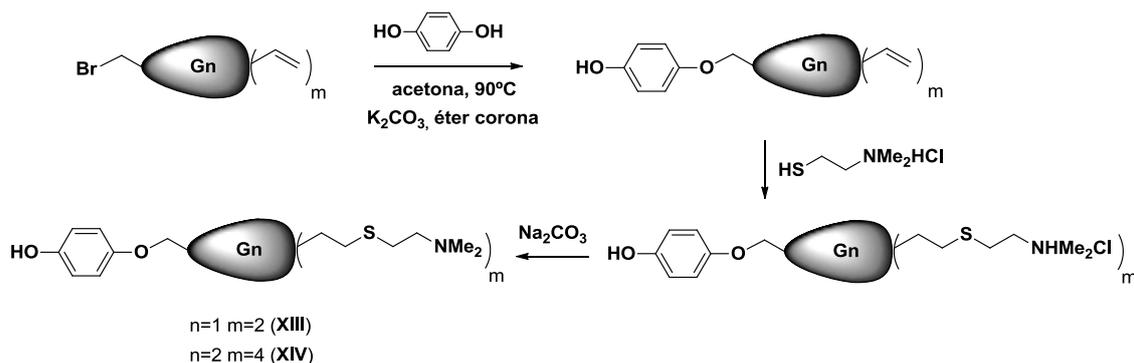
Para los sistemas **22** y **23** la parte carbo-silano presenta el mismo perfil que para los dendrones anteriores, con la diferencia del punto focal. La desprotección se confirma por la señal característica del grupo metileno unido directamente al grupo  $\text{NH}_2$ , la cual aparece como un triplete a 2.66 ppm y a 41.9 ppm en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  respectivamente (Figura 3.11).



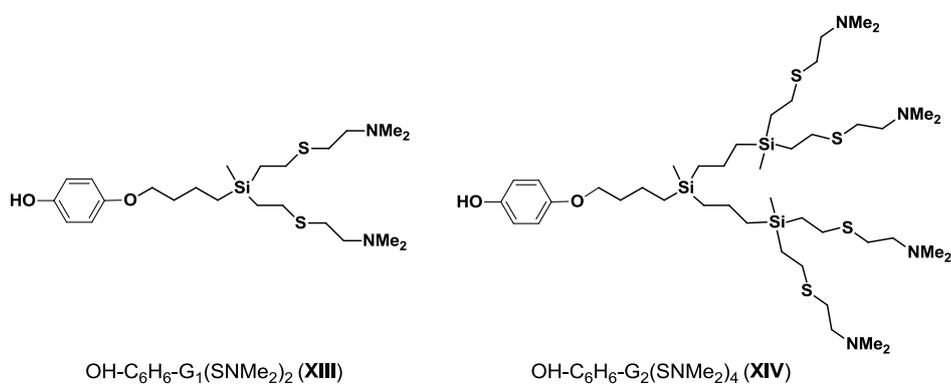
**Figura 3.11** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto  $\text{NH}_2\text{G}_1(\text{SiNHBoc})_2$  (**22**). #Esqueleto CBS y \* $\text{CDCl}_3$ .

### 3.2.2.2 Dendrones carbosilano con un grupo OH en el punto focal

Para obtener sistemas con un grupo fenol en el punto focal se utiliza el reactivo comercial hidroquinona, sobre la cual se realiza una monosustitución con una cuña carbosilano  $\text{BrG}_n\text{V}_m$ . Una vez obtenido este precursor, se lleva a cabo su funcionalización vía tiol-eno mediante el mismo método sintético utilizado en los dendrones anteriores.<sup>31</sup> De esta forma se obtienen los sistemas deseados  $\text{OH-C}_6\text{H}_6\text{-G}_n(\text{SiNMe}_2)$  ( $n=1$ ,  $m=2$  (**XIII**);  $n=2$ ,  $m=4$  (**XIV**)) (Esquema 3.8) (Figura 3.12).



**Esquema 3.8** Síntesis de los dendrones precursores con un grupo fenol en el punto focal y grupos amino en la periferia.



**Figura 3.12** Representación estructural de los dendrones  $\text{OH-C}_6\text{H}_6\text{-G}_n\text{(SNMe}_2\text{)}_m$  (XIII-XIV).

### 3.2.2.3 Dendrones carbosilano con el monómero viológeno en el punto focal

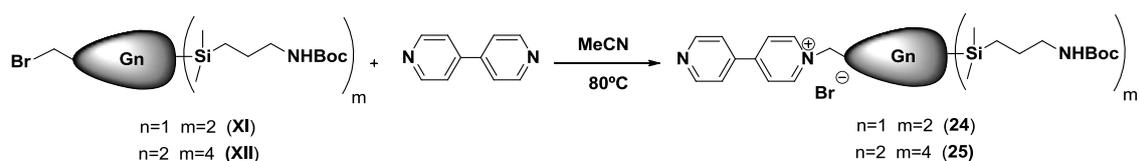
#### a) Dendrones con grupos $\text{-NHBoc}$ en la periferia

Se han preparado dendrones de tipo carbosilano que presentan grupos  $\text{-NHBoc}$  en la periferia y en el punto focal se ha introducido un fragmento viológeno derivatizado con un grupo aldehído.

#### Procedimiento sintético

La primera reacción consiste en la alquilación de uno de los átomos de nitrógeno de biperidina con dendrones carbosilano  $\text{BrG}_n\text{(SiNHBoc)}_m$  ( $\text{G}_1$ (XI) y  $\text{G}_2$ (XII)) en acetonitrilo a  $80^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Esta reacción necesita un gran exceso de biperidina para que la reacción progrese, además de favorecer la monosustitución (Esquema 3.9). La reacción es seguida por espectroscopia de

RMN de  $^1\text{H}$  mediante la desaparición del triplete a 3.40 ppm característico del fragmento  $-\text{CH}_2\text{Br}$ . El exceso de biperidina se puede eliminar por sublimación ( $T=100^\circ\text{C}$ ), pero debido a que siempre se observa cierto porcentaje de disustitución, se ha realizado una columna de cromatografía por exclusión de tamaños en THF. Los dendrones  $\{[(\text{Viológeno})\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNHBoc})_m](\text{Br})\}$  ( $n=1$ ,  $m=2$  (**24**);  $n=2$ ,  $m=4$  (**25**)) se obtienen con elevados rendimientos, como aceites marrones y solubles en los disolventes orgánicos habituales.

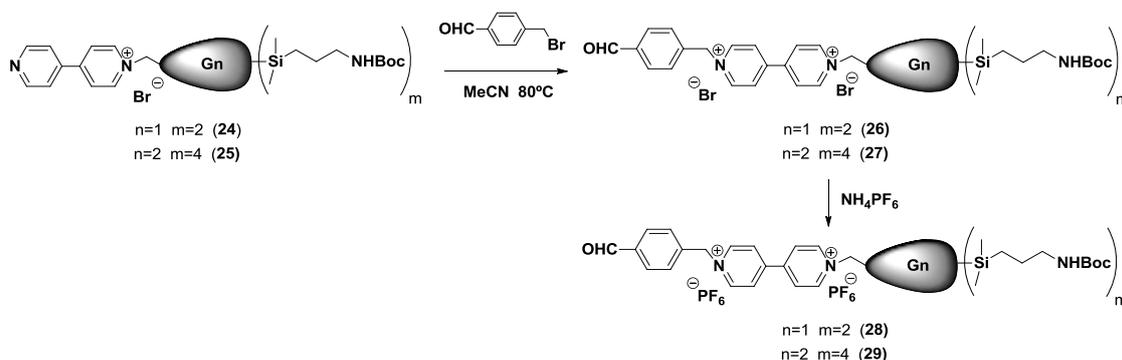


**Esquema 3.9** Síntesis de los dendrones carbosilano funcionalizados con biperidina en el punto focal (**24** y **25**).

El segundo paso consiste en la alquilación del segundo átomo de nitrógeno con el derivado 4-(bromometil)benzaldehído. De esta forma, se obtienen dendrones con un grupo aldehído en el punto focal y grupos  $-\text{NHBoc}$  en la superficie. La reacción se realiza en las mismas condiciones que los sistemas anteriores, pero en este caso sólo se necesita un pequeño exceso de bromobenzaldehído. Para la primera generación, la reacción se completa en una noche, mientras que para la segunda generación son necesarias 48 horas. La reacción es seguida por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  por el desplazamiento de las señales correspondientes a la parte aromática hacia frecuencias más altas (Esquema 3.10) (ver apartado de caracterización).

En trabajos similares realizados en el grupo de Majoral, en el transcurso de la reacción se produce la precipitación total del producto deseado, pudiéndose eliminar el exceso de bromobenzaldehído mediante lavados sucesivos con acetonitrilo, obteniéndose así el producto puro.<sup>34</sup> Sin embargo, en este caso se observa una precipitación parcial, por lo que si se sigue el mismo protocolo de purificación, esto daría lugar a una disminución considerable del rendimiento de la reacción. El problema de estos productos es que son parcialmente solubles en

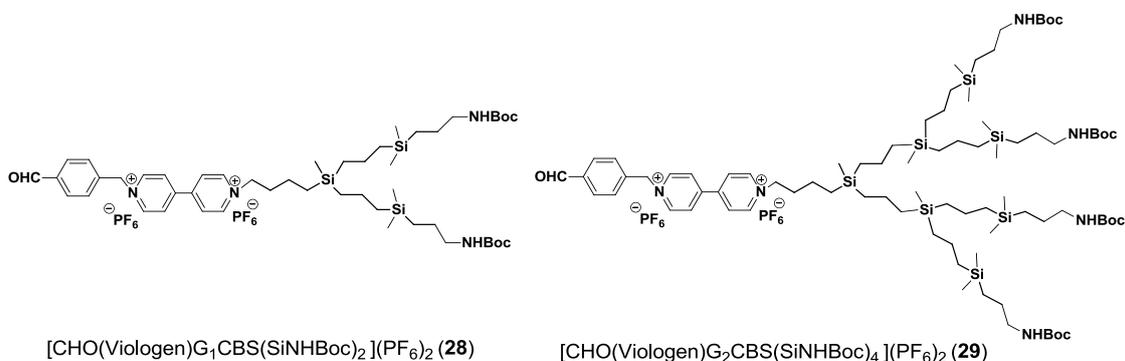
multitud de disolventes, lo que dificulta su purificación. Finalmente, se realiza una extracción agua/DCM donde se observa una gran interfase. Esto es debido a que el producto se comporta como un tensioactivo, la parte del viológeno queda hacia la fase acuosa y la parte carbosilano hacia la fase orgánica. Guardando la interfase y la parte acuosa, y lavando varias veces con el disolvente orgánico, se consigue purificar el producto deseado. No obstante, esta forma de purificación no es adecuada, ya que da lugar a un rendimiento muy bajo, por lo que estos productos solo se han aislado para su caracterización. Los dendrones  $\{[\text{CHO}(\text{Viológeno})\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNHBoc})_m](\text{Br})_2\}$  ( $n=1, m=2$  (**26**);  $n=2, m=4$  (**27**)) se obtienen como aceites amarillentos con baja solubilidad en la mayoría de los disolventes comúnmente empleados.



**Esquema 3.10** Síntesis de los dendrones con un grupo aldehído en el punto focal y aminas protegidas en la periferia (**26-29**).

Para mejorar la solubilidad de estos sistemas y mejorar los rendimientos, se realiza un cambio de contraión. Para ello, el bruto de reacción se disuelve en una mezcla de disolventes DCM/H<sub>2</sub>O y se adiciona una disolución saturada de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, observándose como los derivados se van disolviendo completamente en la fase orgánica, y desapareciendo la interfase anteriormente mencionada. El contraión PF<sub>6</sub><sup>-</sup> cambia de manera considerable la solubilidad de estos sistemas, haciéndolos totalmente solubles en multitud de disolventes orgánicos. Posteriormente el crudo de reacción se purifica mediante columna de exclusión de tamaños en THF y se obtienen los dendrones deseados  $\{[\text{CHO}(\text{Viológeno})\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNHBoc})_m](\text{PF}_6)_2\}$  ( $n=1, m=2$  (**28**);  $n=2, m=4$  (**29**))

como sólidos amarillos con elevados rendimientos (Esquema 3.10 y Figura 3.13). Dicho cambio se sigue mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  ya que algunas señales cambian su desplazamiento, junto con RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  dónde se observa el heptuplete correspondiente al contraión  $\text{PF}_6^-$ .



**Figura 3.13** Representación estructural de los dendrones  $\{[\text{CHO}(\text{Viológeno})\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNHBoc})_m](\text{PF}_6)_2\}$  (**28-29**).

Es importante destacar que el orden de alquilación de los nitrógenos de la biperidina debe ser el descrito en este apartado. La alquilación con el 4-(bromometil)benzaldehído desactiva el segundo nitrógeno y la posterior alquilación con la cuña carbosilano no progresa, haciendo inviable esta ruta sintética.

### Caracterización estructural

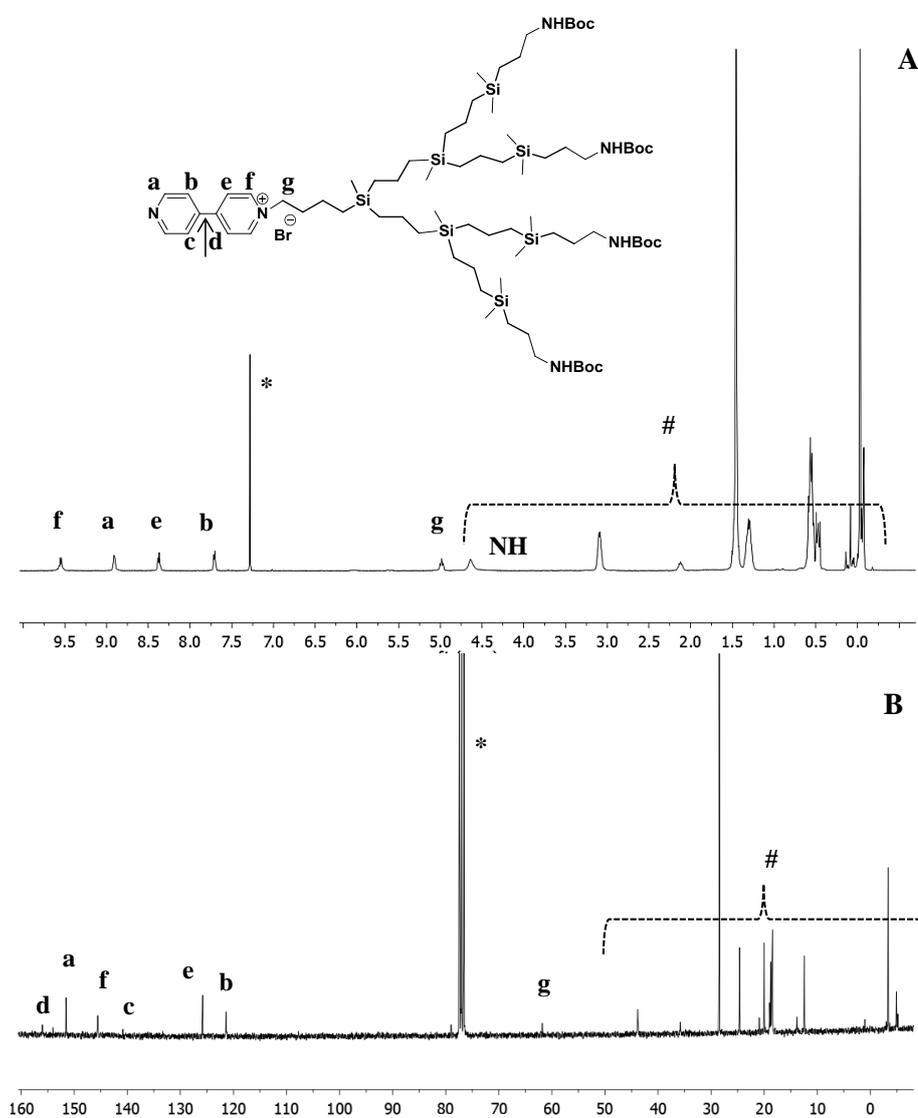
Los sistemas obtenidos se han caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  así como por análisis elemental y espectrometría de masas.

### ***Resonancia magnética nuclear***

Las cuñas que contienen el grupo  $-\text{NHBoc}$  en la periferia presentan los mismos desplazamientos químicos tanto en RMN de  $^1\text{H}$  como en  $^{13}\text{C}$  que los sistemas **22** y **23**. Por ello, en este apartado se describen únicamente las señales correspondientes a los fragmentos introducidos en el punto focal.

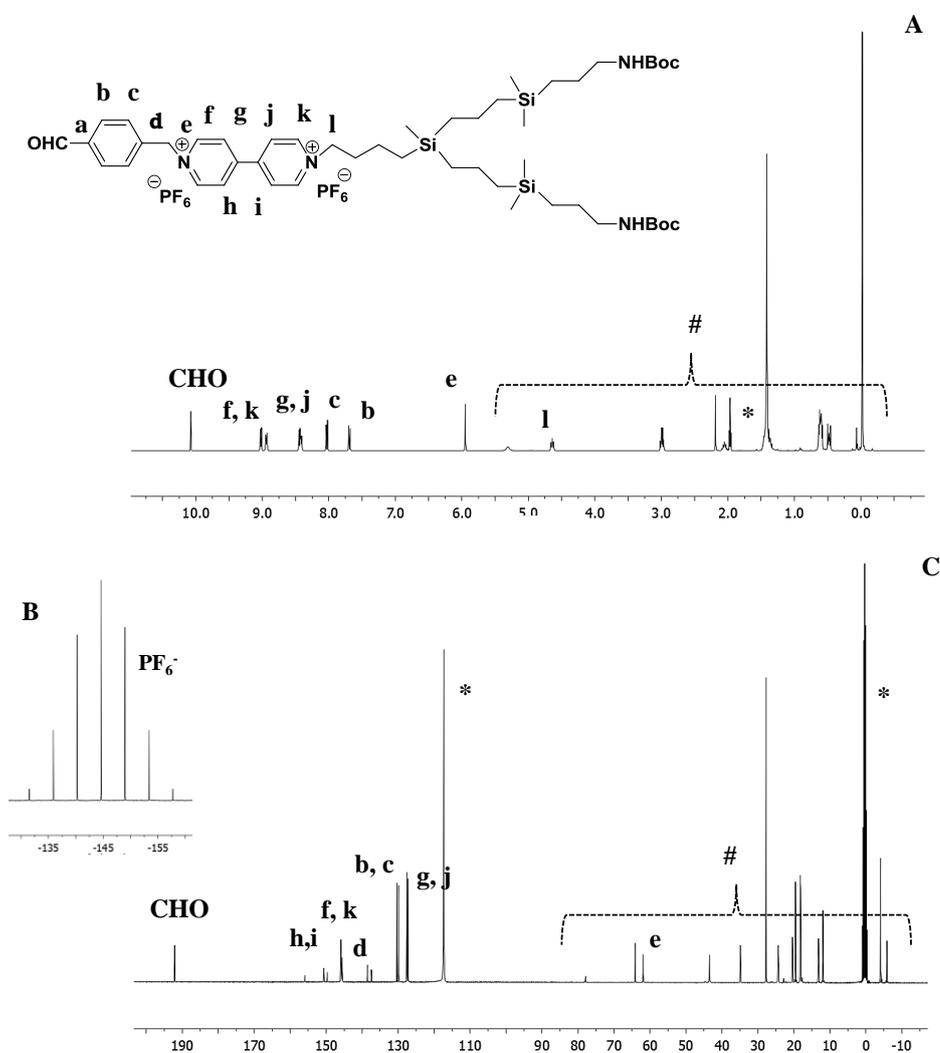
Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  correspondientes a los sistemas **24-25** se realizaron en  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.

Se puede observar la señal correspondiente al grupo metileno  $-\text{CH}_2\text{N}^+$ - que aparece a 4.96 ppm en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y a 61.5 ppm en el espectro de  $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$  que confirma la alquilación de la bipiridina. Además, en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observan cuatro señales correspondientes a la parte aromática, a 8.86 y 9.58 ppm para los protones más cercanos a los nitrógenos, y a 7.73 y 8.43 ppm para los interiores. En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$  se observan las señales a 121.5 y 129.5 ppm correspondientes a los carbonos más alejados de los átomos de nitrógeno, a 145.7 y 151.4 ppm los más cercanos, y a 140.8 y 153.6 ppm los  $\text{C}_{\text{ipso}}$  (Figura 3.14).



**Figura 3.14** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$  del compuesto  $\{[(\text{Viológeno})\text{G}_2\text{CBS}(\text{SiNHBoc})_4](\text{Br})\}$  (25). #Esqueleto CBS y \* $\text{CDCl}_3$ .

Debido a la extensión del trabajo, las especies intermedias con aniones bromuro **26** y **27** no se han descrito con detalle, porque la única diferencia con los derivados **28** y **29** es el contraión. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  correspondientes a los sistemas **28-29** se realizaron en  $\text{CD}_3\text{CN}$  como disolvente.



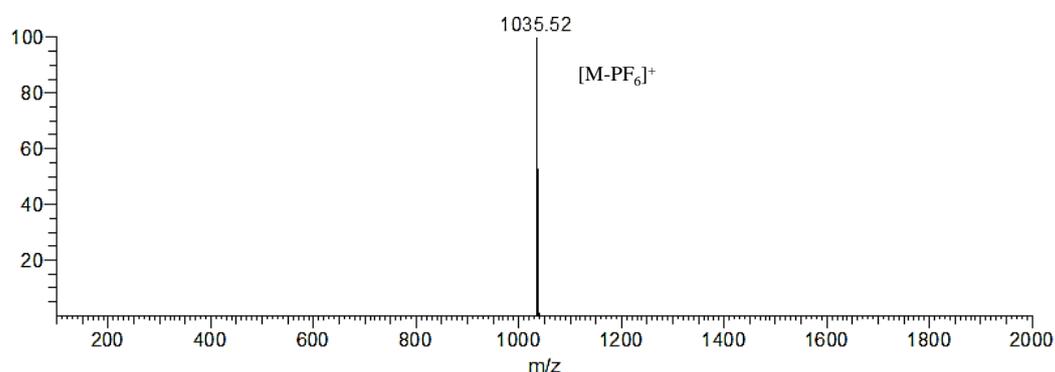
**Figura 3.15** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$ , B) RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y C) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto  $\{[\text{CHO}(\text{Viológeno})\text{G}_1\text{CBS}(\text{SiNHBoc})_2](\text{PF}_6)_2\}$  (**28**). #Esqueleto CBS y \* $\text{CD}_3\text{CN}$ .

Lo más característico de este dendrón es la incorporación del grupo aldehído, el cual se puede observar a 10.07 ppm en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y a 192.10 ppm en el espectro de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ . La incorporación del grupo benzaldehído también se observa por la aparición de la señal correspondiente al grupo metileno unido directamente al átomo de nitrógeno del fragmento viológeno a 5.95 y 61.9

ppm en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ , respectivamente. Las señales aromáticas aparecen a 7.69 y 8.03 ppm en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , y en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  se observan a 129.8 y 130.3 ppm y los  $\text{C}_{\text{ipso}}$  a 137.4 y 138.5 ppm. La parte correspondiente al viológeno se ve modificada por la sustitución del segundo nitrógeno, por el cambio de contraión y el cambio de disolvente (Figura 3.15). El cambio más significativo se observa en los protones más cercanos al nuevo nitrógeno sustituido, que se desplazan de 7.73 y 8.86 ppm a 8.40 y 9.02 ppm en el espectro de  $^1\text{H}$ , respectivamente. Los átomos de carbono más cercanos al nitrógeno sustituido también son los que sufren una mayor influencia en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ .

### *Espectrometría de masas*

Los espectros de masas MALDI-TOF muestran los picos correspondientes al ión molecular  $[\text{M}-\text{Br}]^+$  de los dendrones  $\{(\text{Viológeno})\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNHBoc})_m(\text{Br})\}$  **24** ( $m/z = 771.51$  uma) y **25** ( $m/z = 1457.98$  uma). Para los dendrones  $\{[\text{CHO}(\text{Viológeno})\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNHBoc})_m](\text{PF}_6)_2\}$  se observan los picos correspondientes a  $[\text{M}-\text{PF}_6]^+$ : **28** ( $m/z = 1035.52$ ) y **29** ( $m/z = 1722.00$  uma).



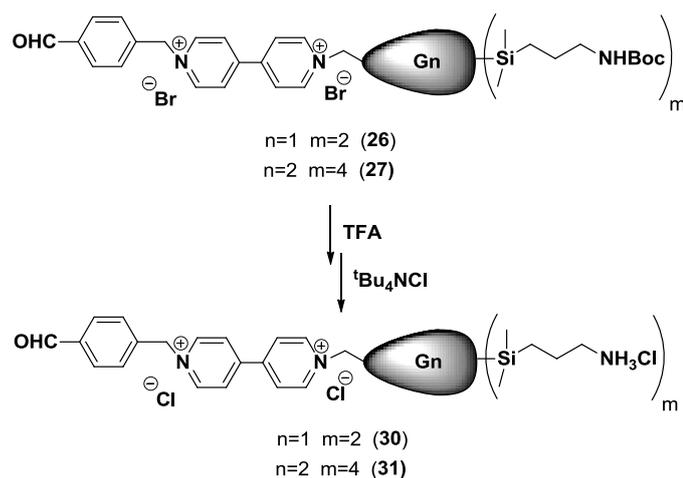
**Figura 3.16** Espectro de masas del dendrón **28**.

#### *b) Dendrones con grupos catiónicos en la periferia*

Una vez obtenidos los dendrones necesarios para anclarlos a un núcleo de fósforo, se sintetizaron cuñas análogas con grupos amonio en la periferia con y sin el monómero viológeno en el punto focal. Estos sistemas permiten estudiar de forma comparativa el efecto del viológeno y las diferentes topologías utilizadas.

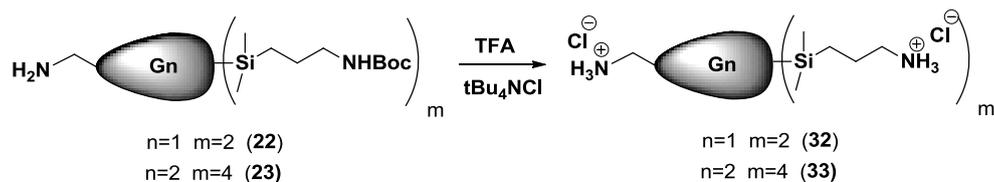
Procedimiento sintético

Sobre una disolución de los dendrones **26** y **27** en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se añade lentamente una disolución de TFA al 20% en diclorometano seco, la mezcla de reacción se mantiene bajo agitación constante 1 hora. La desprotección se sigue mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  a través de la desaparición del grupo *tert*-butilo a 1.45 ppm. Una vez completada la reacción, se lleva a sequedad, se disuelve en acetonitrilo, y se añade lentamente una disolución acuosa saturada de  ${}^t\text{Bu}_4\text{NCl}$ , produciéndose la precipitación del producto (Esquema 3.11). El precipitado se lava varias veces con acetonitrilo, obteniéndose de esta manera los dendrones deseados  $\{[\text{CHO}(\text{Viológeno})\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_m](\text{Cl})_{2+m}\}$  ( $n=1$ ,  $m=2$  (**30**);  $n=2$ ,  $m=4$  (**31**)) como sólidos amarillos con elevados rendimientos (Figura 3.17).

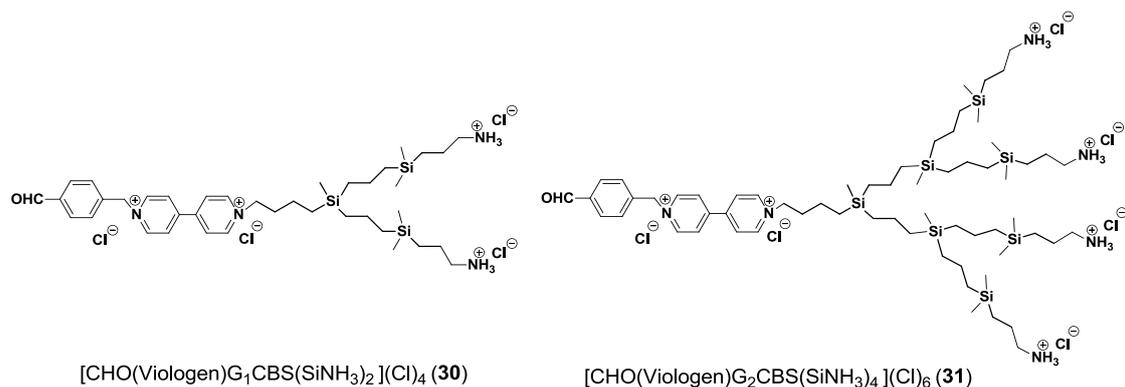


**Esquema 3.11** Síntesis de los dendrones con grupos amonio en la periferia y fragmento viológeno en el punto focal (**30** y **31**).

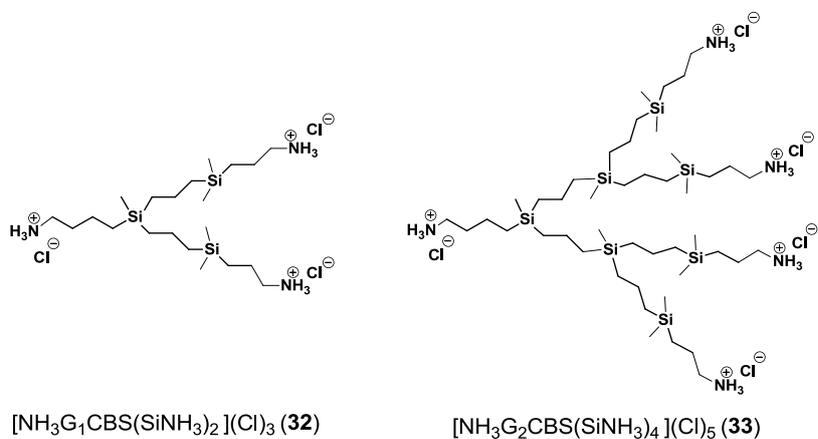
Con el objetivo de poder valorar la influencia del grupo viológeno en este tipo de estructuras, se han preparado dendrones catiónicos puramente carbosilano. Para ello, se utiliza el mismo procedimiento que el anterior, pero partiendo de los dendrones **22** y **23** (Esquema 3.12). Estos dendrones  $\{[\text{NH}_3\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_m](\text{Cl})_{1+m}\}$  ( $n=1$ ,  $m=2$  (**32**);  $n=2$ ,  $m=4$  (**33**)) se obtienen como sólidos blancos con elevados rendimientos (Figura 3.18).



**Esquema 3.12** Síntesis de los dendrones con grupos amonio en la periferia y en el punto focal (32 y 33).



**Figura 3.17** Representación estructural de los dendrones  $\{[\text{CHO}(\text{Viológeno})\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_m](\text{Cl})_{m+2}\} (30-31)$ .



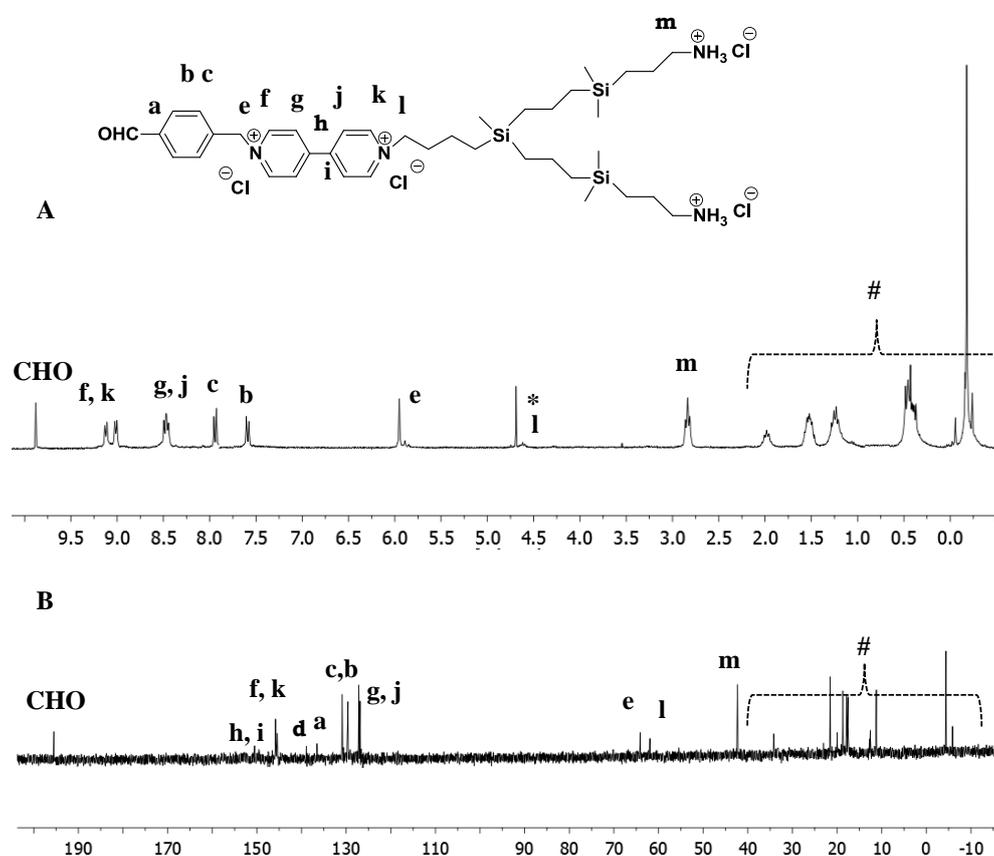
**Figura 3.18** Representación estructural de los dendrones  $\{[\text{NH}_3\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_m](\text{Cl})_{m+1}\} (32-33)$ .

### Caracterización estructural

Los sistemas obtenidos **30-33** se han caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  utilizando  $\text{D}_2\text{O}$  como disolvente, así como por análisis elemental. De nuevo, para estos sistemas la estructura interna del esqueleto

carbosilano no se ve alterada, describiéndose únicamente las señales correspondientes a los fragmentos introducidos en el punto focal y en la periferia.

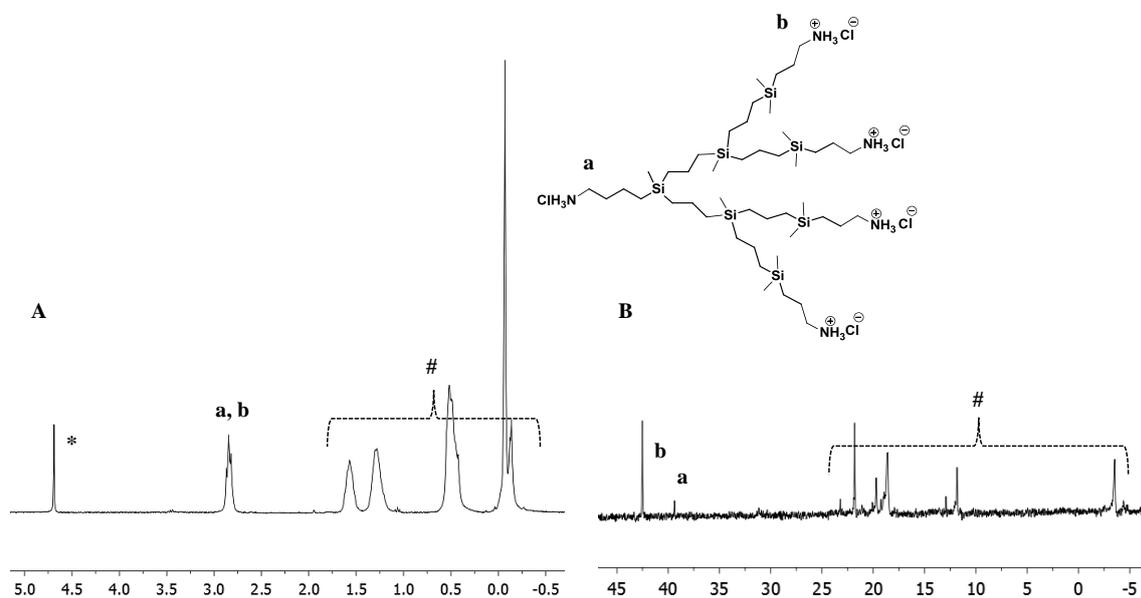
Lo más característico de los dendrones **30** y **31** es la desprotección de las aminas periféricas. La señal correspondiente al grupo metileno unido directamente a los grupos amonio se puede observar como un triplete a 2.84 ppm en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y a 42.32 ppm en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ . La parte aromática perteneciente al punto focal presenta el mismo patrón que para los sistemas **28** y **29**, aunque en los desplazamientos hay pequeñas diferencias debido al cambio del contraión y del disolvente (Figura 3.19).



**Figura 3.19** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto  $\{[\text{CHO}(\text{Viológeno})\text{G}_1\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_2](\text{Cl})_4\}$  (**30**). #Esqueleto CBS y \*D<sub>2</sub>O.

El esqueleto de los dendrones **32** y **33** presentan el mismo perfil que los anteriores, pero en el punto focal presenta otro grupo amonio adicional. El grupo metileno unido a este grupo amonio en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se encuentra

solapado con los grupos metileno correspondientes a la periferia a 2.84 ppm. Sin embargo, en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  si se pueden diferenciar ambos carbonos, observándose a 42.3 ppm los grupos metileno periféricos y a 39.2 ppm el grupo metileno perteneciente al punto focal (Figura 3.20).



**Figura 3.20** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto  $\{[(\text{NH}_3)\text{G}_2\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_4](\text{Cl})_5\}$  (**33**). #Esqueleto CBS y \*D<sub>2</sub>O.

### 3.3 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS HÍBRIDOS FÓSFORO-CARBOSILANO

Anteriormente se ha mostrado la relevancia que han tenido los dendrímeros catiónicos de tipo carbosilano y los basados en átomos de fósforo en diversas aplicaciones, sobre todo en el campo de la biomedicina.<sup>19,35-37</sup>

En este apartado se describe la síntesis de dendrímeros catiónicos híbridos, los cuales poseen un interior basado en un esqueleto de átomos de fósforo y la periferia formada por dendrones tipo carbosilano con diferentes grupos amonio terminales.

#### 3.3.1 Síntesis y caracterización de dendrímeros esféricos neutros

Para generar los dendrímeros esféricos híbridos se han utilizado dos tipos de reacciones:

- (a) Reacción de condensación: Se hacen reaccionar los dendrímeros de fósforo que presentan grupos aldehído en la superficie ( $G_0$  (III) y  $G_{1C}$  (V)) con dendrones carbosilano con grupos amino en la periferia ( $-NMe_2$  o  $-NHBoc$ ) y un grupo  $NH_2$  en el punto focal (VII, IX y 22). El enlace imina formado es relativamente inestable frente a procesos de hidrólisis, pudiendo revertir la reacción a lo largo del tiempo. Para evitarlo, se realiza la reducción selectiva de dicho enlace, dejando nuevos grupos amino en el interior del esqueleto dendrítico.
- (b) Reacción de sustitución: En este caso se hace reaccionar el dendrímero de fósforo con grupos P-Cl en la superficie ( $G_1$  (IV)) y dendrones carbosilano funcionalizados con grupos  $-NMe_2$  en la periferia y un grupo fenol en el punto focal (XIII).

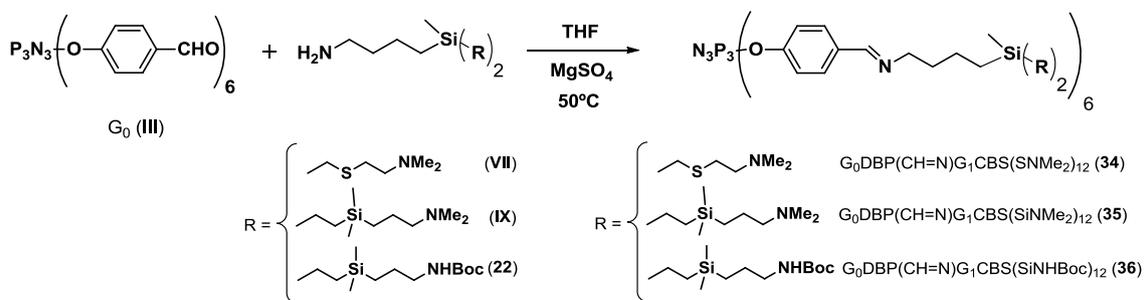
Todas las reacciones que se van a describir a continuación se han intentado con ambas generaciones de dendrones carbosilano ( $G_1$  y  $G_2$ ). Sin embargo, cuando se utilizó la segunda generación, la reacción no se completó o al manipular el producto se agregó con mucha facilidad. Por ello, se descartó la

segunda generación y solo se describen los procesos realizados con las cuñas dendríticas de primera generación.

### 3.3.1.1 Reacciones de condensación y reducción del grupo imina

#### Procedimiento sintético

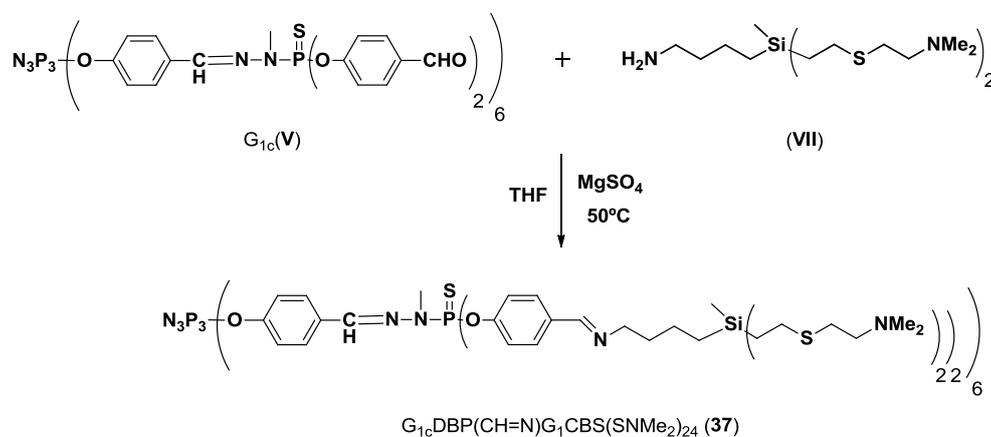
La reacción de condensación se lleva a cabo en THF seco bajo atmósfera inerte entre el dendrímero  $G_0$  (**III**) y las cuñas que contienen un grupo amino en el punto focal (**VII**, **IX** y **22**) en presencia de sulfato de magnesio para eliminar el agua generada como subproducto de la reacción. La reacción se mantiene bajo agitación constante a 50°C durante 48 horas (Esquema 3.13). El proceso en todos los casos se siguió por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , mediante la desaparición del grupo aldehído del dendrímero esférico, que asegura la completa sustitución del mismo, y por la aparición del grupo imina a 8.16 ppm. Una vez finalizada la reacción, los crudos de reacción se centrifugan para eliminar los restos de  $\text{MgSO}_4$ . De esta forma, se obtienen los dendrímeros como aceites amarillentos  $G_0\text{DBP}(\text{CH}=\text{N})G_1\text{CBS}(\text{R})_{12}$  ( $\text{R}=\text{SNMe}_2$  (**34**),  $\text{SiNMe}_2$  (**35**) y  $\text{SiNHBoc}$  (**36**)). Estos compuestos no se han aislado debido a la inestabilidad del enlace imina.



**Esquema 3.13** Síntesis de los dendrímeros híbridos neutros (**34-36**) mediante una reacción de condensación.

La reacción de condensación con un dendrímero de fósforo de generación mayor solo se realizó con un tipo de cuña carbosilano. Se eligió el dendrón más fácil de sintetizar, ya que conlleva un menor número de etapas de reacción. La reacción se lleva a cabo entre el dendrímero  $G_{1c}$  (**V**) y el dendrón (**VII**) en las mismas condiciones descritas anteriormente. De esta forma se obtiene el

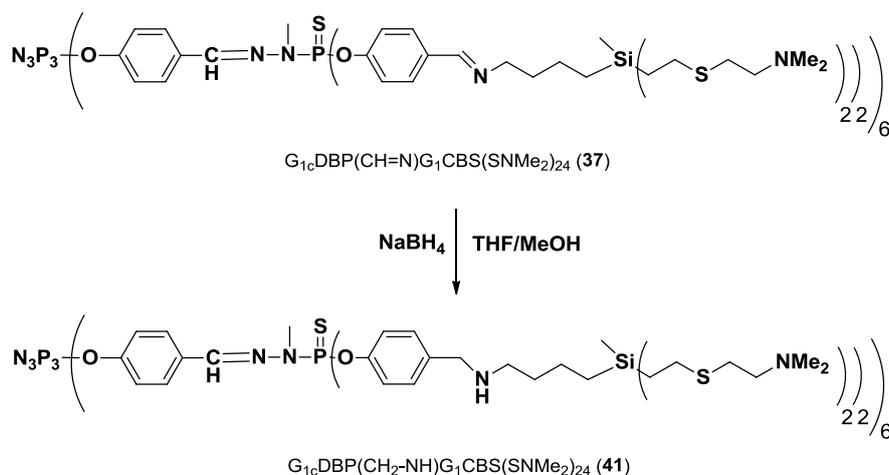
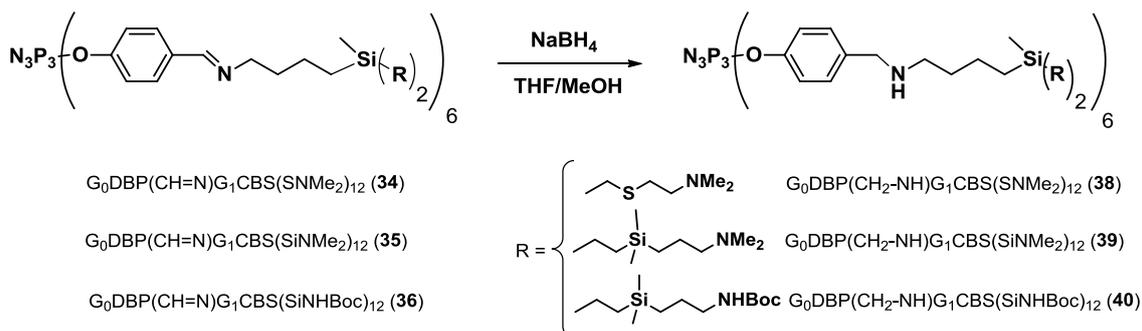
dendrímtero  $G_{1c}DBP(CH=N)G_1CBS(SNMe_2)_{24}$  (**37**) como un aceite amarillento (Esquema 3.14).



**Esquema 3.14** Síntesis del dendrímtero híbrido neutro de mayor generación **37**.

Dado que uno de los objetivos de esta Memoria es obtener sistemas solubles y estables en agua, se necesita reducir el enlace imina a un enlace amino, y posteriormente realizar la cuaternización de los grupos amino.

Para ello, se trataron todos los derivados anteriores **34-37** con  $NaBH_4$  en una mezcla de disolventes THF/metanol a  $0^\circ C$  una noche. La reacción se siguió por espectroscopia de RMN de  $^1H$  mediante la desaparición de la señal correspondiente al grupo imina. Una vez completada la reacción, se realiza una extracción agua/DCM y posteriormente se realiza una columna cromatográfica de exclusión de tamaños en THF para eliminar el exceso de dendron carboxilano (Esquema 3.15). Los dendrimeros  $G_0DBP(CH_2-NH)G_1CBS(R)_{12}$  ( $R=SNMe_2$  (**38**),  $SiNMe_2$  (**39**) y  $SiNHBoc$  (**40**)) y  $G_{1c}DBP(CH_2-NH)G_1CBS(SNMe_2)_{24}$  (**41**) se obtienen con rendimientos moderados, como aceites marrones y solubles en los disolventes orgánicos habituales.

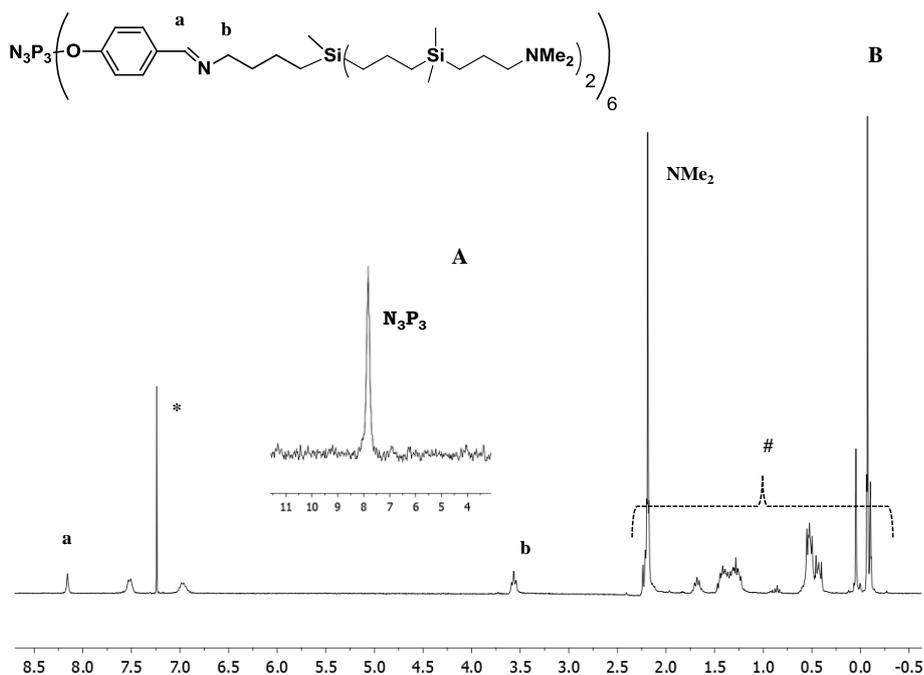


**Esquema 3.15** Reducción de los dendrimeros híbridos con grupos imina (34-37) para originar los dendrímeros con grupos amina internos (38-41).

### Caracterización estructural

Como ya se ha descrito, los sistemas **34-37** no se aislaron debido a su inestabilidad, por lo que tan solo se caracterizaron por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}$  utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.

En estos sistemas, lo más característico es la formación del enlace imina que se puede observar en todos los casos en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 8.16 ppm, y el grupo metileno adyacente al átomo de nitrógeno que aparece en torno a 3.56 ppm. En el espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  se puede observar una resonancia en torno a 7.8 ppm para los sistemas **34-36** (Figura 3.21). El mismo perfil se observa para el sistema **37** de mayor generación, observándose los picos a 8.25 y a 62.43 ppm para los átomos de fósforo interiores y exteriores, respectivamente.

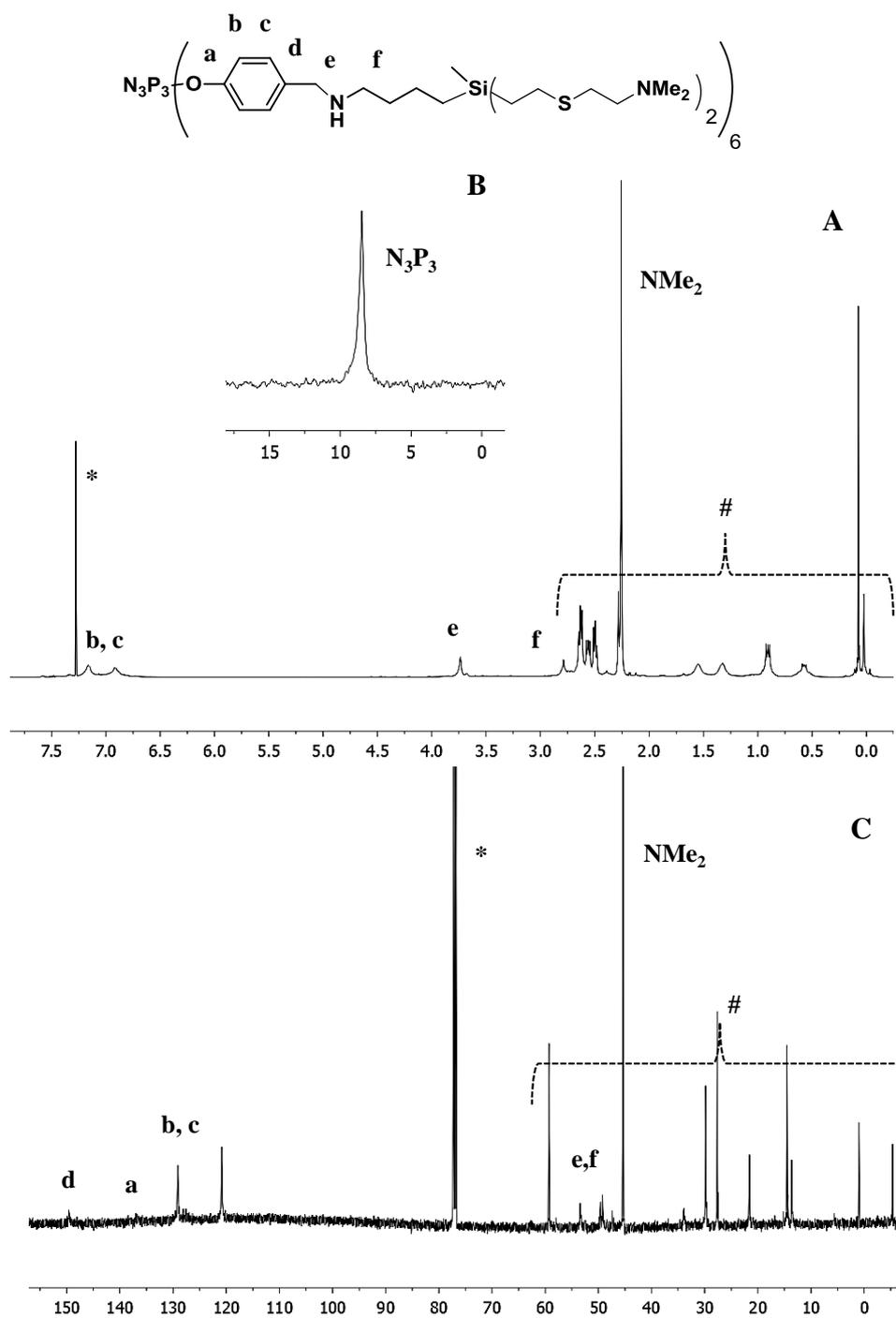


**Figura 3.21** Espectros de A) RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y B) RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto  $\text{G}_0\text{DBP}(\text{CH}=\text{N})\text{G}_1\text{CBS}(\text{SiNMe}_2)_{12}$  (**35**). #Esqueleto CBS y  $^*\text{CDCl}_3$ .

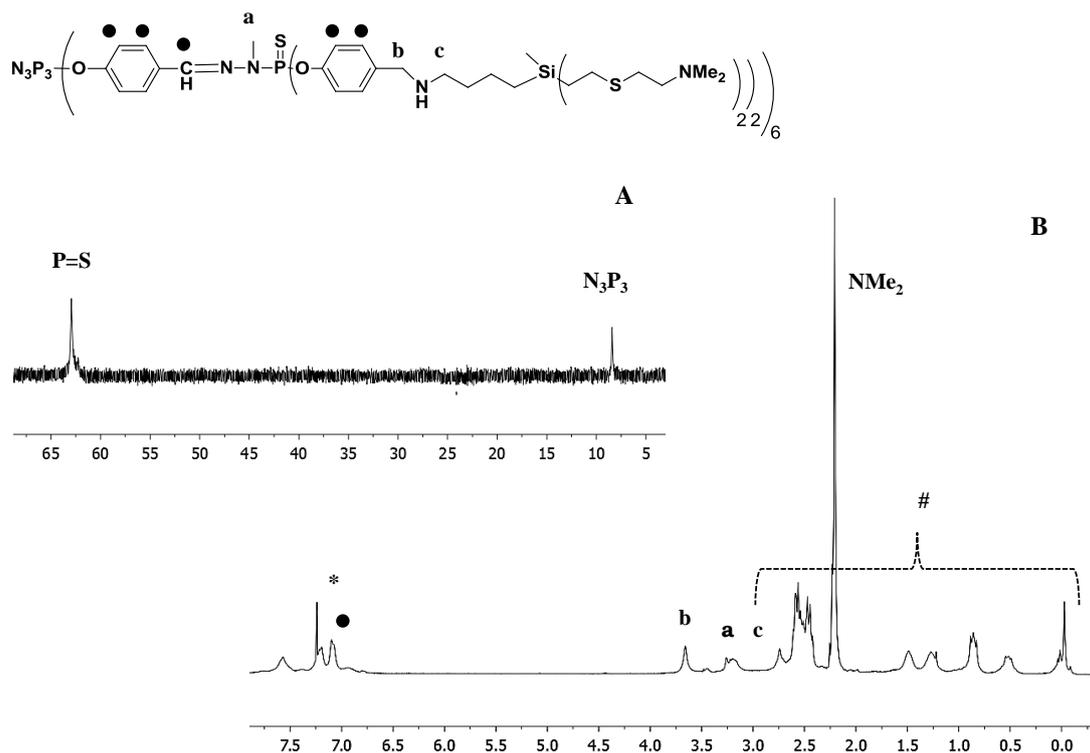
Los derivados estables **38-41** se han caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  así como por análisis elemental.

Los espectros de RMN correspondientes a estos sistemas se realizaron en  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. En ellos, el dato más característico es la reducción del enlace imina para dar lugar a un fragmento amino. Esto se puede confirmar en todos los casos por la presencia de resonancias en torno a 2.74 y 3.70 ppm y a 49.1 y 49.3 ppm, señales correspondientes a los grupos metileno unidos al átomo de nitrógeno en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ , respectivamente. En el espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  no se observa ninguna diferencia significativa en su desplazamiento con los sistemas precursores (Figura 3.21).

Para el sistema con un bloque dendrítico basado en átomos de fósforo de mayor generación se observa el mismo perfil que en los anteriores, con una zona aromática más compleja (Figura 3.22).



**Figura 3.22** Espectros de A) RMN de  $^1H$  y B) RMN de  $^{31}P$   $\{^1H\}$  y C)  $^{13}C$   $\{^1H\}$  del compuesto  $G_0DBP(CH_2-NH)G_1CBS(SNMe_2)_{12}$  (**38**). #Esqueleto CBS y \*CDCl<sub>3</sub>.



**Figura 3.23** Espectros de A) RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y B) RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto  $\text{G}_{1c}\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH})\text{G}_1\text{CBS}(\text{SNMe}_2)_{24}$  (**41**). #Esqueleto CBS y \* $\text{CDCl}_3$ .

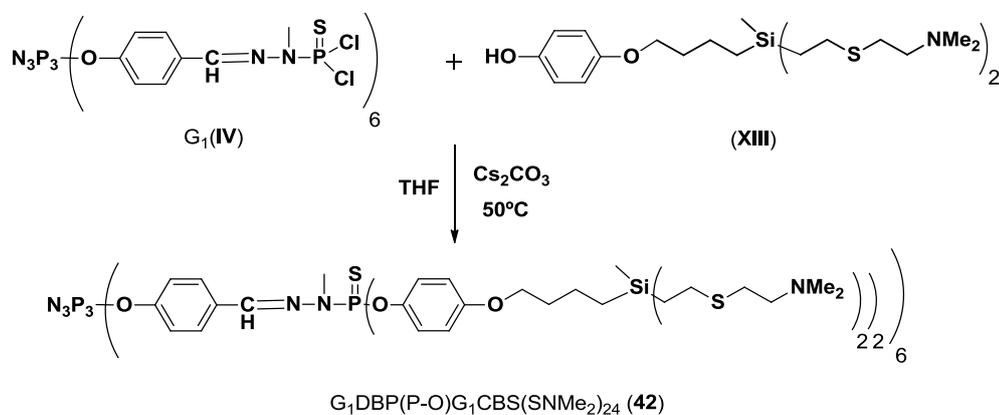
Todos los espectros son muy similares, diferenciándose en la parte periférica de la cuña carbosilano, dónde las señales más características ya se han comentado en la Tabla 3.1.

### 3.3.1.2 Reacción de sustitución

#### Procedimiento sintético

Sobre una disolución en THF seco del dendrímero  $\text{G}_1$  (**IV**) en presencia de  $\text{CsCO}_3$  se añade otra disolución del dendrón (**XIII**) a  $0^\circ\text{C}$ . Una vez completada la adición, la mezcla se deja bajo agitación constante a  $50^\circ\text{C}$  durante una noche.<sup>38</sup> La reacción se siguió por espectroscopia de RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  mediante el desplazamiento de la señal correspondiente al átomo de fósforo que sufre la sustitución de 62.60 a 64.79 ppm. En el espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  se observa perfectamente la disustitución, distinguiéndose de la monosustitución (ver apartado de caracterización). Una vez finalizada la reacción, se centrifuga la

muestra para eliminar el exceso de  $\text{CsCO}_3$ , y posteriormente se purifica mediante cromatografía por exclusión de tamaños en THF, obteniéndose el dendrímero  $\text{G}_1\text{DBP}(\text{P}-\text{O})\text{G}_1\text{CBS}(\text{SNMe}_2)_{24}$  (**42**) como un aceite marrón (Esquema 3.16).



Esquema 3.16 Síntesis del dendrímero **42** mediante una reacción de sustitución.

### Caracterización estructural

El dendrímero **42** ha caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente, así como por análisis elemental.

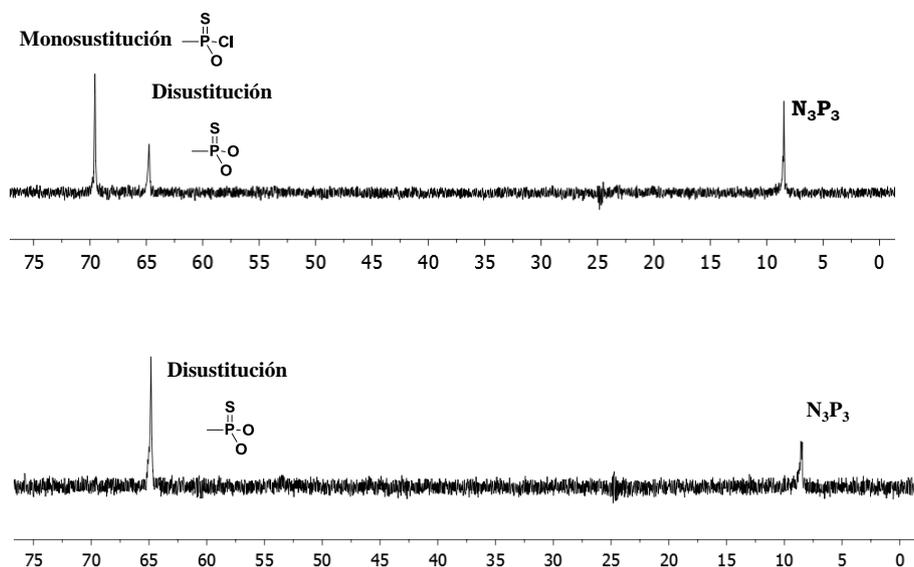
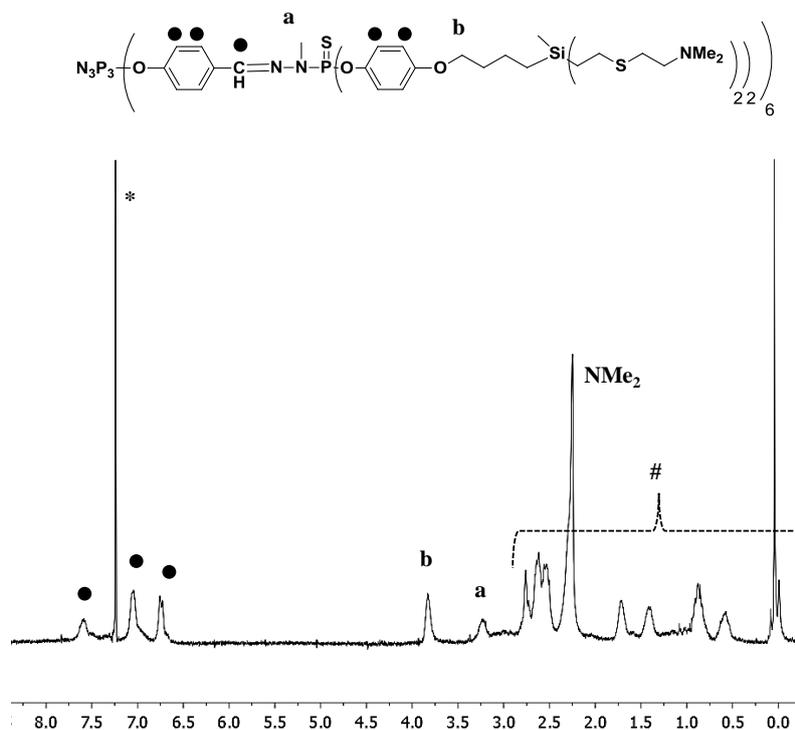


Figura 3.24 Progresión de la reacción hacia el compuesto disustituido  $\text{G}_1\text{DBP}(\text{P}-\text{O})\text{G}_1\text{CBS}(\text{SNMe}_2)_{24}$  (**42**) mediante espectrometría de RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$ .

Como ya se ha descrito anteriormente la formación de este producto se sigue por espectroscopia de RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$ , mediante el desplazamiento de la señal correspondiente al átomo de fósforo que es disustituido a 64.79 ppm. En la Figura 3.24 se puede observar el progreso de la reacción, observándose el pico correspondiente a la monosustitución a 69.56 ppm.



**Figura 3.25** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto  $\text{G}_1\text{DBP}(\text{P}-\text{O})\text{G}_1\text{CBS}(\text{SNMe}_2)_{24}$  (42). #Esqueleto CBS y \* $\text{CDCl}_3$ .

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observan ambos esqueletos, por un lado el esqueleto carbosilano y por otro toda la parte aromática correspondiente al dendrímero basado en átomos de fósforo. Pero no hay ninguna señal característica que indique la unión de ambos fragmentos (Figura 3.25).

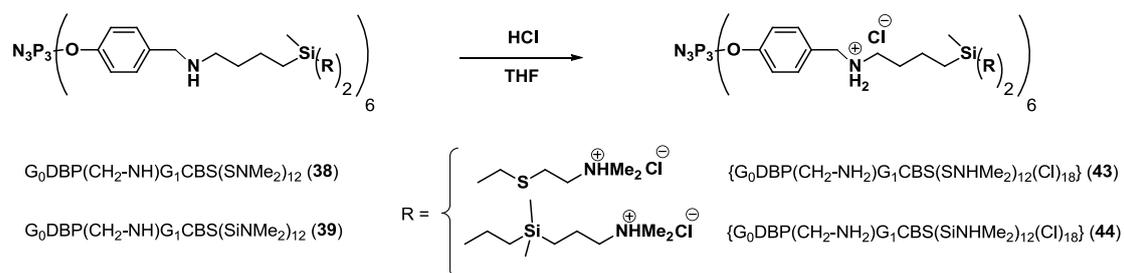
### 3.3.2 Síntesis y caracterización de los dendrímeros esféricos catiónicos

Para obtener los dendrímeros catiónicos y solubles en agua deseados, se procedió a la cuaternización de los grupos amino que presentan en su esqueleto dendrítico.

En el caso de los dendrímeros sintetizados mediante la reacción de condensación y reducción, éstos presentan grupos amino periféricos (-NMe<sub>2</sub>) y grupos amino interiores (-NH-) susceptibles también de ser cuaternizados. La cuaternización con MeI genera sistemas catiónicos no dependientes del pH. Sin embargo, la presencia de aminas secundarias en el interior impide su utilización, ya que da lugar a una mezcla de compuestos debido a la tendencia de este agente a intercambiar protones por grupos metilo. Por este motivo, todos los dendrímeros preparados se cuaternizaron con HCl, haciéndolos sistemas dependientes del pH.

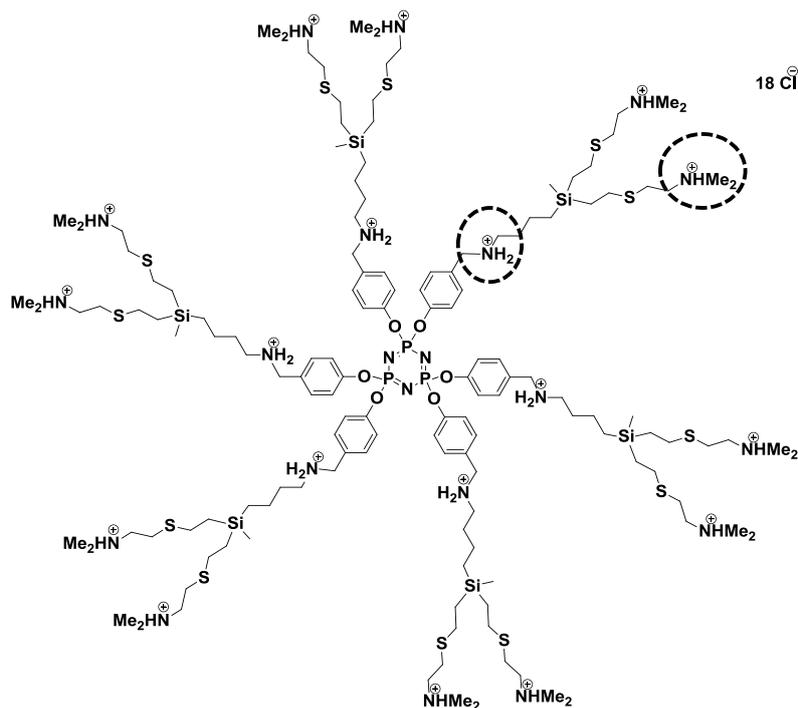
### Procedimiento sintético

Sobre una disolución en THF de los dendrímeros terminados en -NMe<sub>2</sub> (**38** y **39**) se añade a temperatura ambiente y con agitación constante un exceso de cloruro de hidrógeno, manteniendo la agitación durante 2 horas. La reacción es seguida por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H por la desaparición de la señal característica de los grupos metilo en torno a 2.25 ppm y la aparición de una nueva señal en torno a 2.85 ppm para el sistema cuaternizado. Se evaporan los volátiles y el precipitado se lava varias veces con hexano, obteniéndose los dendrímeros deseados {G<sub>0</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)G<sub>1</sub>CBS(R)<sub>12</sub>(Cl)<sub>18</sub>} (R=SNHMe<sub>2</sub> (**43**) y SiNHMe<sub>2</sub> (**44**)) como sólidos amarillos (Esquema 3.17).



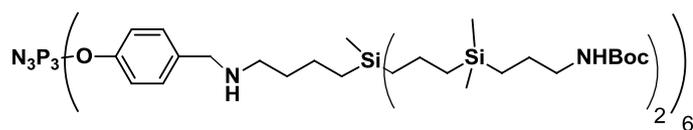
**Esquema 3.17** Síntesis de los dendrímeros híbridos catiónicos **43** y **44**.

Estos sistemas presentan cargas positivas en las ramas y en la periferia, lo que les hace moléculas interesantes para estudiar la influencia de estas cargas en el interior del esqueleto dendrítico y compararlo con otros sistemas (Figura 3.26).

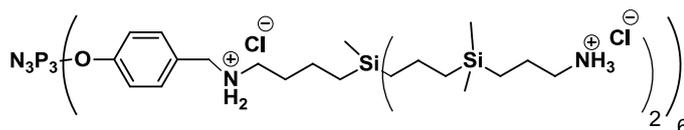
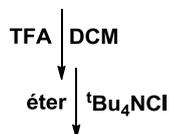


**Figura 3.26** Representación estructural del dendrímero híbrido catiónico  $\{G_0DBP(CH_2-NH_2)G_1CBS(SNHMe_2)_{12}(Cl)_{18}\}$  (**43**).

En el caso del dendrímero **40** cuyos grupos amino periféricos se encuentran protegidos, para obtener el dendrímero catiónico se sigue el mismo protocolo sintético que para los sistemas **26** y **27**. En primer lugar, se desprotegen los grupos  $-NHBoc$  con TFA, para a continuación añadir  $tBu_4NCl$  asegurando así tener cloruros como contraiones. De esta forma, se obtiene el sistema  $\{G_0DBP(CH_2-NH_2)G_1CBS(SiNH_3)_{12}(Cl)_{18}\}$  (**45**) como un sólido blanco (Esquema 3.18).



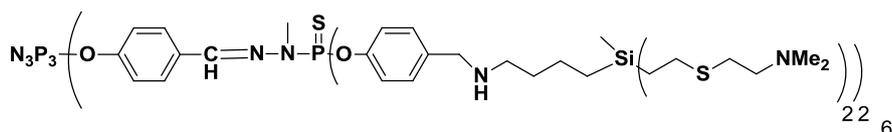
$G_0\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH})G_1\text{CBS}(\text{SiNH}\text{Boc})_{12}$  (**40**)



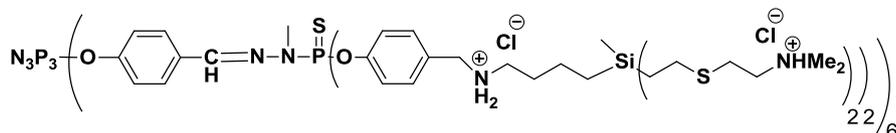
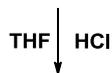
$\{G_0\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH}_2)G_1\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_{12}(\text{Cl})_{18}\}$  (**45**)

**Esquema 3.18** Síntesis del dendrímero híbrido catiónico **45**.

Para el dendrímero de una generación mayor de átomos de fósforo **41** se realiza la misma reacción que para los sistemas **38** y **39**. De esta forma se obtiene el dendrímero  $\{G_{1c}\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH}_2)G_1\text{CBS}(\text{SNMe}_2)_{24}(\text{Cl})_{36}\}$  (**46**) como un sólido amarillo (Esquema 3.19). Este sistema de nuevo presenta un alto número de cargas periféricas e internas (Figura 3.27).

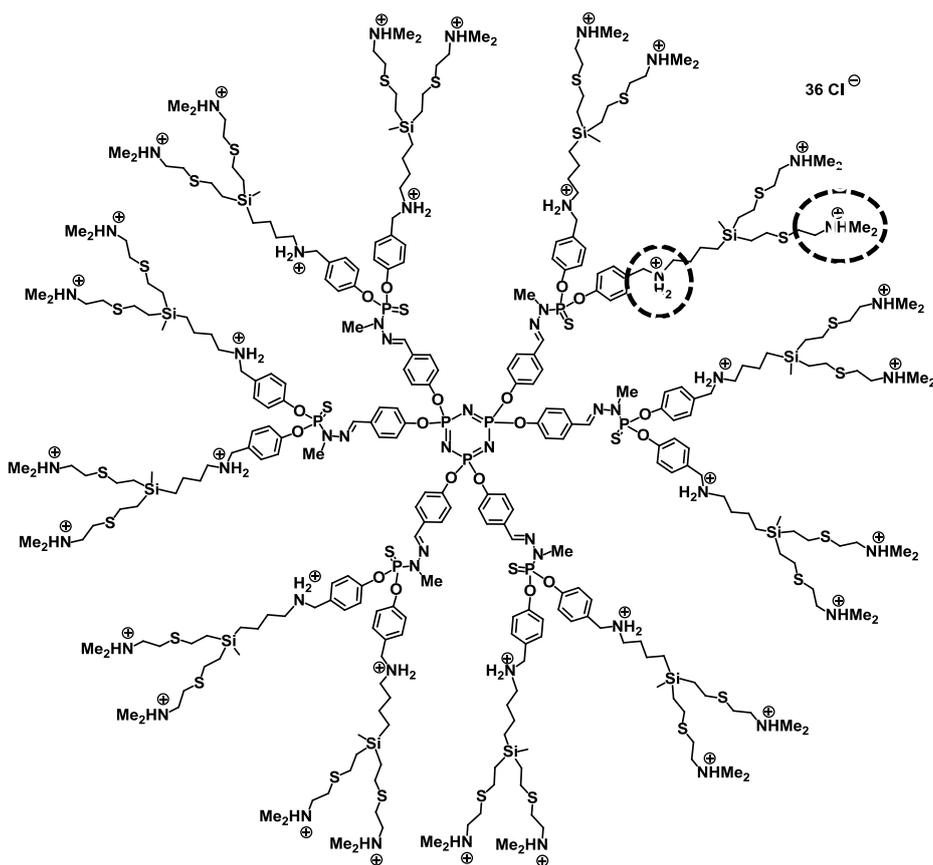


$G_{1c}\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH})G_1\text{CBS}(\text{SNMe}_2)_{24}$  (**41**)



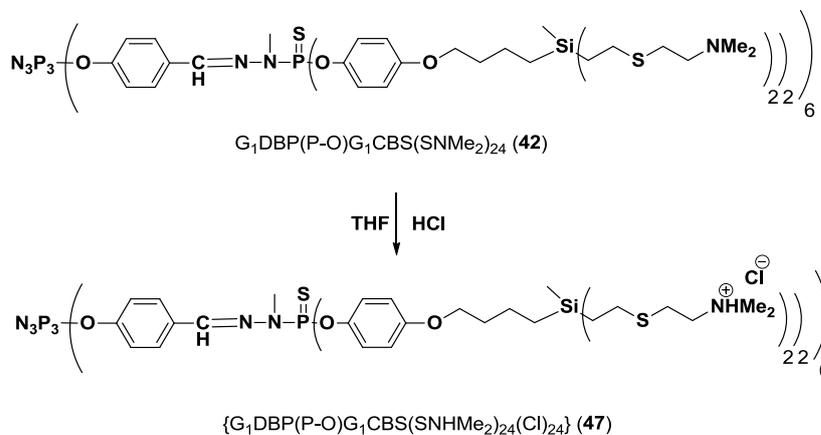
$\{G_{1c}\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH}_2)G_1\text{CBS}(\text{SNHMe}_2)_{24}(\text{Cl})_{36}\}$  (**46**)

**Esquema 3.19** Síntesis del dendrímero híbrido catiónico **46**.

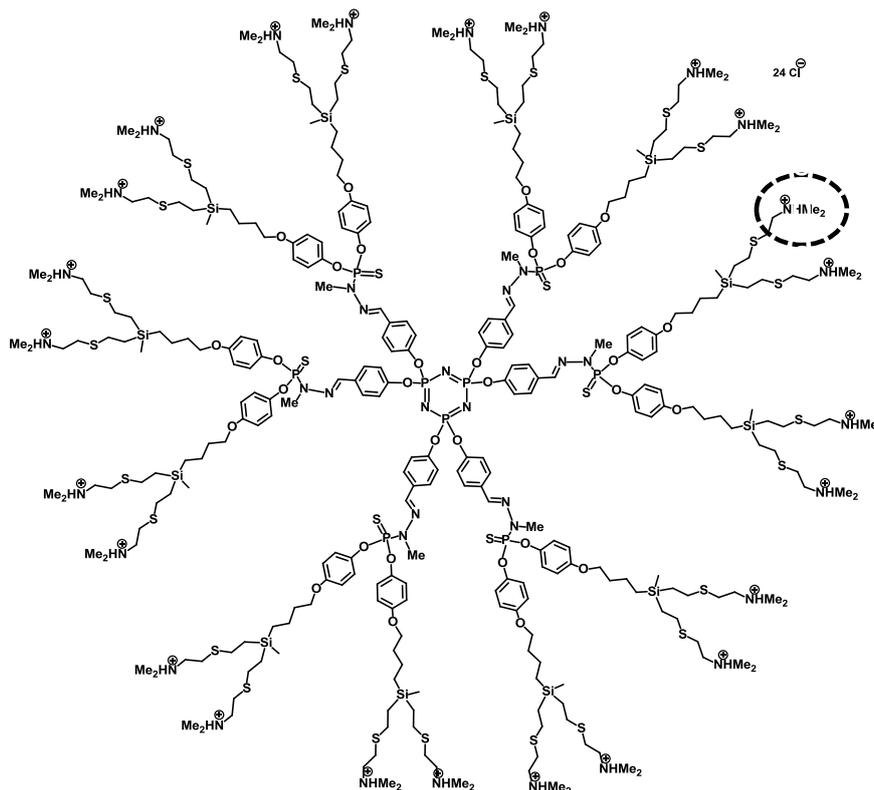


**Figura 3.27** Representación estructural del dendrímico híbrido catiónico  $\{G_{1c}DBP(CH-NH_2)G_1CBS(SNHMe_2)_{24}(Cl)_{36}\}$  (**46**).

Por último, la cuaternización del sistema **42** procedente de la reacción de sustitución, se realizó en las mismas condiciones que las anteriores, obteniéndose el dendrímico  $\{G_1DBP(P-O)G_1CBS(SNMe_2)_{24}(Cl)_{24}\}$  (**47**) como un sólido amarillo (Esquema 3.20 y Figura 3.28).

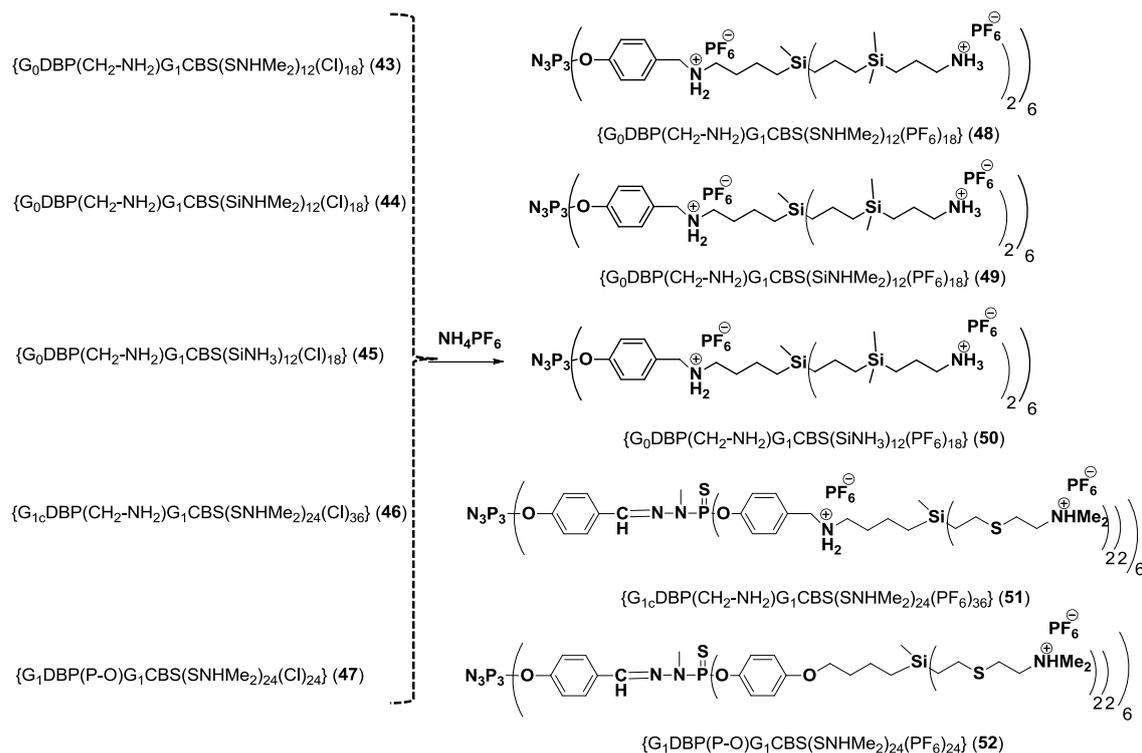


**Esquema 3.20** Síntesis del dendrímico híbrido catiónico **47**.



**Figura 3.28** Representación estructural del dendrímico catiónico  $\{G_1DBP(P-O)G_1CBS(SHNMe_2)_{24}(Cl)_{24}\}$  (47).

Todos los dendrímicos presentan buenas solubilidades en agua, pero se agregan con cierta facilidad, por lo que se almacenan en disolución para evitar este proceso irreversible. Estos sistemas son los que se utilizarán en las diferentes aplicaciones biomédicas presentadas en el capítulo 5. Sin embargo, su completa caracterización de estos derivados es complicada, ya que ofrecen señales muy anchas. Por ello, se prepararon los dendrímicos análogos cambiando el contraión  $Cl^-$  por  $PF_6^-$ , haciendo a estos sistemas solubles en disolventes orgánicos y facilitando considerablemente su caracterización. Para ello, todos los dendrímicos se solubilizan en agua y se añade lentamente una disolución saturada de  $NH_4PF_6$ , produciéndose la precipitación del sistema. Se lavan varias veces con agua y se obtienen los derivados deseados **48-52** solubles en disolventes orgánicos (Esquema 3.21).



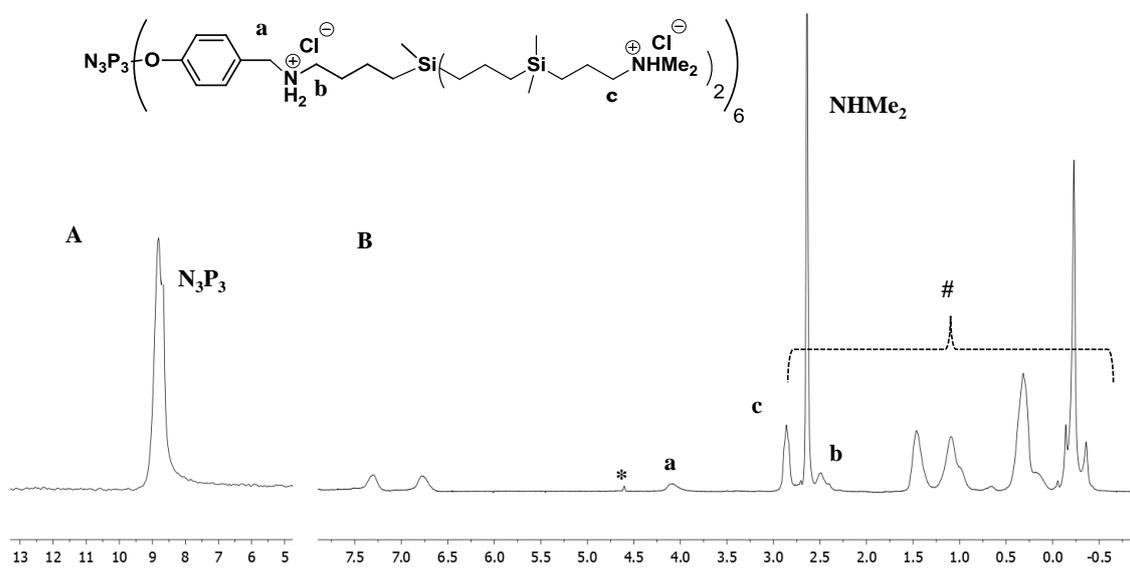
**Esquema 3.21** Síntesis de los dendrimeros catiónicos (48-52) solubles en disolventes orgánicos conteniendo el contraión  $\text{PF}_6^-$ .

### Caracterización estructural

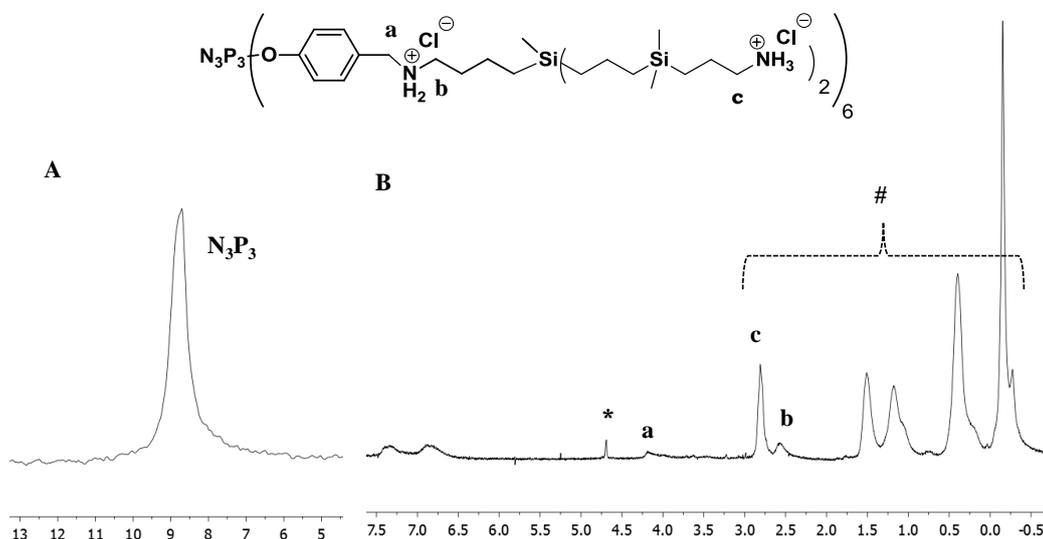
Los sistemas obtenidos **43-47** se han caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{31}\text{P}$  utilizándose  $\text{D}_2\text{O}$  como disolvente, así como por análisis elemental. Como se observa a continuación, los espectros registrados presentan señales muy ensanchadas, por lo que sólo se comentarán las señales más características.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de los sistemas **43**, **44** y **46** el hecho más característico es el desplazamiento de las señales correspondientes al fragmento  $\text{-CH}_2\text{NMe}_2\cdot\text{HCl}$  a frecuencias más altas. En los dendrimeros **43** y **46** que presentan el dendrón carbosilano sintetizado vía tiol-eno, este nuevo fragmento se observa en torno a 3.18 ppm para el grupo metileno unido al átomo de nitrógeno y a 2.81 ppm para los grupos metilo. En el caso del dendrimer **44**, donde la cuña se sintetizó vía hidrosililación, este mismo fragmento se observa a 3.00 ppm para grupo metileno y a 2.63 ppm para los grupos metilo (Figura 3.31).

Para el sistema **45** se observa a 2.86 ppm la señal correspondiente al grupo metileno del fragmento  $-\text{CH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$  (Figura 3.29).



**Figura 3.29** Espectros de A) RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y B) RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto  $\{\text{G}_0\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH}_2)\text{G}_1\text{CBS}(\text{SiNHMe}_2)_{12}(\text{Cl})_{18}\}$  (**43**). #Esqueleto CBS y \* $\text{D}_2\text{O}$ .



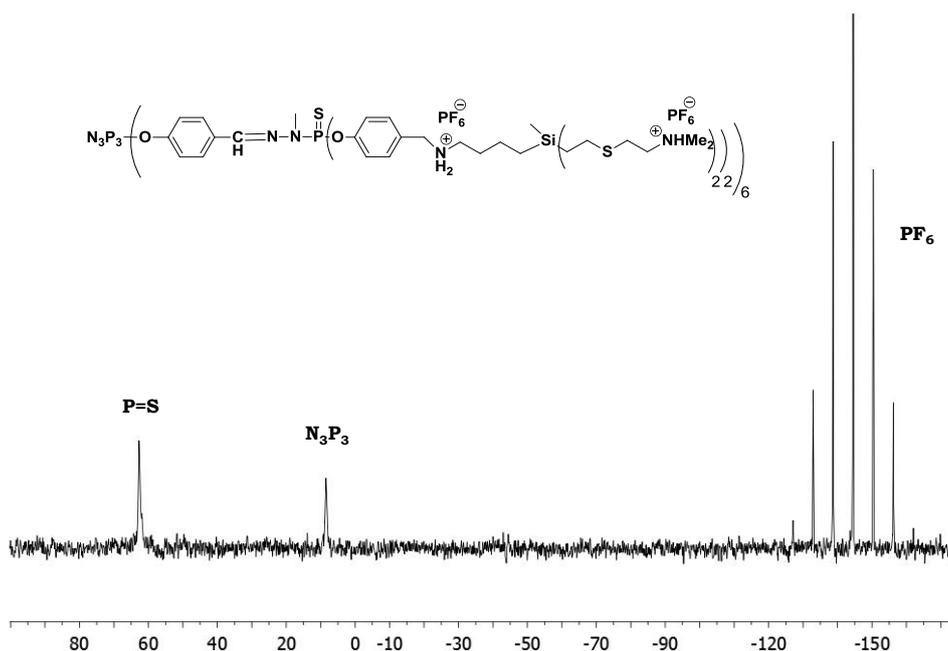
**Figura 3.30** Espectros de A) RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y B) RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto  $\{\text{G}_0\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH}_2)\text{G}_1\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_{12}(\text{Cl})_{18}\}$  (**45**). #Esqueleto CBS y \* $\text{D}_2\text{O}$ .

Otra característica importante de estos sistemas, es la detección de la protonación de los grupos amino internos, lo que se observa en el desplazamiento

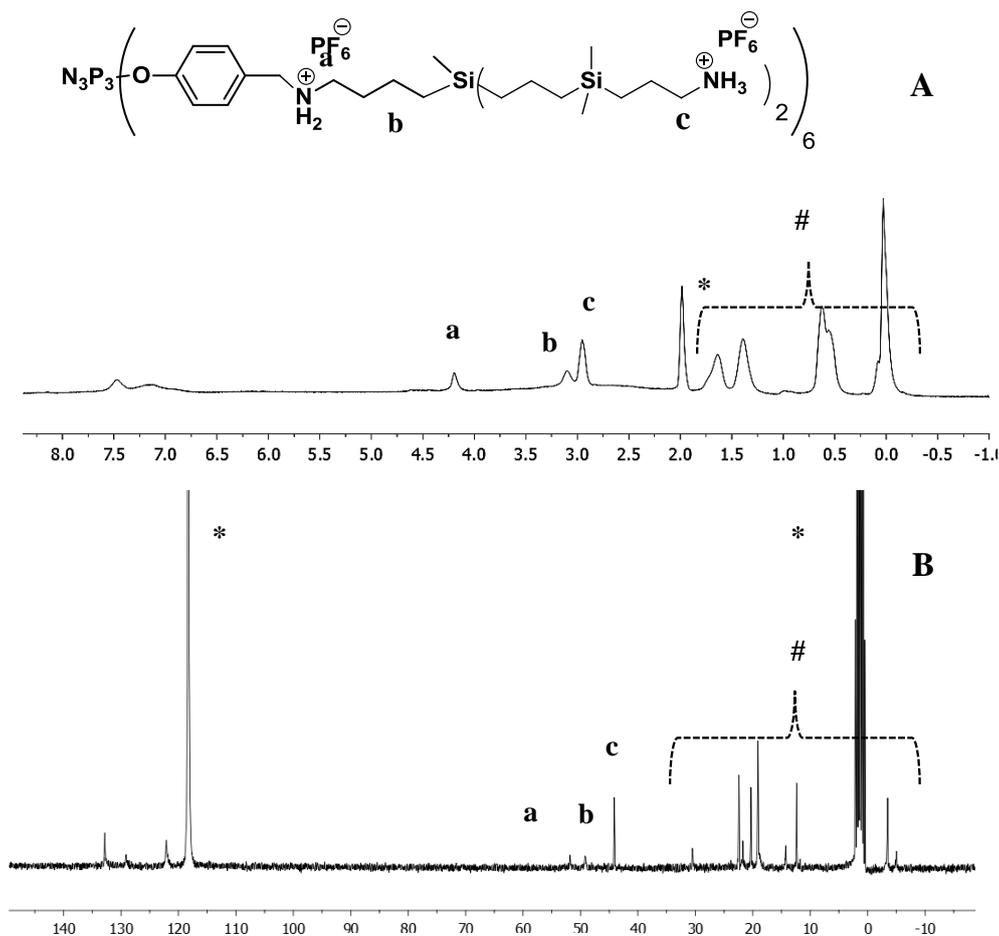
de las señales desapantalladas de los grupos metileno situados a ambos lados de dicho grupo amonio. Así, se observan dos señales anchas a 2.6 y a 4.2 ppm indicativas de que los grupos amino internos se encuentran protonados.

Los sistemas obtenidos **48-52** se han caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  utilizando  $\text{CD}_3\text{CN}$  como disolvente. El cambio de contraíón permitió una caracterización completa.

En el espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  de todos los dendrimeros no se observan variaciones de los desplazamientos con respecto a los sistemas catiónicos con cloruros como contraíones, pero se mejora considerablemente la definición de los espectros (Figura 3.31).



**Figura 3.31** Espectros de RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  en  $\text{CD}_3\text{CN}$  del compuesto  $\{\text{G}_{1c}\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH}_2)\text{G}_1\text{CBS}(\text{SNMe}_2)_{24}(\text{PF}_6)_{36}\}$  (**51**).



**Figura 3.32** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto  $\{\text{G}_0\text{DBP}(\text{CH}_2\text{-NH}_2)\text{G}_1\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_{12}(\text{PF}_6)_{18}\}$  (**50**). #Esqueleto CBS y \* $\text{CD}_3\text{CN}$ .

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  se detectan las señales correspondientes a los grupos metileno unidos directamente al átomo de nitrógeno de los grupos amonio internos, que confirman su cuaternización. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para los sistemas sintetizados por vía tiol-eno se observan a 3.60 ppm el grupo metileno unido a la cuña carbosilano y a 4.20 ppm el fragmento metileno unido al anillo aromático, mientras que por hidrosililación se observan a 3.1 y 4.1 ppm, respectivamente. En el espectro de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  no existen diferencias entre ambas metodologías, apareciendo dichas resonancias a 49.1 y 51.8 ppm, respectivamente (Figura 3.32).

Al igual que en los sistemas neutros todos los espectros son muy similares exceptuando la periferia. En la Tabla 3.2 se recogen las señales más características que diferencian a unos sistemas de otros.

**Tabla 3.2** Valores de RMN característicos de los grupos periféricos de los sistemas cuaternizados sintetizados (43-52).

Fragmento	Señal	RMN de $^1\text{H}$ (ppm) $\text{X} = \text{Cl}^- (\text{D}_2\text{O})$	RMN de $^1\text{H}$ (ppm) $\text{X} = \text{PF}_6^- (\text{CD}_3\text{CN})$	RMN de $^{13}\text{C}$ (ppm) $\text{X} = \text{PF}_6^- (\text{CD}_3\text{CN})$
	a	2.85	2.87	26.4
	b	3.26	3.10	57.5
	c	2.85	2.87	43.9
	a	0.47	0.47	11.5
	b	1.23	1.23	13-21.4
	c	3.0	3.0	56.1
	d	2.7	2.7	42.5
	a	0.47	0.52	11.4
	b	1.56	1.55-1.66	13-21.4
	c	2.86	2.94	44.1

Todos estos derivados catiónicos también se han caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^{29}\text{Si}$   $\{^1\text{H}\}$ . De nuevo la principal diferencia radica en el protocolo sintético: (i) vía hidrosililación, dónde se observan dos tipos de silicios o (ii) vía tior-eno, que se observa un solo tipo (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3** Señales características de los átomos de Si en espectroscopia de RMN de los sistemas sintetizados cuaternizados (43-52).

Fragmento	Señal	RMN de $^{29}\text{Si}$ $\{^1\text{H}\}$ (ppm)
	SiMe	3.0
	SiMe SiMe <sub>2</sub>	1.7 1.9
	SiMe SiMe <sub>2</sub>	1.8 2.1

### 3.4 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS HÍBRIDOS FÓSFORO-VIÓLOGENO-CARBOSILANO

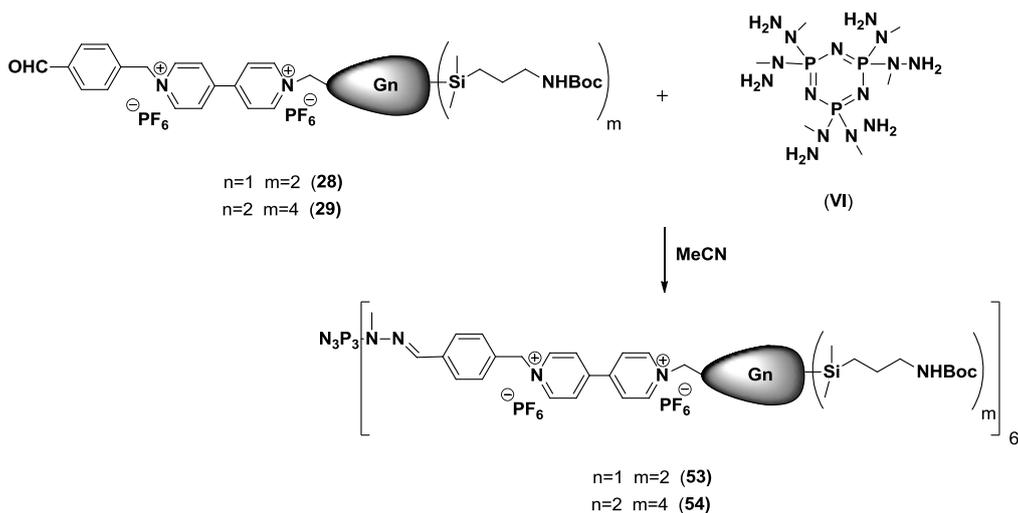
Recientemente, se han preparado dendrímeros híbridos viológeno-fósforo los cuales han presentado excelentes propiedades biomédicas y se han aplicado en diversos campos de la biomedicina.<sup>22,34</sup>

En este apartado se propone la combinación estructural de tres bloques de construcción: la lipofilia de la estructura carbosilano en el exterior, la polaridad impuesta por los monómeros viológeno en las ramas y la multifuncionalidad del núcleo basado en átomos de fósforo, junto con sus potenciales usos biológicos individualmente descritos con anterioridad.<sup>37,39-41</sup>

#### 3.4.1 Síntesis y caracterización de dendrímeros esféricos con grupos amino periféricos protegidos

##### Procedimiento sintético

La reacción de condensación se lleva a cabo entre el núcleo hexafuncional  $[N_3P_3(NMeNH_2)_6]$  (**VI**) y los dendrones con un grupo aldehído en el punto focal (**28** y **29**) preparados en el apartado anterior. Dicha reacción se realiza en acetonitrilo a temperatura ambiente durante una noche. La reacción es seguida por espectroscopia de RMN de  $^{31}P$   $\{^1H\}$ , donde se observa el desplazamiento del núcleo de fósforo a 17.14 ppm, obteniéndose un solo pico para el núcleo, lo que indica una completa sustitución. En el espectro de RMN de  $^1H$  también se observa la desaparición del protón correspondiente al grupo CHO. Una vez completada la reacción, se elimina el disolvente a vacío, obteniéndose los dendrímeros  $[N_3P_3[(Viológeno)G_nCBS(SiNHBoc)_m]_6(PF_6)_{12}]$  ( $n=1, m=2$  (**53**);  $n=2, m=4$  (**54**)) como sólidos amarillentos con rendimientos cuantitativos (Esquema 3.22).



### Esquema 3.22 Síntesis de los dendrimeros híbridos neutros **53** y **54**.

#### Caracterización estructural

Los sistemas obtenidos **53** y **54** se han caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  utilizando  $\text{CD}_3\text{CN}$  como disolvente, así como por análisis elemental.

En el espectro de  $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$  se observa para ambas generaciones un solo pico a 17.14 ppm correspondiente a la sustitución total del núcleo de fósforo y un heptuplete a -144.62 ppm correspondiente al átomo de fósforo perteneciente al contraion  $\text{PF}_6^-$  (Figura 3.33).

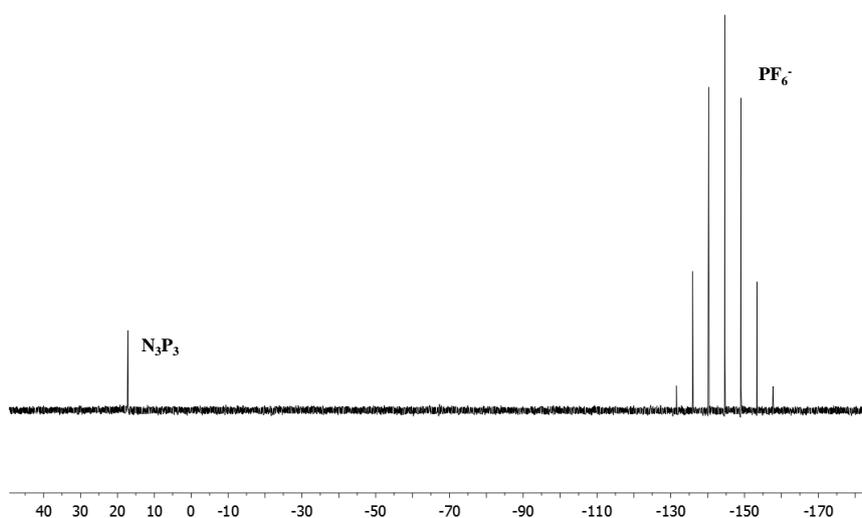
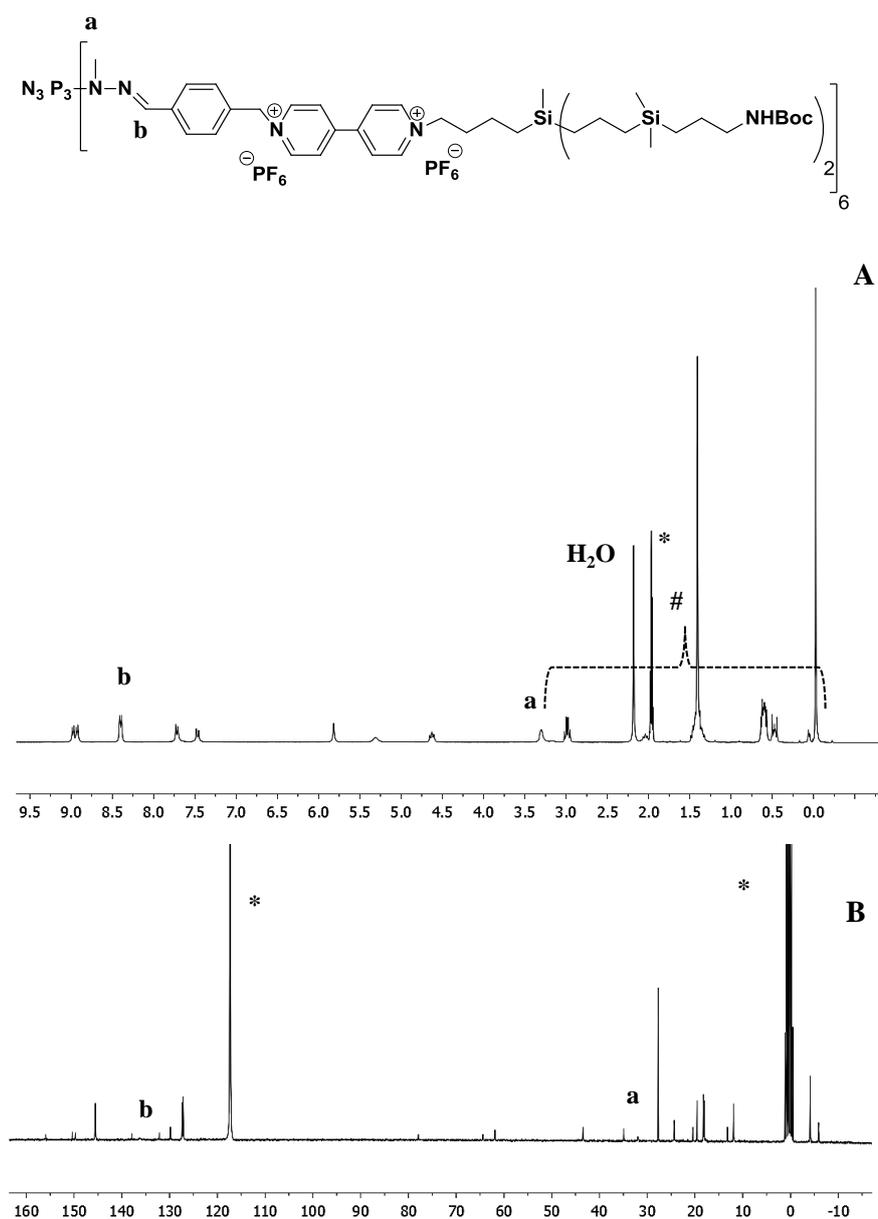


Figura 3.33 Espectro de RMN de  $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$  del compuesto **54** en  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

El hecho más característico es la desaparición del grupo aldehído y la formación de un grupo imina. El protón correspondiente al enlace imina se puede observar a 7.72 ppm y a 136.3 ppm en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ , respectivamente. También, la incorporación del núcleo basada en átomos de fósforo es confirmada por la señal correspondiente al grupo metilo de la diamina que aparece a 3.30 y 31.9 ppm en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ , respectivamente (Figura 3.34).



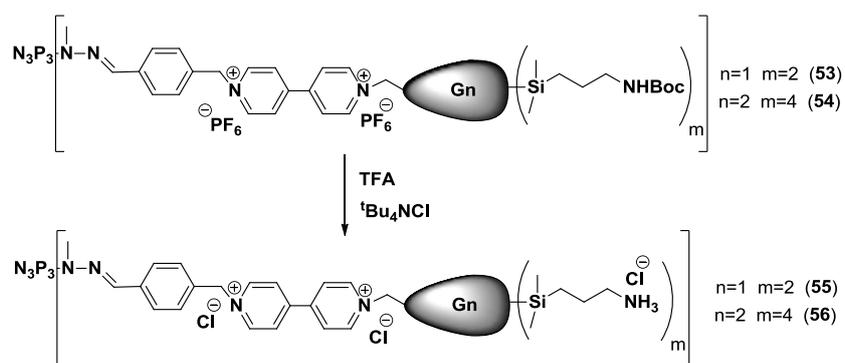
**Figura 3.34** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto **53**.

#Esqueleto CBS y \*CD<sub>3</sub>CN.

### 3.4.2 Síntesis y caracterización de los dendrimeros esféricos catiónicos

#### Procedimiento sintético

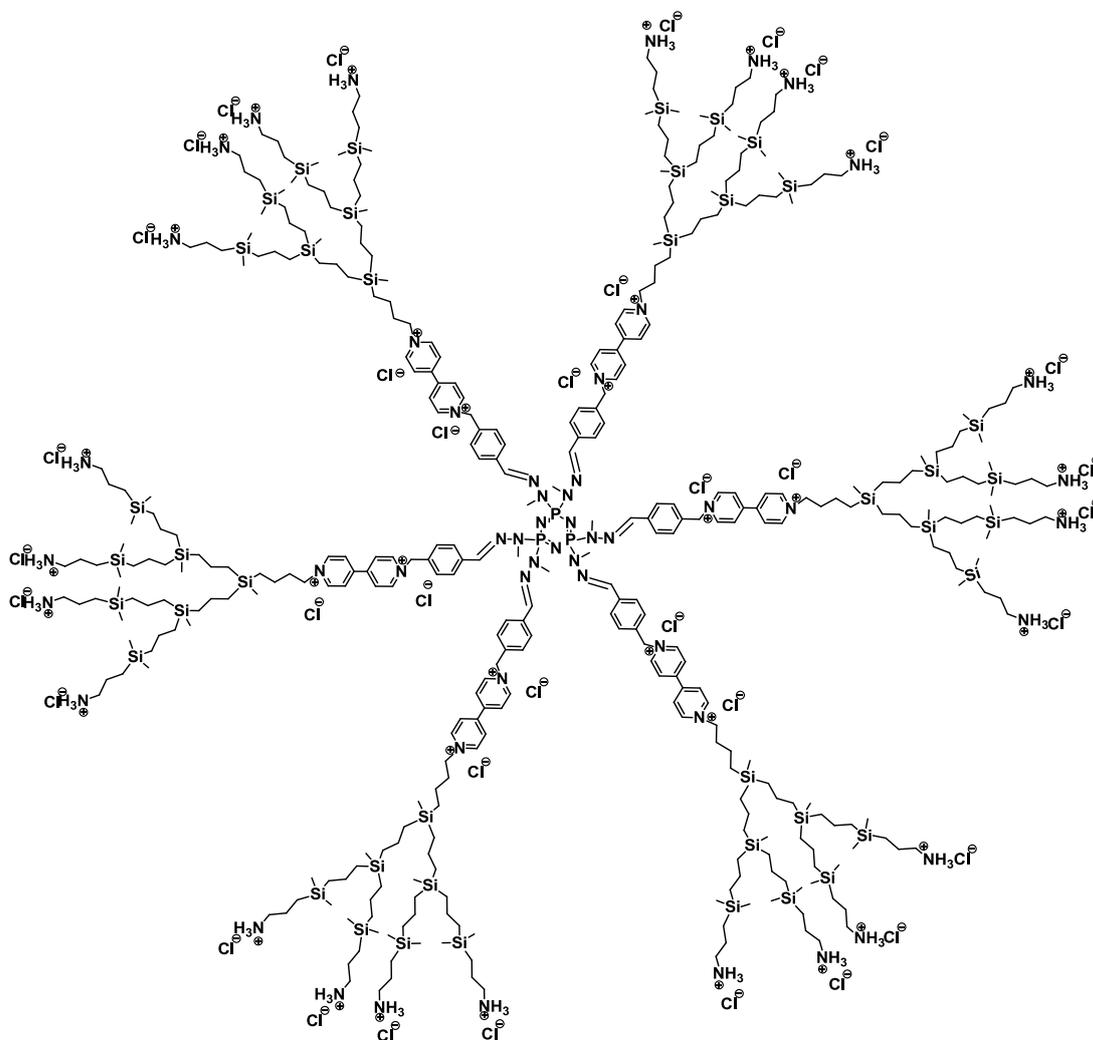
Una vez obtenidos los sistemas anteriores, el siguiente paso es la desprotección de los grupos periféricos para obtener los sistemas catiónicos deseados. En la bibliografía científica se puede encontrar la desprotección del grupo -NHBoc en multitud de condiciones. Sin embargo, la más utilizada es la desprotección con TFA a temperatura ambiente, debido a que es más rápida y menos agresiva. En trabajos anteriores realizados por el grupo de Majoral se ha visto que grandes excesos de TFA pueden atacar al núcleo de fósforo produciendo su degradación, por lo que la desprotección se realiza en varios ciclos de tiempos cortos.<sup>38</sup>



**Esquema 3.23** Síntesis de los dendrimeros híbridos catiónicos con cloruros como contraiones.

En este caso se utilizó un exceso de TFA, y no se observó la degradación del núcleo, pero sí la reacción de TFA con el contraión  $PF_6^-$ , impurificando el producto (detectado por  $^{31}P$  y  $^{19}F$ ). Para evitar esta contaminación se procedió a un cambio de contraión, lo que permite un cambio de solubilidad y por consiguiente la purificación del sistema deseado. Para ello, se evaporó el crudo de la desprotección y se disolvió en acetonitrilo y se añadió una disolución acuosa saturada de  $tBu_4NCl$ , observándose la precipitación del sistema. Una vez completada la precipitación se filtra y se lava varias veces con acetonitrilo. De esta manera se obtienen los sistemas desprotegidos con aniones cloruro como contraiones  $[ \{ N_3P_3[(Viológeno)G_nCBS(SiNH_3)_m]_6 \} (Cl)_{12+6m} ]$  ( $n=1, m=2$  (55);

$n=2$ ,  $m=4$  (**56**)) como sólidos amarillos y solubles en disolventes polares como MeOH, H<sub>2</sub>O o DMSO (Esquema 3.23). Es importante eliminar todo el TFA, ya que el enlace N(Me)=CH es relativamente susceptible a medios muy ácidos y podría degradarse. La purificación se comprueba por RMN de <sup>19</sup>F

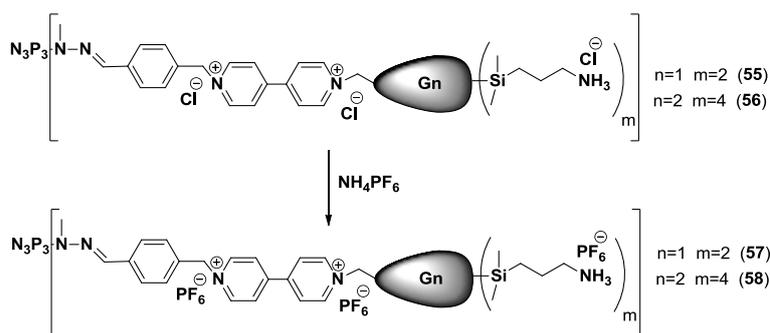


**Figura 3.35** Representación estructural del dendrímoro  
 $[\{N_3P_3[(\text{Viológeno})G_2\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_4]_6\}(\text{Cl})_{36}]$  (**56**).

Estos sistemas tienen una gran tendencia a agregarse, por lo que se recomienda almacenarlos en disolución. Estos derivados son los adecuados para ser testados en las diferentes aplicaciones biomédicas ya que son perfectamente solubles en agua (Figura 3.35). Sin embargo su completa caracterización es complicada, por lo que se procedió de nuevo a un intercambio de contraión, que

permite completar su caracterización con mayor calidad espectral (Esquema 3.24).

Para ello, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para otros sistemas, por adición de una disolución saturada de  $\text{NH}_4\text{PF}_6$ , obteniéndose de esta manera los sistemas  $[\{\text{N}_3\text{P}_3[(\text{Viológeno})\text{G}_n\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_m]_6\}(\text{PF}_6)_{12+6m}]$  ( $n=1, m=2$  (**57**);  $n=2, m=4$  (**58**)) como sólidos amarillos y solubles en disolventes orgánicos como THF o  $\text{CD}_3\text{CN}$ .

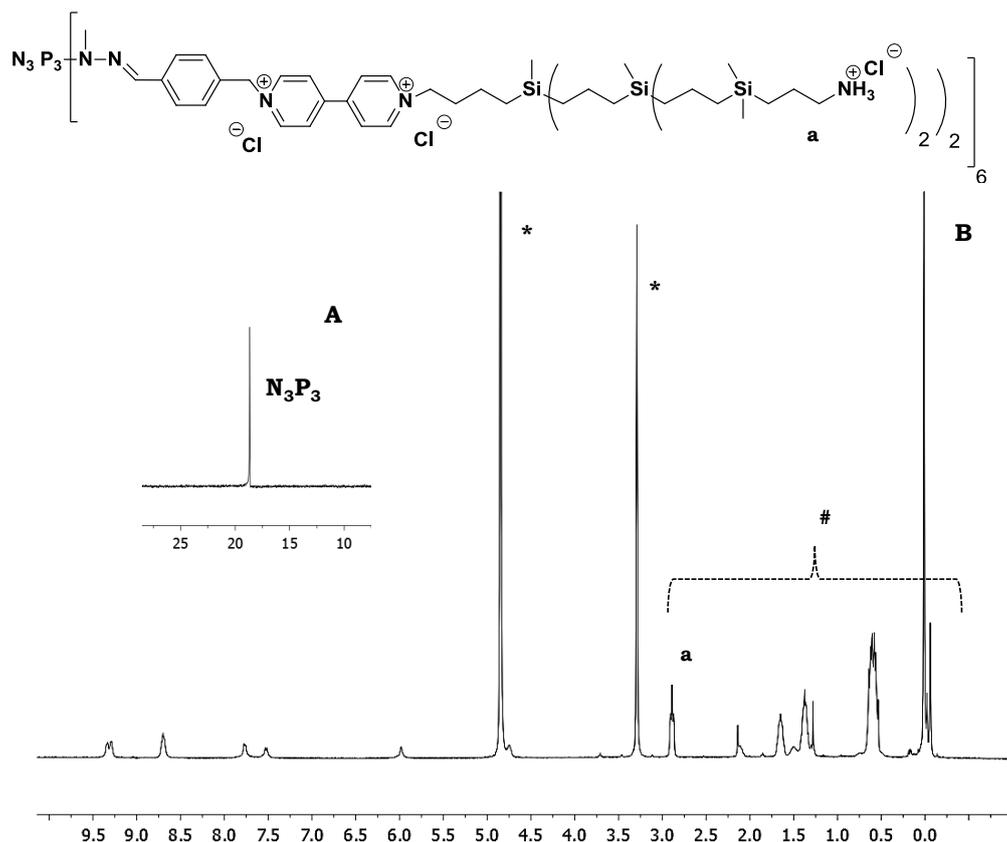


**Esquema 3.24** Cambio de contraión de los dendrimeros híbridos catiónicos.

### Caracterización estructural

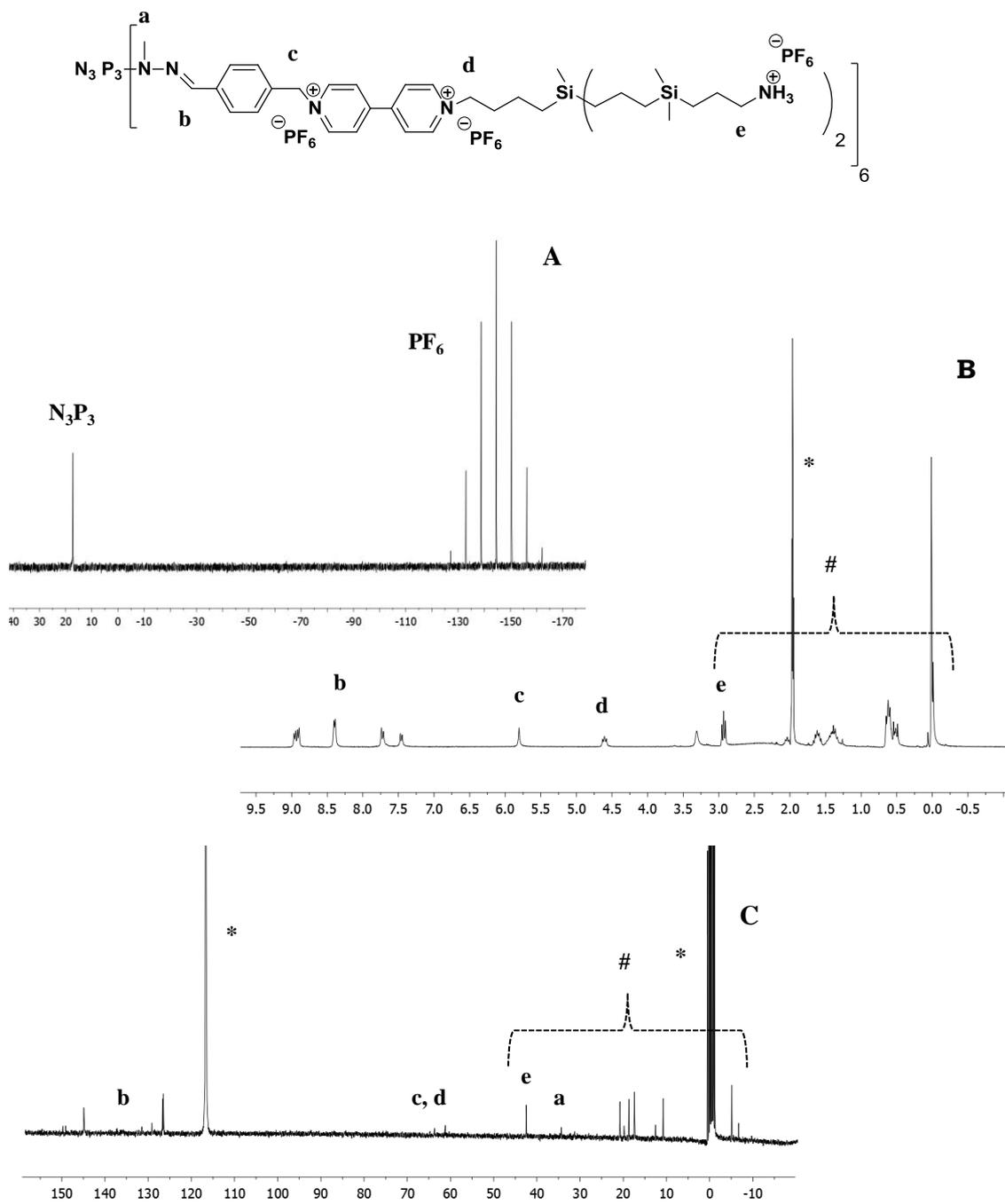
Los dendrimeros obtenidos **55** y **56** se han caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$  utilizando  $\text{CD}_3\text{OD}$  como disolvente, así como por análisis elemental.

En el espectro de RMN de  $^{31}\text{P} \{^1\text{H}\}$  en este caso ya sólo se observa la señal correspondiente al núcleo, que no sufre ningún desplazamiento. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observa la desprotección de los grupos  $\text{NH}_2\text{Boc}$  al desaparecer la señal a 1.41 ppm correspondiente a los grupos *tert*-butilo, y la aparición del triplete a 2.9 ppm correspondiente al grupo metileno unido directamente a los grupos amonio de la periferia (Figura 3.36).



**Figura 3.36** Espectros de A) RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y B) RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto  $[\{\text{N}_3\text{P}_3[(\text{Viológeno})\text{G}_2\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_4]_6\}(\text{Cl})_{36}]$  (**56**). #Esqueleto CBS y \* $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Los sistemas obtenidos **57** y **58** se han caracterizado por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$ . Debido al cambio de contraión cambia su solubilidad, y todos sus espectros fueron registrados en  $\text{CD}_3\text{CN}$  como disolvente (Figura 3.37). El perfil de los espectros recogidos para estos sistemas es similar al anterior, pero mejorando la calidad de resolución de los espectros. En el espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  se observa de nuevo el heptuplete correspondiente a la presencia del anión  $\text{PF}_6^-$ .



**Figura 3.37** Espectros de A) RMN de  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  y B) RMN de  $^1\text{H}$  y C) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto  $[\{N_3P_3[(\text{Viológeno})G_1\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_2]_6\}(\text{PF}_6)_{24}]$  (**57**). #Esqueleto CBS y \* $\text{CD}_3\text{CN}$ .

### 3.5 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Walter, M. V.; Malkoch, M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4593.
- (2) Enciso, A. E.; Ramírez-Crescencio, F.; Zeiser, M.; Redon, R.; Simanek, E. E. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 5219.
- (3) Kottari, N.; Chabre, Y. M.; Shiao, T. C.; Rej, R.; Roy, R. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1983.
- (4) Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4252.
- (5) Zeng, F.; Zimmerman, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5326.
- (6) Killops, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5062.
- (7) Wang, X.; Yang, Y.; Gao, P.; Li, D.; Yang, F.; Shen, H.; Guo, H.; Xu, F.; Wu, D. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 6126.
- (8) Sharma, R.; Zhang, I.; Abbassi, L.; Rej, R.; Maysinger, D.; Roy, R. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 1436.
- (9) Kottari, N.; Chabre, Y. M.; Shiao, T. C.; Rej, R.; Roy, R. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1983.
- (10) Sharma, R.; Kottari, N.; Chabre, Y. M.; Abbassi, L.; Shiao, T. C.; Roy, R. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13300.
- (11) Han, S.; Kanamoto, T.; Nakashima, H.; Yoshida, T. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 1061.
- (12) Roy, R.; Shiao, T. C.; Rittenhouse-Olson, K. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2013**, *49*, 85.
- (13) Abbassi, L.; Chabre, Y. M.; Kottari, N.; Arnold, A. A.; Andre, S.; Josserand, J.; Gabius, H. J.; Roy, R. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 7666.
- (14) Katir, N.; El Brahmi, N.; El Kadib, A.; Mignani, S.; Caminade, A. M.; Bousmina, M.; Majoral, J. P. *Chem. A. Eur. J.* **2015**, *21*, 6400.
- (15) Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 341.
- (16) Caminade, A. M.; Maraval, V.; Laurent, R.; Turrin, C. O.; Sutra, P.; Leclaire, J.; Griffe, L.; Marchand, P.; Baudoin-Dehoux, C.; Rebout, C.; Majoral, J. P. *C. R. Chim.* **2003**, *6*, 791.
- (17) Wasiak, T.; Marcinkowska, M.; Pieszynski, I.; Zablocka, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Klajnert-Maculewicz, B. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 4852.
- (18) Shcharbin, D.; Dzmitruk, V.; Shakhbazau, A.; Goncharova, N.; Seviaryn, I.; Kosmacheva, S.; Potapnev, M.; Pedziwiatr-Werbicka, E.; Bryszewska, M.; Talabaev, M.; Chernov, A.; Kulchitsky, V.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *Pharmaceutics* **2011**, *3*, 458.
- (19) Fuentes-Paniagua, E.; Hernández-Ros, J. M.; Sánchez-Milla, M.; Camero, M. A.; Maly, M.; Pérez-Serrano, J.; Copa-Patiño, J. L.; Sánchez-Nieves, J.; Soliveri, J.; Gómez, R.; de la Mata, F.J. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1256.
- (20) Perise-Barrios, A. J.; Jiménez, J. L.; Dominguez-Soto, A.; de la Mata, F. J.; Corbi, A. L.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Controlled Release* **2014**, *184*, 51.

- (21) Moran, J. M.; Ortiz-Ortiz, M. A.; Ruiz-Mesa, L. M.; Fuentes, J. M. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2010**, *24*, 402.
- (22) Lazniewska, J.; Milowska, K.; Katir, N.; Kadib, A.; Bryszewska, M.; Majoral, J. P.; Gabryelak, T. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2013**, *18*, 459.
- (23) Asaftei, S.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3480.
- (24) Asaftei, S.; Huskens, D.; Schols, D. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10405.
- (25) Launay, N.; Caminade, A.-M.; Majoral, J. P. *J. Organomet. Chem.* **1997**, *529*, 51.
- (26) Galliot, C.; Caminade, A. M.; Dahan, F.; Majoral, J. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *105*, 1508.
- (27) Maraval, V.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Blais, J. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 1822.
- (28) Van Heerbeek, R.; Reek, J. N. H.; Kamer, P. C. J.; Van Leeuwen, P. W. N. M. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7127.
- (29) Zhou, L. L.; Roovers, J. *Macromolecules* **1993**, *26*, 963.
- (30) Sánchez-Nieves, J.; Ortega, P.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9203.
- (31) Fuentes-Paniagua, E.; Pena-González, C. E.; Galán, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Sánchez-Nieves, J. *Organometallics* **2013**, *32*, 1789.
- (32) Lozano-Cruz, T.; Ortega, P.; Batanero, B.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 19294.
- (33) Sánchez-Nieves, J.; Fransen, P.; Pulido, D.; Lorente, R.; Muñoz-Fernández, M. A.; Albericio, F.; Royo, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 43.
- (34) Ciepluch, K.; Katir, N.; El Kadib, A.; Felczak, A.; Zawadzka, K.; Weber, M.; Klajnert, B.; Lisowska, K.; Caminade, A. M.; Bousmina, M.; Bryszewska, M.; Majoral, J. P. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 448.
- (35) Gonzalo, T.; Clemente, M. I.; Chonco, L.; Weber, N. D.; Diaz, L.; Serramia, M. J.; Gras, R.; Ortega, P.; de la Mata, F. J.; Gómez, R.; López-Fernández, L. A.; Muñoz-Fernández, M. A.; Jiménez, J. L. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 921.
- (36) Ferenc, M.; Pedziwiatr-Werbicka, E.; Nowak, K. E.; Klajnert, B.; Majoral, J. P.; Bryszewska, M. *Molecules* **2013**, *18*, 4451.
- (37) Wasiak, T.; Marcinkowska, M.; Pieszynski, I.; Zablocka, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Klajnert-Maculewicz, B. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 4852.
- (38) Franc, G.; Turrin, C.-O.; Cavero, E.; Costes, J.-P.; Duhayon, C.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4290.
- (39) Serramia, M. J.; Álvarez, S.; Fuentes-Paniagua, E.; Clemente, M. I.; Sánchez-Nieves, J.; Gómez, R.; de la Mata, J.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Controlled Release* **2015**, *200*, 60.
- (40) Murugavel, K. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 5873.
- (41) Vacas-Córdoba, E.; Bastida, H.; Pion, M.; Hameau, A.; Ionov, M.; Bryszewska, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Muñoz-Fernández, M. A. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 1898



## **CAPÍTULO 4**

---

# DENDRONES IÓNICOS DE NATURALEZA CARBOSILANO CON EL LIGANDO DO3A EN EL PUNTO FOCAL



## 4.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 4.1.1 Sistemas bifuncionalizados

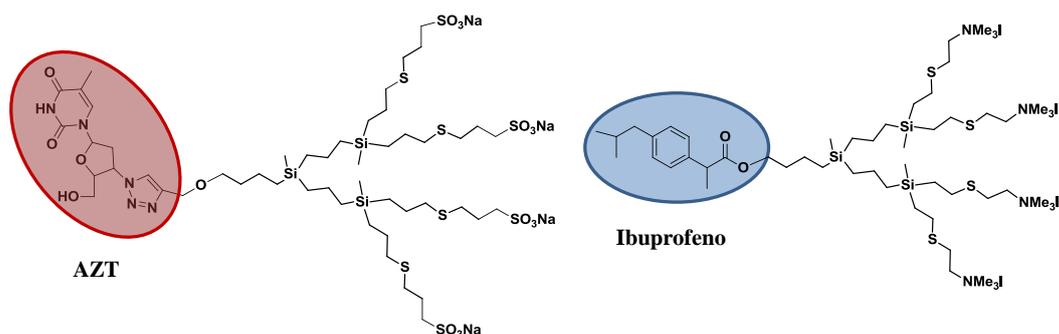
Sobre los sistemas homofuncionales que presentaban excelentes propiedades biomédicas,<sup>1</sup> se ha dado un paso más allá, y se pueden encontrar multitud de trabajos dónde se les ha incorporado una o varias funciones adicionales. Este valor añadido puede consistir en fármacos de interés,<sup>2,3</sup> grupos directores<sup>4</sup> o moléculas que permitan su seguimiento por imagen,<sup>5</sup> entre otros. Los sistemas multifuncionales, como ya se ha comentado con anterioridad, pueden ser contruidos de forma estadística<sup>6</sup> o controlada.<sup>7</sup> Es importante destacar que para generar sistemas de forma precisa, se necesitan rutas sintéticas muy complejas y tediosas.

En los últimos años, se ha apostado por extrapolar toda esta metodología a los dendrones, ya que esta topología permite generar moléculas bifuncionales de forma controlada. Por un lado, la superficie puede ser funcionalizada para una determinada aplicación, y por otro lado, en el punto focal es posible introducir: (i) diferentes grupos reactivos para hacerlos reaccionar con otros sistemas, y de ahí, generar una multitud de compuestos híbridos (dendrímeros tipo Jano o “*bow-tie*”, dendrímeros híbridos, NPs, CNTs o incluso materiales)<sup>8</sup> o (ii) moléculas de interés biológico, generando moléculas bifuncionales.

En la literatura se pueden encontrar pocos ejemplos de dendrones multifuncionales como moléculas independientes. No obstante, a continuación se mencionan algunos ejemplos relevantes:

#### *a) Fármacos de interés*

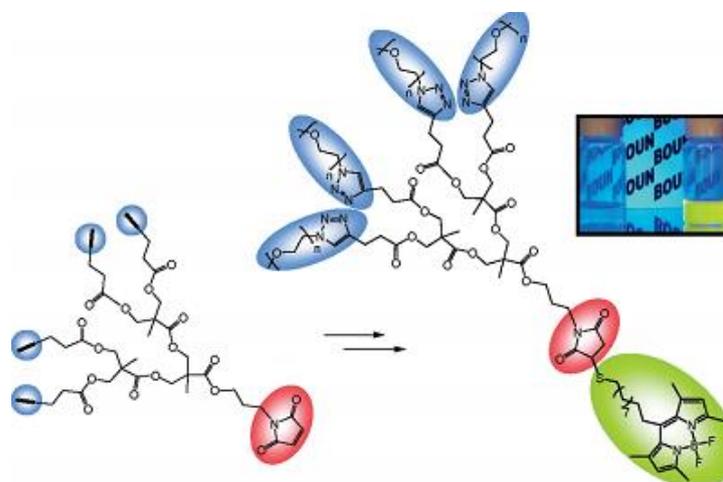
Nuestro grupo de investigación ha utilizado dendrones de tipo carbosilano funcionalizados con grupos iónicos en la periferia para solubilizar en agua fármacos como el ibuprofeno, penicilina o zidovudina (AZT, antiviral) (Figura 4.1).<sup>9,10</sup>



**Figura 4.1** Ejemplos de dendrones de tipo carbosilano iónicos de segunda generación funcionalizados en el punto focal con fármacos de interés.

**b) Cromóforos**

Otros fragmentos de gran interés son los grupos cromóforos. Un ejemplo es el mostrado en la Figura 4.2, dónde dendrones biodegradables han sido funcionalizados en la periferia con grupos PEG, que le proporcionan una mayor biocompatibilidad y un grupo cromóforo en el punto focal. En este caso se ha introducido el BODIPY-SH, utilizado en terapia fotodinámica (Figura 4.2).<sup>11</sup>



**Figura 4.2** Ejemplo de un dendrón bifuncionalizado que posee grupos PEG en la superficie y un cromóforo en el punto focal.

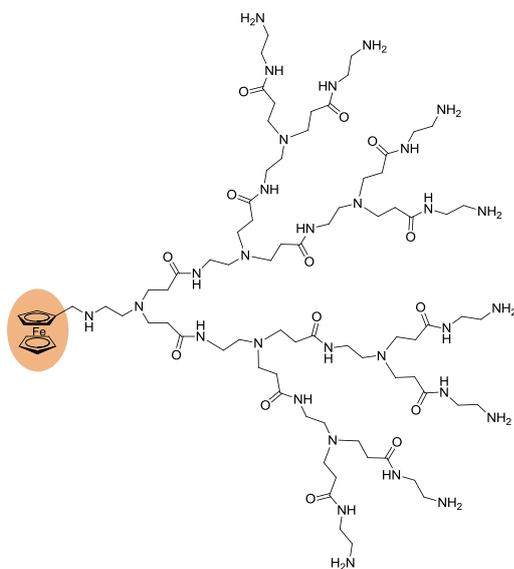
En nuestro grupo de investigación se han preparado dendrímeros esféricos iónicos marcados con fluoresceína mediante una estrategia sintética al azar. Se trata de una metodología sencilla, pero con el inconveniente de que se obtiene una distribución estadística. Por ello, se apostó por obtener sistemas más precisos

mediante el uso de dendrones carbosilano análogos. Se sintetizaron los mismos dendrones iónicos anteriormente descritos pero marcados con fluoresceína en el punto focal, los cuales han sido utilizados para realizar ensayos de biodistribución.<sup>12,13</sup>

### c) Fragmentos metálicos

La introducción de fragmentos metálicos en sistemas dendríticos ha sido estudiada en el tratamiento<sup>14</sup> o diagnóstico<sup>15</sup> de diferentes enfermedades. La combinación de ambas funcionalidades en un mismo sistema, tratamiento y diagnóstico, se conoce como la formación de agentes teragnósticos.<sup>16</sup>

Un ejemplo para el tratamiento de enfermedades, es un dendrón tipo PAMAM en el cual su punto focal ha sido funcionalizado con ferroceno. Este complejo ha demostrado excelentes propiedades en catálisis, electroquímica, y en la actualidad como agente antitumoral (Figura 4.3).<sup>17</sup>

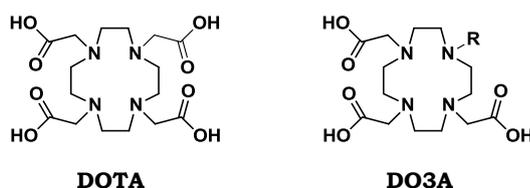


**Figura 4.3** Ejemplo de un dendrón tipo PAMAM funcionalizado con ferroceno en el punto focal.

En la actualidad, debido a la existencia de técnicas tan sofisticadas para imagen tales como la resonancia magnética de imagen (IRM), tomografía computarizada (CT) o tomografía por emisión de positrones (PET), se ha avanzado mucho en el diagnóstico de determinadas enfermedades. Un

diagnóstico temprano siempre mejora la atención y recuperación del paciente y conlleva menores costes médicos.

Para este tipo de aplicación se han utilizados muchos complejos metálicos con ligandos acíclicos y macrocíclicos, entre los que destaca el ligando DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano- N, N', N'', N'''-tetraacético). En la literatura se puede encontrar ligandos DOTA modificados que se han sintetizado para facilitar su funcionalización o mejorar sus propiedades de coordinación.<sup>18</sup> También se ha trabajado con ligandos derivados de este sistema donde algunas de sus posiciones se han sustituido, como por ejemplo el sistema denominado DO3A, en el que uno de los grupos carboxílicos puede ser sustituido por diferentes sustituyentes orgánicos (Figura 4.4).<sup>19</sup>

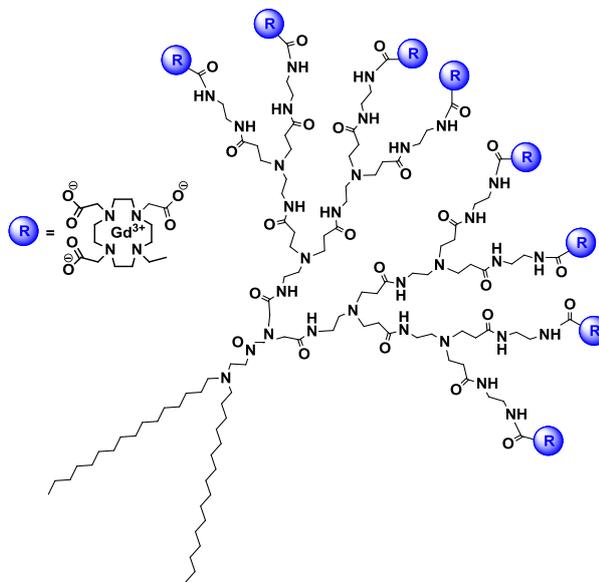


**Figura 4.4** Estructuras de los ligandos macrocíclicos más utilizados en imagen.

Este ligando y sus derivados son capaces de formar complejos con un gran número de iones metálicos con una alta estabilidad termodinámica e inercia cinética.<sup>20</sup> Los metales se encuentran fuertemente coordinados, y esto garantiza una administración segura en vivo, ya que se evita la presencia del metal libre, el cual normalmente genera toxicidad. Se han funcionalizado multitud de dendrímeros con este ligando, y debido al gran tamaño de estas macromoléculas, incrementa el tiempo en el torrente sanguíneo de estos sistemas, pudiéndose disminuir su dosis con la misma calidad en la imagen o tratamiento.

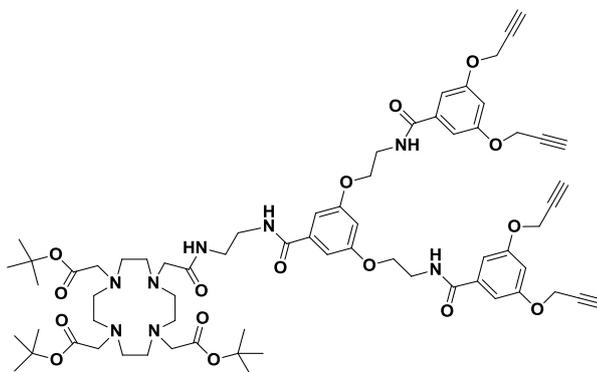
Con este ligando se han generado sistemas dendríticos que se utilizan principalmente como agentes de contraste en IRM<sup>21,22</sup> o como radiofármacos para el diagnóstico y terapia de diferentes tumores.<sup>23,24</sup> En los últimos años, también se están estudiando para retirar cationes metálicos que son responsables de determinadas patologías, sobre todo en enfermedades neurodegenerativas.<sup>25</sup>

Un ejemplo interesante es un dendrón PAMAM, el cual está funcionalizado en el punto focal con dos cadenas alifáticas que le permite formar vesículas para la encapsulación de fármacos como la DOX. En la periferia presenta ligandos DOTA que permiten la incorporación de gadolinio para su uso en IRM. Este derivado multivalente se trata de un sistema de teragnóstico (Figura 4.5).<sup>26</sup>



**Figura 4.5** Ejemplo de un dendrón tipo PAMAM funcionalizado en la periferia con fragmentos Gd-DOTA.

Por el contrario, se encuentran muy pocos ejemplos de dendrones con este tipo de ligando en el punto focal. Uno de ellos se muestra en la Figura 4.6, donde a una estructura dendrítica generada mediante reacciones *click*, se le ha introducido el agente quelante DOTA con los grupos carboxílicos protegidos.<sup>27</sup>



**Figura 4.6** Ejemplo de un dendrón funcionalizado en el punto focal con DOTA protegido.

### 4.1.2 Presentación y objetivos del Capítulo

En este **Capítulo 4** se presenta un nuevo protocolo sintético para preparar sistemas bifuncionalizados. Se han sintetizado dendrones carbosilano los cuales poseen por un lado diferentes grupos iónicos en la periferia ( $-\text{NMe}_2\text{HCl}$ ,  $-\text{SO}_3\text{Na}$  y  $-\text{COONa}$ ) que puedan generar solubilidad al sistema en medio acuoso o incluso proporcionarle una actividad terapéutica, y por otro lado, el ligando DO3A en el punto focal.

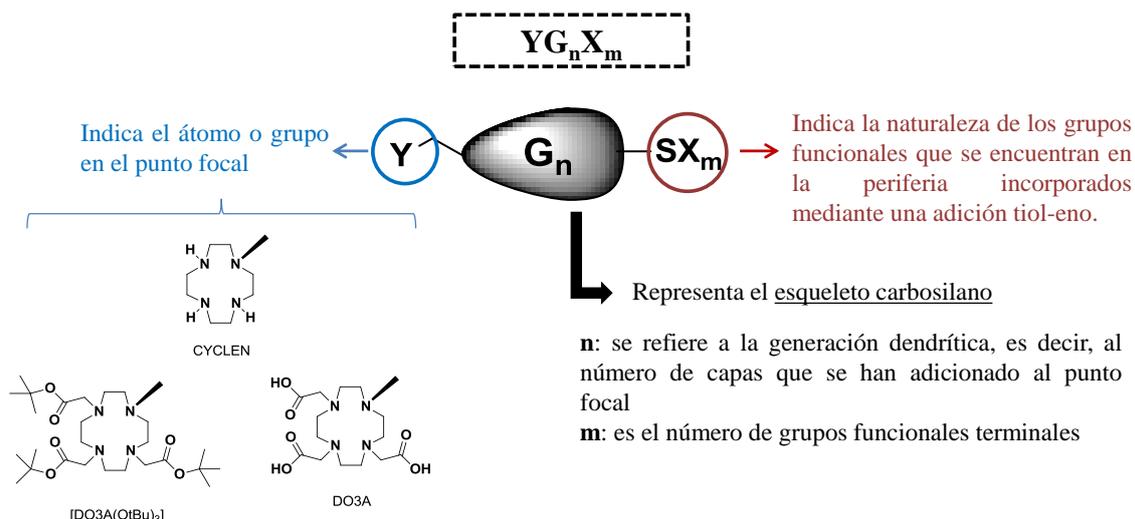
El ligando DO3A es capaz de formar complejos estables con multitud de metales, pero el principal objetivo es incorporar metales como galio y gadolinio utilizados en imagen, obteniéndose sistemas de diagnóstico. Sin embargo, para conocer más en profundidad estos sistemas, se ha elegido incorporar en primer lugar un metal más sencillo como es el cobre. Además, este metal presenta propiedades biomédicas, existiendo la posibilidad de estudiar efectos sinérgicos.

Los objetivos son:

- ✓ Sintetizar y caracterizar dendrones carbosilano con un agente quelante en el punto focal y la incorporación de diferentes grupos funcionales en la periferia mediante adición “click” tiol-eno.
- ✓ Estudiar los modos de coordinación de los diferentes sistemas sintetizados.
- ✓ Sintetizar y caracterizar complejos metálicos para sus diferentes aplicaciones biomédicas.
- ✓ Evaluar sus posibles aplicaciones biomédicas según la naturaleza de sus grupos funcionales (ver Capítulo 5).

### 4.1.3 Nomenclatura

En este Capítulo se utilizan cuñas dendríticas, en las cuales se usará una nomenclatura similar a la empleada en el Capítulo anterior Figura 4.7:



**Figura 4.7** Nomenclatura de los dendrones bifuncionalizados.

#### 4.1.4 Aspectos generales de la caracterización de los sistemas precursores y sintetizados en este Capítulo

Las principales técnicas empleadas para la caracterización de los compuestos sintetizados y descritos en este Capítulo han sido la espectroscopia de RMN multinuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ) y multidimensional (1D y 2D), espectrometría de masas y análisis elemental. Los datos completos se encuentran en el apartado experimental de esta Memoria, tras la descripción detallada de la síntesis de cada producto.

Al ser la estructura dendrítica de naturaleza repetitiva, el desplazamiento químico en espectroscopia de RMN de los átomos internos de los dendrones será prácticamente independiente tanto de la generación como de los grupos funcionales, si bien las señales se van haciendo más anchas a medida que aumenta la generación lo cual provoca un solapamiento de las señales. Este hecho se debe principalmente a: (i) que núcleos que ocupan la misma posición en distintas capas de la molécula poseen desplazamientos químicos similares, pero no idénticos y, (ii) que se produce una restricción de la movilidad al aumentar la generación del dendrón.

Por ello, en la discusión de la caracterización por RMN de los compuestos sintetizados tan sólo se comentarán las señales correspondientes a la periferia o al punto focal, al ser las que se verán afectadas durante los procesos de funcionalización. A continuación se comentan las principales señales en espectroscopia de RMN del esqueleto carbosilano de los dendrones utilizados en este Capítulo.

Los esqueletos de las estructuras dendríticas de tipo carbosilano, que se exponen en este Capítulo, constan estructuralmente de tres tipos de protones y carbonos con desplazamientos característicos en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.8): (a) los grupos metileno en posición  $\beta$  al átomo de Si, (b) los grupos metileno adyacentes a silicio y (c) los grupos metilo adyacentes a silicio.

Asimismo en el espectro de RMN de  $^{29}\text{Si}$  es característica la señal correspondiente a los silicios presentes en el esqueleto carbosilano (Figura 4.8): (1) sólo tienen cadenas alifáticas alrededor, (2) con grupos vinilo (precursor) y (3) funcionalizado via tiol-eno.

Señal	RMN de $^1\text{H}$ (ppm)	RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (ppm)
a	(-0.1) - 0	(-6) - (-5)
b	0.5 - 0.6	17 - 20
c	1.3 - 1.5	17 - 20

Tipo de Si en la estructura	RMN de $^{29}\text{Si}$ (ppm)
1	1 - 1.6
2	$\approx 13$
3	2 - 3

**Figura 4.8** Desplazamientos aproximados en espectroscopia de RMN del esqueleto dendrítico de los dendrones carbosilano utilizados.

## 4.2 CUÑAS DENDRÍTICAS FUNCIONALIZADAS CON EL LIGANDO DO3A EN EL PUNTO FOCAL Y GRUPOS IÓNICOS EN LA PERIFERIA

### 4.2.1 Intentos sintéticos para preparar sistemas catiónicos con el ligando DOTA en el punto focal

Para la obtención de los sistemas deseados, se intentaron distintas estrategias sintéticas, las cuales se comentarán a continuación:

#### *a) Formación de enlace amida (-NHCO-)*

##### Estrategia A:

Reacción directa entre los grupos carboxílicos del ligando DOTA comercial y un dendrón carbosilano catiónico con un grupo amino en el punto focal  $\text{NH}_2\text{G}_2\text{NMe}_3\text{I}$  previamente sintetizado en nuestro grupo de investigación.<sup>28</sup>

Esta reacción se intentó en diferentes condiciones de reacción, variando los agentes acoplantes, el disolvente, la temperatura, etc, pero en ningún caso se obtuvo el producto deseado (Esquema 4.1 A).

##### Estrategia B:

En bibliografía, se han preparado diversos sistemas para facilitar la incorporación del ligando DOTA en los sistemas dendríticos. Se pueden encontrar sistemas con diferentes grupos reactivos o activados en una única posición para facilitar la monosustitución deseada.<sup>18</sup> La mayoría de estos sistemas son comerciales, pero presentan el inconveniente de ser bastante caros.

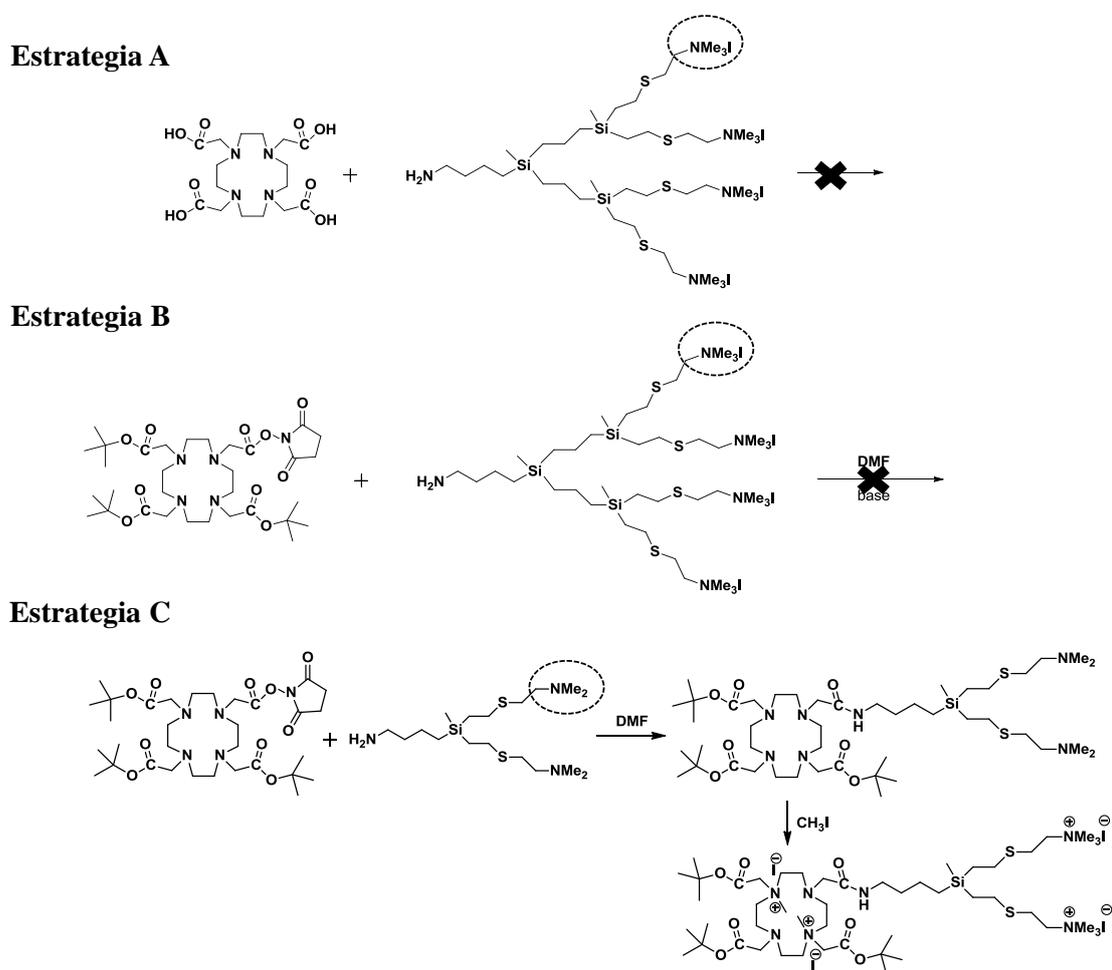
Teniendo en cuenta esto, la segunda estrategia consiste en la reacción directa entre DOTA activado en una posición y el mismo dendrón carbosilano catiónico que en el caso anterior.

Tal vez debido a un problema de solubilidad, ya que el dendrón es soluble en agua y el DOTA modificado en disolventes orgánicos, la reacción de acoplamiento no funcionó (Esquema 4.1 B).

Estrategia C:

Reacción directa entre DOTA activado y un dendrón carbosilano  $\text{NH}_2\text{G}_1\text{NMe}_2$  ambos solubles en disolventes orgánicos.<sup>28</sup>

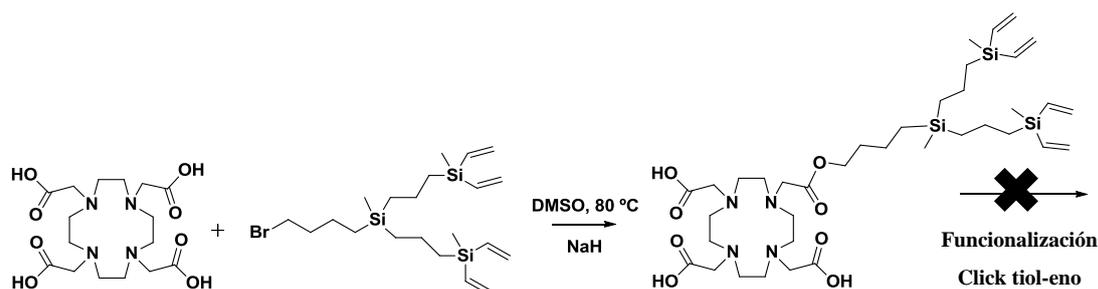
En este caso, la reacción progresa, pero su purificación es complicada, obteniéndose bajos rendimientos. Además, la cuaternización subsiguiente con yoduro de metilo no es selectiva, lo que conllevaba a la cuaternización de los nitrógenos pertenecientes al macrociclo, evitando de esta forma la posterior coordinación de cualquier metal (Esquema 4.1 C). Debido a este bajo rendimiento, la falta de selectividad en el proceso de cuaternización, y el alto coste del material de partida, este procedimiento fue descartado.



**Esquema 4.1** Estrategias sintéticas fallidas para obtener los sistemas bifuncionalizados deseados mediante un enlace amida.

### b) Formación de enlace éster (-COO-)

Para formar dicho enlace se utilizó DOTA comercial y el dendrón BrG<sub>2</sub>V<sub>4</sub>. Esta reacción se llevó a cabo sin problemas y con buenos rendimientos. Sin embargo, al realizar la funcionalización de la periferia dendrítica mediante adición click tiol-eno, las reacciones no se completaban (Esquema 4.2). Esto se podría atribuir a la presencia de aminas y grupos ácido que puedan desactivar al fotoiniciador. Por esta razón, esta alternativa también fue descartada.

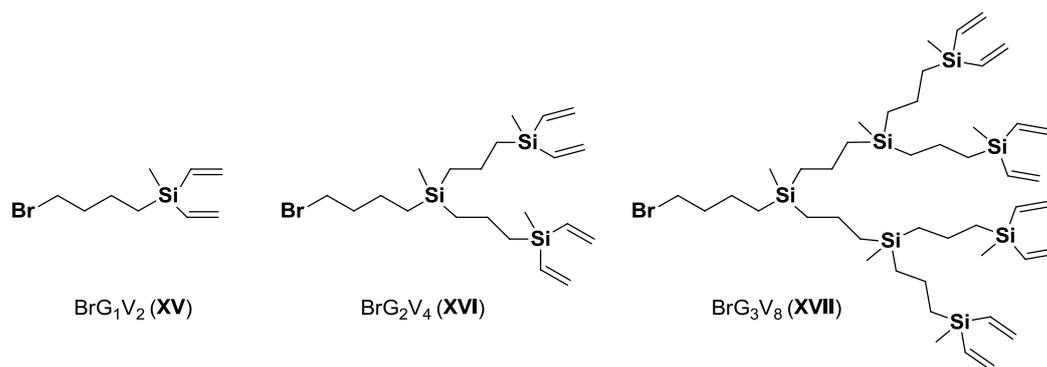


**Esquema 4.2** Estrategia sintética fallida para obtener los sistemas bifuncionalizados deseados mediante un enlace éster.

### c) Formación de enlace carbono-carbono (C-C)

La formación de un enlace C-C constituyó el proceso más viable. Aunque ello supone más pasos de reacción, los sistemas deseados se han obtenido con mayores rendimientos y los productos de partida son más económicos. Este procedimiento sintético se describe más detalladamente en los siguientes subapartados. En esta reacción se pierde un grupo carboxílico respecto al ligando DOTA, obteniéndose un ligando análogo denominado DO3A.

Los sistemas que contienen el ligando DO3A se preparan a partir de tres generaciones de dendrones carbosilano con grupo vinilo en la periferia y un átomo de bromo en el punto focal (BrG<sub>n</sub>V<sub>m</sub>), previamente descritos en bibliografía (Figura 4.9).<sup>28</sup>



**Figura 4.9** Estructuras de las cuñas carbosilano con grupos vinilo en la periferia  $\text{BrG}_n\text{V}_m$  como sistemas precursores.

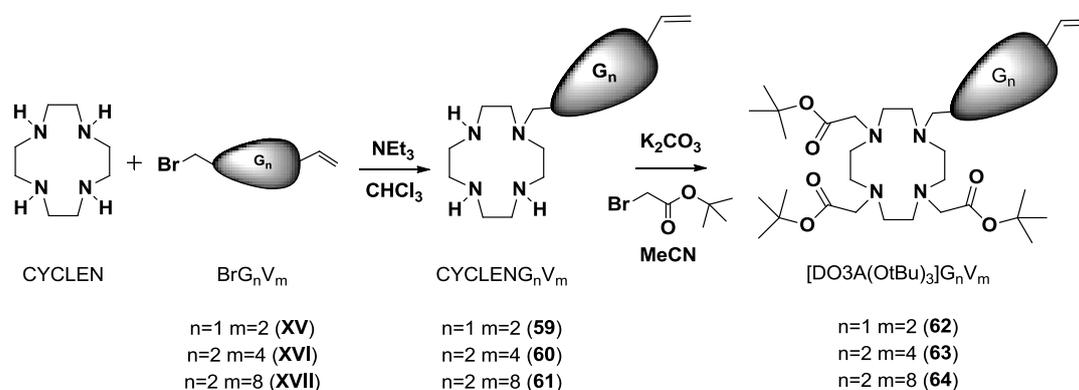
#### 4.2.2 Síntesis y caracterización de las cuñas carbosilano precursoras

##### Procedimiento sintético

Los dendrones con el ligando DO3A protegido (con grupos *tert*-butilo) en el punto focal, se preparan en dos etapas de reacción sobre el macrociclo denominado CYCLEN (1,4,7,10- tetraazaciclododecano) (Esquema 4.3). La primera etapa consiste en la reacción entre un gran exceso de CYCLEN y dendrones tipo  $\text{BrG}_n\text{V}_m$  (XV-XVII). Este proceso se lleva a cabo en condiciones suaves con el objetivo de facilitar la monosustitución, obteniéndose de este modo como producto principal los dendrones (CYCLEN) $\text{G}_n\text{V}_m$ . ( $n = 1$ ,  $m = 2$  (**59**);  $n = 2$ ,  $m = 4$  (**60**);  $n = 3$ ,  $m = 8$  (**61**)). La reacción se sigue por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  mediante la desaparición de la señal del grupo  $-\text{CH}_2\text{Br}$  a 3.40 ppm. Se obtiene una mayor proporción de monosustitución según se va incrementando la generación dendrítica empleada, debido simplemente a una cuestión de impedimento estérico (ver apartado de caracterización HPLC-MS). El producto de monosustitución se aísla mediante una columna de exclusión de tamaños en THF, obteniéndose los productos deseados como aceites incoloros con rendimientos moderados.

La segunda reacción consiste en la sustitución completa del macrociclo para generar posteriormente los grupos carboxílicos deseados. Para ello, se utilizó *tert*-butilbromoacetato en acetonitrilo como disolvente a 60°C durante 48 horas.<sup>29</sup>

De nuevo, los productos se purificaron por cromatografía por exclusión de tamaños en THF, obteniéndose los dendrones  $[\text{DO3A}(\text{O}^t\text{Bu})_3]\text{G}_n\text{V}_m$ . ( $n = 1, m = 2$  (**62**);  $n = 2, m = 4$  (**63**);  $n = 3, m = 8$  (**64**)) como aceites incoloros con elevados rendimientos. Por espectroscopia de RMN se puede confirmar la incorporación de los grupos *tert*-butilo por la aparición de la señal a 1.44 ppm en el espectro de  $^1\text{H}$  y a 28.2 ppm en el espectro de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ . La completa sustitución del macrociclo no se puede seguir por espectroscopia de RMN, ya que no existe ninguna señal característica que permita obtener esta información. La única forma de conocerlo, es una vez purificado el producto, por integración de las señales en RMN y análisis elemental.



**Esquema 4.3** Síntesis de los dendrones precursores con grupos vinilo terminales y con CYCLEN (**59-61**) y  $\text{DO3A}(\text{O}^t\text{Bu})_3$  (**62-64**) en el punto focal.

### Caracterización estructural

#### *a) HPLC-MS*

Uno de los aspectos más importantes en esta síntesis es la obtención del producto de monosustitución en un elevado porcentaje para considerar esta estrategia como la más viable. Como ya se ha descrito, se han elegido condiciones suaves de reacción, una base débil, una adición lenta y un gran exceso de CYCLEN. Este exceso se elimina fácilmente por solubilidad y se puede reciclar para otras reacciones posteriores. Los crudos de reacción de los sistemas **59-61** fueron analizados mediante HPLC-MS.

En la Figura 4.10 se puede observar los resultados para la primera generación, en la que se obtiene un 80% de monosustitución. Este porcentaje se va incrementando según aumenta la generación.

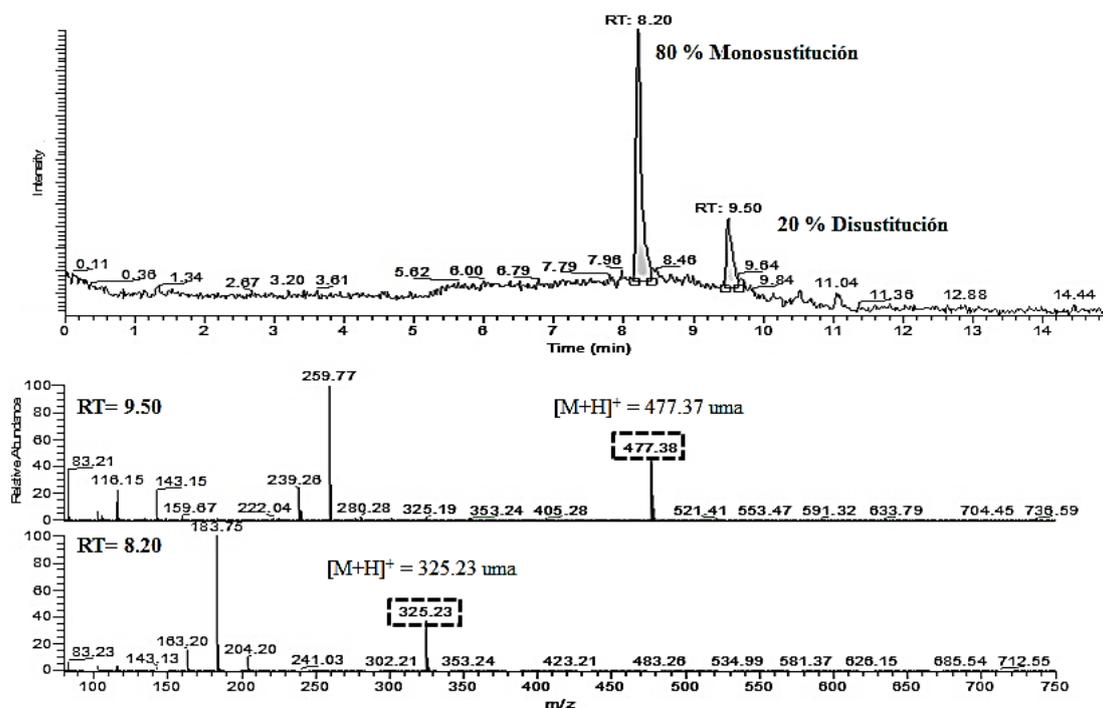


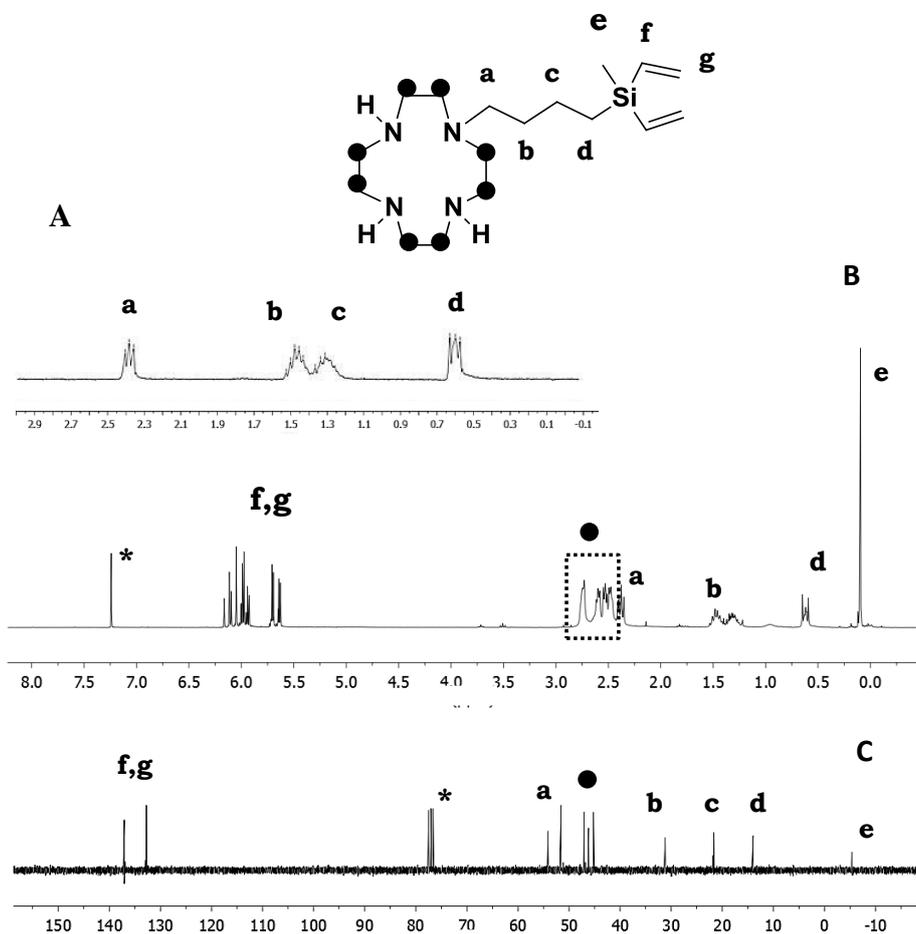
Figura 4.10 Cromatograma de HPLC-MS del dendrón 59.

*b) Espectroscopia de resonancia magnética nuclear*

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes a los sistemas **59-61** fueron realizados en  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.

Para los compuestos **59-61**, la nueva cadena  $-\text{Si}(\text{CH}_2)_4\text{N}-$  se confirmó por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  mediante un experimento TOCSY, que mostró dos multipletes a 1.33 y 1.50 ppm para los grupos metilenos internos de la nueva cadena formada  $-\text{Si}(\text{CH}_2)_4\text{N}$ , y dos tripletes a 0.62 ppm para el grupo metileno unido al átomo de silicio y a 2.38 ppm para grupo metileno unido al átomo de nitrógeno. El nuevo fragmento  $-\text{CH}_2\text{N}-$  se identificó a 54.1 ppm en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ . Un conjunto de resonancias ubicadas en el rango de 2.35 a 2.75 ppm se atribuyó a los grupos metileno del quelante macrocíclico (Figura 4.11).

Además, en un experimento HSQC  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$  se mostraron dos picos correspondientes a los átomos de nitrógeno NH y N-dendrón a 20.5 (ancho) y 28.7 ppm, respectivamente.



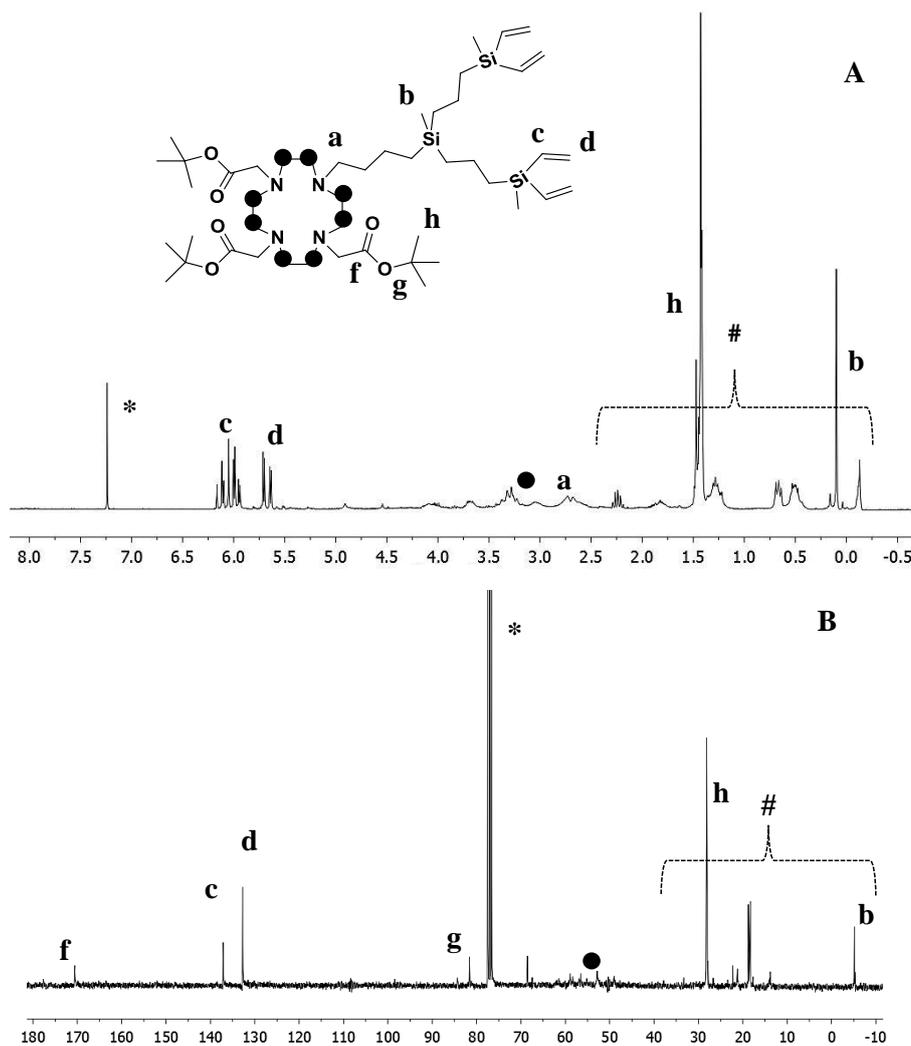
**Figura 4.11** Datos espectroscópicos del dendrón **59**: A) Experimento monodimensional 1D  $^1\text{H}$  TOCSY; B) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ ; C) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ .  $^*\text{CDCl}_3$

Para los sistemas **62-64**, la incorporación de los grupos *tert*-butilo, como ya se ha descrito con anterioridad, se deduce por la aparición de la señal a 1.44 ppm en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . En dicho espectro se pueden distinguir dos señales, una más intensa que otra, debido a que los tres grupos *tert*-butilo no son equivalentes (Figura 4.12).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  se pueden observar dos nuevas señales a 28.2 y 81.7 ppm correspondientes a los grupos metilo y al carbono cuaternario

del grupo *tert*-butilo respectivamente. Y otra señal a 170.6 ppm correspondiente al grupo carbonilo del nuevo enlace éster formado.

Es importante destacar que la zona del macrociclo es complicada de asignar, ya que no hay equivalencia y las señales se ensanchan. De hecho, al ir aumentando la generación dendrítica esta zona apenas se aprecia.

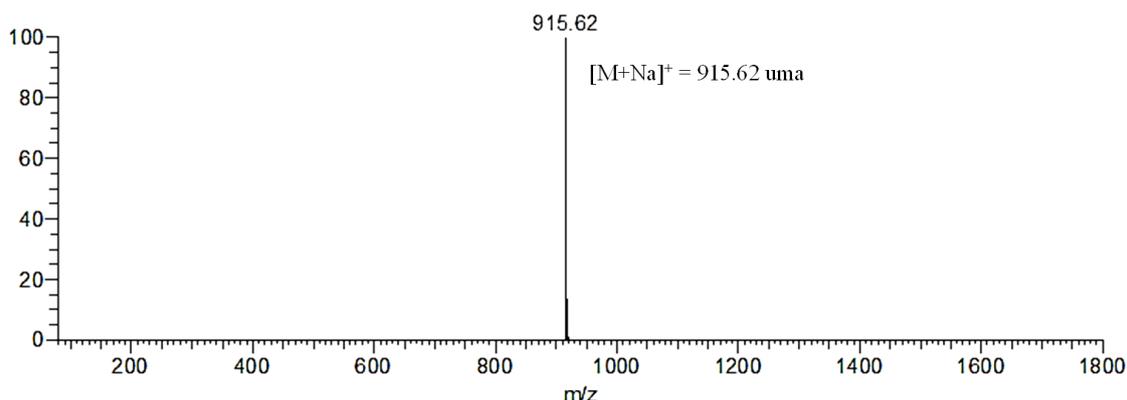


**Figura 4.12** Datos espectroscópicos del dendron **63**: A) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  y B) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ . \* $\text{CDCl}_3$  y # esqueleto carbosilano.

### c) Espectrometría de masas

Los espectros de masas MALDI-TOF muestran los picos correspondientes al ión molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de los dendrones (CYCLEN) $G_nV_m$ : **59** ( $m/z = 325.23$

uma), **60** ( $m/z = 549.42$  uma) y **61** ( $m/z = 997.70$  uma);  $[\text{DO3A}(\text{O}^t\text{Bu})_3]\text{G}_n\text{V}_m$ : **62** ( $m/z = 667.48$ ), **63** ( $m/z = 915.62$  uma,  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) y **64** ( $m/z = 1339.91$  uma).



**Figura 4.13** Espectro de masas del dendrón **63**.

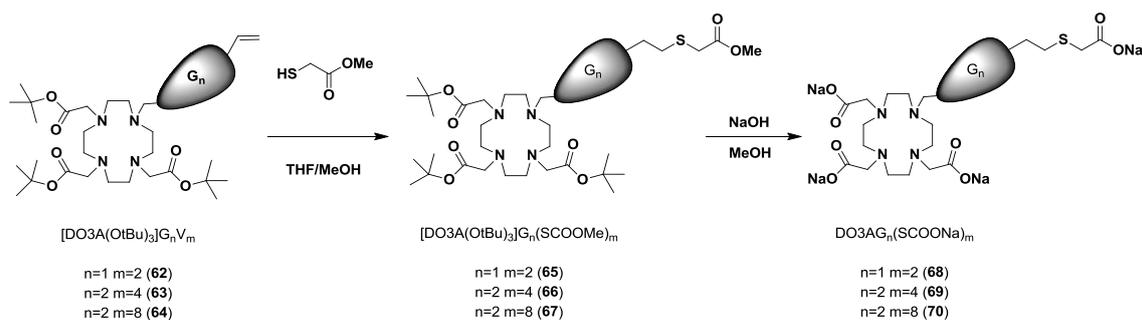
#### 4.2.3 Síntesis y caracterización de las cuñas carbosilano funcionalizadas con grupos iónicos en la periferia

Los compuestos vinilo **62-64** se trataron con tioles disponibles comercialmente bajo luz UV para proporcionar los dendrones funcionalizados deseados. El procedimiento de síntesis se basa en la química tiol-eno, ya descrita más detalladamente en el Capítulo 2. En este caso, todas las reacciones se controlaron mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , a través de la desaparición de los grupos vinilo.

##### 4.2.3.1 Síntesis y caracterización de las cuñas carbosilano aniónicas

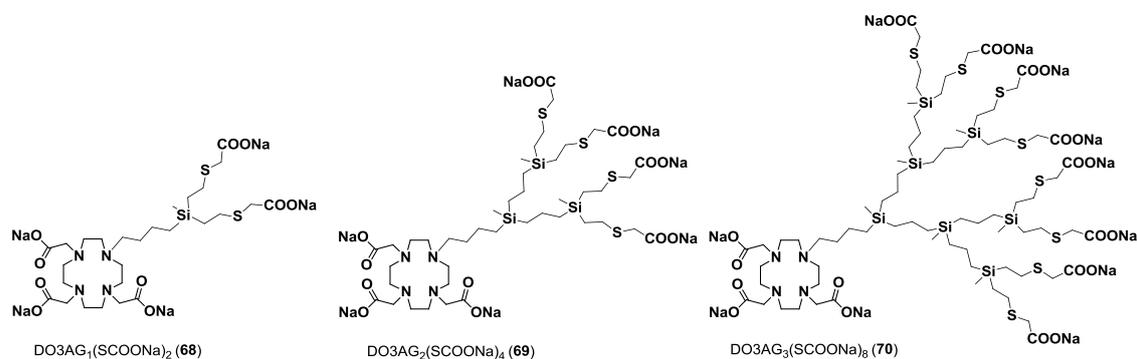
###### Procedimiento sintético

Para la síntesis de dendrones con grupos carboxilato periféricos, se necesita la formación de los precursores con grupos éster. Para ello, los dendrones terminados en grupos vinilo se trataron con tioglicolato de metilo para proporcionar las estructuras deseadas terminadas en grupos metiléster  $[\text{DO3A}(\text{O}^t\text{Bu})_3]\text{G}_n(\text{SCOOME})_m$  ( $n = 1, m = 2$  (**65**);  $n = 2, m = 4$  (**66**);  $n = 1, m = 2$  (**67**)). Las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla de disolventes de THF/MeOH (1:1) bajo luz UV durante 4 horas y se purificaron por cromatografía de exclusión de tamaño en THF (Esquema 4.4).



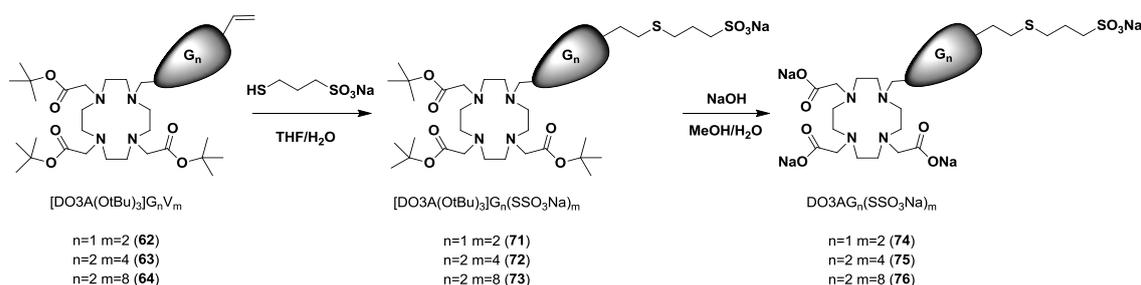
**Esquema 4.4** Síntesis de los dendrones con grupos éster (**65-67**) y grupos carboxilato en la periferia (**68-70**), y el grupo DO3A protegido y desprotegido en el punto focal respectivamente.

Posteriormente, los dendrones precursores con los grupos éster (**65-67**) se trataron con hidróxido sódico en metanol durante una noche dando lugar a los dendrones aniónicos con el ligando DO3A en el punto focal  $[\text{DO3A}]\text{G}_n(\text{SCOONa})_m$  ( $n = 1, m = 2$  (**68**);  $n = 2, m = 4$  (**69**);  $n = 3, m = 8$  (**70**)) como sólidos de color amarillo. La desaparición del grupo metilo del éster y del grupo *tert*-butilo se confirmó por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ . Las generaciones altas se purificaron fácilmente por diálisis (con membranas con un corte de peso molecular  $M_{\text{WCO}}=500-1000$  Da). Sin embargo, la primera generación debido a su pequeño tamaño tuvo que ser purificada por columna de tamaños de sephadex en agua, obteniéndose rendimientos menores. En la siguiente Figura 4.14 se representan las estructuras desarrolladas de los dendrones terminados en grupos carboxilato.



**Figura 4.14** Representación estructural de los dendrones  $[\text{DO3A}]\text{G}_n(\text{SCOONa})_m$  (**68-70**).

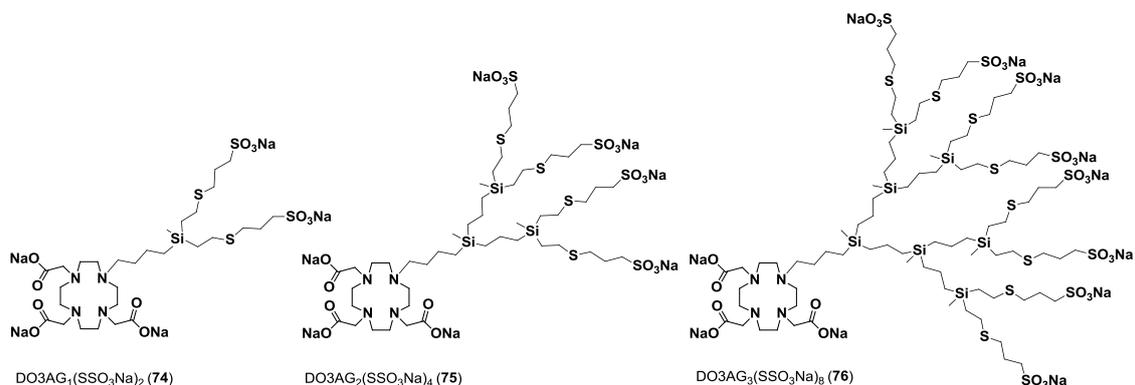
Mediante un procedimiento sintético similar al descrito anteriormente, se ha llevado a cabo la síntesis de los dendrones terminados en grupos sulfonato. Para ello, sobre los precursores con dobles enlaces se añadió el derivado tiol comercial 3-mercapto-1-propanosulfonato de sodio junto con el fotoiniciador (DMPA). En este caso, la reacción se lleva a cabo en una mezcla de disolventes THF/H<sub>2</sub>O bajo luz UV durante 4 horas, obteniéndose las estructuras deseadas terminadas en grupos sulfonato [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>n</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>m</sub> (n = 1, m = 2 (**71**); n = 2, m = 4 (**72**); n = 3, m = 8 (**73**)). Para mejorar el rendimiento y añadir menos excesos de reactivos, el derivado tiol y el fotoiniciador se añadieron en cuatro fracciones, evitando de esta forma oxidaciones y procesos de agregación indeseados. Los sistemas **72** y **73** fueron purificados por diálisis (M<sub>WCO</sub> = 500-1000 Da) obteniéndose como sólidos blancos-amarillos con rendimientos moderados. Sin embargo, el dendrón **71** presenta una baja solubilidad en todos los disolventes, por ello, tuvo que ser purificado en el paso siguiente (Esquema 4.5).



**Esquema 4.5** Síntesis de los dendrones con grupos sulfonato en la periferia con el grupo DO3A en el punto focal protegido (**71-73**) y desprotegido (**74-76**).

Con el objetivo de obtener dendrones terminados en grupos sulfonato con DO3A en el punto focal, la desprotección de los grupos *tert*-butilo se realizó mediante el tratamiento de dendrones **71-73** con hidróxido de sodio en una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O durante 2 horas, dando lugar a los dendrones aniónicos [DO3A]G<sub>n</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>m</sub> (n = 1, m = 2 (**74**); n = 2, m = 4 (**75**); n = 3, m = 8 (**76**)) como sólidos de color amarillo. La desaparición de la resonancia de los grupos *tert*-butilo fue confirmada en espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}. En estos casos, las purificaciones se consiguen también por los mismos procedimientos utilizados para los análogos con grupos carboxilato. En la Figura 4.15 se

representan las estructuras desarrolladas de los dendrones terminados en grupos sulfonato.



**Figura 4.15** Representación estructural de los dendrones  $[\text{DO3A}]G_n(\text{SSO}_3\text{Na})_m$  (74-76).

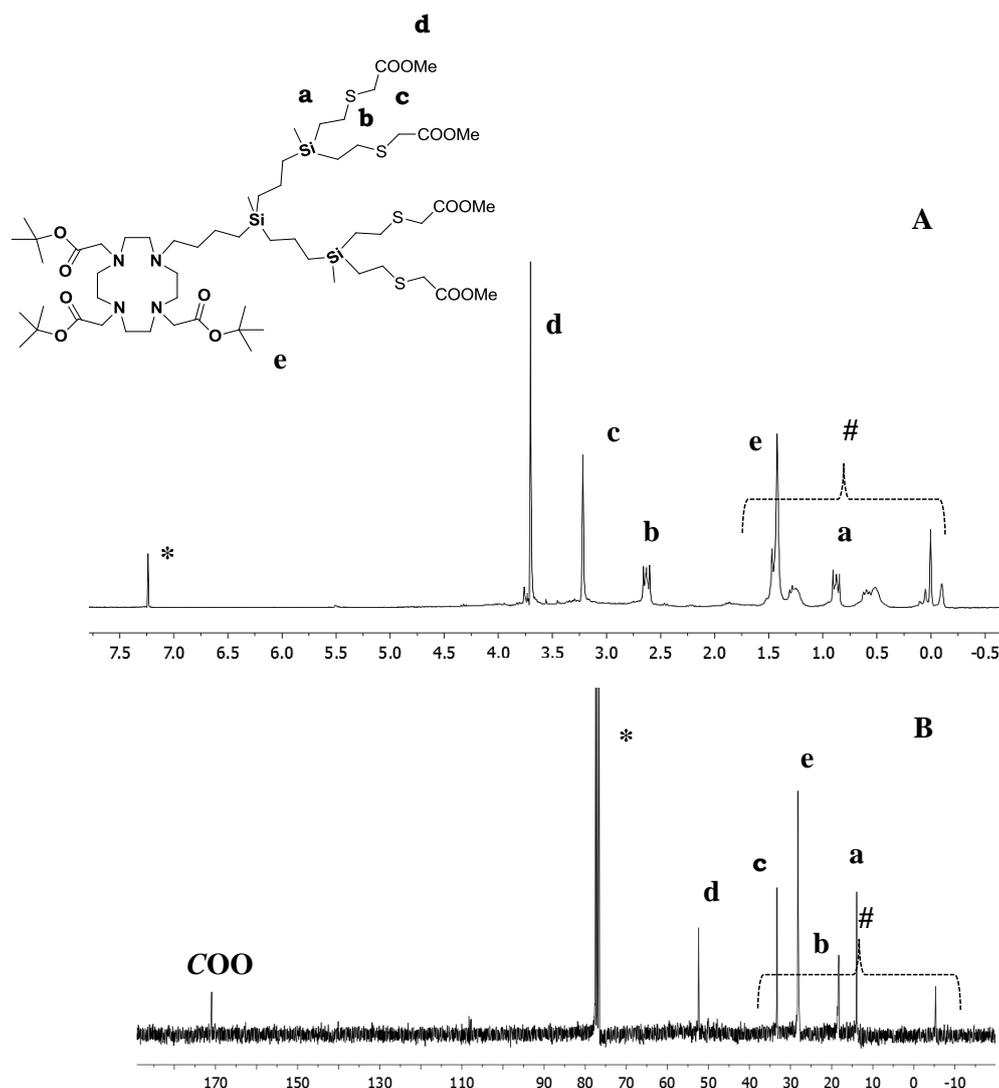
### Caracterización estructural

#### *a) Espectroscopia de resonancia magnética nuclear*

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes a los sistemas **65-67** fueron realizados en  $\text{CDCl}_3$  como disolvente.

Para los compuestos **65-67** se puede observar la aparición de dos nuevos picos en su espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , uno correspondiente al grupo metileno situado entre el átomo de azufre y el grupo carbonilo  $-\text{SCH}_2\text{CO}-$  a 3.22 ppm y otro del éster metílico situado a 3.71 ppm.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C} \{^1\text{H}\}$ , esos grupos aparecen a 33.0 y 52.4 ppm respectivamente, mientras que el grupo carbonilo se encuentra a 171 ppm. La presencia del fragmento macrocíclico se corrobora por la observación de dos grupos  $-\text{O}^t\text{Bu}$  diferentes alrededor de 1.42 ppm en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 4.16).

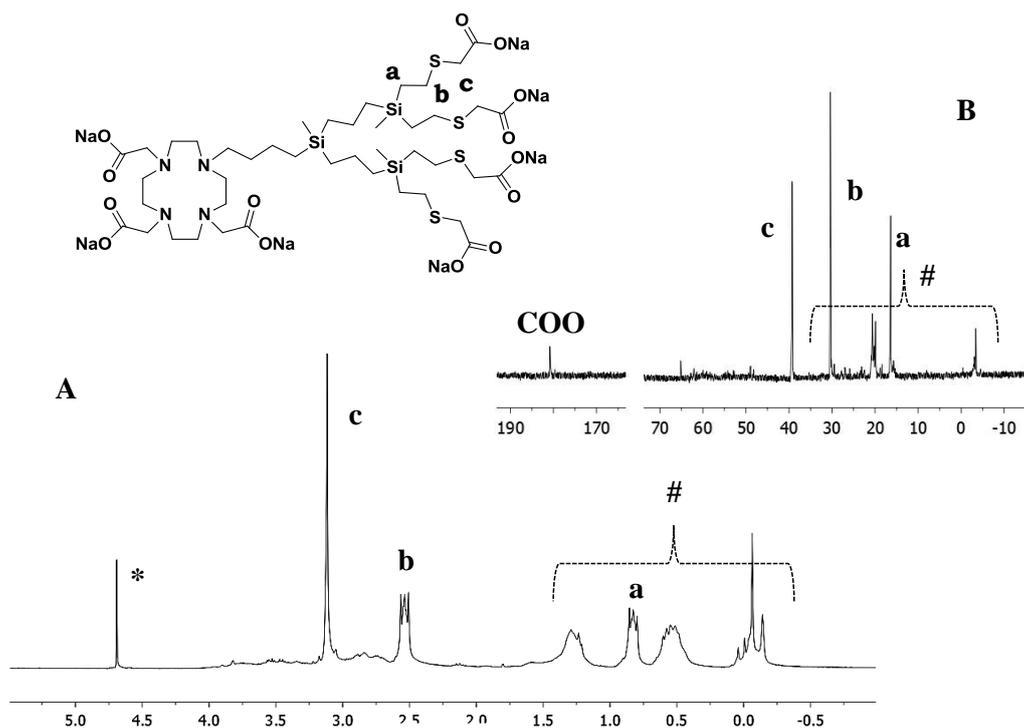


**Figura 4.16** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto  $[\text{DO3A}(\text{O}^t\text{Bu})_3]\text{G}_2(\text{SCOOMe})_4$  (**66**). \* $\text{CDCl}_3$  y # esqueleto carbosilano.

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes a los sistemas con grupos carboxilato **68-70** se realizaron en  $\text{D}_2\text{O}$  como disolvente.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  muestran un singlete alrededor de 3.12 ppm debido al grupo metileno unido al grupo CO y un multiplete situado en 2.53 ppm para el grupo metileno interno unido al átomo de azufre.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ , el grupo carbonilo aparece a 178.8 desplazado a campo más bajo que los derivados éster análogos. Las señales de la unidad del macrociclo se ven solapadas por la estructura dendrítica (Figura 4.17).

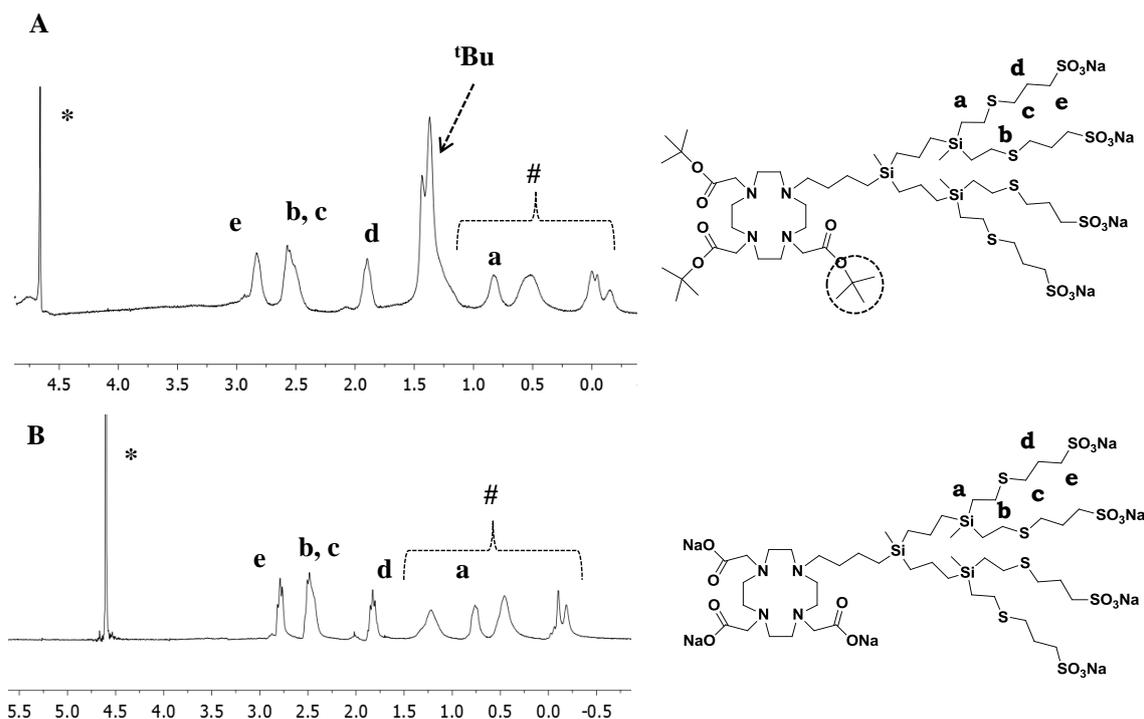


**Figura 4.17** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y b) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del compuesto  $\text{DO3AG}_2(\text{SCOONa})_4$  (**69**). \* $\text{D}_2\text{O}$  y #esqueleto carbosilano.

Para los sistemas **71-73**, en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , aparece una nueva cadena de dos grupos metileno a 2.58 y 0.87 ppm atribuida al fragmento  $-\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{S}-$ , y tres nuevos grupos metileno a 2.84, 2.58 y 1.93 ppm confirman la presencia de unidades propanosulfonato  $-\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$  (Figura 4.18).

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ , las señales correspondientes al fragmento mencionado  $-\text{S}(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$  aparecen a 24.4, 30.2 y 49.8 ppm.

Para los sistemas **74-76**, los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  muestran el mismo perfil que los sistemas anteriores, pero con la desaparición de las señales características a los grupos *tert*-butilo (Figura 4.18).



**Figura 4.18** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  de los compuestos A)

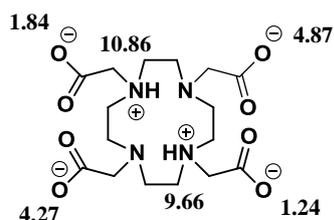
[DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>2</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>4</sub> (**72**) y B) DO3AG<sub>2</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>4</sub> (**75**). \*D<sub>2</sub>O y # esqueleto carbosilano.

### b) Espectrometría de masas

En este caso solo se pudieron obtener los espectros de masas MALDI-TOF correspondientes al ión molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de los derivados neutros [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>n</sub>(SCOOME)<sub>m</sub>: **65** ( $m/z = 879.50$  uma) y **66** ( $m/z = 1315.66$  uma). Para la generación más alta se observan fragmentaciones, pero no el ión molecular.

### c) Valoración potenciométrica

En bibliografía científica se pueden encontrar multitud de trabajos acerca del sistema de protonación del ligando DOTA. La principal conclusión es que este sistema a un pH fisiológico presenta los cuatro grupos carboxilato en su forma aniónica y dos nitrógenos opuestos protonados (Figura 4.19).<sup>30</sup>



**Figura 4.19** Valores de pKa para el sistema DOTA.

Sin embargo, en este trabajo se ha sintetizado un derivado diferente, un ligando DO3A, donde uno de los brazos del DOTA ha sido modificado, perdiendo un grupo carboxilato y por tanto, una posición de coordinación. De esta manera, se trata de evaluar si la sustitución de una rama provoca grandes diferencias en el proceso de protonación.

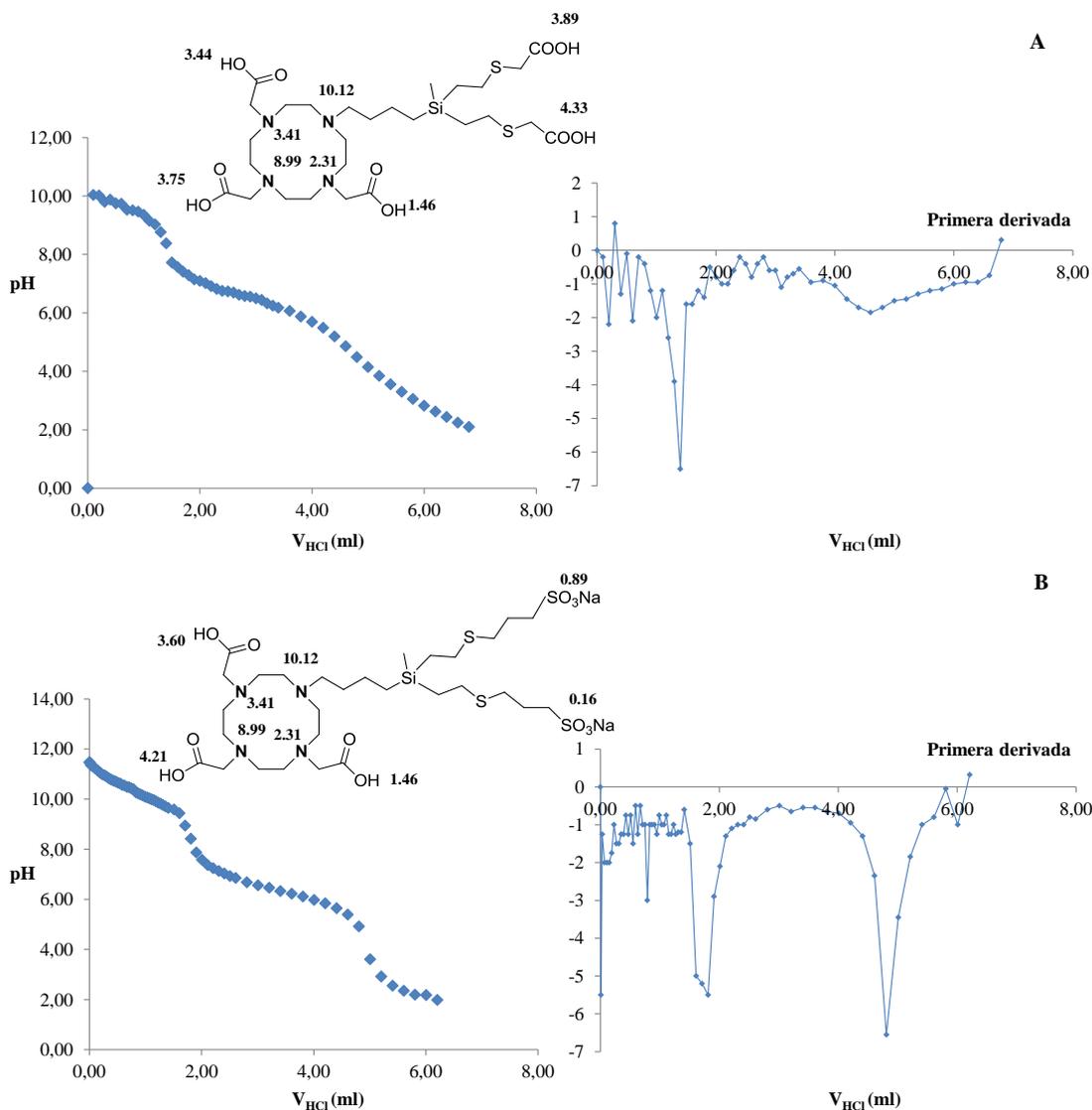
Se realizó una valoración potenciométrica de los diferentes sistemas aniónicos de la primera generación (**68** y **74**). Los compuestos contienen varios centros básicos en la estructura dendrítica, es decir, los átomos de nitrógeno y los grupos carboxilato del resto DO3A, los átomos de azufre de las ramas, y los grupos periféricos (carboxilato o sulfonato).

Para realizar la valoración, las disoluciones de los sistemas se basificaron con NaOH (0.01M) hasta alcanzar un pH en torno a 12. Una vez alcanzado dicho pH, se fueron añadiendo pequeños volúmenes de HCl (0.01 M), y registrando los valores de pH correspondientes. Los valores experimentales de pKa se calcularon utilizando el método de la segunda derivada.

Los resultados experimentales se compararon con los pKa obtenidos teóricamente por el programa Marvin, Términos Calculadora plugin y químicas Demo.<sup>31</sup>

Los datos calculados mediante el programa indican que las constantes de protonación del fragmento macrocíclico no cambian al modificar los grupos periféricos de la unidad dendrítica, como era de esperar. La sustitución en un átomo de nitrógeno de un grupo carboxílico por un fragmento alquílico proporciona un carácter más básico a dicho heteroátomo, por lo que el valor de pKa debe ser más alto. El siguiente valor de pKa debe ser el del nitrógeno

opuesto, dado que los contiguos deben verse afectado por la carga positiva que dicho nitrógeno recibe tras el proceso de protonación.



**Figura 4.20** Curvas de valoración potenciométrica y primera derivada de los sistemas A) DO3AG<sub>1</sub>(SCOONa)<sub>2</sub> (**68**) y B) DO3AG<sub>1</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub> (**74**). En las estructuras aparecen los datos de pKa calculados teóricamente de los distintos centros básicos.

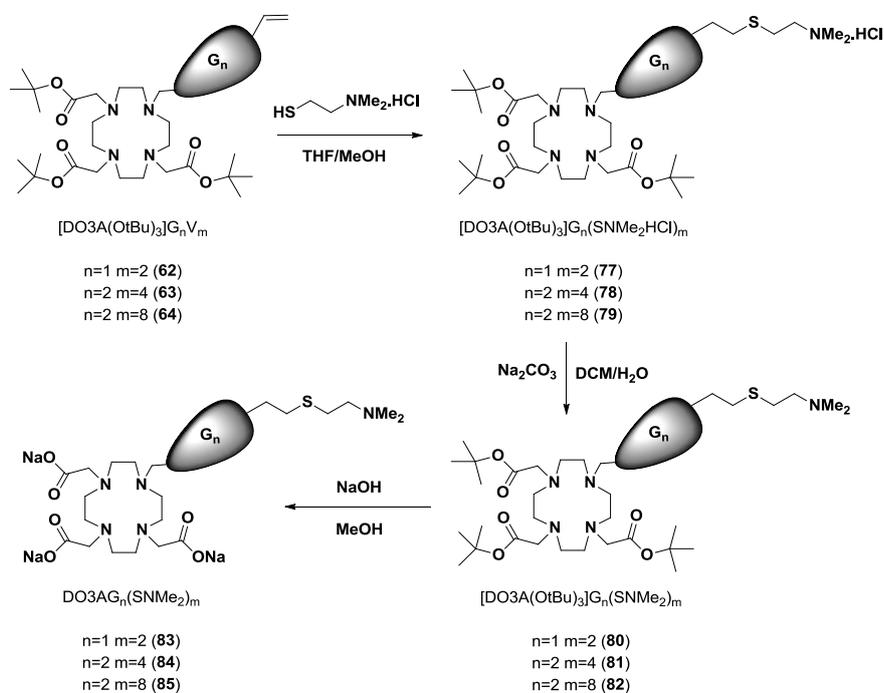
Las curvas de valoración para los dendrones con grupos sulfonato y carboxilato mostraron principalmente dos regiones de pKa (4.6 y 9.1), característicos de las constantes de disociación ácidas de los grupos [(NH<sup>+</sup>) + COOH] y (NH<sup>+</sup>), respectivamente (Figura 4.20). Como era de esperar, los valores de pKa de los átomos de azufre y los grupos sulfonato no se observan, debido a que son demasiado bajos para ser determinados por esta técnica. Estos

resultados están de acuerdo con el cálculo teórico, así como con los datos encontrados en literatura científica.<sup>32,33</sup> Por lo tanto, en un intervalo de pH de 4-8, los grupos sulfonato o carboxilato se encuentran en su forma aniónica, mientras que algunos de los átomos de N del macrocíclico actuarían como grupos amino, todos ellos capacitados para coordinar diferentes centros metálicos.

#### 4.2.3.2 Síntesis y caracterización de las cuñas carbosilano catiónicas

##### Procedimiento sintético

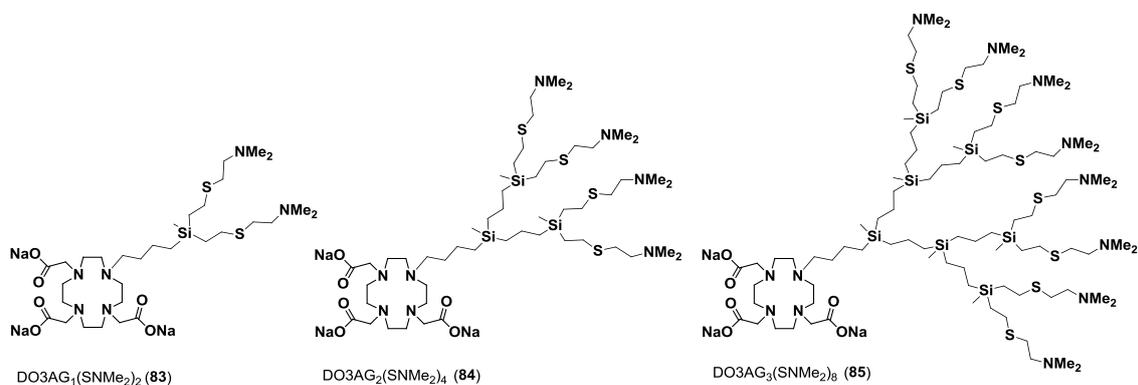
Para la síntesis de dendrones con grupos amonio periféricos, los precursores **62-64** se trataron con clorhidrato de 2-(dimetilamino)etanol. Las reacciones se realizaron en una mezcla de disolventes THF/MeOH durante 4 horas de irradiación, en presencia de DMPA. El fotoiniciador se añadió en dos veces bajo atmosfera inerte. De esta manera se obtienen los dendrones  $[\text{DO3A}(\text{OtBu})_3]\text{G}_n(\text{SNMe}_2\cdot\text{HCl})_m$  ( $n = 1, m = 2$  (**77**);  $n = 2, m = 4$  (**78**);  $n = 3, m = 8$  (**79**)). Todos los dendrones catiónicos se purificaron por diálisis ( $M_{\text{WCO}} = 500$  Da), obteniéndose como sólidos muy higroscópicos de color amarillo.



**Esquema 4.6** Síntesis de dendrones con grupos amonio y amino en la periferia con el fragmento DO3A en el punto focal protegido (**77-82**) o desprotegido (**83-85**).

El tratamiento de **77-79** con una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en una mezcla de disolventes  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) dio los derivados neutros  $[\text{DO3A}(\text{O}^t\text{Bu})_3]\text{G}_n(\text{SNMe}_2)_m$  ( $n = 1, m = 2$  (**80**);  $n = 2, m = 4$  (**81**);  $n = 3, m = 8$  (**82**)) como aceites amarillos con altos rendimientos, solubles en disolventes orgánicos (Esquema 4.6).

El tratamiento posterior con hidróxido de sodio en una mezcla de disolventes  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  durante 2 horas condujo a la formación de los dendrones  $\text{DO3AG}_n(\text{SNMe}_2)_m$  ( $n = 1, m = 2$  (**83**);  $n = 2, m = 4$  (**84**);  $n = 3, m = 8$  (**85**)) como sólidos muy higroscópicos solubles en disolventes polares como  $\text{H}_2\text{O}$  o metanol. Una vez más, la desaparición de la resonancia del grupo *tert*-butilo en ambos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  junto con la observación de la señal debido a los grupos carboxilato confirmó la formación del producto deseado. Las generaciones altas se purificaron por diálisis ( $M_{\text{WCO}}=500-1000$  Da). Sin embargo, la primera generación debido a su pequeño tamaño se purificó por columna de tamaños de sephadex en agua, obteniéndose rendimientos menores. En la siguiente Figura 4.21 se representan las estructuras desarrolladas de los dendrones terminados en grupos amina.



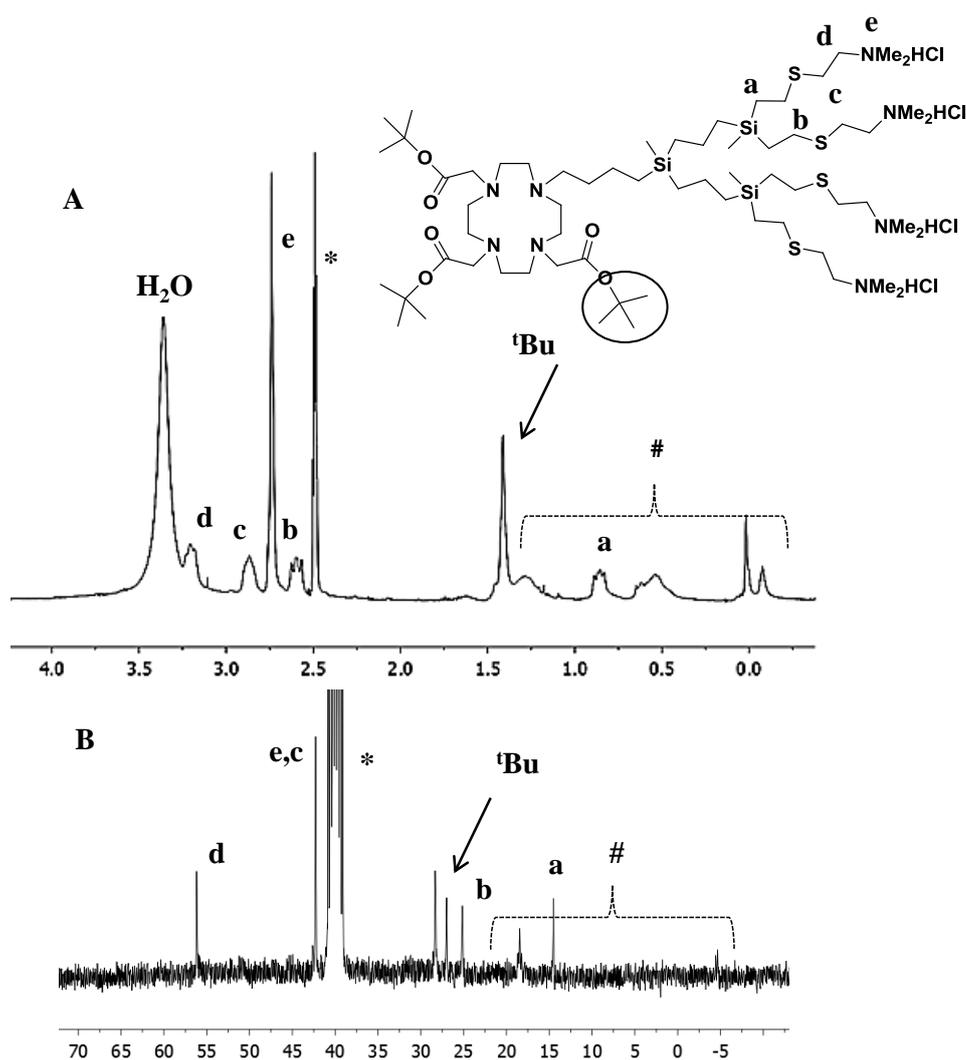
**Figura 4.21** Representación estructural de los dendrones  $[\text{DO3A}]\text{G}_n(\text{SNMe}_2)_m$  (**83-85**).

### Caracterización estructural

#### *a) Espectroscopia de resonancia magnética nuclear*

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes a los sistemas **77-79** se realizaron en  $\text{DMSO}-d_6$  como disolvente.

La presencia de la nueva cadena de  $-\text{Si}(\text{CH}_2)_2\text{S}-$  se confirmó por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , en la que se observan dos multipletes a 0.87 y 2.53 ppm para los protones de los fragmentos  $-\text{SiCH}_2-$  y  $-\text{CH}_2\text{S}-$ , respectivamente. Mientras que para la cadena exterior  $-\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$  se observan dos multipletes a 2.88 y 3.17 ppm para los protones del grupo  $-\text{SCH}_2-$  y los grupos  $-\text{CH}_2\text{N}-$ , respectivamente. Además, un singlete a 2.71 ppm confirmó la presencia del fragmento  $-\text{NMe}_2\text{H}$ .



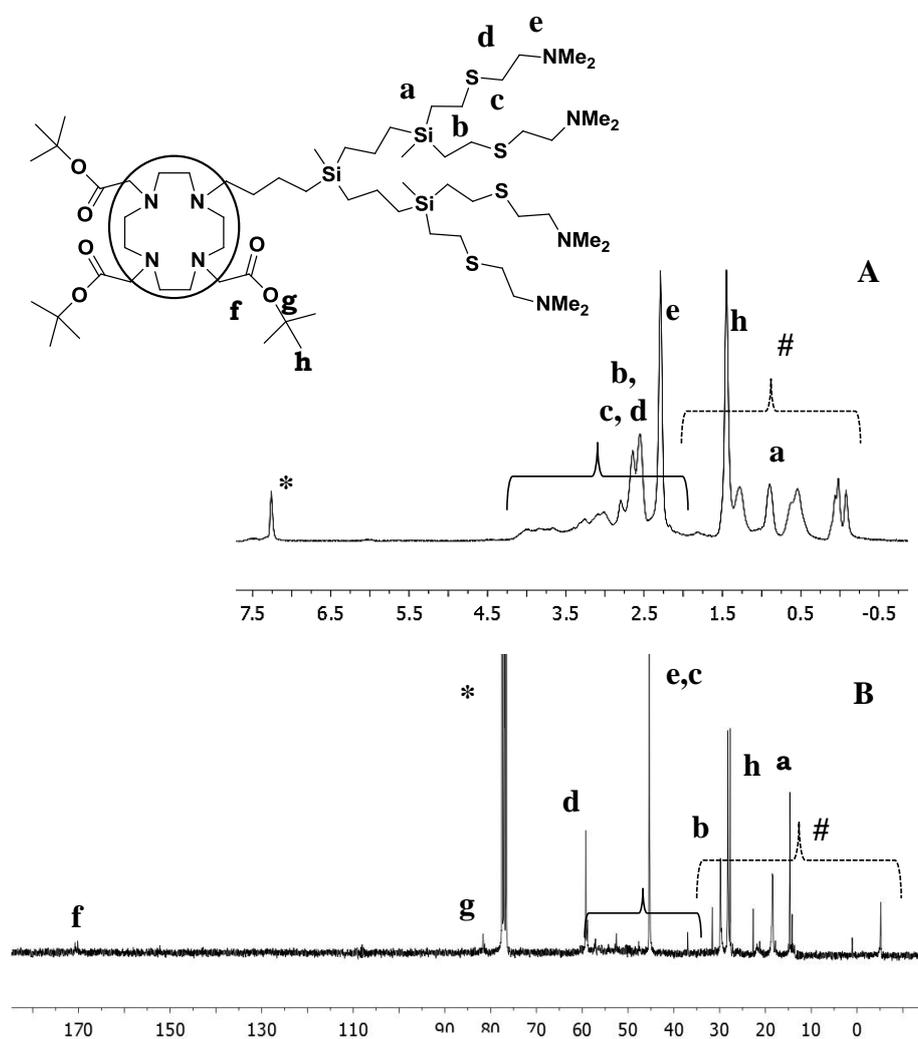
**Figura 4.22** Espectros de A) RMN de  $^1\text{H}$  y B) RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  del dendron  $[\text{DO3A}(\text{O}^t\text{Bu})_3]\text{G}_2(\text{SNMe}_2\text{HCl})_4$  (**78**). \*DMSO- $d_6$  y #esqueleto carbosilano.

En los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  los fragmentos  $-\text{SiCH}_2-$  y  $-\text{CH}_2\text{S}-$  se observan a 14.4 y 26.9 ppm, respectivamente. Para la cadena exterior  $-\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$ , se aprecian dos señales a 42.4 y 56.4 ppm para los carbonos de los fragmentos -

SCH<sub>2</sub>- y -CH<sub>2</sub>N-, respectivamente. Por último, la señal correspondiente al grupo -NMe<sub>2</sub>H aparece a 42.5 ppm.

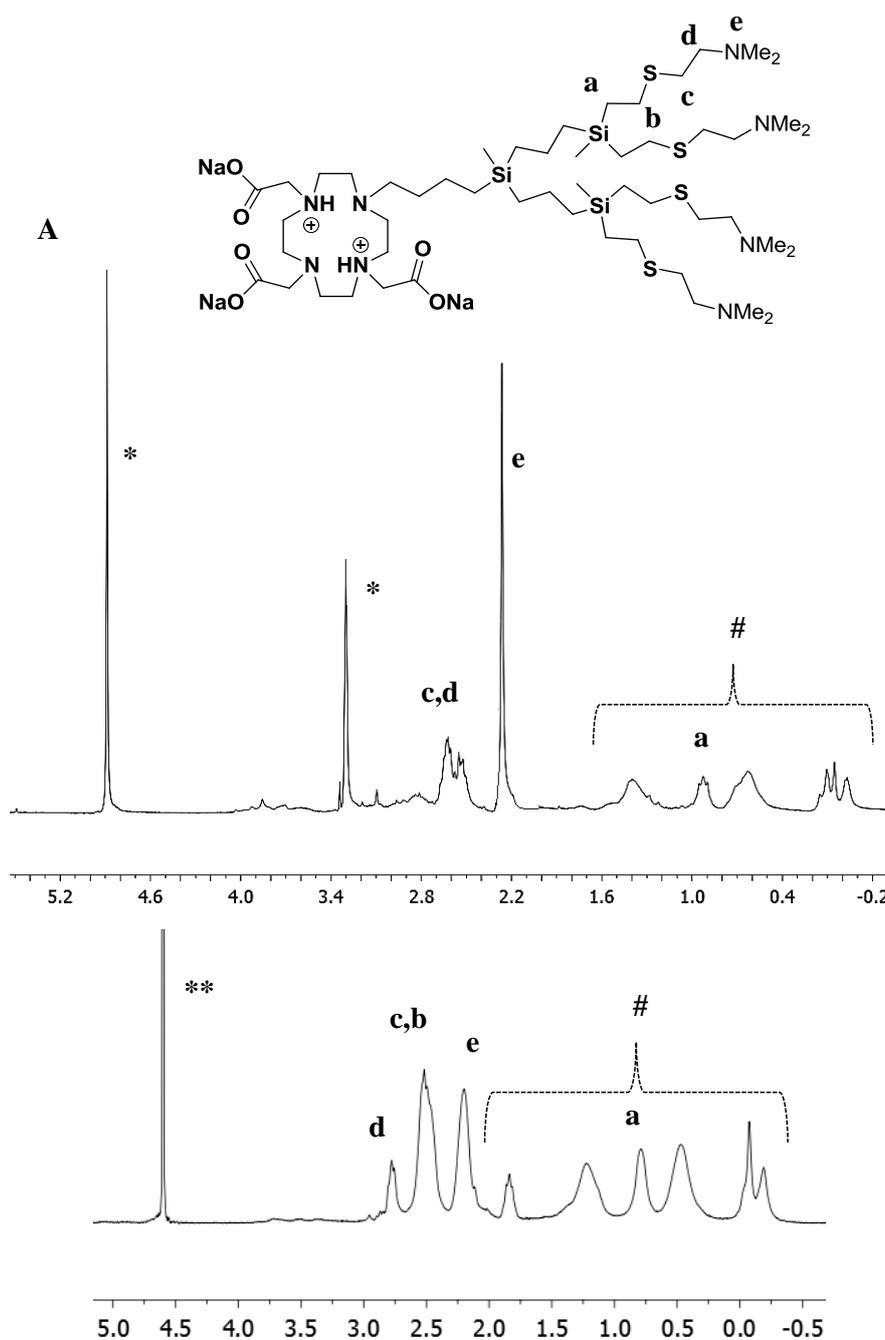
Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>29</sup>Si correspondientes a los sistemas **80-82** fueron realizados en CDCl<sub>3</sub> como disolvente.

Para estos compuestos se observa un perfil similar al descrito para los sistemas anteriores, pero en este caso se observa un desplazamiento a frecuencias más bajas de las señales correspondientes al fragmento -CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>. Estas señales se desplazan a 2.23 y 45.1 ppm los grupos metilo y a 2.50 y 58.8 ppm el grupo metileno en los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}, respectivamente (Figura 4.23).



**Figura 4.23** Espectros de A) RMN de <sup>1</sup>H y B) RMN de <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} del dendron [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>2</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>4</sub> (**81**). \*CDCl<sub>3</sub> y # esqueleto carbosilano.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{29}\text{Si}$  correspondientes a los sistemas **83-85** se realizaron en  $\text{CD}_3\text{OD}$  como disolvente. Estos derivados presentan aminas en su estructura susceptibles de sufrir un proceso de autoprotonación y podrían observarse situaciones de equilibrio. Con el fin de facilitar la caracterización, estos sistemas se basificarón para evitar dichos procesos de autoprotonación.



**Figura 4.24** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  del dendron  $[\text{DO3A}]G_2(\text{SNMe}_2)_4$  (**84**) A)

\* $\text{CD}_3\text{OD}$  y B)\*\* $\text{D}_2\text{O}$ . #Esqueleto carbosilano.

Estos sistemas han sido caracterizados en metanol deuterado como disolvente (Figura 4.24 A), pero también se registró el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en agua deuterada ( $\text{pH} \approx 6$ ) (Figura 4.24 B). Se puede observar que la señal a 2.20 ppm es menos intensa y a 2.80 ppm hay un ensanchamiento de las señales, lo que indica que algunos grupos amino periféricos se encontrarán en su forma protonada.

Para estos sistemas se observa un perfil similar al descrito para los derivados anteriores, con la diferencia de la desaparición del grupo *tert*-butilo, lo que indica que los grupos ácidos del ligando DO3A están disponibles. Los grupos carboxílicos en las generaciones más bajas se pueden detectar por su señal característica a 179.1 ppm en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$ .

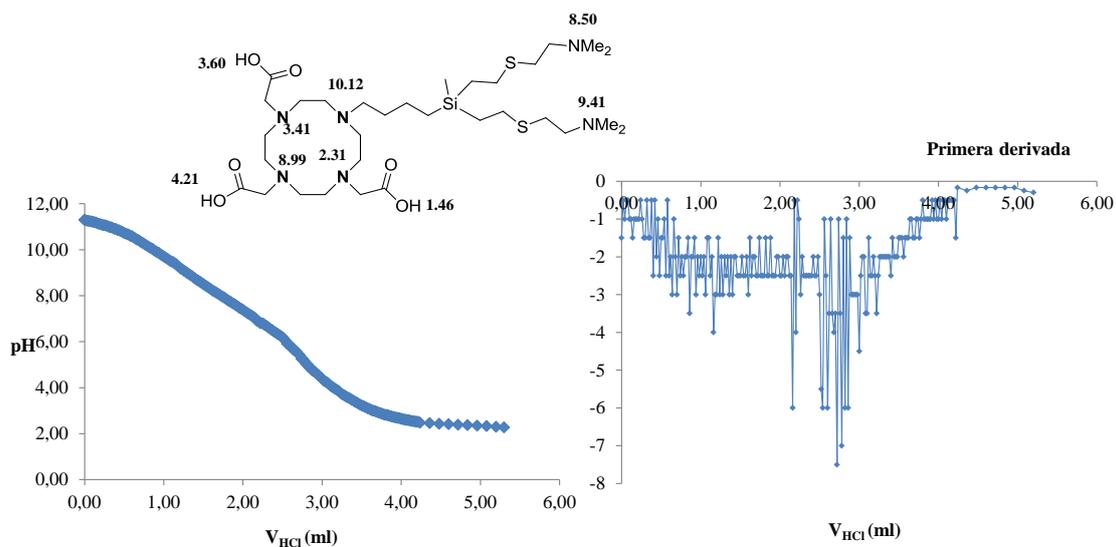
### ***b) Espectrometría de masas***

En este caso solo se pudieron obtener los espectros de masas MALDI-TOF correspondientes al ión molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de los derivados neutros  $[\text{DO3A}(\text{O}^t\text{Bu})_3]_{\text{G}_n}(\text{SNMe}_2)_m$ : **77** ( $m/z = 877.60$  uma) y **78** ( $m/z = 1311.87$  uma). De nuevo, para la generación más alta se observan fragmentaciones, pero no el ión molecular.

### ***c) Valoración potenciométrica***

Se realizó una valoración potenciométrica del sistema catiónico de primera generación (**83**). La valoración se realizó en las mismas condiciones descritas para los sistemas aniónicos.

En el caso de los dendrones terminados en grupos amino la curva es más compleja aún. No obstante, se puede deducir que en un intervalo de pH de 4-8 el sistema tendría los grupos amino periféricos cuaternizados y algunos de los cuatro nitrógenos del ligando DO3A, que explicaría la solubilidad en agua observado para el dendrón **83** (Figura 4.25).



**Figura 4.25** Curva de valoración potenciométrica para el sistema DO3AG<sub>1</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (83). En la estructura aparecen los datos de pKa calculados teóricamente de los distintos centros básicos.

#### 4.2.4 Estudio de los modos de coordinación

Una vez obtenidos los sistemas iónicos, se ha realizado un estudio de sus modos de coordinación mediante valoración potenciométrica, espectroscopia UV-Vis y resonancia de espín electrónico (RSE), usando Cu(II) como sonda. Los factores claves que influyen en la estabilidad de los complejos metálicos originados por el macrociclo basado en DOTA o DO3A, están relacionados con el tamaño de la cavidad, la rigidez del macrociclo, y el tipo, número y posición de los sustituyentes. Incluso un pequeño cambio en la estructura del ligando puede conducir a una modificación drástica en la estabilidad del complejo.<sup>34</sup>

##### 4.2.4.1 Valoración potencimetría

Se realizaron medidas de pH al adicionar diferentes equivalentes de Cu(II) a los sistemas de segunda generación **69**, **75** y **84** como sistemas representativos de las distintas familias, obteniéndose los resultados obtenidos en la Tabla 4.1.

Las medidas de pH realizadas para los sistemas **75** y **84** en presencia de bajas concentraciones de Cu(II), no mostraron cambios significativos en sus valores respecto al de cationes de cobre libre, a diferencia de lo observado para el sistema **69**. Estos datos sugieren modos de coordinación selectivos en el núcleo

DO3A para los dendrones con grupos sulfonato o amina, mientras que se pueden intuir diferentes posibilidades de coordinación para el sistema con grupos carboxilato. Para altas concentraciones de cobre, el complejo con el dendrón **69** precipita, lo que indica una saturación (neutralización) de los modos de coordinación periféricos, no pudiéndose obtener valores de pH para este sistema. Para los sistemas **75** y **84** los valores de pH obtenidos a altas concentraciones de Cu(II) están cerca de los obtenidos para  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  o Cu(II) con una coordinación débil (Tabla 4.1). Estos resultados, junto con la solubilidad mostrada por estos complejos, incluso a concentraciones de Cu(II) superiores para conseguir la electroneutralidad teórica, están de acuerdo con una baja coordinación de Cu(II) en la periferia dendrítica.

**Tabla 4.1** Medidas de pH comparativas de los diferentes dendrones de segunda generación en presencia de diferentes concentraciones Cu(II).

Ligando <sup>a</sup>	Valores de pH				
	Ligando	0.01M Cu(II) <sup>b</sup>	0.05M Cu(II) <sup>b</sup>	0.1M Cu(II) <sup>b</sup>	0.3M Cu(II) <sup>b</sup>
DO3AG <sub>2</sub> (SCOONa) <sub>4</sub> ( <b>69</b> )	10.26	8.97	7.36	(c)	(c)
DO3AG <sub>2</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>4</sub> ( <b>75</b> )	9.62	9.34	7.06	5.29	4.69
DO3AG <sub>2</sub> (SNMe <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ( <b>84</b> )	8.64	8.07	6.91	5.55	5.20

<sup>(a)</sup>Concentración de ligando (0.025 M); <sup>(b)</sup>Cu (II) añadido como Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O; <sup>(c)</sup>precipitación

#### 4.2.4.2 Espectroscopia de UV-VIS

Los compuestos **68-69**, **74-75** y **83-84** se disolvieron en agua destilada pura a una concentración de 1 mM y se trataron con concentraciones crecientes de Cu(II) añadido en forma Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O. Las disoluciones se diluyeron hasta 0.1 mM. A continuación, se registraron los espectros con diferentes equivalentes de Cu(II) (n = 0, 0.5, 1, 2, 3). En la Tabla 4.2 se recogen los valores obtenidos de

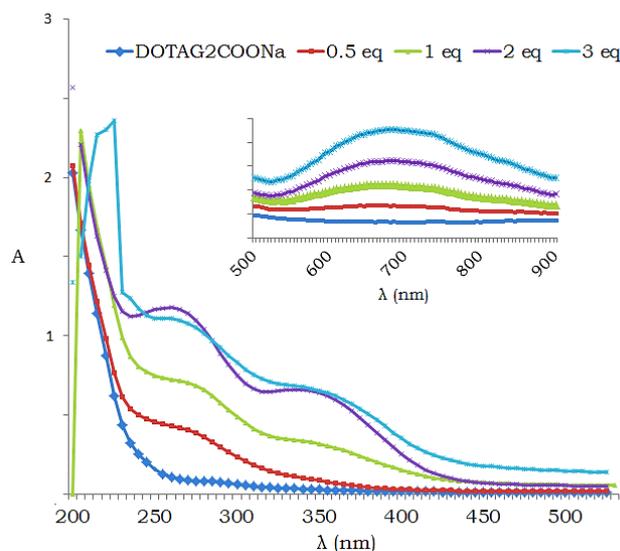
$\lambda_{\text{máx}}$  característicos en los espectros de absorción en el UV-Vis para los diferentes sistemas.

**Tabla 4.2** Absorción UV-Vis de los complejos formados por dendrones a diferentes concentraciones de Cu(II).

Dendrones	Equivalentes de Cu(II)	LMCT-MLCT (nm)	d-d (nm)
<b>68</b>	0.5	255	690
	1	250	670
	2	250, 330	685
	3	245, 330	690
	4	245, 330	690
<b>69</b>	0.5	270	-
	1	270, 350	690
	2	260, 345	695
	3	265, 350	695
<b>74</b>	0.5	255	-
	1	255	675
	2	255	680
	3	250	680
	4	250	680
<b>75</b>	0.5	245	660
	1	245	685
	2	245	700
	3	245	700
<b>83</b>	1	245	680
	2	245	685
	3	250	680
<b>84</b>	1	245	705
	2	245	680
	3	250	700
Valores de referencia	“CuO <sub>6</sub> ”: [Cu(OH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>2+</sup>	200-300	794
	“CuN <sub>6</sub> ”: [Cu(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>2+</sup>	200-300	578

**a) Dendrones con grupos carboxilato**

Los espectros de UV-Vis de los dendrones con grupos carboxilato periféricos (**68** y **69**) a bajas concentraciones de Cu(II), muestran bandas de transición d-d cercanas a  $\lambda_{\text{d-d}} = 700$  nm, datos alejados del valor observado para [Cu(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]<sup>2+</sup> ( $\lambda_{\text{d-d}} = 794$  nm). Esto sugiere la presencia de ambos átomos de O y N en la esfera de coordinación. Estos datos están de acuerdo con un entorno pseudooctaédrico<sup>35,36</sup>, bipirámide trigonal ( $\lambda_{\text{d-d}} = 666$  a  $1000$  nm)<sup>37,38,39</sup> o incluso un ambiente de pirámide de base cuadrada ( $\lambda_{\text{d-d}} = 526$ - $625$  nm).



**Figura 4.26** Espectros de UV -Vis del dendrón **69** con diferentes equivalentes de Cu(II).

De los datos obtenidos para estos compuestos, se puede deducir una geometría  $N_4O_2$ , donde los grupos axiales del entorno octaédrico pueden provenir de los grupos carboxilato del macrociclo o de alguna rama periférica del sistema.

Según el modelo de Prenesti y colaboradores,<sup>40</sup> es posible estimar el número y la naturaleza de los átomos donadores unidos a Cu(II). Este modelo tiene en cuenta dos situaciones:

- Una situación estructural *puramente ecuatorial*, es decir, una estructura plano cuadrada. En este caso, se utiliza la ecuación (1), y se obtiene una estimación de  $\lambda_{\max}$  mediante sumatorio de las contribuciones individuales de cada tipo de grupo dador. Estos valores son optimizados sobre la base de datos experimentales de espectros de absorción y tienen en cuenta que las dos posiciones axiales están ocupadas por dos moléculas de agua, obteniéndose así un octaedro distorsionado.

$$\lambda_{\max} = 10^3 / \sum_{i=1}^4 n_i \bar{\nu}_i \quad \bar{\nu}_i \text{ representa la contribución de cada grupo dador en el complejo de cobre} \quad (1)$$

- Una situación estructural *intermedia entre ecuatorial y axial*. En este caso, se incluyen la geometría octaédrica o pirámide de base cuadrada. El efecto

observado al sustituir moléculas de agua por grupos dadores a lo largo de las posiciones axiales es una disminución de las energías d-d, es decir un corrimiento hacia el rojo de  $\lambda_{\max}$ . El desplazamiento hacia el rojo es el cambio hacia mayores longitudes de onda de la absorción visible cuando un complejo Cu(II) con coordinación ecuatorial adquiere un ligando dador en una posición axial. El desplazamiento al rojo de un grupo dador se expresa como  $\Delta\lambda(\text{nm})/n = \{[\lambda_{\max}(\text{valor experimental}) - \lambda_{\max1}(\text{valor teórico})]/n\}$ , dónde n es el número de grupos dadores axiales.

**Tabla 4.3** Valores teóricos de  $\lambda_{\max1}$  y desplazamiento hacia el rojo considerando distintas posibilidades de coordinación de los dendrones [DO3A]G<sub>1</sub>X<sub>4</sub> frente a Cu(II), con una estequiometría 1:1.

Grupo donante en ecuatorial <sup>a</sup>	Grupo donante en axial <sup>a</sup>	$\lambda_{\max1}$ (nm) <sup>b</sup>	Desplazamiento o rojo para <b>68</b> ( $\lambda_{\max} = 670$ nm) por grupo dador <sup>c</sup>	Desplazamiento rojo para <b>74</b> ( $\lambda_{\max} = 675$ nm) por grupo dador <sup>c</sup>	Desplazamiento rojo para <b>83</b> ( $\lambda_{\max} = 680$ nm) por grupo dador <sup>c</sup>
1N <sub>a</sub> + 3N <sub>p</sub>	-----	517	-----	-----	-----
	2O <sub>co</sub>	517	77	79	82
1N <sub>a</sub> +2N <sub>p</sub> +1O <sub>c</sub>	-----	558	-----	-----	-----
o	1N <sub>p</sub> or 1O <sub>co</sub>	558	112	117	122
	1N <sub>p</sub> + 1O <sub>co</sub>	558	56	59	61
1N <sub>a</sub> +1N <sub>p</sub> +2O <sub>c</sub>	-----	606	-----	-----	-----
o	1N <sub>p</sub>	606	64	69	74
	2N <sub>p</sub>	606	32	35	37
3N <sub>p</sub> + 1O <sub>co</sub>	-----	544	-----	-----	-----
	1N <sub>a</sub> or 1O <sub>co</sub>	544	126	132	136
	1N <sub>a</sub> + 1O <sub>co</sub>	544	63	65	68
2N <sub>p</sub> + 2O <sub>co</sub>	-----	590	-----	-----	-----
	1N <sub>a</sub> or 1N <sub>p</sub>	590	80	85	90
	1N <sub>a</sub> + 1N <sub>p</sub>	590	40	43	45

<sup>a</sup>Símbolos para los grupos dadores: nitrógeno amino (N<sub>a</sub>); nitrógeno peptídico (N<sub>p</sub>); oxígeno carboxílico (O<sub>co</sub>). <sup>b</sup> $\lambda_{\max1}$  es el valor teórico calculado por el modelo de Prenesti. <sup>c</sup>Desplazamiento al rojo por grupo dador axial:  $\Delta\lambda$  (nm) /n, dónde n es el número de grupos dadores axiales.

En la Tabla 4.3 se recogen los datos teóricos obtenidos para distintas situaciones de coordinación de los sistemas analizados utilizando el modelo de Prenesti.

El análisis de los valores permite concluir las siguientes consideraciones:

(i) Valores de desplazamiento al rojo muy altos ( $>45$ ) quedan descartados por no ajustarse a los catalogados por Prenesti en sistemas modelo.

(ii) Por comparación, los valores aceptables de los grupos susceptibles de coordinación en el ligando  $[\text{DO3A}]_n\text{X}_4$  oscilan entre 30-45.

(iii) Entornos pentacoordinados quedan descartados por originar valores muy altos de corrimiento hacia el rojo por grupo.

(iv) Ligandos axiales de naturaleza  $[\text{2CO}]$ ,  $[\text{N}_p + \text{CO}]$  o  $[\text{N}_a + \text{CO}]$  quedan descartados al originar valores altos de corrimiento hacia el rojo por grupo.

(v) Los modos de coordinación ecuatorial y axial concordantes con el modelo son dos posibles:

a) Posiciones: ecuatorial:  $1\text{N}_a + 1\text{N}_p + 2\text{O}_{\text{co}}$  // axial:  $2\text{N}_p$

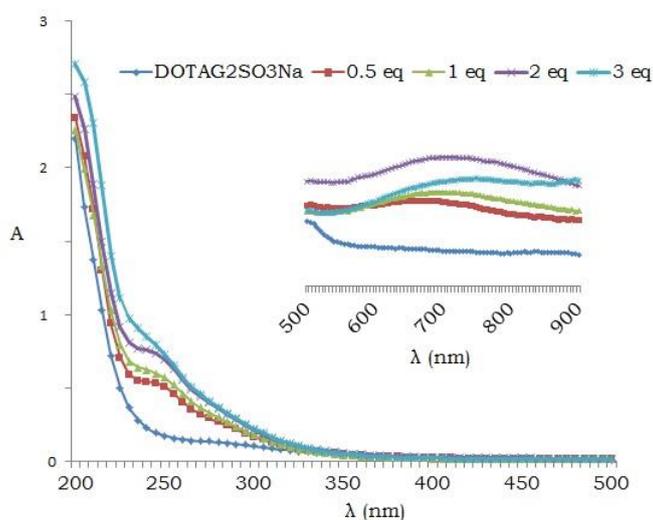
b) Posiciones: ecuatorial:  $2\text{N}_p + 2\text{O}_{\text{co}}$  // axial:  $1\text{N}_p + 1\text{N}_a$

Los resultados obtenidos para el compuesto con grupos carboxilato en la periferia (**68**), son extrapolables a los calculados para el derivado con grupos sulfonato (**74**) o amino (**83**) en la periferia, por lo que no serán tratados en las secciones correspondientes.

También se pueden observar las bandas de transferencia de carga ligando-metal N-Cu y O-Cu en el rango  $\lambda_{\text{max}} = 250\text{-}300$  nm superpuestas,<sup>41,42</sup> lo que indica que a bajas concentraciones de Cu(II), éstos iones metálicos están coordinados al macrociclo DO3A y no en la periferia. Sin embargo, al aumentar el número de equivalentes de Cu(II), se observó una nueva banda atribuida a la interacción S-Cu a  $\lambda_{\text{max}} = 350$  nm. Se puede intuir una estructura más rígida con iones Cu(II) atrapados en la periferia a través de átomos de azufre y oxígeno.

**b) Dendrones con grupos sulfonato**

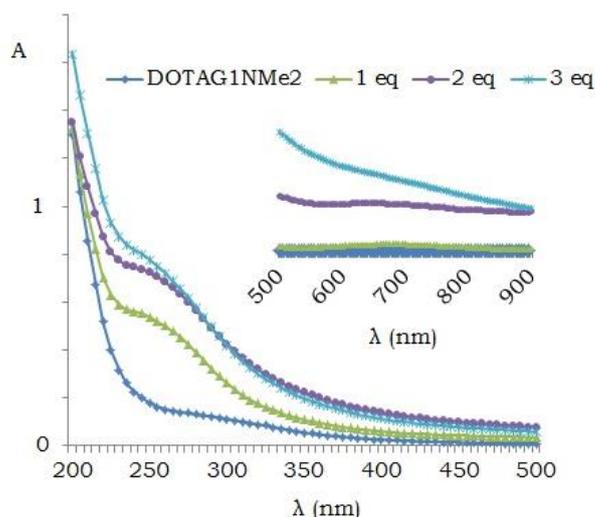
Análogamente, para los dendrones con grupos sulfonato **74** y **75**, a bajas concentraciones de Cu(II), se observaron las mismas bandas que para los sistemas **68** y **69**, aunque a mayores relaciones molares de Cu(II), la banda característica con la interacción con azufre no es observada. Esta observación indica una débil coordinación periférica sin la participación de heteroátomos en el entorno de coordinación.



**Figura 4.27** Espectros de UV -Vis del dendrón **75** con diferentes equivalentes de Cu(II).

**c) Dendrones con grupos amina**

En el caso de los dendrones terminados grupos amino **83** y **84**, se observó el mismo perfil que para los sistemas con grupos sulfonato, una falta de coordinación en la periferia tanto a bajas como a altas concentraciones de Cu(II). Este hecho puede ser atribuido a la protonación de los grupos amino terminales.



**Figura 4.28** Espectros de UV -Vis del dendrón **84** con diferentes equivalentes de Cu(II).

El diferente comportamiento mostrado en UV-Vis en los dendrones terminados en grupos carboxilato frente a aquellos con grupos sulfonato o amino, están de acuerdo con lo observado en la valoración potenciométrica anteriormente descrita y aclarado mejor por el análisis de RSE que se explicará en detalle en el siguiente apartado.

#### 4.2.4.2 Resonancia de espín electrónico (RSE)

La presencia de iones paramagnéticos de Cu(II) permite el estudio de estos complejos por RSE. Este estudio se realizó debido a una colaboración establecida con el grupo de la Dra. M. F. Ottaviani, en la Universidad de Urbino (Italia).

La espectroscopia de RSE ya había sido anteriormente utilizada en nuestro grupo de investigación para caracterizar diferentes complejos de Cu(II). Se han estudiado pequeños ligandos con átomos de N dadores que contienen grupos sulfonato o carboxilato.<sup>41</sup> Y también se han estudiado dendrímeros carboxilano con grupos sulfonato y carboxilato en la periferia que contienen átomos de N<sup>43</sup> o tioéteres.<sup>9</sup> Este tipo de ligandos proporcionan información detallada sobre los modos de coordinación, y permite compararlos con los modos de coordinación de los iones Cu(II) en los dendrones carboxilano iónicos sintetizados presentados en este Capítulo.

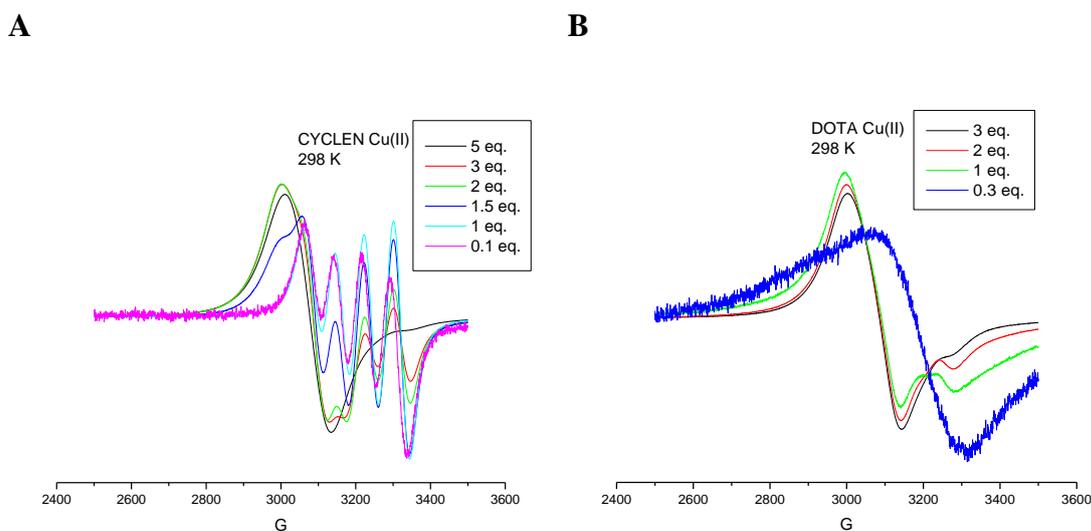
Los espectros de RSE se obtuvieron en disoluciones acuosas a 298 y 150 K para todos los dendrones con diferentes equivalentes de Cu(II). Los principales parámetros extraídos de los cálculos se encuentran registrados en la Tabla 4.4, y son los siguientes: (a) las componentes  $G_{II}$ , producidas por el acoplamiento entre el espín del electrón y el campo magnético; (b) el componente  $A_{zz}$ , debido al acoplamiento entre el espín del electrón y el espín nuclear de cobre ( $I_{Cu} = 3/2$ ), éstos parámetros  $G_{II}$  y  $A_{zz}$  reflejan la coordinación y la estructura de Cu(II) y (c) el tiempo de correlación ( $\tau$ ), que determina el movimiento de rotación de difusión de los complejos de Cu(II), e informa sobre la flexibilidad de la estructura compleja.

El análisis se fundamenta en el estudio comparativo con coordinaciones similares encontradas en bibliografía científica.<sup>32,41,44-49</sup>

**Tabla 4.4** Parámetros principales extraídos de los espectros de RSE por complejación de Cu(II) con diferentes ligandos, medidos a 298 K y 150 K.

Ligando	[Cu <sup>2+</sup> ] eq.	%	$g_{xx}$	$g_{yy}$	$g_{zz}$	$A_{zz}(x10^{-4} \text{ cm}^{-1})$	$\tau$ (ns)	Coord.
AGUA	todo	100	2.055	2.090	2.400	133.9	0.006	Cu-O <sub>4</sub>
CICLEN	<1	100	2.005	2.043	2.190	178.9	0.02	Cu-N <sub>4</sub>
DOTA	<0.5	100	2.030	2.090	2.280	145.8	0.17	Cu-N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cu-N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
	<1	100	2.013	2.048	2.253	172.5	0.23	Cu-N <sub>4</sub>
68	2	42	2.051	2.141	2.393	137.4	2.00	Cu-S <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<2	100	2.015	2.042	2.254	171.5	0.30	Cu-N <sub>4</sub>
69	4	55	2.051	2.141	2.393	137.4	2.00	Cu-S <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	<1	100	2.013	2.044	2.253	172.5	0.2	Cu-N <sub>4</sub>
74	1	85	2.020	2.055	2.260	169.9	0.28	Cu-N <sub>4</sub>
	<0.25	100	2.007	2.030	2.239	180.8	3.32	Cu-N <sub>4</sub>
75	0.25-1	100-80	2.015	2.042	2.253	171.5	0.30	Cu-N <sub>4</sub>
	83	<0.6	100	2.010	2.050	2.250	174.4	0.2
84	<0.6	100	2.020	2.062	2.260	168.8	1.87	Cu-N <sub>4</sub>

La estructura cristalina de DOTA-Cu(II) en estado sólido ha sido previamente descrita y revela una coordinación de los cuatro nitrógenos y una coordinación monodentada de dos grupos carboxilato.<sup>50</sup> Sin embargo, en disolución, todavía no está claro el papel de los grupos carboxilato en el sistema DOTA o DO3A con respecto a su participación en el proceso de formación de complejos. Para responder a esta pregunta, se realizaron los mismos experimentos con los productos de partida CYCLEN y DOTA, obteniéndose los espectros mostrados en la Figura 4.29.



**Figura 4.29** Espectros de RSE a 298 K de los ligandos comerciales A) CYCLEN y B) DOTA a diversas concentraciones de Cu(II).

Los parámetros observados en la Tabla 4.4 indican que los complejos Cu(II)-CYCLEN presentan un enlace Cu-N considerablemente más fuerte que el observado para los complejos Cu(II)-DOTA. La fuerte unión Cu-N en el complejo CYCLEN viene acompañada por una coordinación plano cuadrada Cu-N<sub>4</sub> poco distorsionada y un movimiento rápido a temperatura ambiente. Por el contrario, la unión débil en el complejo Cu-DOTA es debido a la unión con los grupos carboxilato unidos en el anillo macrocíclico en una situación similar a la del estado sólido. Los parámetros extraídos de cálculo (Tabla 4.4) para el complejo con DOTA en solución indican una coordinación Cu-N<sub>2</sub>(COO)<sub>2</sub>, o una estructura octaédrica axialmente comprimida Cu-N<sub>4</sub>-(COO)<sub>2</sub>, en donde los grupos carboxilato ocuparían las posiciones axiales.

El siguiente paso es estudiar la influencia de la presencia de la estructura dendrítica como sustituyente en el comportamiento de complejación de Cu(II) en el fragmento DO3A.

Todos los espectros que se van a mostrar a continuación son los espectros experimentales obtenidos a 298 K para diversas concentraciones de Cu(II) (se parte de una concentración de ligando 0.025 M y se van añadiendo diferentes equivalentes) coordinados a los sistemas de primera generación. Espectros similares se obtuvieron para las segundas generación.

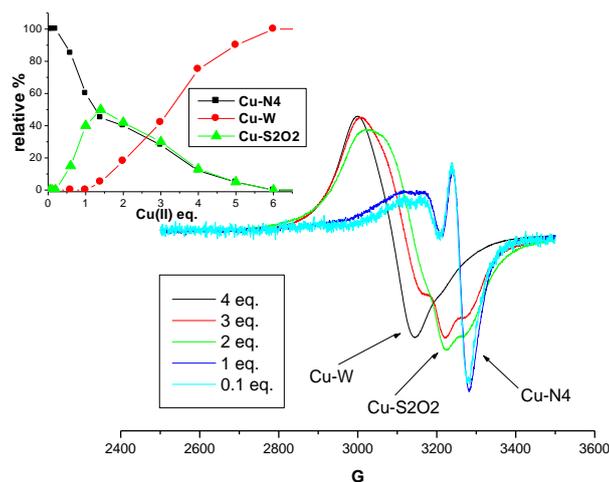
En los espectros se observan dos o más componentes que surgen de diferentes modos de coordinación de Cu(II).

En las siguientes figuras se pueden distinguir tres tipos de coordinación:

- Componente Cu-W (W significa agua): Esta coordinación se suele observar en presencia de concentraciones altas de Cu(II). Es una coordinación en la que la única componente es equivalente a la encontrada para el Cu(II) libre en agua  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  en ausencia de dendrones y ligandos.
- Componente Cu-N<sub>4</sub>: Esta coordinación indica que los iones Cu(II) se encuentran anclados en los nitrógenos del ligando DO3A. Esta situación se suele encontrar a concentraciones bajas de Cu(II), es decir, por debajo de 1 equivalente de Cu(II).
- Componente Cu-S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Esta coordinación indica que los iones Cu(II) se encuentran anclados en la periferia de los sistemas dendríticos.

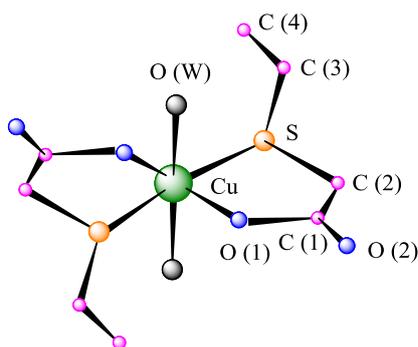
***a) Dendrones con grupos carboxilato***

Este tipo de sistemas como se puede observar en la Figura 4.30 muestra las tres componentes anteriormente descritas. Se observa como a bajas concentraciones de Cu(II) la coordinación es mayoritariamente en el macrociclo, pero entre 1 y 2 equivalente de Cu(II) ya se encuentra un elevado porcentaje de la componente Cu-S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, deduciéndose una coordinación en la periferia. Esta componente, se observa tanto a temperatura ambiente como a temperaturas bajas.



**Figura 4.30** Espectro de RSE de Cu(II) a diversas concentraciones coordinado al dendrón DO3AG<sub>1</sub>(SCOONa)<sub>2</sub> (**68**) a 298 K.

Esta situación es corroborada con la literatura científica.<sup>32,47-49,51,52</sup> Así, Ogawa y colaboradores<sup>51</sup> compararon los datos de EPR de Cu(II) con diversos ligandos (etiltioacetato, propiltioacetato e isopropiltioacetato) determinando su estructura cristalina en estado sólido por difracción de rayos X (Figura 4.31). Los dos primeros ligandos forman un anillo quelato de cinco miembros con un entorno pseudooctaédrico, mientras que isopropiltioacetato forma complejos más cercanos a una geometría plano cuadrada.



**Figura 4.31** Estructura cristalina del complejo etiltioacetato de Cu(II).

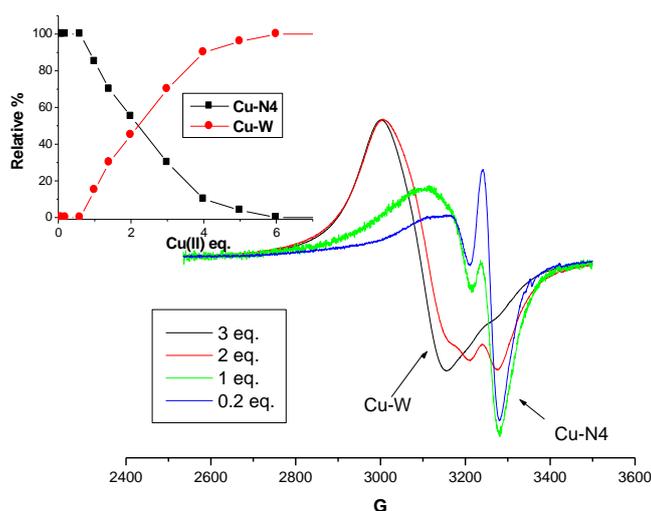
Los parámetros magnéticos obtenidos para el complejo dendrón **68**-Cu(II) muestran un sistema más cercano a una situación plano cuadrada Cu-S<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la periferia probablemente como consecuencia de la congestión estérica impuesta

por la estructura dendrítica. Los sitios de oxígeno en este complejo pueden venir de los grupos carboxilato o por moléculas de agua.

### b) Dendrones con grupos sulfonato

Por el contrario, para los sistemas con grupos sulfonato en la periferia, se puede observar solo la presencia de dos componentes, Cu-W y Cu-N<sub>4</sub> (Figura 4.32). Esto indica una situación diferente en la periferia con respecto a los sistemas carboxilato. En estos sistemas los átomos de S no participan en ninguna coordinación, lo que hace intuir que no hay coordinación en la periferia, o ésta es muy lábil.

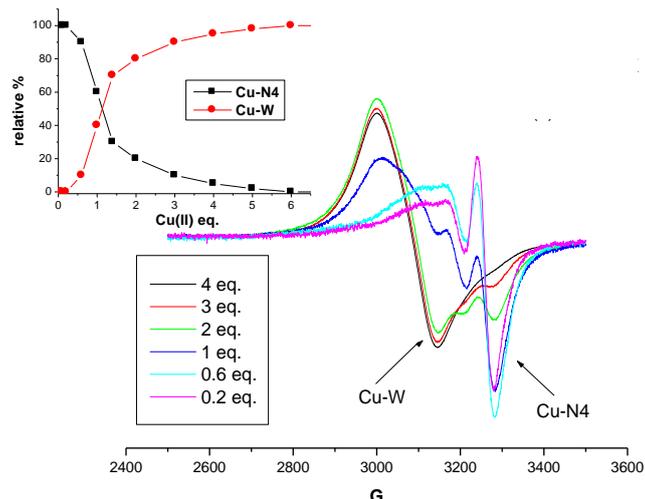
Estudios anteriores sobre dendrímeros PPI funcionalizados con grupos carboxilato y sulfonato mostraron que los grupos sulfonato interactúan menos que los análogos carboxilato.<sup>32</sup>



**Figura 4.32** Espectro de RSE de Cu(II) a diversas concentraciones coordinado al dendrón DO3AG<sub>1</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub> (**74**) a 298 K.

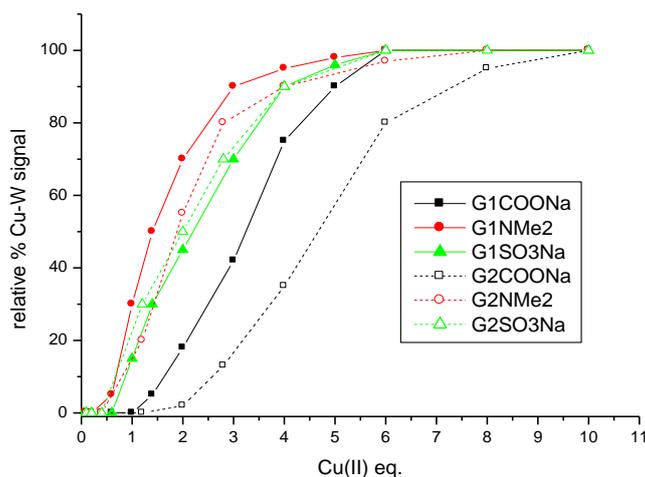
### c) Dendrones con grupos amina

Si se observa la Figura 4.33, se puede deducir un comportamiento similar al descrito para los sistemas sulfonato. De nuevo, solo se observan dos componentes, Cu-W y Cu-N<sub>4</sub>. Teniendo en cuenta el pH en el que se realiza el experimento, las aminas periféricas se encuentran cuaternizadas, permitiendo descartar una coordinación en la periferia de estos sistemas.



**Figura 4.33** Espectro de RSE de Cu(II) a diversas concentraciones coordinado al dendrón DO3AG<sub>1</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (**83**) a 298 K.

Cuando se produce la saturación de los sitios de coordinación por los iones Cu(II) en los diferentes dendrones, aparece el complejo Cu-W. Esta medida es una manera útil para caracterizar cuantitativamente los modos de coordinación de los dendrones de una manera comparativa. En la Figura 4.34 se comparan las variaciones de los porcentajes relativos de la coordinación Cu-W en función de los equivalentes de Cu(II) para los diferentes sistemas estudiados tanto de primera como de segunda generación.



**Figura 4.34** Porcentajes relativos de la coordinación Cu -W en función de los equivalentes de Cu(II) para los diferentes dendrones de generaciones 1 y 2.

A partir de este gráfico y de los parámetros obtenidos para los diferentes sistemas (Tabla 4.4), se pueden deducir varios aspectos que se comentarán a continuación.

Para las dos generaciones de los sistemas  $\text{DO3AG}_n(\text{SNMe}_2)_m$ , se observa una rápida saturación a 0.5 equivalentes de Cu (II) para ambas generaciones. En el dendrón de segunda generación (**84**), se observa un debilitamiento moderado de los enlaces Cu-N (una pequeña disminución en  $A_{zz}$  y aumento de  $g_{zz}$ ,<sup>32,41,44-46</sup>) (ver Tabla 4.4), tal vez producido tentativamente por el aumento de cargas positivas.

Para los sistemas  $\text{DO3AG}_n(\text{SSO}_3\text{Na})_m$ , la presencia de un mayor número de grupos aniónicos en la segunda generación (**75**) favorece una interacción más fuerte Cu-N (aumento de  $A_{zz}$ , disminución de  $g_{zz}$ ,<sup>25,34,37-39</sup> así como un descenso de la movilidad medido a través del parámetro  $\tau$ , véase también la Tabla 4.4) con respecto a la primera generación en presencia de concentraciones bajas de Cu(II). Esto provoca una ocupación más temprana del núcleo DO3A para la segunda generación. Sin embargo, al aumentar el contenido de Cu(II), ambos sistemas se comportan de forma similar.

Para los sistemas  $\text{DO3AG}_n(\text{SCOONa})_m$ , la aparición tardía de la componente Cu-W para el dendrón **69** (2 equivalentes de Cu(II)) con respecto a **68**, correlaciona muy bien con una clara participación de las ramas periféricas en la coordinación de iones Cu(II). La señal de Cu-S<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para **69** comienza a aparecer alrededor de 1.5 equivalentes de Cu(II) y aumenta progresivamente su porcentaje relativo hasta aproximadamente 4 equivalentes. Esto significa que para la segunda generación se necesita una mayor cantidad de Cu(II) para alcanzar la saturación. Por el contrario, para el dendrón **68**, la señal de Cu-S<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comienza justo por encima de 0.2 equivalentes y alcanza el porcentaje máximo en 1.5 equivalentes, motivado por la presencia de un menor número de sitios de coordinación en la periferia.

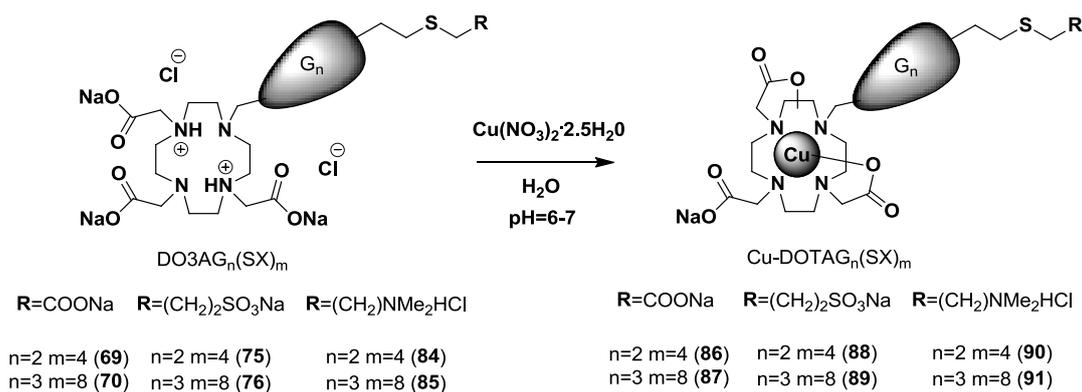
#### 4.2.5 Síntesis y caracterización de complejos metálicos de cobre

El ligando DO3A es capaz de formar complejos extremadamente estables con un gran número de iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Tc}^{3+}$ , etc).<sup>53</sup> Por lo que según la aplicación que se requiera, se puede utilizar un metal u otro.

En primer lugar, ya que se ha utilizado Cu(II) como sonda, se decidió aislar los complejos metálicos para estudiar si la presencia de este metal podría mejorar alguna propiedad biomédica. En la literatura científica se pueden encontrar sistemas con cobre que actúan como agentes antibacterianos, antivirales y antitumorales.<sup>54-56</sup>

##### Procedimiento sintético

A las disoluciones acuosas de los dendrones  $[\text{DO3A}]G_n(\text{SCOONa})_m$  ( $n = 2$ ,  $m = 4$  (**69**);  $n = 3$ ,  $m = 8$  (**70**)),  $[\text{DO3A}]G_n(\text{SSO}_3\text{Na})_m$  ( $n = 2$ ,  $m = 4$  (**75**);  $n = 3$ ,  $m = 8$  (**76**)) y  $\text{DO3A}G_n(\text{SNMe}_2)_m$  ( $n = 2$ ,  $m = 4$  (**84**);  $n = 3$ ,  $m = 8$  (**85**)) se añadió 1 equivalente de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ , manteniendo el pH entre 6 y 7. Las disoluciones acuosas se mantuvieron con agitación durante 30 minutos, tras los cuales se evaporó el disolvente a presión reducida y se purificaron los compuestos separándolos de las sales alcalinas por nanofiltración con membranas de celulosa de corte molecular  $M_{\text{WCO}} = 500$  y 1000 Da (Esquema 4.7).



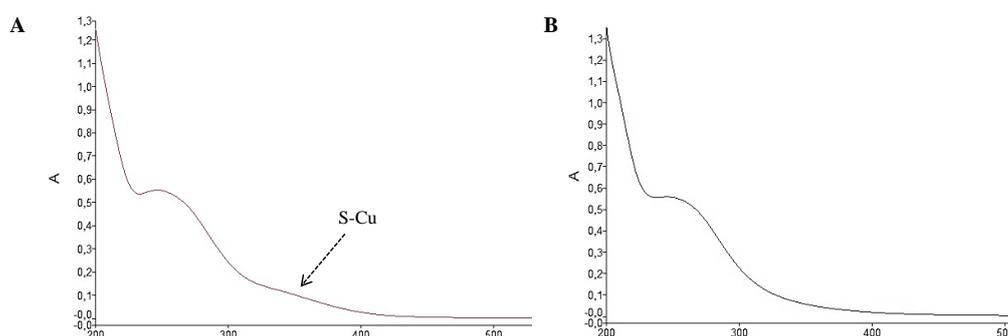
**Esquema 4.7** Síntesis de complejos metálicos de cobre (**86-91**).

Tras la eliminación del disolvente se obtuvieron los complejos de cobre  $\text{Cu-DOTAG}_n(\text{SX})_m$  ( $\text{X}=\text{COONa}$   $n=2$   $m=4$  (**86**) y  $n=3$   $m=8$  (**87**);  $\text{X}=\text{SO}_3\text{Na}$   $n=2$   $m=4$

(88) y n=3 m=8 (89); R=NMe<sub>2</sub>HCl n=2 m=4 (90) y n=3 m=8 (91) como sólidos de color verde, todos ellos con rendimientos moderados (70%).

### Caracterización estructural

Los compuestos preparados no pueden ser estudiados por RMN por la presencia del ión paramagnético Cu(II). Su caracterización se ha realizado por espectroscopia de absorción UV-Vis y análisis elemental. Los datos encontrados están de acuerdo con la estructura descrita en el esquema 4.7.

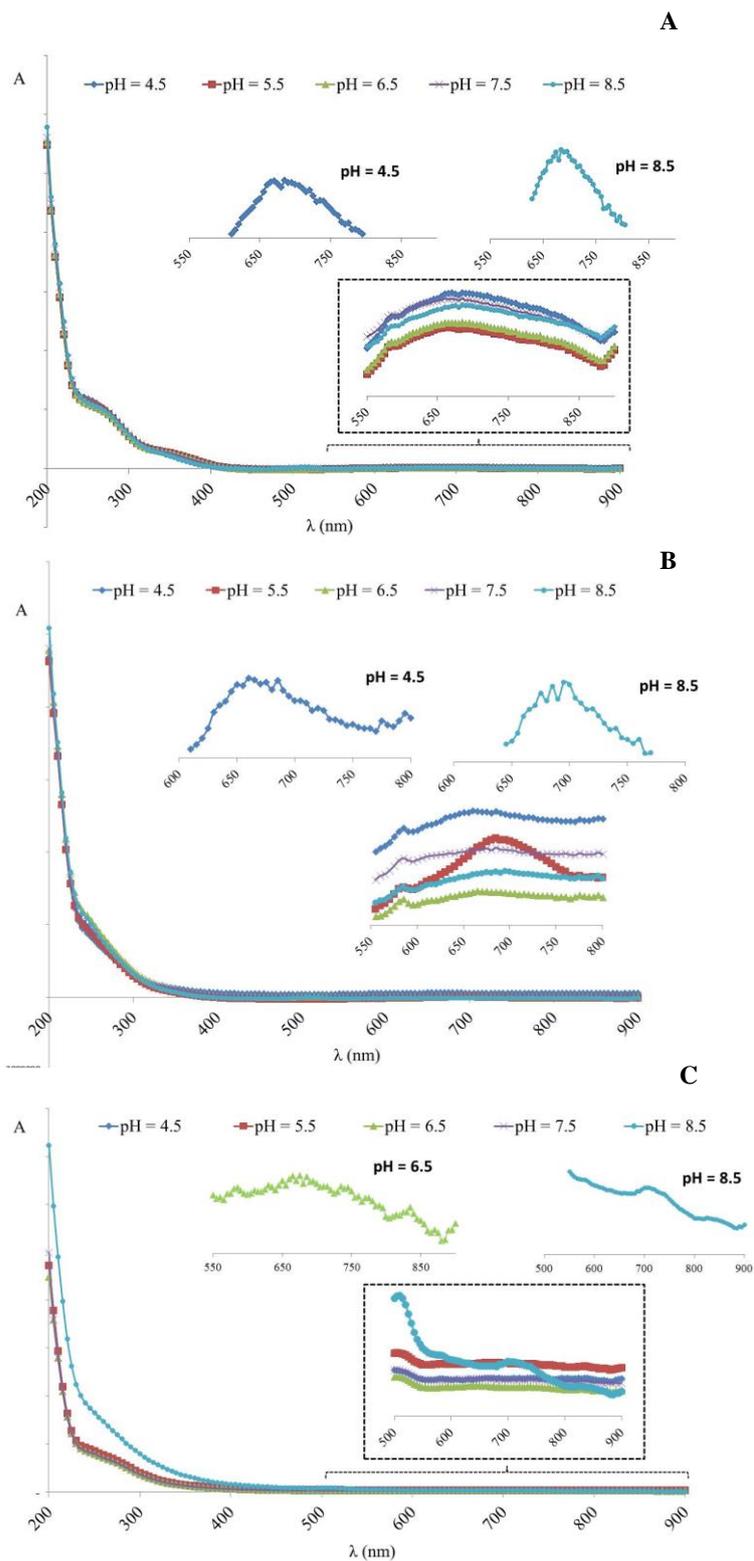


**Figura 4.35** Espectros de UV -Vis de los complejos Cu-DO3AG<sub>3</sub>(SX)<sub>8</sub> A) X=COONa (87) y B) X=SO<sub>3</sub>Na (89).

Los espectros de UV-VIS de los complejos sintetizados siguen el mismo patrón que los espectros mostrados en la parte de caracterización de UV-Vis (apartado 4.2.4.2). Es importante mencionar que al utilizar una estequiometría 1:1 para preparar los complejos de Cu(II), en los dendrones sulfonato no se observa coordinación en la periferia. Sin embargo, en el caso de los dendrones con grupos carboxilato se puede intuir la banda S-Cu, lo que permite deducir que la mayor parte de Cu(II) se encontrara coordinado al sistema DO3A, pero pudiendo existir una pequeña proporción situada en la periferia.

### Estudios de estabilidad

Se realizaron estudios de estabilidad de los complejos sintetizados (86-91), modificando varias condiciones (tiempo, temperatura y pH), evaluándose por la reproducibilidad de los espectros de UV-Vis. Estos datos se deben considerar por sí mismo como una prueba de la estabilidad de estos complejos, lo cual es fundamental para su uso biomédico.



**Figura 4.36** Espectros de UV-Vis a diferentes pH de los complejos Cu-DO3AG<sub>2</sub>(SX)<sub>4</sub> A) X = COONa (**86**), B) X = SO<sub>3</sub>Na (**88**) y C) X = NMe<sub>2</sub>HCl (**90**).

No se observaron cambios durante dos semanas y a temperaturas inferiores a 50°C para todos los complejos metálicos preparados. Respecto al pH, los

sistemas con grupos carboxilato son estables en un rango de 4.5 a 8.5, mientras que en los sistemas con grupos sulfonato se empieza a observar cierta descomposición a un pH de 8.5. Para los dendrones con grupos amino, a pH 8.5 se observa una turbidez debida a la desprotonación de los grupos amino de la periferia (Figura 4.36).

### 4.3 BIBLIOGRAFIA

- (1) Svenson, S.; Tomalia, D. A. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2106.
- (2) Zolotarskaya, O. Y.; Xu, L.; Valerie, K.; Yang, H. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 58600.
- (3) Fu, F.; Wu, Y.; Zhu, J.; Wen, S.; Shen, M.; Shi, X. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 16416.
- (4) Zheng, Y.; Fu, F.; Zhang, M.; Shen, M.; Zhu, M.; Shi, X. *MedChemComm* **2014**, *5*, 879.
- (5) Luo, K.; Liu, G.; She, W.; Wang, Q.; Wang, G.; He, B.; Ai, H.; Gong, Q.; Song, B.; Gu, Z. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7951.
- (6) Shaunak, S.; Thomas, S.; Gianasi, E.; Godwin, A.; Jones, E.; Teo, I.; Mireskandari, K.; Luthert, P.; Duncan, R.; Patterson, S.; Khaw, P.; Brocchini, S. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 977.
- (7) Luo, K.; Liu, G.; She, W.; Wang, Q.; Wang, G.; He, B.; Ai, H.; Gong, Q.; Song, B.; Gu, Z. *Biomaterials* **2011**, *32*, 7951.
- (8) Hourani, R.; Kakkar, A. *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 947.
- (9) Tesis Doctoral, Marta Galán, Alcalá de Henares, **2013**.
- (10) Tesis Doctoral, Elena Fuentes-Paniagua, Alcalá de Henares, **2014**.
- (11) Kose, M. M.; Onbulak, S.; Yilmaz, I. I.; Sanyal, A. *Macromolecules* **2011**, *44*, 2707.
- (12) Fuentes-Paniagua, E.; Serramia, J.; Sánchez-Nieves, J.; Álvarez, S.; Muñoz-Fernández, A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Eur. Polym. J.* **2015**, *71*, 61.
- (13) Galán, M.; Fuentes-Paniagua, E.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Organometallics* **2014**, *33*, 3977.
- (14) El Kazzouli, S.; El Brahmi, N.; Mignani, S.; Bousmina, M.; Zablocka, M.; Majoral, J. P. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4995.
- (15) Manzoni, L.; Belvisi, L.; Arosio, D.; Bartolomeo, M. P.; Bianchi, A.; Brioschi, C.; Buonsanti, F.; Cabella, C.; Casagrande, C.; Civera, M.; De Matteo, M.; Fugazza, L.; Lattuada, L.; Maisano, F.; Miragoli, L.; Neira, C.; Pilkington-Miksa, M.; Scolastico, C. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1084.
- (16) Muthu, M. S.; Leong, D. T.; Mei, L.; Feng, S. S. *Theranostics* **2014**, *4*, 660.
- (17) Sagir, T.; Isik, S.; Senel, M. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 4867.
- (18) De León-Rodríguez, L. M.; Kovacs, Z. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 391.
- (19) Sung, S.; Holmes, H.; Wainwright, L.; Toscani, A.; Stasiuk, G. J.; White, A. J. P.; Bell, J. D.; Wilton-Ely, J. D. E. T. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 1989.
- (20) Wadas, T. J.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Anderson, C. J. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2858.
- (21) Bruckman, M. A.; Jiang, K.; Simpson, E. J.; Randolph, L. N.; Luyt, L. G.; Yu, X.; Steinmetz, N. F. *Nano Lett.* **2014**, *14*, 1551.
- (22) Liu, Q.; Chen, S.; Chen, J.; Du, J. *Macromolecules* **2015**, *48*, 739.
- (23) Mustafa, S.; Elgazzar, A. H. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 801.

- (24) Stott Reynolds, T. J.; Schehr, R.; Liu, D.; Xu, J.; Miao, Y.; Hoffman, T. J.; Rold, T. L.; Lewis, M. R.; Smith, C. J. *Nucl. Med. Biol.* **2015**, *42*, 99.
- (25) Bacher, F.; Enyedy, E. A.; Nagy, N. V.; Rockenbauer, A.; Bogнар, G. M.; Trondl, R.; Novak, M. S.; Klapproth, E.; Kiss, T.; Arion, V. B. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 8895.
- (26) Kono, K.; Nakashima, S.; Kokuryo, D.; Aoki, I.; Shimomoto, H.; Aoshima, S.; Maruyama, K.; Yuba, E.; Kojima, C.; Harada, A.; Ishizaka, Y. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1387.
- (27) Dijkgraaf, I.; Rijnders, A. Y.; Soede, A.; Dechesne, A. C.; Van Esse, G. W.; Brouwer, A. J.; Corstens, F. H. M.; Boerman, O. C.; Rijkers, D. T. S.; Liskamp, R. M. J. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 935.
- (28) Fuentes-Paniagua, E.; Pena-González, C. E.; Galán, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Sánchez-Nieves, J. *Organometallics* **2013**, *32*, 1789.
- (29) Jamous, M.; Haberkorn, U.; Mier, W. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 6810.
- (30) Keire, D. A.; Kobayashi, M. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 454.
- (31) Programa Marvin, Términos Calculadora plugin y químicas Demo.
- (32) García-Gallego, S.; Cangiotti, M.; Fiorani, L.; Fattori, A.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; Ottaviani, M. F.; de la Mata, F. J. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 5874.
- (33) van Duijvenbode, R. C.; Rajanayagam, A.; Koper, G. J. M.; Baars, M. W. P. L.; de Waal, B. F. M.; Meijer, E. W.; Borkovec, M. *Macromolecules* **2000**, *33*, 46.
- (34) Sevcik, R.; Vanek, J.; Lubal, P.; Kotkova, Z.; Kotek, J.; Hermann, P. *Polyhedron* **2014**, *67*, 449.
- (35) Kurdziel, K.; Glowiak, T. *Polyhedron* **2000**, *19*, 2183.
- (36) Papish, E. T.; Taylor, M. T.; Jernigan, F. E., III; Rodig, M. J.; Shawhan, R. R.; Yap, G. P. A.; Jove, F. A. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 2242.
- (37) Hathaway, B. J.; Dudley, R. J.; Nicholls, P. *J. Chem. Soc. A* **1969**, 1845.
- (38) Hathaway, B. J.; Procter, I. M.; Slade, R. C.; Tomlinson, A. A. G. *J. Chem. Soc. A* **1969**, 2219.
- (39) Kurosaki, H.; Koike, H.; Omori, S.; Ogata, Y.; Yamaguchi, Y.; Goto, M. *Inorg. Chem. Commun.* **2004**, *7*, 1229.
- (40) Prenesti, E.; Daniele, P. G.; Berto, S.; Toso, S. *Polyhedron* **2006**, *25*, 2815.
- (41) García-Gallego, S.; Rodríguez, J. S.; Jiménez, J. L.; Cangiotti, M.; Ottaviani, M. F.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6488.
- (42) Leong, W. L.; Vittal, J. J. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2011**, *71*, 557.
- (43) Galán, M.; Sánchez-Rodríguez, J.; Cangiotti, M.; García-Gallego, S.; Jiménez, J. L.; Gómez, R.; Ottaviani, M. F.; Muñoz-Fernández, M. A.; de la Mata, F. J. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4984.
- (44) Ottaviani, M. F.; Bossmann, S.; Turro, N. J.; Tomalia, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 661.
- (45) Ottaviani, M. F.; Cangiotti, M.; Fattori, A.; Coppola, C.; Lucchi, S.; Ficker, M.; Petersen, J. F.; Christensen, J. B. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 14163.

- (46) Ottaviani, M. F.; Cangiotti, M.; Fattori, A.; Coppola, C.; Posocco, P.; Laurini, E.; Liu, X.; Liu, C.; Fermeiglia, M.; Peng, L.; Pricl, S. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 685.
- (47) Xie, Y.; Riedinger, A.; Prato, M.; Casu, A.; Genovese, A.; Guardia, P.; Sottini, S.; Sangregorio, C.; Miszta, K.; Ghosh, S.; Pellegrino, T.; Manna, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 17630.
- (48) Addison, A. W. *Copper Coordination Chemistry: Bio-chemical and Inorganic Perspectives*, Adenine Press:Guilderland, New York 1983.
- (49) Solomon, E. I. H., M. A. *Inorganic Electronic Structure and Spectroscopy, Volume II: Applications and Case Studies*, John Wiley & Sons, New York, 2006.
- (50) Riesen, A.; Zehnder, M.; Kaden, T. A. *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 2067.
- (51) Ogawa, T.; Shimoi, M.; Ouchi, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 126.
- (52) Kneubuhl, F. K. *J. Chem. Phys.* **1960**, *33*, 1074.
- (53) Stasiuk, G. J.; Long, N. J. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2732.
- (54) Ottaviani, M. F.; El Brahmī, N.; Cangiotti, M.; Coppola, C.; Buccella, F.; Cresteil, T.; Mignani, S.; Caminade, A. M.; Costes, J. P.; Majoral, J. P. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 36573.
- (55) García-Gallego, S.; Diaz, L.; Jiménez, J. L.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Muñoz-Fernández, M. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *98*, 139.
- (56) Ramesh, S.; Giribabu, K.; Kumar, S. P.; Manigandan, R.; Narayanan, V. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7*, 793.



## **CAPÍTULO 5**

---

# APLICACIONES BIOMÉDICAS



## 5.1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En el campo de la biomedicina, se requieren sistemas que sean principalmente solubles en agua y que sean relativamente inertes, con el objetivo de evitar reacciones secundarias en el organismo, ofreciendo de esta manera una adecuada biocompatibilidad. La estabilidad de los sistemas dendríticos, su flexibilidad sintética, junto con su alta concentración local de grupos funcionales, los convierten en candidatos ideales para su posible utilización en diferentes aplicaciones biomédicas.

A lo largo de esta Memoria se han sintetizado sistemas dendríticos catiónicos y aniónicos, por lo que a continuación se ha realizado una revisión de sus posibles aplicaciones dependiendo de la naturaleza de su grupo funcional, pero haciendo especial énfasis en aquellas en las cuales se han aplicado.

### 5.1.1 Sistemas dendríticos catiónicos en aplicaciones biomédicas

En general, los sistemas catiónicos se están utilizando a dos niveles, por un lado como agentes terapéuticos por sí mismos, y por otro, como agentes transportadores de moléculas de interés biológico.

#### 5.1.1.1 Sistemas catiónicos como agentes terapéuticos

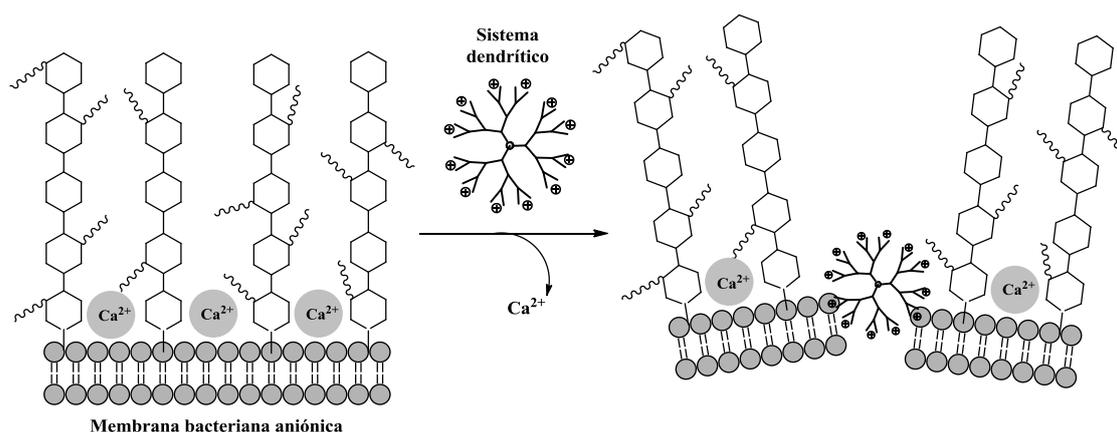
Los sistemas catiónicos poseen actividad biocida frente a bacterias y parásitos, aunque los microorganismos más comúnmente tratados han sido las bacterias.<sup>1-3</sup> También se encuentran interesantes estudios que demuestran su capacidad como agentes antipriónicos.<sup>4</sup>

##### *a) Sistemas catiónicos como agentes antibacterianos*

En los últimos años, el uso extendido y abusivo de antibióticos en países desarrollados, ha contribuido a la aparición de resistencias bacterianas, lo que ha forzado la búsqueda de nuevas estrategias para combatir estas infecciones.<sup>5</sup> Una de las posibles alternativas es el uso de sales de amonio cuaternarias (QAS), las cuales presentan una capacidad antibacteriana de amplio espectro contra bacterias Gram + y Gram -.<sup>6,7</sup> En general, el mecanismo de acción de este tipo de

sistemas catiónicos consiste en la adhesión y daño a la membrana bacteriana aniónica y provocar así la lisis bacteriana (Figura 5.1). Se trata de un mecanismo inespecífico, lo que evita en muchas ocasiones la aparición de resistencias.

La incorporación de los grupos amonio en una superficie dendrítica genera macromoléculas con una superficie altamente cargada.<sup>8</sup> Se han estudiado diferentes tipos de sistemas dendríticos, entre ellos, dendrímeros<sup>9</sup> y polímeros hiperramificados,<sup>10</sup> todos ellos funcionalizados con grupos amonio, obteniéndose resultados prometedores en todos los casos. Son sistemas no volátiles, presentan estabilidad química y una mayor actividad terapéutica a largo plazo en comparación con las moléculas pequeñas utilizadas en este campo.<sup>11</sup> Además, normalmente son solubles en agua, permitiendo matar las bacterias en este medio.



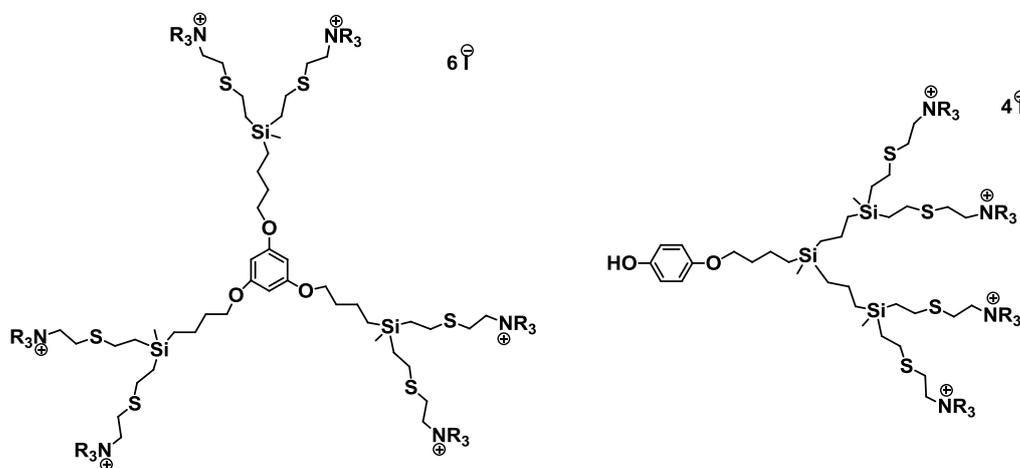
**Figura 5.1** Mecanismo propuesto para la actividad antibacteriana de compuestos dendríticos catiónicos.

Si los grupos funcionales son los que presentan la actividad terapéutica, es de esperar que ésta aumente con la concentración de los mismos. No obstante, el tamaño y topología del sistema dendrítico es importante, ya que se ha demostrado que la actividad de los mismos se basa en la interacción con diferentes membranas celulares, para lo que sistemas muy impedidos estéricamente podrían tener mayor dificultad para ejercer la acción terapéutica. Por lo tanto, sistemas más grandes podrían originar una menor actividad, a pesar de poseer un mayor número de cargas en la periferia dendrítica. Debido a esta

controversia entre tamaño y multivalencia, ha surgido la necesidad de intentar establecer algunas tendencias, evaluando la influencia del esqueleto dendrítico, factores como el núcleo dendrítico, el tipo de grupos periféricos, su carga o su estructura tridimensional.<sup>12</sup> Otros factores como la biopermeabilidad, la polidispersidad, la naturaleza de los contraiones o el balance hidrofilia/hidrofobia también puede influir en su actividad o mecanismo de acción.<sup>13,14</sup>

**b) Sistemas catiónicos de tipo carbosilano como agentes antibacterianos**

En nuestro grupo de investigación se han sintetizado dendrímeros carbosilano y polímeros hiperramificados con grupos amonio en la periferia, los cuales presentan buenas actividades como agentes antimicrobianos.<sup>15,16</sup> Más recientemente, se han utilizado rutas sintéticas más sencillas (click tiol-eno) obteniéndose dendrímeros esféricos similares,<sup>17</sup> y dendrones con grupos amonio en la periferia y distintos grupos en el punto focal.<sup>18,19</sup> Se han comparado sistemas de diferente núcleo, punto focal, generación, topología y naturaleza de grupo funcional.



**Figura 5.2** Estructuras de los sistemas carbosilano con mejores propiedades para su uso como agentes antibacterianos.

Hasta ahora, los sistemas más desarrollados son los mostrados en la Figura 5.2, un dendrímero esférico de primera generación y un dendrón de segunda generación con un grupo fenol en el punto focal. Ambos presentan buenas actividades pero además han mostrado no generar resistencias.<sup>20</sup>

### 5.1.1.2 Sistemas catiónicos como agentes de transporte

Muchas moléculas de interés biológico son incapaces de llegar con eficacia al tejido celular donde ejercen su efecto terapéutico. Esto puede ser debido a numerosas causas: baja solubilidad en medios acuosos, falta de especificidad tisular, degradación en medios biológicos, incapacidad para atravesar barreras biológicas, etc. Para evitar estos problemas se han estudiado diferentes sistemas de transporte. En el Capítulo 1 se realizó un análisis más en detalle de sistemas de transporte de fármacos, en este apartado se va a tratar más en profundidad el transporte de material genético, es decir, macromoléculas como agentes de transfección.

En los últimos años ha habido un gran interés en el uso de material genético para el desarrollo de tratamientos contra virus, cáncer o trastornos genéticos, entre otros.<sup>21</sup> Dicho tratamiento puede realizarse por modificación de la expresión de un gen, por sustitución o reparación de un gen erróneo, por alteración directa de su expresión o mediante la utilización de material genético con propiedades terapéuticas *per se*.<sup>22</sup>

No obstante, los oligonucleóticos presentan baja resistencia a la degradación enzimática y baja permeabilidad a través de la membrana celular, factores que han restringido su aplicación *in vivo*. Consecuentemente, la obtención de sistemas de transporte que protejan al material nucleico de la degradación en el torrente sanguíneo y facilite su entrada a las células, es uno de los principales retos en su aplicación terapéutica. Los agentes transportadores pueden clasificarse en dos grupos: (i) vectores de tipo viral, prácticamente en desuso debido a la generación de respuesta inmune o de mutagénesis y (ii) vectores de tipo no viral, entre los que se encuentran los liposomas, polímeros y sistemas dendríticos.

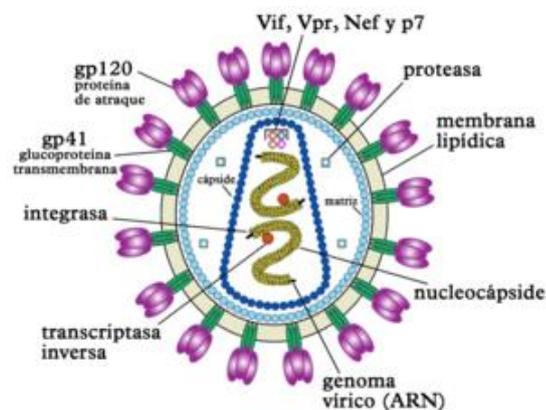
#### a) *Sistemas catiónicos como agentes de transfección: VIH*

Una de las enfermedades candidatas a ser tratadas por medio de terapia génica es el sida. A pesar de los continuos avances en el tratamiento y prevención del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el síndrome de

inmunodeficiencia adquirida (SIDA), actualmente la pandemia VIH/SIDA representa un problema importante y sin resolver en nuestra sociedad.<sup>23</sup>

### Estructura del VIH y mecanismo de infección

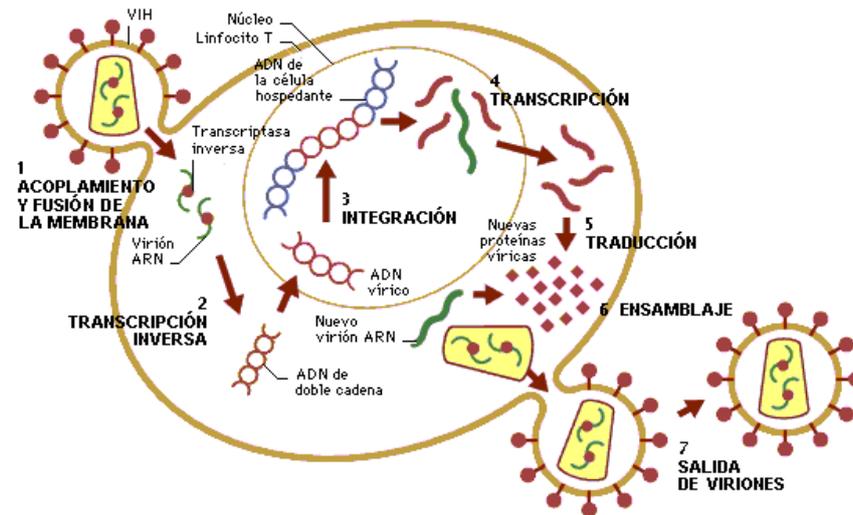
El VIH presenta una estructura globular con un diámetro medio de 100-120 nm. La cubierta externa del virión está formada por una bicapa de fosfolípidos donde se ancla el complejo proteico formado por la asociación de las proteínas gp120 y gp41.<sup>24</sup> La interacción entre ambas es de naturaleza no covalente, formando trímeros de modo que la proteína gp41 queda anclada en la bicapa y gp120 queda en el exterior del virus (Figura 5.3).<sup>25,26</sup>



**Figura 5.3** Estructura esquematizada del VIH.<sup>27</sup>

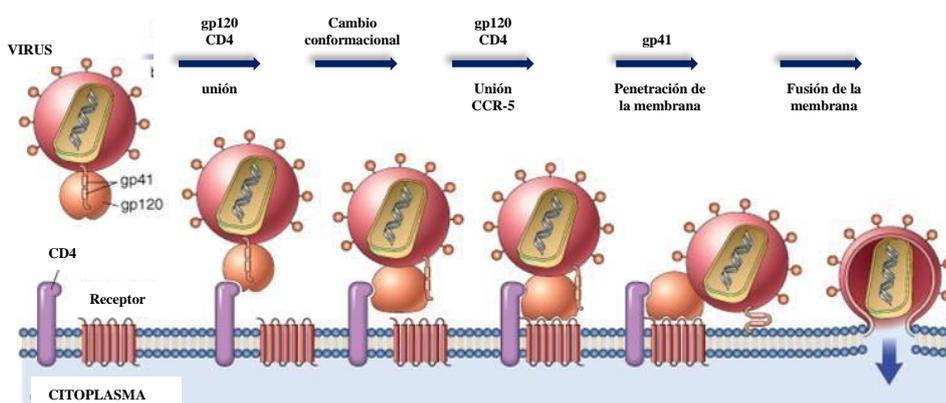
En el interior del virión hay una cápside formada por la proteína p24 que protege dos copias de ARN asociadas a diversas proteínas, incluidas la transcriptasa inversa y la integrasa que cumplen funciones esenciales en la replicación viral.<sup>28</sup>

El ciclo replicativo del VIH puede simplificarse en siete etapas recogidas en la Figura 5.4:<sup>29</sup>



**Figura 5.4** Representación esquematizada del ciclo replicativo del VIH.<sup>30</sup>

1. Acoplamiento y fusión: La infección comienza con la unión específica de la proteína gp120 de la cubierta viral a los receptores CD4 en la membrana celular, que se expresan de forma mayoritaria en células T (CD4+), macrófagos y células dendríticas del sistema inmune. Esta unión provoca cambios conformacionales en la proteína gp120 que permiten su interacción con los correceptores de la membrana celular CXCR4 (en células T) o CCR5 (en macrófagos) (Figura 5.5).



**Figura 5.5** Unión del VIH a la membrana celular.

2. Transcripción inversa: Mediante la acción de la transcriptasa inversa, la cadena simple de ARN viral se transforma en una doble cadena de ADN vírico.

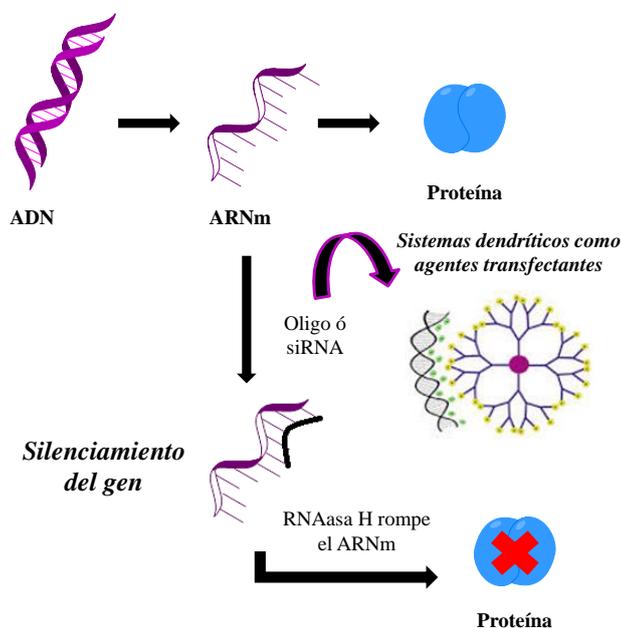
3. Integración: Utilizando los orgánulos celulares de la célula huésped, el ADN viral se traslada al núcleo celular donde se incorpora al ADN de la célula gracias a la enzima integrasa. Se forma el provirus.
4. Transcripción: El provirus es capaz de utilizar las enzimas de la célula anfitriona para crear nuevas copias del material genético del virus así como generar ARN mensajero (ARNm).
5. Traducción: ARNm es utilizado para formar las proteínas del virión.
6. Ensamblaje: Los diferentes componentes generados en el citosol se unen formando una nueva partícula de virus.
7. Salida de viriones: El nuevo virus ensamblado sale de la célula anfitriona.

La infección viral conduce a la muerte de las células T, y por tanto a un debilitamiento del sistema inmune del paciente, que se hace susceptible al ataque de enfermedades oportunistas capaces de causar su muerte.

En la actualidad, los pacientes son tratados mediante la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), que consiste en una combinación de, como mínimo, de tres fármacos de al menos dos clases distintas de agentes antirretrovirales que afectan a diferentes etapas. Este tratamiento suprime la carga viral en plasma hasta niveles indetectables por los métodos habituales utilizados en la clínica y produce una recuperación de las células T CD4+.<sup>31</sup> Sin embargo, este tratamiento es de por vida debido a que no consigue erradicar el VIH, lo que conlleva la aparición de resistencias virales y un alto número de efectos secundarios.<sup>32</sup> Además, presenta altos costes económicos impidiendo su uso generalizado, estando en buena medida limitado a los países desarrollados. En estos países, el sector femenino es el más desfavorecido debido a su estatus económico y sociocultural.<sup>33</sup> Por lo tanto, la investigación acerca del VIH-1 continúa siendo un reto para mejorar las terapias actuales.

Una estrategia prometedora para el tratamiento de esta enfermedad es el silenciamiento de genes, que consiste en un proceso de control de la expresión génica mediante el silenciamiento de un gen por interferencia de una secuencia

específica. Esta metodología fue descubierta por Fire y Mello en 1998 cuando consiguieron silenciar ciertos genes en *Caenorhabditis elegans* (Figura 5.6).<sup>34</sup> Normalmente, se emplean oligonucleótidos antisentido o ARN de interferencia pequeños (siARN).<sup>35,36</sup>

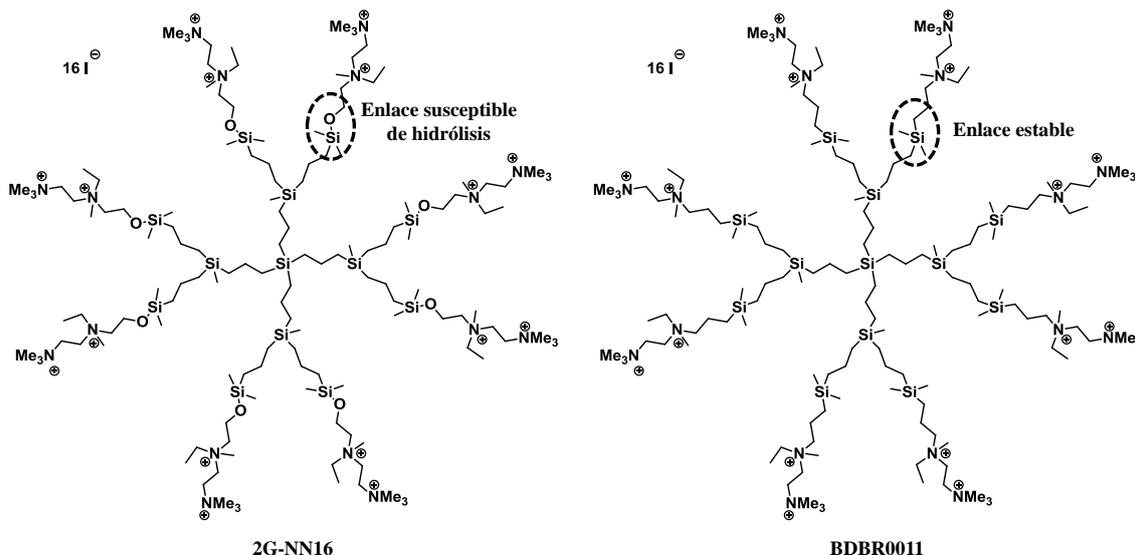


**Figura 5.6** Representación esquematizada del silenciamiento de genes.

En el tratamiento para VIH, la mayoría de las células susceptibles a la infección, como los linfocitos T CD4+, son muy difíciles de transfectar. Como agentes transfectantes de siRNAs, se han utilizado sistemas como nanotubos de carbono,<sup>37</sup> polímeros,<sup>38</sup> dendrímeros<sup>39</sup> y liposomas<sup>40</sup> en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos T. Dentro de los dendrímeros, los más ampliamente utilizados como transfectantes han sido los sistemas tipo PAMAM,<sup>41</sup> PPI<sup>42</sup> y los basados en átomos de fósforo.<sup>43</sup>

***b) Sistemas catiónicos de tipo carbosilano como agentes de transfección***

En nuestro grupo de investigación se han utilizado dendrímeros de esqueleto carbosilano con aminos cuaternizadas en la superficie como agentes de transporte no virales, ya que la naturaleza hidrofóbica del esqueleto carbosilano podría favorecer la biopermeabilidad y la interacción de los dendrímeros con la membrana celular, permitiendo el transporte del material genético hacia el citoplasma.<sup>44</sup>



**Figura 5.7** Estructuras de los dendrímeros carbosilano más ampliamente usados como agentes transfectantes.

El sistema más utilizado como agente transfectante es el dendrímero esférico 2G-NN16 (Figura 5.7). Se trata de un sistema biocompatible y capaz de llevar a cabo una transfección eficiente en diversas líneas celulares (CMSP, SupT1, U87MG, JAR, etc) que juegan un papel clave en la infección por VIH-1.<sup>45,46</sup> Este sistema presenta excelentes propiedades, pero su inestabilidad debido a la presencia del enlace Si-O hace complicada su manipulación, por lo que se han diseñado sistemas análogos estables. Entre ellos, se encuentra el dendrímero BDBR0011, en el que se han sustituido los enlaces Si-O por enlaces Si-C (Figura 5.7).

Estos sistemas también se han estudiado como transportadores de péptidos inmunogénicos frente al VIH para la generación de vacunas terapéuticas.<sup>47</sup>

### 5.1.2 Sistemas dendríticos aniónicos en aplicaciones biomédicas

Los derivados aniónicos poseen propiedades antivirales frente a la gripe,<sup>48</sup> al herpes virus (HSV)<sup>49</sup> o al VIH-1,<sup>50</sup> entre otros.

**a) Sistemas aniónicos como agentes antivirales: VIH**

En el caso del VIH, en ausencia de una vacuna preventiva<sup>51</sup> y los problemas asociados a las terapias actuales (resistencias, efectos secundarios, alto coste económico, etc.),<sup>52</sup> se ha apostado por nuevos métodos alternativos de profilaxis, que se basan en microbicidas tópicos que actúan sobre los primeros pasos de la infección.<sup>53</sup> Los primeros candidatos a microbicidas contra el VIH estudiados fueron: (i) surfactantes, que destruyen los patógenos de la superficie mediante la destrucción de las membranas; (ii) tampones ácidos, que mantienen la flora vaginal y (iii) polímeros aniónicos, que inhiben la entrada de los patógenos.<sup>54</sup> Hasta la fecha, la mayoría de los microbicidas no específicos no han demostrado su eficacia en ensayos clínicos.<sup>55</sup>

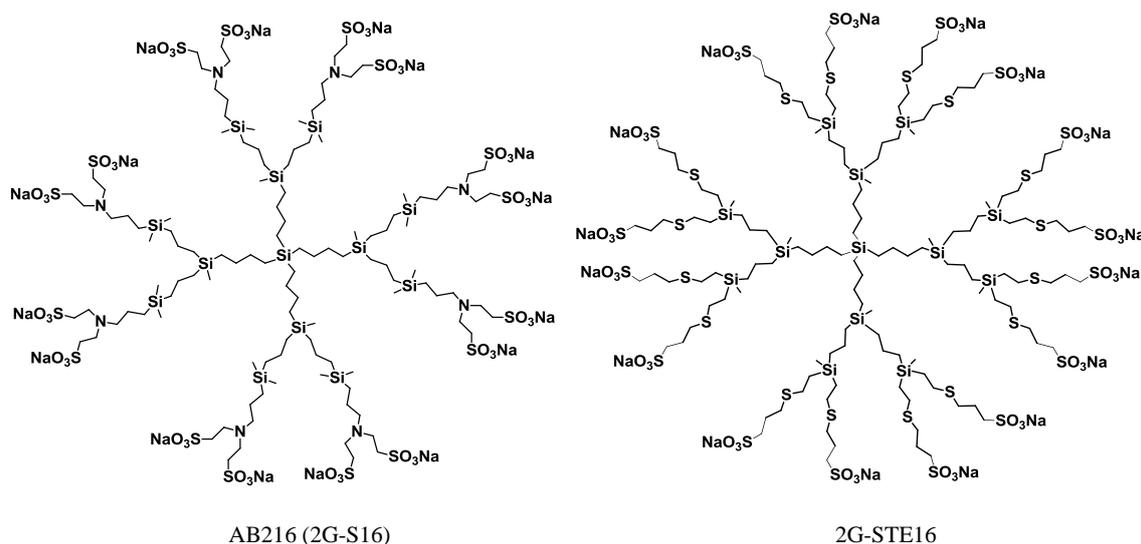
Los sistemas dendríticos han demostrado ser excelentes y prometedores candidatos como microbicidas para proporcionar una defensa contra las infecciones por enfermedades de transmisión sexual (ETS).<sup>56-58</sup> Una de las estrategias utilizadas actualmente es la combinación de compuestos no específicos que actúen en diferentes etapas de la replicación del VIH con antirretrovirales.<sup>53,59-61</sup>

El sistema dendrítico más avanzado como microbicida es un dendrímero de estructura polilisina y grupos naftalensulfonato, SPL7013. Se trata de una formulación de un gel vaginal con el nombre comercial VivaGel®, el cual ha demostrado capacidad antiviral frente al VIH-1 y virus herpes simplex tipo 2 (VHS-2).<sup>62</sup> Sin embargo, se presentaron algunas limitaciones y no superó el ensayo clínico fase 2 frente al VIH.<sup>63,64</sup> Actualmente se está utilizando contra la vaginosis bacteriana.<sup>65</sup>

**b) Sistemas aniónicos de tipo carbosilano como agentes antivirales: VIH**

En nuestro grupo de investigación se han sintetizado distintos dendrímeros de estructura carbosilano con grupos aniónicos en la periferia que han mostrado resultados prometedores *in vitro* e *in vivo* frente a la infección por el VIH, siendo el más desarrollado el dendrímero AB216 (también denominado 2G-S16) (Figura 5.8).<sup>50</sup>

Estos dendrímeros interfieren en el proceso de entrada viral. Inhiben la replicación del VIH al dirigirse específicamente a residuos catiónicos del bucle V3 de la proteína gp120/gp41 de la envoltura viral y a los receptores y coreceptores CD4, CXCR4 y CXCR5 y otras moléculas de la superficie de la célula diana.<sup>50</sup>



**Figura 5.8** Representación de dendrímeros carbosilano con grupos sulfonato en la periferia, denominados AB216 (2G-S16) y 2G-STE16.

Posteriormente, se han sintetizado y analizado otros sistemas similares preparados mediante reacciones “click chemistry”,<sup>66</sup> como por ejemplo el G2-STE16 (Figura 5.8)<sup>67</sup> y metalodendrímeros.<sup>68,69</sup> Aunque todos los sistemas ensayados presentan buenas actividades, no se llegan a alcanzar inhibiciones del 100% para todos los subtipos y aislados virales, por lo que se ha apostado por la combinación de varios dendrímeros entre sí o la combinación con otros antirretrovirales para obtener así efectos sinérgicos entre ellos.<sup>53,70,71</sup>

### 5.1.3 Presentación y objetivos del capítulo

Tal y como se ha descrito en esta Memoria, el grupo de investigación BioInden ha sintetizado tanto dendrímeros como polímeros hiperramificados de naturaleza carbosilano que han mostrado ser efectivos en diversas aplicaciones

biomédicas como vectores no virales para el transporte de material genético, agentes antivirales frente al VIH o agentes antibacterianos.

En el **Capítulo 5** se presenta el estudio de los diferentes sistemas dendríticos sintetizados a lo largo de la Memoria en diferentes aplicaciones biomédicas, según la naturaleza de sus grupos funcionales.

En Capítulos anteriores se ha descrito la preparación de polímeros hiperramificados, dendrímeros híbridos y dendrones bifuncionalizados. Se ha llevado a cabo un estudio de su comportamiento biomédico en función de la topología utilizada siendo difícil un análisis comparativo entre ellos.

Los objetivos de este Capítulo 5 son:

- ✓ Estudiar los sistemas catiónicos como agentes antibacterianos y como agentes de transfección.
- ✓ Estudiar las propiedades físico-químicas de los nanoconjugados formados por los diferentes sistemas catiónicos.
- ✓ Estudiar los sistemas aniónicos como agentes antivirales frente al VIH y su mecanismo de acción.

Para facilitar la comprensión de la discusión de estos resultados, la primera vez que se utiliza cada sistema se muestra su representación estructural.

Todos los experimentos realizados se encuentran de forma detallada en el apartado experimental de esta Memoria.

## 5.2 SISTEMAS CATIONICOS COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS

Los estudios sobre la capacidad antibacteriana de los diferentes sistemas dendríticos catiónicos se han realizado en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología (unidad docente de Microbiología y Parasitología) de la Universidad de Alcalá con la colaboración de los Dres. Juan Soliveri de Carranza y José Luis Copa Patiño. A excepción de los polímeros hiperramificados, el resto de sistemas se han analizado por la autora de esta Memoria en el contexto de la presente Tesis Doctoral.

Las pruebas de determinación de la actividad antibacteriana se realizaron utilizando las bacterias *Escherichia coli* (CECT 515) y *Staphylococcus aureus* (CECT 240), como bacterias representativas de bacterias que son Gram negativa y Gram positiva, respectivamente. Dichas bacterias se eligieron por el hecho de que poseen diferencias estructurales en su pared celular. Las Gram + están formadas por una única bicapa en su membrana que les hace muy sensible a la acción biocida, mientras que las Gram – constan de dos bicapas en su membrana, lo que las hace más resistentes al ataque externo.

Para comprobar la actividad antibacteriana se utilizó el método de microdilución en placa, midiendo la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano (efecto bacteriostático), y la concentración mínima bactericida (CMB), que es la concentración necesaria para producir la muerte bacteriana (efecto bactericida). Para un determinado agente antibacteriano, valores bajos de CMI y CMB denotan una mayor potencia biocida, debiendo ser la CMI siempre inferior o igual a la CMB. Los datos antibacterianos de las macromoléculas dendríticas catiónicas se presentan en mg/L (ppm) y cuando ha sido posible en molaridad (mol/L).

### 5.2.1 Polímeros hiperramificados

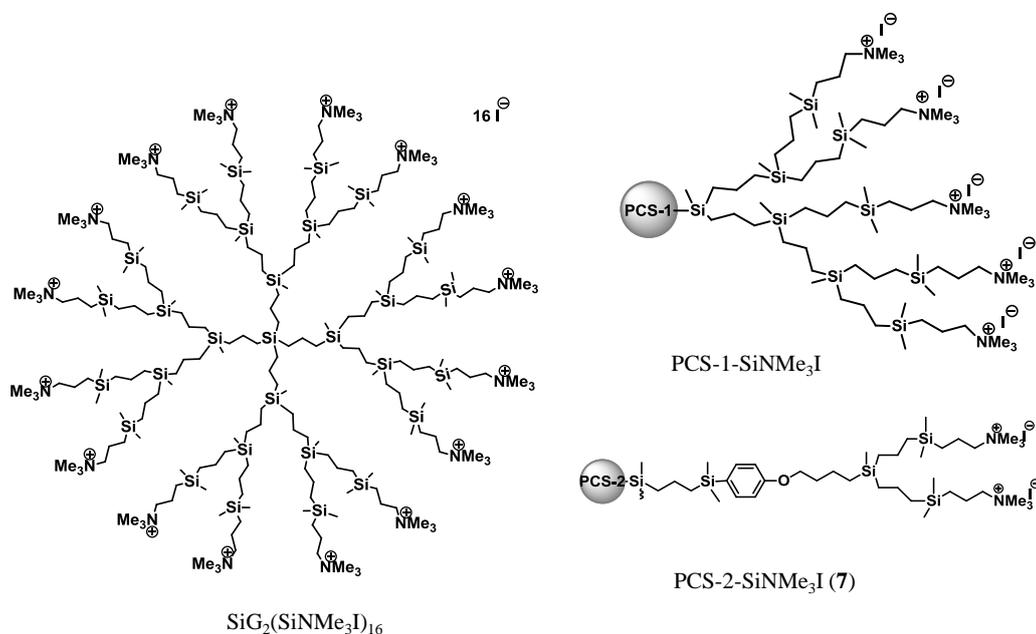
En este estudio se incluyeron tanto los polímeros sintetizados por hidrosililación PCS-2-SiNMe<sub>3</sub>I (7) como aquellos obtenidos por adición tiol-eno

PCS-2-SR (R=NH<sub>3</sub>Cl (**9**) y R=NMe<sub>3</sub>I (**12**)), todos ellos descritos en detalle en el Capítulo 2.

En primer lugar, se realizó un análisis comparativo con varios sistemas dendríticos de tipo carbosilano que han sido funcionalizados mediante una reacción de hidrosililación. Se compara el polímero **7** con su análogo PCS-1-SiNMe<sub>3</sub>I, y con un dendrímico de segunda generación (Figura 5.9). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.1.<sup>15</sup>

**Tabla 5.1** Resultados de la actividad antibacteriana para polímeros y dendrímicos catiónicos sintetizados por hidrosililación.

Sistemas estudiados	Peso molecular promedio (g/mol)	Nº de grupos funcionales	Gram-negativa		Gram-positiva	
			<i>Escherichia coli</i> (CECT 515)		<i>Staphylococcus aureus</i> (CECT 240)	
			MIC (ppm)	MBC (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)
PCS-1-SiNMe <sub>3</sub> I	16000	33	16	16	4	4
PCS-2-SiNMe <sub>3</sub> I ( <b>7</b> )	10000	16	16	16	2	2
SiG <sub>2</sub> (SiNMe <sub>3</sub> I) <sub>16</sub>	6303.7	16	16	16	8	8
Penicilina V	-	-	256	256	0.016	0.016



**Figura 5.9** Representación estructural del polímero **7** y otros sistemas dendríticos carbosilano sintetizados vía hidrosililación.

Si se comparan los resultados obtenidos para el polímero **7** con el resto de estructuras dendríticas para bacterias Gram +, se observa una ligera mejora cuando el polímero presenta el anillo aromático en su estructura. Esto puede deberse a que este tipo de sistemas posean una estructura más extendida, impuesta por la rigidez del anillo aromático, que hace que los grupos iónicos se encuentren más expuestos que en el caso del polímero PCS-1-SiNMe<sub>3</sub>I y el dendrímero esférico SiG<sub>2</sub>(SiNMe<sub>3</sub>I)<sub>16</sub>, presentando así una mayor eficacia. La diferencia de tamaño entre ambas matrices poliméricas también puede ser un factor a tener en cuenta, ya que la matriz PCS-1 a pesar de tener un mayor número de grupos funcionales en la periferia, su gran tamaño puede dificultar la interacción disminuyendo así su actividad.

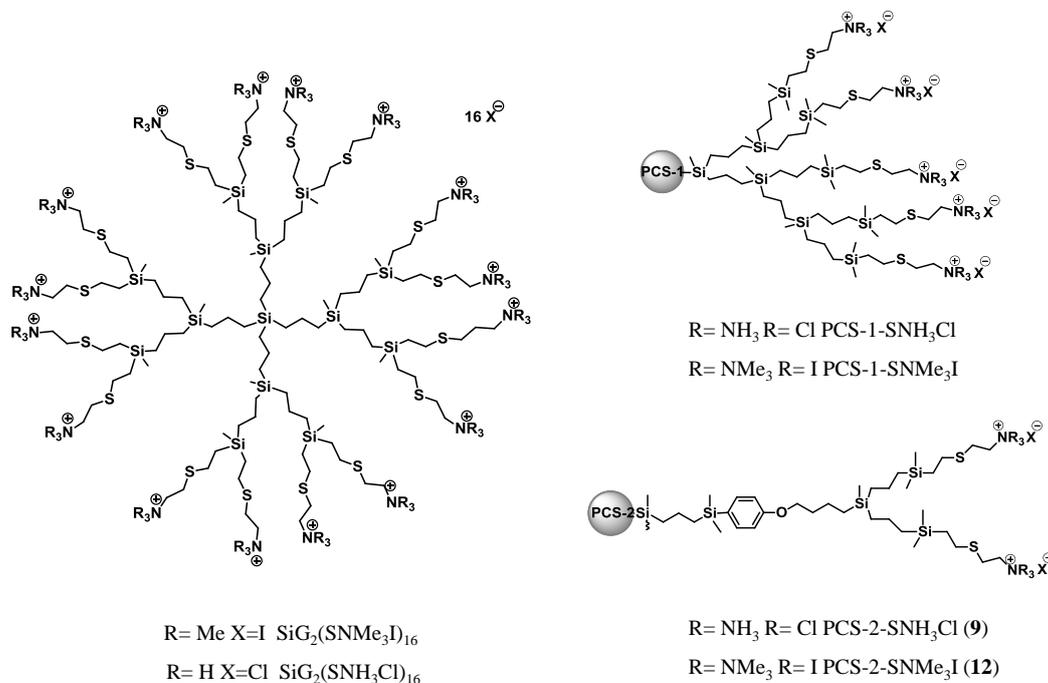
Sin embargo, en bacterias Gram - todos los sistemas presentan la misma actividad. Este tipo de bacterias presentan doble membrana, pudiendo ser menos susceptible a pequeños cambios, y por ello, se pueda perder el efecto de la topología y el número de grupos funcionales en la actividad de estos sistemas.

También, se ha llevado a cabo un estudio comparativo de la actividad antibacteriana de los diferentes sistemas con la penicilina V, potente antibiótico frente a bacterias Gram +, donde se deduce que el polímero es menos activo que la penicilina frente a bacterias Gram + pero mucho más activo frente a bacterias Gram -. Por ello, se puede decir que los sistemas dendríticos pueden actuar como un agente antibacteriano de amplio espectro.

**Tabla 5.2** Resultados de la actividad antibacteriana para polímeros y dendrímeros catiónicos sintetizados por adición tiol-eno.

Sistemas estudiados	Peso molecular promedio (g/mol)	Nº de grupos funcionales	Gram-negativa		Gram-positiva	
			<i>Escherichia coli</i> (CECT 515)		<i>Staphylococcus aureus</i> (CECT 240)	
			MIC (ppm)	MBC(ppm)	MIC(ppm)	MBC(ppm)
PCS-1-SNH <sub>3</sub> Cl	13000	<b>33</b>	16	16	8	8
PCS-1-SNMe <sub>3</sub> I	17500	<b>33</b>	128	128	8	8-16
PCS-2-SNH <sub>3</sub> Cl ( <b>9</b> )	8600	<b>16</b>	128	128	32	32
PCS-2-SNMe <sub>3</sub> I ( <b>12</b> )	10700	<b>16</b>	256	256	32	32
SiG <sub>2</sub> (SNH <sub>3</sub> Cl) <sub>16</sub>	3300	<b>16</b>	4	4	2	4
SiG <sub>2</sub> (SNMe <sub>3</sub> I) <sub>16</sub>	5437	<b>16</b>	16	64	16	128

En segundo lugar, se realizó un análisis comparativo de sistemas dendríticos de tipo carbosilano funcionalizados mediante vía tiol-eno. Se comparan los polímeros **9** y **12**, con sus analogos PCS-1-SR y con dendrímeros de segunda generación que presenten los mismos grupos funcionales (Figura 5.10).<sup>19</sup> Los resultados se muestran en la Tabla 5.2.



**Figura 5.10** Representación estructural de los polímeros **9** y **12** y otros sistemas dendríticos carbosilano sintetizados vía tiol-eno.

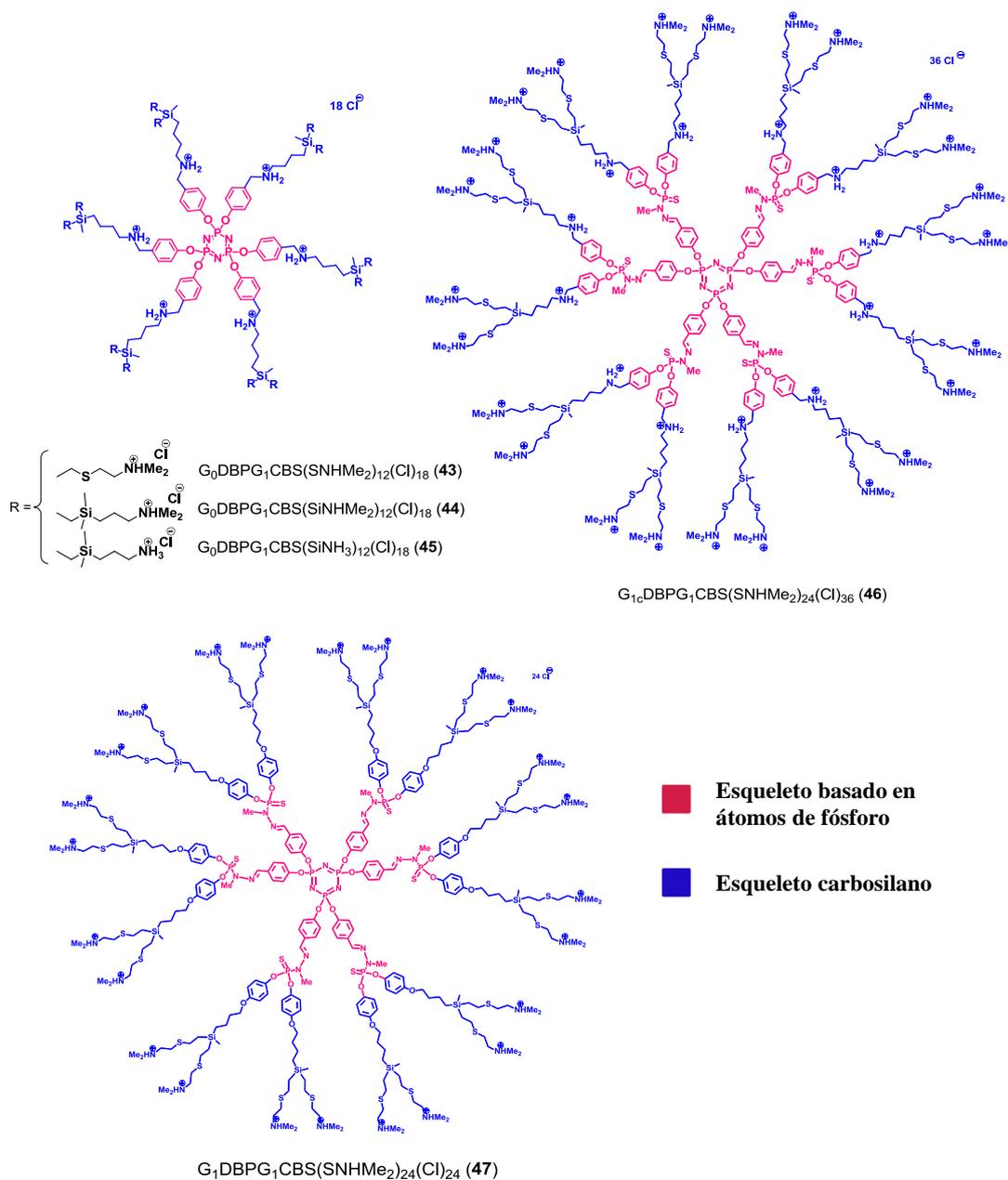
Los distintos polímeros utilizados parecen tener una actividad antibacteriana baja en Gram - y moderada en Gram +.

Si se comparan los resultados obtenidos para los polímeros sintetizados por vía tiol-eno para ambas matrices poliméricas con respecto a las matrices generadas por hidrosililación, se observa que las actividades disminuyen en general. Esto puede ser debido a que por vía tiol-eno la cadena introducida es más grande debido a la necesidad de introducir las cadenas vinilo, pudiendo existir un cambio de polaridad, provocando un cambio en el balance hidrofobia/hidrofilia, disminuyendo su actividad. Además, estos sistemas presentan una solubilidad en agua menor que los sistemas funcionalizados por vía hidrosililación.

Aunque en ambas matrices hay una pérdida de actividad, ésta es más acusada en la matriz PCS-2. En este caso, a pesar de que los grupos están más expuestos por la rigidez del sistema, la menor solubilidad que manifiesta puede ser el factor determinante que haga que su capacidad antibacteriana sea menor.

### 5.2.2 Sistemas híbridos

En este estudio se incluyeron todos los sistemas catiónicos solubles en agua sintetizados en el Capítulo 3.



**Figura 5.11** Estructuras esquemáticas de los dendrímeros híbridos (43-47).

En primer lugar se estudiaron los dendrímeros híbridos fósforo-carbosilano (43-47) (Figura 5.11), donde los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3** Comparación de la capacidad antibacteriana de los sistemas híbridos sintetizados (43-47) y otros dendrímeros puramente carbosilano.

Sistemas estudiados	Nº de cargas (int+ext)	Gram-negativa				Gram-positiva			
		<i>Escherichia coli</i> (CECT 515)				<i>Staphylococcus aureus</i> (CECT 240)			
		MIC		MBC		MIC		MBC	
		ppm	µM	ppm	µM	ppm	µM	ppm	µM
Dendrímero 43	6+12	32	8.65	32	8.65	32	8.65	64	17.3
Dendrímero 44	6+12	16	3.68	32	7.34	16	3.68	16	3.68
Dendrímero 45	6+12	32	7.97	64	15.9	32	7.97	32	7.87
Dendrímero 46	12+24	(a)	(a)	(a)	(a)	128	15.5	128	15.5
Dendrímero 47	24	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)	(a)
G <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (SNMe <sub>3</sub> I) <sub>12</sub>	12	8	1.91	8	1.91	2	0.5	2	0.5
G <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (SiNMe <sub>3</sub> I) <sub>12</sub>	12	64	13.2	64	13.2	4	0.83	4	0.83
G <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (SNH <sub>3</sub> Cl) <sub>12</sub>	12	8	3.08	8	3.08	4	1.5	4	1.5

(a) Actividad antibacteriana despreciable a las concentraciones estudiadas

Sus actividades han sido comparadas con dendrímeros de tipo carbosilano los cuales presentan un número de cargas similar en la periferia.<sup>19</sup> Para corroborar si existen efectos sinérgicos entre ambos tipo de esqueleto, también se quiso comparar sus resultados con los dendrímeros basados en átomos de fósforo, sin embargo en la bibliografía no se ha encontrado esta información.

En líneas generales, se observa que los sistemas presentan cierta capacidad antibacteriana, pero con menor actividad que los sistemas puramente carbosilano con el mismo número de cargas externas. Hay que destacar que estos sistemas son dependientes del pH, y puede que en el medio utilizado para realizar las medidas, parte de los grupos amino se encuentren desprotonados siendo la interacción finalmente menos eficaz.

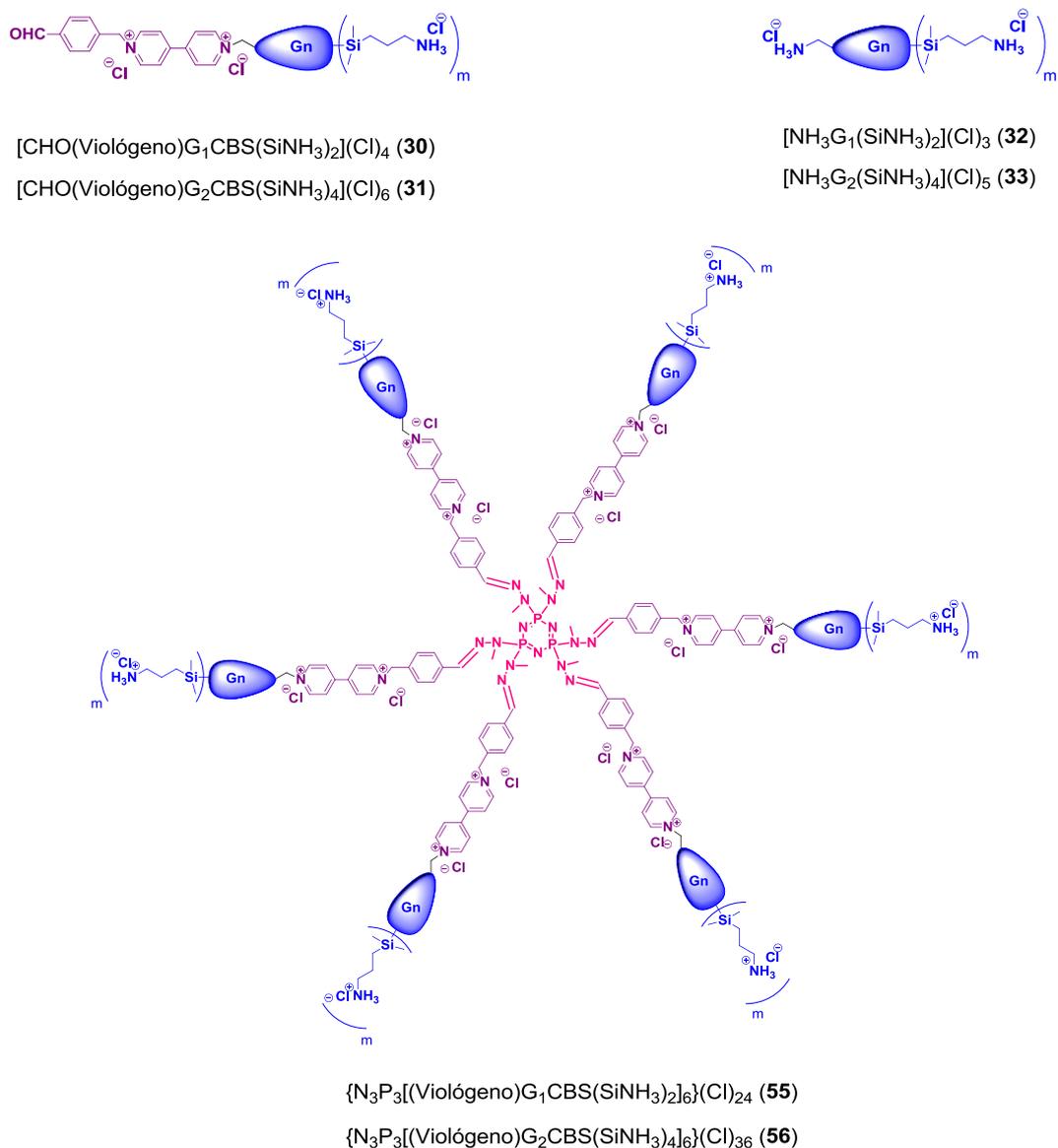
Nuestro grupo de investigación ha realizado un trabajo muy completo donde se ha analizado la capacidad antibacteriana de una variedad de dendrímeros esféricos y dendrones de tipo carbosilano con diferentes núcleos, puntos focales, ramas y grupos funcionales.<sup>20</sup> De este estudio y corroborado por otros trabajos anteriores,<sup>72</sup> se deduce que uno de los aspectos más importantes en la actividad antibacteriana, es un adecuado balance hidrófilico/hidrofóbico. Por lo tanto, puede ser que la presencia de cargas internas en los dendrímeros **43-46** provoque que dicho balance no sea adecuado, y de ahí, la diferencia encontrada en la actividad en comparación con los dendrímeros carbosilano.

A mayor generación se obtiene una menor capacidad antibacteriana, probablemente en este caso sea debido a una mayor congestión estérica de la periferia que no permite una interacción adecuada del esqueleto dendrítico con la membrana bacteriana.

Por otro lado, se han estudiado los dendrímeros fósforo-viológeno-carbosilano (**55** y **56**) y las cuñas dendríticas (**30-33**) (Figura 5.12), donde los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.4. En este caso, se pretende estudiar la influencia de la incorporación del viológeno respecto a los sistemas anteriores.

**Tabla 5.4** Comparación de la capacidad antibacteriana de los sistemas híbridos sintetizados (**55-56**) y las cuñas carbosilano (**30-33**).

Sistemas estudiados	Nº de cargas (int+ext)	Gram-negativa				Gram-positiva			
		<i>Escherichia coli</i> (CECT 515)				<i>Staphylococcus aureus</i> (CECT 240)			
		MIC		MBC		MIC		MBC	
		ppm	µM	ppm	µM	ppm	µM	ppm	µM
Dendrímero <b>55</b>	12+12	8	1.51	8	1.51	2	0.38	4	0.75
Dendrímero <b>56</b>	12+24	16	1.85	16	1.85	8	0.92	8	0.92
Dendrón <b>30</b>	2+2	2	2.39	4	4.79	1	1.20	1	1.20
Dendrón <b>31</b>	2+4	8	6.04	8	6.04	4	3.02	4	3.02
Dendrón <b>32</b>	1+2	2	3.69	4	7.39	0.5	0.92	4	7.39
Dendrón <b>33</b>	1+4	8	7.26	8	7.26	4	3.63	8	7.26

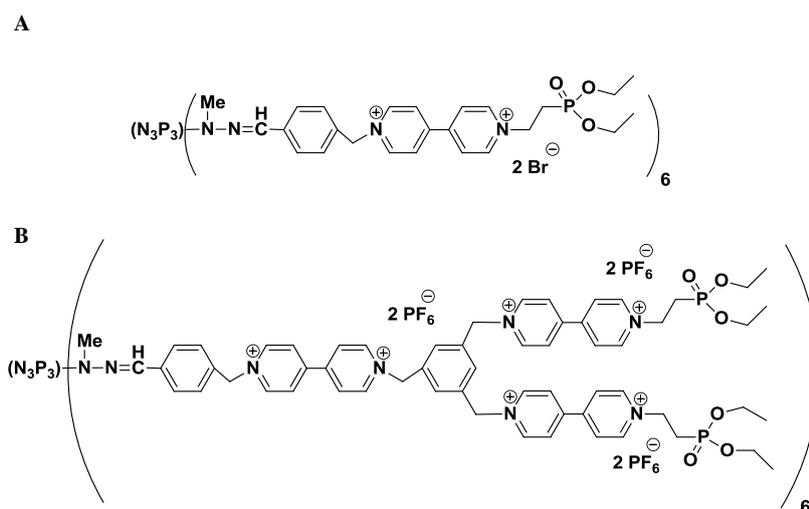


**Figura 5.12** Estructuras esquemáticas de los dendrones viológeno-carbosilano (**30-31**) y de los dendrímeros híbridos fósforo-viológeno-carbosilano (**55-56**). Las estructuras de los dendrones carbosilano (**32** y **33**) se introducen a nivel comparativo.

En este caso, los dendrímeros esféricos a pesar de su gran tamaño presentan buenas actividades en comparación con los sistemas fósforo-carbosilano. Este tipo de sistemas al poseer mayor número de cargas en el interior, el balance hidrofóbico-hidrofílico cambia y puede que éste sea más adecuado, y permita una mejor interacción con la membrana, provocando un mayor daño y con ello, una mayor actividad.

Por otro lado, los dendrones de primera generación son los que mejores actividades presentan, probablemente debido a que su topología y tamaño permite una interacción más eficaz con la membrana bacteriana. Los dendrones con monómero viológeno en el punto focal (**30** y **31**) presentan una actividad antibacteriana similar a la de los dendrones puramente carbosilano (**32** y **33**), por lo que dicha actividad viene condicionada principalmente por la presencia de los grupos amonio en la superficie del dendrón.

Para estudiar la influencia de la incorporación de las cuñas dendríticas de tipo carbosilano, en bibliografía se encuentran trabajos dónde se ha estudiado la capacidad antibacteriana de sistemas fósforo-viológeno en las mismas bacterias que se han utilizado en este apartado.<sup>73</sup> En la Figura 5.13A se muestra un dendrímico similar a los sistemas **55** y **56**, conteniendo el mismo núcleo, seis unidades viológeno, y en este caso grupos fosfonato en la periferia. Este sistema no presenta capacidad antibacteriana, por lo que se podría pensar que la actividad observada se debe fundamentalmente a las presencia de las cuñas carbosilano. Sin embargo, el dendrímico B, en el cual se han incorporado más unidades viológeno, presenta una mayor actividad. Se observa que a 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  inhibe un 50% el crecimiento de las bacterias *S. Aureus* y *E. Coli*, respectivamente.

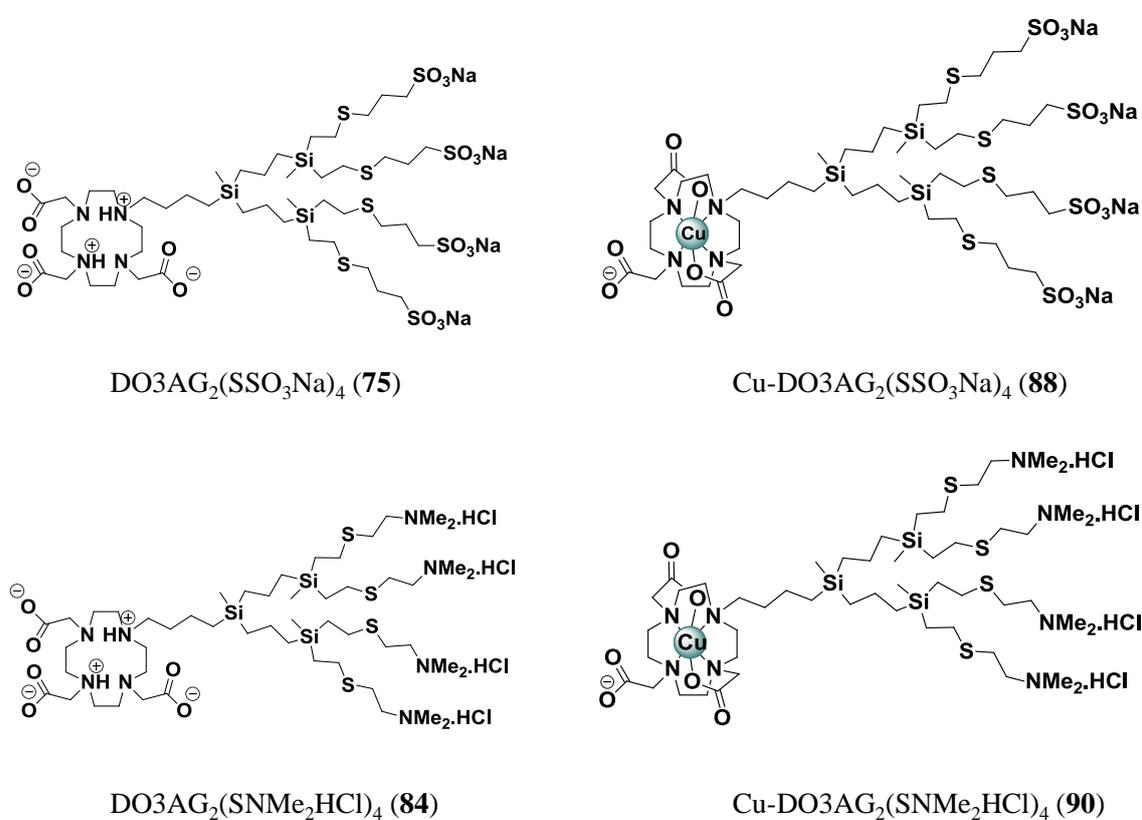


**Figura 5.13** Estructuras esquemáticas de dendrímicos fósforo-viológeno con: A) seis y B) dieciocho unidades viológeno en su estructura.

### 5.2.3 Dendrones bifuncionalizados

La inclusión de fragmentos metálicos en los esqueletos dendríticos con el objetivo de aumentar la gama de sus aplicaciones es otra alternativa a explorar. Las diferentes propiedades de los metales permiten modular la actividad de macromoléculas dendríticas donde están anclados.<sup>74,75</sup>

En este apartado se estudió la capacidad antibacteriana de dendrones de segunda generación, uno de naturaleza aniónica y otro catiónica, y sus correspondientes complejos metálicos con Cu(II) (Figura 5.14).



**Figura 5.14** Representación estructural de los dendrones **75** y **84** y sus correspondientes complejos metálicos de cobre **88** y **90**.

En la Tabla 5.5 se observa una actividad moderada para los sistemas catiónicos y nula para los sistemas aniónicos. Además, se observa que la incorporación del complejo metálico no mejora la actividad antibacteriana, probablemente debido a la formación de un complejo muy estable que no permite al catión metálico ejercer su función.

Según los resultados obtenidos de las actividades antibacterianas, se puede concluir que ni cobre ni los grupos sulfonatos proporcionan actividad antibacteriana, proviniendo la actividad biocida únicamente de la presencia de los grupos amonio de la periferia.

**Tabla 5.5** Capacidad antibacteriana de los dendrones bifuncionalizados.

Sistemas estudiados	Gram-negativa		Gram-positiva	
	<i>Escherichia coli</i> (CECT 515)		<i>Staphylococcus aureus</i> (CECT 240)	
	MIC (ppm)	MBC (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)
DOTAG <sub>2</sub> (SNMe <sub>2</sub> HCl) <sub>4</sub> ( <b>84</b> )	32	32	32	32
Cu-DOTAG <sub>2</sub> (NMe <sub>2</sub> HCl) <sub>4</sub> ( <b>90</b> )	32	32	32	32
DOTAG <sub>2</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>4</sub> ( <b>75</b> )	-	-	-	-
Cu-DOTAG <sub>2</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>4</sub> ( <b>88</b> )	-	-	-	-

#### 5.2.4 Conclusiones del apartado

Con estos resultados se puede deducir que la actividad antibacteriana puede depender de la topología mostrada por el sistema dendrítico, así como del compromiso entre el tamaño, el número de grupos funcionales y un adecuado balance hidrofilia/hidrofobia.

Los resultados obtenidos con los polímeros hiperramificados a lo largo de este apartado muestran que tan sólo el polímero **7** funcionalizado via hidrosililación podría suponer una alternativa a los dendrímeros como agentes antibacterianos en el intento de buscar sistemas dendríticos con procedimientos sintéticos más cortos y menos costosos. Por el contrario, los sintetizados via tioleno presentan actividades menores que sus dendrímeros análogos.

Los sistemas híbridos fósforo-carbosilano presentan una capacidad antibacteriana baja en los sistemas de primera generación, siendo prácticamente despreciable en la segunda. Sin embargo, la incorporación del fragmento viológeno en el sistema dendrítico mejora notablemente su capacidad antibacteriana, obteniéndose el mejor resultado para el sistema de primera generación **55**.

Por último, se observa que la incorporación del complejo metálico en el punto focal del dendrón no mejora la actividad antibacteriana, probablemente debido a la formación de un complejo muy estable que no permite al catión metálico ejercer su función. Se puede concluir que la actividad biocida proviene únicamente de la presencia de los grupos amonio de la periferia.

### 5.3 SISTEMAS CATIONICOS COMO AGENTES DE TRANSFECCIÓN

Los compuestos catiónicos sintetizados a lo largo de esta Memoria pueden ser candidatos como agentes de transfección para el tratamiento de enfermedades como el VIH y cáncer.<sup>76,77</sup>

Para evaluar su posible actividad como agentes transfectantes se han realizado diferentes ensayos:

1. Estudio de la biocompatibilidad mediante un ensayo MTT que permite establecer la concentración idónea de trabajo.
2. Capacidad de formar nanoconjugados con diferentes siRNA a la concentración conocida en la que el siRNA tiene un efecto terapéutico.
3. Ensayo funcional: Ensayo que permite determinar su actividad para transportar el material genético a su lugar de acción.
4. Ensayos de interacción con proteínas. La eficacia en el transporte de una molécula de interés biológico, puede verse afectada por su grado de unión a las proteínas dentro del plasma sanguíneo.

Los estudios sobre la toxicidad, ensayos de retención y estudios funcionales sobre el VIH de los diferentes sistemas dendríticos catiónicos se han realizado en el laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. El estudio de diferentes propiedades biofísicas usando ácidos nucleicos antitumorales, en el Instituto de Biología Química y Medicina Fundamental (ICBFM), en Novosibirsk, (Rusia). Ambos estudios han sido llevados a cabo en estancias realizadas por la autora de esta Tesis doctoral.

Los ensayos de interacción con proteínas se han llevado a cabo mediante una colaboración con el grupo de la Dra. Maria Bryszewska en el departamento General de Biofísicas de la universidad de Lodz (Polonia).

### 5.3.1 Polímeros hiperramificados

Sobre los polímeros catiónicos se realizó un ensayo preliminar de retención que resultó fallido, por lo que unido a sus bajas solubilidades en agua, fueron descartados para realizar un mayor número de estudios.

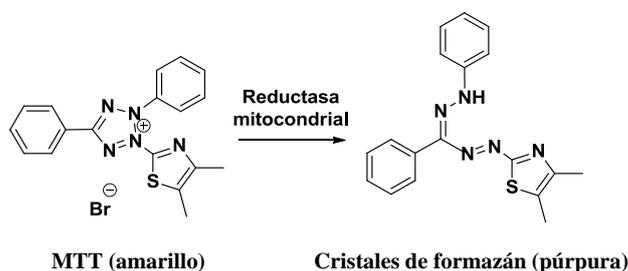
### 5.3.2 Sistemas híbridos

En este estudio se incluyeron tanto los dendrímeros híbridos fósforo-carbosilano (**43-47**) (Figura 5.11) como los dendrímeros fósforo-viológeno-carbosilano (**55** y **56**) (Figura 5.12) sintetizados en el [Capítulo 3](#). Sin embargo, no se han realizado los mismos estudios para ambos tipo de sistemas, por lo que se comentarán de forma independiente.

#### 5.3.2.1 Dendrímeros híbridos fósforo-carbosilano

##### a) *Biocompatibilidad*

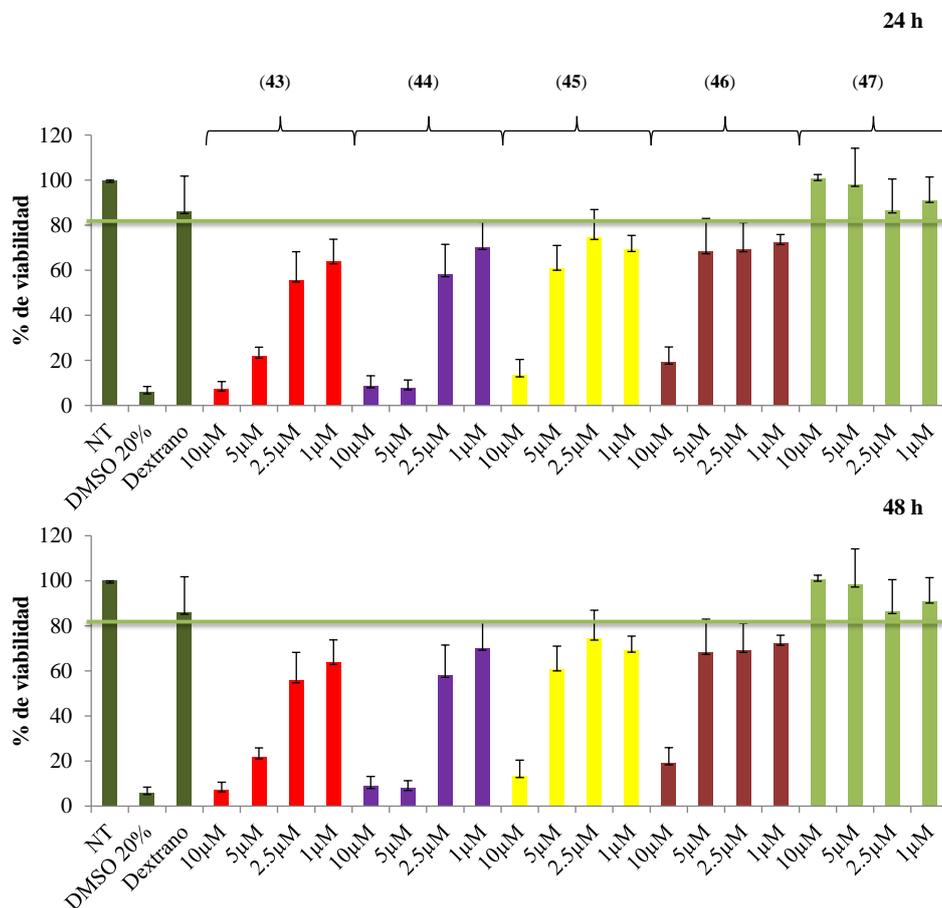
La citotoxicidad de los compuestos se ha evaluado mediante un ensayo MTT, el cual valora la actividad metabólica de la célula. Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción mitocondrial de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a sales de formazán por parte de las células vivas (Figura 5.15). Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (ver parte experimental). Valores de reducción mitocondrial menores del 80% se consideran indicios de toxicidad.



**Figura 5.15** Reacción de reducción producida por las células viables en el ensayo MTT.

La toxicidad de estos compuestos se ha estudiado en células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Las muestras de sangre se obtuvieron de “buffy

*coats*” de donantes sanos procedentes del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid siguiendo las recomendaciones de la normativa legal vigente. Las CMSP se aislaron mediante un gradiente de Ficoll siguiendo los estándares del Biobanco VIH HGM (Madrid, España).<sup>78,79</sup> Esta línea celular es muy dependiente del donante, lo que da lugar a una mayor variabilidad. Se ha evaluado la citotoxicidad de los compuestos mediante ensayo MTT, utilizando como controles: NT (células sin tratar), DMSO (10-20 %, control de muerte celular) y dextrano (20  $\mu$ M, control macromolecular de viabilidad). Los resultados obtenidos para los dendrímeros esféricos se muestran en la Figura 5.16.



**Figura 5.16** Ensayo MTT en CMSP tratadas durante 24 y 48 horas con los dendrímeros **43-47** a un amplio rango de concentraciones. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

En general, todos los dendrímeros excepto el **47** presentan elevadas toxicidades. El hecho de que el dendrímero **47** no sea tóxico hasta

concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y que no presente capacidad antibacteriana (apartado 5.2.2), podría indicar una menor exposición de los grupos cargados sobre las membranas bacterianas y celulares. Tal vez la presencia de átomos de oxígeno internos facilite procesos de plegamiento de las ramas (*back-folding*). Además, otro factor determinante es que es el único que no presenta cargas en el interior.

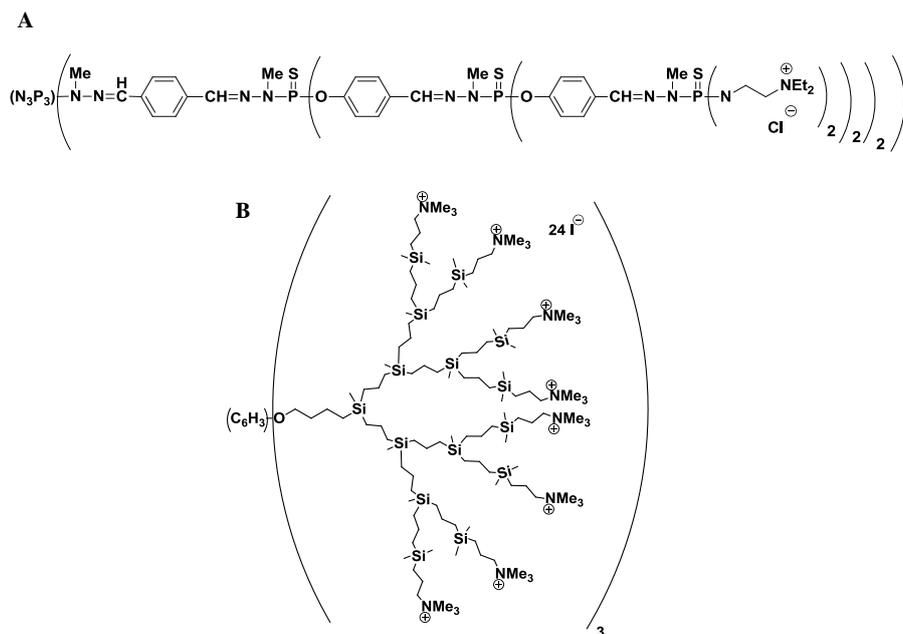
Aunque dendrímeros de la misma o diferente naturaleza pueden comportarse de manera diferente a partir de una línea celular a otra, la comparación con los valores obtenidos en la literatura científica puede dar una idea del orden de magnitud de la viabilidad celular. Se ha llevado a cabo un análisis comparativo con dendrímeros basados en átomos de fósforo y puramente carbosilano (Figura 5.17 y en la Tabla 5.6).<sup>80,81</sup>

**Tabla 5.6** Comparación de la viabilidad de dendrímeros de diferente naturaleza.

Sistema dendrítico	Grupos terminales	Carga exterior	Carga interior	Toxicidad ( $\mu\text{M}$ )*	Línea celular
<b>43</b>	$-\text{NHMe}_2^+$	12	6	$\text{TC}_{50} > 2.5$	CMSP
<b>44</b>	$-\text{NHMe}_2^+$	12	6	$\text{TC}_{50} > 2.5$	CMSP
<b>45</b>	$-\text{NH}_3^+$	12	6	$\text{TC}_{50} > 5$	CMSP
<b>46</b>	$-\text{NHMe}_2^+$	24	12	$\text{TC}_{50} > 5$	CMSP
<b>47</b>	$-\text{NHMe}_2^+$	24	-	$\text{TC}_{50} > 10$	CMSP
<b>DBP (Fig. 5.17 A)</b>	$-\text{NHEt}_2^+$	24	-	$\text{TC}_{50} = 1.74$	N2a
<b>CBS (Fig. 5.17 B)</b>	$-\text{NMe}_3^+$	24	-	$\text{TC}_{80} = 1.0$	CMSP

\* Cálculo aproximado del parámetro  $\text{TC}_{50}$  (concentración a la cual un sistema o fármaco es letal para el 50% de las células). DBP, dendrímero basado en átomos de fósforo; CBS, dendrímero carbosilano.

Si se comparan los resultados de los dendrímeros de fósforo y carbosilano, en general, los sistemas híbridos presentan una menor toxicidad. Se decidió continuar estudiando el dendrímero **47** junto con los sistemas **45** y **46**, ya que éstos últimos presentan viabilidades entorno al 70% a concentraciones de 5  $\mu\text{M}$ , con la presunción de que su toxicidad se vea disminuida al unirse al material genético y originar el nanoconjugado correspondiente.



**Figura 5.17** Representación estructural de dendrímeros A) basados en átomos de fósforo y B) puramente carbosilano.

### b) Estudios de formación de nanoconjugados

Una vez estudiada la toxicidad de las macromoléculas dendríticas sintetizadas, el siguiente paso fue verificar si son capaces de unir material nucleico. Para ello, se ha evaluado la capacidad de retención de ARN pequeño de interferencia (siRNA), capaz de suprimir la expresión de un determinado gen.

En los estudios mostrados a continuación se ha trabajado con dos tipos de siRNA: (i) siNEF (con 42 cargas negativas) para inhibir la infección por el VIH, con el que se trabaja a una concentración de 200 nM y (ii) siBcl-x1 (con 40 cargas negativas) siRNA antitumoral, con el que se trabaja a una concentración de 4  $\mu$ M. Las concentraciones utilizadas son las mínimas a la cuales se conoce que pueden tener un efecto terapéutico. Las estequiometrías propuestas están limitadas por la toxicidad del sistema. Un sistema con mayor número de cargas y menor toxicidad, permite estudiar relaciones de carga más elevadas.

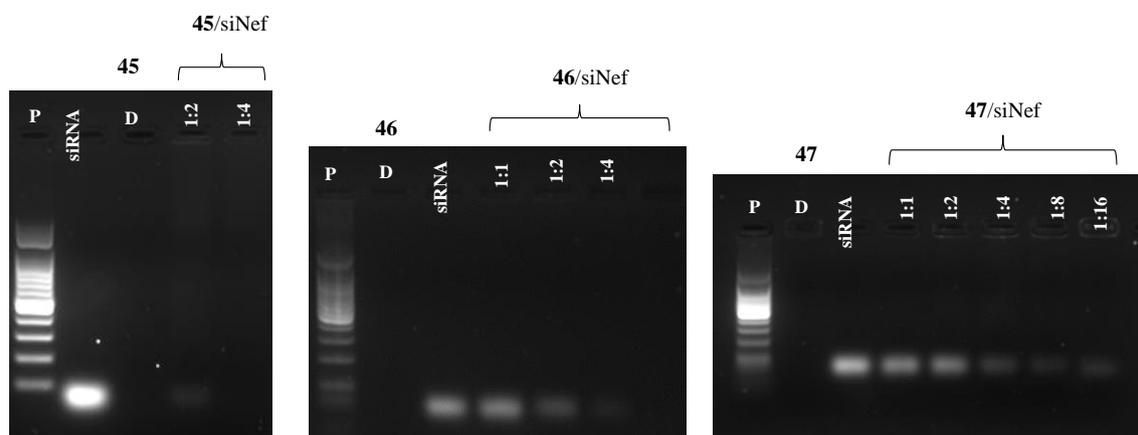
#### I. Ensayos de electroforesis en gel de agarosa

Dicho estudio se ha realizado mediante electroforesis en geles de agarosa. Al tener el material genético carga negativa, éste migrará hacia el polo positivo, en ausencia de dendrímero o cuando no sea capaz de formar un complejo estable

con la macromolécula dendrítica. Pero cuando el dendrímero sea capaz de formar un complejo estable (nanoconjugado), éste quedará retenido en el pocillo junto al dendrímero. Como patrón se ha utilizado el propio siRNA, observándose para el mismo que en ausencia de dendrímero migra hacia el polo positivo.

En todos los geles mostrados a continuación, el polo negativo se encuentra en la zona superior y el polo positivo en la inferior. En la primera columna se muestra un patrón de pesos moleculares, mientras que la segunda y tercera columna corresponde a siRNA y a dendrímero de forma aislada. Las siguientes columnas corresponderán a mezclas de dendrímero con siRNA en distintas proporciones carga negativa (correspondiente a siRNA)/carga positiva (correspondiente a dendrímero).

Los sistemas **45-47** son altamente dependientes del pH como ya se ha descrito, observándose que al preparar las disoluciones patrón para preparar los nanoconjugados, se ponen turbias. El medio utilizado es PBS, el cual presenta un pH en el que no se puede asegurar que todos los grupos amino presentes en el esqueleto dendrítico se encuentren cuaternizados, por lo que la capacidad de retención se verá disminuida.



**Figura 5.18** Electroforesis de los nanoconjugados siNEF/**45-47** para distintas relaciones de carga negativa:carga positiva tras un periodo de incubación de 2 h.

Para los sistemas **45** y **46** se observan retenciones buenas a relaciones 1:2 y una retención prácticamente completa a 1:4. Sin embargo, para el sistema **47**, se

observa retención desde una estequiometría 1:4, aunque el aumento de la relación de cargas no consigue una retención completa, debido a la existencia de una interacción más débil (Figura 5.18). Este hecho demuestra de nuevo que el sistema **47** presenta una menor exposición de los grupos cargados hacia el exterior.

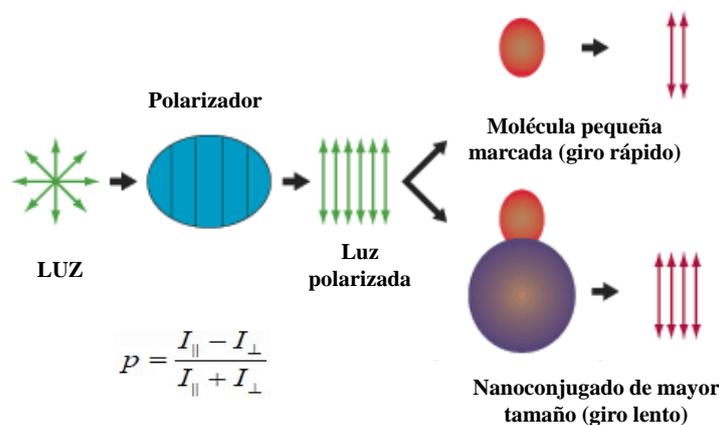
La mayor interacción del sistema **45** en la formación del nanocjugado, puede deberse a una mayor flexibilidad del sistema al ser una generación menor que **46** y **47**, que permite un mayor contacto con el material nucleico a pesar de disponer de un menor número de cargas positivas. En el caso del sistema **46**, el aumento de cargas positivas a 36 puede ser el factor determinante de la mayor interacción observada frente a **47**. Para el sistema **47** la reducción de la carga positiva interna sugerida hace que este sistema origine un nanoconjugado menos estable.

## II. Polarización de fluorescencia

Las moléculas fluorescentes que se han excitado con luz polarizada plana en disolución emiten de nuevo en un plano fijo, ya que la polarización se conserva, siempre y cuando la molécula permanezca quieta durante el proceso de excitación. Como en solución las moléculas se encuentran girando al azar, y al girar cambia el plano de polarización de la luz que emite, si la molécula gira lentamente, el plano de polarización de la luz emitida es prácticamente el mismo que el de la luz incidente, conservándose la polarización de la luz; pero si la molécula gira muy rápido el plano es muy distinto al original, obteniéndose luz no polarizada. Las moléculas pequeñas giran muy rápido, por lo que, tras haber sido irradiadas con luz polarizada, emiten luz no polarizada, mientras que las moléculas grandes, que giran más despacio, emiten luz altamente polarizada. La polarización de fluorescencia proporciona información sobre la movilidad y orientación de las moléculas, entendiéndose por polarización una relación entre la fluorescencia generada en el plano horizontal y el vertical (Figura 5.19).

Debido a las diferencias de polarización producidas por los distintos tamaños moleculares, esta técnica puede ser útil para caracterizar la formación de

nanoconjugados dendrímtero-siRNA. Para ello, se mide la polarización del cromóforo del siRNA marcado con concentraciones crecientes de dendrímtero. La observación de un valor constante en la medida de polarización estaría relacionada con la formación de nanoconjugados.



**Figura 5.19** Mecanismo de polarización de fluorescencia y ecuación de la polarización.

|| significa paralelo a la luz polarizada y  $\perp$  perpendicular a la misma.

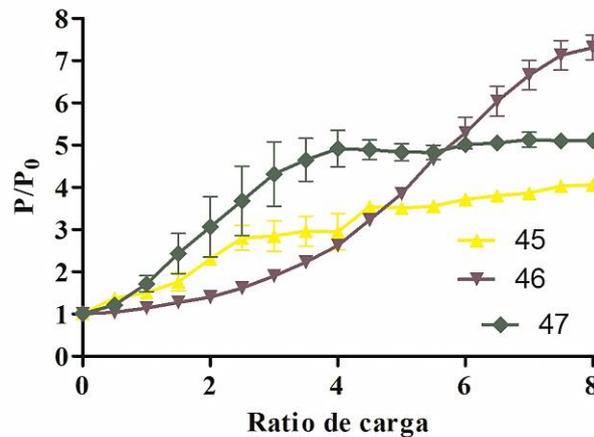
Para realizar estas medidas se ha utilizado siRNA antitumoral Bcl-x1. Esta técnica ha permitido estudiar dos aspectos interesantes de estos sistemas: (i) estudio de la relación molar óptima y (ii) la estabilidad del nanoconjugado formado frente al desplazamiento por heparina.

### i. Estudio de la relación molar de carga óptima

Para cada sistema dendrítico, se prepara por triplicado una disolución de siRNA marcado con fluoresceína. Posteriormente, se van añadiendo diferentes cantidades de los sistemas dendríticos para obtener las diferentes proporciones molares de carga. Además, se prepara otra disolución de siRNA igual que las anteriores que se mantiene como control. Cada adición de compuesto se agita y se incuba durante 5 minutos, y a continuación se registra el espectro de polarización de fluorescencia.

Los resultados por polarización de fluorescencia muestran un comportamiento similar al observado por electroforesis en gel de agarosa para los sistemas esféricos (Figura 5.20). El dendrímtero **45** empieza a formar

nanoconjugado a partir de una proporción 1:2, el dendrímero **46** a una relación 1:4, y sin embargo, para el dendrímero **47** al menos hasta una estequiometría 1:8 no se observa una retención completa.



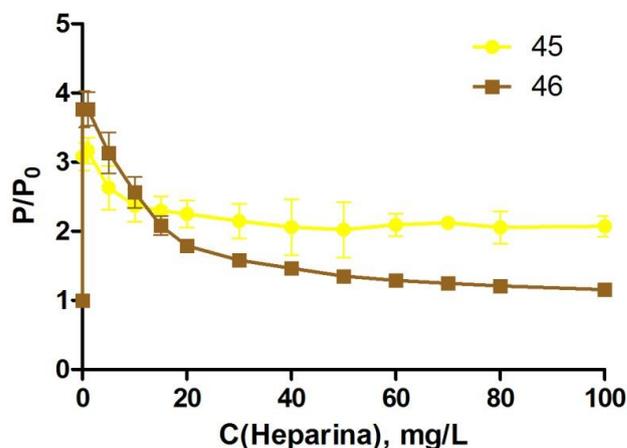
**Figura 5.20** Relación entre polarización final y polarización inicial ( $P/P_0$ ) para distintas relaciones molares de carga de los nanoconjugados formados por los dendrímeros **45-47** con siRNA Bcl-x1 marcado con fluoresceína.

## ii. Estudio de la estabilidad del nanoconjugado formado mediante el desplazamiento con heparina

La eficacia de transfección de estos sistemas puede verse afectada por su grado de unión a otras moléculas dentro del plasma sanguíneo, pudiendo existir cierta competencia y que su eficacia finalmente se vea disminuida. Entre dichas moléculas se encuentra la heparina, de ahí, la importancia de estudiar la estabilidad de los nanoconjugados formados frente a diferentes concentraciones de heparina.

Para cada sistema dendrítico, se prepara una disolución por triplicado de siRNA marcado con fluoresceína. Además, se prepara una disolución de siRNA igual que las anteriores que se mantiene como control. A continuación, se añade la cantidad necesaria de compuesto para obtener una completa retención del siRNA, se agita y se incuba durante 10 min, y finalmente se registra el espectro. Una vez finalizado este proceso, se van añadiendo cantidades de heparina desde 1 a 100 mg/L, se incuba durante 5 min y se vuelven a registrar los espectros correspondientes.

En el estudio de los dendrímeros esférico sólo se utilizarán los sistemas **45** y **46** con una relación molar 1:4 para ambos casos (Figura 5.21), ya que el sistema **47** no da lugar a una retención completa.



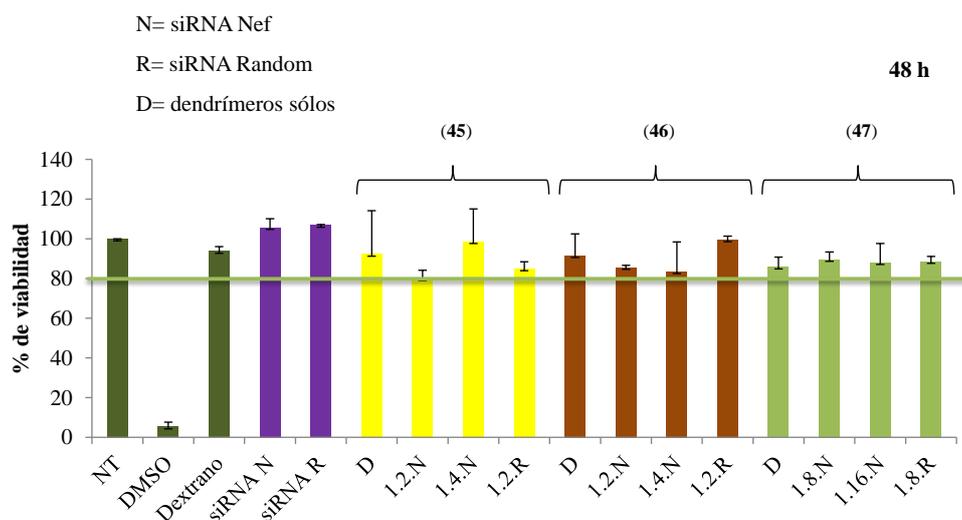
**Figura 5.21** Estudio del desplazamiento con heparina de los nanoconjugados formados por los dendrímeros **45** y **46** y siRNA Bcl-xl marcado con fluoresceína mediante la relación entre la polarización final y la polarización inicial ( $P/P_0$ ) para distintas concentraciones de heparina.

En el caso del nanoconjugado preparado a partir del dendrímero **46**, el material nucleico se ve desplazado a partir de una concentración de 20 mg/L de heparina. Para el dendrímero **45** se observa como también se alcanza un plató, pero la disminución de la señal no es tan acentuada como en el caso del sistema **46**, por lo que no queda claro su desplazamiento.

En bibliografía científica se ha estudiado el desplazamiento de este siRNA en nanoconjugados formados con dendrímeros de tipo carbosilano y dendrímeros basados en átomos de fósforo. Se observa como el siRNA del nanoconjugado formado por el sistema carbosilano es totalmente desplazado a 40 mg/L. Sin embargo, esta concentración no es suficiente para el sistema basado en átomos de fósforo, argumentando una mayor fortaleza del nanoconjugado correspondiente. Por tanto, para el sistema **46**, estos datos evidencian un mayor debilitamiento en la formación del nanoconjugado, en relación a los dendrímeros puros con un comportamiento más parecido a los derivados carbosilano.<sup>82</sup>

**c) Biocompatibilidad y ensayo funcional de los nanoconjugados formados con siNef (VIH)**

Una vez analizada la biocompatibilidad de los dendrímeros (45-47) y su capacidad para formar los complejos, es necesario conocer la toxicidad de los nanoconjugados formados entre los dendrímeros y el siRNA en las proporciones de carga adecuadas, de modo que se seleccionaron las relaciones molares 1:2 y 1:4 para siNEF/45 y 46 y 1:8 y 1:16 para siNEF/47 (Figura 5.22).



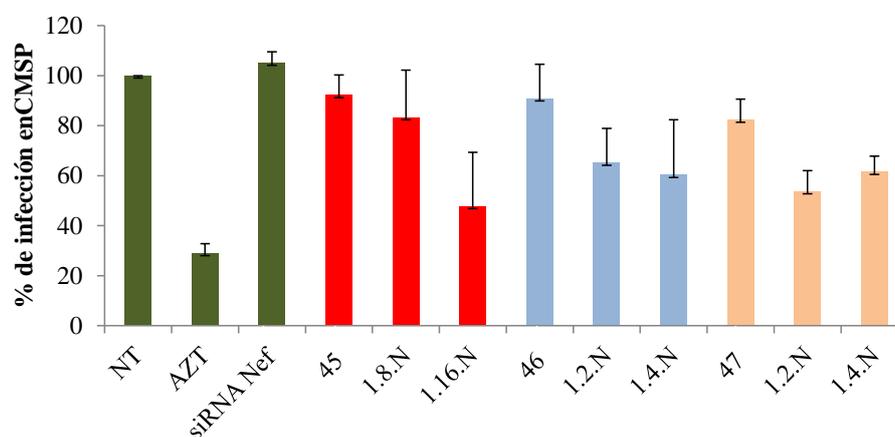
**Figura 5.22** Ensayo MTT en CMSP tratadas durante 48 horas con los nanoconjugados formados. Controles: NT (células sin tratar), DMSO (control de muerte celular) y dextrano (control macromolecular de viabilidad), siRNA Nef (N) y Random (R) (200 nM) y los dendrímeros independientes (D).

En todos los casos se observa un ligero descenso de la toxicidad de los nanoconjugados con respecto a los dendrímeros (ver Figura 5.16), probablemente debido a la ocultación o neutralización parcial de las cargas catiónicas superficiales del dendrímero, involucradas en la interacción con el ácido nucleico.

Teniendo en cuenta la biocompatibilidad, así como las propiedades del nanoconjugado, el siguiente paso es comprobar si los complejos estudiados son capaces de dar lugar a una inhibición de la infección por el VIH.

Para ello, se eligieron los dendrímeros (**45-47**) a las relaciones molares de carga estudiadas. En este experimento se incuban durante 48 horas los distintos dendrímeros y los nanoconjugados dendrímero-siRNA en CMSP activadas, previamente infectadas con X4-VIH-1<sub>NL4.3</sub> para comprobar su capacidad de inhibición. El porcentaje de inhibición se relaciona con la cantidad de proteína P24, a través del inmunoensayo para cuantificar antígeno P24 del VIH.<sup>83</sup> Éste consiste en un inmunoensayo modificado en el que se sensibiliza una superficie con un anticuerpo que reconoce específicamente a la proteína P24, cuantificándose dicha unión colorimétricamente. Por lo que cuantas más proteínas se unan a dichos anticuerpos, mayor es el grado de infección por el VIH, y por tanto, menor es la inhibición.

Como control de infección se usan células infectadas (NT). Además se añade de manera independiente siNEF sólo, para comprobar que en ausencia de transportadores es incapaz de inhibir la infección por el VIH. Como control de inhibición del VIH se utiliza zidoduvina (AZT), inhibidor de la retrotranscriptasa del VIH (Figura 5.23).



**Figura 5.23** Inhibición de la infección por el VIH utilizando los nanoconjugados siNEF/**45-47**. N significa siNEF. NT es control de infección por VIH en células infectadas.

Se observan inhibiciones moderadas en los tres casos, un 40% para **45** y **46** y un 50% para **47**. Estos valores moderados pueden ser debidos a diferentes causas: (i) la concentración de siRNA es insuficiente; (ii) la interacción de los

nanoconjugados es muy estable, y no libera el siRNA para realizar su función; o (iii) que el debilitamiento observado mediante el ensayo de competición por heparina se traduzca en que el ácido nucleico no llegue al sitio adecuado de acción. Según los resultados obtenidos, la tercera causa sería la más probable, aunque un aumento de la concentración de siRNA también podría proponerse para mejorar las inhibiciones.

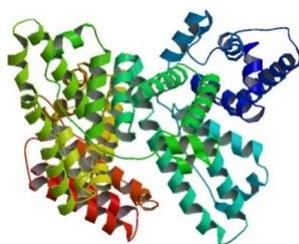
### 5.3.2.2 Dendrímeros híbridos fósforo-viológeno-carbosilano

En este apartado se estudian los sistemas híbridos conteniendo fragmentos viológeno en las ramas  $\{N_3P_3[(\text{Viológeno})G_n\text{CBS}(\text{SiNH}_3)_m]_6\}(\text{Cl})_{12+6m}$  (**55** y **56**).

La eficacia en el transporte de una molécula de interés biológico, puede verse afectada por su grado de unión a las proteínas dentro del plasma sanguíneo. Por una parte, puede mejorar su farmacocinética, o por el contrario, puede existir cierta competencia y que su eficacia finalmente se vea disminuida.

Los dendrímeros catiónicos generalmente son utilizados como agentes de transporte, por lo que podrían existir competencias entre la molécula de interés biológico transportada y proteínas del medio utilizado. Por ello, es de gran relevancia estudiar la interacción de los sistemas dendríticos con este tipo de proteínas.

La albúmina de suero humano (HSA) ha sido una de las proteínas más estudiadas durante muchos años, ya que se trata de una de las proteínas más abundantes en el plasma sanguíneo. Esta proteína desempeña un papel crucial en la liberación de fármacos y en su eficacia farmacológica (Figura 5.24).<sup>84</sup>



**Figura 5.24** Representación esquemática de la proteína HSA.

Desde hace años se sabe que los dendrímeros catiónicos pueden interactuar con la albúmina de suero humano. Esta proteína tiene cinco regiones aniónicas no específicas y los dendrímeros cargados son capaces de unirse a ellas mediante interacciones electroestáticas.<sup>85-87</sup> Existen trabajos recientes en sistemas tipo PAMAM donde describen que este tipo de interacciones dependen fuertemente del tamaño y de la química del grupo terminal, y sugieren varios mecanismos de interacción:<sup>88</sup> (i) interacciones electrostáticas entre los grupos terminales del dendrímero cargados y residuos de proteínas; (ii) enlaces de hidrógeno entre los grupos internos de los dendrímeros y los residuos de aminoácidos de la proteína; (iii) las interacciones hidrofóbicas entre la parte no polar del dendrímero y grupos HSA; y (iv) las interacciones específicas entre los grupos carboxílicos de dendrímero y sitios de unión de ácido alifáticos de proteínas.

Con estos sistemas se han realizado los siguientes ensayos:

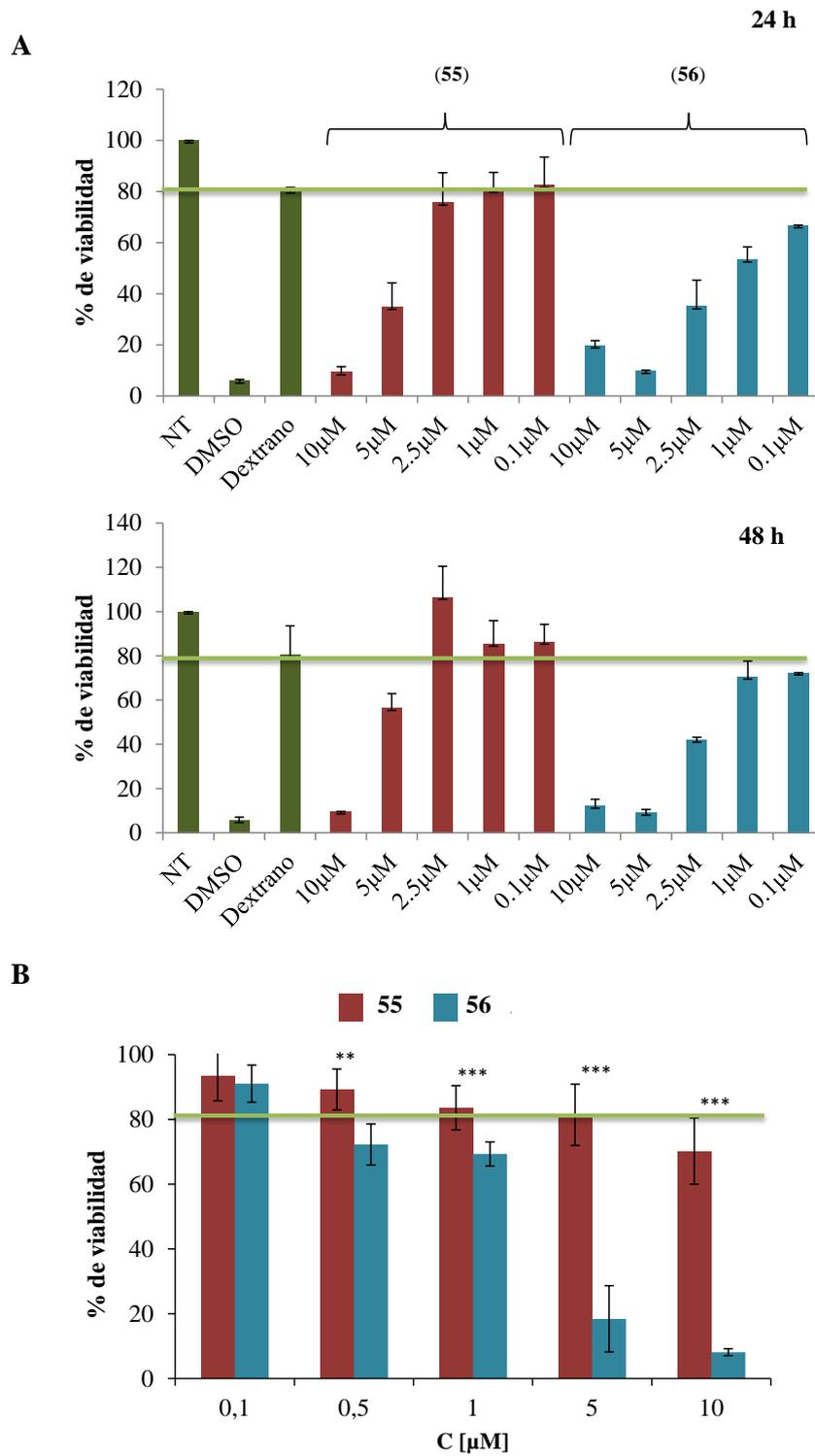
1. Estudio de la biocompatibilidad mediante un ensayo MTT que permite establecer la concentración idónea de trabajo.
2. Estudios biofísicos de la interacción de los dendrímeros con la proteína HSA.

#### ***a) Biocompatibilidad y actividad hemolítica***

Se han realizado estudios de biocompatibilidad de los dendrímeros **55** y **56** en diversas líneas celulares. En todos los casos se ha utilizado un ensayo MTT.

En primer lugar, la toxicidad de estos compuestos ha sido estudiada en CMSP en un rango de concentraciones a 24 y 48 horas. Se ha considerado un valor de 80 % como punto de corte para la toxicidad de las muestras, de forma que la viabilidad en CMSP es 2.5  $\mu\text{M}$  para **55** e inferior a 0.1  $\mu\text{M}$  para **56** (Figura 5.25 A).

En la línea celular constituida por fibroblastos de hámster chino (línea celular B14) se observa una menor toxicidad, con viabilidades del 80% a 5 y 0.1  $\mu\text{M}$  para los sistemas **55** y **56**, respectivamente (Figura 5.25 B).



**Figura 5.25** Ensayo MTT en A) CMSP y B) células B14, tratadas con los dendrímeros **55-56** en un amplio rango de concentraciones.

El índice terapéutico (IT) constituye una medida del margen de seguridad de un fármaco. Se expresa numéricamente como una relación entre la dosis requerida para producir el efecto letal en el 50% de la población ( $TC_{50}$ ) y la dosis

que causa el efecto terapéutico deseado en el 50% de la población ( $EC_{50}$ ). Este concepto se puede formular como:  $IT = TC_{50}/EC_{50}$ . Cuanto mayor sea el índice terapéutico, más inocuo será el fármaco.

Si se realiza un cálculo aproximado para el dendrímero de primera generación (**55**), su relación entre su  $TC_{50} \approx 5 \mu\text{M}$  (B14) y su eficacia como agentes antibacterianos ( $EC_{50}$  (Gram +)  $< 1.51 \mu\text{M}$  y  $EC_{50}$  (Gram -)  $< 0.75 \mu\text{M}$ ), se obtendría un buen índice terapéutico, alejado de 1 ( $IT > 3.3$  (Gram -) y  $IT > 6.7$  (Gram +)) lo que ofrece un margen de seguridad aceptable sobre todo en Gram +. Por el contrario, esto no sucede en el caso del dendrímero **56**, en el que su toxicidad es demasiado elevada.

El análisis comparativo con otros sistemas híbridos viológeno-fósforo,<sup>73</sup> los cuales se han estudiado en la misma línea celular, permite observar la influencia del esqueleto carbosilano en la estructura dendrítica (Figura 5.26 y Tabla 5.7).

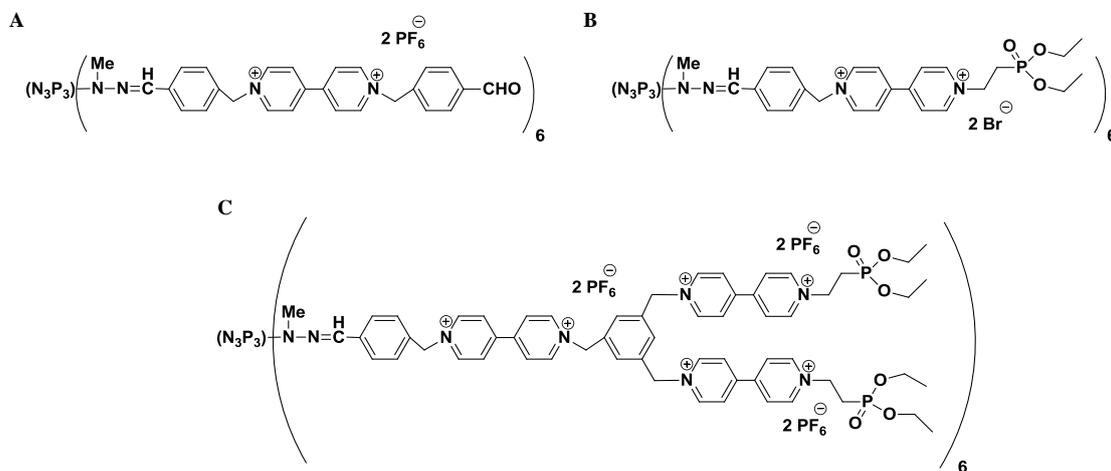
**Tabla 5.7** Aspectos generales y valores de toxicidad para diferentes dendrímeros híbridos con viológeno en su estructura.

Dendrímero	$G_n$	Grupos terminales	Carga exterior	Carga interior	Toxicidad ( $\mu\text{M}$ )*	Línea celular
<b>55</b>	1	$-\text{NH}_3^+$	12	12	$TC_{50} > 10$ $TC_{80} = 5$	B14
<b>56</b>	2	$-\text{NH}_3^+$	24	12	$TC_{50} \approx 1$ $TC_{80} = 0.1$	B14
<b>DPV (Fig. 5.26 A)</b>	0	$-\text{CHO}$	0	12	$TC_{80} = 1.0$	B14
<b>DPV (Fig. 5.26 B)</b>	0	$-\text{P(O)(OEt)}_2$	0	12	$TC_{80} = 2.5$	B14
<b>DPV (Fig. 5 26 C)</b>	1	$-\text{P(O)(OEt)}_2$	0	36	$TC_{80} = 10$	B14

\*Cálculo aproximado del parámetro  $TC_{50}$  (concentración a la cual un sistema o fármaco es letal para el 50% de las células). DPV, dendrímeros fósforo-viológeno.

En comparación con los dendrímeros híbridos fósforo-viológeno con grupos fosfonato neutros en la periferia, (Figura 5.26 B y C), el dendrímero **55** muestra una biocompatibilidad similar, lo que indica que las cargas internas en este caso son principalmente las que contribuyen a la toxicidad de estos sistemas. Sin embargo, en el caso del sistema **56**, el factor determinante parece ser el alto número de cargas periféricas. Este análisis sugiere que el número de cargas

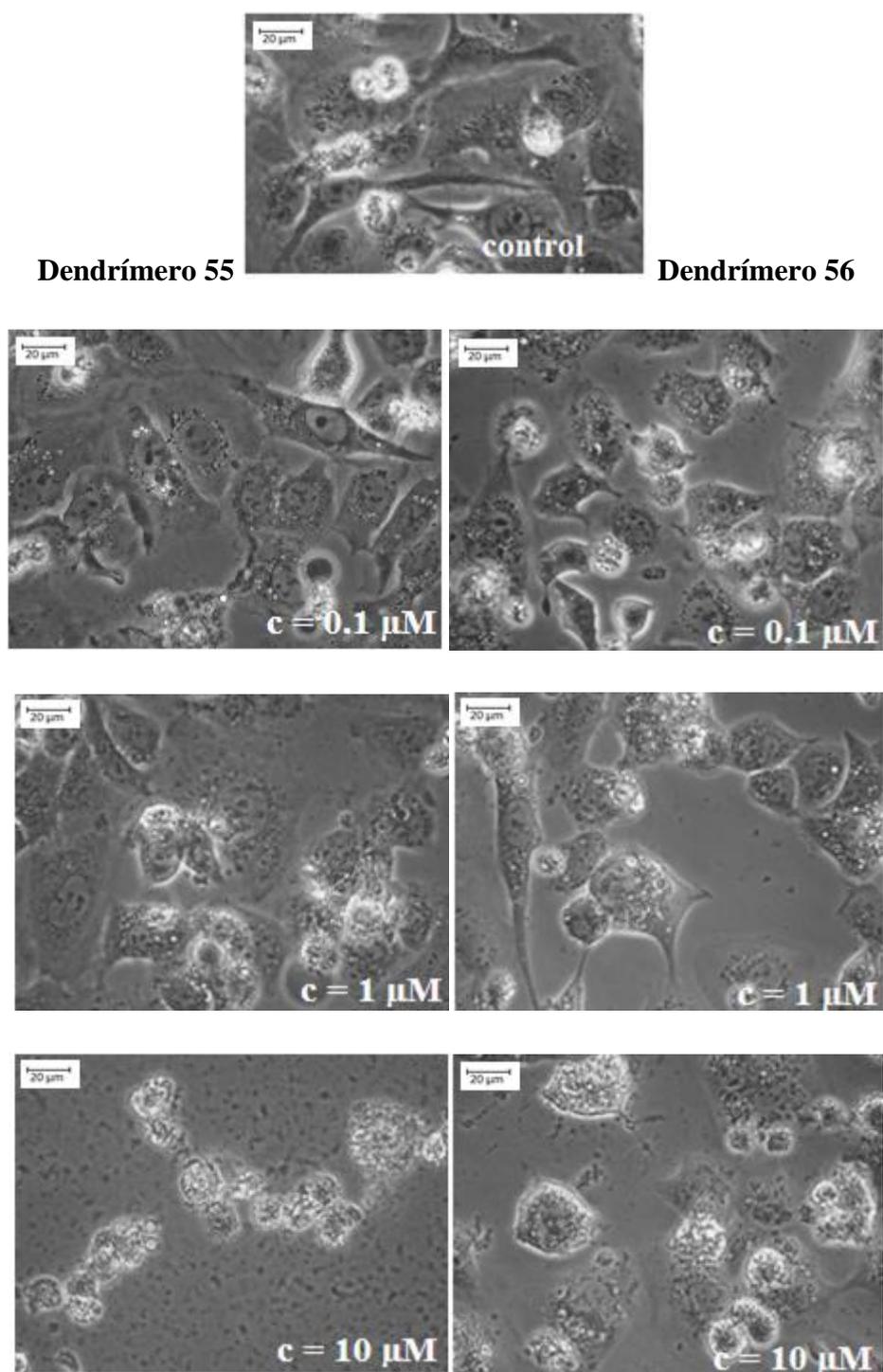
positivas exteriores es un factor importante en la toxicidad, tal y como se esperaba, pero también contribuyen de manera notable las cargas positivas internas.



**Figura 5.26** Representaciones estructurales de dendrímeros híbridos viológeno-fósforo A y B) de primera y C) de segunda generación.

Para completar este estudio, se han registrado los cambios en la morfología en los fibroblastos de hámster chino en presencia de los dendrímeros híbridos **55** y **56** a diferentes concentraciones (Figura 5.27).

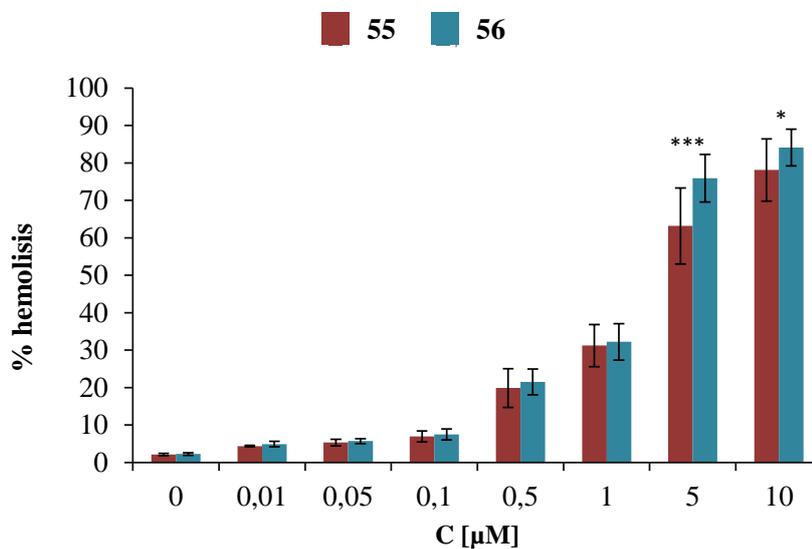
El dendrímero **55** a una concentración de  $0.1 \mu M$  no provoca cambios en la morfología celular. Sin embargo, a concentraciones más altas y a todas las concentraciones estudiadas para el dendrímero **56** provocan cambios significativos en la morfología celular, ya que se observan fragmentos de células en las fotografías, indicando de nuevo diferencias entre los dos dendrímeros.



**Figura 5.27** Estudio del cambio morfológico en células B14. Fotografías del control y las células tratadas con los dendrímeros **55** y **56** a las concentraciones 0.1, 1 y 10 μM.

Con el fin de evaluar el daño de estos dendrímero en los glóbulos rojos se llevó a cabo un estudio de su actividad hemolítica. Para ello, las células se incubaron con los dendrímeros a diferentes concentraciones durante 3 horas (Figura 5.28).

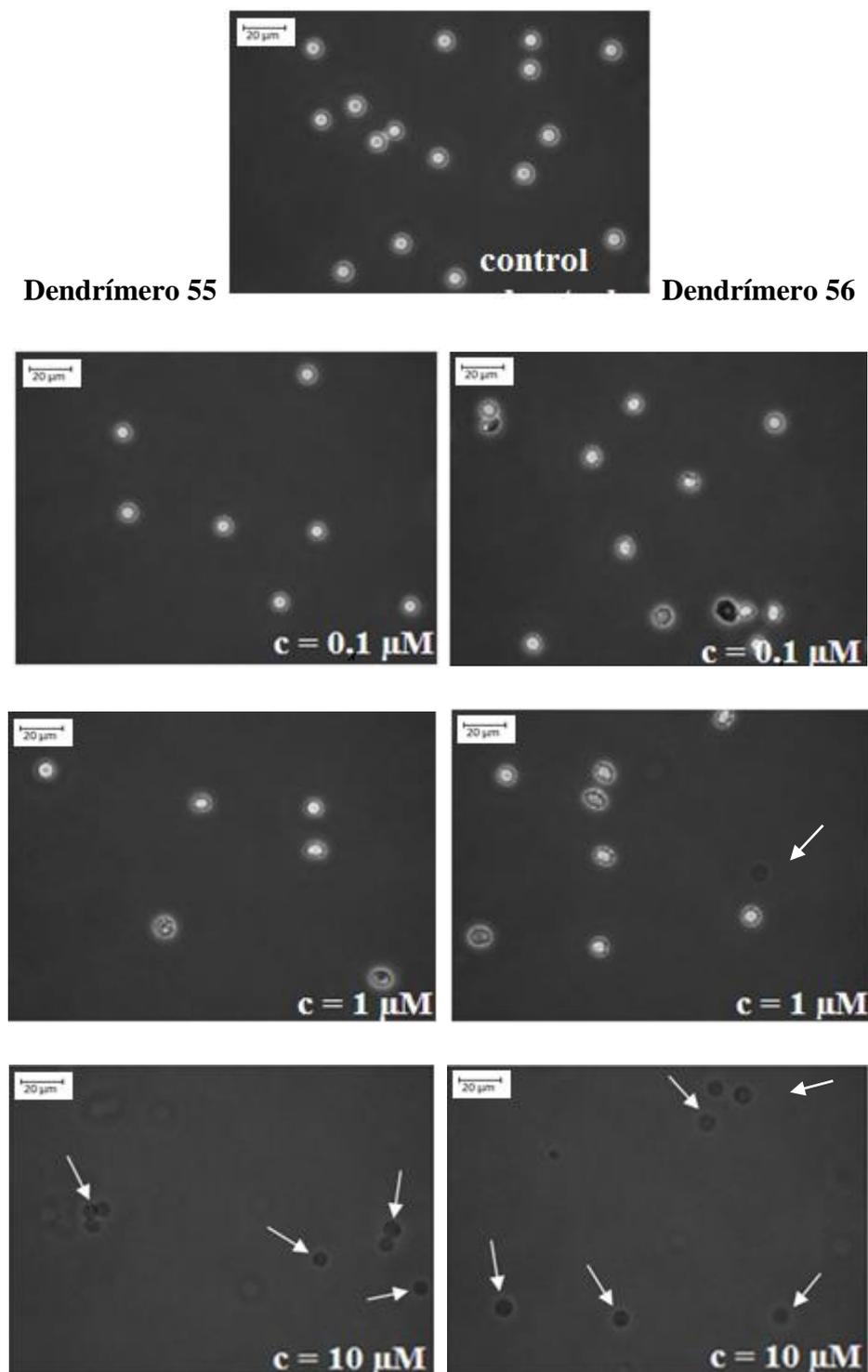
Ambos dendrímeros **55** y **56** causan un aumento estadísticamente significativo en el grado de hemólisis en los eritrocitos tratados. Sin embargo, en un intervalo de concentraciones de 0.01 hasta 0.1 M, estos cambios son pequeños, de 2.5% (valor de control) a aproximadamente 7.5% (0.1  $\mu\text{M}$ ). Para concentraciones más altas, más eritrocitos son afectados. El dendrímero **55** a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  causa un 78% de hemólisis, mientras que el dendrímero **56** a la misma concentración causa un 84% (Figura 5.28). Basándose en estos resultados, se puede concluir que los dendrímeros estudiados son hemotóxicos a una concentración superior a 0.1  $\mu\text{M}$ .



**Figura 5.28** Hemólisis de eritrocitos inducida por los dendrímeros **55** y **56**.

El análisis microscópico de los eritrocitos incubados durante 3 horas con estos sistemas a unas concentraciones de 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$  muestra que pierden su morfología normal en presencia de los dendrímeros híbridos.

Para concentraciones bajas se observa la aparición de proyecciones citoplasmáticas en la superficie y la conversión de los eritrocitos normales a equinocitos. A la concentración más alta utilizada (10  $\mu\text{M}$ ) se observaron muchos residuos procedentes del escape de la hemoglobina. En la Figura 5.29, se muestra que el dendrímero **55** presenta una hemotoxicidad a 1  $\mu\text{M}$  mientras que para sistemas **56** se observa a todas las concentraciones estudiadas.



**Figura 5.29** Fotografías de eritrocitos control y eritrocitos tratados con los dendrímeros híbridos **55** y **56** a las concentraciones 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ .

La hemotoxicidad observada para los sistemas **55** y **56** (1  $\mu\text{M}$  lisa un 30% para ambos casos) es menor que la detectada para dendrímeros puramente carbosilano (1  $\mu\text{M}$  lisa 87%)<sup>81</sup> y sistemas híbridos basados en viológeno-fósforo

de segunda generación (1  $\mu\text{M}$  lisa 40%). Sin embargo, la hemotoxicidad se reduce significativamente para dendrímeros viológeno-fósforo de primera generación (1  $\mu\text{M}$  lisa 5-10%), sin duda como consecuencia de un menor número de cargas interiores y la presencia de grupos neutros en la superficie dendrítica.<sup>73</sup>

Estos hechos sugieren que la toxicidad en glóbulos rojos no sigue los mismos parámetros que en células eucariotas, en las que ambos dendrímeros originan un daño paralelo o similar. No se puede inferir una correlación sencilla con el número de cargas positivas, por lo que otros factores como el tamaño, la topología, la naturaleza de los grupos de amonio, densidad de carga locales y tipología pueden ser también determinantes.

#### *b) Estudio de la interacción de los dendrímeros con la proteína HSA*

La interacción entre los dendrímeros **55** y **56** con la proteína HSA se ha estudiado mediante la utilización de diferentes técnicas: potencial zeta, dicroísmo circular y fluorescencia.

##### *I. Potencial zeta ( $\zeta$ )*

En primer lugar se han estudiado los valores de potencial zeta de ambos dendrímeros en diferentes medios, disueltos en agua y en un tampón fosfato, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 5.8.

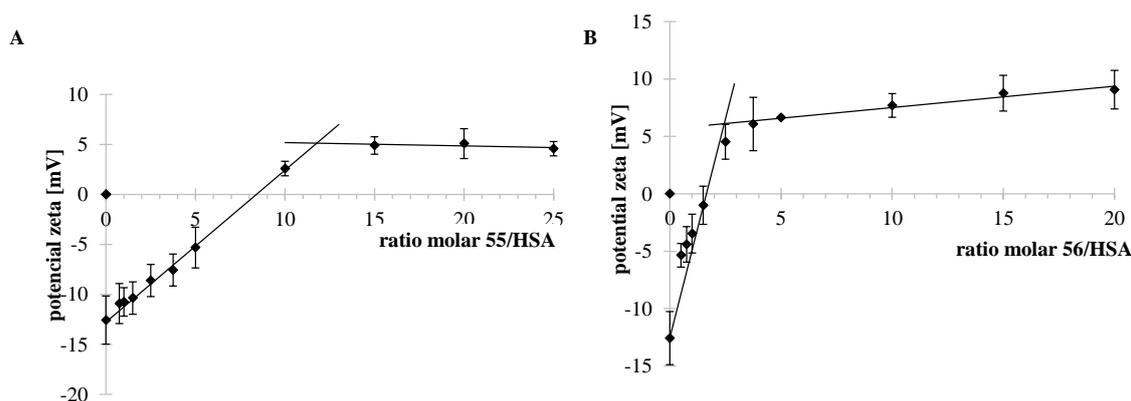
**Tabla 5.8** Valores de potencial zeta obtenidos para los dendrímeros híbridos en agua y en una disolución tampón.

Dendrímtero estudiados	Potencial zeta [mV]	
	en agua	en tampón fosfato
<b>55</b>	17.0 $\pm$ 2.4	4.1 $\pm$ 0.7
<b>56</b>	22.3 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 1.5

En agua se observa que el valor de potencial zeta para el dendrímtero **56** es mayor que para el sistema **55**, esto se atribuye simplemente al mayor tamaño y número de cargas del sistema **56**.

Sin embargo, estos valores son significativamente más bajos disueltos en el tampón. El tampón presenta un pH fisiológico, estos sistemas son altamente dependientes del pH, y puede que en el tampón el número de unidades de amonio terminales descienda. Otro aspecto importante es la alta concentración de sales que posee el tampón, lo que puede contribuir a que existan interacciones con los contraiones fosfato facilitando la formación de pares iónicos. Este hecho puede conllevar también a una menor exposición de los grupos amonio periféricos, y explicar los valores observados.

Para estudiar la interacción de los dendrímeros con HSA, se representó los valores del potencial zeta frente a la relación molar dendrímero/HSA, permitiendo de esta forma determinar el número de moléculas de dendrímero que se unen a la proteína (Figura 5.30).



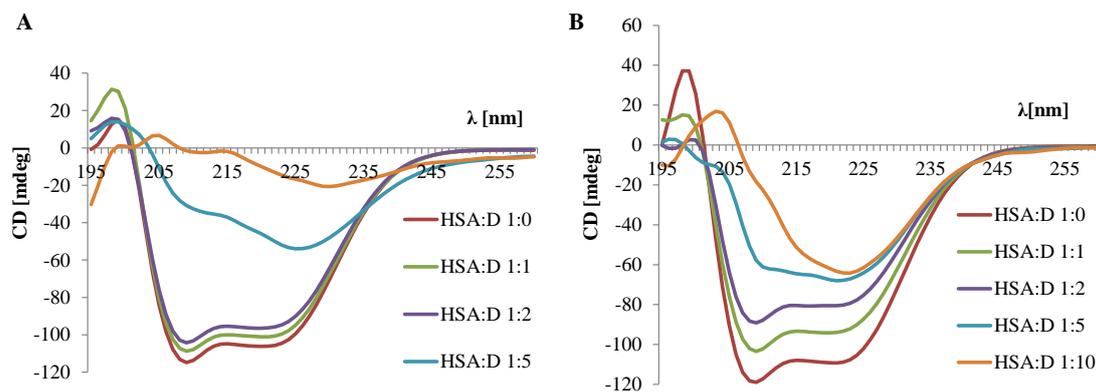
**Figura 5.30** Cambios del potencial zeta para HSA después de la adicción de los diferentes dendrímeros: A) **55** y B) **56** ( $x = 12$ ,  $x$  es el número de repeticiones,  $C_{HSA} = 0.2 \mu M$ ).

La molécula de HSA inicialmente presenta un potencial zeta negativo (-12.6 mV), y cambia a positivo con el aumento de concentración de los sistemas dendríticos. Basándose en los resultados obtenidos para el dendrímero **55** (Figura 5.30 A), se puede calcular que a una sola molécula de HSA se unen de 11 a 12 moléculas de dendrímero. Sin embargo, para el sistema **56**, se observa que tan sólo se unen 2-3 moléculas de dendrímero (Figura 5.30 B). De nuevo, este hecho se atribuye a la diferencia de tamaño y número de cargas para ambos sistemas.

## II. Dicroísmo circular (DC)

Numerosos estudios confirman que la interacción de determinadas moléculas con la proteína HSA puede inducir un cambio conformacional alterando su estructura secundaria, y por consiguiente afectar a su función.<sup>89</sup>

La estructura secundaria de las proteínas puede determinarse por espectroscopia de DC en la región de UV lejano. La señal de DC refleja una media de la población molecular, por lo que no se puede determinar qué residuos concretos están implicados en cada tipo de estructura, aunque sí es posible analizar los cambios generados en cada una de las estructuras, por comparación de los espectros obtenidos con los teóricos. Por lo tanto, un cambio en el espectro de DC de albúmina es indicativo de cambios en su estructura secundaria.



**Figura 5.31** Espectros de dicroísmo circular de la proteína HSA ( $c = 2.5 \mu\text{M}$ ) en presencia de concentraciones crecientes de los dendrímeros: A) **55** y B) **56**; ( $x = 6$ ,  $x$  es el número de repeticiones, cada espectro es el promedio de seis réplicas).

A concentraciones bajas de dendrímoro **55**,  $2.5$  o  $5 \mu\text{M}$  (proporción molar HSA/**55** 1:1 ó 1:2), los cambios en la forma del espectro pueden considerarse insignificantes debido a que son inferiores a 10%. Sin embargo, concentraciones mayores de este sistema (relación molar HSA/**55** 1:5 ó 1:10), sí provocan una alteración significativa en el espectro de DC de albúmina (Figura 5.31 A).

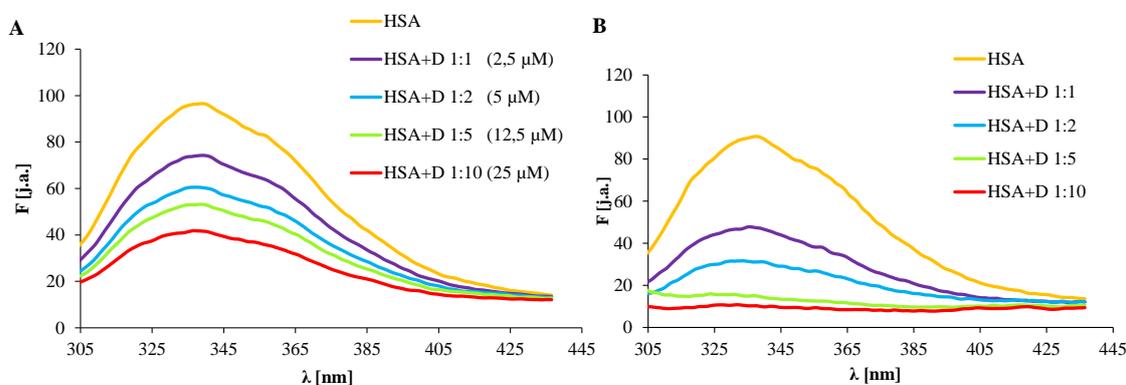
En el caso del dendrímoro **56**, se observan cambios significativos ya a bajas concentraciones (Figura 5.31 B). Estos resultados indican que este sistema afecta

a la estructura secundaria de HSA a partir de 2  $\mu\text{M}$ , no descartándose que pueda dañar por debajo de esa concentración.

Aunque ambos dendrímeros en concentraciones altas modifican la estructura secundaria de HSA, no se puede establecer cuál de los dos sistemas altera la estructura de la proteína de manera significativa, y por consiguiente a su función.

### III. Fluorescencia

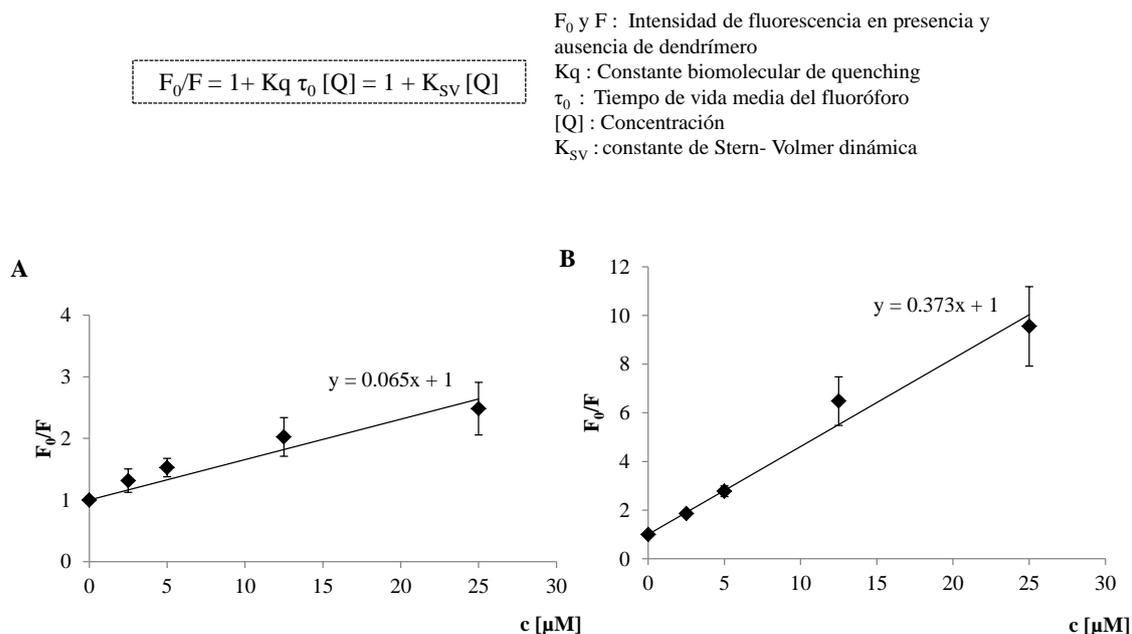
La influencia de estos sistemas en la conformación de la proteína HSA se ha corroborado por intensidad de fluorescencia. Esta proteína tiene un residuo de triptófano en su estructura que permite el uso esta técnica. Este residuo es accesible para el sistema dendrítico, por lo que una desactivación de la fluorescencia de HSA es indicativa de una interacción con la proteína por un cambio estructural en la zona de triptófano. Se representó gráficamente los espectros de fluorescencia de la albúmina después de la adición de concentraciones crecientes de los dendrímeros **55** y **56** (Figura 5.32).



**Figura 5.32** Espectros de fluorescencia de HSA ( $c = 2.5 \mu\text{M}$ ) en presencia de concentraciones crecientes de los dendrímeros: A) **55** y B) **56**; ( $x = 6$ ).

Se ha observado una disminución en la intensidad de la fluorescencia al aumentar la concentración de dendrímoro, lo que indica una desactivación de la fluorescencia de HSA por parte de ambos dendrímeros. Estos cambios sugieren que los dendrímeros modifican la estructura secundaria de la proteína, siendo más acusada para el dendrímoro **56**.

Las representaciones de Stern-Volmer para la desactivación de la fluorescencia de HSA con ambos dendrímeros se muestran en la Figura 5.33.<sup>90</sup> Las curvas de Stern-Volmer para ambos dendrímeros son lineales indicando que el mecanismo de desactivación es dinámico. Las constantes de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) encontradas son  $K_{SV} = 0.65 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  para el sistema **55** y  $K_{SV} = 3.73 \times 10^5 \pm 0.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  de sistema **56**.



**Figura 5.33** Gráficas de Stern-Volmer. Amortiguamiento de la fluorescencia de HSA por los dendrímeros: A) **55** y B) **56**; ( $x = 6$ ).

La desactivación de la fluorescencia de la albúmina no fue acompañada por ningún desplazamiento hacia el rojo o el azul del máximo de emisión para los dendrímeros. El cambio de  $\lambda_{\text{max}}$  durante la desactivación de fluorescencia sugeriría que el residuo de triptófano fue expuesto a un ambiente más polar (desplazamiento hacia el rojo) o menos polar (desplazamiento hacia el azul). Sin embargo, este no fue el caso encontrado en esta Memoria. Esto puede significar que, aunque el residuo de triptófano (Trp) es más accesible para el inhibidor de la fluorescencia, esta interacción no se trasladó a un ambiente de diferente polaridad. En otras palabras, se producen algunos reordenamientos estructurales,

pero no vinculados con el cambio en la polaridad en las inmediaciones del cromóforo.

En los dendrímeros fósforo-viológeno-carbosilano, la presencia de grupos terminales  $-NH_3$  permite la interacción con la proteína por enlaces de hidrógeno. Este hecho puede explicar los cambios en las estructuras secundarias. Para ambos híbridos utilizados, la constante de Stern-Volmer está en el mismo rango que las observados para los dendrímeros viológeno-fósforo: el valor más alto encontrado es para un sistema con unidades viológeno de 36 cargas positivas interiores  $13.1 \times 10^5 M^{-1}$  (Figura 5.26 C) y la más baja ( $0.75 \times 10^5 M^{-1}$ ) se observó para los compuestos con 6 cargas positivas interiores.<sup>73</sup> Sin embargo, para el dendrímero **56**, que posee 12 cargas en el interior y 24 cargas exteriores, la interacción con HSA es más fuerte que la del dendrímero **55** con 24 (12+12) cargas positivas en total. Esto puede sugerir, como era de esperar, que la interacción más fuerte entre la proteína y el dendrímero es una consecuencia de la presencia de cargas positivas exteriores.

### 5.3.3 Dendrones bifuncionalizados

En este apartado se han estudiado el dendrón de tercera generación catiónico, y su correspondiente complejo metálico con Cu(II) (Figura 5.34).

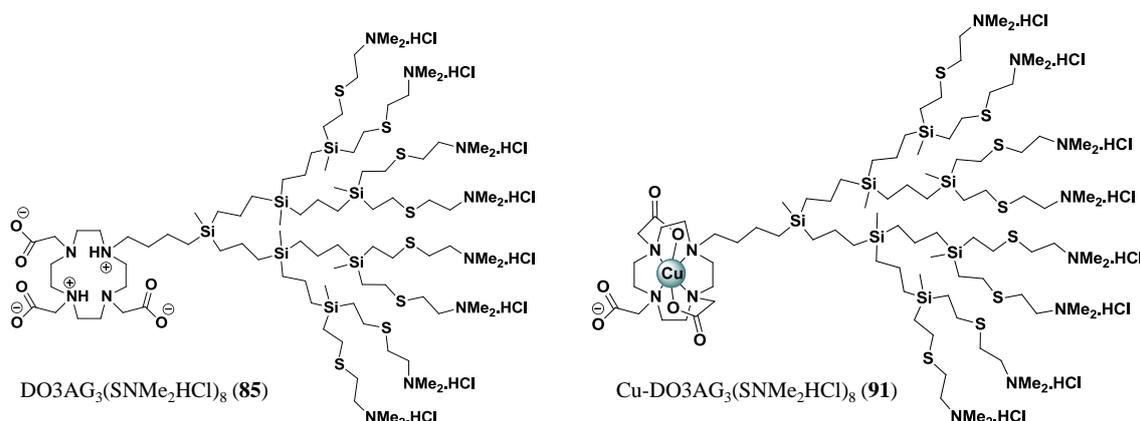
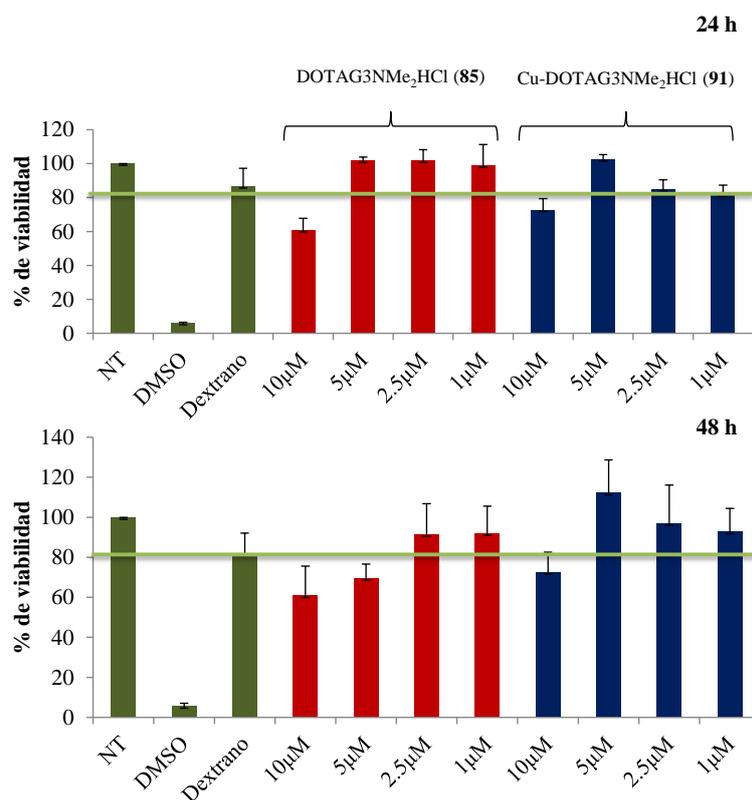


Figura 5.34 Representación estructural de los sistemas catiónicos **85** y **91**.

### 5.3.3.1 Biocompatibilidad

La citotoxicidad de los compuestos se ha evaluado mediante un ensayo MTT en CMSP, utilizando como controles NT (células sin tratar), DMSO (10-20%, control de muerte celular) y dextrano (20  $\mu\text{M}$ , control macromolecular de viabilidad). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.35.



**Figura 5.35** Ensayo MTT en CMSP tratadas durante 24 y 48 horas con los dendrones **85** y **91** en un amplio rango de concentraciones.

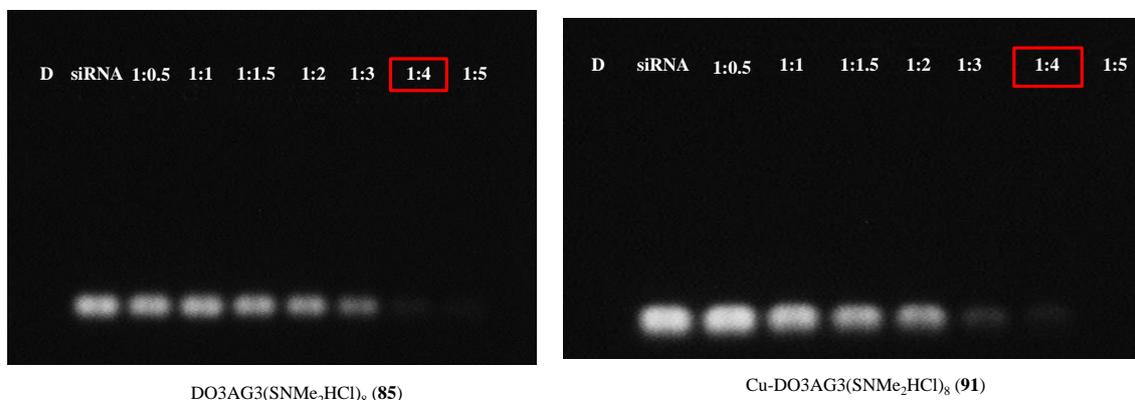
Ambos dendrones se pueden utilizar hasta concentraciones de 5  $\mu\text{M}$ , no generando ninguna toxicidad adicional la inclusión de Cu(II) en el fragmento DO3A.

### 5.3.3.2 Estudios de formación de nanoconjugados

Una vez estudiada la toxicidad de los dendrones sintetizadas, el siguiente paso fue verificar si son capaces de unir material nucleico. La mayoría de los experimentos recogidos en este apartado se realizan de forma similar a los descritos en el apartado 5.3.2.1 para dendrímeros híbridos fósforo-carbosilano.

*a) Ensayos de electroforesis en gel de agarosa*

En ambos casos se obtiene la misma relación molar de carga 1:4 en la formación de los nanoconjugados (Figura 5.36).



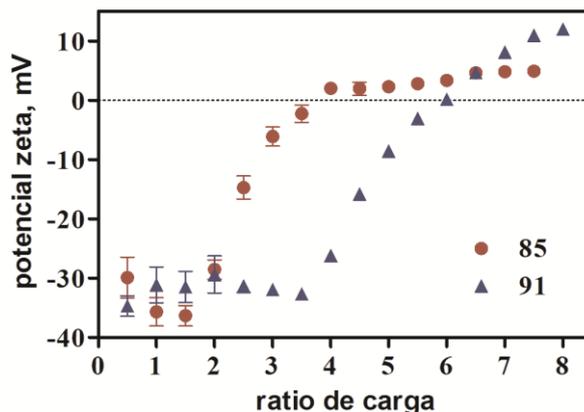
**Figura 5.36** Electroforesis de los nanoconjugados siBcl-xl/**85** y siBcl-xl/**91** para distintas relaciones de carga con tiempos de incubación de 15 min.

En el dendrón **85** las cargas aniónicas de los grupos carboxilato del ligando DO3A podrían ejercer una cierta repulsión electrostática con el siRNA, Sin embargo, en el sistema **91** al estar anclado el metal en el ligando DO3A ésta repulsión se ve disminuida, lo que explicaría la ligera mejora observada para el dendrón **91**.

*b) Potencial zeta ( $\zeta$ )*

A partir de una muestra de siRNA, se van añadiendo diferentes cantidades de los dendrones (**85** y **91**) para obtener las diferentes proporciones de carga (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 etc). En cada adición de compuesto se agita y se incuba durante 5 minutos, para a continuación realizar la medida de potencial  $\zeta$  (Figura 5.37).

De estos resultados se deduce una clara relación molar 1:4 para el dendrón **85**. Para el sistema **91** la gráfica es más complicada, intuyéndose una relación de carga 1:6 o superior, probablemente porque el metal provoque algún tipo de interacción que dificulte la medida.



**Figura 5.37** Potencial zeta para distintas relaciones de carga de los nanoconjugados formados por los dendrones **85** y **91** con el siRNA Bcl-x1 marcado con fluoresceína.

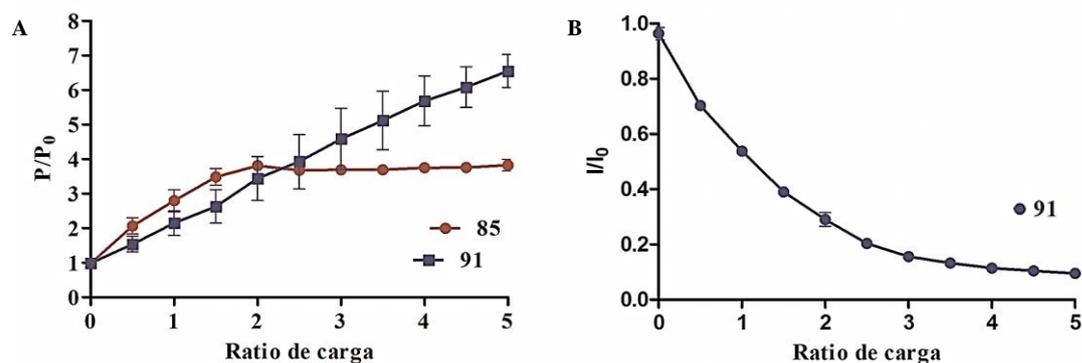
### c) Polarización de fluorescencia

De nuevo, esta técnica ha permitido estudiar dos aspectos interesantes de estos sistemas: (i) estudio de la relación molar óptima y (ii) la estabilidad del nanoconjugado formado frente al desplazamiento por heparina.

#### i. Estudio de la relación molar de carga óptima

El protocolo es igual que en los casos anteriores (ver apartado 5.3.2.1), se prepara una disolución de siRNA marcado con fluoresceína y se van añadiendo diferentes cantidades de los dendrones (**85** y **91**) para obtener las diferentes proporciones de carga. Cada adición de compuesto se agita y se incuba durante 5 min, y luego se registra el espectro de polarización de fluorescencia (Figura 5.38 A).

En el caso del dendrón **85** se observa que a partir de una relación de cargas 1:2 se empieza a formar el nanoconjugado. Sin embargo, en el caso del dendrón **91**, la presencia del metal produce una desactivación de la señal, por lo que se realizó el estudio por fluorescencia (Figura 5.38 B). Por fluorescencia, se observa una relación molar entre 1:3 y 1:4 para el dendron **91**, en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio llevado a cabo en gel de agarosa.

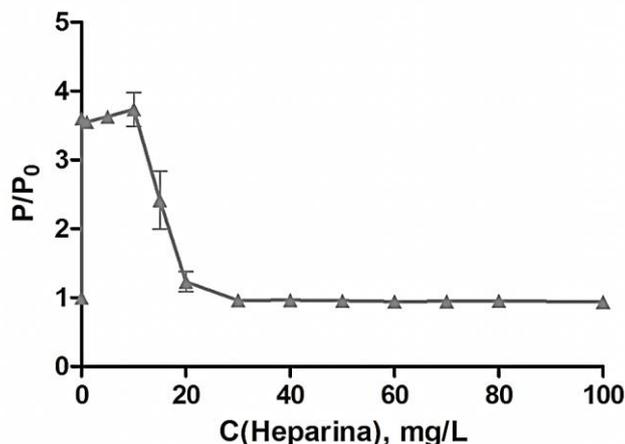


**Figura 5.38** Estudio de la formación de los nanoconjugados formados por los dendrones **85** y **91** con el siRNA Bcl-x1 marcado con fluoresceína mediante A) relación entre la polarización final y la polarización inicial ( $P/P_0$ ) y B) fluorescencia.

**ii. Estudio de la estabilidad del nanoconjugado formado mediante el desplazamiento con heparina**

Este estudio se realiza de la misma forma que en los dendrímeros híbridos descrito en el apartado 5.3.2.1, utilizando solo el dendrón **85**, ya que cobre produce un fenómeno de desactivación de la señal. En primer lugar, se forma el nanoconjugado entre el siRNA marcado con fluoresceína y el dendrón en una relación de carga 1:4. Posteriormente, se van añadiendo cantidades de heparina desde 1 a 100 mg/L, se incuba durante 5 minutos y se van registrando los espectros correspondientes (Figura 5.39).

En este caso, lo que se observa es que el nanoconjugado con el dendrón **85** se ve desplazado a 20 mg/L, análogo al encontrado para dendrímeros híbridos esféricos fósforo-carbosilano, y de nuevo concuerda con lo descrito para sistemas de naturaleza puramente carbosilano.<sup>82</sup>



**Figura 5.39** Estudio del desplazamiento de heparina en el nanoconjugado formado por el dendrón **85** y el el siRNA Bcl-x1 marcado mediante la relación entre la polarización final y la polarización inicial ( $P/P_0$ ) para distintas concentraciones de heparina.

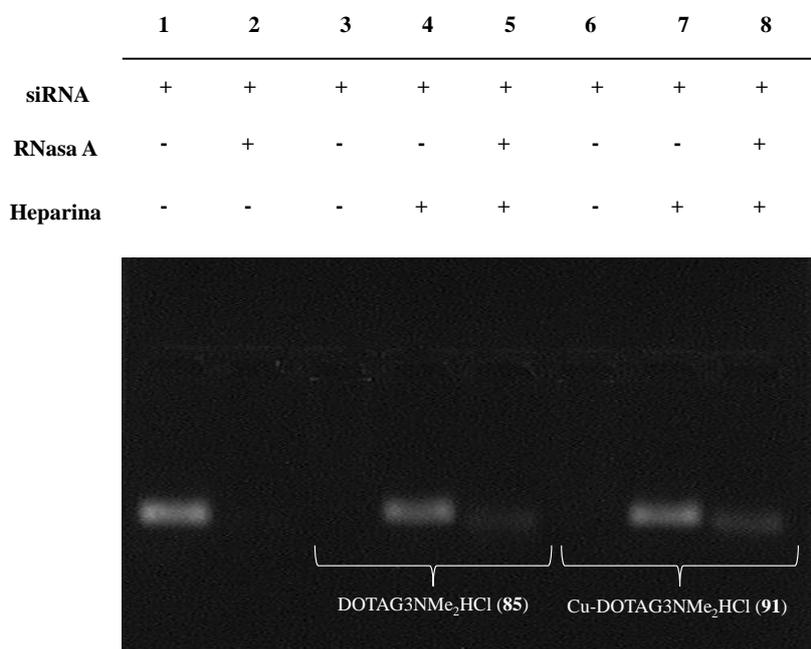
*d) Estudios de estabilidad frente a RNasas en gel de agarosa*

Para evaluar la capacidad de los dendrones de proteger o evitar la degradación del material genético en presencia de RNasa A, se prepararon 5 muestras diferentes (Figura 5.40):

- Muestra 1 (Columna 1): siRNA en PBS.
- Muestra 2 (Columna 2): siRNA en presencia de RNasa A (degradación del material genético).
- Muestra 3 (Columna 3 y 6): siRNA y el dendrón correspondiente (formación del nanoconjugado).
- Muestra 4 (Columna 4 y 7): siRNA y el dendrón correspondiente en presencia de heparina (desplazamiento del material genético).
- Muestra 5 (Columna 5 y 8): el nanoconjugado en presencia de RNasa A.

De este estudio se deduce que estos sistemas pueden retardar la degradación del siRNA, pero no la impiden. Este comportamiento es diferente al observado en dendrímeros esféricos de tipo carboxilano, donde si existe una protección frente a la RNasa A.<sup>82</sup> Esta diferencia puede ser debida a que estos sistemas son

más pequeños que un dendrímero y la interacción más superficial, siendo menos eficaz la protección del material genético.



**Figura 5.40** Ensayo de estabilidad de los nanoconjugados formados por los dendrones **85** y **91** con el siRNA Bcl-x1 marcado frente a la RNasa A.

### 5.3.4 Conclusiones del apartado

A lo largo de este apartado se han estudiado diferentes sistemas dendríticos como posibles agentes transfectantes y otras propiedades biofísicas de interés biológico.

De los todos los sistemas fósforo-carbosilano se han elegido tres sistemas híbridos **45-47** como agentes transfectantes, capaces de formar nanoconjugados con siRNA con una biocompatibilidad adecuada. No obstante, el sistema **47** da lugar a situaciones menos estables a relaciones de carga similares. Además, todos ellos han mostrado originar nanoconjugados menos estables que los formados con dendrímeros precursores basados en átomos de fósforo o carbosilano. Este hecho, puede explicar la obtención de inhibiciones moderadas en los experimentos de infección por el VIH.

Con respecto a los dendrímeros fósforo-viológeno-carbosilano, la viabilidad celular de los sistemas **55** y **56** comparada con los dendrímeros análogos fósforo-viológeno, tentativamente sugiere que la toxicidad está relacionada con el número de cargas en el exterior con una contribución secundaria provocada por las cargas interiores. Sin embargo, con respecto a la hemotoxicidad no existe ninguna correlación con respecto al número de cargas exteriores y su diferente localización (en el interior o exterior).

Se ha corroborado por diferentes técnicas que la interacción con la proteína HSA es más acusada con el dendrímero de segunda generación **56**, lo que se traduce en una modificación más fuerte en la estructura secundaria de HSA que en caso del sistema **55**. Probablemente, todo sea consecuencia del mayor número de cargas positivas externas, siendo las cargas internas de menor relevancia.

Los sistemas dendríticos catiónicos **85** y **91** utilizados muestran biocompatibilidades aceptables, en torno a 5  $\mu$ M. Forman nanoconjugados con diferentes siRNA, con una estabilidad frente a heparina similar a la observada en dendrímeros híbridos esféricos. Además, el grado de protección frente a nucleasas parece ser inferior a los dendrímeros carbosilano esféricos, probablemente como consecuencia de sus diferentes topologías. No obstante, sería necesario realizar ensayos funcionales para corroborar su eficacia como posibles agentes transfectantes.

## 5.4 SISTEMAS ANIÓNICOS COMO AGENTES ANTIVIRALES FRENTE AL VIH

Los estudios sobre la actividad antiviral de los diferentes sistemas dendríticos aniónicos se han realizado por la autora de esta Memoria en el laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital Gregoria Marañón, grupo liderado por la Dra. M<sup>a</sup>Ángeles Muñoz Fernández.

Los compuestos aniónicos sintetizados a lo largo de esta Memoria son potenciales candidatos como agentes antivirales frente al VIH, ya que presentan grupos aniónicos aptos para su unión a dominios catiónicos del receptor CD4 y/o de los correceptores CXCR4 o CCR5 de las células dianas, o a las proteínas de la envuelta del virus, como la glicoproteína gp120, impidiendo su unión y fusión.<sup>50</sup>

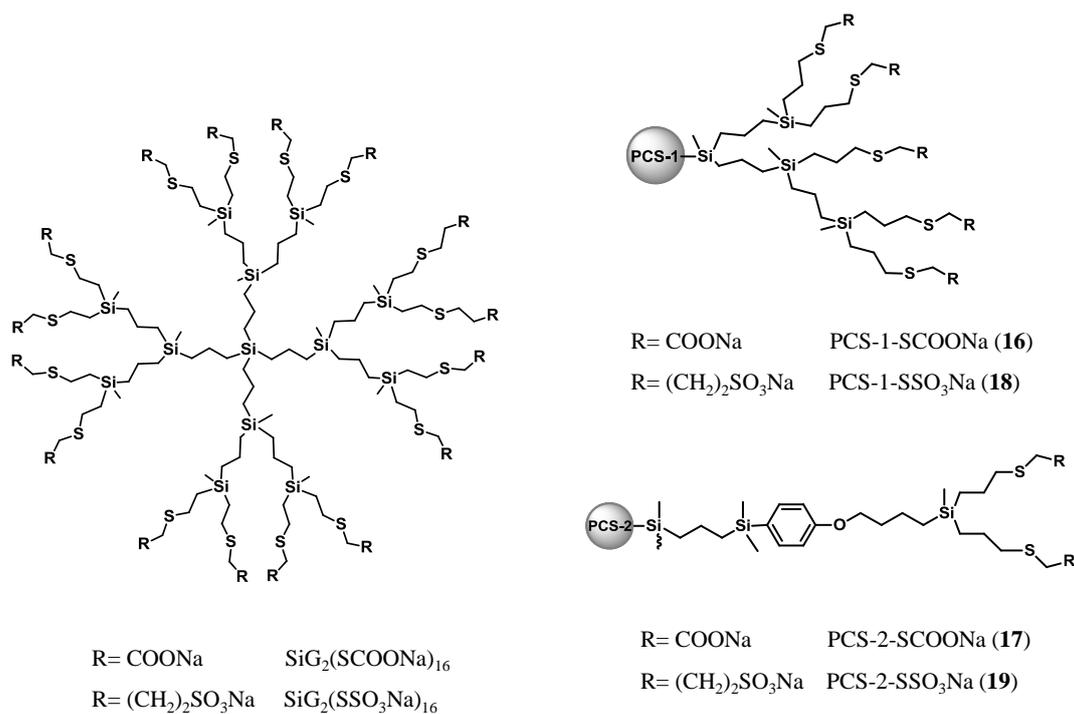
Para evaluar su posible actividad antiviral frente al VIH, se han realizado los siguientes ensayos:

1. Estudio de la biocompatibilidad en diferentes líneas celulares de los diversos compuestos mediante ensayo MTT, que permite establecer la concentración idónea de trabajo.

2. Ensayos de inhibición de la infección por el VIH. Ensayo en pre-tratamiento, que permite determinar su actividad profiláctica a su concentración máxima no tóxica.

### 5.4.1 Polímeros hiperramificados

En este estudio se incluyeron los polímeros sintetizados por adición tiol-eno PCS-N-SCOONa (N=1 (**16**) y N=2 (**17**)) y PCS-N-SSO<sub>3</sub>Na (N=1 (**18**) y N=2 (**19**)). Estos sistemas se han comparado con dendrímeros esféricos carbosilano con un número similar de cargas en la periferia (Figura 5.41).<sup>67,91</sup>



**Figura 5.41** Representación estructural de los polímeros **16-19** funcionalizados vía tioleno y sus dendrímeros esféricos análogos.

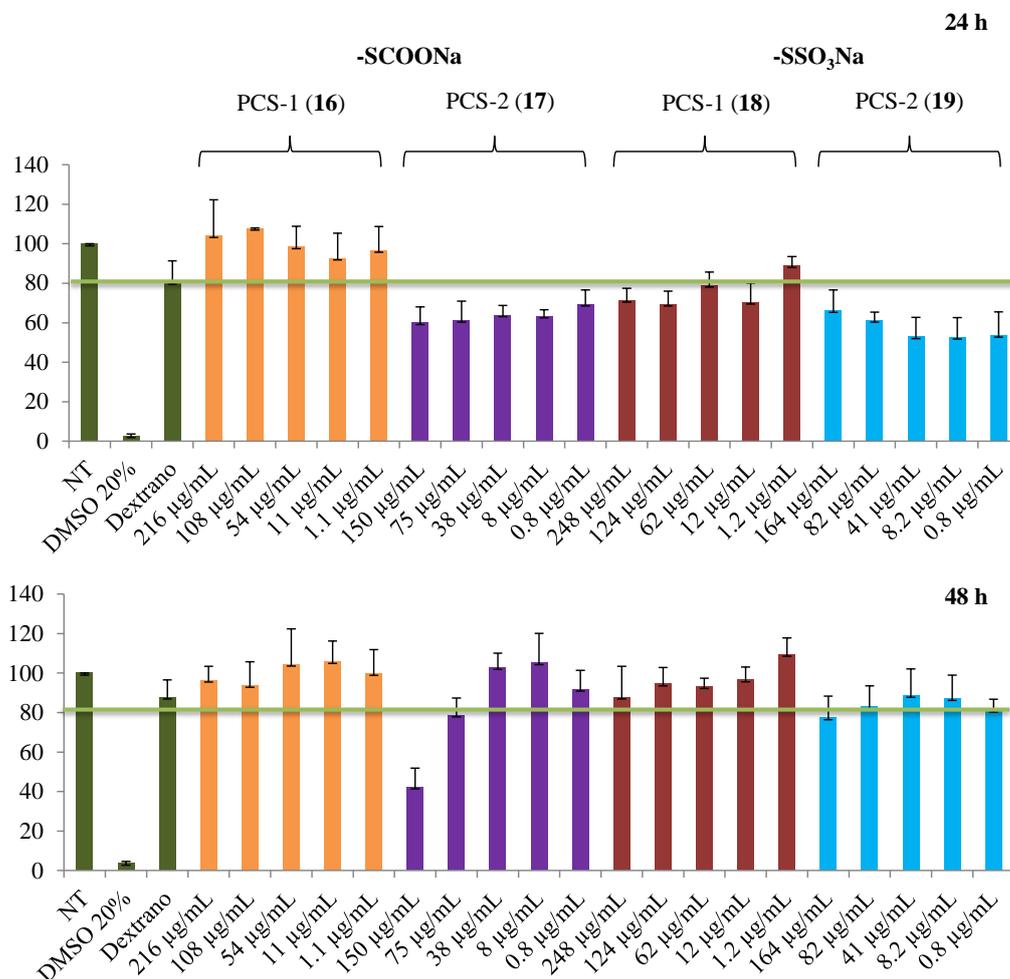
#### 5.4.1.1 Biocompatibilidad

La toxicidad de los polímeros se ha evaluado en dos líneas celulares, HEC-1A (Figura 5.42) y TZM.bl (Figura 5.43). Estas líneas celulares se usan como modelos del epitelio y de la mucosa vaginal respectivamente, y son la primera barrera de defensa frente a la infección por el VIH.

En todos los ensayos de biocompatibilidad realizados en este apartado se han utilizado como controles: NT (células sin tratar), DMSO (10-20 %, control de muerte celular) y dextrano (20  $\mu\text{M}$ , control macromolecular de viabilidad). Las concentraciones se expresan en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ya que estos sistemas son polidispersos. Sin embargo, se han utilizado sus pesos moleculares promedio, para que las concentraciones utilizadas se asemejen a las concentraciones comúnmente empleadas en otros sistemas similares, las cuales son 20, 10, 5, 1 y 0.1  $\mu\text{M}$ .

Los resultados obtenidos en la línea celular HEC-1A muestran que la matriz PCS-1 presenta menor toxicidad que la PCS-2 (Figura 5.42). Este hecho puede

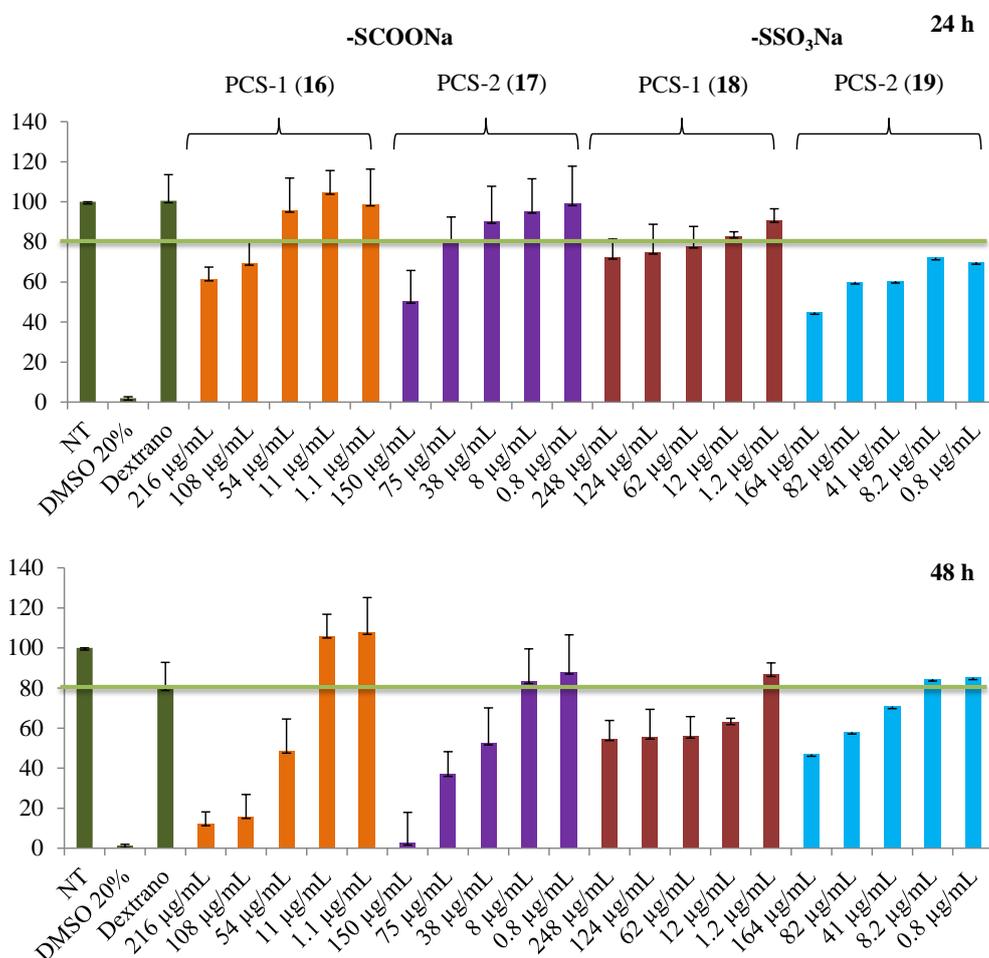
ser debido a que la presencia de anillos aromáticos en su estructura genere cierta toxicidad. Además, también los grupos sulfonato muestran mayor toxicidad que los grupos carboxilato en ambas matrices.



**Figura 5.42** Ensayo MTT en células HEC-1A tratadas durante 24 y 48 horas con los polímeros **16-19** en un amplio rango de concentraciones. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

En el caso de la línea celular TZM-bl, se observa un aumento en sus toxicidades con respecto a la línea celular HEC-1A. En algunos casos se observa que hay sistemas que son tóxicos a las 24 horas pero no a las 48 horas, como es el ejemplo del polímero **19** (Figura 5.43). Esto puede ser debido a que a las 24 horas el sistema ya ha sido degradado y las células que han sobrevivido han podido proliferar. Aunque se debe analizar cada caso en particular, normalmente

siempre es más fiable un dato a 24 horas que a 48 horas. Esto sucede para el polímero **17** en la línea celular HEC-1A y para el polímero **19** en la línea celular TZM-bl. Debido a que los siguientes ensayos se realizaron en células TZM-bl, se descartó el polímero **19**.

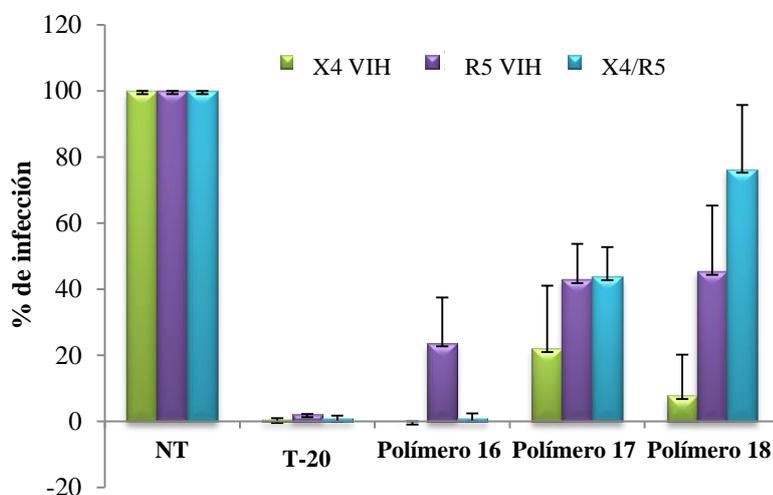


**Figura 5.43** Ensayo MTT en células TZM-bl tratadas durante 24 y 48 horas con los polímeros **16-19** en un amplio rango de concentraciones. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

#### 5.4.1.2 Ensayos de inhibición frente al VIH

Tras evaluar las concentraciones a las que los compuestos son biocompatibles, el siguiente paso es analizar su capacidad para inhibir la infección por el VIH. Los ensayos de inhibición se realizaron en las células TZM-bl, eligiéndose las concentraciones máximas no tóxicas en esta línea celular, las cuales son 11, 8 y 1.2 µg/mL para los polímeros **16-18**,

respectivamente. En todos los ensayos de inhibición se utilizan como controles: NT (células infectadas sin tratar, como control de infección), 20  $\mu$ M de T-20 (inhibidor de la entrada y fusión, como control de inhibición).



**Figura 5.44** Porcentaje de actividad luciferasa medida por intensidad de luminiscencia frente al control de células NT y tratadas con T-20 en la línea celular TZM.bl en pre-tratamiento de los polímeros **16-18** frente a los tres tipos de aislados virales. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

Las células TZM-bl tras ser plaqueadas 24 horas, se trataron durante 1 hora con los polímeros a su concentración máxima no tóxica. Trascurrido dicho tiempo se procedió a la infección con los aislados virales X4-VIH-1<sub>NL4.3</sub>, R5-VIH-1<sub>NLAD8</sub> y tropismo dual X4/R5-VIH-1<sub>89.6</sub> durante 3 horas. El uso de diferentes aislados virales se fundamenta en que el aislado viral R5 es mayoritario en la fase aguda de la infección y el X4 y tropismo dual durante la fase crónica, por lo que es de gran interés saber si su actividad inhibitoria depende del tropismo viral. Después, las células se lavaron con PBS estéril y se repuso el medio de cultivo. Transcurridas 48 horas, se lisaron las células y se cuantificó el porcentaje de infección mediante el un ensayo de luciferasa utilizando un kit comercial y cuantificando la luminiscencia (Figura 5.44).

La presencia de los polímeros aniónicos reduce la infección viral, dando lugar a una mayor inhibición frente a la infección para el aislado viral con

tropismo X4. Este comportamiento coincide con lo que se ha observado con anterioridad para otros dendrímeros polianiónicos, que presentan mayor actividad frente a cepas virales que usan los correceptores CXCR<sub>4</sub> para la infección.<sup>92</sup>

**Tabla 5.8** Comparación de la capacidad antiviral de los sistemas sintetizados con otros sistemas dendríticos.

Sistemas dendríticos estudiados	Nº de grupos funcionales	Concentraciones utilizadas		% de inhibición	
		ppm (µg/ mL)	µM	X4	R5
PCS-1-SCOONa ( <b>16</b> )	33	11	1	99	75-80
PCS-2-SCOONa ( <b>17</b> )	16	8	1	70-80	55-60
PCS-1-SSO <sub>3</sub> Na( <b>18</b> )	33	1.2	0.1	90	50-60
SiG <sub>2</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>16</sub>	16	2.2	0.5	95	80

Los dendrímeros análogos se han estudiado en diferentes líneas celulares, pero para tener una buena comparación de los resultados, es conveniente comparar los datos en células TZM-bl.<sup>53,93</sup> En caso del dendrímero con grupos carboxilato SiG<sub>2</sub>(SCOONa)<sub>16</sub> no se ha encontrado inhibiciones del VIH en las células TZM-bl, pero en otras líneas celulares como CMSP o VK2/E6E7 a concentraciones de 10 µM presentaron inhibiciones de la infección por el VIH similares a las del dendrímero análogo con grupos sulfonato SiG<sub>2</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>16</sub>.<sup>67</sup>

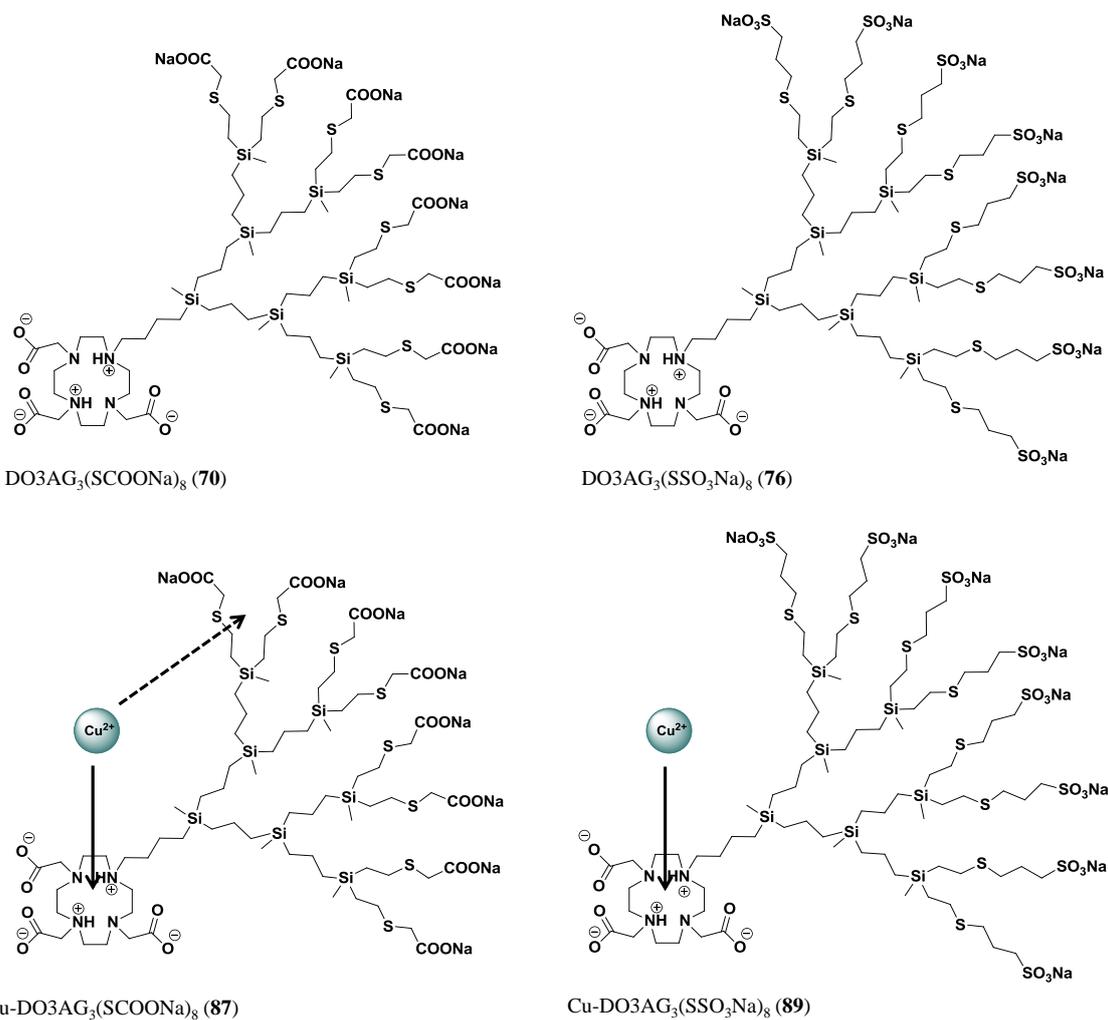
Las mejores inhibiciones se observan con el polímero **16** con grupos carboxilato periféricos, los cuales suelen presentar menor actividad que los grupos sulfonato.<sup>67</sup> Sin embargo, en este estudio no se puede establecer una comparación, ya que cada sistema se ha utilizado a una determinada concentración, en cada caso a la concentración no tóxica. La mayor actividad observada para los polímeros con grupos carboxilato, pueda ser debida a que se ha utilizado una mayor concentración, y por consiguiente haya un mayor número de grupos activos que en el caso del polímero con grupos sulfonatos.

En estos sistemas se observa el mismo perfil de actividad antiviral que en los dendrímeros esféricos. Es decir, en ningún caso se alcanzan inhibiciones de un 100% en ambos aislados virales. No obstante, el uso de terapia de

combinación con algún antirretroviral o con un dendrímero, podrían dar lugar a resultados parecidos o idénticos a los conseguidos con dendrímeros.

### 5.4.2 Dendrones bifuncionalizados

En nuestro grupo de investigación se han sintetizado previamente metalodendrímeros carbosilano aniónicos conteniendo Cu(II) en su estructura, demostrando que el anclaje periférico del metal mejora la actividad antiviral frente al VIH-1 en comparación con el dendrímero solo.<sup>69</sup>



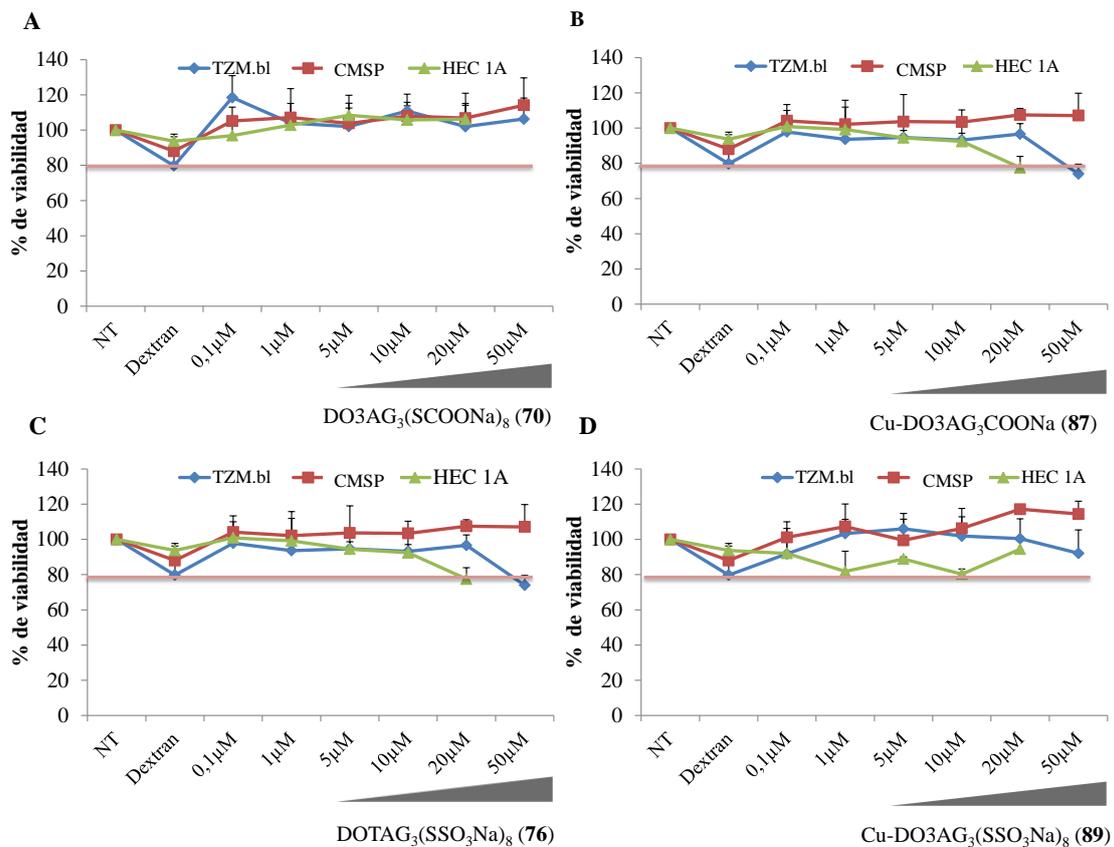
**Figura 5.45** Representación esquemática de los sistemas DO3AG<sub>3</sub>(SCOONa)<sub>8</sub> (70), Cu- DO3AG<sub>3</sub>(SCOONa)<sub>8</sub> (87), DO3AG<sub>3</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>8</sub> (76) y Cu-DO3AG<sub>3</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>8</sub> (89).

En este apartado se han evaluado los sistemas **70**, **76**, **87** y **89** como potenciales agentes antivirales conteniendo grupos carboxilato y sulfonato

periféricos. Como se describió en el Capítulo 4, en el caso de los dendrones carboxilato, la mayor parte del catión Cu(II) estará anclado en el sistema DO3A, pero no se puede descartar que haya un pequeño porcentaje en las ramas periféricas (Figura 5.45).

### 5.4.2.1 Biocompatibilidad

La toxicidad de los dendrones se ha evaluado en tres líneas celulares, HEC-1A, TZM.bl y CMSP mediante ensayos MTT (Figura 5.46).



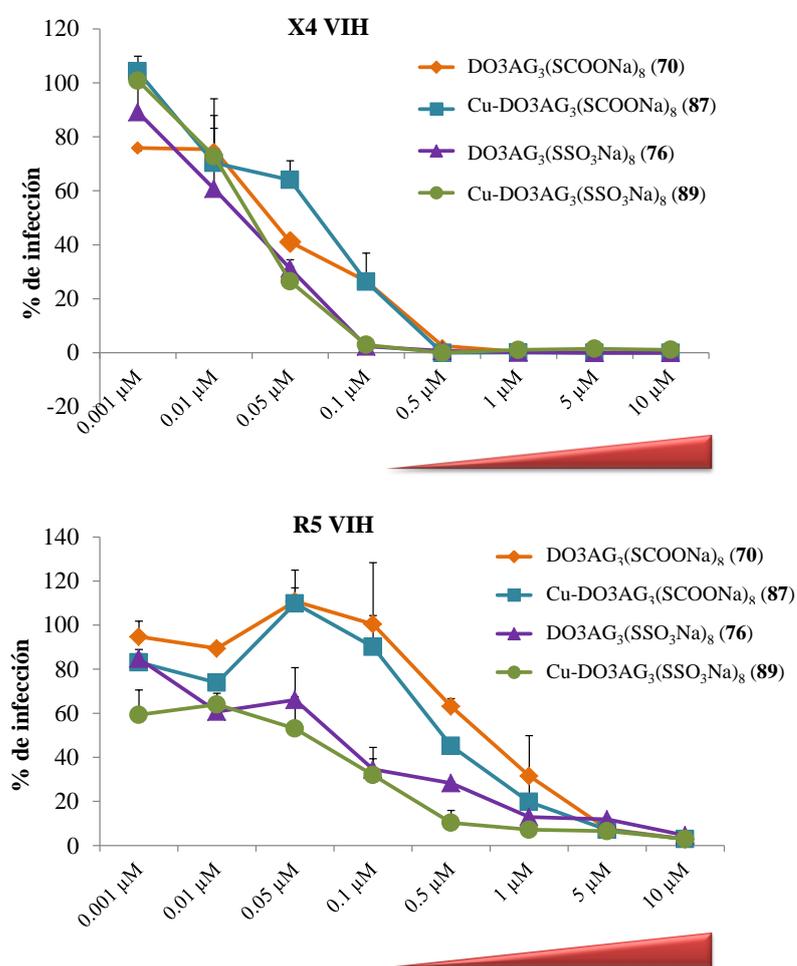
**Figura 5.46** Ensayo MTT en diferentes líneas celulares primarias y vaginales tratadas durante 24 horas con los dendrones **70**, **87**, **76** y **89** en un amplio rango de concentraciones. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes.

Se puede observar que presentan una biocompatibilidad similar en todas las líneas celulares, y además la presencia del cobre no genera toxicidad en los

sistemas. En la mayoría de los casos se observa que no generan toxicidad hasta la concentración de 50  $\mu\text{M}$ .

### 5.4.2.2 Ensayos de inhibición

Los ensayos de inhibición se realizan en las células TZM-bl. Se estudian las curvas de inhibición de los cuatro dendrones en dos aislados virales, con el objetivo de poder determinar el valor de  $\text{EC}_{50}$  (concentración necesaria de un determinado sistema para inhibir el 50% de la infección viral) y observar si la actividad inhibitoria se ve afectada por el aislado viral utilizado según su tropismo.



**Figura 5.47** Actividad anti-VIH en células TZM.bl. Las células se pretrataron con los diferentes sistemas 1 hora antes de ser infectados por los aislados virales X4 trópico VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 trópico VIH-1<sub>NLAD8</sub>.

Las células TZM-bl tras ser plaqueadas 24 horas antes, se trataron durante 1 hora con los dendrones en un amplio rango de concentraciones (10  $\mu\text{M}$ -0.001

$\mu\text{M}$ ). Transcurrido dicho tiempo se procedió a la infección con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub> durante 3 horas. Después se lavaron con PBS estéril y se repuso el medio de cultivo. Transcurridas 48 horas, se cuantificó el porcentaje de infección utilizando el kit de luciferasa (Figura 5.47).

Todos los dendrones muestran buenas actividades, aunque dicha actividad es dependiente del tropismo viral, siendo más activo frente al aislado viral X4 que a R5. Este comportamiento ya se ha observado en otros sistemas aniónicos carbosilano.<sup>91</sup> Los sistemas con grupos sulfonato son más activos debido a que generan una interacción más fuerte con el receptor celular y/o viral. También se observa que la coordinación del cobre no mejora su actividad, probablemente debido a que el complejo formado con el ligando DO3A sea demasiado estable e impida ejercer una acción adicional.

Tras el análisis estadístico, se calcularon los  $\text{EC}_{50}$  para cada sistema (Tabla 5.9). Estos sistemas se compararon con la cuña dendrítica de tipo carbosilano de tercera generación con grupos sulfonato, pero sin el ligando DO3A en el punto focal  $\text{NH}_2\text{G}_3(\text{SSO}_3\text{Na})_8$ .<sup>94</sup>

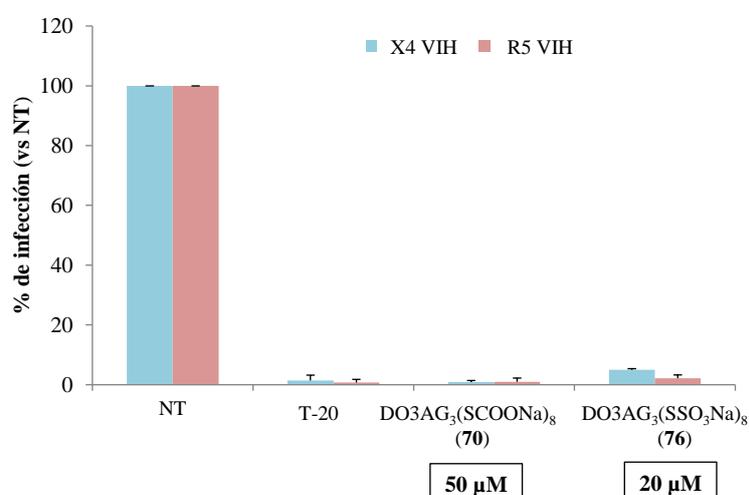
**Tabla 5.9** Valores de  $\text{EC}_{50}$  de los dendrones en células TZM.bl.

Sistema utilizado	X4 VIH	R5 VIH
	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
DO3AG <sub>3</sub> (SCOONa) <sub>8</sub> ( <b>70</b> )	0.031 $\pm$ 0.004	0.57 $\pm$ 0.09
Cu-DO3AG <sub>3</sub> (SCOONa) <sub>8</sub> ( <b>87</b> )	0.0478 $\pm$ 0.009	0.44 $\pm$ 0.09
DO3AG <sub>3</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>8</sub> ( <b>76</b> )	0.015 $\pm$ 0.006	0.07 $\pm$ 0.02
Cu-DO3AG <sub>3</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>8</sub> ( <b>89</b> )	0.019 $\pm$ 0.006	0.05 $\pm$ 0.01
$\text{NH}_2\text{G}_3(\text{SSO}_3\text{Na})_8$	0.080 $\pm$ 0.009	0.20 $\pm$ 0.04

Los valores encontrados son muy dependientes del tropismo viral, y es mucho más acentuado en el caso de los carboxilatos. Las diferencias entre los dendrones solos y su correspondiente complejo metálico no mejoran la actividad, por lo que se descartaron, prosiguiendo el estudio con los sistemas **70** y **76**. Por

otro lado, sí se observa una mejora del sistema  $\text{DO3AG}_3(\text{SSO}_3\text{Na})_8$  (**76**) con respecto al dendrón  $\text{NH}_2\text{G}_3(\text{SSO}_3\text{Na})_8$ , que no presenta el ligando DO3A en el punto focal. La diferencia es más acusada sobre todo en el aislado viral R5, ya que el valor de  $\text{EC}_{50}$  varía un orden de magnitud.

En el caso de que el VIH-1 pudiera atravesar la primera barrera epitelial, es importante conocer si es capaz de inhibir también en las CMSP, ya que en ella se encuentran las diferentes subpoblaciones que expresan la diana del virus, el receptor CD4. Las CMSP activadas se pretrataron 1 hora con las máximas concentraciones no tóxicas de los dendrones y posteriormente se infectaron con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>NL(AD8)</sub>. Después de 72 horas se recogen los sobrenadantes y se cuantifica la cantidad de antígeno VIH-p24<sup>gag</sup> mediante un ensayo ELISA. Se utilizó el antirretroviral T-20 como control de inhibición de entrada y fusión (20  $\mu\text{M}$ ) del VIH. Los resultados que se muestran en la Figura 5.48 son el promedio de tres ensayos independientes.



**Figura 5.48** Actividad anti-VIH en CMSP activadas. Las CMSP se pretrataron con los diferentes sistemas 1 hora antes de ser infectados por los aislados X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5-VIH-1<sub>NLAD8</sub>.

Ambos dendrones inhiben los dos aislados virales X4 y R5 (97 y 98% de inhibición para  $\text{DO3AG}_3(\text{SCOONa})_8$ ; 95 y 98% para  $\text{DO3AG}_3(\text{SSO}_3\text{Na})_8$ ), si bien para el caso del dendrón con grupos carboxílicos es necesario aumentar la

concentración para encontrar valores de inhibiciones similares al dendrón con grupos sulfonato.

Si se realiza un cálculo aproximado del valor del índice terapéutico del sistema con grupos sulfonato (**76**) en ambas cepas virales, se observa que la relación entre su  $TC_{50} > 20 \mu\text{M}$  (TZM-bl) y su eficacia como agentes antiviral  $EC_{50}$  (X4)  $< 0.02 \mu\text{M}$  y  $EC_{50}$  (R5)  $< 0.08 \mu\text{M}$ , da lugar a un índice terapéutico elevado en ambos aislados virales ( $IT(X4) \approx 1000$  y  $IT(R5) \approx 250$ ), lo que indica un margen de seguridad prometedor.

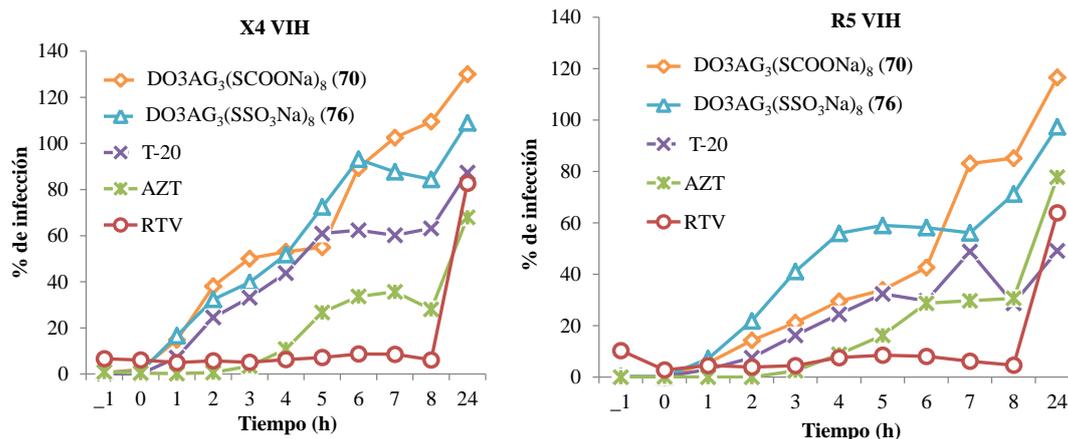
#### 5.4.2.3 Mecanismo de acción

Una vez que se ha estudiado la actividad antiviral de estos dendrones, el siguiente paso es estudiar cuál es su mecanismo de acción. Para ello, se llevaron a cabo los siguientes experimentos:

##### a) *Tiempo de adicción*

Este experimento se diseñó para determinar el modo de acción de estos sistemas en el ciclo viral de la infección por el VIH en células TZM-bl.

Se utilizaron los dos dendrones  $\text{DO3AG}_3(\text{SCOONa})_8$  (**70**) y  $\text{DO3AG}_3(\text{SSO}_3\text{Na})_8$  (**76**) ( $20 \mu\text{M}$ ), y varios antirretrovirales que actúan a diferentes niveles del ciclo de infección por el VIH: T-20 ( $20 \mu\text{M}$ ) inhibidor de la entrada y fusión, AZT ( $1 \mu\text{M}$ ) inhibidor de la transcriptasa inversa y raltegravir (RTV) ( $1 \mu\text{M}$ ) inhibidor de la integrasa. Las células TZM-bl tras ser plaqueadas 24 horas antes, se pretrataron durante 1 hora ( $t = -1$ ) con los dendrones y los diferentes antirretrovirales a su concentración correspondiente. Transcurrido dicho tiempo se procedió a la infección con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>NLAD8</sub> ( $t = 0$ ). A partir de ahí, se fueron añadiendo todos los compuestos a diferentes tiempos. Transcurridas 48 horas, se cuantificó el porcentaje de los niveles de expresión de luciferasa usando el kit de luciferasa para conocer los niveles de inhibición (Figura 5.49).



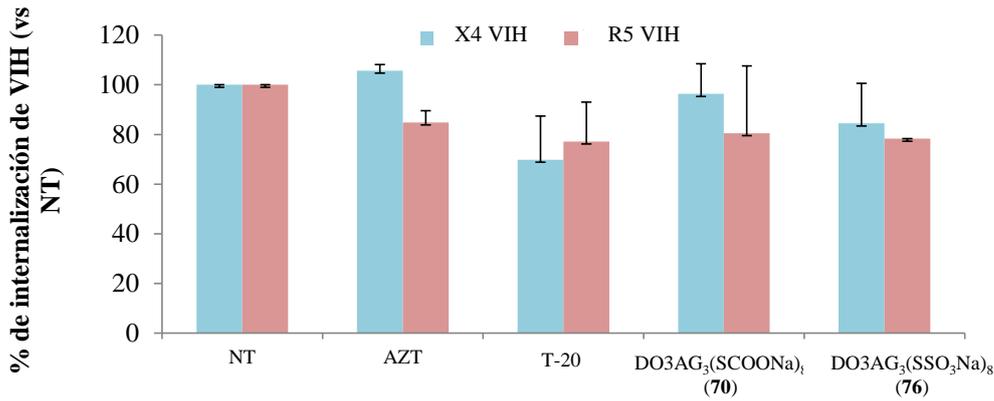
**Figura 5.49** Experimento tiempo de adicción en células TZM-bl. Los resultados mostrados son el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes.

La actividad inhibitoria del fármaco T-20 desciende a partir de las 2 horas, el AZT después de las 5 horas y el RTV después de las 7 horas. Los dendrones presentan buenas actividades hasta las 2-3 horas después de la infección en ambos aislados virales, lo que indica que tiene un perfil de acción similar al de T-20. Es decir, se puede sugerir que actuarían en las etapas tempranas de la infección.

### b) Internalización

Si realmente estos sistemas actúan en las etapas tempranas de la infección, se espera que dificulte la entrada del virus en la célula. Para corroborarlo, se realizó un ensayo de internalización, en el cual se cuantifica la cantidad de virus que ha entrado dentro de la célula.

Las CSMP activadas se pretrataron con los dendrones durante 1 hora antes de la infección por el VIH-1. Se utilizaron como controles los antirretrovirales T-20 y AZT. Trascurrido dicho tiempo se procedió a la infección con los aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>AD8</sub>. Después de 3 horas de infección, las CMSP se lavaron con PBS y glicina (pH=3.2) para eliminar el exceso de virus y los sistemas pegados a las células, y finalmente se lisaron con Triton X-100 0.1%. A continuación, se cuantificó la cantidad de antígeno VIH-p24<sup>gag</sup> que hay dentro de la célula utilizando un ensayo ELISA (Figura 5.50).



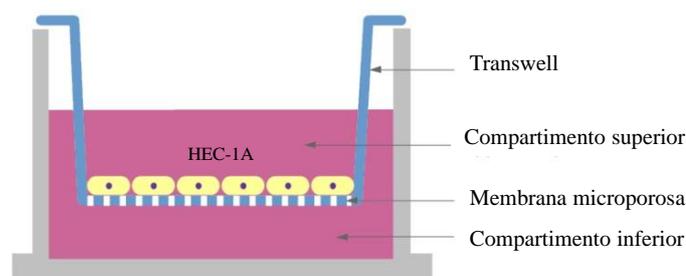
**Figura 5.50** Ensayo de internalización en CMSP activadas. Los resultados mostrados son el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres ensayos independientes. NT, no tratados.

Estos sistemas no impiden la entrada del virus, ya que se obtienen porcentajes de internalización por encima del 80% para ambos sistemas y ambos aislados virales.

Es importante destacar que los ensayos de inhibición y de internalización en CMSP se realizaron en paralelo. Por un lado, en el ensayo de internalización se observa como a las 3 horas de infección más de un 80% del virus ha entrado al interior de la célula. Sin embargo, 48 horas después en el ensayo de inhibición se observan excelentes inhibiciones. Esto hace pensar que estos sistemas no impiden la entrada del virus, pero son capaces de impedir la infección por los aislados virales. Es decir, el virus entra en la célula, pero la presencia de los sistemas le hace no infectivo, no siendo capaz de realizar su ciclo celular e infectar a otra célula.

### c) *Monocapa de células HEC-1A*

Se ha descrito el uso de soportes permeables "transwell" para el estudio de posibles candidatos como microbicidas (Figura 5.51). Este dispositivo imita de alguna forma el epitelio vaginal disponiendo una monocapa de células, y permite comprobar si los sistemas estudiados previenen el paso del VIH-1 a través de una monocapa de células epiteliales.

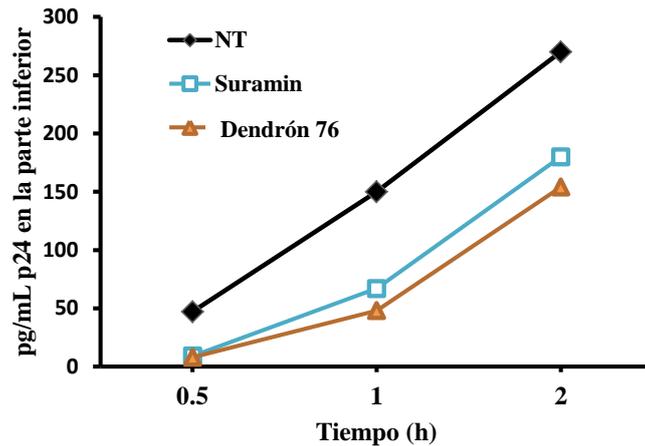


**Figura 5.51** Esquema de un dispositivo transwell.

Para obtener una monocapa perfecta, se procedió al cultivo de células HEC-1A durante siete días en el dispositivo transwell. La formación de la monocapa se monitorizó mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TER). Para ello, se colocan dos electrodos, uno fuera y otro dentro del inserto transwell. De esta forma, una reducción en el valor de TER indica una mala formación de la monocapa. Los valores obtenidos de TER permiten indicar que la monocapa estaba bien constituida. Previamente se observó que los dendrones no afectaban a los valores TER de la monocapa HEC-1A, es decir, que la monocapa no sufre ninguna alteración.

Se llevó a cabo el pre-tratamiento del dendrón **76** ( $20 \mu\text{M}$ ) durante 1 hora. Se utilizó como control el antiviral Suramin, el cual es un inhibidor de la entrada y de la fusión. Posteriormente se infectaron con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>, y se recogió el medio de la parte inferior a 0.5, 1 y 2 horas. Se cuantifica la cantidad de antígeno VIH-p24<sup>gag</sup> que pasa a través de la monocapa mediante un ensayo ELISA (Figura 5.52).

El dendrón DO3AG<sub>3</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>8</sub> (**76**) impide a tiempos tempranos la entrada del X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>, sin embargo, a tiempos largos se observa que el virus atraviesa la monocapa en su totalidad. Esto corrobora los resultados obtenidos en el experimento de internalización, de tal manera que estos sistemas no impiden la entrada del virus.

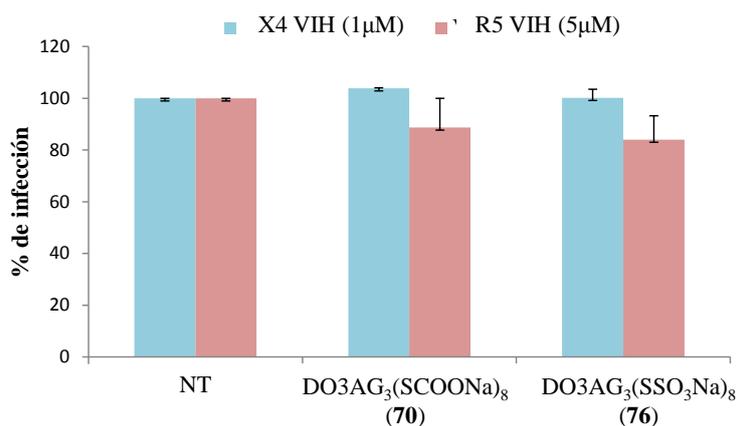


**Figura 5.52** Reducción de la transmisión viral a través de la monocapa de HEC-1A en presencia del dendrón  $\text{DO3AG}_3(\text{SSO}_3\text{Na})_8$  (**76**). Los resultados mostrados son el promedio de tres ensayos independientes.

#### *d) Unión célula-dendrímero*

La unión célula-dendrón se ha estudiado en células TZM.bl. Para ello, se pre-trataron las células durante 1 hora con concentraciones de  $1 \mu\text{M}$  para el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>, y  $5 \mu\text{M}$  para R5 VIH-1<sub>NLAD8</sub>. Se utilizaron las mismas concentraciones para ambos dendrones (**70** y **76**). Transcurrido dicho tiempo se lavaron varias veces, para eliminar el dendrón que no se hubiera unido a las células y posteriormente se infectaron, y tras 48 horas se procedió a la cuantificación de los aislados virales por kit de luciferasa (Figura 5.53).

De la gráfica se deduce que los dendrones no interaccionan con la célula. El pequeño descenso (20% de disminución de la infección) observado en el caso del aislado viral con tropismo R5, podría ser atribuido a dos factores: (i) la utilización de una mayor concentración de ambos dendrones o (ii) el tropismo R5 tiene mayor posibilidad de unirse a co-receptores celulares como CCR5, CCR3, CCR2, a diferencia de X4 que sólo se une a un receptor.

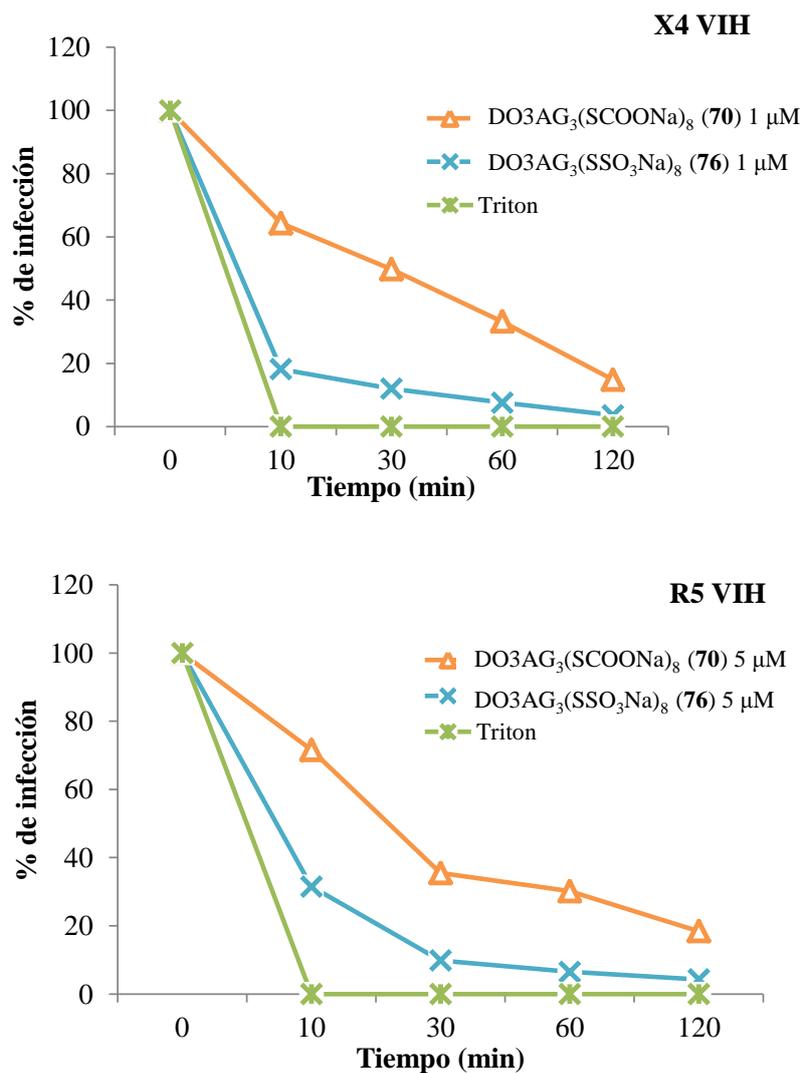


**Figura 5.53** Unión de los dendrones a las células para evitar la infección por el VIH-1. Los resultados mostrados son el promedio de tres ensayos independientes.

*e) Actividad virucida*

A la vista de los resultados obtenidos, el siguiente paso es estudiar si estos sistemas son capaces de inactivar directamente al virus, lo que se denomina actividad virucida.

Para ello, se trataron ambos aislados virales X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5-VIH 1<sub>NLAD8</sub> con concentraciones de 1 y 5 µM de ambos dendrones (70 y 76), respectivamente. Se incuban los aislados virales y el dendrón a diferentes tiempos (10, 30, 60 y 120 minutos). Transcurridos dichos tiempos, las células TZM-bl se tratan con la mezcla (virus-dendrón), obteniendo en la placa concentraciones finales para ambos dendrones de 0.01 µM para el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y 0.05 µM para el aislado R5 VIH-1<sub>NLAD8</sub>, concentraciones a las cuales el porcentaje de inhibición es muy bajo o nulo. Por lo tanto, la inhibición observada está únicamente relacionada con la interacción previa entre los aislados virales y los dendrones (Figura 5.54). Se utiliza como control positivo de inactivación viral Tritón. Transcurridas 48 horas, se lisan las células y se cuantifica el porcentaje de infección utilizando el kit de luciferasa (luminiscencia).



**Figura 5.54** Actividad virucida. Los resultados mostrados son el promedio de tres ensayos independientes.

A estas concentraciones los dendrones se comportan de forma similar en ambos aislados virales, aunque esto puede ser debido a que frente al aislado viral R5 se utiliza una concentración de los dendrones cinco veces mayor que en para el aislado X4.

Por otro lado, se puede observar como el dendrón DO3AG<sub>3</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>8</sub> a 1 μM disminuye la infectividad del aislado X4-VIH-1<sub>NL4.3</sub> en 10 minutos un 80% frente a un 30% del dendrón con grupos carboxilato, lo que indica una interacción más rápida y eficaz entre el dendrón y el VIH-1. Se puede concluir que estos sistemas presentan actividad virucida.

### 5.4.3 Conclusiones del apartado

Con respecto a los polímeros hiperramificados, el polímero **16** con grupos carboxilato funcionalizado vía tiol-eno da lugar a resultados similares a sus dendrímeros análogos como agentes antivirales, pero con la ventaja de utilizar sistemas de síntesis mucho más sencilla, tanto en tiempo como en coste económico.

Los resultados obtenidos con los dendrones bifuncionalizados con el ligando DO3A muestran que estos sistemas pueden suponer una nueva alternativa a los dendrímeros como agentes antivirales.

Todos los sistemas aniónicos y sus correspondientes complejos con cobre, presentan una alta biocompatibilidad. Con los dendrones **70** y **76** se consiguen muy buenas inhibiciones frente al VIH-1, obteniéndose valores interesantes de EC<sub>50</sub>. Con estos sistemas, se consiguen índices terapéuticos elevados en ambas cepas virales X4 y R5, sobre todo para el dendrón **76**. Los estudios sobre el mecanismo de acción indican que estos dendrones actúan en las etapas tempranas de la infección. El ensayo de internalización en paralelo con el de inhibición y junto con el experimento de monocapa HEC-1A, indican que estos sistemas no impiden la entrada del VIH-1 en la célula, sin embargo, presentan una alta actividad virucida. Es decir, los dendrones **70** y **76** se unen al VIH-1 mediante interacciones con proteínas virales, sin embargo, no interacciona con receptores celulares. En conclusión, el dendrón **76** es el que presenta mejor actividad anti-VIH-1, por lo que puede considerarse un sistema prometedor como microbicida frente al VIH.

## **5.5 PERSPECTIVAS DE FUTURO**

En el caso de Cu(II), se ha demostrado que el ligando DO3A da lugar a una coordinación muy estable. Este hecho ha sido corroborado por la ausencia de sinergias observadas entre el metal y la cuña carbosilano en su capacidad antibacteriana y antiviral. Sin embargo, la estabilidad de este ligando como agente quelante es muy importante a la hora de coordinar metales como galio y gadolinio, para su uso como agentes teragnósticos.

Además, la capacidad de captar el metal y formar un complejo estable abre las puertas al uso de estos sistemas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, dónde la desregularización homeostática de determinados metales juega un papel importante en el desarrollo de este tipo de enfermedades.

## 5.6 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Tulu, M.; Erturk, A. S.; *InTech*: 2012, p 89.
- (2) Gao, W.; Thamphiwatana, S.; Angsantikul, P.; Zhang, L. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2014**, *6*, 532.
- (3) Heredero-Bermejo, I.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; García-Gallego, S.; Rasines, B.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Pérez-Serrano, J. *Parasitol Res* **2013**, *112*, 961.
- (4) Wasiak, T.; Marcinkowska, M.; Pieszynski, I.; Zablocka, M.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P.; Klajnert-Maculewicz, B. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 4852.
- (5) Coates, A.; Hu, Y.; Bax, R.; Page, C. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 895.
- (6) Chen, C. Z.; Cooper, S. L. *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 843.
- (7) Tischer, M.; Pradel, G.; Ohlsen, K.; Holzgrabe, U. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 22.
- (8) Chanawanno, K.; Chantrapromma, S.; Anantapong, T.; Kanjana-Opas, A.; Fun, H. K. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4199.
- (9) Hou, S.; Zhou, C.; Liu, Z.; Young, A. W.; Shi, Z.; Ren, D.; Kallenbach, N. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5478.
- (10) Kanai, T.; Thirumoolan, D.; Mohanram, R.; Vetrivel, K.; Basha, K. A. *J. Bioact. Compat. Polym.* **2015**, *30*, 145.
- (11) Dizman, B.; Elasri, M. O.; Mathias, L. J. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *94*, 635.
- (12) Caminade, A. M.; Fruchon, S.; Turrin, C. O.; Poupot, M.; Ouali, A.; Maraval, A.; Garzoni, M.; Maly, M.; Furer, V.; Kovalenko, V.; Majoral, J. P.; Pavan, G. M.; Poupot, R. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7722.
- (13) Muñoz-Bonilla, A.; Fernández-García, M. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 281.
- (14) Chen, C. Z.; Beck-Tan, N. C.; Dhurjati, P.; Van Dyk, T. K.; LaRossa, R. A.; Cooper, S. L. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 473.
- (15) Ortega, P.; Cobaleda, B. M.; Hernández-Ros, J. M.; Fuentes-Paniagua, E.; Sánchez-Nieves, J.; Tarazona, M. P.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5238.
- (16) Rasines, B.; Hernandez-Ros, J. M.; de las Cuevas, N.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Dalton Trans.* **2009**, 8704.
- (17) Fuentes-Paniagua, E.; Hernandez-Ros, J. M.; Sánchez-Milla, M.; Camero, M. A.; Maly, M.; Pérez-Serrano, J.; Copa-Patiño, J. L.; Sánchez-Nieves, J.; Soliveri, J.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1256.
- (18) Lozano-Cruz, T.; Ortega, P.; Batanero, B.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 19294.
- (19) Tesis Doctoral, Elena Fuentes-Paniagua, Alcalá de Henares, **2014**.
- (20) Fuentes-Paniagua, E.; Sánchez-Nieves, J.; Hernández-Ros, J. M.; Fernández-Ezequiel, A.; Soliveri, J.; Copa-Patiño, J. L.; Gómez, R.; de la Mata, J. *RSC Adv.* **2016**, DOI: 101039/c5ra25901k.
- (21) Xu, H.; Li, Z.; Si, J. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 3483.
- (22) Joshi, S.; Shinde, S.; Khinvasara, A.; Joshi, B. *Pharma Util.* **2013**, *7*.

- (23) Vanpouille, C.; Arakelyan, A.; Margolis, L. *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 369.
- (24) Muriaux, D.; Darlix, J. L. *RNA Biol.* **2010**, *7*, 744.
- (25) Sierra, S.; Kupfer, B.; Kaiser, R. *J. Clin. Virol.* **2005**, *34*, 233.
- (26) Zhu, P.; Liu, J.; Bess, J., Jr.; Chertova, E.; Lifson, J. D.; Grise, H.; Ofek, G. A.; Taylor, K. A.; Roux, K. H. *Nature* **2006**, *441*, 847.
- (27) Health, U. N. I. o.
- (28) Frankel, A. D.; Young, J. A. T. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 1.
- (29) De, C. E. *Clin Microbiol Rev* **1995**, *8*, 200.
- (30) MEC, <http://www.dicyt.com/viewItem.php?itemId=2327>.
- (31) Pirrone, V.; Thakkar, N.; Jacobson, J. M.; Wigdahl, B.; Krebs, F. C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1831.
- (32) Carpenter, C. C.; Cooper, D. A.; Fischl, M. A.; Gatell, J. M.; Gazzard, B. G.; Hammer, S. M.; Hirsch, M. S.; Jacobsen, D. M.; Katzenstein, D. A.; Montaner, J. S.; Richman, D. D.; Saag, M. S.; Schechter, M.; Schooley, R. T.; Thompson, M. A.; Vella, S.; Yeni, P. G.; Volberding, P. A. *JAMA* **2000**, 283, 381.
- (33) Elias, C. J.; Coggins, C. *AIDS* **1996**, *10 Suppl 3*, S43.
- (34) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* **1998**, *391*, 806.
- (35) Turner, J. J.; Fabani, M.; Arzumanov, A. A.; Ivanova, G.; Gait, M. J. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2006**, *1758*, 290.
- (36) Weber, N. D.; Merkel, O. M.; Kissel, T.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Controlled Release* **2012**, *157*, 55.
- (37) Liu, Z.; Winters, M.; Holodniy, M.; Dai, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2023.
- (38) Chirila, T. V.; Rakoczy, P. E.; Garrett, K. L.; Lou, X.; Constable, I. J. *Biomaterials* **2002**, *23*, 321.
- (39) de las Cuevas, N.; García-Gallego, S.; Rasines, B.; de la Mata, F. J.; Guijarro, L. G.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 5052.
- (40) Kim, S.-S.; Peer, D.; Kumar, P.; Subramanya, S.; Wu, H.; Asthana, D.; Habiro, K.; Yang, Y. G.; Manjunath, N.; Shimaoka, M.; Shankar, P. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 370.
- (41) Zhou, J.; Neff, C. P.; Liu, X.; Zhang, J.; Li, H.; Smith, D. D.; Swiderski, P.; Aboellail, T.; Huang, Y.; Du, Q.; Liang, Z.; Peng, L.; Akkina, R.; Rossi, J. J. *Mol. Ther.* **2011**, *19*, 2228.
- (42) Maly, J.; Pedziwiatr-Werbicka, E.; Maly, M.; Semeradtova, A.; Appelhans, D.; Danani, A.; Zaborski, M.; Klajnert, B.; Bryszewska, M. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4708.
- (43) Briz, V.; Serramia, M. J.; Madrid, R.; Hameau, A.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Muñoz-Fernández, M. A. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 5044.
- (44) Weber, N.; Ortega, P.; Clemente, M. I.; Shcharbin, D.; Bryszewska, M.; de la Mata, F. J.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Controlled Release* **2008**, *132*, 55.

- (45) Gonzalo, T.; Clemente, M. I.; Chonco, L.; Weber, N. D.; Diaz, L.; Serramia, M. J.; Gras, R.; Ortega, P.; de la Mata, F. J.; Gómez, R.; López-Fernández, L. A.; Muñoz-Fernández, M. A.; Jiménez, J. L. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 921.
- (46) Bermejo, J. F.; Ortega, P.; Chonco, L.; Eritja, R.; Samaniego, R.; Muellner, M.; de Jesus, E.; de la Mata, F. J.; Flores, J. C.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 483.
- (47) Ionov, M.; Ciepluch, K.; Klajnert, B.; Glinska, S.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Muñoz-Fernández, M. A.; Bryszewska, M. *Colloids Surf., B* **2013**, *101*, 236.
- (48) Oka, H.; Onaga, T.; Koyama, T.; Guo, C.-T.; Suzuki, Y.; Esumi, Y.; Hatano, K.; Terunuma, D.; Matsuoka, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5465.
- (49) Lujanini, A.; Nicoletto, S. F.; Pizzuto, L.; Pirri, G.; Giuliani, A.; Landolfo, S.; Gribaudo, G. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 3231.
- (50) Chonco, L.; Pion, M.; Vacas, E.; Rasines, B.; Maly, M.; Serramia, M. J.; López-Fernández, L.; De la Mata, J.; Álvarez, S.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Controlled Release* **2012**, *161*, 949.
- (51) Koff, W. C. *Vaccine* **2012**, *30*, 4310.
- (52) Smith, P. L.; Tanner, H.; Dalgleish, A. *FL1000Prime Rep.* **2014**, *6*, 1.
- (53) Sepúlveda-Crespo, D.; Lorente, R.; Leal, M.; Gómez, R.; De la Mata, F. J.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A. *Nanomedicine* **2014**, *10*, 609.
- (54) Abdool, K. S. S.; Baxter, C. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2012**, *26*, 427.
- (55) McElrath, M. J.; Ballweber, L.; Terker, A.; Kreger, A.; Sakchalathorn, P.; Robinson, B.; Fialkow, M.; Lentz, G.; Hladik, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 763.
- (56) Nutan; Gupta, S. K. *Indian J. Med. Res.* **2011**, *134*, 939.
- (57) Telwatte, S.; Moore, K.; Johnson, A.; Tyssen, D.; Sterjovski, J.; Aldunate, M.; Gorry, P. R.; Ramsland, P. A.; Lewis, G. R.; Paull, J. R. A.; Sonza, S.; Tachedjian, G. *Antiviral Res.* **2011**, *90*, 195.
- (58) Rupp, R.; Rosenthal, S. L.; Stanberry, L. R. *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2*, 561.
- (59) Roberts, L.; Liebenberg, L.; Barnabas, S.; Passmore, J.-A. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2012**, *26*, 441.
- (60) Ferir, G.; Vermeire, K.; Huskens, D.; Balzarini, J.; Van Damme, E. J. M.; Kehr, J.-C.; Dittmann, E.; Swanson, M. D.; Markovitz, D. M.; Schols, D. *Antiviral Res.* **2011**, *90*, 200.
- (61) Sepúlveda-Crespo, D.; Sánchez-Rodríguez, J.; Serramia, M. J.; Gómez, R.; De La Mata, F. J.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 899.
- (62) Price, C. F.; Tyssen, D.; Sonza, S.; Davie, A.; Evans, S.; Lewis, G. R.; Xia, S.; Spelman, T.; Hodsman, P.; Moench, T. R.; Humberstone, A.; Paull, J. R. A.; Tachedjian, G. *PLoS One* **2011**, *6*, e24095.
- (63) Pirrone, V.; Passic, S.; Wigdahl, B.; Krebs, F. C. *Viol. J.* **2012**, *9*, 33.
- (64) Moscicki, A. B.; Kaul, R.; Ma, Y.; Scott, M. E.; Daud, I. I.; Bukusi, E. A.; Shiboski, S.; Rebbapragada, A.; Huibner, S.; Cohen, C. R. *JAIDS, J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **2012**, *59*, 134.

- (65) [http://www.asiabiotech.com/publication/apbn/12/english/preserved-docs/1210/0062\\_0063.pdf](http://www.asiabiotech.com/publication/apbn/12/english/preserved-docs/1210/0062_0063.pdf).
- (66) Arnaiz, E.; Vacas-Córdoba, E.; Galán, M.; Pion, M.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A.; de la Mata, F. J. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2014**, *52*, 1099.
- (67) Sánchez-Rodríguez, J.; Diaz, L.; Galán, M.; Maly, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2015**, *11*, 1783.
- (68) García-Gallego, S.; Diaz, L.; Jiménez, J. L.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Muñoz-Fernández, M. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *98*, 139.
- (69) Galán, M.; Sánchez-Rodríguez, J.; Cangiotti, M.; García-Gallego, S.; Jiménez, J. L.; Gómez, R.; Ottaviani, M. F.; Muñoz-Fernández, M. A.; de la Mata, F. J. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4984.
- (70) Vacas-Córdoba, E.; Arnaiz, E.; De La Mata, F. J.; Gómez, R.; Leal, M.; Pion, M.; Muñoz-Fernández, M. A. *AIDS* **2013**, *27*, 2053.
- (71) Vacas-Córdoba, E.; Galán, M.; de la Mata, F. J.; Gómez, R.; Pion, M.; Muñoz-Fernández, M. A. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 3591.
- (72) Chen, C. Z.; Beck-Tan, N. C.; Dhurjati, P.; Van Dyk, T. K.; LaRossa, R. A.; Cooper, S. L. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 473.
- (73) Ciepluch, K.; Katir, N.; El Kadib, A.; Felczak, A.; Zawadzka, K.; Weber, M.; Klajnert, B.; Lisowska, K.; Caminade, A. M.; Bousmina, M.; Bryszewska, M.; Majoral, J. P. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 448.
- (74) Hwang, S. H.; Shreiner, C. D.; Moorefield, C. N.; Newkome, G. R. *New J. Chem.* **2007**, *31*, 1192.
- (75) Govender, P.; Therrien, B.; Smith, G. S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 2853.
- (76) Perise-Barrios, A. J.; Jiménez, J. L.; Domínguez-Soto, A.; de la Mata, F. J.; Corbi, A. L.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Controlled Release* **2014**, *184*, 51.
- (77) Ajith, T. A. *J. Exp. Ther. Oncol.* **2015**, *11*, 33.
- (78) García-Merino, I.; de, L. C. N.; Jiménez, J. L.; García, A.; Gallego, J.; Gómez, C.; García, D.; Muñoz-Fernández, M. A. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2010**, *26*, 241.
- (79) García-Merino, I.; de, L. C. N.; Jiménez, J. L.; Gallego, J.; Gómez, C.; Prieto, C.; Serramia, M. J.; Lorente, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *Retrovirology* **2009**, *6*, 27.
- (80) Lazniewska, J.; Milowska, K.; Zablocka, M.; Mignani, S.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Bryszewska, M.; Gabryelak, T. *Mol. Pharmaceutics* **2013**, *10*, 3484.
- (81) Pedziwiatr-Werbicka, E.; Fuentes, E.; Dzumitruk, V.; Sánchez-Nieves, J.; Sudas, M.; Drozd, E.; Shakhbazau, A.; Shcharbin, D.; de la Mata, F. J.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A.; Bryszewska, M. *Colloids Surf., B* **2013**, *109*, 183.
- (82) Ionov, M.; Lazniewska, J.; Dzumitruk, V.; Halets, I.; Loznikova, S.; Novopashina, D.; Apartsin, E.; Krasheninina, O.; Venyaminova, A.; Milowska, K.; Nowacka, O.; Gomez-Ramirez, R.; de la Mata, F. J.; Majoral, J.-P.; Shcharbin, D.; Bryszewska, M. *Int. J. Pharm.* **2015**, *485*, 261.
- (83) de las Cuevas, N.; García-Gallego, S.; Rasines, B.; de la Mata, F. J.; Guijarro, L. G.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 5052.

- (84) He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, 358, 209.
- (85) Ciepluch, K.; Katir, N.; El Kadib, A.; Weber, M.; Caminade, A. M.; Bousmina, M.; Majoral, J. P.; Bryszewska, M. *J. Lumin.* **2012**, 132, 1553.
- (86) Shcharbin, D.; Klajnert, B.; Mazhul, V.; Bryszewska, M. *J. Fluoresc.* **2005**, 15, 21.
- (87) Klajnert, B.; Stanislawski, L.; Bryszewska, M.; Palecz, B. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2003**, 1648, 115.
- (88) Giri, J.; Diallo, M. S.; Simpson, A. J.; Liu, Y.; Goddard, W. A.; Kumar, R.; Woods, G. C. *ACS Nano* **2011**, 5, 3456.
- (89) Wang, Y.; Wang, X.; Wang, J.; Zhao, Y.; He, W.; Guo, Z. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 12661.
- (90) Sun, J.; Huang, Y.; Zheng, C.; Zhou, Y.; Liu, Y.; Liu, J. *Biol. Trace Elem. Res.* **2015**, 163, 266.
- (91) Galán, M.; Sánchez Rodríguez, J.; Jiménez, J. L.; Relloso, M.; Maly, M.; de la Mata, F. J.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 3222.
- (92) Sepúlveda-Crespo, D.; Gómez, R.; De La Mata, F. J.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A. *Nanomedicine* **2015**, 11, 1481.
- (93) Tesis Doctoral, Marta Galán Herranz, Alcalá de Henares, **2013**.
- (94) Galán, M.; Fuentes-Paniagua, E.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Organometallics* **2014**, 33, 3977.

## **CAPÍTULO 6**

---

# PARTE EXPERIMENTAL



## 6.1 MÉTODOS Y TÉCNICAS INSTRUMENTALES

### 6.1.1 Condiciones generales de trabajo

La mayoría de preparaciones sintéticas se realizaron bajo las condiciones de manipulación comunes. Sin embargo, dada la sensibilidad a la humedad de algunos de los productos utilizados en este trabajo, las reacciones que conducen a su preparación fueron realizadas en condiciones de atmósfera inerte. Para ello, se utilizaron técnicas de Schlenk en líneas de vacío/argón (argón de tipo UN-45 de Air-Liquide con cantidades de O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O menores de 3 ppm) y disolventes secos de grado HPLC, obtenidos por un sistema de purificación MB-SPS (M-Braun).

Todas las reacciones de adición tiol-eno se han llevado a cabo, previa desoxigenación, mediante irradiación con una lámpara de mercurio HPK 125 W Heraeus Noblelight con el máximo de emisión en  $\lambda_{\text{máx}} = 365$  nm.

Debido a que el VIH está clasificado como agente biológico del grupo 3 (riesgo individual elevado y poblacional bajo), los ensayos biomédicos con este agente se realizaron en un laboratorio con nivel de seguridad 2, con seguridad biológica de clase 3 y en cabinas de flujo laminar y (Hospital General Gregorio Marañón).

En el caso de las medidas antibacterianas, todos los ensayos se realizaron en condiciones de esterilidad en una cabina de seguridad biológica Telstar Bio II-A de flujo laminar vertical (Departamento de Biomedicina y Biotecnología, unidad docente de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá).

### 6.1.2 Técnicas instrumentales

**Análisis elemental.** Los análisis cuantitativos de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre de los derivados que se describen se realizaron en el Centro de apoyo a la investigación en Química de la Universidad de Alcalá en un microanalizador LECO CHNS-932.

**Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).** Los espectros de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>31</sup>P han sido realizados en

espectrómetros Varian, modelos Unity-500, Unity-300, Mercury-300 y Gemini-200 pertenecientes al CAIQ-UAH.

Los espectros bidimensionales HMBC  $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ , HMBC  $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$  y experimentos de difusión DOSY-2D fueron realizados a 25°C en un espectrómetro Bruker AV400 del grupo de investigación Comorproca de la UAH. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ , ppm) se midieron relativos a la señal residual de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los disolventes deuterados, en los espectros de  $^{29}\text{Si}$  se tomó como referencia tetrametilsilano (TMS) y en los de  $^{15}\text{N}$  nitrometano.

Se realizaron experimentos TOCSY (Total Correlation Spectroscopy, para determinar los acoplamiento escalares entre protones de un mismo sistema de espín), HSQC  $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$  (Heteronuclear Single Quantum Correlation, para correlacionar el desplazamiento químico de los protones con los carbonos, a través de las interacciones de acoplamiento entre dicho núcleos), HMBC (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity, para correlacionar el desplazamiento químico de los protones con los  $^{29}\text{Si}$  o  $^{15}\text{N}$ , a través de las interacciones de acoplamiento entre ambos núcleos a larga distancia) y DOSY-2D (Diffusion Ordered Spectroscopy, que permite determinar los componentes de una mezcla en función de sus distintos coeficientes de traslación).

**Espectroscopia UV-Vis.** Los espectros de UV-Vis han sido registrados en un espectrómetro Perkin-Elmer UV-Vis Lambda-18 entre 200 y 900 nm, equipado con un detector fotomultiplicador de doble haz.

**Espectrometría de masas.** Los distintos compuestos han sido analizados mediante la técnica de ionización de MALDI-TOF en un equipo Ultraflex III de Bruker en el Centro de apoyo a la investigación en Química de la Universidad de Alcalá. Las muestras se prepararon con las matrices: ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (ACC) y ditranol, y se hicieron registros en modo reflector de 450 a 5000 umas.

**Espectrometría de Resonancia de Espín Electrónico (RSE).** Los espectros de RSE fueron registrados en colaboración con la Dra. M<sup>a</sup> Francesca Ottaviani en la Universidad de Urbino (Italia), utilizando un espectrómetro

EMX-Bruker operativo en la banda X (9.5 GHz), midiendo los parámetros magnéticos en referencia al estándar 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH,  $\langle g \rangle = 2.0036$ ). La temperatura se controló con un Bruker ST3000 assembly de temperatura variable. Las simulaciones de los espectros para evaluar los parámetros magnéticos se llevaron a cabo con el programa WINEPR SimFonia (versión 1.25, Bruker) y con el programa CU23G (Dr. Romanelli, Universidad de Florencia), para espectros a baja temperatura de complejos Cu(II) plano-cuadrado (o elongado octaédricamente). Los espectros a temperatura ambiente se simularon mediante el programa de Budil, Freed y colaboradores, que considera el mecanismo de relajación de sistemas paramagnéticos  $S=1/2$  (principalmente radicales nitroxido) y permite calcular el tiempo de correlación para la difusión rotacional de las especies paramagnéticas en las llamadas “condiciones de movimiento rápido-lento” ( $\tau < 5 \times 10^{-8}$  s). Los parámetros magnéticos utilizados para las simulaciones a 298 K fueron los mismos que los de 150 K. La precisión en los parámetros magnéticos y de movilidad, así como los porcentajes relativos de los componentes espectrales fue 5%, tal y como se obtuvo del ajuste entre las señales experimentales y simuladas.

**SEC-MALS.** Las mediciones de SEC se llevaron a cabo en el Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá, utilizando un equipo que consiste en una bomba de modelo 510 Waters Associates con un filtro en línea de 0.1  $\mu\text{m}$  (Miliporo), un inyector de U6K (Waters) y dos detectores diferentes: un refractómetro de interferometría (RI) OptiRex funcionando a  $\lambda = 632.8$  nm y un fotómetro multiángulo de dispersión de luz (MALS) Dawn DSP-F, equipado con un láser de He-Ne ( $\lambda_0 = 632.8$  nm), ambos de Wyatt Technology Corp. El eluyente utilizado fue THF, el cual fue previamente filtrado y desgasificado (Scharlau, grado GPC). Las columnas de cromatografía utilizadas fueron styragel Linear (Waters). Repetidas inyecciones de las muestras filtradas (Millipore, nylon 0.2  $\mu\text{m}$ ) fueron realizadas para cada polímero para asegurar la reproducibilidad de los resultados. El detector MALS fue calibrado con tolueno de grado espectrométrico (Scharlau). La normalización de los detectores en las distintas

soluciones orgánicas se realizó con una muestra estándar de poliestireno de bajo peso molecular. El software utilizado, ASTRA 5.1 de Wyatt Technology, permitió la recogida en línea de los datos de masa molecular y radio de giro, así como el cálculo de las distribuciones y promedios. Los promedios en peso molecular y los índices de polidispersidad correspondientes se calcularon con los datos de los pesos moleculares obtenidos para las diferentes secciones del cromatograma.

**Calorimetría diferencial de barrido (DSC).** Las propiedades térmicas de los polímeros hiperramificados han sido registradas usando un calorímetro diferencial de barrido DSC Q-100, equipado con un robot de muestras y un CRYCOOLER. Las muestras fueron realizadas bajo N<sub>2</sub> con una velocidad de calentamiento de 100°C/min desde -90°C a 450°C. Las medidas se realizaron en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) en la Universidad Autónoma de Madrid (Laboratorio de Análisis Térmico).

**Potencial  $\zeta$ .** El potencial  $\zeta$  de los compuestos fue medido en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) a 25°C en una cubeta desechable de plástico. En el caso de los polímeros catiónicos, se midieron disoluciones con concentraciones 1 mg/mL de cada compuesto en agua destilada, previamente filtradas con un filtro de tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se ha utilizado esta técnica para hacer otro tipo de estudios biofísicos en colaboraciones con otros grupos, las condiciones de trabajo en cada caso serán detalladas más adelante (apartado 6.3.5).

**Tensiómetro.** El carácter anfifílico de los polímeros hiperramificados ha sido estudiado mediante medidas de tensión superficial de los diferentes sistemas usando un tensiómetro K6 model (Krüss GmbH, Germany). Las medidas se realizaron en el Departamento de Química Física de la Universidad de Alcalá.

**Valoración potenciométrica.** Las valoraciones potenciométricas se realizaron utilizando un sistema CRISON, que consiste en un potenciómetro digital (pHMeter BASIC 20+) y un electrodo de pH, que presenta un sistema de referencia encapsulado (*cartridge*) con una barrera de iones Ag<sup>+</sup>, dos diafragmas

y electrolito CRISOLYT. El pH-metro se estandarizo a pH = 4.01, 7.00 y 9.21 mediante las disoluciones tampón apropiadas. Las volumetrías se realizaron con 20 mg de compuesto disueltos en 5 mL de agua destilada, y se basifica con una disolución de NaOH 0.01 M hasta alcanzar un pH próximo a 12. Una vez alcanzado este pH, se va añadiendo HCl 0.01 M y registrando la curva potenciométrica.

## 6.2 MATERIALES UTILIZADOS

### 6.2.1 Reactivos y materiales empleados en el procedimiento sintético

Los disolventes orgánicos empleados en la síntesis, salvo la acetona, metanol, etanol y el acetonitrilo, que se emplearon sin tratamiento previo, el resto fueron purificados y secados mediante un sistema tipo MB-SPS.<sup>1</sup>

Para transferir las disoluciones se han utilizado cánulas de acero flexible de 0.5-1 mm de espesor, para ser inyectadas se usaron tapones tipo Suba-seal, aplicando presión en el Schlenk de origen con gas inerte. Las filtraciones se llevaron a cabo con la misma técnica, incorporando a uno de los extremos del tubo de acero una campana de vidrio de aproximadamente 8 mm de diámetro; en dicho cilindro se soporta el agente filtrante, un papel Whatman nº 40, o bien, doble papel con una capa de celite para conseguir un menor diámetro de poro.

Todos los reactivos comerciales se han utilizado tal y como se recibieron de la casa comercial. Los dendrímeros y dendrones precursores se sintetizaron tal y como está descrito en la bibliografía, indicándose la referencia en las preparaciones correspondientes.

### 6.2.2 Sistemas de purificación

Los productos intermedios neutros normalmente son purificados mediante las técnicas comunes (extracción, precipitación, etc.). Sin embargo, existen situaciones en los que los productos no pueden ser purificados por estos métodos, normalmente debido a que presentan solubilidades similares. En estos casos, se han realizado columnas cromatográficas de exclusión por tamaños con una fase estacionaria de poliestireno (Bio-Beads SX-1 de Bio-Rad), utilizándose THF o acetona como eluyente.

Los productos finales solubles en agua son purificados mediante diferentes sistemas:

- Columnas cromatográficas de exclusión por tamaños, con una fase estacionaria de sephadex g-50 (Sigma Aldrich) y H<sub>2</sub>O como eluyente.

- Sistemas de nanofiltración (Milipore, amicon) con membranas de celulosa con diferentes tamaños de poro (500 y 1000 Da). Se pasa el crudo de reacción disuelto en agua (solo acepta un 10% de un disolvente orgánico) a través de la membrana, en la parte inferior se recogen los desechos y en la parte superior se concentra el producto deseado. Las membranas son reutilizables y deben ser almacenadas en EtOH/H<sub>2</sub>O o en agua con NaN<sub>3</sub>.
- Sistemas de diálisis (Zellutrans roth) con diferentes tamaños (500, 1000 y 2000 Da).

Para asegurar en algunos sistemas el contraíón deseado, se ha utilizado una resina de intercambio (Ambelita IRA-402) de yoduros por cloruros.

En casos donde se producen suspensiones, para facilitar la precipitación y mejorar los rendimientos, se ha utilizado un sistema de centrifugación (Cencom II Selecta).

### 6.2.3 Cultivos celulares primario y líneas celulares

**Medios de cultivo.** El medio de cultivo completo (MCC) utilizado para cada cultivo celular se clasificó en 3 tipos: *MCC1* (RPMI 1640, Biochrom KG Seromed), *MCC2* (McCoy's 5A, Biochrom AGÓ) y *MCC3* (*DMEM*, Biochrom AGÓ) suplementados todos con 5% de SFB (suero fetal bovino, inactivado por calor), 2 mM de L-glutamina (ICN Pharmaceuticals, CostaMesa, CA, USA) y 1% de penicilina/estreptomicina.

**Células mononucleares de sangre periférica (CMSP):** las muestras de sangre se obtuvieron de buffy coats de donantes sanos procedentes del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid siguiendo las recomendaciones de la normativa legal vigente. Las CMSP se aislaron mediante un gradiente de Ficoll (Rafer, España, 30 minutos, 1800 rpm) siguiendo los estándares del Biobanco VIH HGM (Madrid, España).<sup>2,3</sup> Tras dicha centrifugación se recuperó el halo que contenía las CMSP y se procedió a dos ciclos de centrifugación-lavado con PBS estéril. Las CMSP resultantes se cultivaron en medio de cultivo *MCC1* a 37°C en

una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. La activación de las CMSP se realizó con 1 mg/mL de fitohemaglutinina (PHA, Remel) durante 48 horas, y para mantener la viabilidad de los linfocitos T en cultivo, se trataron con 60 U/mL de interleuquina-2 (IL-2, Bachem). Se trata de una línea celular en suspensión, por lo que se plaquean al realizar el experimento, y en cada lavado o cambio de medio se deben centrifugar (1500 rpm, 10 min).

**Línea celular HEC-1A.** (ATCC HTB-112) Línea celular endometrial humana, derivada de un adenocarcinoma humano de endometrio, adquirida a través del *American Type Culture Collection* (ATCC) y cultivada en MCC2 a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se trata de una línea celular adherente, por lo que se plaquean 24 horas antes de realizar el experimento, y en cada lavado o cambio de medio no es necesario la centrifugación, se elimina fácilmente por decantación.

**Línea celular TZM-bl:** línea celular procedente de una línea HeLa. Expresa CD4, CXCR4 y CCR5 además de la proteína Tat que expresa de manera inducible el gen de la luciferasa y genes reporteros de la β-galactosidasa. Se obtuvieron a través del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Se crecieron de forma rutinaria en medio de cultivo MCC2 a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se trata de una línea celular adherente, por lo que se plaquean 24 horas antes de realizar el experimento, y en cada lavado o cambio de medio no es necesario la centrifugación, se elimina fácilmente por decantación.

#### 6.2.4 Fármacos utilizados como controles

Los fármacos utilizados como controles de la inhibición del VIH son: T-20 o Fuzeon, inhibidor de la entrada y fusión del VIH-1 a células por unión a la glicoproteína gp41 (Genetech USA, Inc. And Trimeris, Sigma-Aldrich); Raltegravir (RTV), inhibidor de la integrasa (Merck & dohme corp, whitehouse station, USA); Zidovudina (AZT), inhibidor de la transcriptasa inversa (Retrovir, GSK); Suramin, inhibidor de la entrada y adhesión (Sigma-Aldrich).

Como control negativo de la viabilidad celular de los sistemas medidos se ha utilizado Dextrano (Sigma-Aldrich), se trata de un polímero de gran tamaño

que no genera toxicidad. Esto implica que la toxicidad de los sistemas estudiados no viene dada por el tamaño, sino por otros factores, principalmente por los grupos funcionales que han sido introducidos. Y como control positivo se ha utilizado DMSO (Sigma-Aldrich).

### 6.2.5 ARN de interferencia (siRNA)

**Tabla 6.1** siRNA marcados con fluoresceína y sin marcar utilizados en los estudios biofísicos.

siRNA	Oligonucleotidos	Secuencias	Coefficiente de extinción(L/mol.cm)
<b>Bcl-xL (E2)<sup>1</sup></b>	E5s	E5s 5'-CAG GGA CAG CAU AUC AGA Gtt'3'	218.5 x10 <sup>3</sup>
	E5a	E5a 5'-C UCU GAU AUG CUG UCC CUGtt 3'	192.8 x10 <sup>3</sup>
	<i>E5s-FAM*</i>	E5s 5'-CAG GGA CAG CAU AUC AGA Gtt'3'	218.5x10 <sup>3</sup>

\*FAM oligonucleótido marcado con fluoresceína

Se prepara una disolución Stock de 50 µM (en PBS 1X) de siRNA marcado y otro sin marcar para todos los ensayos realizados. Para ello, se incuban ambas hebras (sense y antisense) a 90-95°C durante 2 minutos. Transcurrido dicho tiempo, se deja alcanzar temperatura ambiente y se almacena a 0°C.

**Tabla 6.2** siRNA marcados con fluoresceína utilizados en los ensayos biomédicos.

siRNA	Secuencias
<b>NEF</b>	5'-GUGCCUGGCUAGAAGCACA-3'
<b>RANDOM</b>	5'-ACACGAAGAUCGGUCCGUG -3'

En este caso, la casa comercial proporciona la doble hélice sintetizada. Se prepara una disolución Stock de 7.5 µM (en PBS 1X) de todos los siRNA para todos los ensayos realizados.

### 6.3 ENSAYOS BIOMÉDICOS Y MEDIDAS BIOFÍSICAS

Todos los experimentos descritos a continuación se han realizado en diferentes departamentos de la Universidad de Alcalá, en estancias realizadas por la autora de esta Tesis Doctoral o por colaboraciones con otros grupos de investigación.

Los ensayos biomédicos de los compuestos sintetizados como agentes antibacterianos, se realizaron en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá en el grupo de los Dres. José Luis Copa Patiño y Juan Soliveri de Carranza.

La mayoría de los ensayos de toxicidad y las medidas de actividad frente a la infección y tratamiento del VIH se realizaron en la estancia realizada en el Laboratorio de Inmunología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, dirigido por la Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Muñoz Fernández (Codirectora de tesis).

Parte de los estudios biofísicos se realizaron una parte en la estancia realizada en el Instituto de Biología Química y Medicina Fundamental (ICBFM) de la Rama Siberiana de la Academia de Ciencias Rusa, en Novosibirsk (Rusia), grupo liderado por la Dra. Alia Venyaminra.

El resto de los ensayos biofísicos se han realizado gracias a la colaboración con el grupo de Prof. María Bryszewska del Departamento General de Biofísicas, de la universidad de Lodz (Polonia).

#### 6.3.1 Capacidad antibacteriana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los productos se determinó en microplacas de 96 pocillos utilizando los métodos estándar (ISO 20776-1).<sup>4</sup> El ensayo se realiza por sextuplicado para cada concentración analizada. 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). Las microplacas se incubaron a 37°C durante 24 horas utilizando un lector de microplacas ELX808iu (Bio-Tek Instruments). La

concentración mínima bactericida (CMB) se calcula inoculando 3  $\mu\text{L}$  de las muestras utilizadas para el cálculo de CMI, en una placa Petri con agar Mueller-Hinton (ref. 02-136, Scharlau). Tras 24 horas de incubación a 37°C, se observó la presencia de colonias.

### **6.3.2 Viabilidad celular**

El método utilizado en esta Memoria para estudiar la viabilidad celular es el ensayo colorimétrico MTT que se basa en la capacidad que tienen las células viables de reducir una sal de tetrazolio a cristales de formazan por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, pudiéndose medir de esta manera la citotoxicidad de determinadas sustancias o moléculas. Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (MTT, Sigma-Aldrich, St Louis, EE.UU).

Para ello, se sembraron las células en una placa de 96 pocillos a una densidad 15.000 (TZM-bl), 20.000 (HEC-1A) y  $3 \cdot 10^5$  (CMSP) células/pocillo, en medio completo (MCC1 para CMSP, MCC2 para HEC-1A y MCC3 para TZM-bl). Tras añadir las cantidades necesarias de los distintos compuestos, las células se incubaron 24 y 48 horas a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ . Se utilizó como control positivo DMSO al 20%, y como control negativo el dextrano (10  $\mu\text{M}$ ). Transcurrido dicho tiempo, se retiró el medio por centrifugación o decantación dependiendo de la línea celular, y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de la disolución de MTT (20 mL de una disolución 5 mg/mL MTT en agua (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio, Sigma- Aldrich) por cada 200 mL de Opti-MEM). El tiempo de incubación depende de la línea celular, pero se deben mantener entre 2-4 horas de incubación a 37°C en oscuridad. Una vez que se observó la formación de los cristales de formazan deseados, el sobrenadante se decantó y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de DMSO para disolverlos. La absorbancia se midió a 570 nm con referencia 690 nm en un lector de placas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 6.3.3 Infección con aislados virales

Para la realización de los experimentos de infección, se utilizaron tres tipos de aislados virales: X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> (aislado de laboratorio con tropismo X4, específico del correceptor CXCR4), R5 VIH-1<sub>NLAD8</sub> (aislado de laboratorio con tropismo R5, específico del correceptor CCR5) y dual-tropic X4/R5 VIH-1<sub>89.6</sub>. La cantidad de virus añadido por lo general a las células fue de 20 ng por millón de células, y la infección se realizó durante 3 horas a 37°C.

**Cuantificación del antígeno p24<sup>gag</sup> mediante ELISA.** La cantidad de virus en los distintos aislados virales se cuantificó mediante un inmunoensayo (ELISA) comercial (INNOTESTR HIV antigen mAb, Innogenetics N.V., Zwijndrecht, Belgium) según las instrucciones del fabricante.

**Estudio de la infectividad de los aislados virales.** La cantidad de virus necesaria para obtener una infección óptima de las células se realizó mediante la expresión de la luciferasa (Luciferase Assay System, Promega, Madison, WI, USA) en células TZM-bl siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 6.3.4 Ensayos de inhibición de la infección por el VIH y su mecanismo de acción

En este apartado se describe el diseño de varios experimentos. Por un lado, ensayos que permiten conocer la actividad de los diferentes sistemas dendríticos antes y después de que se produzca la infección por el VIH (pre-tratamiento y tratamiento). Y por otro, ensayos diseñados para conocer parte del mecanismo de acción de estos sistemas. Todos los experimentos han sido realizados por triplicado.

**Inhibición de la replicación del VIH.** Los ensayos de inhibición se realizaron en células TZM-bl y CMSP, previamente sembradas a una densidad de 20.000 (TZM-bl) y 300.000 (CMSP) células/pocillo con medio completo.

Ensayo de pre-tratamiento. Las células se pre-trataron durante 1 hora, inmediatamente después de la siembra para CMSP o tras 24 horas de incubación a 37°C en TZM-bl. Tras el pre-tratamiento, se infectaron con 20 ng del aislado

viral elegido durante 3 horas, transcurrido dicho tiempo, se lavaron 2 veces con PBS y se repone el medio completo. Se deja incubando la infección a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas para TZM-bl o 72 horas para CMSP. Para TZM-bl tras la infección, se lisan las células y se cuantifica la replicación viral según los valores de expresión de la luciferasa siguiendo las instrucciones del fabricante. Para CMSP tras 72 horas de cultivo, se recogen los sobrenadantes de los cultivos celulares y se cuantifica la producción de Ag p24<sup>gag</sup> por ELISA. Como controles se utilizaron células no infectadas (NI), células infectadas sin tratar (NT, 100% infección) y T-20 (20 µM, control positivo de inhibición).

Ensayo de post-tratamiento. Se infectaron las células CMSP con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> durante 3 horas. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS y por último se resuspendieron con la cantidad de medio correspondiente para sembrar en una placa p96, y se trataron con los distintos compuestos a las concentraciones adecuadas (este experimento sólo se ha realizado con nanoconjugados formados por el sistema dendrítico correspondiente y el siRNA NEF). El sobrenadante de los cultivos celulares se recogió a 72 horas, y la producción de Ag p24 fue determinada mediante ELISA. Como controles se utilizaron células no infectadas (NI), células infectadas sin tratar (NT, 100% infección) y AZT (1 µM, Zidovudina, como control positivo de inhibición).

**Ensayos de internalización del virus.** Estos experimentos se realizaron en CMSP, se cultivaron 300.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Tras 1 hora de pre-tratamiento con los distintos sistemas, las células se infectaron 3 horas con 50 ng/10<sup>6</sup> células de los aislados virales R5 VIH-1<sub>NL(AD8)</sub> o X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub>. Tras ese periodo de tiempo se lavaron las células (se incluyó un lavado ácido rápido con glicina, pH=3.2 para eliminar el virus y los sistemas dendríticos adheridos a la superficie pero no internalizados) y se lisaron las células con Tritón™ X-100 al 0.2% durante 45 minutos a 37°C. Finalmente, se cuantificó la cantidad de Ag p24<sup>gag</sup> en el lisado utilizando un kit de ELISA p24<sup>gag</sup>.

**Ensayos de “tiempo de adición”.** Las células TZM-bl plaqueadas previamente, se infectaron con X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> y R5 VIH-1<sub>NL(AD8)</sub> y se trataron a diferentes tiempos (-1, 0, 1, 2,...24 horas) con distintos compuestos antivirales que actúan en diferentes pasos del ciclo viral. Se cuantificó la infección celular tras 30 horas post-infección cuantificando los valores de expresión de la luciferasa.

**Inactivación del VIH por interacción con el dendrón.** Se preparan eppendorfs con 20 ng de virus en 30 µL de DMEM por cada punto que vaya a introducirse, y se añaden las concentraciones óptimas que se han elegido para realizar el experimento y el control (Tritón 1% como control positivo de inhibición de la infectividad), y se incuban a diferentes tiempos (10, 30, 60 y 120 minutos) para observar si es dependiente del tiempo de exposición al dendrón. Transcurrido el último tiempo, se incuba durante 3 horas. Posteriormente, se lava 2 veces con PBS y se repone el medio completo, y se deja incubando la infección a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Finalmente se lisan las células y se cuantifica la replicación viral según los valores de expresión de la luciferasa.

**Unión dendrón-célula.** Las células TZM-bl se pre-trataron con las concentraciones máximas no tóxicas de los diferentes dendrones durante 1 hora. Tras el pre-tratamiento, se lava 2 veces con PBS para eliminar compuesto no unido, y se repone con medio completo. Una vez finalizada la etapa de lavado, se infectaron con 20 ng del aislado viral elegido durante 3 horas, transcurrido dicho tiempo, se lava una vez con PBS y se repone el medio completo (comprobar que no haya una gran pérdida de células). Se deja incubando la infección a 37°C y 5 %CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Posteriormente se lisan las células y se cuantifica la replicación viral según los valores de expresión de la luciferasa.

**Inhibición de la transmisión viral a través de monocapa.** Para obtener una monocapa perfecta de células epiteliales HEC-1A se cultivaron durante 7 días, con cambio de medio cada 48-72 horas. Se sembraron 2x10<sup>5</sup> células en un depósito transwell (soporte de policarbonato permeable de 0.4 µm de poro (Costar, Cambridge, MA)) y se llevaron a cabo medidas de la resistencia

eléctrica trans-epitelial (TER) a los días 1, 3, 7, 8 y 9 para la línea celular HEC-1A como seguimiento de la correcta formación y mantenimiento de la monocapa. Los dendrones se añadieron 1 hora antes de la infección (día 7), que se llevó a cabo con el aislado viral X4 VIH-1<sub>NL4.3</sub> a una concentración de 100 ng de VIH/10<sup>6</sup> células. Se recogió el sobrenadante de la cámara inferior a los 30, 60 y 120 minutos posteriores, así como a las 24 horas para llevarse a cabo la posterior cuantificación del antígeno p24<sup>gag</sup> por ELISA.

### 6.3.5 Formación de dendriplex y el estudio de sus propiedades biofísicas

**Estudio de la formación de dendriplex mediante electroforesis en gel de agarosa.** Este estudio fue realizado en dos estancias diferentes, a continuación se explican las condiciones de trabajo en cada caso:

Estancia realizada en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid)

Las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa (2%) en un tampón denominado TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 1% (v/v) ácido acético y 1 mM EDTA), utilizándose una celda de electroforesis horizontal SE-2 (Helicon).

*Procedimiento para la formación de dendriplex:* En primer lugar se añaden 4 µL de siRNA ( $C_{\text{Stock}}=7.5 \mu\text{M}$ ), luego se añaden las diferentes cantidades de los sistemas dendríticos para obtener los diferentes ratios molares, y por último, el PBS (1X) (los µL de PBS necesarios se calcularon previamente para obtener un volumen final de 20 µL en todas las muestras). La mezcla se incubó a diferentes tiempos (2, 24 y 48 horas).

Condiciones para la electroforesis. Se realiza a 90 V durante 40 minutos. Las bandas del gel se revelaron por el sistema Molecular Imager Gel Doc y Chemi Doc (BioRad).

Estancia realizada en el ICBFM (Rusia)

Las muestras fueron analizadas en un gel de agarosa (1% agarosa, 0.005% de bromuro de etidio, 89 mM de Tris-borato, pH 8.3, 2 mM de Na<sub>2</sub>EDTA) en un

tampón denominado TBE 1X (89 mM Tris-borato, pH 8.3, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA), utilizándose una celda de electroforesis horizontal SE-2 (Helicon, Russia).

*Procedimiento para la formación de dendriplex:* Se añadieron 0.8 µL de siRNA ( $C_{\text{Stock}} = 50 \mu\text{M}$ ) sobre una disolución de PBS (1X) (los µL de PBS necesarios se calcularon previamente para obtener un volumen final de 10 µL en todas las muestras), y sobre esta mezcla se adicionan 0.8 µL de EtBr ( $C_{\text{Stock}} = 500 \mu\text{M}$ ), se agita, se centrifuga y se incuba durante 15 minutos (este paso es necesario para que el EtBr se intercale correctamente en el siRNA y pueda ser detectado correctamente en los pasos posteriores). Trascurrido dicho tiempo, se añaden las diferentes cantidades de dendrones para obtener los diferentes ratios molares. De nuevo, se agita vigorosamente, se centrifuga y se incuba durante 15 minutos (formación del dendriplex). Posteriormente, se añaden 2 µL de glicerol a cada muestra y se introducen en los pocillos del gel de agarosa.

*Condiciones para la electroforesis.* Se realiza a 140 V durante 25-30 minutos. Posteriormente la presencia de siRNA es detectada gracias al EtBr que absorbe en UV-VIS (254 nm).

**Estudio de la formación de dendriplex mediante polarización de fluorescencia.** Para cada sistema dendrítico, se prepara por triplicado una disolución de siRNA marcado con fluoresceína, una disolución en la cual se añaden 0.6 µL de siRNA marcado con fluoresceína ( $C_{\text{Stock}}=50 \mu\text{M}$ ) sobre 29.4 µL de PBS (1X). Posteriormente, se van añadiendo diferentes cantidades de los sistemas dendríticos para obtener las diferentes proporciones molares de carga (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 etc). Además, se prepara otra disolución de siRNA igual que las anteriores que se mantiene como control. Cada adición de compuesto se agita y se incuba durante 5 minutos, y luego se registra el espectro de polarización de fluorescencia (500-600 nm).

**Estudio de la formación de dendriplex mediante fluorescencia (Desactivación de la señal).** Este estudio se realiza siguiendo el mismo protocolo que el anterior, pero se registra el espectro de fluorescencia, para evitar la desactivación de la señal producida por las muestras que contienen metales.

**Estudio de la formación de dendriplex mediante medidas de potencial zeta ( $\zeta$ ).** Para cada sistema se prepara una muestra de 12  $\mu\text{L}$  de siRNA ( $C_{\text{Stock}}=50 \mu\text{M}$ ) en 588  $\mu\text{L}$  de PBS. Posteriormente, se van añadiendo diferentes cantidades de sistemas dendríticos para obtener los diferentes ratios molares (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5 etc). Para cada adición de compuesto se agita y se incuba durante 5 minutos, y luego se realiza la medida de potencial  $\zeta$ .

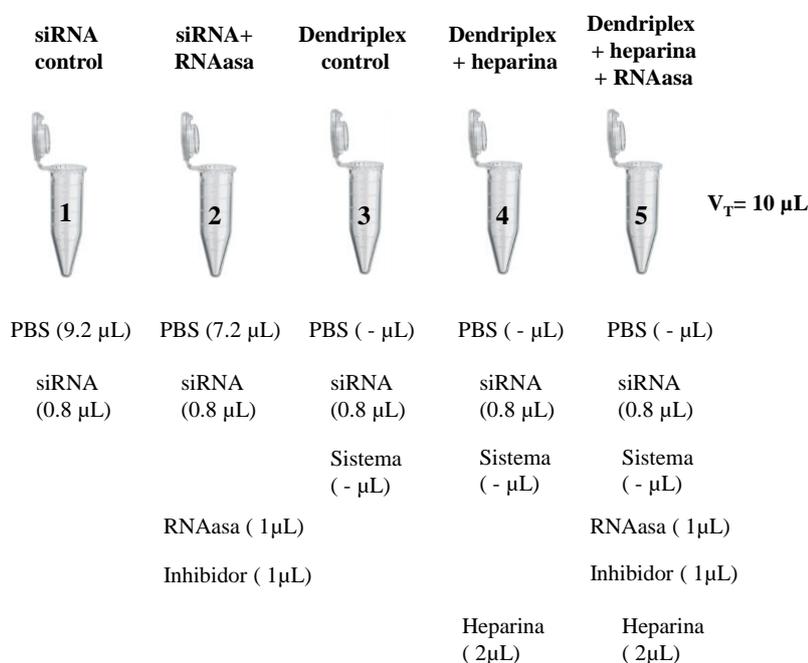
**Estudio del desplazamiento de heparina mediante polarización de fluorescencia.** Para cada sistema dendrítico, se prepara por triplicado una disolución en la cual se añaden 0.6  $\mu\text{L}$  de siRNA marcado con fluoresceína ( $C_{\text{Stock}}=50 \mu\text{M}$ ) sobre 29.4  $\mu\text{L}$  de PBS (1X). Además, se prepara otra disolución de siRNA igual que las anteriores que se mantiene como control. Posteriormente, se añade la cantidad necesaria de compuesto para obtener una completa complejación del siRNA, se agita y se incuba durante 10 minutos, y se registra el espectro. Posteriormente, se van añadiendo cantidades de heparina desde 1 a 100 mg/L, se incuba durante 5 minutos y se van registrando los espectros correspondientes.

**Estudio de la estabilidad del siRNA frente a la RNasa A en los dendriplex.** Las muestras fueron analizadas mediante un ensayo de electroforesis similar al descrito anteriormente, pero a una concentración del 3% de agarosa.

Para evaluar la capacidad de los compuestos de proteger o evitar la degradación del material genético en presencia de la RNasa A, se prepararon 5 muestras diferentes (Figura 6.1):

- En todas las muestras se añade 0.8  $\mu\text{L}$  de siRNA ( $C_{\text{Stock}} = 50 \mu\text{M}$ ) y la cantidad necesaria de PBS en cada caso para obtener un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ .
- A las muestras **3, 4 y 5** se le añade la cantidad de compuesto necesaria para obtener una completa complejación, y se deja incubar durante 15 minutos (**formación del dendriplex**).

- Posteriormente, se añade la enzima RNasa A (1  $\mu\text{L}$ ,  $C_{\text{Stock}}=50 \text{ mg/L}$ , en agua) a las muestras **2** y **5**, y se incuban a  $37^\circ\text{C}$  durante 45 minutos (**degradación**).
- Trascurrido dicho tiempo, se añade el inhibidor de la enzima (1  $\mu\text{L}$ ,  $C_{\text{Stock}}= 10 \text{ U}/\mu\text{L}$ ,  $\text{pH}=7.5$ ) en hielo ( $0^\circ\text{C}$ ) a las muestras **2** y **5** (**se para la reacción**).
- A continuación, se añade la heparina (2  $\mu\text{L}$ ,  $C_{\text{Stock}}= 410 \text{ mg /L}$ ) a las muestras **4** y **5**, y se deja incubar durante 5 min (**desplazamiento del siRNA**).



**Figura 6.1** Controles y muestras para el ensayo de estabilidad.

Finalmente, se añaden 2  $\mu\text{L}$  de glicerol a cada muestra y se introducen en los pocillos del gel de agarosa. La electroforesis se lleva a cabo con 140 V durante 30 minutos.

### 6.3.6 Ensayos de citotoxicidad, hematoxicidad y cambios morfológicos

**Ensayo de citotoxicidad.** Los fibroblastos de hámster chino (línea celular B14) fueron adquiridos de Centro de Salud Infantil en Varsovia (Polonia). Las células fueron cultivadas como una monocapa en medio DMEM suplementado

con suero bovino fetal al 10% con 100 unidades/mL de gentamicina. Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire con un 95% de humedad. La viabilidad celular se midió por un ensayo MTT.

**Hemotoxicidad.** La sangre de donantes sanos se obtuvo del Banco Central de Sangre en Lodz. La sangre fue anticoagulada con un 3% de citrato de sodio. Los eritrocitos fueron separados mediante centrifugación (4000 g, 10 minutos) a 4°C y se lavaron tres veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato; pH=7.4). Los eritrocitos se utilizaron inmediatamente después del aislamiento.

Para estudiar el efecto de los dendrímeros híbridos fósforo-viológen-carbosilano sobre los eritrocitos, se añadieron los dendrímeros en un rango de concentraciones de 0.01-10 mM a las células rojas de la sangre y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después de la incubación, las suspensiones se centrifugaron (1000 g, 10 minutos). La hemólisis se determinó midiendo el contenido de hemoglobina en el sobrenadante a 540 nm.

Porcentaje de hemólisis se calculó a partir de la fórmula: Hemólisis [%] =  $(A/A_c) \times 100\%$

Donde, A es la absorbancia de la muestra, y A<sub>c</sub> es la absorbancia de la muestra en agua (100% de hemólisis).

**Cambios morfológicos de la línea celular B14.** La morfología de la línea celular B14 y los eritrocitos se evaluó mediante observación microscópica. Las concentraciones finales de los dendrímeros de la muestra fueron 0.1, 1 y 10 mM. Las células se incubaron con dendrímeros a 37°C durante 24 horas. Luego, las células se observaron bajo un microscopio óptico Olympus CKX41 con un aumento de 400x.

### 6.3.7 Estudios biofísicos de la interacción con la proteína HSA

**Medidas de potencial zeta (ζ).** Las mediciones del potencial zeta se realizaron con Zetasizer Nano ZS de Malvern, que utiliza las técnicas electroforesis y LDV (Laser Doppler velocimetría). La combinación de ambas técnicas permite la medición de la movilidad electroforética de las moléculas en

disolución. El valor de potencial zeta se calcula directamente a partir de la ecuación de Helmholtz - Smoluchowski usando el software.<sup>43</sup> Malvern.

Las mediciones de potencial zeta de los dendrímeros solo se realizaron en agua y tampón de fosfato (10 mM, pH=7.4).

Las mediciones de potencial zeta de HSA en presencia de dendrímeros se realizaron en un tampón de fosfato a 37°C. Se realizaron medidas para un rango de concentraciones de dendrímero de 0.1 mM-10 mM, en cada adición se añadía una concentración de 0.2 mM sobre la proteína HSA.

**Medidas de dicroísmo circular (DC).** Los espectros de DC (195-260 nm) para la HSA se registraron en presencia/ausencia de dendrímeros en un espectropolarímetro -815 CD Jasco J , en cubetas de cuarzo de 5 mm de longitud, con un paso de longitud de onda de 1 nm, un tiempo de respuesta de 4 segundos y una velocidad de barrido de 20 nm/min , termostatizado a 37°C . Cada espectro es la media de tres repeticiones. HSA se utilizó a una concentración de 2 mM. La relación molar de dendrímeros/HSA varió de 0.5 a 20. viológeno-carbosilano-dendrímeros fósforo solo en las concentraciones utilizadas en los experimentos no produjo características perceptibles en sus espectros de CD y fueron utilizados como blancos (controles) de HSA-dendrímeros espectros complejos.

**Desactivación de la fluorescencia de HSA.** Las mediciones de fluorescencia se realizaron utilizando un Perkin -Elmer LS- 55 espectrofluorómetro con excitación a 290 nm, y los espectros de emisión se registraron en el intervalo de 305-435 nm. HSA a una concentración de 2.5 mM en una cubeta de cuarzo de 5 mm, y termostatizado a 37°C. A continuación, se añadieron concentraciones crecientes de dendrímeros a HSA y se registraron los espectros de fluorescencia. Antes de examinar las propiedades de fluorescencia de la proteína, se comprobó que los dendrímeros no estaban excitados por la longitud de onda de 290 nm y que no emiten fluorescencia.

### **6.3.8 Análisis estadísticos**

Todos los resultados son presentados como un valor  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prim 5.0. Y los resultados proporcionados por el grupo de Polonia fueron analizados mediante el programa SigmaPlot 11.0 Systat Software.

## 6.4 DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES

### 6.4.1 Métodos sintéticos

Para evitar repeticiones a lo largo de este apartado, se describen de manera general los protocolos más utilizados para la construcción y funcionalización de los diferentes sistemas dendríticos. En algunos casos se introducen modificaciones (reactivos utilizados, temperatura, tiempo de reacción etc.) que se detallaran en el apartado correspondiente para cada compuesto.

#### 6.4.1.1 Protocolo 1: Reacción de hidrotiolación de dobles enlaces

##### *1a) Adición “click” tiol-eno de hidrocioruro de cisteamina y hidrocioruro de 2-(dimetilamino)etanotiol*

Se disuelve el sistema dendrítico precursor (con grupos vinilo terminales) en una mezcla de disolventes THF/MeOH (1:1), y sobre esta disolución, se añaden 1.05 equivalentes del reactivo comercial hidrocioruro de cisteamina,  $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2\cdot\text{HCl}$ , o hidrocioruro de 2-(dimetilamino)etanotiol,  $\text{HS}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2\cdot\text{HCl}$ , y el fotoiniciador, 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA) en un 5% mol con respecto al número de dobles enlaces. La mezcla se desoxigena con argón y se deja agitando durante 2 horas bajo una lámpara UV con  $\lambda_{\text{máx}}=364$  nm. Transcurrido este tiempo se añade otro 5% mol de DMPA con respecto al número de dobles enlaces y se desoxigena de nuevo. Tras otras 2 horas de reacción se elimina el disolvente por evaporación, se disuelve en agua y se purifica el sistema mediante nanofiltración o diálisis con una membrana de corte adecuado.

##### *1b) Adición “click” tiol-eno de metiltioglicolato*

El compuesto precursor (con dobles enlaces terminales) se disuelve en una mezcla de disolventes THF:MeOH (1:1) y se adiciona la cantidad estequiométrica del derivado tioglicolato de metilo,  $\text{HSCH}_2\text{COOCH}_3$ . La disolución se irradia con luz UV durante 4 horas, se lleva a sequedad y se purifica por cromatografía de exclusión de tamaños en THF.

**1c) Adición “click” tiol-eno de 3-mercapto-1-propanosulfonato de sodio**

Se disuelve el compuesto precursor (con dobles enlaces en la periferia) en una mezcla de disolventes THF/H<sub>2</sub>O (1.5:0.5) y se prepara una disolución del derivado 3-mercapto-1-propanosulfonato de sodio, HS(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Na (1.2 equivalentes por cada doble enlace presente en el precursor) en 0.5 mL de agua destilada. Sobre la disolución del precursor se añade un cuarto de la disolución del reactivo y un 0.025% molar de DMPA. Tras cada adición, el crudo de reacción se desoxigena haciendo burbujear argón en su interior durante 1 minuto, y se irradia con luz UV durante un tiempo total de 1 hora. El tiempo total de irradiación son 4 horas. Finalmente se lleva a sequedad y se purifica por nanofiltración en agua con membranas de celulosa (M<sub>wco</sub> = 500-1000 Da).

**6.4.1.2 Protocolo 2: Reacción de neutralización de los grupos -NR<sub>2</sub>·HCl**

A una disolución de un sistema con grupos -NR<sub>2</sub>·HCl terminales en una mezcla de H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) se añade una disolución acuosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.3 equivalentes con respecto al número de grupos amonio terminales). La mezcla de reacción se agita durante 15 minutos a temperatura ambiente y después la fase orgánica se separa y se extrae la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y a continuación los volátiles se eliminan a vacío obteniéndose así los derivados deseados.

**6.4.1.3 Protocolo 3: Reacción de cuaternización de los grupos -NMe<sub>2</sub> terminales para generar grupos amonio****3a) Cuaternización con yoduro de metilo (CH<sub>3</sub>I)**

Se trasvasa a un Schlenck la cantidad adecuada de sistemas con grupos terminales NMe<sub>2</sub> y se disuelve en THF seco. A continuación, se añade a temperatura ambiente y con agitación un exceso de MeI. La disolución se deja con agitación durante una noche bajo atmósfera inerte. Finalizada la reacción, se evaporan los volátiles y se lava el producto varias veces con hexano, obteniéndose los productos deseados.

### **3b) Cuaternización con cloruro de hidrógeno (HCl)**

Se sigue un procedimiento análogo al **protocolo 3a** pero la reacción se realiza con un exceso de cloruro de hidrógeno (2 N en Et<sub>2</sub>O). La disolución se deja con agitación durante 2 horas. Finalizada la reacción, se realiza el mismo procedimiento que en el apartado anterior.

#### **6.4.1.4 Protocolo 4: Reacción de desprotección de los grupos acrilato para generar grupos carboxilato**

El compuesto precursor (con grupos metilacrilato en la periferia) se disuelve en MeOH y se adiciona NaOH en exceso (3 equivalentes por cada grupo metil éster). La disolución se agita durante toda la noche a temperatura ambiente, se lleva a sequedad y se purifica por nanofiltración con membranas de celulosa ( $M_{wCO}=500-1000$  Da).

#### **6.4.1.5 Protocolo 5: Reacción de condensación entre un grupo aldehído y grupo amina**

Sobre una disolución en THF seco del dendrímero de fósforo correspondiente se añade el dendrón carbosilano, la reacción se mantiene bajo agitación constante a 40°C en presencia de MgSO<sub>4</sub> activado durante 48 horas. Las generaciones más altas necesitan más equivalentes y más tiempo de reacción. Una vez finalizada la reacción, se centrifuga rápidamente para eliminar los restos de MgSO<sub>4</sub>, pero estos compuestos no se aíslan debido a la inestabilidad del enlace imina.

#### **6.4.1.6 Protocolo 6: Reacción de reducción de enlaces imina**

Sobre una disolución en THF/MeOH del dendrímero correspondiente se añade lentamente y en frío NaBH<sub>4</sub> (3 equivalentes por cada enlace que se desea reducir). Completada la adición, se deja que la reacción progrese a temperatura ambiente durante 12 horas con un borboteador. Posteriormente se utiliza una disolución acuosa de NH<sub>4</sub>Cl (12%), se realiza una extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub>. Posteriormente el disolvente se elimina a

vacío, y el residuo se purifica mediante cromatografía por exclusión de tamaños en THF.

#### **6.4.1.7 Protocolo 7: Reacción de desprotección de los grupos -NH<sub>2</sub>Boc para generar grupos amonio -NH<sub>3</sub>Cl**

Sobre una disolución del correspondiente sistema dendrítico en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se añade lentamente una disolución de TFA al 20% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, la mezcla de reacción se mantiene bajo agitación constante durante 1 hora. Una vez completada la desprotección, la reacción se lleva a sequedad. A continuación el crudo de reacción se disuelve en acetonitrilo y se añade lentamente una disolución acuosa saturada de <sup>t</sup>Bu<sub>4</sub>NCl, produciéndose la precipitación del producto, el cual se lava varias veces con acetonitrilo, obteniéndose de esta forma los productos deseados.

#### **6.4.1.8 Protocolo 8: Cambio de contraión**

Sobre una disolución acuosa del dendrímero correspondiente se añaden gota a gota una disolución saturada de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, observándose la precipitación del producto. El sólido resultante es filtrado y lavado varias veces con agua y Et<sub>2</sub>O, obteniéndose el producto deseado.

### **6.4.2 Síntesis y caracterización de los sistemas dendríticos**

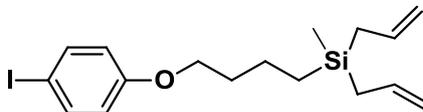
## **CAPÍTULO 2**

#### **6.4.2.1 Síntesis y caracterización del monómero AB<sub>2</sub> y la matriz polimérica (1-3)**

##### **I-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SiMe(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> (1)**

Sobre una disolución en acetona (60 mL) de 4-yodofenol (1.00 g, 4.54 mmol) se añade BrG<sub>1</sub>A<sub>2</sub> (I)<sup>5</sup> (1.24 g, 4.77 mmol), carbonato de potasio (1.13 g, 8.16 mmol), éter corona 18-C-6 (0.12 g, 0.45 mmol) y una pequeña cantidad de NaI. La mezcla de reacción se mantiene en agitación constante a 80°C durante 24 horas. Una vez completada la reacción, se evapora la disolución hasta sequedad y el crudo se extrae con éter. La fase orgánica se lava con agua saturada de NaCl,

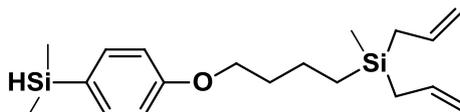
se seca con  $\text{MgSO}_4$ , y se añade  $\text{SiO}_2$  para eliminar el éter corona. La disolución se filtra y el disolvente se evapora a vacío, obteniéndose el compuesto **1** como un líquido incoloro (1.55 g, 85%).



**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -0.01 (s, 3 H,  $\text{MeSi}$ ), 0.59 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 1.47 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 1.54 (d, 4 H,  $\text{SiCH}_2\text{CH}$ ), 1.76 (m, 2 H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.90 (t, 2 H,  $\text{OCH}_2$ ), 4.84 (m, 4 H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.75 (m, 2 H,  $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 6.67 (d, 2 H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ), 7.54 (d, 2 H,  $\text{C}_6\text{H}_4$ ). **RMN- $^{13}\text{C}$**   $\{^1\text{H}\}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -5.9 ( $\text{MeSi}$ ), 12.7 ( $\text{SiCH}_2$ ), 20.1 ( $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 21.2 ( $\text{CH}_2$ ), 32.8 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 67.5 ( $\text{OCH}_2$ ), 82.4 ( $\text{C}_{\text{ipso}} \text{I}-\text{C}_6\text{H}_4$ ), 113.3 ( $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 116.8 ( $\text{C}_6\text{H}_4$ ), 134.5 ( $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 138.1 ( $\text{C}_6\text{H}_4$ ), 158.9 ( $\text{C}_{\text{ipso}} \text{O}-\text{C}_6\text{H}_4$ ). **RMN- $^{29}\text{Si}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.9 ( $\text{SiMe}$ ). **Anal.Calc.**  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{IOSi}$  (400.37 g/mol): C, 51.00; H, 6.29. Exp.: C, 51.35; H, 7.22. **MS:**  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 401.1055$  uma (calcd. = 401.0700 uma).

#### **H-SiMe $_2$ -C $_6$ H $_4$ -O-(CH $_2$ ) $_4$ SiMe(C $_3$ H $_5$ ) $_2$ (**2**)**

Sobre una disolución del compuesto **1** (1.00 g, 2.50 mmol) en hexano a  $-78^\circ\text{C}$  (50 mL) se añade lentamente un ligero exceso de  $^n\text{BuLi}$  (1.50 mL, 3.76 mmol) y se deja que la reacción progrese durante 2 horas. A continuación se añade 0.40 mL de  $\text{HSiMe}_2\text{Cl}$  (3.76 mmol), manteniendo la mezcla de reacción en agitación constante durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez completada la reacción se filtra y se evapora hasta sequedad para eliminar el disolvente y el exceso de  $\text{HSiMe}_2\text{Cl}$ , obteniéndose el monómero **2** como un aceite amarillento (0.75 g, 90%).

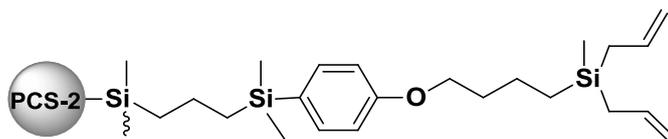


**RMN- $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -0.02 (s, 3 H,  $\text{MeSi}(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)_2$ ), 0.29 (d, 6 H,  $\text{HSiMe}_2$ ), 0.60 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 1.47 (m, 2 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 1.54 (d, 4 H,  $\text{SiCH}_2$ -

CH), 1.78 (m, 2 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.95 (t, 2 H, OCH<sub>2</sub>), 4.38 (m, 1 H, HSiMe<sub>2</sub>), 4.84 (m, 4 H, CH=CH<sub>2</sub>), 5.74 (m, 2 H, CH=CH<sub>2</sub>), 6.88 (d, 2 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.42 (d, 2 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** (CDCl<sub>3</sub>): δ -5.8 (MeSi), -3.5 (Me<sub>2</sub>Si), 12.7 (SiCH<sub>2</sub>), 20.1 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 21.3 (CH<sub>2</sub>), 32.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 67.1 (OCH<sub>2</sub>), 113.2 (CH=CH<sub>2</sub>), 114.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 127.9 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.7 (CH=CH<sub>2</sub>), 135.4 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 160.1 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ -17.8 (SiH), 0.9 (SiMe). **Anal.Calc.** C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>OSi<sub>2</sub> (332.20 g/mol): C, 68.61; H, 9.70. Exp.: C, 68.99; H, 10.17. **MS:** [M+H]<sup>+</sup> = 333.1919 uma (calcd. = 333.2000 uma).

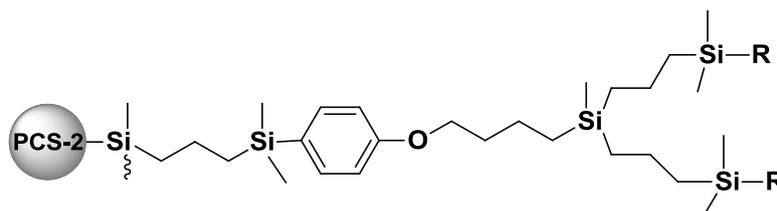
### PCS-2-A (3)

En una ampolla de vidrio se introduce 0.50 g del monómero **2**, 5 mL de tolueno seco y el catalizador de Karstedt (3% molar). La mezcla de reacción se mantiene en agitación constante bajo atmosfera inerte a 60°C durante 24 horas. Terminada la reacción, el disolvente se elimina a vacío, obteniéndose el polímero **3** como un aceite de color marrón (0.49 g).



**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ -0.02 (s, MeSi(CH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), -0.07 (s, SiMe), 0.21 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.50-0.70 (m, CH<sub>2</sub>Si), 1.34-1.56 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>-CH), 1.77 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.94 (t, OCH<sub>2</sub>), 4.83 (m, CH=CH<sub>2</sub>), 5.77 (m, CH=CH<sub>2</sub>), 6.88 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.39 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** (CDCl<sub>3</sub>): δ -5.8 y -5.4 (MeSi), -2.67 (SiMe<sub>2</sub>), 12.7 y 13.3 (SiCH<sub>2</sub>), 18.1-21.8 (CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>), 32.9 y 33.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 67.1 (OCH<sub>2</sub>), 113.2 (CH=CH<sub>2</sub>), 114.1 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.4 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.9 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.7 (CH=CH<sub>2</sub>), 159.8 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ Polimerización a 60°C; 0.9 (s, T, 21.5%), 1.5 (s, L, 56.5%), 1.8 (s, D, 22.0%), -4.3 (SiAr). DB=0.44. PDI = 1.4 y Mw = 4500 g/mol.

### 6.4.2.2 Síntesis y caracterización de polímeros hiperramificados catiónicos mediante hidrosililación (4-7)



R = Cl (**4**), H (**5**), (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NMe<sub>2</sub> (**6**), (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NMe<sub>3</sub>I (**7**)

#### PCS-2-SiCl (**4**)

Sobre 0.40 g del polímero **3** se añaden 2.50 mL de dimetilclorosilano y el catalizador de Karsted (3% molar). La reacción se deja en agitación constante bajo atmósfera inerte a 80°C durante 48 horas. Trascurrido dicho tiempo se elimina el exceso de dimetilclorosilano a vacío obteniéndose el polímero **4** como un aceite grisáceo (0.55 g).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ -0.09 (s, SiMe), 0.21 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.38 (s, SiMe<sub>2</sub>Cl), 0.50-0.70 (m, CH<sub>2</sub>Si), 0.88 (m, CH<sub>2</sub>SiCl), 1.34-1.56 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.77 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.94 (t, OCH<sub>2</sub>), 6.89 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.38 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>): δ -5.1 (MeSi), -2.67 (SiMe<sub>2</sub>), 1.8 (SiClMe<sub>2</sub>), 13.7 (SiCH<sub>2</sub>), 17.1-20.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 23.5 (CH<sub>2</sub>SiCl), 33.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 67.3 (OCH<sub>2</sub>), 114.0 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.4 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.9 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 159.8 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ -4.4 (SiC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 1.9 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) y 31.0 (SiCl).

#### PCS-2-SiH (**5**)

Sobre una disolución de LiAlH<sub>4</sub> (1M Et<sub>2</sub>O, 0.80 mL) en Et<sub>2</sub>O (60 mL) se añade lentamente y en frío otra disolución del polímero **4** (0.55 g) en éter. Completada la adición, se deja que la reacción progrese a temperatura ambiente durante 12 horas. Posteriormente, se utiliza una disolución de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 14% para hidrolizar el exceso de LiAlH<sub>4</sub>, se realiza una extracción y la fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub>. Finalmente se elimina el disolvente a vacío, obteniéndose el polímero **5** como un aceite incoloro (0.37 g).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -0.09 (s, SiMe), 0.05 (d, SiHMe<sub>2</sub>), 0.21 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.50-0.70 (m, CH<sub>2</sub>Si), 1.34-1.56 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>-CH), 1.77 (m, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.82 (m, SiH), 3.94 (t, -OCH<sub>2</sub>), 6.89 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.38 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -5.1 (MeSi), -4.4 (SiHMe<sub>2</sub>), -2.7 (SiMe<sub>2</sub>), 13.6 (SiCH<sub>2</sub>), 18.1-21.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 33.1 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 67.3 (OCH<sub>2</sub>), 114.0 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.3 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.9 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 159.7 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -14.1 (SiH), -4.6 (SiC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) y 1.9 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>).

### PCS-2-SiNMe<sub>2</sub> (6)

En una ampolla de vidrio se introduce una disolución del polímero **5** (0.37 g) en THF seco (2 mL), a la cual se añade un exceso de N, N- alildimetilamina (0.50 mL) y el catalizador de Karstedt (3% molar). La mezcla de reacción se deja con agitación constante a 60°C durante 48 horas. Completada la reacción, se elimina el disolvente y el exceso de amina a vacío, obteniéndose el polímero **6** como un aceite marrón claro (0.43 g).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -0.07 (s, SiMe), 0.05 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.46 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 1.34-1.56 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 1.77 (m, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.20 (m, CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub> y NMe<sub>2</sub>), 3.94 (t, -OCH<sub>2</sub>), 6.89 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.38 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -5.1 (SiMe), -3.3 (SiMe<sub>2</sub>), 12.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 18.4-20.1 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O), 22.0 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 33.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 45.4 (NMe<sub>2</sub>), 63.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 67.3 (-OCH<sub>2</sub>), 114.0 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.3 (C<sub>ipso</sub> CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 159.7 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -4.5 (SiC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 1.6 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.9 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>).

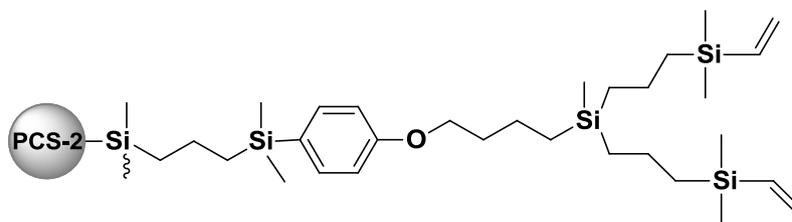
### PCS-2-SiNMe<sub>3</sub>I (7)

Se obtiene el polímero **7** siguiendo el **protocolo 3a**, en el cual se produce la cuaternización de los grupos amino. Sólido amarillo muy higroscópico (0.20 g).

**Datos:** Polímero **6** (0.18 g), CH<sub>3</sub>I (0.10 mL, 1.61 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -0.02 (s, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.50-0.70 (m, CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 1.20-1.50 (m, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 1.60-1.80 (m, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>I), 3.02 (s, NMe<sub>3</sub>I), 3.21 (t, CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>I), 3.91 (t, -OCH<sub>2</sub>), 6.86 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.33 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -5.1 (SiMe), -3.3 (SiMe<sub>2</sub>), 15.0 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 17.2-25.2 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O- y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si-), 24.3 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 32.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 49.8 (NMe<sub>3</sub>I), 66.1 (-CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 66.2 (OCH<sub>2</sub>), 113.5 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 128.8 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 158.9 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -4.5 (SiC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 1.8 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.4 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>I).

#### 6.4.2.3 Síntesis y caracterización de la matriz polimérica funcionalizada con grupos vinilo en la periferia (8)



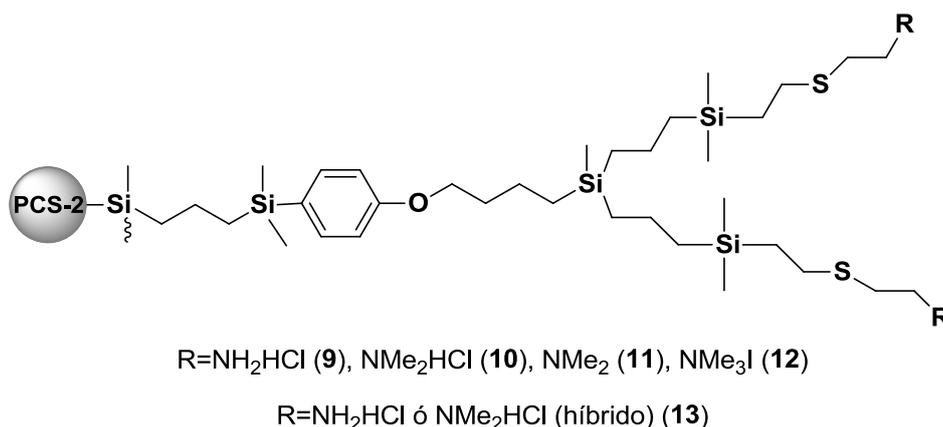
#### PCS-2-V (8)

Sobre 0.950 g del compuesto **4** disuelto en hexano anhidro (30 mL) se añaden 2 mL de cloruro de vinilmagnesio (3.20 mmol) y la disolución se mantiene a reflujo a 60°C durante 24 horas. Una vez finalizada la reacción, el exceso de magnesiano se hidroliza con una disolución de cloruro de amonio al 12% y el crudo de reacción se extrae con hexano (3 x 25 mL). Finalmente, la fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub>, se filtra y el disolvente se evapora en el rotavapor dando lugar al polímero **8** como un aceite amarillo oscuro (0.640 g).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.09 (s, SiMe), 0.02 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.19 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.46-0.63 (m, CH<sub>2</sub>Si), 1.23-1.41 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.77 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.93 (t, OCH<sub>2</sub>), 5.60 (dd, SiCHCH<sub>2</sub>), 6.00 (m, SiCHCH<sub>2</sub>), 6.87 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.38 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.0 (MeSi), -3.2 (SiMe<sub>2</sub>), -2.6 (SiMe<sub>2</sub>), 13.8 (SiCH<sub>2</sub>), 17.8-20.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si),

33.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 67.3 (OCH<sub>2</sub>), 114.1 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.4 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 131.2 (SiCHCH<sub>2</sub>), 135.1 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 139.4 (SiCHCH<sub>2</sub>), 159.8 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ -6.4 (SiMe<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), -4.4 (SiAr), 1.9 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si).

#### 6.4.2.4 Síntesis y caracterización de polímeros hiperramificados catiónicos mediante adición tiol-eno (9-13)



#### PCS-2-SNH<sub>2</sub>.HCl (**9**)

Se obtiene el polímero **9** siguiendo el **protocolo 1a**, en el cual se introducen grupos catiónicos en la periferia. Sólido amarillo (0.300 g).

**Datos:** Polímero **8** (0.450 g), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.HCl (2.17 mmol), DMPA (0.22 mmol, 0.056 g).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -0.08, -0.02 (s, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.48-0.63 (m, CH<sub>2</sub>Si), 0.80 (t, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.23-1.41 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.74 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.56 (t, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.71 (t, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.HCl), 2.91 (t, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.HCl), 3.94 (t, OCH<sub>2</sub>), 6.87 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.24 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -4.5 (SiMe), -2.9 (SiMe<sub>2</sub>), 13.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 16.0-20.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 26.9 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 28.7 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.HCl), 33.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 39.0 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.HCl), 67.3 (OCH<sub>2</sub>), 114.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.9 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 135.3 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 159.2 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -4.0 (SiAr), 1.7-1.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 3.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **RMN-<sup>15</sup>N (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ-342.4 (NH<sub>3</sub>Cl).

**PCS-2-SNMe<sub>2</sub>.HCl (10)**

Se obtiene el polímero **10** siguiendo el **protocolo 1a**, en el cual se introducen grupos catiónicos en la periferia. Sólido amarillo (0.323g).

**Datos:** Polímero **8** (0.450 g), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl (2.12 mmol), DMPA (0.22 mmol, 0.056 g).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -0.00 (s, SiMe), 0.16 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.66-0.88 (m, CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.13-1.58 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.80 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.56 (t, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.74 (t, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 2.86 (s, NMe<sub>2</sub>.HCl), 3.18 (t, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 3.95 (t, OCH<sub>2</sub>), 6.90 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.39 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -4.4 (SiMe), -2.84 (SiMe<sub>2</sub>), 13.6 (SiCH<sub>2</sub>), 16.0 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 18.4-20.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 25.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 27.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 32.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 42.6 (NMe<sub>2</sub>.HCl), 56.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 67.2 (OCH<sub>2</sub>), 114.4 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.9 (*C*<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.7 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 159.8 (*C*<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -4.5 (SiAr), 1.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 3.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **RMN-<sup>15</sup>N (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -338.2 (NMe<sub>2</sub>.HCl).

**PCS-2-SNMe<sub>2</sub> (11)**

Se obtiene el polímero **11** siguiendo el **protocolo 2**, en el cual se neutralizan los grupos catiónicos de la periferia. Aceite amarillento (0.250 g).

**Datos:** Polímero **10** (0.300 g), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.225 g, 2.12 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.09 (s, SiMe), 0.19 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.53-0.58 (m, CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>SiC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>S), 0.83 (t, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.23-1.41 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.77 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.23 (s, NMe<sub>2</sub>), 2.40-2.61 (m, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 3.93 (t, OCH<sub>2</sub>), 6.87 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.38 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.0 (SiMe), -2.6 (SiMe<sub>2</sub>), 13.8 (SiCH<sub>2</sub>), 16.2-23.2 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 27.8 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 29.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 33.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 45.4 (NMe<sub>2</sub>), 59.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 67.3 (OCH<sub>2</sub>), 114.0 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.4 (*C*<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.9

(C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 159.8 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ -4.5 (SiAr), 1.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 3.2 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **RMN-<sup>15</sup>N** (CDCl<sub>3</sub>): δ -352.1 (NMe<sub>2</sub>).

### PCS-2-SNMe<sub>3</sub>I (12)

Se obtiene el polímero **12** siguiendo el **protocolo 3a**, en el cual se produce la cuaternización de los grupos amino. Sólido amarillo pulverulento (0.20 g).

**Datos:** Polímero **11** (0.250 g), CH<sub>3</sub>I (0.20 mL, 3.22 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H** (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ -0.08, 0.1 (s, SiMe), 0.51-0.63 (m, CH<sub>2</sub>Si), 0.78 (t, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.23 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.66 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.57 (t, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.86 (t, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>I), 3.06 (s, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>I), 3.48 (t, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>I), 3.90 (t, OCH<sub>2</sub>), 6.80 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.28 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** {<sup>1</sup>H} (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ -4.5 (MeSi), -2.9 (SiMe<sub>2</sub>), 13.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 16.0-20.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 23.0 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>I), 26.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 33.0 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 52.6 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>I), 64.9 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>3</sub>I), 67.2 (OCH<sub>2</sub>), 114.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.9 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 135.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 159.9 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ -4.0 (SiC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 1.8 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.3 (SiMe<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **RMN-<sup>15</sup>N** (DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ -330.0 (NMe<sub>3</sub>I).

### PCS-2-S(NMe<sub>2</sub>HCl)<sub>x</sub>(NH<sub>3</sub>Cl)<sub>y</sub> (13) (x = 78% e y = 22% de los grupos terminales)

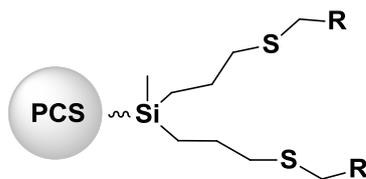
Para obtener el polímero **13** se realiza un procedimiento similar al descrito en el protocolo **1a**. Se añade en primer lugar el tiol que presentará menor proporción en la cantidad y estequiometría necesaria junto al DMPA necesario, 5% mol con respecto al número de dobles enlaces a sustituir con el mismo. La mezcla de reacción en THF/MeOH (1:2) se desoxigena y se deja reaccionar durante 30 minutos. Estos derivados se pueden aislar evaporando la mezcla de reacción y realizando una columna de tamaños en THF como eluyente. Si no se desean aislar, se puede continuar la reacción añadiendo 1.05 equivalentes por cada doble enlace que queda en la molécula de HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl, junto a la cantidad necesaria de DMPA, 5% mol con respecto al número de dobles enlaces. La reacción se desoxigena y se deja cuatro horas más tras las cuales se procede a

la purificación de manera análoga a la empleada en el protocolo **1a**. Sólido amarillo (0.210 g).

**Datos:** Polímero **10** (0.450 g), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.HCl (0.014 g, 0.12 mmol), DMPA (0.003 g, 0.01 mmol); HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl (0.076 g, 0.54 mmol), DMPA (0.014 g, 0.05 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -0.08 (s, SiMe), -0.03 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.54 (m, CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 0.78 (t, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.24-1.50 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.72 (m, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.53 (t, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.70 (s, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.HCl), 2.81 (s, NMe<sub>2</sub>.HCl), 3.11 (s, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.HCl), 3.93 (t, -OCH<sub>2</sub>), 6.95 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.39 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -5.3 (SiMe), -3.8 (SiMe<sub>2</sub>), 12.6 (SiCH<sub>2</sub>), 15.0 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 17.2–24.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 25.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 26.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 27.0 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>.HCl), 31.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 45.2 (NMe<sub>2</sub>.HCl), 55.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 66.1 (OCH<sub>2</sub>), 113.4 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 128.8 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 158.8 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -4.5 (SiAr), 1.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.9 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

#### 6.4.2.5 Síntesis y caracterización de polímeros hiperramificados aniónicos mediante adición tiol-eno (14-19)



R = COOMe	R = COONa	R = (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> Na
PCS-1 ( <b>14</b> )	PCS-1 ( <b>16</b> )	PCS-1 ( <b>18</b> )
PCS-2 ( <b>15</b> )	PCS-2 ( <b>17</b> )	PCS-2 ( <b>19</b> )

#### PCS-1-SCOOMe (14)

Se obtiene el polímero **14** siguiendo el protocolo **1b**. Aceite marrón (0.530 g).

**Datos:** Polímero PCS-1-A (**II**)<sup>6</sup> (0.500 g), HSCH<sub>2</sub>COOMe (0.350 g, 3.29 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.11 (s, SiMe), 0.53 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.22 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.50 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.56 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.15 (s, SCH<sub>2</sub>COOMe), 3.67 (s, SCH<sub>2</sub>COOMe). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.4 (SiMe), 13.2–18.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 23.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 33.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 36.3 (SCH<sub>2</sub>COOMe), 52.4 (COOMe), 170.9 (COOMe). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.60 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.50 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

### PCS-2-SCOOMe (15)

Se obtiene el polímero **15** siguiendo el **protocolo 1b**, en el cual se introducen grupos éster, precursores de sistemas con grupos carboxilato periféricos. Aceite marrón (0.420 g).

**Datos:** Polímero **3** (0.500 g), HSCH<sub>2</sub>COOMe (0.300 g, 2.12 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.03 (s, SiMe), 0.26 (s, SiMe<sub>2</sub>), 0.59 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.22 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.45 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.77 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.63 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.23 (s, SCH<sub>2</sub>COOMe), 3.67 (s, SCH<sub>2</sub>COOMe), 3.94 (t, OCH<sub>2</sub>), 6.86 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.43 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.4 (SiMe), -2.6 (SiMe), 13.3–20.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 23.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 32.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.1 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 37.4 (SCH<sub>2</sub>COOMe), 50.8 (COOMe), 67.5 (OCH<sub>2</sub>), 114.5 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.4 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.9 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 159.1 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 177.9 (COOMe). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ -2.8 (SiAr), 1.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 3.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

### PCS-1-SCOONa (16)

Se obtiene el polímero **16** siguiendo el **protocolo 4**. Sólido blanco (0.250 g).

**Datos:** Polímero **14** (0.300 g), NaOH (0.100 g, 2.50 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.17 (s, SiMe), 0.46 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 0.85 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.22 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.41 (s, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.01 (s,

SCH<sub>2</sub>CO). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ -4.4 (SiMe), 13.2-18.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 23.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 35.9 y 36.0 (CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>COONa), 177.9 (COONa). **RMN-<sup>29</sup>Si (D<sub>2</sub>O):** δ 1.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

### PCS-2-SCOONa (17)

Se obtiene el polímero **17** siguiendo el **protocolo 4**, en el cual se generan grupos carboxilato periféricos. Sólido amarillo (0.240 g).

**Datos:** Polímero **15** (0.300 g), NaOH (0.085 g, 2.12 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.15, -0.1 (s, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.40-0.80 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.05-1.70 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.50 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.13 (s, SCH<sub>2</sub>CO), 3.60 (t, OCH<sub>2</sub>), 6.53 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.11 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ -5.4 (SiMe), -3.1 (SiMe), 12.2-20.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 22.0 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 31.5 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 32.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 38.4 (CH<sub>2</sub>SCH<sub>2</sub>COONa), 66.1 (OCH<sub>2</sub>), 113.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.4 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.6 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 159.5 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 174.9 (COONa). **RMN-<sup>29</sup>Si (D<sub>2</sub>O):** δ -4.5 (SiAr), 1.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

### PCS-1-SSO<sub>3</sub>Na (18)

Se obtiene el polímero **18** siguiendo el **protocolo 1c**. Sólido amarillo (0.470 g).

**Datos:** Polímero PCS-1-A (**II**)<sup>6</sup> (0.500 g), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Na (0.500 g, 2.80 mmol), DMPA (0.072 g, 0.28 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -0.08 (s, SiMe), 0.56 (m, CH<sub>2</sub>Si), 1.30 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.48 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.80 (m, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 2.48 (m, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 2.82 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.35 (t, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -5.6 (SiMe), 12.4 (SiCH<sub>2</sub>), 17.6–23.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 24.9 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 29.9 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 30.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 49.8 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na). **RMN-<sup>29</sup>Si (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 1.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

### PCS-2-SSO<sub>3</sub>Na (19)

Se obtiene el polímero **19** siguiendo el **protocolo 1c**, en el cual se generan grupos sulfonato periféricos. Sólido amarillo (0.300 g).

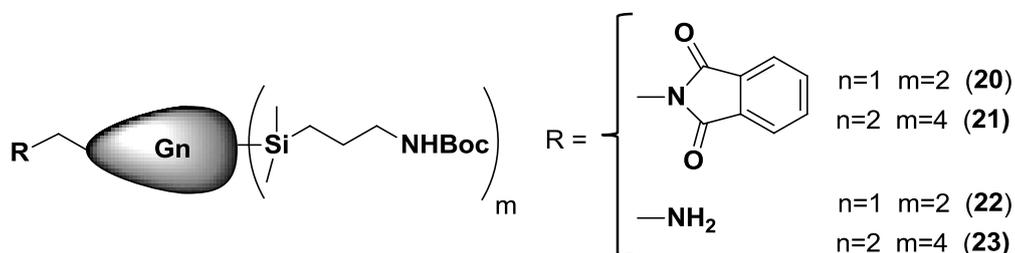
**Datos:** Polímero **3** (0.500 g), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Na (0.400 g, 2.25 mmol), DMPA (0.056 g, 0.22 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -0.06 a 0.06 (s, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.50-0.75 (m, CH<sub>2</sub>Si), 1.26-1.46 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.77 (m, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.82 (m, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 2.49 (m, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 2.82 (m, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.15 (t, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 3.91 (t, OCH<sub>2</sub>), 6.87 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.33 (d, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -5.6 (SiMe), -3.15 (SiMe<sub>2</sub>), 12.7 (SiCH<sub>2</sub>), 15.0-22.0 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 24.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 26.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 30.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 34.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 49.9 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 66.1 (OCH<sub>2</sub>), 113.5 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 128.6 (C<sub>ipso</sub> Si-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 134.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 158.9 (C<sub>ipso</sub> O-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -4.5 (SiAr), 1.2 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

## CAPÍTULO 3

### 6.4.2.6 Síntesis y caracterización de diferentes cuñas dendríticas (20-33)

a) *Cuñas con un grupo amino en el punto focal y grupos -NHBoc en la periferia y sus precursores*



### PhtG<sub>1</sub>(SiNHBoc)<sub>2</sub> (20)

Una mezcla del dendrón carbosilano BrG<sub>1</sub>(SiNHBoc)<sub>2</sub> (**XI**)<sup>7</sup> (0.200 g, 0.287 mmol), un exceso de ftalimida potásica (0.213 g, 1.14 mmol) y un 10% de NaI en

25 mL de DMF se mantiene en agitación constante a 80°C durante 16 horas. Una vez completada la reacción, se evapora la disolución hasta sequedad y al crudo de reacción se le realiza una extracción Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O, la fase orgánica se lava con agua saturada de NaCl y se seca con MgSO<sub>4</sub>. La disolución se filtra y el disolvente se evapora a vacío, obteniéndose el compuesto **20** como un aceite amarillento (0.250 g, 90%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.07 (s, 3 H, *MeSi*), 0.04 (s, 12 H, *SiMe*<sub>2</sub>), 0.45 (t, 4 H, *SiCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*NH*), 0.51 (m, 10 H, *SiCH*<sub>2</sub>), 1.21-1.32 (m, 4 H, *CH*<sub>2</sub>), 1.39-1.47 (m, 24 H, *CH*<sub>2</sub> y -*C(CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.65 (t, 2 H, *NCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>), 3.06 (m, 4 H, *CH*<sub>2</sub>*NH*), 3.65 (t, 2 H, *NCH*<sub>2</sub>), 4.60 (sa, 2 H, *NH*), 7.68 y 7.82 (m, 4 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.1 (*MeSi*), -3.4 (*SiMe*<sub>2</sub>), 12.4 (*SiCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*NH*), 13.6-24.7 (*SiCH*<sub>2</sub>), 28.5 (*C(CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.4 (*NCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>), 37.8 (*NCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>), 43.8 (*CH*<sub>2</sub>*NH*), 78.9 (*C(CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 123.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, CH), 132.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, C<sub>ipso</sub>), 133.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, CH), 156.0 (CO, Boc), 168.5 (C=O). C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>3</sub> (762.25 g/mol).

#### **PhtG<sub>2</sub>(SiNHBoC)<sub>4</sub> (21)**

Se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **20**. El compuesto **21** se obtiene como un aceite amarillento (0.760 g, 85%).

**Datos:** Dendron BrG<sub>2</sub>(SiNHBoc)<sub>4</sub> (**XII**)<sup>7</sup> (0.861 g, 0.623 mmol), ftalimida potásica (0.461 g, 2.49 mmol), NaI.

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.07 (s, 9 H, *MeSi*), 0.04 (s, 24 H, *SiMe*<sub>2</sub>), 0.43 (t, 8 H, *SiCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*NH*), 0.51 (m, 26 H, *SiCH*<sub>2</sub>), 1.27-1.35 (m, 12 H, *CH*<sub>2</sub>), 1.39-1.47 (m, 46 H, *CH*<sub>2</sub> y -*C(CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.66 (t, 2 H, *NCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>), 3.05 (m, 8 H, *CH*<sub>2</sub>*NH*), 3.64 (t, 2 H, *NCH*<sub>2</sub>), 4.58 (sa, 4 H, *NH*), 7.68 y 7.81 (m, 4 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.9 (*MeSi*), -3.4 (*SiMe*<sub>2</sub>), 12.4 (*SiCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>*NH*), 13.6-24.7 (*SiCH*<sub>2</sub>), 28.5 (*C(CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 32.5 (*NCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>), 37.8 (*NCH*<sub>2</sub>*CH*<sub>2</sub>), 43.8 (*CH*<sub>2</sub>*NH*), 78.9 (*C(CH*<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 123.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, CH), 132.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, C<sub>ipso</sub>), 133.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, CH), 155.8 (CO, Boc), 168.1 (C=O). C<sub>73</sub>H<sub>145</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>Si<sub>7</sub> (1449.56 g/mol).

**NH<sub>2</sub>G<sub>1</sub>(SiNHBoC)<sub>2</sub> (22)**

A una disolución del compuesto **20** (0.150 g, 0.197 mmol) en MeOH (10 mL) fue añadido un exceso de N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (0.02 mL, 0.64 mmol). La mezcla de reacción se mantiene en agitación constante a 80°C durante 16 horas en una ampolla. Una vez completada e la reacción, se evapora la disolución hasta sequedad eliminando el disolvente y el exceso de hidracina, el producto se extrae varias veces (3x15mL) con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Posteriormente el disolvente se evapora a vacío, obteniéndose el compuesto **22** como un aceite amarillento (0.080 g, 65%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.08 (s, 3 H, MeSi), 0.03 (s, 12 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.42 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 0.51 (m, 10 H, SiCH<sub>2</sub>), 1.21-1.32 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>), 1.38-1.47 (m, 26 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub> y -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.65 (t, 2 H, NCH<sub>2</sub>), 3.03 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>NH), 4.66 (sa, 2 H, NH). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.1 (MeSi), -3.4 (SiMe<sub>2</sub>), 12.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 13.8-24.6 (SiCH<sub>2</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 41.9 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>NH), 78.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.9 (CO, Boc). C<sub>31</sub>H<sub>69</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Si<sub>3</sub> (632.15 g/mol).

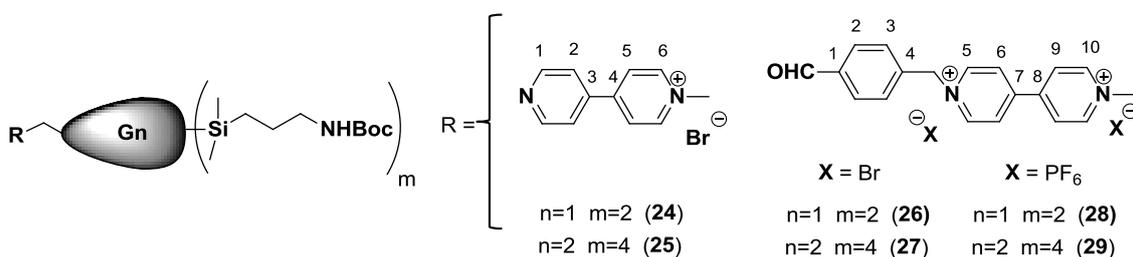
**NH<sub>2</sub>G<sub>2</sub>(SiNHBoC)<sub>4</sub> (23)**

Se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **22**. El compuesto **23** se obtiene como un aceite amarillento (0.350 g, 77%).

**Datos:** Dendrón **20** (0.500 g, 0.345 mmol), N<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (0.04 mL, 1.28 mmol).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.07 (s, 9 H, MeSi), 0.03 (s, 24 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.42 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 0.53 (m, 26 H, SiCH<sub>2</sub>), 1.22-1.32 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>), 1.38-1.47 (m, 48 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub> y C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.66 (t, 2 H, NCH<sub>2</sub>), 3.05 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>NH), 4.63 (sa, 2 H, NH). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.1 (MeSi), -3.4 (SiMe<sub>2</sub>), 12.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 13.8-24.6 (SiCH<sub>2</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 37.9 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 41.9 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 43.8 (CH<sub>2</sub>NH), 78.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 155.9 (CO, Boc). C<sub>65</sub>H<sub>143</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>Si<sub>7</sub> (1319.46 g/mol).

b) Cuñas con viológeno en el punto focal y grupos  $-NHBoc$  en la periferia y sus precursores



### {[(Viológeno) $G_1$ CBS(SiNHBoc) $_2$ ](Br)} (24)

Una mezcla del dendron carbosilano  $BrG_1SiNHBoc$  (**XI**)<sup>7</sup> (0.350 g, 0.503 mmol) y un exceso de 4,4'-bipiridina (0.235 g, 1.51 mmol) en 4 mL de acetonitrilo se mantiene en agitación constante a 80°C durante 48 horas. Una vez completada la reacción, se evapora la disolución hasta sequedad y el crudo de reacción puede ser purificado mediante sublimación (100°C, 48 horas; eliminando el exceso de bipiridina) o por cromatografía de exclusión de tamaños en THF (eliminando el exceso de bipiridina y el pequeño porcentaje de disustitución), obteniéndose el compuesto **24** como un aceite marrón (390 mg, 90%).

**RMN-<sup>1</sup>H** ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  -0.09 (s, 3 H,  $MeSi$ ), 0.06 (s, 12 H,  $SiMe_2$ ), 0.45 (t, 4 H,  $SiCH_2CH_2CH_2NH$ ), 0.50-0.56 (m, 10 H,  $SiCH_2$ ), 1.21-1.32 (m, 4 H,  $CH_2$ ), 1.39-1.58 (m, 24 H,  $CH_2$  y  $-C(CH_3)_3$ ), 2.09 (t, 2 H,  $N^+CH_2CH_2$ ), 3.04-3.10 (m, 4 H,  $CH_2NH$ ), 4.69 (sa, 2 H,  $NH$ ), 4.96 (t, 2 H,  $N^+CH_2$ ), 7.73 (d, 2 H,  $H^2$ ), 8.43 (d, 2 H,  $H^5$ ), 8.86 (d, 2 H,  $H^1$ ), 9.58 (d, 2 H,  $H^6$ ). **RMN-<sup>13</sup>C** {<sup>1</sup>H} ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  -5.2 ( $MeSi$ ), -3.4 ( $SiMe_2$ ), 12.4 (t, 4H,  $SiCH_2CH_2CH_2NH$ ), 13.8-24.6 ( $SiCH_2$ ), 28.4 ( $C(CH_3)_3$ ), 35.7 ( $N^+CH_2CH_2$ ), 43.6 ( $CH_2NH$ ), 61.5 ( $N^+CH_2$ ), 78.9 ( $C(CH_3)_3$ ), 121.5 ( $C^2$ ), 125.9 ( $C^5$ ), 140.8 ( $C^3$ ), 145.7 ( $C^6$ ), 151.4 ( $C^1$ ), 153.6 ( $C^4$ ), 156.0 (CO, Boc). **Anal. Calcd.**  $C_{41}H_{75}BrN_4O_4Si_3$  (852.22  $g \cdot mol^{-1}$ ): C, 57.78; H, 8.87; N, 6.57; Exp.: C, 55.54; H, 8.84; N, 6.56. **MS:**  $[M-Br]^+ = 771.5089$  uma (calcd. = 771.5096 uma).

**{[(Viologen)G<sub>2</sub>CBS(SiNHBoc)<sub>4</sub>](Br)} (25)**

Se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **24** pero partiendo del dendron BrG<sub>2</sub>SiNHBoc (**XII**)<sup>7</sup> (0.600 g, 0.434 mmol) y 4,4'-bipiridina (0.203 g, 1.30 mmol). El compuesto **25** se obtiene como un aceite marrón (460 mg, 70%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.017 (s, 33 H, MeSi y SiMe<sub>2</sub>), 0.48 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 0.53-0.59 (m, 26 H, SiCH<sub>2</sub>), 1.27-1.35 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>), 1.43-1.50 (m, 46 H, CH<sub>2</sub> y -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.12 (t, 2 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.02-3.16 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>NH), 4.64 (sa, 4 H, NH), 4.99 (t, 2 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 7.71 (d, 2 H, H<sup>2</sup>), 8.38 (d, 2 H, H<sup>5</sup>), 8.90 (d, 2 H, H<sup>1</sup>), 9.55 (d, 2 H, H<sup>6</sup>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.9 (MeSi), -3.2 (SiMe<sub>2</sub>), 12.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 13.9-24.8 (SiCH<sub>2</sub>), 28.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 36.0 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 43.9 (CH<sub>2</sub>NH), 61.9 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 79.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 121.4 (C<sup>2</sup>), 125.8 (C<sup>5</sup>), 140.8 (C<sup>3</sup>), 145.7 (C<sup>6</sup>), 151.2 (C<sup>1</sup>), 154.0 (C<sup>4</sup>), 156.0 (CO, Boc). **Anal.Calcd.** C<sub>75</sub>H<sub>149</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>SiBr (1539.52 g/mol): C, 58.51; H, 9.76; N, 5.46; Exp.: C, 55.15; H, 8.40; N, 5.00. **MS:** [M-Br]<sup>+</sup> = 1457.98 uma (calcd. = 1457.98 uma).

**{[CHO(Viológeno)G<sub>1</sub>CBS(SiNHBoc)<sub>2</sub>](Br)<sub>2</sub>} (26)**

Una mezcla del compuesto **24** (0.390 g, 0.458 mmol) y 4-(bromometil)benzaldehido (0.103 g, 0.514 mmol) en 4 mL de acetonitrilo se mantiene en agitación constante a 80°C durante 24 horas. A continuación la reacción se lleva a sequedad y el crudo de reacción es disuelto en una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1). El producto es extraído varias veces con agua, la disolución resultante se evapora a alto vacío, obteniéndose el compuesto **26** como un sólido amarillo pálido. Este compuesto fue aislado solamente una vez para su caracterización.

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.017 (s, 15 H, MeSi y SiMe<sub>2</sub>), 0.48 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 0.58-0.64 (m, 10 H, SiCH<sub>2</sub>), 1.31-1.48 (m, 28 H, CH<sub>2</sub> y -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.00 (t, 2 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.96-3.03 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>NH) 4.73 (t, 2 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 5.40 (sa, 2 H, NH), 6.19 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.85 (d, 2 H, H<sup>2</sup>), 8.02 (d, 2 H,

H<sup>3</sup>), 8.66-8.68 (m, 4 H, H<sup>6</sup> y H<sup>9</sup>), 9.17 (d, 2 H, H<sup>10</sup>), 9.44 (d, 2 H, H<sup>5</sup>) 10.07 (s, 1 H, CHO). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.5 (*MeSi*), -0.2 (*SiMe<sub>2</sub>*), 11.9 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH*), 13.2-24.3 (*SiCH<sub>2</sub>*), 27.7 (*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 34.9 (*N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 43.4 (*CH<sub>2</sub>NH*), 61.7 (*N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>*), 63.5 (*CH<sub>2</sub>*), 77.9 (*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 127.4 (*C<sup>9</sup>*), 127.6 (*C<sup>5</sup>*), 130.1 (*C<sup>2</sup>*), 130.3 (*C<sup>3</sup>*), 137.3 (*C<sup>1</sup>*), 139.1 (*C<sup>4</sup>*), 145.8 (*C<sup>10</sup>*), 149.2 (*C<sup>5</sup>*), 149.5 (*C<sup>8</sup>*), 150.2 (*C<sup>7</sup>*), 155.9 (CO, Boc), 192.2 (CHO). C<sub>49</sub>H<sub>82</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>Si<sub>3</sub> (1051.26 g/mol).

**{[CHO(Viológeno)G<sub>2</sub>CBS(SiNHBoc)<sub>4</sub>](Br)<sub>2</sub>} (27)**

Se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **26** pero partiendo del compuesto **25** (0.400 g, 0.260 mmol) y 4-(bromometil)benzaldehído (0.068 g, 0.338 mmol). La reacción se mantiene a 80°C durante 48 horas. El compuesto **27** se obtiene como un sólido amarillo pálido. Este compuesto fue aislado solamente una vez para su caracterización.

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.046 (s, 9 H, *MeSi*), -0.013 (s, 24 H, *SiMe<sub>2</sub>*), 0.48 (t, 8 H, *SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH*), 0.58-0.63 (m, 28 H, *SiCH<sub>2</sub>*), 1.39-1.42 (m, 60 H, *CH<sub>2</sub>* y *-C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 2.00 (t, 2 H, *N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 2.96-3.01 (m, 8 H, *CH<sub>2</sub>NH*), 4.67 (t, 2 H, *N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>*), 5.34 (sa, 4 H, NH), 6.09 (s, 2 H, *CH<sub>2</sub>*), 7.78 (d, 2 H, H<sup>2</sup>), 8.04 (d, 2 H, H<sup>3</sup>), 8.53-8.58 (m, 4 H, H<sup>6</sup> y H<sup>9</sup>), 9.04 (d, 2 H, H<sup>10</sup>), 9.28 (d, 2 H, H<sup>5</sup>), 10.08 (s, 1 H, CHO). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.5 (*MeSi*), -0.2 (*SiMe<sub>2</sub>*), 11.9 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH*), 13.2-24.3 (*SiCH<sub>2</sub>*), 27.7 (*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 34.9 (*N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 43.4 (*CH<sub>2</sub>NH*), 61.7 (*N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>*), 63.5 (*CH<sub>2</sub>*), 77.9 (*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 127.4 (*C<sup>9</sup>*), 127.6 (*C<sup>5</sup>*), 130.1 (*C<sup>2</sup>*), 130.3 (*C<sup>3</sup>*), 137.3 (*C<sup>1</sup>*), 139.1 (*C<sup>4</sup>*), 145.8 (*C<sup>10</sup>*), 149.2 (*C<sup>5</sup>*), 149.5 (*C<sup>8</sup>*), 150.2 (*C<sup>7</sup>*), 155.9 (CO, Boc), 192.2 (CHO). C<sub>83</sub>H<sub>156</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>Si<sub>7</sub> (1738.57 g/mol).

**{[CHO(Viológeno)G<sub>1</sub>CBS(SiNHBoc)<sub>2</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>} (28)**

El compuesto **26** (0.514 mmol) es disuelto en una mezcla CHCl<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (1:1), y se añaden gota a gota 2 mL de una disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>. El producto se extrae varias veces con CHCl<sub>3</sub> (2x20 mL), la fase orgánica se lava con agua saturada de NaCl y se seca con MgSO<sub>4</sub>. La disolución se filtra y el disolvente se evapora a vacío. El producto fue purificado mediante cromatografía

de exclusión de tamaños en THF, obteniéndose el compuesto **28** como un aceite marrón (0.420 g, 78%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.020 (s, 15 H, *MeSi* y *SiMe<sub>2</sub>*), 0.48 (t, 4 H, *SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH*), 0.60-0.62 (m, 10 H, *SiCH<sub>2</sub>*), 1.33-1.49 (m, 28 H, *CH<sub>2</sub>* y -*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 2.05 (t, 2 H, *N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 2.96-3.01 (m, 4 H, *CH<sub>2</sub>NH*), 4.64 (t, 2 H, *N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>*), 5.31 (sa, 2 H, *NH*), 5.95 (s, 2 H, *CH<sub>2</sub>*), 7.69 (d, 2 H, *H<sup>2</sup>*), 8.03 (d, 2 H, *H<sup>3</sup>*), 8.42-8.45 (m, 4 H, *H<sup>6</sup>* y *H<sup>9</sup>*), 8.94 (d, 2 H, *H<sup>5</sup>*), 9.02 (d, 2 H, *H<sup>10</sup>*), 10.07 (s, 1 H, *CHO*). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -5.9 (*MeSi*), -4.1 (*SiMe<sub>2</sub>*), 11.9 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH*), 13.2-24.3 (*SiCH<sub>2</sub>*), 27.7 (*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 34.9 (*N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 43.4 (*CH<sub>2</sub>NH*), 61.9 (*NCH<sub>2</sub>*), 64.1 (*CH<sub>2</sub>*), 77.9 (*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 127.3 (*C<sup>9</sup>*), 127.6 (*C<sup>6</sup>*), 129.8 (*C<sup>2</sup>*), 130.3 (*C<sup>3</sup>*), 137.4 (*C<sup>1</sup>*), 138.5 (*C<sup>4</sup>*), 145.6 (*C<sup>10</sup>*), 145.9 (*C<sup>5</sup>*), 149.7 (*C<sup>8</sup>*), 150.7 (*C<sup>7</sup>*), 155.9 (*CO, Boc*), 192.1 (*CHO*). **RMN-<sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>CN):** δ -144.62 (h, *PF<sub>6</sub>*). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):** δ 1.77 (*SiMe*), 1.81 (*SiMe<sub>2</sub>*). **Anal.Calcd.** C<sub>49</sub>H<sub>82</sub>F<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>3</sub> (1181.38 g.mol<sup>-1</sup>): C, 49.82; H, 7.00; N, 4.74; Exp.: C, 48.46; H, 7.21; N, 4.36. **MS:** [M-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup> = 1035.52 uma (calcd. = 1035.47 uma).

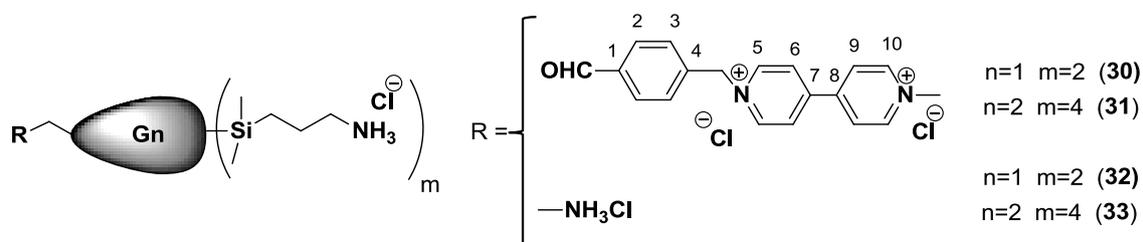
### {[CHO(Viológeno)G<sub>2</sub>CBS(SiNHBoc)<sub>4</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>2</sub>} (**29**)

Se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **28** (0.260 mmol) pero partiendo del compuesto **27**. El compuesto **29** se obtiene como un sólido amarillo (0.430 g, 88%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.045 (s, 9 H, *MeSi*), -0.021 (s, 24 H, *SiMe<sub>2</sub>*), 0.48 (t, 8 H, *SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH*), 0.57-0.62 (m, 28 H, *SiCH<sub>2</sub>*), 1.34-1.43 (m, 60 H, *CH<sub>2</sub>* y -*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 2.04 (t, 2 H, *N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 2.97-3.02 (m, 8 H, *CH<sub>2</sub>NH*), 4.63 (t, 2 H, *N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>*), 5.31 (sa, 4 H, *NH*), 5.95 (s, 2 H, *CH<sub>2</sub>*), 7.69 (d, 2 H, *H<sup>2</sup>*), 8.03 (d, 2 H, *H<sup>3</sup>*), 8.40-8.44 (m, 4 H, *H<sup>6</sup>* y *H<sup>9</sup>*), 8.92 (d, 2 H, *H<sup>5</sup>*), 9.01 (d, 2 H, *H<sup>10</sup>*), 10.07 (s, 1 H, *CHO*). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -5.5 (*MeSi*), -4.1 (*SiMe<sub>2</sub>*), 11.9 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH*), 13.4-24.4 (*SiCH<sub>2</sub>*), 27.8 (*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 34.9 (*N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 43.5 (*CH<sub>2</sub>NH*), 61.9 (*N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>*), 64.1 (*CH<sub>2</sub>*), 77.9 (*C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>*), 127.3 (*C<sup>9</sup>*), 127.6 (*C<sup>6</sup>*), 129.8 (*C<sup>2</sup>*), 130.3 (*C<sup>3</sup>*), 137.5 (*C<sup>1</sup>*), 138.5 (*C<sup>4</sup>*), 145.6 (*C<sup>10</sup>*), 145.9 (*C<sup>5</sup>*), 149.7 (*C<sup>8</sup>*), 150.6 (*C<sup>7</sup>*), 155.9 (*CO, Boc*), 192.1 (*CHO*). **RMN-<sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>CN):** δ -144.61 (h, *PF<sub>6</sub>*). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):** δ 0.98 (*MeSi*), 1.77 (*MeSi*), 1.82 (*SiMe<sub>2</sub>* y *SiMe*).

**Anal. Calcd.** C<sub>83</sub>H<sub>156</sub>F<sub>12</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>P<sub>2</sub>Si<sub>7</sub> (1868.69 g.mol<sup>-1</sup>): 53.35; H, 8.41; N, 4.50; Exp.: C, 53.46; H, 8.18 N, 4.05. **MS:** [M-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup> = 1722.00 uma (calcd. = 1722.78 uma).

c) *Cuñas catiónicas con diferentes grupos en el punto focal*



**{[CHO(Viológeno)G<sub>1</sub>CBS(SiNH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>](Cl)<sub>4</sub>} (30)**

Se obtiene el dendrón **30** siguiendo el **protocolo 7**. Sólido amarillento (0.060 mg, 77%).

**Datos:** Dendrón **26** (0.100 g, 0.085 mmol), disolución de TFA al 20% en DCM (2 mL), disolución saturada <sup>t</sup>Bu<sub>4</sub>NCl (2.5 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.18 (s, 15 H, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.42 (m, 14 H, CH<sub>2</sub>Si), 1.23 (m, 6 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.52 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl), 1.95 (m, 2 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.84 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl), 4.64 (m, 2 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub> solapado por el agua), 5.96 (s, 2 H, CH<sub>2</sub>), 7.59 (d, 2 H, H<sup>2</sup>), 7.95 (d, 2 H, H<sup>3</sup>), 8.45-8.51 (m, 4 H, H<sup>6</sup> y H<sup>9</sup>), 9.02 (d, 2 H, H<sup>5</sup>), 9.13 (d, 2 H, H<sup>5</sup>), 9.88 (s, 1 H, CHO). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ -5.9 (MeSi), -4.4 (SiMe<sub>2</sub>), 11.2-21.5 (SiCH<sub>2</sub>), 34.2 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 42.3 (CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl), 61.9 (NCH<sub>2</sub>), 64.1 (CH<sub>2</sub>), 126.9 (C<sup>9</sup>), 127.2 (C<sup>6</sup>), 129.6 (C<sup>2</sup>), 130.9 (C<sup>3</sup>), 136.6 (C<sup>1</sup>), 138.8 (C<sup>4</sup>), 145.5 (C<sup>10</sup>), 145.8 (C<sup>5</sup>), 149.7 (C<sup>8</sup>), 150.7 (C<sup>7</sup>), 195.5 (CHO). C<sub>39</sub>H<sub>68</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>4</sub>OSi<sub>3</sub> (835.05 g/mol).

**{[CHO(Viológeno)G<sub>2</sub>CBS(SiNH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>](Cl)<sub>6</sub>} (31)**

Se obtiene el dendrón **31** siguiendo el **protocolo 7**. Sólido amarillento (0.058 mg, 79%).

**Datos:** Dendróon **27** (0.100 g, 0.053 mmol), disolución de TFA al 20% en DCM (2 mL), disolución saturada  $t\text{Bu}_4\text{NCl}$  (2.5 mL).

**RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  -0.015 (s, 33 H,  $\text{SiMe}$  y  $\text{SiMe}_2$ ), 0.39 (m, 34 H,  $\text{SiCH}_2$ ), 1.08 (m, 14 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ) 1.55 (m, 8 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$ ), 1.95 (m, 2 H,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.84 (m, 8 H,  $\text{CH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$ ), 4.64 (m, 2 H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$  solapado con el agua), 5.98 (s, 2 H,  $\text{CH}_2$ ), 7.65 (d, 2 H,  $\text{H}^2$ ), 7.92 (d, 2 H,  $\text{H}^3$ ), 8.51 (m, 4 H,  $\text{H}^6$  y  $\text{H}^9$ ), 9.10 (d, 2 H,  $\text{H}^5$ ), 9.19 (d, 2 H,  $\text{H}^{10}$ ), 9.87 (s, 1 H, CHO). **RMN- $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  -5.4 ( $\text{MeSi}$ ), -3.9 ( $\text{SiMe}_2$ ), 11.5-21.6 ( $\text{SiCH}_2$ ), 34.8 ( $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 42.1 ( $\text{CH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$ ), 61.9 ( $\text{NCH}_2$ ), 64.1 ( $\text{CH}_2$ ), 126.9 ( $\text{C}^9$ ), 127.0 ( $\text{C}^6$ ), 129.4 ( $\text{C}^2$ ), 130.8 ( $\text{C}^3$ ), 136.6 ( $\text{C}^1$ ), 140.4 ( $\text{C}^4$ ), 145.5 ( $\text{C}^{10}$ ), 145.7 ( $\text{C}^5$ ), 149.7 ( $\text{C}^8$ ), 150.7 ( $\text{C}^7$ ), 190.3 (CHO).  $\text{C}_{63}\text{H}_{128}\text{Cl}_6\text{N}_6\text{OSi}_7$  (1395.05 g/mol).

### **$\{[\text{NH}_3\text{G}_1(\text{SiNH}_3)_2](\text{Cl})_3\}$ (32)**

Se obtiene el dendróon **32** siguiendo el **protocolo 7**. Sólido blanco (0.060 mg, 88%).

**Datos:** Dendróon **22** (0.080, 0.126 mmol), disolución de TFA al 20% en DCM (2 mL), disolución saturada  $t\text{Bu}_4\text{NCl}$  (2.5 mL).

**RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  -0.15 (s, 3 H,  $\text{MeSi}$ ), -0.11 (s, 12 H,  $\text{SiMe}_2$ ), 0.50 (m, 14 H,  $\text{CH}_2\text{Si}$ ), 1.28 (m, 6 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 1.56 (m, 6 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$ ), 2.85 (m, 6 H,  $\text{CH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$ ). **RMN- $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):**  $\delta$  -5.7 ( $\text{MeSi}$ ), -4.2 ( $\text{SiMe}_2$ ), 11.3-21.6 ( $\text{SiCH}_2$  y  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ ), 30.6 ( $\text{NCH}_2\text{CH}_2$ ), 39.2 y 42.3 ( $\text{CH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$ ).  $\text{C}_{21}\text{H}_{56}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{Si}_3$  (541.30 g/mol).

### **$\{[\text{NH}_3\text{G}_2(\text{SiNH}_3)_4](\text{Cl})_6\}$ (33)**

Se obtiene el dendróon **33** siguiendo el **protocolo 7**. Sólido blanco (0.190 mg, 84%).

**Datos:** Dendróon **23** (0.300, 0.227 mmol), disolución de TFA al 20% en DCM (2 mL), disolución saturada  $t\text{Bu}_4\text{NCl}$  (2.5 mL).

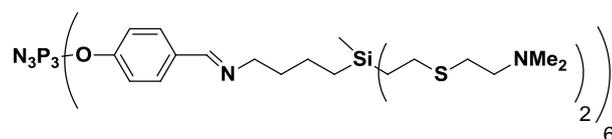
**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.14 (s, 9 H, *MeSi*), -0.07 (s, 24 H, *SiMe<sub>2</sub>*), 0.49 (m, 34 H, *CH<sub>2</sub>Si*) 1.27 (m, 12 H, *CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 1.57 (m, 10 H, *CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl*), 2.85 (t, 10 H, *CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl*). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ -5.7 (*MeSi*), -3.9 (*SiMe<sub>2</sub>*), 11.6-23.0 (*SiCH<sub>2</sub>* y *CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 30.6 (*NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 39.2 y 42.3 (*CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl*). C<sub>45</sub>H<sub>116</sub>Cl<sub>5</sub>N<sub>5</sub>Si<sub>7</sub> (1101.30 g/mol).

#### 6.4.2.7 Síntesis y caracterización de los dendrímeros híbridos neutros fósforo-carbosilano (34-42)

##### G<sub>0</sub>DBP(CH=N)G<sub>1</sub>CBS(SNMe<sub>2</sub>)<sub>12</sub> (34)

Se obtiene el dendrímero **34** siguiendo el **protocolo 5**.

**Datos:** Dendrímero G<sub>0</sub> (**III**)<sup>8</sup> (51.6 mg, 0.060 mmoles) y el dendrón NH<sub>2</sub>G<sub>1</sub>SNMe<sub>2</sub> (**VII**)<sup>9</sup> (182 mg, 0.48 mmoles).

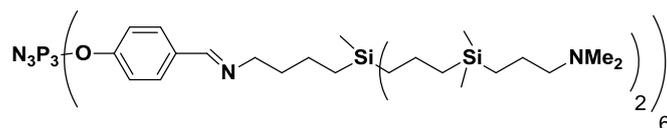


**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.01 (s, 18 H, *SiMe*), 0.60 (m, 12 H, *CH<sub>2</sub>Si*), 0.88 (t, 24 H, *SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*), 1.35 (m, 12 H, *CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 1.68 (m, 12 H, *NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 2.23 (s, 72 H, *NMe<sub>2</sub>*), 2.40-2.65 (m, 72 H, *SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>*, *SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S* y *SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>*), 3.56 (m, 12 H, *NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 6.99 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.54 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8.17 (s, 6 H, *CH=N*). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.48 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). C<sub>144</sub>H<sub>264</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>3</sub>S<sub>12</sub>Si<sub>6</sub> (3031.99 g/mol).

##### G<sub>0</sub>DBP(CH=N)G<sub>1</sub>CBS(SiNMe<sub>2</sub>)<sub>12</sub> (35)

Se obtiene el dendrímero **35** siguiendo el **protocolo 5**.

**Datos:** Dendrímero G<sub>0</sub> (**III**)<sup>8</sup> (66.9 mg, 0.078 mmoles) y el dendrón NH<sub>2</sub>G<sub>1</sub>SiNMe<sub>2</sub> (**IX**)<sup>10</sup> (250 mg, 0.51 mmoles).

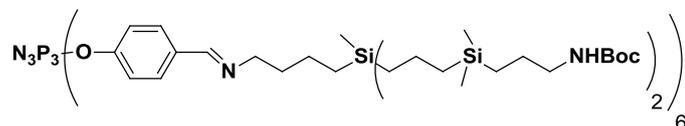


**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -0.07 (s, 18 H, SiMe), 0.05 (s, 72 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.47 (m, 84 H, CH<sub>2</sub>Si), 1.34 (m, 60 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 1.67 (m, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.17 (m, 96 H, CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub> y NMe<sub>2</sub>), 3.57 (m, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.97 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.50 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8.16 (s, 6 H, CH=N). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  7.92 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). C<sub>192</sub>H<sub>384</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>3</sub>Si<sub>18</sub> (3681,70 g/mol).

**G<sub>0</sub>DBP(CH=N)G<sub>1</sub>CBS(SiNHBoc)<sub>12</sub> (36)**

Se obtiene el dendrímero **36** siguiendo el **protocolo 5**, en el cual se introducen dendrones carbosilano en la periferia mediante una reacción de condensación.

**Datos:** Dendrímero G<sub>0</sub> (**III**)<sup>8</sup> (41.0 mg, 0.047 mmoles), dendrón **22** (200 mg, 0.32 mmoles).

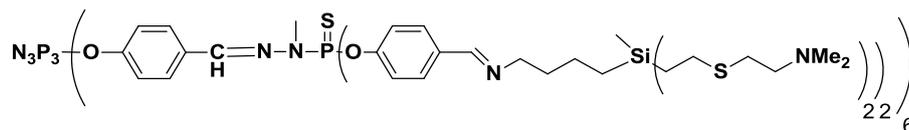


**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -0.07 (s, 18 H, SiMe), 0.05 (s, 72 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.47 (m, 84 H, CH<sub>2</sub>Si), 1.26 (m, 60 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.42 (m, 108 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.68 (m, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 3.04 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH), 3.57 (m, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.63 (sa, 12 H, NH), 6.99 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.53 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 8.16 (s, 6 H, CH=N). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  7.92 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). C<sub>228</sub>H<sub>432</sub>N<sub>21</sub>O<sub>30</sub>P<sub>3</sub>Si<sub>18</sub> (4546.45 g/mol).

**G<sub>1c</sub>DBP(CH=N)G<sub>1</sub>CBS(SNMe<sub>2</sub>)<sub>24</sub> (37)**

Se obtiene el dendrímero **37** siguiendo el **protocolo 5**.

**Datos:** Dendrímero G<sub>1c</sub> (**V**)<sup>8</sup> (80 mg, 0.028 mmoles) y el dendrón NH<sub>2</sub>G<sub>1</sub>SNMe<sub>2</sub> (**VII**)<sup>9</sup> (140 mg, 0.37 mmoles).

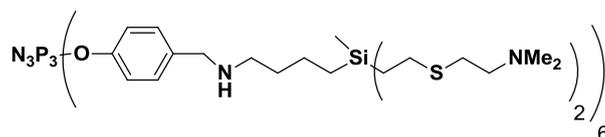


**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ -0.01 (s, 18 H, SiMe), 0.58 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.88 (t, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.40 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.69 (m, 12 H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.21 (s, 72 H, NMe<sub>2</sub>), 2.40-2.63 (m, 72 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.75 (m, 12 H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.3 (d, 18 H, N-CH<sub>3</sub>), 3.55 (m, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH), 7.0 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), 7.3 (dd, 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), 7.51 (m, 36 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>; 6 H, CH=N), 8.15 (s, 6 H, CH=N). **RMN-<sup>31</sup>P** {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.25 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), 62.43 (P=S). C<sub>336</sub>H<sub>576</sub>N<sub>51</sub>O<sub>18</sub>P<sub>9</sub>S<sub>30</sub>Si<sub>12</sub> (7196.24 g/mol).

### G<sub>0</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH)G<sub>1</sub>CBS(SNMe<sub>2</sub>)<sub>12</sub> (38)

Se obtiene el dendrímero **38** siguiendo el **protocolo 6**. Aceite incoloro (140 mg, 75%).

**Datos:** Dendrímero **34** (0.186 mg, 0.061 mmoles) y NaBH<sub>4</sub> (41.3 mg, 1.10 mmol).



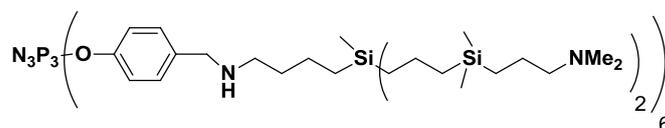
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ -0.02 (s, 18 H, SiMe), 0.53 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.87 (t, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.26 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.50 (m, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.21 (s, 72 H, NMe<sub>2</sub>), 2.41-2.66 (m, 72 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.74 (m, 12 H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.70 (s, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH), 6.87 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.13 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>): δ -5.3 (SiMe), 13.6 (CH<sub>2</sub>Si), 14.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 27.5 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 29.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 34.1 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 45.4 (NMe<sub>2</sub>), 49.1 y 49.3 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH y NHCH<sub>2</sub>), 59.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 120.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.1 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 149.6 (C<sub>ipso</sub> -CHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P** {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.48 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.04 (SiMe). **Anal.Calcd.** C<sub>144</sub>H<sub>276</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>3</sub>S<sub>12</sub>Si<sub>6</sub>

(3044.08 g/mol): C, 56.82; H, 9.14; N, 9.66; S, 12.64. Exp.: C, 56.54; H, 8.84; N, 9.56; S, 11.98.

**G<sub>0</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH)G<sub>1</sub>CBS(SiNMe<sub>2</sub>)<sub>12</sub> (39)**

Se obtiene el dendrímero **39** siguiendo el **protocolo 6**. Aceite marrón (140 mg, 75%).

**Datos:** Dendrímero **35** (0.286 mg, 0.078 mmoles) y NaBH<sub>4</sub> (52.3 mg, 1.40 mmol).



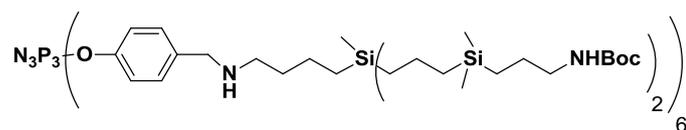
**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ -0.07 (s, 18 H, SiMe), 0.05 (s, 72 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.46 (m, 84 H, CH<sub>2</sub>Si), 1.23 (m, 60 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 1.40 (m, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.19 (m, 96 H, CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub> y NMe<sub>2</sub>), 2.58 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 3.70 (m, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.86 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.1 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** (CDCl<sub>3</sub>): δ -4.3 (SiMe), -2.6 (SiMe<sub>2</sub>), 13.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 14.7-20.8 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 22.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 35.0 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 46.2 (NMe<sub>2</sub>), 64.2 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 121.4 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.6 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 137.8 (C<sub>ipso</sub>-O C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 150.4 (C<sub>ipso</sub>-CHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H}** (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.92 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.6 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.9 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>). **Anal. Calcd.** C<sub>192</sub>H<sub>396</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>3</sub>Si<sub>18</sub> (3693.80 g/mol): C, 62.43; H, 10.81; N, 7.96. Exp.: C, 62.27; H, 10.19; N, 6.43.

**G<sub>0</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH)G<sub>1</sub>CBS(SiNHBoc)<sub>12</sub> (40)**

Se obtiene el dendrímero **40** siguiendo el **protocolo 6**, en el cual se reducen los enlaces imina presentes en el dendrímero. Aceite marrón (160 mg, 73%).

**Datos:** Dendrímero **36** (0.215 mg, 0.048 mmoles) y NaBH<sub>4</sub> (32.0 mg, 0.85 mmol).

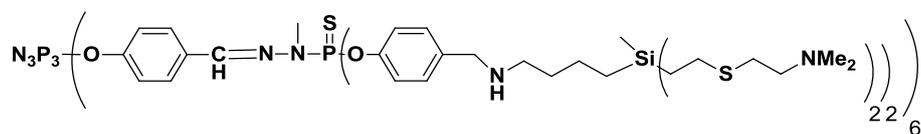


**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.07 (s, 18 H, SiMe), 0.05 (s, 72 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.47 (m, 84 H, CH<sub>2</sub>Si), 1.26 (m, 60 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.42 (m, 108 H, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.68 (m, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 3.0 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NHBoc), 3.04 (m, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>NH), 3.57 (m, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.63 (sa, 12 H, NH), 6.99 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.53 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -4.9 (SiMe), -3.5 (SiMe<sub>2</sub>), 12.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc), 13.8-24.8 (CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 33.9 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 43.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 49.8 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH y NHCH<sub>2</sub>), 53.5 (CH<sub>2</sub>NHBoc), 79.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 120.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.0 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 136.5 (C<sub>ipso</sub> -O C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 149.5 (C<sub>ipso</sub> -CHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 156.2 (CO, Boc). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.92 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.6 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.9 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHBoc). **Anal.Calcd.** C<sub>228</sub>H<sub>444</sub>N<sub>21</sub>O<sub>30</sub>P<sub>3</sub>Si<sub>18</sub> (4558.58 g/mol): C, 60.07; H, 9.82; N, 6.45. **Exp.:** C, 59.94; H, 9.84; N, 6.56.

#### G<sub>1c</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH)G<sub>1</sub>CBS(SNMe<sub>2</sub>)<sub>24</sub> (41)

Se obtiene el dendrímero **41** siguiendo el **protocolo 6**. Aceite marrón (120 mg, 60%).

**Datos:** Dendrímero **37** (200 mg, 0.028 mmoles) y NaBH<sub>4</sub> (75.4 mg, 2.01 mmoles).

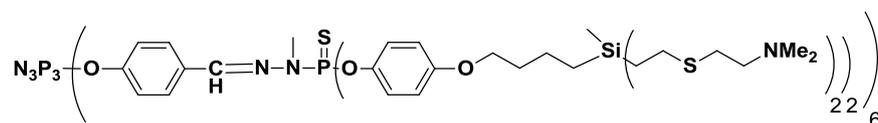


**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.02 (s, 18 H, SiMe), 0.51 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.86 (t, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.26 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.48 (m, 12 H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.21 (s, 72 H, NMe<sub>2</sub>), 2.42-2.59 (m, 72 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.74 (m, 12 H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.18 (d, 18 H, N-CH<sub>3</sub>), 3.66 (m, 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH), 7.10 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), 7.19 (dd, 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), 7.57 (m, 36 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>; 6H, CH=N). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -

5.4 (SiMe), 13.6 (CH<sub>2</sub>Si), 14.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 27.6 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 29.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 33.0 (NCH<sub>3</sub>), 33.9 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 45.4 (NMe<sub>2</sub>), 59.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 121.3 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 127.0 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 128.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.28 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 132.1 (C<sub>ipso</sub>-O C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 137.49 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 138.67(CH=N), 149.3 (C<sub>ipso</sub>-CHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 151.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.36 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), 62.89 (P=S). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 2.9 (SiMe). **Anal.Calcd.** C<sub>336</sub>H<sub>600</sub>N<sub>51</sub>O<sub>18</sub>P<sub>9</sub>S<sub>30</sub>Si<sub>12</sub>(7220.43 g/mol): C, 55.89; H, 8.38; N, 9.89; S, 13.32. Exp.: C, 55.54; H, 8.84; N, 9.56; S, 12.32.

### G<sub>1</sub>DBP(P-O)G<sub>1</sub>CBS(SNMe<sub>2</sub>)<sub>12</sub> (42)

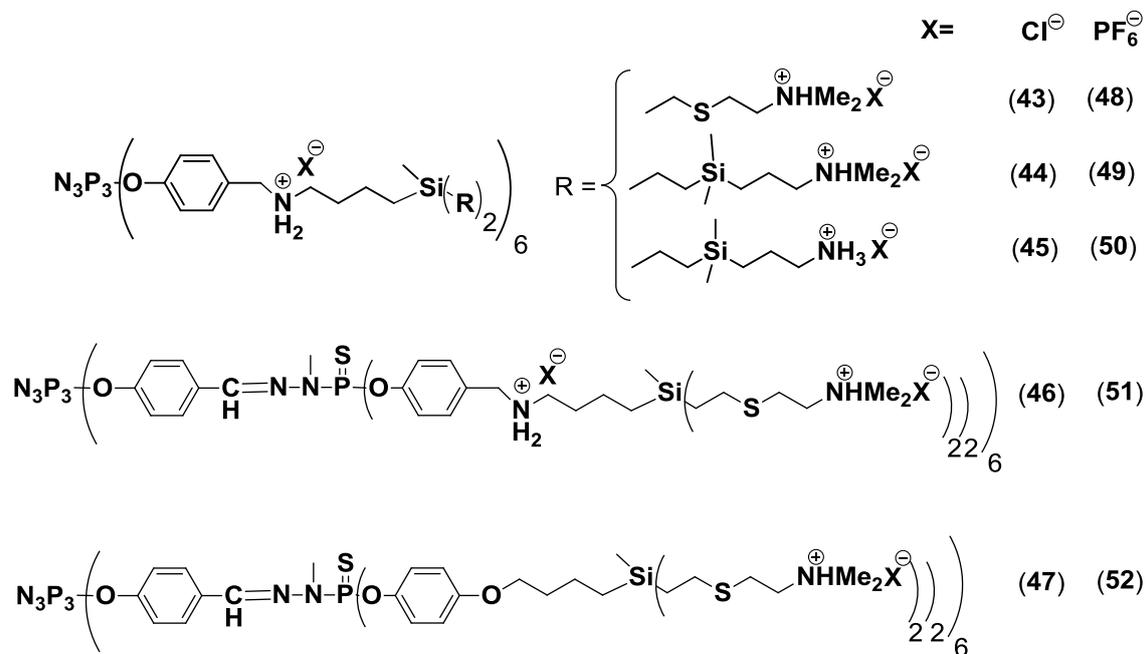
Sobre una disolución en THF seco del dendrímero G<sub>1</sub> (IV)<sup>8</sup> (43.9 mg, 0.024 mmoles) en presencia de CsCO<sub>3</sub> (103 mg, 0.32 mmoles) se añade otra disolución del dendrón (III) (150 mg, 0.32 mmoles) a 0°C. Una vez completada la adición, la mezcla se deja bajo agitación constante a 50°C durante toda la noche. Para eliminar el CsCO<sub>3</sub> la muestra es centrifugada y posteriormente se purifica mediante cromatografía por exclusión de tamaños, obteniéndose el dendrímero 42 como un aceite marrón (150 mg, 88%).



**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.07 (s, 36 H, SiMe), 0.63 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.88 (t, 48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.41 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.72 (m, 24 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.25 (s, 144 H, NMe<sub>2</sub>), 2.49-2.78 (m, 144 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 3.23 (s, 18 H, NMe), 3.82 (m, 24 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 6.74 (d, 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.05 (m, 36 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.59 (m, 18 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> y CH=N). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.3 (SiMe), 13.0 (CH<sub>2</sub>Si), 14.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 20.0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 27.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 29.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 32.7 (NCH<sub>3</sub>), 33.9 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 45.4 (NMe<sub>2</sub>), 59.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 121.3 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 127.0 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 128.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.28 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 132.1 (C<sub>ipso</sub>-O C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 137.49 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 138.67(CH=N), 149.3 (C<sub>ipso</sub>-CHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 151.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ 8.45 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), 64.79 (P=S). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.0 (SiMe). **Anal.Calcd.**

$C_{327}H_{576}N_{39}O_{30}P_9S_{30}Si_{12}$  (7112.06 g/mol): C, 55.22; H, 8.16; N, 7.68; S, 13.53.  
Exp.: C, 55.04; H, 7.84; N, 7.56; S, 12.73

### 6.4.2.8 Síntesis y caracterización de los dendrímeros híbridos catiónicos fósforo-carbosilano (43-52)



### { $G_0$ DBP( $CH_2-NH_2$ ) $G_1$ CBS(SNHMe<sub>2</sub>)<sub>12</sub>(Cl)<sub>18</sub>} (43)

Se obtiene el dendrímero **43** siguiendo el **protocolo 3a**. Sólido amarillo (105 mg, 86%).

**Datos:** Dendrímero **38** (0.100 g, 0.033 mmoles), HCl (0.6 mL, 1.1 mmoles).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  -0.01 (s, 18 H, SiMe), 0.45 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.82 (t, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.19 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.58 (m, 12 H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.56 (t, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.85 (m, 84 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub> y NMe<sub>2</sub>HCl), 3.26 (m, 24 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 3.51 (m, 12 H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.21 (m, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 6.96 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.45 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  8.69 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **Anal. Calcd.** C<sub>144</sub>H<sub>294</sub>Cl<sub>18</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>3</sub>S<sub>12</sub>Si<sub>6</sub>. H<sub>2</sub>O (3700.38 g/mol): C, 43.56; H, 8.22; N, 7.41; S, 8.69. Exp.: C, 43.42; H, 8.20; N, 6.79; S, 7.94.

**{G<sub>0</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)G<sub>1</sub>CBS(SiNHMe<sub>2</sub>)<sub>12</sub>(Cl)<sub>18</sub>} (44)**

Se obtiene el dendrímero **44** siguiendo el **protocolo 3a**. Se realiza la cuaternización con cloruro de hidrógeno de las aminas presentes en el dendrímero. Sólido amarillo (105 mg, 89%).

**Datos:** Dendrímero **39** (0.100 g, 0.027 mmoles), HCl (0.5 mL, 1.01 mmoles).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.22 (s, 18 H, SiMe), -0.09 (s, 72 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.45 (m, 84 H, CH<sub>2</sub>Si), 1.23 (m, 36 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.61 (m, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 2.48 (m, 12 H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.63 (m, 72 H, NMe<sub>2</sub>.HCl), 3.00 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 4.23 (m, 12 H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 6.92 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.44 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ 8.82 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **Anal.Calcd.** C<sub>192</sub>H<sub>414</sub>Cl<sub>18</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>3</sub>Si<sub>18</sub> (4350.08 g/mol): C, 53.01; H, 9.59; N, 6.76. Exp.: C, 52.54; H, 8.99; N, 6.56.

**{G<sub>0</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)G<sub>1</sub>CBS(SiNH<sub>3</sub>)<sub>12</sub>(Cl)<sub>18</sub>} (45)**

Se obtiene el dendrímero **45** siguiendo el **protocolo 7**, en el cual se realiza la desprotección de las aminas periféricas y su posterior cuaternización con cloruro de hidrógeno. Sólido amarillo (0.070 mg, 80%).

**Datos:** Dendrímero **40** (0.100 g, 0.022 mmol), TFA (20% DCM) (2 mL), disolución saturada de <sup>t</sup>Bu<sub>4</sub>NCl (1.5 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.21 (s, 18 H, SiMe), -0.09 (s, 72 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.47 (m, 84 H, CH<sub>2</sub>Si), 1.23 (m, 36 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.56 (m, 36 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl), ), 2.48 (m, 12 H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.71 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl), 4.10 (s, 12 H, NCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 6.90 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.23 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ 8.71 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **Anal.Calcd.** C<sub>168</sub>H<sub>365</sub>Cl<sub>18</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>3</sub>Si<sub>18</sub> (4013.46 g/mol): C, 50.29; H, 9.17; N, 7.33. Exp.: C, 49.83; H, 8.34; N, 6.36.

**{G<sub>1c</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)G<sub>1</sub>CBS(SNHMe<sub>2</sub>)<sub>24</sub>(Cl)<sub>36</sub>} (46)**

Se obtiene el dendrímero **46** siguiendo el **protocolo 3a**. Sólido amarillo (0.100 g, 88%).

**Datos:** Dendrímero **41** (0.100 g, 0.014 mmoles), HCl (0.5 mL, 1.01 mmoles).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.08 (s, 36 H, SiMe), 0.50 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.83 (t, 48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.15 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.50 (m, 24 H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.78 (48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S; 192 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub> y NMe<sub>2</sub>HCl), 3.22 (m, 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>; 18 H, NMe), 3.45 (m, 24 H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.37 (m, 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 7.02 (d, 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), 7.28 (m, 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>; 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>; 6 H, CH=N). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ 9.08 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), 62.83 (P=S). **Anal.Calcd.** C<sub>336</sub>H<sub>624</sub>Cl<sub>24</sub>N<sub>51</sub>O<sub>18</sub>P<sub>9</sub>S<sub>30</sub>Si<sub>12</sub> (8095.48 g/mol): C, 47.29; H, 7.51; N, 14.96; S, 11.27. Exp.: C, 46.95; H, 6.84; N, 13.56; S, 11.03.

**{G<sub>1</sub>DBP(P-O)G<sub>1</sub>CBS(SNHMe<sub>2</sub>)<sub>24</sub>(Cl)<sub>24</sub>} (47)**

Se obtiene el dendrímero **47** siguiendo el **protocolo 3a**. Sólido amarillo (0.080 g, 90%).

**Datos:** Dendrímero **42** (0.080 g, 0.011 mmoles), HCl (0.27 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.07 (s, 36 H, SiMe), 0.50 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.80 (t, 48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.25 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.51 (m, 24 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.71 (48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S; 192 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub> y NMe<sub>2</sub>HCl; 24 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.12 (m, 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>; 18 H, NMe), 6.85 (m, 72 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>; 6 H, CH=N). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ 8.48 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), 63.94 (P=S). **Anal.Calcd.** C<sub>327</sub>H<sub>599</sub>Cl<sub>24</sub>N<sub>39</sub>O<sub>30</sub>P<sub>9</sub>S<sub>30</sub>Si<sub>12</sub> (7986.10 g/mol): C, 49.18; H, 7.56; N, 6.84; S, 12.05. Exp.: C, 48.54; H, 6.74; N, 6.56, S, 11.55.

**{G<sub>0</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)G<sub>1</sub>CBS(SNHMe<sub>2</sub>)<sub>12</sub>(PF<sub>6</sub>)<sub>18</sub>} (48)**

Se obtiene el dendrímero **48** siguiendo el **protocolo 8**. Sólido amarillo (0.026 mg, 85%).

**Datos:** Dendrímero **43** (0.020 mg, 0.005 mmol), disolución saturada NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (2.5 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ 0.10 (s, 18 H, SiMe), 0.67 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.94 (t, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.41 (m, 12 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.72 (m, 12 H,

NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.65 (t, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.87 (m, 96 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub> y NMe<sub>2</sub>H), 3.10 (m, 24 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 3.67 (m, 12 H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.20 (m, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 7.11 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.47 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -5.5 (SiMe), 13.6 (CH<sub>2</sub>Si), 14.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.4 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 26.4 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHMe<sub>2</sub>), 27.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 30.4 (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 43.9 (NHMe<sub>2</sub>), 57.5 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHMe<sub>2</sub>), 49.1 (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 51.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>), 122.1 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 132.9 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ 8.00 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), -144.56 (PF<sub>6</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):** δ 3.04 (SiMe). C<sub>144</sub>H<sub>294</sub>F<sub>108</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>21</sub>S<sub>12</sub>Si<sub>6</sub> (5671.57 g/mol).

**{G<sub>0</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)G<sub>1</sub>CBS(SiNHMe<sub>2</sub>)<sub>12</sub>(PF<sub>6</sub>)<sub>18</sub>} (49)**

Se obtiene el dendrímero **49** siguiendo el **protocolo 8**. Sólido amarillo (0.029 g, 80%).

**Datos:** Dendrímero **44** (0.025 g, 0.006 mmoles), disolución saturada NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (2.5 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.22 (s, 18 H, SiMe), -0.09 (s, 72 H, SiMe<sub>2</sub>), 0.45 (m, 84 H, CH<sub>2</sub>Si), 1.23 (m, 36 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.61 (m, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 2.63 (m, 72 H, NMe<sub>2</sub>.HCl), 3.00 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>.HCl), 3.87 (m, 12 H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.23 (m, 12 H, NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 6.92 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.44 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -4.1 (SiMe), -3.5 (SiMe<sub>2</sub>), 11.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 14.7-20.7 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 22.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 43.9 (NHMe<sub>2</sub>), 49.2 (NHCH<sub>2</sub>), 52.1 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH), 62.0 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 120.6 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.5 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ 9.11 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), -144.56 (PF<sub>6</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):** δ 1.6 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.9 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHMe<sub>2</sub>). C<sub>192</sub>H<sub>414</sub>F<sub>108</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>21</sub>Si<sub>18</sub> (6321.34 g/mol).

**{G<sub>0</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)G<sub>1</sub>CBS(SiNH<sub>3</sub>)<sub>12</sub>(PF<sub>6</sub>)<sub>18</sub>} (50)**

Se obtiene el dendrímero **50** siguiendo el **protocolo 8**. Sólido amarillo (0.030 g, 81%).

**Datos:** Dendrímero **45** (0.025 g, 0.006 mmoles), disolución saturada NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>.

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ 0.03 (s, 90 H, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.52 (m, 84 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH y SiCH<sub>2</sub>), 1.34 (m, 36 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.59 (m, 36 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>), 2.90 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>), 3.05 (s, 12 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.14 (s, 12 H, NCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.07 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.42 (d, 12 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -5.1 (SiMe), -3.5 (SiMe<sub>2</sub>), 11.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 12.3-21.4 (SiCH<sub>2</sub>), 30.5 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 44.1 (CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>), 49.2 (NHCH<sub>2</sub>), 51.8 (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH), 122.1 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 132.8 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>) 136.5 (C<sub>ipso</sub> -O C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 149.5 (C<sub>ipso</sub> -CHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):** δ 1.6 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.9 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ 8.71 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), -144.56 (PF<sub>6</sub>). C<sub>168</sub>H<sub>366</sub>F<sub>108</sub>N<sub>21</sub>O<sub>6</sub>P<sub>21</sub>Si<sub>18</sub> (5984.71 g/mol).

**{G<sub>1c</sub>DBP(CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)G<sub>1</sub>CBS(SNHMe<sub>2</sub>)<sub>24</sub>(PF<sub>6</sub>)<sub>36</sub>} (51)**

Se obtiene el dendrímero **51** siguiendo el **protocolo 8**. Sólido amarillo (29 mg, 88%).

**Datos:** Dendrímero **46** (0.025 g, 0.003 mmoles), disolución saturada NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (2.5 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.01 (s, 36 H, SiMe), 0.57 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.87 (t, 48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.29 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.51 (m, 24 H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.40-2.60 (m, 48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.85 (s, 144 H, NHMe<sub>2</sub> y 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 3.10 (m, 66 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub> y NMe), 3.60 (m, 24 H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.13 (m, 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>CH<sub>2</sub>NH), 6.88 (d, 36 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.13 (d, 36 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, 6 H, HC=N). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -5.4 (SiMe), 13.6 (CH<sub>2</sub>Si), 14.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.5 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 27.6 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 29.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 33.0 (NCH<sub>3</sub>), 33.9 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 45.4 (NMe<sub>2</sub>), 59.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 121.3 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 127.0 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 128.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.28 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 132.1 (C<sub>ipso</sub> -O C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 137.49 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 138.67(CH=N), 149.3 (C<sub>ipso</sub> -CHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 151.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -144.56 (PF<sub>6</sub>), 8.46 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), 62.72 (P=S). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):** δ 3.04 (SiMe). C<sub>336</sub>H<sub>635</sub>F<sub>216</sub>N<sub>51</sub>O<sub>18</sub>P<sub>45</sub>S<sub>30</sub>Si<sub>12</sub> (12474.4 g/mol).

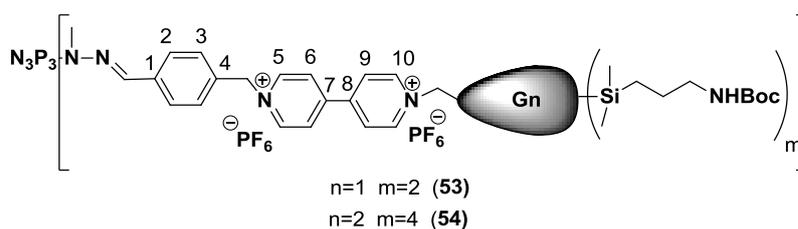
**{G<sub>1</sub>DBP(P-O)G<sub>1</sub>CBS(SNHMe<sub>2</sub>)<sub>24</sub>(PF<sub>6</sub>)<sub>24</sub>} (52)**

Se obtiene el dendrímero **52** siguiendo el **protocolo 8**. Sólido amarillo (27 mg, 82%).

**Datos:** Dendrímero **47** (0.025 g, 0.003 mmoles), disolución saturada NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (2.5 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ 0.07 (s, 36 H, SiMe), 0.65 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.93 (t, 48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.45 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.73 (m, 24 H, O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 2.61 (m, 48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.80 (s, 144 H, NHMe<sub>2</sub>; 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>; 24 H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.20 (m, 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 3.31 (18 H, NMe), 3.90 (m, 24 H, O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 6.85 (d, 24 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.10 (d, 36 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 7.74 (m, 18 H, C<sub>6</sub>H<sub>4</sub> y CH=N). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -5.3 (SiMe), 13.0 (CH<sub>2</sub>Si), 14.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 20.0 (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 27.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 29.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 32.7 (NCH<sub>3</sub>), 33.9 (NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 45.4 (NMe<sub>2</sub>), 59.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 121.3 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 127.0 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 128.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 129.28 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 132.1 (C<sub>ipso</sub>-O C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 137.49 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 138.67(CH=N), 149.3 (C<sub>ipso</sub>-CHC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>), 151.2 (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>). **RMN-<sup>31</sup>P {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ 8.48 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):** δ 3.04 (SiMe). C<sub>327</sub>H<sub>599</sub>F<sub>144</sub>N<sub>39</sub>O<sub>30</sub>P<sub>33</sub>S<sub>30</sub>Si<sub>12</sub> (1061.44 g/mol).

**6.4.2.9 Síntesis y caracterización sistemas híbridos neutros fósforo-viologen-carbosilano (53-54)**



**[[N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>[(Viologen)G<sub>1</sub>CBS(SiNHBoc)<sub>2</sub>]<sub>6</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>12</sub>] (53)**

Sobre una disolución del compuesto **28** (350 mg, 0.296 mmol) en acetonitrilo (4 mL) fue añadida otra disolución de N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>[N(Me)NH<sub>2</sub>] (**VI**)<sup>11</sup> (0.020 g, 0.048 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante a 30°C durante 48 horas. Una vez completada la reacción, el disolvente

es eliminado a vacío, obteniéndose el compuesto **53** como un sólido amarillo (360 mg, 99%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):**  $\delta$  -0.02 (s, 90 H, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.50 (t, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 0.58-0.64 (m, 60 H, SiCH<sub>2</sub>) 1.33-1.49 (m, 168 H, CH<sub>2</sub> y -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.04 (t, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.95-3.02 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH), 3.30 (s, 18 H, CH<sub>3</sub>), 4.63 (t, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 5.31 (sa, 12 H, NH), 5.82 (s, 12 H, CH<sub>2</sub>), 7.47 (d, 12 H, H<sup>3</sup>), 7.72 (d, 12 H, H<sup>2</sup>), 7.72 (s, 6 H, CH=N), 8.40 (d, 24 H, H<sup>6</sup> y H<sup>9</sup>), 8.93 (d, 12 H, H<sup>5</sup>), 8.98 (d, 12 H, H<sup>10</sup>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):**  $\delta$  -5.8 (MeSi), -4.1 (SiMe<sub>2</sub>), 11.9 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 13.2-24.4 (SiCH<sub>2</sub>), 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.9, 31.9 (2d, N-CH<sub>3</sub>), 34.9 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 43.4 (CH<sub>2</sub>NH), 61.9 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 64.4 (CH<sub>2</sub>), 77.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.1 (C<sup>2</sup>), 127.2, 127.4 (C<sup>9</sup> y C<sup>6</sup>), 129.9 (C<sup>3</sup>), 136.2, 136.3 (2d, CH=N), 137.9 (C<sup>1</sup>), 139.1 (C<sup>4</sup>), 145.6 (C<sup>10</sup> y C<sup>5</sup>), 149.7, 150.2 (C<sup>7</sup> y C<sup>8</sup>), 155.9 (CO, Boc). **RMN-<sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>CN):**  $\delta$  -144.62 (h, PF<sub>6</sub>), 17.14 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):**  $\delta$  1.76 (SiMe), 1.81 (SiMe<sub>2</sub>). **Anal.Calcd.** C<sub>300</sub>H<sub>510</sub>F<sub>72</sub>N<sub>39</sub>O<sub>24</sub>P<sub>15</sub>Si<sub>18</sub> (7385.54 g.mol<sup>-1</sup>): C, 48.79; H, 6.96; N, 7.40. Exp.: C, 48.32; H, 6.68 N, 7.56.

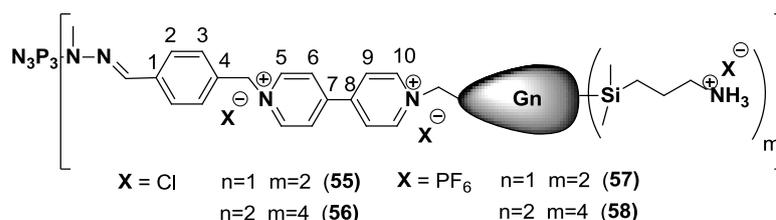
#### [{N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>[(Viológeno)G<sub>2</sub>CBS(SiNHBoc)<sub>4</sub>]<sub>6</sub>](PF<sub>6</sub>)<sub>12</sub>] (**54**)

Se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **53** pero partiendo del compuesto **29** (358 mg, 0.191 mmol) y N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>[N(Me)NH<sub>2</sub>] (**VI**)<sup>11</sup> (0.012 g, 0.031 mmol). El compuesto **54** se obtiene como un sólido amarillo (350 mg, 99%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):**  $\delta$  -0.05, -0.02 (s, 198 H, MeSi y SiMe<sub>2</sub>), 0.47 (t, 48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 0.57-0.62 (m, 168 H, SiCH<sub>2</sub>) 1.31-1.47 (m, 336 H, CH<sub>2</sub> y -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.04 (t, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.30 (s, 18 H, CH<sub>3</sub>), 2.95-3.02 (m, 48 H, CH<sub>2</sub>NH), 4.62 (t, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 5.34 (sa, 24 H, NH), 5.83 (s, 12 H, CH<sub>2</sub>), 7.48 (d, 12 H, H<sup>3</sup>), 7.72 (d, 12 H, H<sup>2</sup>), 7.72 (s, 6 H, CH=N), 8.41 (d, 24 H, H<sup>6</sup> y H<sup>9</sup>), 8.93 (d, 12 H, H<sup>5</sup>), 8.99 (d, 12 H, H<sup>10</sup>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):**  $\delta$  -5.8 (MeSi), -4.1 (SiMe<sub>2</sub>), 11.9 (t, 4H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 13.2-24.3 (SiCH<sub>2</sub>), 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.9 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 43.4 (CH<sub>2</sub>NH), 61.7 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 63.5 (CH<sub>2</sub>), 77.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 127.2, 127.4 (C<sup>6</sup> y C<sup>9</sup>), 130.1 (C<sup>3</sup>), 130.3 (C<sup>2</sup>), 136.2, 136.3 (2d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 10.0 Hz, CH=N), 137.3 (C<sup>1</sup>), 139.1 (C<sup>4</sup>), 145.8 (C<sup>10</sup>), 149.2 (C<sup>5</sup>), 149.5 (C<sup>8</sup>), 150.2 (C<sup>7</sup>),

155.9 (CO, Boc), 192.2 (CHO). **RMN-<sup>31</sup>P** (CD<sub>3</sub>CN): δ 17.17 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>), -144.60 (h, PF<sub>6</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CD<sub>3</sub>CN): δ 0.97 (MeSi), 1.82 (SiMe<sub>2</sub> y SiMe). **Anal.Calcd.** C<sub>504</sub>H<sub>954</sub>F<sub>72</sub>N<sub>51</sub>O<sub>48</sub>P<sub>15</sub>Si<sub>42</sub> (11521.2 g/mol): C, 52.60; H, 8.35; N, 6.21; Exp.: C, 52.30; H, 7.95 N, 6.18.

#### 6.4.2.9 Síntesis y caracterización sistemas híbridos catiónicos fósforo-viologen-carbosilano (55-58)



#### [{N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>[(Viológeno)G<sub>1</sub>CBS(SiNH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>6</sub>}(Cl)<sub>24</sub>] (55)

Se obtiene el dendrímero **55** siguiendo el **protocolo 7**. Sólido amarillo (200 mg, 78%).

**Datos:** Dendrímero **53** (360 mg, 0.049 mmol), disolución de TFA al 20% en DCM (2 mL), disolución saturada <sup>t</sup>Bu<sub>4</sub>NCl (2.5 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CD<sub>3</sub>OD): δ 0.03 (s, 90 H, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.60 (m, 84 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH y SiCH<sub>2</sub>), 1.41 (m, 36 H, CH<sub>2</sub>), 1.66 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>), 2.11 (m, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.90 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH), 3.31 (s, 18 H, CH<sub>3</sub> solapado con la señal del metanol), 4, 74 (t, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 5.93 (s, 12 H, CH<sub>2</sub>), 7.51 (m, 12 H, H<sup>3</sup>), 7.78 (m, 18 H, H<sup>2</sup> and CH=N), 8.65 (m, 24 H, H<sup>6</sup> y H<sup>9</sup>), 9.27 (m, 24 H, H<sup>5</sup> y H<sup>10</sup>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** (CD<sub>3</sub>OD): δ -5.1 (SiMe), -3.4 (SiMe<sub>2</sub>), 13.0-24.8 (SiCH<sub>2</sub>), 36.7 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 43.7 (CH<sub>2</sub>NH), 59.5 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 63.0 (CH<sub>2</sub>), 128.4 (C<sup>2</sup>), 128.6 (C<sup>9</sup> y C<sup>6</sup>), 130.7 (C<sup>3</sup>), 131.6 (C<sup>1</sup>), 134.6 (C<sup>4</sup>), 147.1, 145.6 (C<sup>10</sup> y C<sup>5</sup>), 151.0, 151.8 (C<sup>7</sup> y C<sup>8</sup>). **RMN-<sup>31</sup>P** (CD<sub>3</sub>OD): δ 18.12 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **Anal.Calcd.** C<sub>240</sub>Cl<sub>24</sub>H<sub>426</sub>N<sub>39</sub>P<sub>3</sub>Si<sub>18</sub> (5307.54 g/mol): C, 54.31; H, 8.09; N, 10.29. Exp.: C, 53.78; H, 8.17 N, 10.15.

**[{N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>[(Viológeno)G<sub>2</sub>CBS(SiNH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sub>6</sub>}(Cl)<sub>36</sub>] (56)**

Se obtiene el dendrímero **56** siguiendo el **protocolo 7**. Sólido amarillo (0.210 mg, 80%).

**Datos:** Dendrímero **54** (0.350, 0.030 mmol), disolución de TFA al 20% en DCM (2 mL), disolución saturada <sup>t</sup>Bu<sub>4</sub>NCl (2.5 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD):** δ 0.03 (s, 198 H, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.60 (m, 196 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH y SiCH<sub>2</sub>), 1.40 (m, 92 H, CH<sub>2</sub>), 1.66 (m, 48 H, CH<sub>2</sub>), 2.07 (m, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.90 (m, 48 H, CH<sub>2</sub>NH), 3.31 (s, 18 H, CH<sub>3</sub> solapado con la señal del metanol), 4.74 (12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 5.93 (s, 12 H, CH<sub>2</sub>), 7.50 (m, 12 H, H<sup>3</sup>), 7.78 (m, 18 H, H<sup>2</sup> y CH=N), 8.65 (m, 24 H, H<sup>6</sup> y H<sup>9</sup>), 9.27 (m, 24 H, H<sup>5</sup> y H<sup>10</sup>). **<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>OD):** δ -5.7 (SiMe), -4.7 (SiMe<sub>2</sub>), 11.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 12.6-21.9 (SiCH<sub>2</sub>), 36.2 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 42.3 (CH<sub>2</sub>NH), 62.6 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 64.5 (CH<sub>2</sub>), 127.0 (C<sup>2</sup>), 127.2, 127.7 (C<sup>9</sup> y C<sup>6</sup>), 129.7 (C<sup>3</sup>), 132.9 (C<sup>1</sup>), 137.7 (C<sup>4</sup>), 145.4, 145.6 (C<sup>10</sup> y C<sup>5</sup>), 149.7, 150.4 (C<sup>7</sup> y C<sup>8</sup>). **RMN-<sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>OD):** δ 16.42 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **Anal.Calcd.** C<sub>384</sub>H<sub>785</sub>Cl<sub>36</sub>N<sub>51</sub>P<sub>3</sub>Si<sub>42</sub> (8666.50 g/mol): C, 53.22; H, 9.13; N, 8.24. **Exp.:** C, 52.93; H, 9.42; N, 7.94.

**[{N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>[(Viológeno)G<sub>1</sub>CBS(SiNH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sub>6</sub>}(PF<sub>6</sub>)<sub>24</sub>] (57)**

Se obtiene el dendrímero **57** siguiendo el **protocolo 8**. Sólido amarillo (0.052 g, 86%).

**Datos:** Dendrímero **55** (0.040 g, 0.008 mmol), disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (2 mL).

**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.01 (s, 90 H, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.52 (t, 24 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 0.59-0.65 (m, 60 H, SiCH<sub>2</sub>), 1.26-1.44 (m, 36 H, CH<sub>2</sub>), 1.55-1.66 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>), 2.04 (t, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.91-2.96 (m, 24 H, CH<sub>2</sub>NH), 3.31 (s, 18 H, CH<sub>3</sub>), 4.63 (t, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 5.81 (s, 12 H, CH<sub>2</sub>), 7.46 (d, 12 H, H<sup>3</sup>), 7.72 (d, 12 H, H<sup>2</sup>), 7.73 (s, 6 H, CH=N), 8.40 (d, 24 H, H<sup>6</sup> y H<sup>9</sup>), 8.91 (d, 12 H, H<sup>5</sup>), 8.96 (d, 12 H, H<sup>10</sup>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -6.1 (SiMe), -4.5 (SiMe<sub>2</sub>), 11.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 13.0-21.4 (SiCH<sub>2</sub>), 34.9 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 42.9 (CH<sub>2</sub>NH), 61.8 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 64.3 (CH<sub>2</sub>), 127.1 (C<sup>2</sup>), 127.2, 127.3 (C<sup>9</sup> y C<sup>6</sup>), 129.8

(C<sup>3</sup>), 132.1 (C<sup>1</sup>), 136.2, 136.3 (2d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 10.0 Hz, CH=N), 137.8 (C<sup>4</sup>), 145.4, 145.5 (C<sup>10</sup> y C<sup>5</sup>), 149.7, 150.4 (C<sup>7</sup> y C<sup>8</sup>). **RMN-<sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>CN):** δ -144.62 (h, PF<sub>6</sub>), 17.19 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):** δ 1.75 (SiMe), 2.09 (SiMe<sub>2</sub>).

**[{N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>[(Viológeno)G<sub>2</sub>CBS(SiNH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sub>6</sub>}(PF<sub>6</sub>)<sub>36</sub>] (58)**

Se obtiene el dendrímero **58** siguiendo el **protocolo 8**. Sólido amarillo (0.060 g, 83%).

**Datos:** Dendrímero **56** (0.050 mg, 0.006 mmol), disolución acuosa saturada de NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> (2 mL).

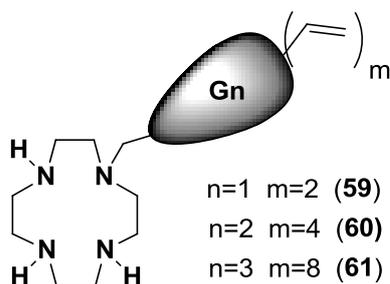
**RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>CN):** δ -0.03 (s, 198 H, SiMe y SiMe<sub>2</sub>), 0.52 (t, 48 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 0.58-0.62 (m, 148 H, SiCH<sub>2</sub>), 1.31-1.46 (m, 92 H, CH<sub>2</sub>), 1.58-1.66 (m, 48 H, CH<sub>2</sub>), 2.04 (t, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.92-2.96 (m, 48 H, CH<sub>2</sub>NH), 3.31 (s, 18 H, CH<sub>3</sub>), 4.60 (t, 12 H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 5.80 (s, 12 H, CH<sub>2</sub>), 7.46 (d, 12 H, H<sup>3</sup>), 7.73 (d, 12 H, H<sup>2</sup>), 7.73 (s, 6 H, CH=N), 8.40 (d, 24 H, H<sup>6</sup> y H<sup>9</sup>), 8.91 (d, 12 H, H<sup>5</sup>), 8.96 (d, 12 H, H<sup>10</sup>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CD<sub>3</sub>CN):** δ -5.7 (SiMe), -4.4 (SiMe<sub>2</sub>), 11.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH), 13.4-21.4 (SiCH<sub>2</sub>), 35.1 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 43.2 (CH<sub>2</sub>NH), 61.9 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 64.2 (CH<sub>2</sub>), 127.0 (C<sup>2</sup>), 127.3, 127.2 (C<sup>9</sup> y C<sup>6</sup>), 129.7 (C<sup>3</sup>), 132.1 (C<sup>1</sup>), 136.2, 136.3 (2d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub>=10.0 Hz, CH=N), 137.8 (C<sup>4</sup>), 145.4, 145.6 (C<sup>10</sup> y C<sup>5</sup>), 149.8, 150.5 (C<sup>7</sup> y C<sup>8</sup>). **RMN-<sup>31</sup>P (CD<sub>3</sub>CN):** δ -144.62 (h, PF<sub>6</sub>), 17.19 (N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CD<sub>3</sub>CN):** δ 0.97 (SiMe), 2.10 (SiMe<sub>2</sub>).

## CAPÍTULO 4

### 6.4.2.10 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano (Cyclen)G<sub>n</sub>V<sub>m</sub> (59-61)

Una disolución en cloroformo del correspondiente dendrón BrG<sub>n</sub>V<sub>m</sub> y NEt<sub>3</sub> se añade lentamente sobre otra disolución de ciclen en CHCl<sub>3</sub> (seco). Finalizada la adicción, la reacción se deja bajo agitación constante durante toda la noche a 60°C. Una vez completada la reacción, se evapora la disolución hasta sequedad y el crudo de reacción se purifica mediante una extracción Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (1:1), la fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub> y la disolución resultante se evapora a vacío. Para

obtener la monosustitución como único producto se utilizó la cromatografía por exclusión de tamaños en THF.



### (Cyclen)G<sub>1</sub>V<sub>2</sub> (59)

**Datos:** Dendrón BrG<sub>1</sub>V<sub>2</sub> (XIII)<sup>9</sup> (600 mg, 2.57 mmoles), NEt<sub>3</sub> (0.43 mL, 3.10 mmoles) y ciclen (1.32 g, 7.72 mmoles). Aceite amarillento (0.550 g, 66%).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.10 (s, 3 H, SiMeC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 0.62 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>SiC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 1.33 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.50 (m, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.35-2.75 (m, 18 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 5.70 (m, 2 H, SiCHCH<sub>2</sub>), 6.16 (m, 4 H, SiCHCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>): δ -5.4 (MeSi), 13.9 (CH<sub>2</sub>Si), 21.7 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si) 31.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.2-51.6 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 54.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 132.7 (SiCHCH<sub>2</sub>), 137.1 (SiCHCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>15</sup>N** (CDCl<sub>3</sub>): δ 20.5 (NH), 28.7 (NCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ -12.9 (SiMeC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>). **HPLC-MS** (crudo de reacción): 78% mono: 22% disustitución. **MS:** [M+H]<sup>+</sup> = 325.23 uma (calcd. = 325.58 uma). C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>Si (324.58 g/mol).

### (Cyclen)G<sub>2</sub>V<sub>4</sub> (60)

**Datos:** Dendrón BrG<sub>2</sub>V<sub>4</sub> (XIV)<sup>9</sup> (500 mg, 1.09 mmoles), NEt<sub>3</sub> (0.18 mL, 1.29 mmoles) y ciclen (376 mg, 2.18 mmoles). Aceite amarillento (450 mg, 75%).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ -0.13 (s, 3 H, SiMe), 0.09 (s, 6 H, SiMeC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 0.46-0.56 (m, 6 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.66 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>SiC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 1.21-1.42 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si and NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.36-2.76 (m, 18 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 5.65 (m, 4 H, SiCHCH<sub>2</sub>), 6.06 (m, 8 H, SiCHCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>): -5.1 y 5.2 (MeSi), 13.9 (SiCH<sub>2</sub>), 18.2 y 18.7 (CH<sub>2</sub>), 21.7 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 31.2

(NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.15-51.19 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 54.3 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 132.6 (SiCHCH<sub>2</sub>), 137.0 (SiCHCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>15</sup>N (CDCl<sub>3</sub>):** δ 20.5 (NH), 28.7 (NCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.7 (SiMe), -13.5 (SiCHCH<sub>2</sub>). **HPLC-MS** (crudo de reacción): 85% mono: 15% disustitución. **MS:** [M+H]<sup>+</sup> = 549.42 uma (calcd. = 549.41 uma). C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>N<sub>4</sub>Si<sub>3</sub> (549.07 g/mol).

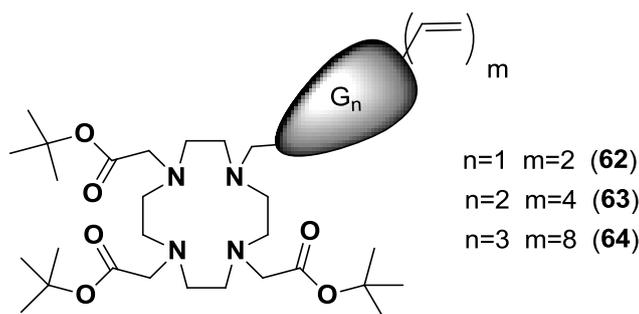
### (Cyclen)G<sub>3</sub>V<sub>8</sub> (61)

**Datos:** Dendrón BrG<sub>3</sub>V<sub>8</sub> (XV)<sup>9</sup> (1 g, 1.10 mmoles), NEt<sub>3</sub> (0.18 mL, 1.29 mmoles) y ciclen (570 mg, 3.31 mmoles). Aceite amarillento (850 mg, 85%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.12 (s, 9 H, SiMe), 0.10 (s, 12 H, SiMeC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 0.47-0.52 (m, 18 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.68 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>SiC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 1.24-1.40 (m, 16 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.40-2.88 (m, 18 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N y NCH<sub>2</sub>), 5.67 (m, 8 H, SiCHCH<sub>2</sub>), 6.02 (m, 16 H, SiCHCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.8, -5.1 y -4.9 (MeSi), 14.0 (SiCH<sub>2</sub>), 18.0-18.4 (CH<sub>2</sub>), 21.7 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si) 31.5 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.10-51.19 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 54.3 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 132.7 (SiCHCH<sub>2</sub>), 137.2 (SiCHCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.1 (SiMe), -13.5 (SiCHCH<sub>2</sub>). **MS:** [M+H]<sup>+</sup> = 997.70 uma (calcd. = 997.70 uma). C<sub>53</sub>H<sub>108</sub>N<sub>4</sub>Si<sub>7</sub> (998.05 g/mol).

#### 6.4.2.11 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>n</sub>V<sub>m</sub> (62-64)

Sobre una disolución en acetonitrilo (10 mL) del correspondiente compuesto (Cyclen)G<sub>n</sub>V<sub>m</sub>, se añade *tert*-butil bromoacetato y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La mezcla de reacción se mantiene en agitación constante a 60°C durante 48 horas. Una vez completada la reacción, se evapora la disolución hasta sequedad y el crudo se extrae en una mezcla Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O. La fase orgánica se lava con agua saturada de NaCl, se seca con MgSO<sub>4</sub>, la disolución se filtra y el disolvente se evapora a vacío. El producto se purifica mediante cromatografía por exclusión de tamaños en THF.



### [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>1</sub>V<sub>2</sub> (62)

**Datos:** Dendrón **59** (0.500 g, 1.54 mmol), *tert*-butil bromoacetato (0.73 mL, 4.95 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.28 g, 9.22 mmoles). Aceite marrón (0.710 g, 69%).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.10 (s, 3 H, SiMeC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 0.63 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>SiC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 1.32 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.38 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.67 (m, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.6-3.73 (m, 22 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N y NCH<sub>2</sub>COO), 3.68 (m, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.70 (m, 2 H, SiCHCH<sub>2</sub>), 6.16 (m, 4 H, SiCHCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>): δ -5.5 (MeSi), 13.9 (SiCH<sub>2</sub>), 21.0 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 47.5-60.3 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 81.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 133.3 (SiCHCH<sub>2</sub>), 136.2 (SiCHCH<sub>2</sub>), 170.15, 170.6 (COO). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ -13.0 (SiMeC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>). **Anal.Calc.** C<sub>35</sub>H<sub>66</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si (667.01 g/mol) (KBr): C, 53.48; H, 8.46; N, 7.13. Exp.: C, 54.96; H, 9.34; N, 7.13. **MS:** [M+H]<sup>+</sup> = 667.48 uma (calcd. = 667.48 uma).

### [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>2</sub>V<sub>4</sub> (63)

**Datos:** Dendrón **60** (300 mg, 0.546 mmoles), *tert*-butil bromoacetato (0.28 mL, 1.89 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.377 g, 2.72 mmoles). Aceite marrón (370 mg, 75%).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ -0.13 (s, 3 H, SiMe), 0.09 (s, 6 H, SiMeC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 0.50 (m, 6 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.67 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>SiC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 1.29 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.47 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.6-3.7 (m, 22 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N and NCH<sub>2</sub>COO), 3.68 (m, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.65 (m, 4 H, SiCHCH<sub>2</sub>), 6.05 (m, 8 H, SiCHCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>): δ -5.3 (MeSi), 14.0 (SiCH<sub>2</sub>), 18.3 (CH<sub>2</sub>), 21.0 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 22.3 (CH<sub>2</sub>), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 33.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 48.7-59.0 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 81.7

( $C(CH_3)_3$ ), 132.8 (SiCHCH<sub>2</sub>), 136.7 (SiCHCH<sub>2</sub>), 170.4, 170.6 (COO). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.8 (SiMe), -13.5 (SiCHCH<sub>2</sub>). **Anal.Calc.** C<sub>47</sub>H<sub>90</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>3</sub> (891.50 g/mol) (KBr): C, 55.86; H, 8.98; N, 5.54. Exp.: C, 55.32; H, 9.16; N, 4.99. **MS:** [M+Na]<sup>+</sup> = 913.62 uma (calcd. = 913.62 uma).

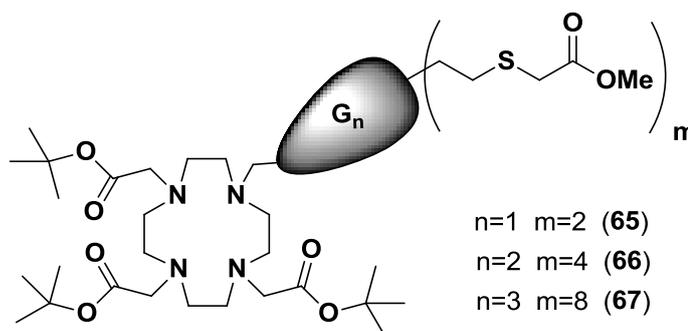
### [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>3</sub>V<sub>8</sub> (64)

**Datos:** Dendrón **61** (500 mg, 0.501 mmoles), *tert*-butil bromoacetato (0.25 mL, 1.71 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.311 g, 2.25 mmoles). Aceite marrón (520 mg, 78%).

**RMN-<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>): δ -0.12 (s, 9 H, SiMe), 0.10 (s, 12 H, SiMeC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 0.52 (m, 18 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.68 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>SiC<sub>2</sub>H<sub>3</sub>), 1.21-1.41 (m, 16 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.44 (s, 27 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.6-3.71 (m, 22 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N y NCH<sub>2</sub>COO), 3.68 (m, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.65 (m, 8 H, SiCHCH<sub>2</sub>), 6.06 (m, 16 H, SiCHCH<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>): δ -5.9 (MeSi), 13.7 (SiCH<sub>2</sub>), 18.2 y 18.5 (CH<sub>2</sub>), 21.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 21.7 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 35.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 51.2-45.1 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 54.9 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 84.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 113.0 (SiCHCH<sub>2</sub>), 134.8 (SiCHCH<sub>2</sub>), 170.15, 170.6 (COO). **RMN-<sup>29</sup>Si** (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.1 y 1.6 (SiMe), -13.5 (SiCHCH<sub>2</sub>). **Anal.Calc.** C<sub>71</sub>H<sub>138</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Si (1340.48 g/mol): C, 58.43; H, 9.53; N, 3.84. Exp.: C, 58.93; H, 9.50; N, 3.38. **MS:** [M+H]<sup>+</sup> = 1339.91 uma (calcd. = 1339.90 uma).

### 6.4.2.12 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>n</sub>(SCOOMe)<sub>m</sub> (65-67)

Se obtienen los dendrones siguiendo el **protocolo 1b**, pero es necesario en este caso la adición de fotoiniciador.



**[DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>1</sub>(SCOOMe)<sub>2</sub> (65)**

**Datos:** Dendrón **62** (0.400 g, 0.600 mmol), HSCH<sub>2</sub>COOMe (0.11 mL, 1.21 mmol) y DMPA (0.032 g, 0.125 mmol). Aceite marrón (0.420 g, 80%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.01 (s, 3 H, SiMe), 0.59 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.88 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.29 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.43 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.45 (m, 11 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.90-3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.63 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.22 (s, 4 H, SCH<sub>2</sub>COOMe), 3.71 (s, 6 H, SCH<sub>2</sub>COOMe). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.4 (MeSi), 13.6 (SiCH<sub>2</sub> y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 20.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 28.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 33.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y SCH<sub>2</sub>COOMe), 52.4 (SCH<sub>2</sub>COOMe), 81.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.9 (COOMe). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.1 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>41</sub>H<sub>78</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>Si (878.29 g/mol) (KBr): C, 49.33; H, 7.88; N, 5.61; S, 6.42. Exp.: C, 50.20; H, 7.27; N, 4.48; S, 6.58. **MS:** [M+H]<sup>+</sup> = 879.50 uma (calcd. = 879.49 uma).

**[DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>2</sub>(SCOOMe)<sub>4</sub> (66)**

**Datos:** Dendrón **63** (0.450 g, 0.505 mmoles), HSCH<sub>2</sub>COOMe (0.21 mL, 2.31 mmol) y DMPA (0.058 g, 0.226 mmol). Aceite marrón (500 mg, 75%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.10 (s, 3 H, SiMe), 0.01 (s, 6 H, SiMe), 0.55 (m, 10 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.88 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.28 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 27 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.90-3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.63 (m, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.22 (s, 8 H, SCH<sub>2</sub>COOMe), 3.70 (s, 12 H, SCH<sub>2</sub>COOMe). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.4 (MeSi), 13.9 (SiCH<sub>2</sub> y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 18.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 33.3 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si and SCH<sub>2</sub>COOMe), 58.7 (SCH<sub>2</sub>COOMe), 81.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.9 (COOMe). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.65 (SiMe), 2.37 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>59</sub>H<sub>114</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>Si<sub>3</sub>.KBr (1314.65 g/mol): C, 49.38; H, 8.01; N, 3.90; S, 8.94. Exp.: C, 48.72; H, 7.64; N, 3.94. **MS:** [M+H]<sup>+</sup> = 1315.66 uma (calcd. = 1315.65 uma).

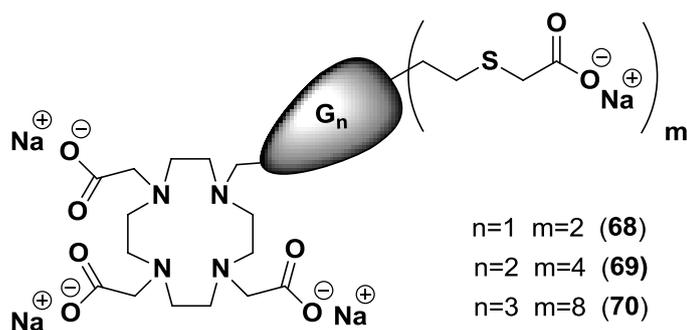
**[DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>3</sub>(SCOOMe)<sub>8</sub> (67)**

**Datos:** Dendrón **64** (0.200 g, 0.149 mmoles), HSCH<sub>2</sub>COOMe (0.12 mL, 1.32 mmol) y DMPA (0.030 g, 0.117 mmol). Aceite marrón (0.260 g, 80%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.07 (s, 9 H, SiMe), 0.06 (s, 12 H, SiMe), 0.54 (m, 26 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.91 (t, 16 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.27 (m, 18 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 27 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.66 (t, 16 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.24 (s, 16 H, SCH<sub>2</sub>COOMe), 3.73 (s, 24 H, SCH<sub>2</sub>COOMe). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.4 y -5.1 (MeSi), 13.9-18.8 (SiCH<sub>2</sub> y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 28.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 36.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 33.2 (SCH<sub>2</sub>COOMe), 52.3 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 170.9 (COOMe). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.0 y 1.5 (SiMe), 2.40 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>95</sub>H<sub>186</sub>N<sub>4</sub>O<sub>22</sub>S<sub>8</sub>Si<sub>7</sub>.KBr (2189.63 g/mol): C, 49.42; H, 8.12; N, 2.43; S, 11.11. Exp.: C, 49.68; H, 7.63; N, 1.97; S, 11.46.

**6.4.2.13 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano DO3AG<sub>n</sub>(SCOONa)<sub>m</sub> (68-70)**

Se obtienen los dendrones siguiendo el **protocolo 4**, pero es necesario añadir más equivalentes de NaOH para desproteger también los del grupo DO3A.



**DO3AG<sub>1</sub>(SCOONa)<sub>2</sub> (68)**

Se sigue el mismo procedimiento sintético, pero debido al pequeño tamaño su purificación debe ser diferente, debe ser purificado mediante cromatografía por exclusión de tamaños en agua (sephadex).

**Datos:** Dendrón **65** (0.150 g, 0.171 mmol), NaOH (0.068 g, 1.71 mmol). Sólido amarillo (0.075 g, 56%).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.09 (s, 3 H, SiMe), 0.51 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.81 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.28 (m, 4 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.90–3.80 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.51 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.06 (s, 4 H, SCH<sub>2</sub>COONa). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ -5.2 (MeSi), 13.5 (SiCH<sub>2</sub>), 14.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 29.6 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 28.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 37.9 (SCH<sub>2</sub>COONa), 47.6-57.1 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 57.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 179.4 y 179.8 (COONa). **RMN-<sup>29</sup>Si (D<sub>2</sub>O):** δ 2.65 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>5</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>Si (792.83 g/mol): C, 40.90; H, 5.72; N, 7.07; S, 8.09. Exp.: C, 40.27; H, 5.08; N, 6.98, S, 8.05.

#### DO3AG<sub>2</sub>(SCOONa)<sub>4</sub> (**69**)

**Datos:** Dendrón **66** (0.300 g, 0.228 mmoles), NaOH (0.127 g, 3.17 mmol). Sólido amarillo (0.215 g, 76%).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.14 (s, 3 H, SiMe), -0.06 (s, 6 H, SiMe), 0.55 (m, 10 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.84 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.28 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.90–3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.53 (m, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 3.12 (s, 8 H, SCH<sub>2</sub>COONa). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** -5.4 y 5.1 (MeSi), 14.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 12.2-20.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 21.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 28.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 37.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.1-63.1 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 55.5 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 178.8 (COONa). **RMN-<sup>29</sup>Si (D<sub>2</sub>O):** δ 1.59 (SiMe), 2.13 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>43</sub>H<sub>75</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>7</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>Si<sub>3</sub>Na (1245.52 g/mol): C, 40.71; H, 5.96; N, 4.42; S, 10.11. Exp.: C, 40.41; H, 6.02; N, 3.59; S, 11.71.

#### DO3AG<sub>3</sub>(SCOONa)<sub>8</sub> (**70**)

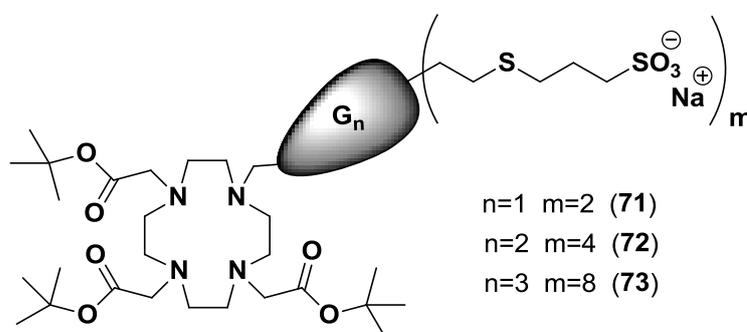
**Datos:** Dendrón **67** (0.150 g, 0.068 mmoles), NaOH (0.060 g, 1.50 mmol). Sólido amarillo (0.105 g, 71%).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.11 (s, 3 H, SiMe), -0.05 (s, 6 H, SiMe), 0.54 (m, 10 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.83 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.30 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>),

1.90-3.70 (m, 24 H,  $N(CH_2)_3N$ ,  $NCH_2COO$  y  $NCH_2CH_2$ ), 2.53 (m, 8 H,  $SiCH_2CH_2S$ ), 3.11 (s, 8 H,  $SCH_2COONa$ ). **RMN- $^{13}C$  { $^1H$ } ( $D_2O$ ):**  $\delta$  -5.4 y -4.2 ( $MeSi$ ), 13.7-18.3 ( $SiCH_2$  y  $SiCH_2CH_2S$ ), 21.1 ( $NCH_2CH_2CH_2CH_2Si$ ), 29.6 ( $SiCH_2CH_2S$ ), 36.9 ( $SCH_2COONa$ ), 56.4 ( $NCH_2CH_2CH_2CH_2Si$ ), 177.9 ( $COONa$ ). **RMN- $^{29}Si$  ( $D_2O$ ):**  $\delta$  1.1 y 2.1 ( $SiMe$ ), 3.6 ( $SiCH_2CH_2S$ ). **Anal.Calc.**  $C_{75}H_{135}N_4Na_{11}O_{22}S_8Si_7$  (2150.89 g/mol): C, 39.97; H, 6.04; N, 2.49; S, 11.38. Exp.: C, 40.14; H, 6.62; N, 1.69; S, 10.50.

#### 6.4.2.14 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>] $G_n$ (SSO<sub>3</sub>Na)<sub>m</sub> (71-73)

Se obtienen los dendrones siguiendo el **protocolo 1c**.



#### [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>] $G_1$ (SSO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub> (71)

**Datos:** Dendron **62** (0.400 g, 0.600 mmol),  $HS(CH_2)_3SO_3Na$  (0.224 g, 1.26 mmol) y DMPA (33 mg, 0.121 mmol). Este producto tiene problemas de solubilidad, es complicada su purificación, por ello no se aisló. Sólido amarillo (0.300 g).

**RMN- $^1H$  ( $DMSO-d_6$ ):**  $\delta$  0.00 (s, 3 H,  $SiMe$ ), 0.60 (m, 2 H,  $CH_2Si$ ), 0.83 (t, 4 H,  $SiCH_2CH_2S$ ), 1.29 (m, 2 H,  $CH_2CH_2Si$ ), 1.41 (s, 29 H,  $C(CH_3)_3$  y  $NCH_2CH_2$ ), 1.90–3.70 (m, 24 H,  $N(CH_2)_3N$ ,  $NCH_2COO$ ,  $NCH_2CH_2$ ), 1.81 (m, 4 H,  $SCH_2CH_2CH_2SO_3Na$ ), 2.54 (m, 8 H,  $SCH_2CH_2CH_2SO_3Na$  y  $SiCH_2CH_2S$ ), 3.15 (t, 4 H,  $SCH_2CH_2CH_2SO_3Na$ , solapado con la señal del agua).

**[DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>2</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>4</sub> (72)**

**Datos:** Dendrón **63** (0.450 g, 0.505 mmoles), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Na (0.404 g, 2.27 mmol) y DMPA (0.058 g, 0.226 mmol). Sólido amarillo (0.650 g, 80%).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.13 (s, 3 H, SiMe), 0.01 (s, 6 H, SiMe), 0.53 (m, 10 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.87 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.39 (m, 35 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> y C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.90–3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.93 (m, 8 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 2.58 (m, 16 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.84 (s, 8 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ -5.1 (MeSi), 13.1 (SiCH<sub>2</sub>), 14.3 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 18.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 27.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.4 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 26.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 30.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 36.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 50.1 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na) 56.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 81.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 165.4 (COO). **RMN-<sup>29</sup>Si (D<sub>2</sub>O):** δ 1.71 (SiMe), 2.13 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>59</sub>H<sub>118</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>4</sub>O<sub>18</sub>S<sub>8</sub>Si<sub>3</sub>.KBr (1604.32 g/mol): C, 41.52; H, 6.90; N, 3.25; S, 14.89. Exp.: C, 41.59; H, 7.56; N, 2.95; S, 16.93.

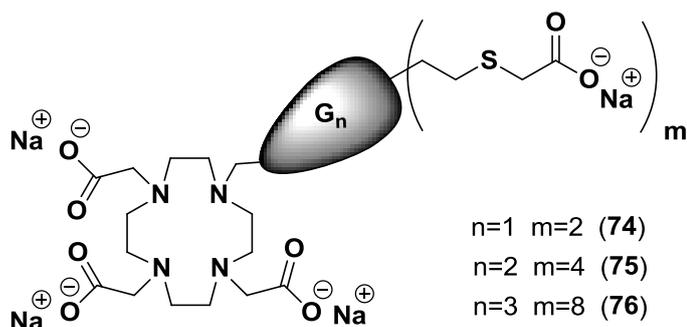
**[DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>3</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>8</sub> (73)**

**Datos:** Dendrón **64** (0.200 g, 0.149 mmoles), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>Na (0.240 g, 1.35 mmol) y DMPA (0.035 g, 0.136 mmol). Sólido amarillo (0.320 g, 78%).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.2 (s, 9 H, SiMe), -0.1 (s, 12 H, SiMe), 0.48 (m, 26 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.78 (t, 16 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.24 (m, 16 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.36 (s, 27 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.86 (m, 16 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 2.46-2.52 (m, 32 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.81 (s, 16 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ -5.2 y -4.6 (MeSi), 13.1 (SiCH<sub>2</sub>), 14.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 24.4 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 26.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 30.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 36.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 49.6 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 170.5 (COO). **RMN-<sup>29</sup>Si (D<sub>2</sub>O):** δ 3.1 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>95</sub>H<sub>194</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>8</sub>O<sub>30</sub>S<sub>16</sub>Si<sub>7</sub>.KBr (2766.12 g/mol): C, 39.76; H, 6.85; N, 1.93; S, 17.69. Exp.: C, 40.04; H, 7.28; N, 1.62; S, 20.22.

### 6.4.2.15 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano DO3AG<sub>n</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>m</sub> (74-76)

Se obtienen los dendrones siguiendo el **protocolo 4**. En este caso, debido a la solubilidad de los precursores, necesitamos una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (2:1) para llevar a cabo la reacción de desprotección.



#### DO3AG<sub>1</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>2</sub> (74)

Se sigue el mismo procedimiento sintético, pero debido al pequeño tamaño su purificación debe ser diferente, debe ser purificado mediante cromatografía por exclusión de tamaños en agua (sephadex).

**Datos:** Dendron **71** (0.150 g, 0.147 mmol), NaOH (0.053 g, 1.32 mmol). Sólido amarillo (0.090 g, 67%).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  -0.06 (s, 3 H, SiMe), 0.55 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.85 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.39 (m, 4 H, CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>SiNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.90–3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.90 (m, 4 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na), 2.57 (m, 8 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na y SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.89 (s, 4 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  -5.2 (MeSi), 13.1 (SiCH<sub>2</sub>), 14.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 29.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 36.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.15-51.19 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 56.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 81.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.5 (COO). **RMN-<sup>29</sup>Si (D<sub>2</sub>O):**  $\delta$  3.1 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S).

**DO3AG<sub>2</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>4</sub> (75)**

**Datos:** Dendrón **72** (0.300 g, 0.187 mmoles), NaOH (0.045 g, 1.12 mmol). Sólido amarillo (0.215 g, 77%).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.10 (s, 3 H, *SiMe*), -0.01 (s, 6 H, *SiMe*), 0.55 (m, 10 H, *CH<sub>2</sub>Si*), 0.85 (t, 8 H, *SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*), 1.31 (m, 8 H, *CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si* y *NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 1.90-3.70 (m, 24 H, *N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N*, *NCH<sub>2</sub>COO*, *NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 1.92 (m, 8 H, *SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na*), 2.59 (m, 16 H, *SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na* y *SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*), 2.87 (s, 8 H, *SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na*). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ -5.2 (*MeSi*), 13.5 (*SiCH<sub>2</sub>*), 14.3 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*), 21.5 (*NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 24.3 (*SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na*), 27.0 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*), 30.1 (*SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na*), 36.8 (*NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 45.15-51.19 (*N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N*), 57.8 (*NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 190.4 (*COO*). **RMN-<sup>29</sup>Si (D<sub>2</sub>O):** δ 1.20 (*SiMe*), 2.12 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*). **Anal.Calc.** C<sub>47</sub>H<sub>91</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>7</sub>O<sub>18</sub>S<sub>8</sub>Si<sub>3</sub> (1501.95 g/mol): C, 37.58; H, 6.11; N, 3.73; S, 17.08. Exp.: C, 37.27; H, 5.08; N, 2.24.

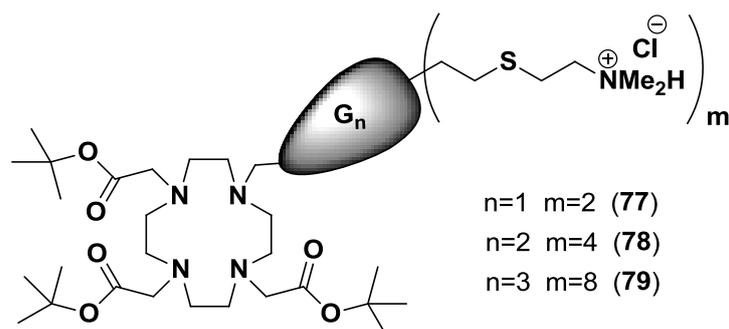
**DO3AG<sub>3</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>8</sub> (76)**

**Datos:** Dendrón **73** (0.150 g, 0.054 mmoles), NaOH (0.013 g, 0.325 mmol). Sólido amarillo (0.100 g, 70%).

**RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O):** δ -0.07 (s, 9 H, *SiMe*), 0.06 (s, 12 H, *SiMe*), 0.54 (m, 26 H, *CH<sub>2</sub>Si*), 0.91 (t, 16 H, *SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*), 1.27 (m, 16 H, *CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si* y *NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 2.51 (t, 16 H, *SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*), 3.22 (s, 16 H, *SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na*), 3.22 (s, 16 H, *SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na*). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (D<sub>2</sub>O):** δ -5.2 (*MeSi*), 13.1 (*SiCH<sub>2</sub>*), 14.5 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*), 21.1 (*NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 29.6 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*), 36.8 (*NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 56.4 (*NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si*), 170.5 (*COO*). **RMN-<sup>29</sup>Si (D<sub>2</sub>O):** 1.1 (*SiMe*), 2.1 (*SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S*). **Anal.Calc.** C<sub>83</sub>H<sub>167</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>11</sub>O<sub>30</sub>S<sub>16</sub>Si<sub>7</sub> (2663.75 g/mol): C, 37.42; H, 6.32; N, 2.10; S, 19.26. Exp.: H, 6.58; N, 1.84 S, 18.62.

#### 6.4.2.16 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>n</sub>(SNMe<sub>2</sub>·HCl)<sub>m</sub> (77-79)

Se obtienen los dendrones siguiendo el **protocolo 1a**.



### [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>1</sub>(SNMe<sub>2</sub>·HCl)<sub>2</sub> (77)

**Datos:** Dendrón **62** (0.500 g, 0.750 mmol), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>·HCl (0.223 g, 1.57 mmol) y DMPA (0.042 g, 0.16 mmol). Este producto es complicado de purificar debido a su tamaño, es más sencillo purificar en el siguiente paso mediante columna por exclusión de tamaños para elevar el rendimiento del proceso (0.370 g, 52%).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 0.03 (s, 3 H, SiMe), 0.59 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.87 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.28 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.41 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.46 (s, 9 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y m, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.90-3.80 (24 H, m, NCH<sub>2</sub>COO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 2.53 (4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.71 (12 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 2.88 (t, 4 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 3.17 (m, 4 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -5.2 (MeSi), 13.1 (SiCH<sub>2</sub>), 14.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 26.9 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 28.2 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.15-51.19 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 42.4 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 42.5 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 56.4 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 67.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 81.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.7 (CO). **RMN-<sup>29</sup>Si (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 3.1 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). C<sub>43</sub>H<sub>90</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>Si (950.33 g/mol).

### [DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>2</sub>(SNMe<sub>2</sub>·HCl)<sub>4</sub> (78)

**Datos:** Dendrón **63** (0.270 g, 0.302 mmoles), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>·HCl (0.193 g, 1.36 mmol) y DMPA (0.018 g, 0.070 mmol). Sólido amarillo (0.323 g, 75%).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ -0.08 (s, 3 H, SiMe), 0.02 (s, 6 H, SiMe), 0.54 (m, 10 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.85 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.27 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.41 (27 H, m, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.90-3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO,

NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.60 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.74 (s, 24 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 2.86 (t, 8 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 3.21 (m, 8H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** (**DMSO-*d*<sub>6</sub>**): δ -5.1 y 4.7 (*MeSi*), 13.1 (SiCH<sub>2</sub>), 14.4 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 25.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 26.9 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 28.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.2 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.15-51.19 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 42.3 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 56.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 67.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 81.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.7 (COO). **RMN-<sup>29</sup>Si (DMSO-*d*<sub>6</sub>)**: δ 1.9 (*SiMe*), 2.6 (*SiCH*<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). C<sub>63</sub>H<sub>138</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub>Si<sub>3</sub> (1458.15 g/mol).

**[DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>3</sub>(SNMe<sub>2</sub>·HCl)<sub>8</sub> (79)**

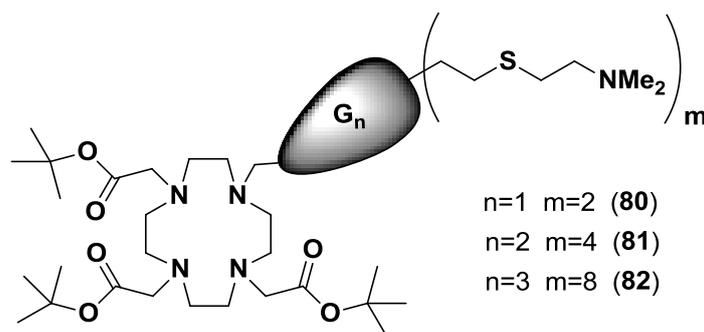
**Datos:** Dendrón **64** (0.450 g, 0.335 mmoles), HS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>·HCl (0.570 g, 4.02 mmol) y DMPA (0.052 g, 0.20 mmol). Sólido amarillo (0.670 g, 81%).

**RMN-<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>)**: δ -0.09 (s, 9 H, *SiMe*), 0.02 (s, 12 H, *SiMe*), 0.50 - 0.66 (m, 26 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.87 (t, 16 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.29 (m, 16 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.42 (27 H, s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.60 (t, 16 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.76 (s, 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 2.88 (t, 16 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 3.16 (t, 16 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H}** (**DMSO-*d*<sub>6</sub>**): δ -5.3 y 4.8 (*MeSi*), 14.1 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 24.6 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 26.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 27.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 31.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 41.7 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 55.7 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 80.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.7 (COO). C<sub>103</sub>H<sub>234</sub>Cl<sub>8</sub>N<sub>12</sub>O<sub>6</sub>S<sub>8</sub>Si<sub>7</sub> (2473.78 g/mol).

**6.4.2.17 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano**

**[DO3A(O<sup>t</sup>Bu)<sub>3</sub>]G<sub>n</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>m</sub> (80-82)**

Se obtienen los dendrones siguiendo el **protocolo 2**.



**[DO3A(OtBu)<sub>3</sub>]G<sub>1</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (80)**

**Datos:** Dendrón **77** (0.300 g, 0.316 mmol), disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 mL). Aceite amarillento (0.255 g, 92%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.04 (s, 3 H, SiMe), 0.55 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.87 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.29 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.42 (s, 18 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.48 (m, 11 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.90–3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.23 (s, 12 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.45 (m, 4 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.48 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.59 (t, 4 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.2 (MeSi), 13.1 (SiCH<sub>2</sub>), 14.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 28.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 36.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.15–51.19 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 45.1 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 52.8 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 56.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 58.8 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 81.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.5 (CO). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 2.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>43</sub>H<sub>88</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>Si.NaCl (877.41 g/mol): C, 55.19; H, 9.48; N, 8.98; S, 6.85; Exp.: C, 56.11.43; H, 8.45, N, 8.08; S, 6.89. **MS:** [M+H]<sup>+</sup> = 877.60 uma (calcd. = 877.60 uma).

**[DO3A(OtBu)<sub>3</sub>]G<sub>2</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>4</sub> (81)**

**Datos:** Dendrón **78** (0.250 g, 0.171 mmoles), disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mL). Aceite amarillento (0.210 g, 93%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):** δ -0.11 (s, 3 H, SiMe), 0.05 (s, 6 H, SiMe), 0.55 (m, 10 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.87 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.21–1.42 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 27 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.90–3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.25 (s, 24 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.48–2.62 (m, 8 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, 8 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):** δ -5.1 y 5.2 (MeSi), 13.9 (SiCH<sub>2</sub>), 14.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 18.4 (CH<sub>2</sub>), 22.5 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 36.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.4 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 56.9 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 56.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 81.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 170.3 y 170.7 (COO). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.6 (SiMe), 2.0 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>63</sub>H<sub>134</sub>N<sub>8</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub>Si<sub>3</sub>.NaCl (1312.30

g/mol): C, 55.15; H, 9.77; N, 8.17, S, 9.33. Exp.: C, 54.70; H, 8.78, N, 7.45, S, 8.39. MS:  $[M+H]^+ = 1311.87$  uma (calcd. = 1311.86 uma).

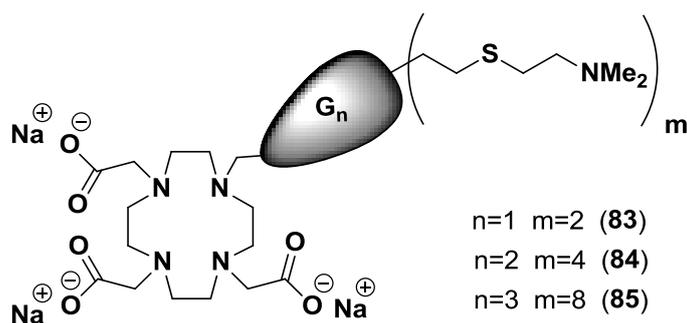
**[DO3A(OtBu)<sub>3</sub>]G<sub>3</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>8</sub> (82)**

**Datos:** Dendrón **79** (0.600 g, 0.242 mmoles), disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 mL). Aceite amarillento (0.490 g, 92%).

**RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  -0.11 (s, 9 H, SiMe), 0.00 (s, 12 H, SiMe), 0.55 (m, 26 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.86 (t, 16 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.25 (m, 16 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.44 (s, 27 H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.24 (s, 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.46-2.65 (m, 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  - 5.2 (MeSi), 14.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 18.4 (CH<sub>2</sub>), 27.7 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.9 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 45.4 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 56.9 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 59.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 81.4 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  1.8 (SiMe), -13.5 (SiCHCH<sub>2</sub>). **Anal.Calc.** C<sub>103</sub>H<sub>226</sub>N<sub>12</sub>O<sub>6</sub>S<sub>8</sub>Si<sub>7</sub>.NaCl (2182,09 g/mol): C, 55.21; H, 10.17; N, 7.50; O, 4.28; S, 11.45. Exp.: C, 70.43; H, 9.54. MS:  $[M+H]^+ = 305.1919$  uma (calcd. = 2183.09 uma).

**6.4.2.18 Síntesis y caracterización de cuñas carbosilano DO3AG<sub>n</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>m</sub> (83-85)**

Se obtienen los dendrones siguiendo el **protocolo 4**.



**DO3AG<sub>1</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (83)**

Debido al pequeño tamaño su purificación debe ser diferente, debe ser purificado mediante cromatografía por exclusión de tamaños en agua (sephadex).

**Datos:** Dendrón **80** (0.200 g, 0.228 mmol), NaOH (0.082 g, 2.05 mmol). Sólido amarillo (0.100 g, 57%).

**RMN-<sup>1</sup>H (MeOD):**  $\delta$  0.10 (s, 3 H, SiMe), 0.50 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>Si), 0.78 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.20 (m, 2 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 1.53 (m, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.90-3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub> y NCH<sub>2</sub>COO), 2.24 (s, 12 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.48 (m, 4 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.51 (t, 4 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 2.58 (t, 4 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>).

**RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (MeOD):**  $\delta$  -5.2 (MeSi), 13.1 (SiCH<sub>2</sub>), 14.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 21.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 29.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 36.8 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 45.15-51.19 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 45.1 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 52.8 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>HCl), 56.4 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 58.8 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 170.5 (COONa). **RMN-<sup>29</sup>Si (MeOD):**  $\delta$  -2.2 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>31</sub>H<sub>64</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>6</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>Si (884.42 g/mol): C, 42.10; H, 7.29; N, 9.50; S, 7.25. Exp.: C, 41.88; H, 7.12, N, 9.40, S, 6.89.

#### DO3AG<sub>2</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>4</sub> (**84**)

**Datos:** Dendrón **81** (0.160 g, 0.122 mmoles), NaOH (0.043 g, 1.10 mmol). Sólido amarillo (0.110 g, 75%).

**RMN-<sup>1</sup>H (MeOD):**  $\delta$  0.02 (s, 3 H, SiMe), 0.09 (s, 6 H, SiMe), 0.67 (m, 10 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.96 (t, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.44 (m, 8 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.90-3.70 (m, 24 H, N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N, NCH<sub>2</sub>COO y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.30 (s, 24 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.53-2.71 (m, 8 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, 8 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, 8 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (MeOD):**  $\delta$  -5.1 y 5.2 (MeSi), 16.7 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 20.9 (CH<sub>2</sub>), 29.8 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 31.1 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 46.4 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 45.15-51.19 (N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N), 54.7 (NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si), 61.7 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 179.07 (COO). **RMN-<sup>29</sup>Si (MeOD):**  $\delta$  1.63 (SiMe), 2.06 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S). **Anal.Calc.** C<sub>51</sub>H<sub>112</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>4</sub>Si<sub>3</sub> (1262.89 g/mol): C, 45.93; H, 8.46; N, 8.40; S, 9.62. Exp.: C, 44.57; H, 8.10; N, 8.45; S, 8.62.

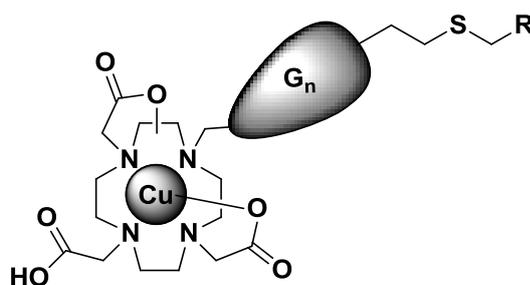
#### DO3AG<sub>3</sub>(SNMe<sub>2</sub>)<sub>8</sub> (**85**)

**Datos:** Dendrón **82** (0.160 g, 0.073 mmoles), NaOH (0.026 g, 0.66 mmol). Sólido amarillo (0.120 g, 79%).

**RMN-<sup>1</sup>H (MeOD):**  $\delta$  -0.03 (s, 9 H, SiMe), 0.06 (s, 12 H, SiMe), 0.63 (m, 26 H, SiCH<sub>2</sub>), 0.94 (t, 16 H, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 1.43 (m, 16 H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si y NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.28 (s, 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 2.52-2.70 (m, 48 H, SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>, SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S y SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} (MeOD):** -4.6 y 5.2 (MeSi), 15.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 19.8 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S), 45.2 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 59.9 (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>). **RMN-<sup>29</sup>Si (MeOD):**  $\delta$  1.8 (SiMe)-13.5 (SiCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>). **Anal.Calc.** C<sub>91</sub>H<sub>199</sub>N<sub>12</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>8</sub>Si<sub>7</sub> (2079.72 g/mol): C, 48.01; H, 9.12; N, 7.38; S, 11.27. Exp.: C, 49.14; H, 8.37; N, 6.16.

#### 6.4.2.19 Síntesis y caracterización de los complejos metálicos de cobre (86-91)

Todos los dendrones polianiónicos (**69**, **70**, **75**, **76**, **84** y **85**) fueron tratados con un equivalente de Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O en agua durante 30 minutos, ajustando el pH= 6-7, obteniéndose una disolución verde azulada. Transcurrido dicho tiempo se purifican los complejos mediante diálisis (M<sub>w</sub>= 500 para la segunda generación y M<sub>w</sub>= 1000 para las altas generaciones), posteriormente se llevan a sequedad obteniéndose los complejos de cobre correspondientes con altos rendimientos.



DO3AG<sub>n</sub>R<sub>m</sub>.Cu

<b>R=COONa</b>	<b>R = (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>Na</b>	<b>R = (CH<sub>2</sub>)NMe<sub>2</sub>.HCl</b>
n=2 m=4 ( <b>86</b> )	n=2 m=4 ( <b>88</b> )	n=2 m=4 ( <b>90</b> )
n=3 m=8 ( <b>87</b> )	n=3 m=8 ( <b>89</b> )	n=3 m=8 ( <b>91</b> )

#### Cu-DO3AG<sub>2</sub>(SCOONa)<sub>4</sub> (**86**)

**Datos:** DO3AG<sub>2</sub>(SCOONa)<sub>8</sub> (**69**) (0.040 g, 0.032 mmoles), Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (0.0074 g, 0.032 mmol). Sólido verde (0.035 g, 77%).

**Anal.Calc.**  $C_{44}H_{78}CuN_4Na_5O_{14}S_4Si_3$  (1278,12 g/mol): C, 41.35; H, 6.15; N, 4.97; S, 10.04. Exp.: C, 40.56; H, 6.03; N, 3.5; S, 10.00.

**Cu-DO3AG<sub>3</sub>(SCOONa)<sub>8</sub> (87)**

**Datos:** DO3AG<sub>3</sub>(SCOONa)<sub>8</sub> (70) (0.040 g, 0.019 mmoles), Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (0.0044 g, 0.019 mmol). Sólido verde (0.035 g, 83%).

**Anal.Calc.**  $C_{76}H_{138}CuN_4Na_9O_{22}S_8Si_7$  (2183.49 g/mol): C, 40.81; H, 6.37; N, 2.57; S, 11.75. Exp.: C, 39.23; H, 6.29; N, 1.54; S, 11.46.

**Cu-DO3AG<sub>2</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>4</sub> (88)**

**Datos:** DO3AG<sub>2</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>4</sub> (75) (0.050 g, 0.033 mmoles), Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (0.0077 g, 0.033 mmol). Sólido verde (0.040 g, 79%).

**Anal.Calc.**  $C_{48}H_{94}CuN_4Na_5O_{18}S_8Si_3$  (1534.55 g/mol): C, 37.57; H, 6.17; N, 3.65; S, 16.72. Exp.: C, 38.34; H, 5.97; N, 3.21; S, 16.91.

**Cu-DO3AG<sub>3</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>8</sub> (89)**

**Datos:** DO3AG<sub>3</sub>(SSO<sub>3</sub>Na)<sub>8</sub> (76) (0.040 g, 0.015 mmoles), Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (0.0035 g, 0.015 mmol). Sólido verde (0.037 g, 90%).

**Anal.Calc.**  $C_{84}H_{170}CuN_4Na_9O_{30}S_{16}Si_7$  (2692.35 g/mol): C, 36.42; H, 6.35; N, 2.08; S, 19.03. Exp.: C, 36.13; H, 6.66; N, 1.48; S, 18.49.

**Cu-DO3AG<sub>2</sub>(NMe<sub>2</sub>HCl)<sub>4</sub> (90)**

**Datos:** DO3AG<sub>2</sub>(SNMe<sub>2</sub>HCl)<sub>4</sub> (84) (0.050 g, 0.039 mmoles), Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (0.0091 g, 0.039 mmol). Sólido verde (0.040 g, 74%).

**Anal.Calc.**  $C_{52}H_{114}Cl_4CuN_8NaO_6S_4Si_3$  (1388.38 g/mol): C, 44.98; H, 8.28; N, 8.07; S, 9.24. Exp.: C, 44.14; H, 8.37; N, 7.16; S, 8.24.

**Cu-DO3AG<sub>3</sub>(NMe<sub>2</sub>HCl)<sub>8</sub> (91)**

**Datos:** DO3AG<sub>3</sub>(SNMe<sub>2</sub>HCl)<sub>8</sub> (85) (0.040 g, 0.020 mmoles), Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·2.5H<sub>2</sub>O (0.0046 g, 0.020 mmol). Sólido verde (0.041 g, 85%).

**Anal.Calc.**  $C_{92}H_{210}Cl_8N_{12}CuNaO_6S_8Si_7$  (2404.01 g/mol): C, 45.96; H, 8.80; N, 6.99; S, 10.67. Exp.: C, 45.24; H, 8.35; N, 6.16; S, 9.98.

## 6.5 BIBLIOGRAFIA

- (1) Perrin, D. D., Armarego, W. L. F., *Purification of laboratory chemicals* (3er Ed) Pergamon Press, Oxford: New York, **1988**.
- (2) García-Merino, I.; de, L. C. N.; Jiménez, J. L.; Gallego, J.; Gómez, C.; Prieto, C.; Serramia, M. J.; Lorente, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *Retrovirology* **2009**, *6*, 27.
- (3) García-Merino, I.; de, L. C. N.; Jiménez, J. L.; García, A.; Gallego, J.; Gómez, C.; García, D.; Muñoz-Fernández, M. A. *AIDS Res Hum Retroviruses* **2010**, *26*, 241.
- (4) Reference Methods for the testing the “in vitro” activity of antimicrobial agents against bacteria involved in infectious diseases. ISO 20776-1 **2006**.
- (5) Sánchez-Nieves, J.; Ortega, P.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9203.
- (6) Ortega, P.; Cobaleda, B. M.; Hernández-Ros, J. M.; Fuentes-Paniagua, E.; Sánchez-Nieves, J.; Tarazona, M. P.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5238.
- (7) Sánchez-Nieves, J.; Fransen, P.; Pulido, D.; Lorente, R.; Muñoz-Fernández, M. A.; Albericio, F.; Royo, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 43.
- (8) Launay, N.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P. *J. Organomet. Chem.* **1997**, *529*, 51.
- (9) Fuentes-Paniagua, E.; Pena-González, C. E.; Galán, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Sánchez-Nieves, J. *Organometallics* **2013**, *32*, 1789.
- (10) Lozano-Cruz, T.; Ortega, P.; Batanero, B.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 19294.
- (11) Ciepluch, K.; Katir, N.; El Kadib, A.; Felczak, A.; Zawadzka, K.; Weber, M.; Klajnert, B.; Lisowska, K.; Caminade, A. M.; Bousmina, M.; Bryszewska, M.; Majoral, J. P. *Mol. Pharmaceutics* **2012**, *9*, 448.

## **CAPÍTULO 7**

---

# CONCLUSIONES



---

El trabajo presentado en esta Memoria ha dado lugar a las siguientes conclusiones:

- I.** Se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de una nueva matriz polimérica con anillos aromáticos en su estructura a través de una reacción de policondensación del monómero **2** de tipo AB<sub>2</sub>. El polímero presenta un alto grado de ramificación como lo demuestra el valor de DB encontrado a 80°C, así como una baja polidispersidad (PDI ≈ 1.4). La matriz obtenida presenta un peso molecular promedio cercano a un dendrímero de tercera generación de tipo carbosilano y un número de grupos funcionales similar a uno de segunda. Esto implica que la densidad de grupos terminales en el polímero sea más baja a la del dendrímero esférico análogo. La introducción del anillo aromático disminuye ligeramente su flexibilidad (T<sub>g</sub> ≈ - 68°C) en comparación con el otro polímero utilizado (PCS-1-A (**III**)), pero le proporciona una mayor estabilidad térmica.
- II.** Se han preparado polímeros hiperramificados iónicos solubles en agua a partir de dos matrices poliméricas. Para los sistemas catiónicos se han utilizado dos metodologías sintéticas, hidrosililación y adición tiol-eno. Esto permite estudiar la influencia de la incorporación de átomos de azufre en su futura aplicación biomédica. En el caso de los sistemas aniónicos, solo se obtuvieron mediante la metodología tiol-eno, la cual transcurre en condiciones suaves y tiempos relativamente más cortos. Las correspondientes reacciones de hidrosililación, incluso en condiciones drásticas, no dieron lugar a los productos deseados.
- III.** El estudio de la capacidad antibacteriana de los polímeros catiónicos (**7**, **9** y **12**) muestra que sólo el polímero sintetizado por vía hidrosililación (**7**) presenta una alta actividad similar a la de su dendrímero análogo. Éste sistema, dado que se origina con procedimientos sintéticos más sencillos y económicos, puede ser considerado como una alternativa viable al uso de dendrímeros.

- IV.** El estudio de la viabilidad de distintos cultivos celulares en presencia de los polímeros hiperramificados aniónicos ha permitido relacionar la biocompatibilidad de éstos con las características estructurales de la matriz dendrítica y la naturaleza de sus grupos funcionales, mostrando una mayor toxicidad los sistemas que presentan un anillo aromático y grupos sulfonato en la periferia.
- V.** Del estudio de la capacidad antiviral de los polímeros aniónicos biocompatibles **16-18**, se han extraído las siguientes conclusiones:
- i. Todos ellos presentan buenas actividades para la cepa X4 y moderadas para R5.
  - ii. El polímero **16**, con grupos carboxilato periféricos funcionalizado vía tiol-eno es el que mejor actividad ha mostrado. Se obtienen resultados similares a sus dendrímeros análogos, pero con la ventaja de utilizar sistemas de síntesis mucho más sencilla, tanto en tiempo como en coste económico.
- VI.** Se ha desarrollado un protocolo sintético para generar dendrones carbosilano los cuales poseen diferentes grupos reactivos en el punto focal y grupos amino en la periferia. Estos sistemas se han utilizado como bloques de construcción para generar una variedad de dendrímeros esféricos híbridos catiónicos a través de un protocolo sintético denominado “*onion-peel*”.
- VII.** Por un lado, se ha diseñado una estrategia sintética para preparar dendrímeros esféricos híbridos catiónicos, con un esqueleto basado en átomos de fósforo polifuncional en el interior y dendrones de tipo carbosilano en la periferia. Mediante reacciones de condensación y reducción se obtienen sistemas con cargas positivas tanto en el exterior como en el interior de la estructura dendrítica. En el caso de los dendrímeros híbridos producidos por reacciones de sustitución, sólo se incluyen cargas externas. Por otro lado, también se han preparado otros híbridos con tres tipos de esqueletos diferentes, un núcleo polifuncional de

átomos de fósforo, viológeno en las ramas y dendrones carbosilano en la periferia, dónde la presencia de unidades viológeno con cargas positivas internas, induce diferencias de comportamiento con los anteriores y los homodendrimeros correspondientes.

- VIII.** Los sistemas híbridos fósforo-carbosilano presentan una capacidad antibacteriana baja en los sistemas de primera generación, siendo prácticamente despreciable en la segunda.
- IX.** De los todos los sistemas fósforo-carbosilano se han elegido tres sistemas híbridos **45-47** como agentes transfectantes, capaces de formar nanoconjugados con siRNA con una biocompatibilidad adecuada. No obstante, el sistema **47** da lugar a situaciones menos estables a relaciones de carga similares. Además, todos ellos han mostrado originar nanoconjugados menos estables que los formados con dendrimeros precursores basados en átomos de fósforo o carbosilano. Este hecho, puede explicar la obtención de inhibiciones moderadas en la infección por VIH.
- X.** Los resultados obtenidos muestran que la incorporación del fragmento viológeno en el sistema dendrítico mejora notablemente su capacidad antibacteriana en comparación con los sistemas fósforo-carbosilano, obteniéndose el mejor resultado para el sistema de primera generación **55**. Este sistema proporciona un compromiso adecuado entre su toxicidad y eficacia, dando lugar a un prometedor índice terapéutico.
- XI.** La viabilidad celular de los sistemas **55** y **56** comparada con los dendrimeros análogos fósforo-viológeno, sugiere que la toxicidad está relacionada con el número de cargas en el exterior con una contribución secundaria provocada por las cargas internas. Sin embargo, con respecto a la hemotoxicidad no existe ninguna correlación con respecto al número de cargas exteriores y su diferente localización (en el interior o exterior).
- XII.** Se ha corroborado por diferentes técnicas que la interacción con la proteína HSA es más acusada con el dendrímtero de segunda generación

**56**, lo que se traduce en una modificación más fuerte en la estructura secundaria de HSA que en caso del sistema **55**. Probablemente todo sea consecuencia del mayor número de cargas positivas externas, siendo las cargas internas de menor relevancia.

**XIII.** Se ha diseñado una estrategia sintética para preparar una familia de dendrones bifuncionalizados que presentan grupos iónicos (-COONa, -SO<sub>3</sub>Na y NMe<sub>2</sub>HCl) en la periferia y un agente quelante DO3A en el punto focal. Se ha explorado su capacidad coordinante utilizando Cu(II) como sonda a través de diferentes técnicas espectrofotométricas, UV-Vis y RSE, las cuales han permitido describir los distintos modos de coordinación de Cu(II) en estas estructuras:

- i. Se ha observado que a concentraciones pequeñas de Cu(II), la coordinación tiene lugar de manera preferente en el agente quelante DO3A.
- ii. Al aumentar la concentración del catión metálico en la disolución, la coordinación se desplaza hacia posiciones periféricas, sobre todo en el caso de los sistemas con grupos carboxílicos en la superficie. En el caso de los grupos sulfonato y amonio ésta interacción es más débil o nula.

**XIV.** Por un lado, todos los sistemas aniónicos de tercera generación (**70** y **76**) y sus correspondientes complejos con cobre (**87** y **89**), presentan una alta biocompatibilidad. Con todos ellos se consiguen muy buenas inhibiciones en ambas cepas virales, obteniéndose interesantes valores de EC<sub>50</sub>. El sistema **76** presenta una alta actividad antiviral e índices terapéuticos alrededor de 1000 para la cepa X4 y de 250 para R5, lo que ofrece un alto margen de seguridad, pudiendo considerar a este sistema como un prometedor agente microbicida frente al VIH.

**XV.** Los estudios sobre el mecanismo de acción indican que actúan en las etapas tempranas de la infección. El ensayo de internalización en paralelo con el de inhibición, junto con el experimento en la monocapa HEC-1A,

señalan que estos sistemas no impiden la entrada del virus en la célula, pero presentan una actividad virucida muy importante. Es decir, los dendrones **70** y **76** se unen al virus mediante interacciones con receptores virales, sin embargo, no interacciona con receptores celulares.

**XVI.** Por otro lado, el dendrón catiónico de tercera generación **85** y su correspondiente complejo con cobre **91** muestran biocompatibilidades aceptables, en torno a 5  $\mu\text{M}$ . Son capaces de formar nanoconjugados con diferentes siRNA, con una estabilidad frente a heparina similar a la observada en dendrímeros híbridos esféricos y a lo descrito en bibliografía para homodendrímeros carbosilano. Además, el grado de protección frente a nucleasas es inferior a los dendrímeros carbosilano esféricos, probablemente como consecuencia de sus diferentes topologías que hace que la condensación del material genético sea menos eficaz en el caso del dendrón. No obstante, sería necesario realizar ensayos funcionales para corroborar su eficacia como agentes transfectantes.

**XVII.** Por último, se ha visto que la coordinación de un metal en el ligando DO3A, es demasiado estable y no mejora ninguna actividad terapéutica. No obstante, este hecho abre la puerta para su utilización como agentes quelantes para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas fundamentadas en la hipótesis del ión metálico o en diagnóstico mediante coordinación de otros metales como Ga, Gd.



## **CAPÍTULO 8**

---

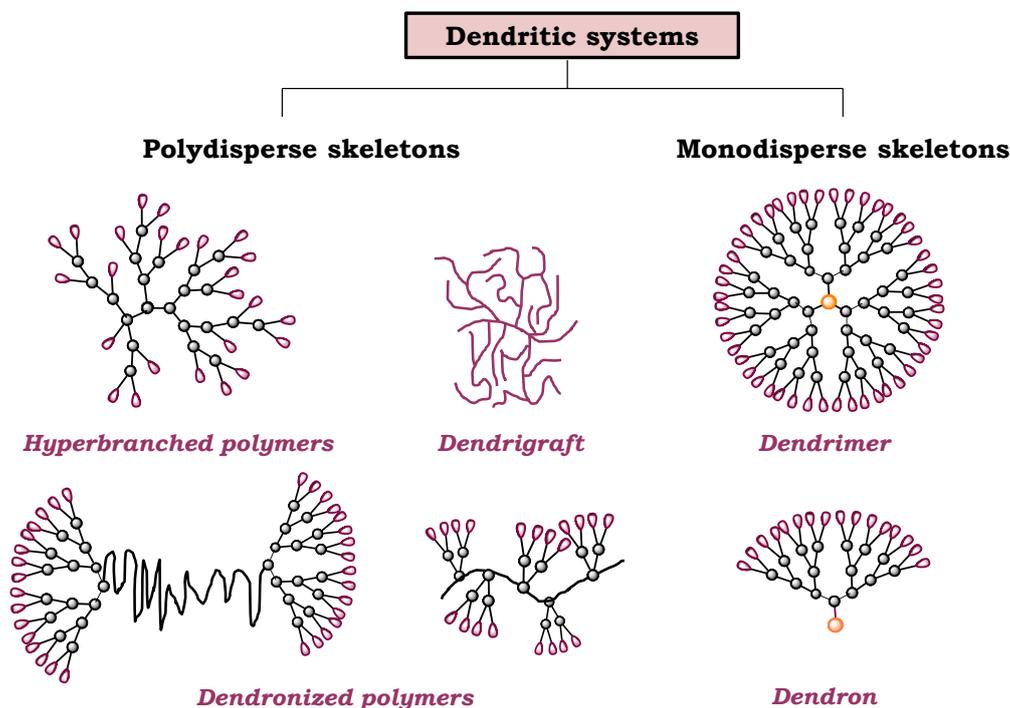
# SUMMARY AND CONCLUSIONS



## 8.1 INTRODUCTION

Dendritic systems are highly branched macromolecules. Due to their potential properties such as high density, low viscosity and especially their multivalency, these systems present a broad field of applications in biomedicine, materials science or catalysis, among others.<sup>1</sup>

Dendritic systems can be sub-divided into two main categories: (i) polydisperse skeletons such as hyperbranched polymers, dendrigrafts and dendronized polymers and (ii) monodisperse skeletons such as dendrimers and dendrons (Figure 8.1). If a given application requires high amount of product and/or high functionality, but not a high structural precision, polydisperse dendritic systems may be proposed as a viable and economic alternative to the dendrimers and dendrons. This is because the latter need many stages of reaction and purification, making the process time consuming and therefore more expensive.



**Figure 8.1** Structure of different dendritic systems.

Firstly, dendritic homofunctionalized systems were prepared and studied in several biomedical applications. However, in recent years the dendron topology

has been used as building block for the dendronization of several systems, obtaining hybrid products such as:

- (i) dendronization of different biomolecules at the focal point (drugs, metal complex, peptides, chromophore, etc).<sup>2</sup>
- (ii) hybrid dendrimers, with different building blocks at the skeleton (“onion peel”)<sup>3</sup> or different topologies (“bow-tie”, Janus).<sup>4</sup>
- (iii) nanostructured materials such as nanotubes or nanoparticles.<sup>5</sup>

The application in biomedicine of these compounds mainly depends on the dendritic periphery. From this point of view, cationic molecules, such as those containing ammonium moieties, can be used in gene therapy<sup>6</sup> or as therapeutic agents (antibacterial,<sup>7</sup> antiprion<sup>8</sup>). On the other hand, anionic dendritic molecules can be used as antiviral agents against a variety of diseases such as HIV. Other applications are associated to the transport of other molecules or image.<sup>9</sup>

Our research group has a long experience in the synthesis of water soluble carbosilane dendritic systems which can be used in different fields of nanomedicine.<sup>10-12</sup> In this work, the preparation of hyperbranched polymers, hybrid dendrimers and bifunctionalized dendrons, through either click chemistry or hydrosilylation, are described. All the compounds here synthesized, have been characterized by several techniques such as NMR spectroscopy, elemental analysis or mass spectrometry depending on their structure. When the metal complexes are considered, some other techniques have been applied, as UV-Vis spectrophotometry and Electronic Paramagnetic Resonance (EPR).

All the new systems have been evaluated for their use as carriers for nucleic acids in HIV or cancer, or as therapeutic agents (antibacterial or antiviral against HIV).

## 8.2 RESULTS AND DISCUSSION

### 8.2.1 Hyperbranched polymers

#### 8.2.1.1 Synthesis and characterization

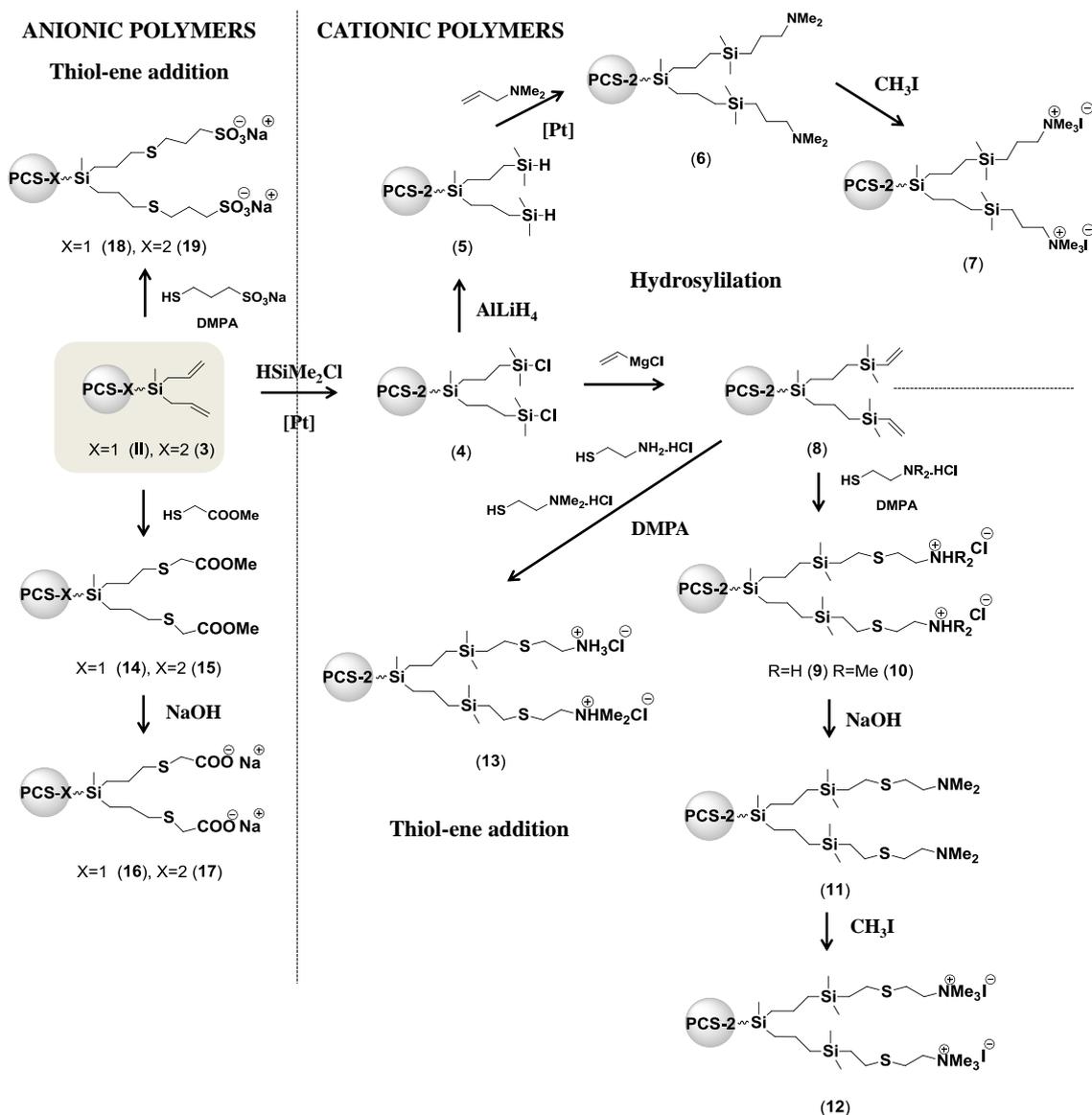
New amphiphilic hyperbranched polymers (HBPs) possessing hydrophobic skeletons and hydrophilic terminal groups have been prepared and characterized.

The synthetic strategy involved the formation of a new stable matrix with aromatic units within the carbosilane backbone (PCS-2-A (**3**)) through a polycondensation reaction of monomer AB<sub>2</sub> H-SiMe<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SiMe(C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub> (**2**), as well as the use of a classical polycarbosilane matrix (PCS-1-A (**I**)).<sup>13</sup> Both of them contain allyl groups on the surface with narrow polydispersity values. Molecular weight and polydispersity of the hyperbranched polymers were obtained using gel permeation chromatography with multi-angle light scattering, and the determination of the average number of functional groups present on the surface was achieved using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy (Table 8.1).

**Table 8.1** Measurement of SEC-MALLS and determination of the number of functional groups of the polymer matrix using <sup>1</sup>H-NMR analysis.

Polymers	10 <sup>3</sup> Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	10 <sup>3</sup> Mn (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI (Mw/Mn)	Number of functional groups
PCS-1-A ( <b>I</b> )	6.5 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.3	33
PCS-2-A ( <b>3</b> )	5.4 ± 0.1	3.7 ± 0.1	1.4	16

The introduction of ionic groups was carried out via thiol-ene or hydrosilylation reactions (Scheme 8.1). All these compounds have been isolated and characterized mainly by NMR experiments.



**Scheme 8.1** Synthesis of ionic hyperbranched polymers through hydrosilylation or thiol-ene addition.

The thermal properties of the polymers were also analyzed using differential scanning calorimetry. In general, as expected, the neutral HBPs ( $T_g \approx (-60)-(-70)^\circ\text{C}$ ) show lower  $T_g$  than the ionic derivatives ( $T_g \approx (-20)-(-30)^\circ\text{C}$ ). When these polymers are decorated with ionic groups at the periphery, the electrostatic repulsions among the peripheral chains reduce the mobility of these systems and therefore increasing the  $T_g$  value. The  $T_g$  values obtained for the all hyperbranched systems seem to indicate that the presence of aromatic units in the backbone does not substantially affect the mobility of the polymers, although it may alter the thermal degradation. The HBPs with aromatic units in the backbone

(PCS-2) show better thermal stability, with decomposition temperatures over 400°C higher than the HBPs without these units (PCS-1) with lower  $T_0$  of about 300°C.

To confirm the ionic nature of the surface, zeta potential measurements were carried out at room temperature. As expected, cationic systems give rise to positive values between 56 and 107 mV, while in the case of anionic HBPs the zeta potential is negative, between -72 and -46 mV.

The amphiphilic nature of the ionic systems was studied using surface tension measurements. In all cases an increase of HBP concentrations decreases the surface tension, underlining the amphiphilic character of these systems.

### 8.2.1.2 Biomedical applications

#### a) Antibacterial activity

Evaluation of antibacterial activity of cationic polymers (**7**, **9** and **12**) has been tested in *S. aureus* (Gram +) and *E. coli* (Gram -) (Table 8.2). These activities have been compared with others similar dendritic systems.

**Table 8.2** Antibacterial activity of different dendritic systems.

Dendritic systems	Mw (g/mol)	Number of functional groups	Gram-negative		Gram-positive	
			<i>Escherichia coli</i> (CECT 515)		<i>Staphylococcus aureus</i> (CECT 240)	
			MIC (ppm)	MBC (ppm)	MIC (ppm)	MBC (ppm)
PCS-1-SiNMe <sub>3</sub> I <sup>(a)</sup>	16000	33	16	16	4	4
PCS-2-SiNMe <sub>3</sub> I ( <b>7</b> )	10000	16	16	16	2	2
SiG <sub>2</sub> (SiNMe <sub>3</sub> I) <sub>16</sub> <sup>(a)</sup>	6303.7	16	16	16	8	8
PCS-2-SNH <sub>3</sub> Cl ( <b>9</b> )	8600	16	128	128	32	32
PCS-2-SNMe <sub>3</sub> I ( <b>12</b> )	10700	16	256	256	32	32
SiG <sub>2</sub> (SNMe <sub>3</sub> I) <sub>16</sub> <sup>(b)</sup>	5437.45	16	16	64	16	128

MIC: minimum inhibitory concentration; MBC: minimum bactericidal concentration

(a) Data found in literature.<sup>13</sup>

(b) Data found in literature.<sup>14</sup>

These results show that just the polymer synthesized via hydrosilylation (**7**) improves its antibacterial activity with respect to its analogous dendrimer. The

rest does not represent an improvement in the attempt to find dendritic systems with shorter and less expensive synthetic procedures.

*b) Antiviral activity*

Biocompatibility and antiviral activity of anionic polymers (**16-19**) have been evaluated.

Their toxicities have been studied in different cell cultures, HEC-1A and TZM-bl. The polymer **19** was discarded for further evaluation, due to its low biocompatibility profile that prevents their use as antivirals in the usual concentrations.

Inhibition of infection was measured through luciferase activity detection in a TZM-bl cell line in pre-treatment experiments. Cells were pre-treated with the maximum no toxic concentration of polymers, and infection with X4 and R5 strains was performed (Table 8.3).

**Table 8.3** Inhibition of the HIV infection in pre-treatment against X4 and R5 strains in TZM-bl cell line.

Dendritic systems	Number of functional groups	Concentrations		% of inhibition	
		ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$\mu\text{M}$	X4	R5
PCS-1-SCOONa ( <b>16</b> )	33	11	1	99	75-80
PCS-2-SCOONa ( <b>17</b> )	16	8	1	70-80	55-60
PCS-1-SSO <sub>3</sub> Na ( <b>18</b> )	33	1.2	0.1	90	50-60
SiG <sub>2</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>16+</sub> <sup>(a)</sup>	16	2.2	0.5	95	80

(a) Data found in literature.<sup>15</sup>

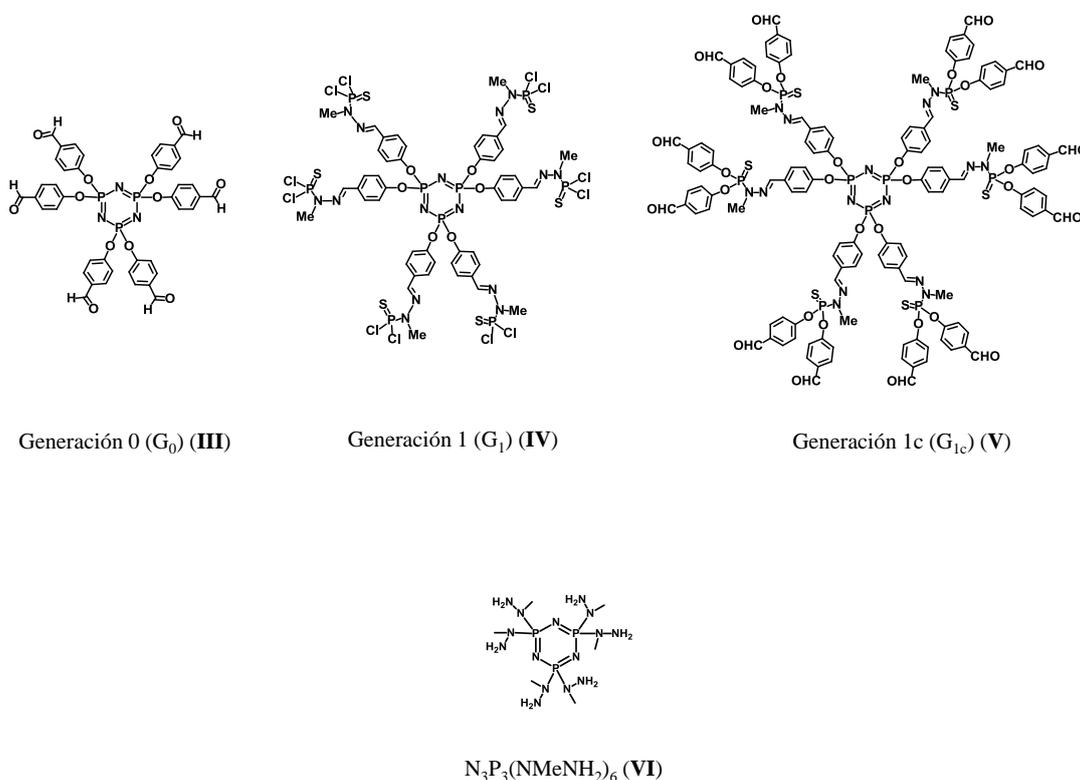
Results show that these polymers are able to inhibit infection with the selected strains when they are used in pre-treatment. The best inhibition was observed for the polymer **16** with peripheral carboxylate groups, which often have less activity than sulfonate groups. However, increased activity may be due simply to the higher concentration used compared to the sulfonate systems, and not to a higher number of active groups.

In these systems, the same antiviral activity profile found for spherical dendrimers was observed. That is, in any case, inhibitions of 100% were not

achieved in both viral strains. However, the use of combination therapy with any antiretroviral or dendrimer,<sup>11</sup> could lead to identical results to that achieved for spherical dendrimers, but with the advantage of using simple, less time- and cost-consuming synthetic routes.

### 8.2.2 Hybrid dendrimers

A series of hybrid dendrimers were prepared, constituting a new example of the synthetic “onion peel” approach to induce possible synergic effects in biomedical processes. Two kinds of systems have been synthesized: (a) phosphorus-carbosilane dendrimers and (b) phosphorus-viologen-carbosilane dendrimers.

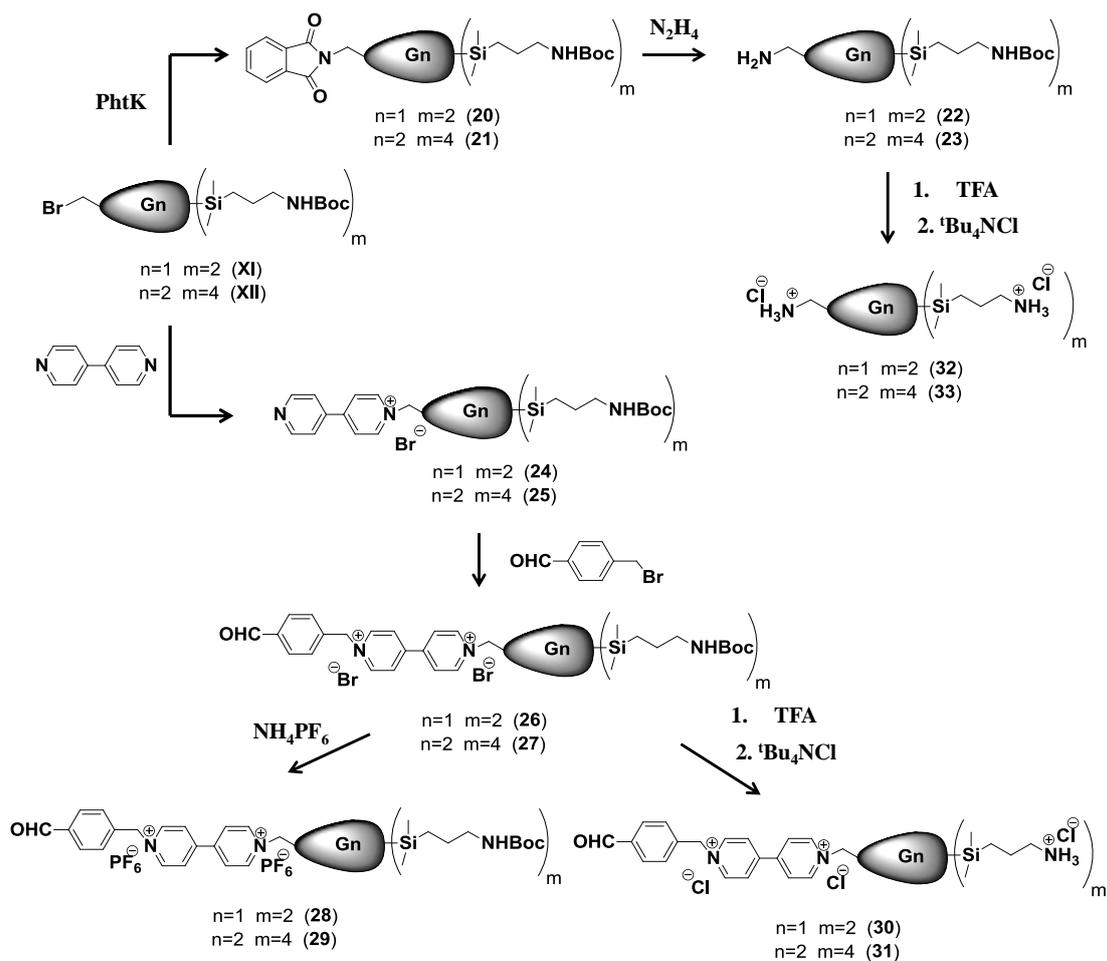


**Figure 8.2** Cores based on phosphorus atoms (III-VI).

The cores are based on different systems of phosphorus atoms widely described in literature (Figure 8.2).<sup>16</sup> The viologen fragment has been used in the literature as herbicides presenting important risks for human health due to their high toxicity. However, when viologen is included in a dendritic structure, several

biomedical properties such as cytotoxicity, hemotoxicity, antibacterial and antiviral activity are improved.<sup>17</sup> Finally, different carbosilane dendrons have been used as building block for obtaining the hybrid systems.

Some carbosilane dendrons here used, have been described in the literature,<sup>18</sup> but others have been synthesized according to the following procedure (Scheme 8.2):



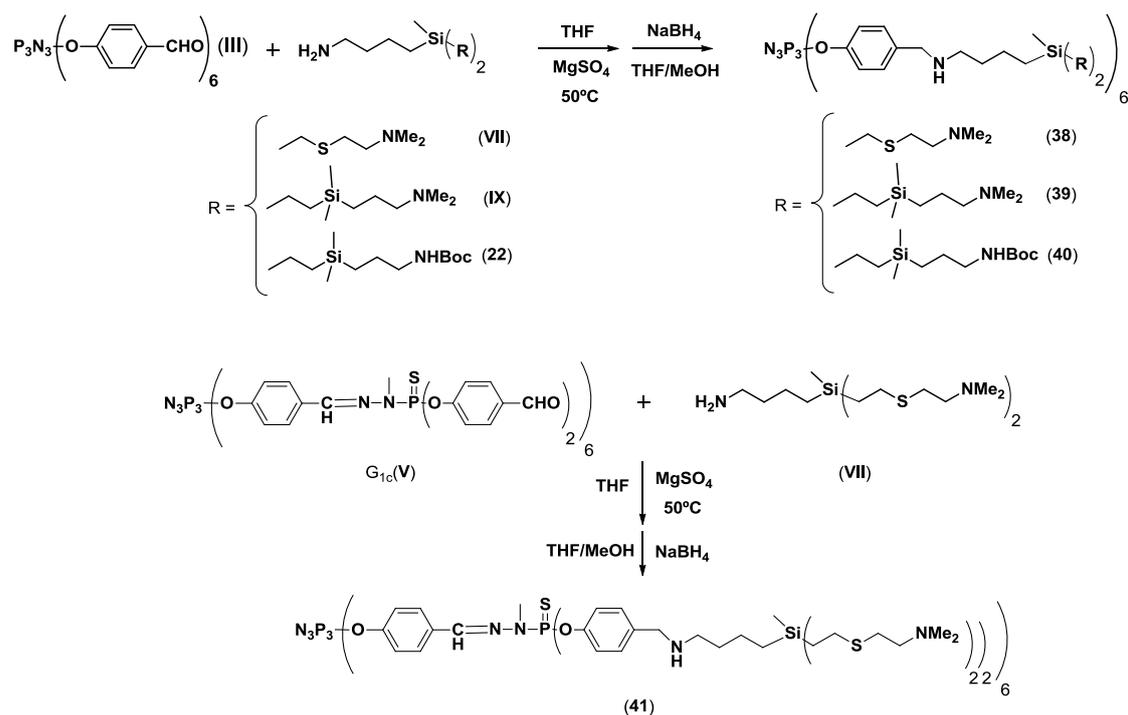
**Scheme 8.2** Synthesis of cationic carbosilane dendrons (32-33) and neutral (28-29) or cationic (30-31) dendrons with viologen at the focal point.

### 8.2.2.1 Synthesis and characterization of spherical dendrimers

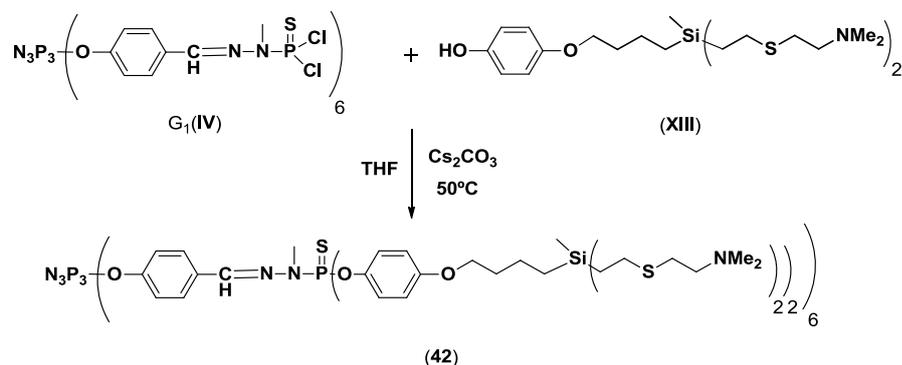
#### I. Phosphorus-carbosilane hybrid dendrimers

To generate spherical hybrid dendrimers two types of reactions were used (Scheme 8.3):

## A) CONDENSATION AND REDUCTION



## B) SUBSTITUTION

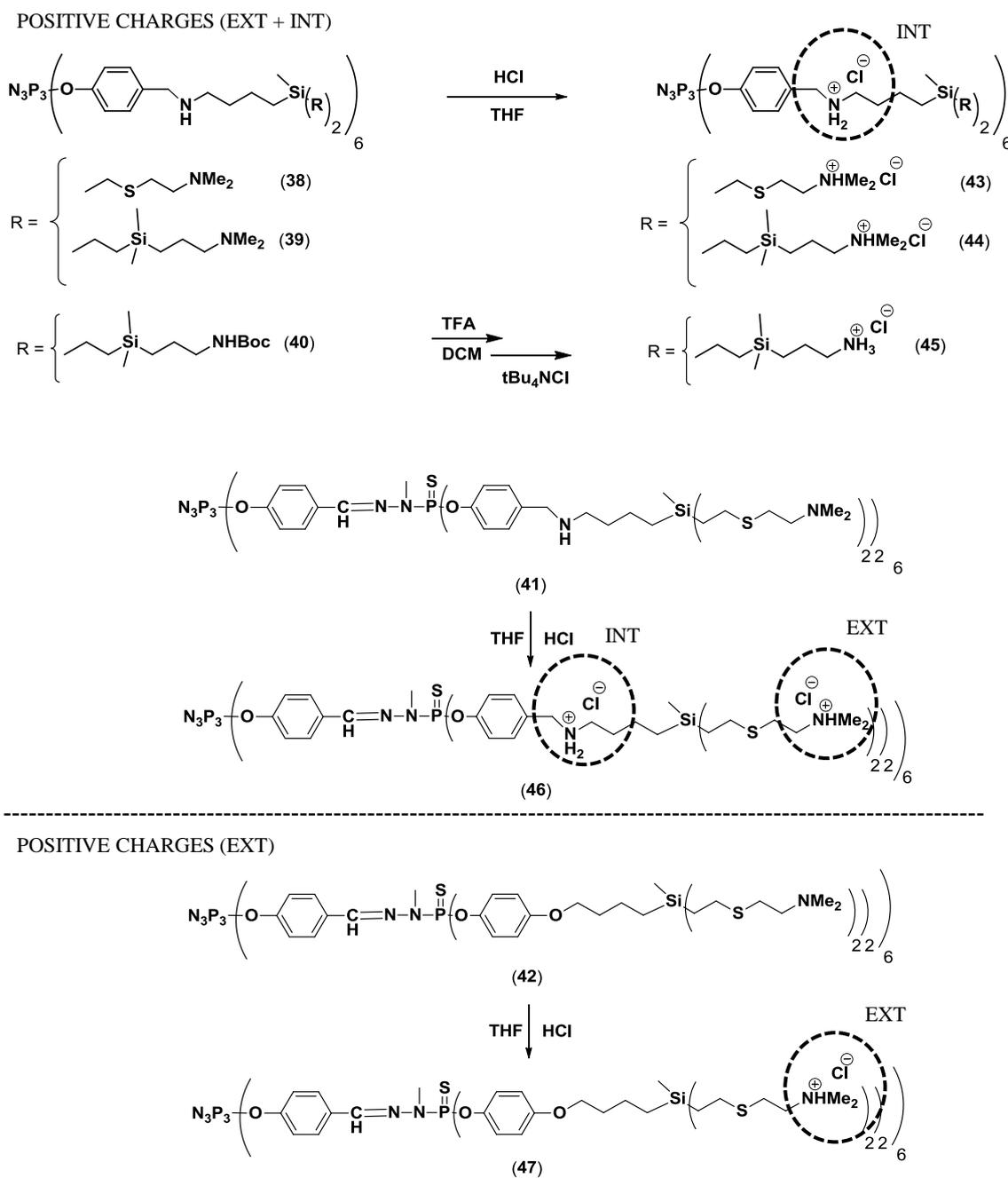


**Scheme 8.3** Synthesis of neutral hybrid spherical dendrimer through A) condensation and reduction (38-41) and B) substitution (42).

(A) *Condensation reaction*: on the one hand, phosphorus dendrimers with aldehyde groups on the surface ( $G_0$  (III) and  $G_{1C}$  (V)) and in the other hand, carbosilane dendrons with amino groups (-NMe<sub>2</sub> or -NHBoc) on the periphery and NH<sub>2</sub> group at the focal point (VII, IX, 22) were used. The formed imine bond is unstable in water suffering hydrolysis, and reversed reaction can occur over time. To avoid this, a selective reduction of such bond was made, leaving new amino groups inside the dendritic skeleton.

(B) *Substitution reaction*: In this case phosphorus dendrimer with P-Cl groups on the surface ( $G_1$  (IV)) and carbosilane dendrons with  $-NMe_2$  groups in the periphery and a phenol group at the focal point (XIII) were used.

For the formation of water-soluble cationic dendrimers, we proceeded to the quaternization of the amino groups with HCl, giving rise to pH-dependent systems (see Scheme 8.4).

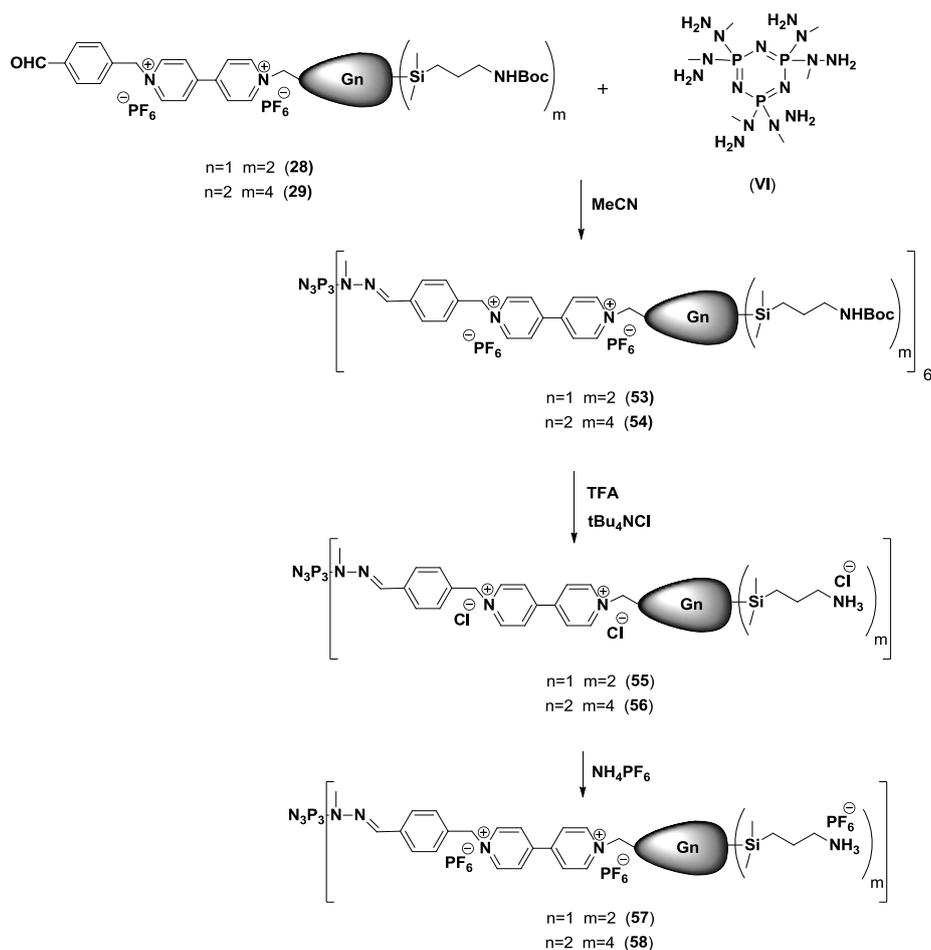


**Scheme 8.4** Synthesis of cationic hybrid spherical dendrimer (43-47).

In the case of dendrimers synthesized by condensation reaction and subsequent reduction, outer amino groups ( $-\text{NMe}_2$ ) and inner amino groups ( $-\text{NH}-$ ) are prone to be quaternized affording charges both outer and inner of the dendritic skeleton. However, for dendrimers built from substitution reactions, only peripheral positive charges are found.

## II. Phosphorus-viologen-carbosilane hybrid dendrimers

For the synthesis of hybrid spherical dendrimers, G1 and G2 dendrons, **28** and **29**, with an aldehyde group at the focal point were linked to the  $\text{N}_3\text{P}_3[\text{N}(\text{Me})\text{NH}_2]_6$  core. Finally, deprotection of these terminal amino groups and the change of counterion from  $\text{PF}_6^-$  to  $\text{Cl}^-$  lead to water-soluble systems. For these dendrimers two kinds of cationic groups were included: those located at the branches of the quaternized viologen units and those related to the ammonium groups at the surface of carbosilane wedges (Scheme 8.5).



**Scheme 8.5** Synthesis of hybrid spherical dendrimers **53-58**.

### 8.2.2.2 Biomedical applications

#### I. Phosphorus-carbosilane hybrid dendrimers

##### a) Antibacterial activity

Evaluation of antibacterial activity of cationic polymers (**43-47**) has been tested in *S. aureus* (Gram +) and *E. coli* (Gram -).

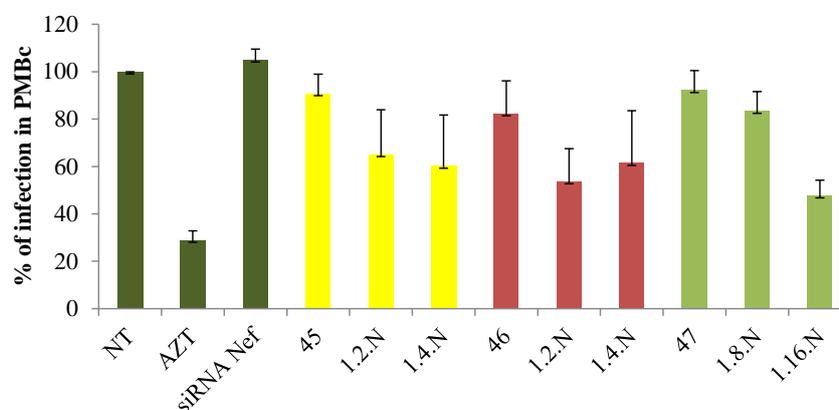
The phosphorus-carbosilane hybrid systems present low antibacterial capacity for the first generation systems, being negligible in the second one.

##### b) Systems as transfecting agents

Initially, evaluation of the toxicity in peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) of this family (**43-47**) has been tested. The dendrimers **43** and **44** were discarded for further evaluation, due to their low biocompatibility profiles.

Dendrimers **45-47** are able to form dendriplexes with anti-HIV siRNA (siNef) and antitumoral siRNA (Bcl-xl) and their stability were studied by electrophoresis and fluorescence polarization. All systems form nanoconjugates with siRNA with suitable biocompatibility.

However, the system **47** results to afford less stable situations at similar loading ratios. In addition, all of them have shown to afford nanoconjugates less stable than those formed with dendrimers based on precursor carbosilane or phosphorus atoms. This fact may explain the moderate inhibitions obtained in HIV infection experiments (Figure 8.3).



**Figure 8.3** Inhibition of p24 antigen by dendriplexes siNEF/ **45-47**.

## II. Phosphorus-viologen-carbosilane hybrid dendrimers

It is important to point out the risks of viologen derivatives for human health due to its high toxicity.<sup>19</sup> However, when this monomer is introduced as a building block for the design of polycationic dendrimers, several biomedical properties are improved as it was mentioned before.<sup>17</sup>

### a) Antibacterial activity

Evaluation of antibacterial activity of cationic hybrid dendrimers (**55** and **56**) has been tested in *S. aureus* (Gram +) and *E. coli* (Gram -). These activities have been compared with others similar dendrons with or without viologen units at the focal point (**30-33**) (Table 8.4).

**Table 8.4** Antibacterial activity of hybrid spherical dendrimers (**55-56**) and cationic carbosilane dendrons (**30-33**).

Dendritic systems	Number of charges (int+ext) (f.point+ ext)	Gram-negative				Gram-positive			
		<i>Escherichia coli</i> (CECT 515)				<i>Staphylococcus aureus</i> (CECT 240)			
		MIC		MBC		MIC		MBC	
		ppm	μM	ppm	μM	ppm	μM	ppm	μM
Dendrimer <b>55</b>	12+12	8	1.51	8	1.51	2	0.38	4	0.75
Dendrimer <b>56</b>	12+24	16	1.85	16	1.85	8	0.92	8	0.92
Dendron <b>30</b>	2+2	2	2.39	4	4.79	1	1.20	1	1.20
Dendron <b>31</b>	2+4	8	6.04	8	6.04	4	3.02	4	3.02
Dendron <b>32</b>	1+2	2	3.69	4	7.39	0.5	0.92	4	7.39
Dendron <b>33</b>	1+4	8	7.26	8	7.26	4	3.63	8	7.26

The results show that the incorporation of viologen fragment to the dendritic scaffold dramatically improves its antibacterial capacity, obtaining the best result for the first-generation system **55**.

### b) Biological properties

Biocompatibility and hemolysis studies of dendrimers **55** and **56** have also been performed. In order to assess the effect of hybrid dendrimers on eukaryotic

cells, Chinese hamster fibroblasts (B14 cell line) and PMBCs were chosen and MTT assay were performed for this study (Table 8.5).

**Table 8.5** Key features of dendritic structures and toxicity values of hybrid dendrimers **55** and **56**.

Dendrimer	G <sub>n</sub>	Terminal groups	Outer charge	Inner charge	Toxicity (μM)	Cell line
<b>55</b>	1	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	12	12	TC <sub>50</sub> > 10 TC <sub>80</sub> = 5	B14
<b>56</b>	2	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	24	12	TC <sub>50</sub> ≈ 1 TC <sub>80</sub> = 0.1	B14

The interaction of these systems with plasma proteins like human serum albumin (HSA) has been confirmed by various techniques. These results show an interaction more pronounced with the second generation dendrimer **56**, which shows a stronger change in the secondary structure of HSA than in case of **55**.

Although the observed biological behaviors were mainly related to the presence of outer positive charges, in some cases the inner positive charges acted as fine tuning factor.

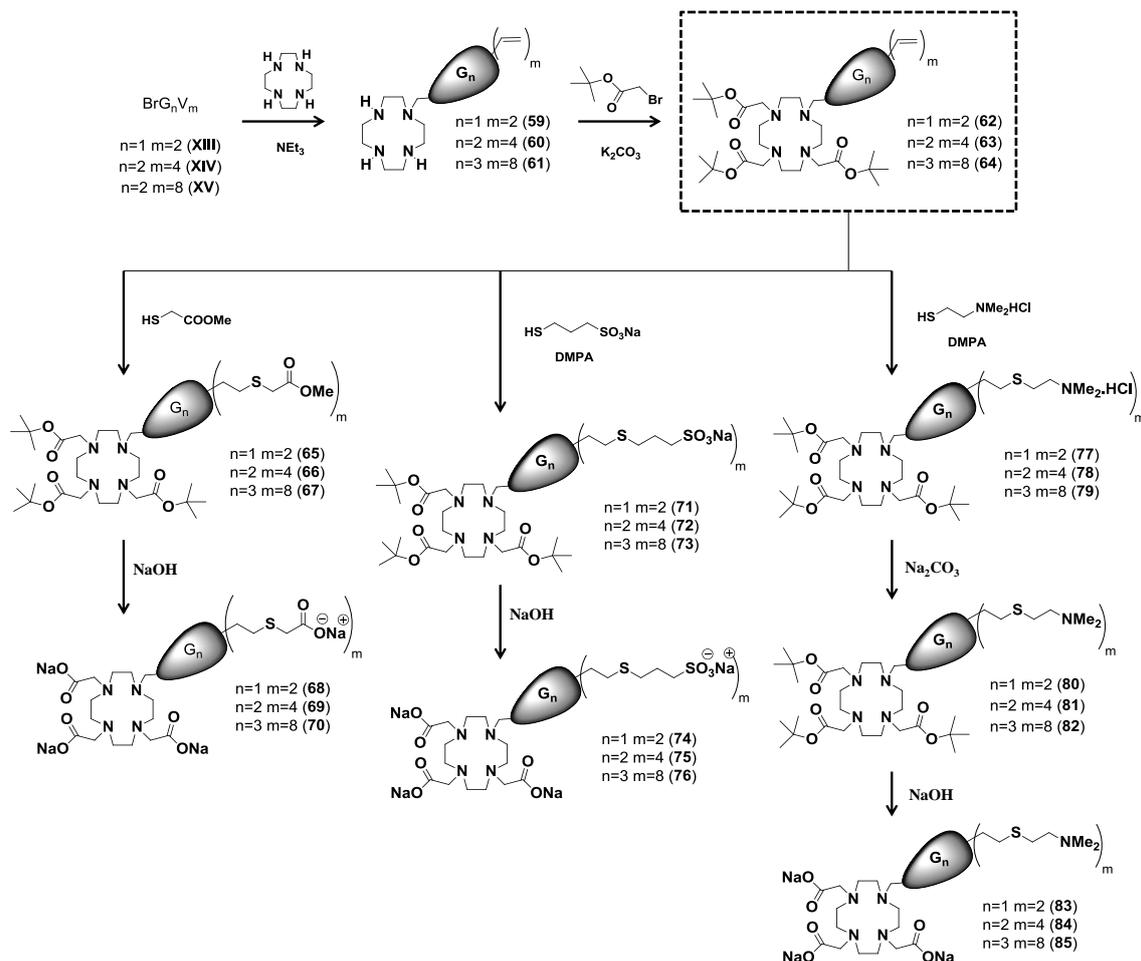
### 8.2.3 Carbosilane dendrons with DO3A at the focal point

New bifunctionalized carbosilane dendrons have been designed. The topology of these systems allows them to have ionic peripheral groups for a therapeutic action, but in addition, an excellent chelating agent DO3A at the focal point, which may form extremely stable complexes with a large number of metal ions.

#### 8.2.3.1 Synthesis and characterization

The synthesis of a variety of ionic carbosilane dendrons with different peripheral functions (NMe<sub>2</sub>HCl, SO<sub>3</sub>Na and COONa) and DO3A at the focal point is described in the following (Scheme 8.6). These dendrons were synthesized from carbosilane vinyl dendrons BrG<sub>n</sub>V<sub>m</sub> from generations 1-3 with 2, 4 and 8 terminal groups respectively at the periphery, by substitution of the

bromide atom at the focal point with CYCLEN ligand and functionalization of the vinyl groups via thiol-ene click chemistry with different reagents.

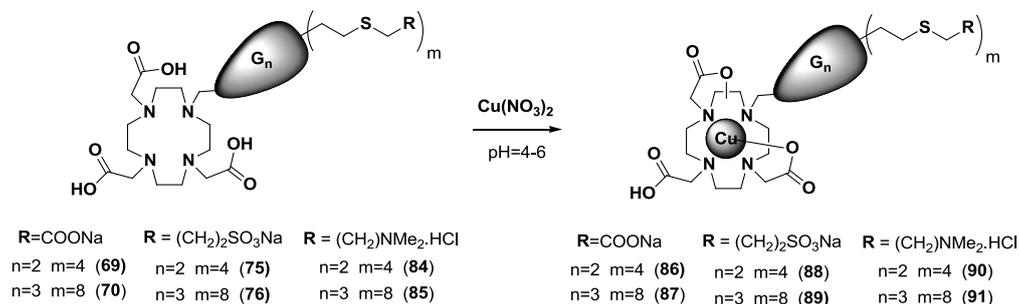


**Scheme 8.6** Synthesis of neutral (amine or ester) and ionic (amine, carboxylate, or sulfonate) -terminated dendrons with protected and unprotected DO3A at the focal point.

All these compounds have been isolated and characterized mainly by NMR experiments. The complexation behavior study of these dendrons has been accomplished by UV-Vis and electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy as well as potentiometric titrations.

The presence of the dendron branches modify the complexation capacity of the macrocyclic ring respecting to that of DOTA and DO3A ligands. Also, a different behavior has been observed for the carboxylate-terminated dendrons against the analogous sulfonate- or amine-terminated dendrons respecting to the contribution of the branches and peripheral groups to the coordination modes.

Subsequently, copper complexes were isolated (Scheme 8.7) and their biomedical properties were studied.



**Scheme 8.7** Synthesis of ionic copper complexes (**86-91**).

### 8.2.3.2 Biomedical applications

The inclusion of metal fragments in the dendritic skeletons with the goal at increasing their biomedical properties is another alternative that can be explored.<sup>20</sup>

#### a) Antibacterial activity

For that, cationic and anionic dendrons of second generation in presence and absent of copper (**75**, **84**, **88** and **90**), were evaluated as antibacterial agents against Gram + and Gram - bacteria.

From this study, the antibacterial activity is the result of the cationic groups at the periphery, where the presence of copper atom do not improve such activity. This later feature may be ascribed to the formation of very strong complexes, trapping the metal and making it not available to act.

#### b) Antiviral activity

In vitro studies were performed to evaluate the safety, biocompatibility, anti-HIV ability and mechanism of these bifunctionalized anionic carbosilane dendrons.

Toxicity evaluation of anionic compounds (**70**, **76**, **87** and **89**) has been carried out in different cell cultures, including epithelial cell lines (HEC-1A and

TZM-bl) and primary cultures as PBMC. All compounds by themselves were not toxic at the studied concentrations up to 20  $\mu\text{M}$  in PBMC and TZM.bl cells.

$\text{EC}_{50}$  values were measured to know the efficiency of each compound against HIV-1-infection in our *in vitro* model. A range of dendron concentrations were tested against X4-HIV-1<sub>NL4.3</sub> and R5-HIV-1<sub>NL(AD8)</sub> strains and they have demonstrated potent and a broad-spectrum anti-HIV-1 activity for *in vitro* experiments (Table 8.6).

**Table 8.6** 50% effective concentration ( $\text{EC}_{50}$ ) of dendrons in TZM-bl cells.

Used system	HIV X4	HIV R5
	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
DO3AG <sub>3</sub> (SCoONa) <sub>8</sub> ( <b>70</b> )	0.031 $\pm$ 0.004	0.57 $\pm$ 0.09
DO3AG <sub>3</sub> (SCoONa) <sub>8</sub> .Cu ( <b>87</b> )	0.0478 $\pm$ 0.009	0.44 $\pm$ 0.09
DO3AG <sub>3</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>8</sub> ( <b>76</b> )	0.015 $\pm$ 0.006	0.07 $\pm$ 0.02
DO3AG <sub>3</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>8</sub> .Cu ( <b>89</b> )	0.019 $\pm$ 0.006	0.05 $\pm$ 0.01
NH <sub>2</sub> G <sub>3</sub> (SSO <sub>3</sub> Na) <sub>8</sub>	0.080 $\pm$ 0.009	0.20 $\pm$ 0.04

Mean 50% effective concentrations ( $\text{EC}_{50}$ ) of dendrons obtained *in vitro* in the TZM-bl cell line after infection with R5-HIV-1<sub>NLAD8</sub>, X4-HIV-1<sub>NL4.3</sub>. Data are shown as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments performed in duplicate.

Several experiments show that these systems act at the entry level, by interaction with virus receptor instead of cell receptors. This behavior means a virucidal activity.

### c) Systems as transfecting agents

Initially, evaluation of the toxicity in PMBCs of cationic dendrons (**85** and **91**) has been tested, showing acceptable biocompatibilities about 5  $\mu\text{M}$ .

After ability to form dendriplexes between anti-HIV siRNA (siNef) or antitumoral siRNA (Bcl-xl) and dendrons (**85** and **91**), their corresponding stability was studied by electrophoresis and fluorescence polarization. All

systems are able to form nanoconjugates with siRNA with appropriate biocompatibility.

The nanoconjugate stability with different siRNA towards heparin was similar to that observed in hybrid spherical dendrimers. Moreover, the degree of protection against nucleases seems to be lower than those of the carbosilane spherical dendrimers, probably due to their different topologies.<sup>21</sup> However, a functional assay would be needed to confirm its efficacy as transfecting agents.

### 8.3 CONCLUSIONS

The scientific work here performed, has led to the following conclusions:

- I. Synthesis and characterization of a new polymer matrix with aromatic rings through a reaction of polycondensation of the monomer **2** of type AB<sub>2</sub> has been accomplished. The matrix has a high degree of branching as the DB parameter shows, along with a low polydispersity value (PDI  $\approx$  1.4). The polymer has a molecular weight close to a third generation carbosilane homodendrimer and a number of functional groups similar to the second generation. This means a lower density of peripheral functional groups in the hyperbranched polymer compared to spherical dendrimer analogue. In addition, flexibility of this system (Tg  $\approx$  - 68°C) is slightly reduced respecting to the other polymer used (PCS-1-A (**III**)), although providing higher thermal stability probably due to the presence of the aromatic ring.
- II. Water-soluble ionic carbosilane hyperbranched polymers have been prepared from two polymeric matrices. For cationic systems, two synthetic methodologies have been used, hydrosilylation and thiol-ene addition reactions. This allows studying the influence of incorporating sulfur atoms in their structure for future biomedical applications. In the case of anionic systems, only the thiol-ene methodology was used, which proceed under smooth reaction conditions and short reaction times. The corresponding hydrosilylation reactions failed for the synthesis of anionic compound even under harsh reaction conditions.

- III.** The study of antibacterial ability of cationic polymers (**7**, **9** and **12**) shows that just the polymer synthesized *via* hydrosilylation **7** presents better activity than its spherical dendrimer analogues. This system, because it is prepared under simple and economic synthetic procedures, could be considered as a viable alternative to the use of dendrimers.
- IV.** The study of the biocompatibility of anionic hyperbranched polymers (**16-19**) in different cell cultures makes possible to correlate this behavior with the structural characteristics of the matrix and the nature of their functional groups. Hence, polymers containing aromatic groups in the backbone and sulfonate groups at the periphery showed to have higher toxicity.
- V.** From the antiviral studies of biocompatible anionic hyperbranched polymers **16-19**, the following conclusion can be described:
- (i) All of them show good activities against the X4 viral strain and moderate values for R5 strain.
  - (ii) Polymer **16** with peripheral carboxylate groups functionalized *via* thiol-ene protocol showed the best activity. Similar results have been obtained compared to the analogue spherical dendrimers, but with the advantage of using systems prepared with easier synthetic procedure, both in time and cost.
- VI.** Carbosilane dendrons have been synthesized with different reactive groups at the focal point and amino groups at the periphery. These systems have been used as building blocks to generate a variety of hybrid spherical cationic dendrimers through the synthetic protocol so-called "onion-peel".
- VII.** Synthetic protocols for the preparation of two set of hybrid dendrimers have been performed. The first one consisted on cationic hybrid phosphorus-carbosilane dendrimers based on a polyfunctional phosphorus core and carbosilane dendrons at the periphery of the skeleton. By using condensation and reduction reactions, outer and inner positive charges

were included in the dendritic skeleton, however, by means of substitution reaction only external positive charges were added. For the second family, three different building blocks were used for the final structure: a polyfunctional core based on phosphorus atoms, viologen units in the branches and carbosilane dendrons at the periphery. Here, the presence of positive charges on the viologen units induced differences in the behavior respecting the phosphorus-carbosilane hybrid dendrimers and the corresponding homodendrimers.

- VIII.** The phosphorus-carbosilane hybrid systems present low antibacterial capacity for the first generation systems, being negligible for the second one.
- IX.** Of all phosphorus-carbosilane systems prepared, three hybrid systems **45-47** were chosen as transfecting agents capable of forming nanoconjugates with siRNA with suitable biocompatibility. However, system **47** results in less stable situations at similar charge ratios. In addition, all of them give rise to less stable nanoconjugates than those formed with dendrimers based on carbosilane or phosphorus atoms precursors. This fact may explain the moderate inhibitions obtained in HIV infection experiments.
- X.** The incorporation of viologen fragments to the dendritic scaffold dramatically improves its antibacterial capacity, obtaining the best result for the first-generation system **55**. This system provides a compromise between toxicity and efficacy, leading to a promising therapeutic index.
- XI.** Cell viability of systems **55** and **56** compared to the analogous phosphorus-viologen dendrimers tentatively suggested that the toxicity is related to the number of outer charges with a secondary contribution caused by internal charges. However, regarding the hemotoxicity no correlation with the number of positive charges and their different location were observed.
- XII.** Interaction of hybrid dendrimers with the HSA protein is more pronounced for the case of the second generation dendrimer **56**, which

shows a stronger change in the secondary structure of HSA than the first generation system **55**. Probably, the largest number of positive external charges may be the responsible of this effect, being inner charges less relevant.

**XIII.** A synthetic protocol for the preparation of a family of dendrons containing ionic groups (-COONa, -SO<sub>3</sub>Na and -NMe<sub>2</sub>HCl) at the periphery and a chelating agent DO3A the focal point has been designed. The coordinating capacity of all these systems was analyzed using Cu(II) as a probe through different techniques such as UV-Vis and EPR, which allowed describing the different coordination modes of Cu(II) in these structures:

(i) At lower Cu concentrations, the coordination occurs preferably on the DO3A ligand.

(ii) For higher concentrations the coordination moves to dendritical peripheral positions in the case of carboxylate-terminated dendrons. For sulfonate- or amine-terminated dendrons weak or no coordination is observed.

**XIV.** The studies of mechanism of action indicate that they act in the early stages of the infection. Internalization assay in parallel with the inhibition tests, together with the experiment in HEC-1A monolayer, indicate that these systems do not prevent virus entry into the cell, but exhibit virucidal activity. That is, dendrons **70** and **76** bind to the virus via interaction with viral receptors, however, do not interact with cellular receptors.

**XV.** Third generation cationic dendrons **85** and **91** showed acceptable biocompatibilities about 5 μM. They are able to form nanoconjugates with different siRNA, with similar stability against heparin to those observed for hybrid spherical dendrimers and carbosilane homodendrimers. Moreover, the degree of protection against nucleases seems to be lower than those shown by the spherical carbosilane dendrimers, probably due to their different topologies, which makes condensation of the nucleic

material less efficient for the case of dendrons. However, a functional assay would be needed to confirm their efficacy as transfecting agents.

**XVI.** Finally, it has been found that the metal coordination in this ligand is very strong, giving rise to very stable complexes and therefore, precluding any therapeutic activity associated to the metal behavior. Nevertheless, this feature opens the door for the use of these systems as chelate agents for the treatment of neurodegenerative diseases based on the metal ion hypothesis or the coordination of other metals like Ga or Gd, as image contrast agents.

## 8.4 BIBLIOGRAPHY

- (1) Astruc, D.; Boisselier, E.; Ornelas, C. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1857.
- (2) Kose, M. M.; Onbulak, S.; Yilmaz, I. I.; Sanyal, A. *Macromolecules* **2011**, *44*, 2707.
- (3) Sharma, R.; Naresh, K.; Chabre, Y. M.; Rej, R.; Saadeh, N. K.; Roy, R. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4321.
- (4) Caminade, A. M.; Laurent, R.; Delavaux-Nicot, B.; Majoral, J. P. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 217.
- (5) Soleyman, R.; Adeli, M. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 10.
- (6) Joshi, S.; Shinde, S.; Khinvasara, A.; Joshi, B. *Pharma Util.* **2013**, *7*.
- (7) Tulu, M.; Erturk, A. S.; *InTech*: **2012**, p 89.
- (8) Wasiak, T.; Marcinkowska, M.; Pieszynski, I.; Zablocka, M.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Klajnert-Maculewicz, B. *New J. Chem.* **2015**, *39*, 4852.
- (9) Fernández-Trillo, F.; Pacheco-Torres, J.; Correa, J.; Ballesteros, P.; López-Larrubia, P.; Cerdan, S.; Riguera, R.; Fernández-Megia, E. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 2902.
- (10) Fuentes-Paniagua, E.; Hernández-Ros, J. M.; Sánchez-Milla, M.; Camero, M. A.; Maly, M.; Pérez-Serrano, J.; Copa-Patiño, J. L.; Sánchez-Nieves, J.; Soliveri, J.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1256.
- (11) Sepúlveda-Crespo, D.; Sánchez-Rodríguez, J.; Serramia, M. J.; Gómez, R.; De La Mata, F. J.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 899.
- (12) Fuentes-Paniagua, E.; Serramia, J.; Sánchez-Nieves, J.; Álvarez, S.; Muñoz-Fernández, A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Eur. Polym. J.* **2015**, *71*, 61.
- (13) Ortega, P.; Cobaleda, B. M.; Hernández-Ros, J. M.; Fuentes-Paniagua, E.; Sánchez-Nieves, J.; Tarazona, M. P.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; de la Mata, F. J.; Gómez, R. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5238.
- (14) Tesis Doctoral, Elena Fuentes-Paniagua, Alcalá de Henares, **2014**.
- (15) Sánchez-Rodríguez, J.; Diaz, L.; Galán, M.; Maly, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Jiménez, J. L.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2015**, *11*, 1783.

- (16) Launay, N.; Caminade, A.-M.; Majoral, J. P. *J. Organomet. Chem.* **1997**, 529, 51.
- (17) Asaftei, S.; De Clercq, E. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 3480.
- (18) Fuentes-Paniagua, E.; Pena-González, C. E.; Galan, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Sánchez-Nieves, J. *Organometallics* **2013**, 32, 1789.
- (19) Moran, J. M.; Ortiz-Ortiz, M. A.; Ruiz-Mesa, L. M.; Fuentes, J. M. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2010**, 24, 402.
- (20) Govender, P.; Therrien, B.; Smith, G. S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, 2012, 2853.
- (21) Ionov, M.; Lazniewska, J.; Dzmitruk, V.; Halets, I.; Loznikova, S.; Novopashina, D.; Apartsin, E.; Krasheninina, O.; Venyaminova, A.; Milowska, K.; Nowacka, O.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Majoral, J. P.; Shcharbin, D.; Bryszewska, M. *Int. J. Pharm.* **2015**, 485, 261.

