

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Inorgánica



**DENDRÍMEROS DE ESTRUCTURA CARBOSILANO Y SU USO COMO
VECTORES NO-VIRALES EN TERAPIA GÉNICA Y COMO AGENTES
TERAPÉUTICOS.**

Memoria presentada en la Universidad de Alcalá
para optar al grado de Doctor en Química por la
licenciada Beatriz Rasines Moreno.

JOSÉ TOMÁS CUENCA AGREDA, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada **“Dendrímeros de estructura carbosilano y su uso como vectores no-virales en terapia génica y como agentes terapéuticos.”**, ha sido realizada por la licenciada Beatriz Rasines Moreno en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá y dirigida por el Dr. D. Rafael Gómez Ramírez y el Dr. D. Fco. Javier de la Mata de la Mata y da su conformidad para la presentación de la misma como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, 15 de Junio de 2010

Fdo. Dr. D. José Tomás Cuenca Agreda

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

Fco. JAVIER DE LA MATA DE LA MATA, Profesor Titular del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICAN:

Que la presente la memoria titulada "**Dendrímeros de estructura carbosilano y su uso como vectores no-virales en terapia génica y como agentes terapéuticos.**", ha sido realizada en el Departamento de 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, 15 de Junio de 2010

Fdo. Dr. Rafael Gómez Ramírez

Fdo. Dr. Fco. Javier de la Mata de la Mata

Tras el duro período de escritura, aquí tenéis el fruto del trabajo de investigación más bonito que jamás hubiera soñado. Este sueño se ha hecho realidad gracias a todas las personas que de manera directa o indirecta habéis estado en contacto con él y me habéis dado el apoyo para llegar hasta el final de esta etapa. Es por este motivo, por el que os quiero expresar mi sincero agradecimiento.

A los Dres. Fco. Javier de la Mata y Rafael Gómez, directores de este trabajo, por darme la oportunidad de trabajar en un campo de la química tan fascinante, por vuestra confianza en mí y los tirones de orejas que han hecho que volviera a la tierra cuando empezaba a perderme..., por hacer lo imposible buscar financiación y por ser dos tíos tan, tan emprendedores..., muchas gracias, de corazón.

A la Dra. M^a Ángeles Muñoz por su gran dedicación a la investigación biomédica y la ayuda y disponibilidad que me ha brindado durante estos años. Gracias a esta colaboración contigo he reafirmado mi pasión por los procesos bioquímicos.

A los Dres. J. Luís Copa, Manuel Guzmán y Carmen García de los Dptos. de Microbiología y Parasitología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Química Analítica de la U.A.H., por permitirme el lujo de trabajar con vosotros y de conocer a tres grandes personas.

Al Dr. J. Carlos Flores, desde mis comienzos con la química del grupo V me has demostrado un interés profesional y personal que no olvidaré nunca.

Al Dr. Mikhail V. Galakhov por su infinita paciencia con todos los experimentos de resonancia magnética nuclear que se me ocurría hacer con tal de caracterizar mis compuestos. Ha sido un placer trabajar contigo.

A mi amiga, compañera y voz de la conciencia, la Dra. Paula Ortega; sin ti esto no hubiera sido posible. Muchas gracias por estar siempre a mi lado..., la mayoría de los momentos han sido muy buenos..., pero los malos han sido muy duros para las dos, espero tenerte siempre cerca.

A mis compañeros del grupo BioInDen (Dendrímeros para aplicaciones Biomédicas), o GDBUAH, o como nos llamemos: a Edu, eres el mejor, ya sólo por las risas que nos hemos echado, ha merecido la pena trabajar junto a ti. Al Dr. J. Sánchez-Nieves, me encanta tu filosofía de vida y de trabajo, no me extraña que todos te aprecien tanto. A Sandra, la más peque y la más inteligente...eres un ejemplo a seguir. Elena, ¡¡¡menudo crack estás hecha!!!. Marta y Macarena, mis dos nuevas compis...os deseo mucha suerte en esto en lo que os habéis metido.

A los Dres. Manuel Gómez, Gerardo Jiménez, Román Andrés, Eva Royo, Gema Martínez, Vanessa Taberner, Jesús Cano, Adrián Pérez, María García; todos me habéis aportado algo positivo, muchas gracias.

No os penséis que me he olvidado del resto de compañeros del departamento: Alba y Pili, la alegría y el humor ácido del Departamento; Gustavo, por esas deliciosas charlas, me han ayudado a reponerme; Maribé, la mejor en todos los sentidos; Carlos y José, mis compañeros del Módulo II, con los que tan buenos ratos he pasado; Mila y Cristina P.P., me habéis demostrado un gran cariño; Ghaita y Cristina P., mis chicas del cuartito de al lado; Marina, siempre dispuesta a escuchar y dar ánimos; María V., Addis, Sergio, Octavio, Noelia, Jymmy, M^a Carmen, Lorena, Álvaro, Alberto, Jorge..., no sé si se me

olvida alguien...perdonad, pero sois muchos y todos os merecéis una mención, ¡¡¡habéis sido unos compañeros excepcionales!!!.

A mis compañeros de Gregorio Marañón: Louis, gran compañero y amigo, siempre dispuesto a ayudar incondicionalmente, a estar de risas y a darme su apoyo en los malos tragos de este año; Nati, gran parte de esta tesis es gracias a tu ayuda; Chusa, Almudena, Maribel, José Luis, Raquel, Laura, Teresa, Nick, Ali..., también sois un mogollón de gente estupenda, me alegro de conoceros a todos.

A mis amigos: Bego y Juanki, Susaniti, Eviti y Gemi, Eva y Gustavo, Isa y Mauro, Susana, Raúl, Javi..., a todos gracias por estar conmigo en los buenos y no tan buenos momentos de mi vida.

A toda mi familia, directa y postiza, que siempre me ha animado a seguir y se ha preocupado por cómo me iban los "estudios". A mis cuatro abuelos que me han educado para ser lo que soy.

A mi Madre y a Roberto, lo que hemos pasado este año ha sido la peor experiencia de nuestras vidas, pero aún así hemos sacado fuerzas para seguir adelante. Sois muy fuertes y os merecéis lo mejor...Os quiero mucho.

A Sergio, después de tantos años sigues demostrándome cada día que vale la pena esforzarse por conseguir lo que uno quiere..., el desánimo no entra en tu diccionario...Muchas gracias por estar a mi lado, siempre.

Papá, no estás conmigo para celebrar que por fin lo hemos conseguido..., ¡¡¡soy Doctora en Química!!!. Seguro que te alegraría mucho verme...

A Sergio

A mis Padres y a Roberto



ÍNDICE

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE DE COMPUESTOS	xi
PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS	
0.1 INTRODUCCIÓN	3
0.2 OBJETIVOS Y DISTRIBUCIÓN DE LA MEMORIA	4
CAPÍTULO I "INTRODUCCIÓN"	
I. INTRODUCCIÓN	9
I.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE UN DENDRÍMERO	9
I.2. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS	11
I.3. APLICACIONES DE LOS DENDRÍMEROS EN NANOMEDICINA	14
I.3.1 Dendrimeros en transporte de fármacos	15
I.3.2 Dendrimeros en terapia génica	18
I.3.3 Dendrimeros como agentes terapéuticos	27
I.3.4 Dendrimeros aplicados al diagnóstico	32
I.4. BIBLIOGRAFÍA	36
CAPÍTULO II "DENDRÍMEROS CARBOSILANO CATIONICOS"	
II.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	45
II.1.1. Síntesis de dendrimeros catiónicos	45
II.2. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO	50
II.2.1. Síntesis de dendrimeros precursores	51
II.2.2. Dendrimeros funcionalizados mediante hidrosililación de la amina [(CH ₂ =CHCH ₂)N(Et)(CH ₂ CH ₂ NMe ₂)]	53
II.2.2.1. <i>Estudio preparativo</i>	53
II.2.2.1.1. <i>Síntesis de N,N-dimetil-N' alil,N' etil-etilenodiamina</i>	53
II.2.2.1.2. <i>Síntesis de dendrimeros funcionalizados con grupos amino terminales</i>	54
II.2.3.1.3. <i>Síntesis de dendrimeros con grupos amonio en la periferia</i>	57
II.2.2.2. <i>Estudio estructural</i>	60
II.2.2.2.1. <i>Dendrimeros con grupos amino terminales</i>	60

	II.2.2.2.2. Dendrímeros funcionalizados con grupos amonio	73
II.2.3.	Dendrímeros funcionalizados mediante hidrosililación de la amina [(CH₂=CHCH₂)C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)]	93
	II.2.3.1. Estudio preparativo	95
	II.2.3.1.1. Síntesis del compuesto [2-(4-alil-2-metoxi-fenoxi)-etil]-dímetil amina	95
	II.2.3.1.2. Síntesis de dendrímeros con grupos amino en la superficie	95
	II.2.3.1.3. Síntesis de dendrímeros con grupos amonio en la superficie	97
	II.2.3.2. Estudio estructural	99
	II.2.3.2.1. Dendrímeros funcionalizados con grupos amino	99
	II.2.3.2.2. Dendrímeros funcionalizados con grupos amonio	108
II.2.4.	Dendrímeros funcionalizados con otros ligandos amino terminales por alcoholisis de enlaces SiCH₂-Cl.	115
	II.2.4.1. Estudio preparativo	116
	II.2.4.1.1. Síntesis de dendrímeros neutros	116
	II.2.4.1.2. Síntesis de dendrímeros catiónicos	118
	II.2.4.2. Estudio estructural	120
	II.2.4.2.1. Dendrímeros neutros	120
	II.2.4.2.2. Dendrímeros catiónicos	125
II.3.	BIBLIOGRAFÍA	130
<hr/>		
CAPÍTULO III "APLICACIONES BIOMÉDICAS DE DENDRÍMEROS CATIÓNICOS"		
<hr/>		
III.1.	DENDRÍMEROS CARBOSILANO CATIÓNICOS EN BIOMEDICINA	135
	III.1.2. Dendrímeros como vehículos de transporte de fármacos	135
	III.1.2.1. Estudio de la interacción del dendrímero 16 con Diclofenac	137
	III.1.2.2. Estudio de la interacción del dendrímero 26 con Penicilina	138
	III.1.3. Dendrímeros catiónicos en terapia génica	139
	III.1.3.1. Formación de dendriplexes	144
	III.1.3.2. Medidas de Toxicidad	146
	III.1.3.3. Ensayos de transfección	148
	III.1.4. Dendrímeros catiónicos como agentes terapéuticos	152
	III.1.4.1. Capacidad bactericida de los dendrímeros catiónicos	152
	III.1.4.2. Capacidad antiviral de los dendrímeros catiónicos	159

III.1.4.3. <i>Capacidad antipirónica de los dendrímeros catiónicos</i>	162
III.2. BIBLIOGRAFÍA	167
<hr/>	
CAPÍTULO IV "DENDRÍMEROS CARBOSILANO ANIÓNICOS"	
<hr/>	
IV.1. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS ANIÓNICOS	173
IV.1.1. Reacción de Adición de Michael	173
IV.1.2. Formación de amidas	174
IV.1.3. Técnica Click Chemistry	175
IV.1.4. Reacciones de alcoholisis de enlaces X-Cl	177
IV.1.5. Reacción de Williamson	178
IV.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO ANIÓNICOS	179
IV.2.1. Introducción. Síntesis de dendrímeros percursores	179
IV.2.2. Dendrímeros con grupos carboxilato en la periferia	180
IV.2.2.1. <i>Estudio preparativo</i>	180
IV.2.2.1.1. <i>Síntesis de dendrímeros con grupos éster terminales</i>	181
IV.2.2.1.2. <i>Síntesis de dendrímeros con grupos carboxilato terminales</i>	183
IV.2.2.2. <i>Estudio estructural</i>	185
IV.2.2.2.1. <i>Dendrímeros con grupos éster terminales</i>	186
IV.2.2.2.2. <i>Dendrímeros con grupos carboxilato en la superficie</i>	194
IV.2.3. Dendrímeros con grupos sulfonato en la periferia	215
IV.2.3.1. <i>Estudio preparativo</i>	216
IV.2.3.2. <i>Estudio estructural</i>	218
IV.3. BIBLIOGRAFÍA	232
<hr/>	
CAPÍTULO V "APLICACIONES BIOMÉDICAS DE DENDRÍMEROS ANIÓNICOS"	
<hr/>	
V.1. DENDRÍMEROS CARBOSILANO ANIÓNICOS EN BIOMEDICINA	237
V.1.1. Dendrímeros con grupos carbohidrato en la periferia	240
V.1.2. Dendrímeros peptídicos	241
V.1.3. Dendrímeros polianiónicos	242
V.2. ENSAYOS BIOMÉDICOS CON DENDRÍMEROS POLIANIÓNICOS	244
V.2.1. Evaluación de la capacidad antiviral de los dendrímeros polianiónicos	244
V.2.1.1. <i>Ensayos de Toxicidad</i>	245
V.2.1.2. <i>Estudio de inhibición en células HEC-1A</i>	249
V.2.1.3. <i>Ensayos de inhibición en CMSP</i>	252
V.2.2. Evaluación del efecto antiinflamatorio	254
V.2.3. Evaluación del efecto antibacteriano	256

V.3. BIBLIOGRAFÍA	259
<hr/>	
CAPÍTULO VI "PARTE EXPERIMENTAL"	
<hr/>	
VI.1. CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO	263
VI.2. PRODUCTOS DE PARTIDA UTILIZADOS	263
VI.3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES	265
VI.4. DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES	271
VI.4.1. Dendrímeros funcionalizados mediante hidrosililación de la amina [(CH ₂ =CHCH ₂)N(Et)(CH ₂ CH ₂ NMe ₂)]	271
VI.4.2. Dendrímeros funcionalizados mediante hidrosililación de la amina [(CH ₂ =CHCH ₂)C ₆ H ₃ (OMe)(OCH ₂ CH ₂ NMe ₂)]	288
VI.4.3. Dendrímeros funcionalizados con otros ligandos amino terminales por alcoholisis de enlaces SiCH₂-Cl.	297
VI.4.4. Preparación de G₃-(CH₂CH₂CH₂NH₂)₁₆	297
VI.4.5. Dendrímeros con grupos éster terminales	305
VI.4.6. Dendrímeros con grupos carboxilato en la superficie	309
VI.4.7. Dendrímeros con grupos sulfonato en la periferia	319
VI.5. BIBLIOGRAFÍA	327
<hr/>	
CAPÍTULO VII "CONCLUSIONES"	331
<hr/>	
CAPÍTULO VIII "SUMMARY"	341
<hr/>	

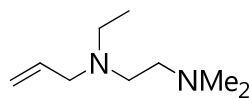
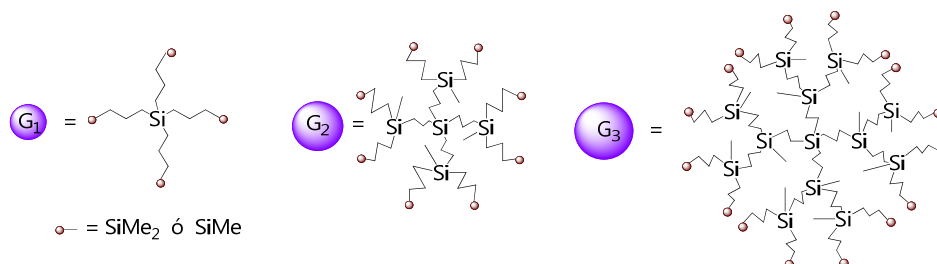
ABREVIATURAS

A continuación se muestra una ordenación alfabética de las abreviaturas que aparecerán a lo largo de esta memoria, con el fin de facilitar la interpretación de los capítulos, tablas, esquemas y figuras incluidas en ella.

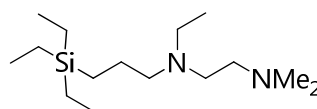
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
APCI	Ionización química a presión atmosférica (EM)
aq.	Disolución acuosa
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
Δ	Calor
Å	Amstrong
Calc.	Calculado
C _{ipso}	Carbono cuaternario ipso (RMN)
Cat.	Catalizador
δ	Desplazamiento químico (RMN)
d	Doblete (RMN)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
Dr./Dres.	Doctor/Doctores
1D	Monodimensional
ESI/TOF	Electrospray Ionization-Time-Of-Flight (EM)
Et	Etilo
Exc.	Exceso
Exp.	Experimental
g	Gramos

gHMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlation
gHMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherent
h	Horas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertzios
J_{H-H}	Constante de acoplamiento de protón (RMN)
Ka	Constante de disociación ácida
m	Multiplete (RMN)
M	Concentración Molar
Maldi-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight (EM)
mg	Miligramos
min	Minutos
Me	Metilo
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mmol	Milimoles
m/z	Relación masa/carga
μ M	Micromolar
nM	Nanomolar
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ODN	Oligodesoxinucleótido
PBL	Peripheral Blood Lymphocytes
PBS	Peripheral Blood Serum
pKa	logaritmo negativo de la constante de disociación de un ácido
ppm	Partes por millón

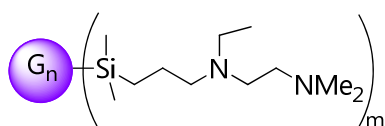
PrP ^C	Forma normal de la Proteína Prión
PrP ^{Sc}	Proteína Prión infectiva
[Pt]	Catalizador de Speier o de Karsted
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ARN ⁱ	ARN de interferencia
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 desacoplado de protón
¹⁵ N-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Nitrógeno-15 desacoplado de protón
¹⁹ F-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Flúor-19 desacoplado de protón
²⁹ Si-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Silicio-29 desacoplado de protón
s	Singlete (RMN)
t	Triplete (RMN)
t.a.	Temperatura ambiente
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TMS	Tetrametilsilano
T2	Tiempo de relajación Transversal (RMN)
UV-Vis	Ultravioleta-Visible



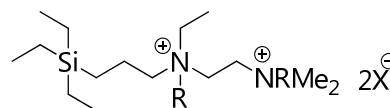
(1)



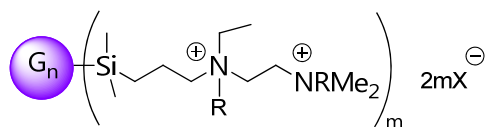
(2)



$n = 1, m = 4$ (3)
 $n = 2, m = 8$ (4)
 $n = 3, m = 16$ (5)



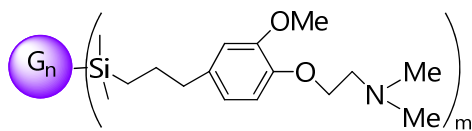
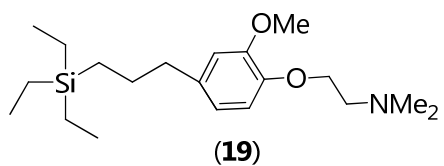
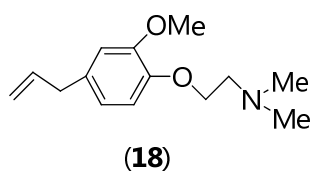
$X = \text{CF}_3\text{SO}_3$ (6)
 $X = \text{Cl}$ (10)
 $X = \text{I}$ (14)



$R = \text{Me}, X = \text{CF}_3\text{SO}_3$ $n = 1, m = 4$ (7)
 $n = 2, m = 8$ (8)
 $n = 3, m = 16$ (9)

$R = \text{H}, X = \text{Cl}$ $n = 1, m = 4$ (11)
 $n = 2, m = 8$ (12)
 $n = 3, m = 16$ (13)

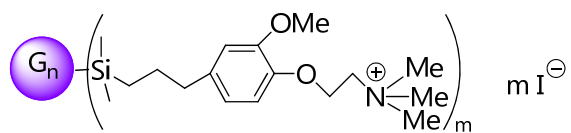
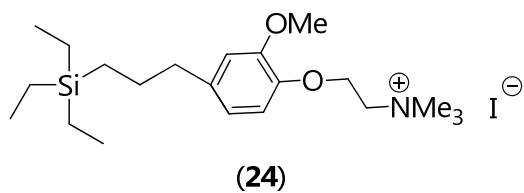
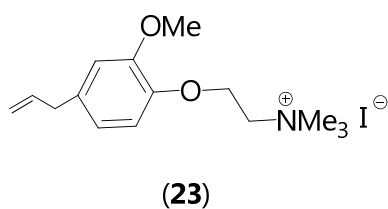
$R = \text{Me}, X = \text{I}$ $n = 1, m = 4$ (15)
 $n = 2, m = 8$ (16)
 $n = 3, m = 16$ (17)



$$n = 1, m = 4 \quad (20)$$

$$n = 2, m = 8 \quad (21)$$

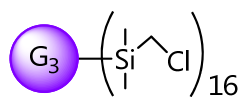
$$n = 3, m = 16 \quad (22)$$



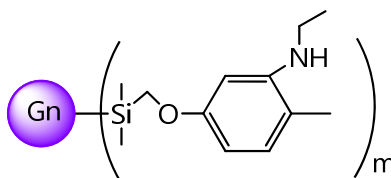
$$n = 1, m = 4 \quad (25)$$

$$n = 2, m = 8 \quad (26)$$

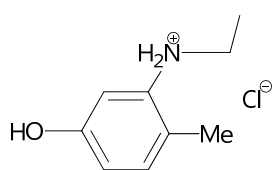
$$n = 3, m = 16 \quad (27)$$



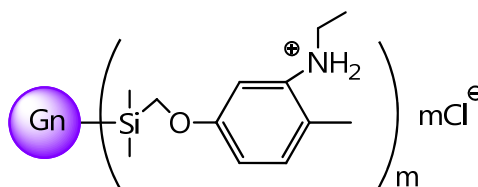
(28)



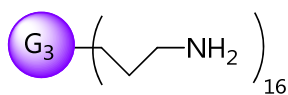
n=1 m= 4 (29)
n=2 m= 8 (30)
n=3 m= 16 (31)



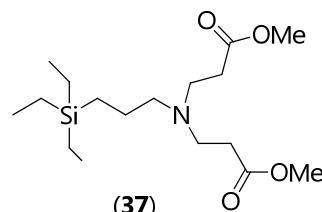
(32)



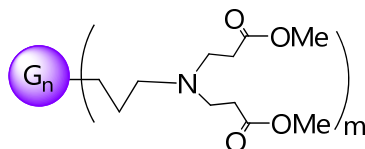
n=1 m= 4 (33)
n=2 m= 8 (34)
n=3 m= 16 (35)



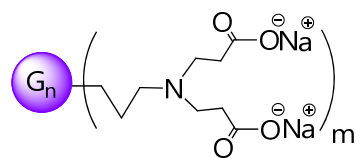
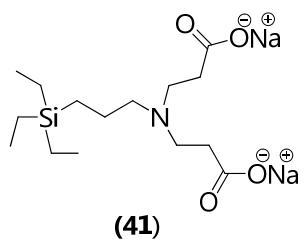
(36)



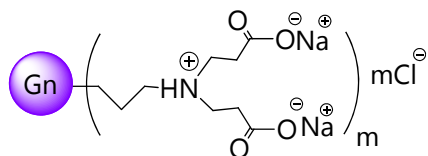
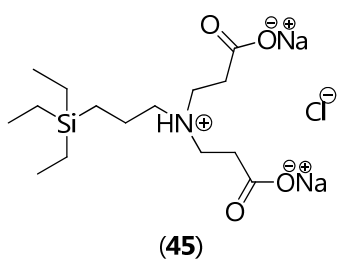
(37)



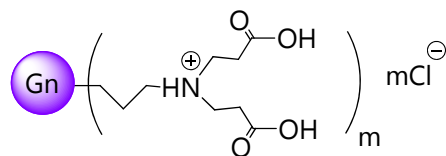
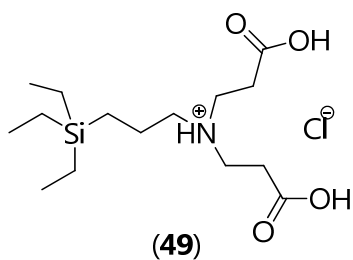
n= 1 m= 4 (38)
n= 2 m= 8 (39)
n= 3 m= 16 (40)



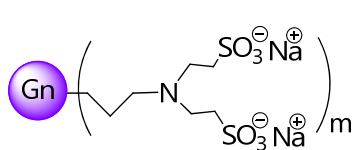
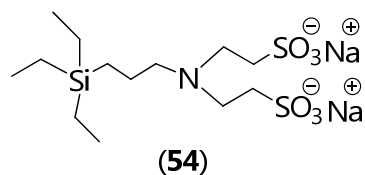
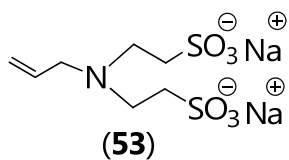
n=1 m=4 **(42)**
 n=2 m=8 **(43)**
 n=3 m=16 **(44)**



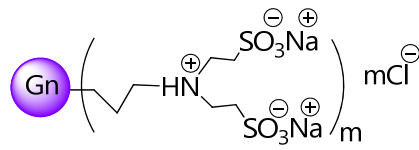
n=1 m=4 **(46)**
 n=2 m=8 **(47)**
 n=3 m=16 **(48)**



n=1 m=4 **(50)**
 n=2 m=8 **(51)**
 n=3 m=16 **(52)**



n=1 m=4 **(55)**
 n=2 m=8 **(56)**
 n=3 m=16 **(57)**



n=1 m=4 **(58)**
 n=2 m=8 **(59)**
 n=3 m=16 **(60)**



PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

0.1. INTRODUCCIÓN.

A partir de la década de los 80, surgió un gran interés en la obtención de polímeros globulares denominados dendrímeros, los cuales abrían nuevas áreas de estudio, tanto en el ámbito de la investigación básica como en el de la aplicación tecnológica.

Las moléculas dendríticas son importantes y poderosas unidades estructurales sintéticas que pueden ser usadas para la construcción de sistemas macro y supramoleculares de forma bien definida y de tamaño controlado. En los últimos años, las estrategias de síntesis de dendrímeros han madurado lo suficiente como para permitir el uso de los mismos en la búsqueda de nuevos materiales poliméricos, con interesantes aplicaciones en el campo de las ciencias de la vida y más recientemente en el campo de la medicina.

Este trabajo es el fruto de un proyecto de investigación del grupo BioInDen de la Universidad de Alcalá, en el que han colaborado los grupos de Inmunobiología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, los Departamentos de Microbiología y Parasitología y de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Alcalá, el grupo de Biofísica de la Universidad de Łódz, en Polonia y el Departamento de Física de la Universidad J.E. Purkinje de la República Checa. Está basado en la síntesis y caracterización de nuevas macromoléculas dendríticas de naturaleza carbosilano y su uso como vectores no virales y como agentes terapéuticos.

0.2. OBJETIVOS Y DISTRIBUCIÓN DE LA MEMORIA.

Nuestro grupo de investigación posee una demostrada experiencia en la síntesis de dendrímeros con estructura carbosilano solubles en disolución acuosa, para su aplicación como vehículos virales en procesos de terapia génica. Este hecho, unido al gran interés que estos sistemas dendríticos están despertando en otros campos de la nanomedicina nos ha llevado a plantear para este trabajo los siguientes objetivos:

Objetivo general: Síntesis y caracterización estructural de dendrímeros iónicos de estructura carbosilano, solubles y estables en disolución acuosa y evaluación de su actividad en diferentes procesos biomédicos.

Objetivos particulares:

I-Síntesis, caracterización estructural y comportamiento químico de dendrímeros de estructura carbosilano funcionalizados en la periferia con grupos amino, susceptibles de ser transformados en dendrímeros catiónicos estables y solubles en agua a través de la cuaternización de los grupos amino terminales con distintos agentes cuaternizantes.

II-Estudio de la biocompatibilidad de los dendrímeros catiónicos sintetizados, teniendo en cuenta la solubilidad y la estabilidad de los mismos en medios acuosos y fisiológicos, el efecto del contraión y su tamaño.

III-Evaluación de los dendrímeros que mejores perfiles de biocompatibilidad hayan presentado en distintos procesos biomédicos. Para ello se realizarán ensayos que determinen su posible uso como agentes de transporte de fármacos, como agentes de transfección en terapia génica y como agentes terapéuticos.

IV-Síntesis, caracterización estructural y comportamiento químico de dendrímeros de estructura carbosilano funcionalizados en la periferia con grupos aniónicos.

V-Evaluación de la biocompatibilidad de estos dendrímeros de estructura carboxilato aniónicos. Para ello será necesario determinar los límites de solubilidad y de citotoxicidad en un medio fisiológico.

VI-Evaluación de los dendrímeros aniónicos que mejores perfiles de biocompatibilidad hayan presentado. Para este fin se llevará a cabo el estudio de éstos como posibles agentes microbicidas en procesos de infección por VIH.

El trabajo realizado en cada una de estas etapas se describirá en esta memoria de acuerdo con la siguiente distribución:

En el **capítulo I** se hace una breve revisión general de los trabajos más representativos del uso de dendrímeros dentro del campo de la nanomedicina.

En el **capítulo II** se aborda la síntesis y caracterización estructural de dendrímeros carboxilato funcionalizados con las aminas: N,N-dimetil-N'alil,N'etil-etilenodiamina, [2-(4-alil-2-metoxi-fenoxi)-etil]-dimetil amina.y 3-(etilamino)-4-(metilfenol). La cuaternización de los grupos amino periféricos con diferentes agentes cuaternizantes, permite la obtención de sistemas dendríticos catiónicos estables.

En el **capítulo III** se evalúa la capacidad de estos sistemas para actuar como agentes de transporte de fármacos, como agentes de transfección en terapia génica en la línea celular linfocítica PBL y en la hepática HepG2 y, como agentes terapéuticos, en especial como sistemas antibacterianos, antivirales y antipriónicos.

En el **capítulo IV** se estudia la síntesis, caracterización estructural y comportamiento ácido-base en disolución acuosa de dendrímeros carbosilano aniónicos, con grupos carboxilato y sulfonato en la periferia.

En el **capítulo V** se detallan los ensayos llevados a cabo para determinar la biocompatibilidad de estos sistemas con el fin de estudiar su posible uso como agentes antivirales, tanto como profilácticos como terapéuticos, en las líneas celulares HEC-1A y CMSP y, se estudia brevemente la actividad antiinflamatoria en células Jurkat y bactericida en bacterias Gram+.

La descripción de las preparaciones, así como las condiciones generales de trabajo experimental y las técnicas de identificación estructural y análisis se recogen en el **capítulo VI**.

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

Finalmente y de acuerdo a la normativa vigente que rige los estudios de doctorado, se añade un resumen en inglés del trabajo presentado en esta memoria (**Summary**).



CAPÍTULO I

“INTRODUCCIÓN”

I. INTRODUCCIÓN.

I.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE UN DENDRÍMERO.

Las estructuras dendríticas fueron descritas por primera vez en 1978,^[1] aunque no fue hasta años más tarde^[2] cuando se utilizó el término dendrímoro para hacer referencia a este tipo de macroestructuras. Estos materiales hiperramificados son considerados como una nueva clase de polímeros que poseen una serie de propiedades únicas y muy interesantes, los cuales se diferencian de los clásicos en que son estructuras bien definidas, con un alto grado de uniformidad molecular, además de poseer una superficie con una elevada funcionalidad.^[2-5] Su gran versatilidad radica en la facilidad con la que se pueden diseñar y modificar las partes que lo componen variando así sus propiedades físico-químicas. En función de la aplicación que se les quiera dar se puede diseñar el dendrímoro deseado.

Para describir su estructura se utilizan distintos parámetros. La base partiría de un núcleo, a partir del cual se produce el crecimiento del dendrímoro capa a capa o, generación tras generación, ramificándose en cada una de ellas (Figura I.1.). En la periferia se localizan los grupos terminales, que le confieren propiedades específicas, a los que se les denomina grupos funcionales o grupos periféricos. Sin embargo este último término se debe utilizar con precaución, ya que se vuelve inespecífico cuando las ramas dendríticas se pliegan hacia el interior del dendrímoro.^[6]

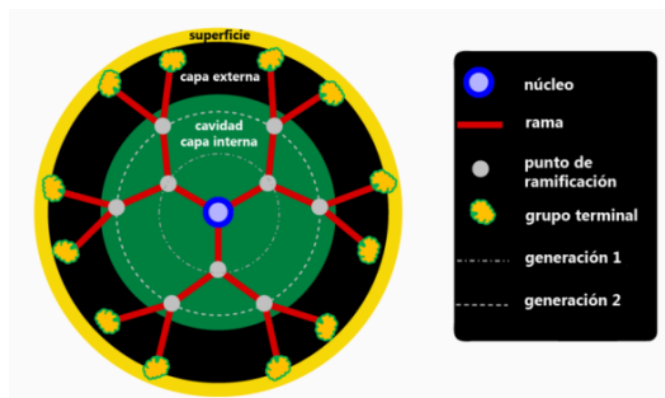


Figura I.1. Representación esquemática de un dendrímero de segunda generación.

Se han sintetizado muchas clases de dendrímeros con una gran variedad de moléculas o elementos químicos en el núcleo, distintas clases de ramas y diferentes modificaciones de la periferia. A medida que va creciendo el sistema, van surgiendo nuevos compartimentos o huecos, que dependiendo de la morfología de las ramas dendríticas, pueden ser adecuados para alojar otras moléculas.

Las generaciones más pequeñas de los dendrímeros poseen estructuras abiertas y, a medida que estas van aumentando se hacen más densas y globulares llegando a alcanzar tamaños adecuados para ser utilizados en distintos campos de la nanociencia. La disposición globular es susceptible de ser modificada por agentes externos, tales como el disolvente o la fuerza iónica del medio, lo que puede dar lugar a la modificación de propiedades del compuesto, como ocurre con la solubilidad.

A medida que la macromolécula aumenta de tamaño los grupos funcionales van estando más próximos, llegando incluso a una situación de congestión superficial, que puede producir la aparición de defectos en su crecimiento provocando que deje de ser monodisperso. En este sentido hay que destacar que los dendrímeros pueden aumentar su tamaño de acuerdo con dos

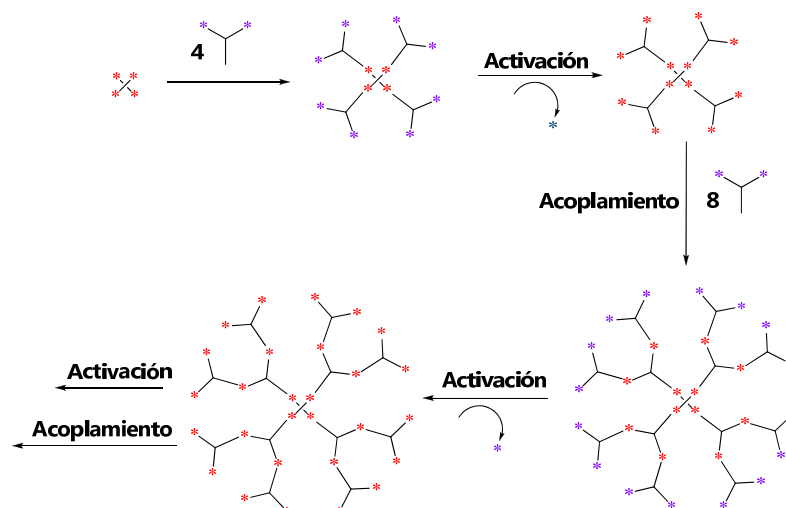
modelos de crecimiento: i) el descrito por Lescanec y Muthukumar,^[7] en el cual la mayor congestión se produce en el núcleo, relajándose la estructura al ir avanzando hacia la superficie, un ejemplo de ello se encuentra en los dendrímeros de tipo carbosilano^[8] y ii) el publicado por de Gennes y Hervet,^[9] que es más adecuado para los dendrímeros de tipo Fréchet^[10]. En este caso la máxima densidad se localiza en la periferia.

I.2. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS.

Los dendrímeros se construyen mediante métodos iterativos. La primera estrategia sintética fue propuesta por Vötgler en 1978^[1] y aunque su crecimiento presentó algunos problemas, permitió demostrar que era posible hacer crecer polímeros de una manera controlada a partir de la repetición de un ciclo de reacciones. Desde entonces, el interés por la síntesis de este nuevo tipo de macromoléculas ha crecido exponencialmente, como demuestran las numerosas publicaciones que existen sobre el tema,^[11-13] aunque no se reflejen todas en este trabajo.

Básicamente, existen dos técnicas de síntesis de dendrímeros:

- **Método divergente**, el dendrímero crece, generación a generación y desde el interior hacia la superficie, a partir de una molécula central o núcleo sobre la que se van adicionando unidades de repetición. Este método fue desarrollado de forma independiente por los grupos de Denkewalter,^[14-16] Tomalia^[2] y Newkome^[17] (Esquema I.1.).

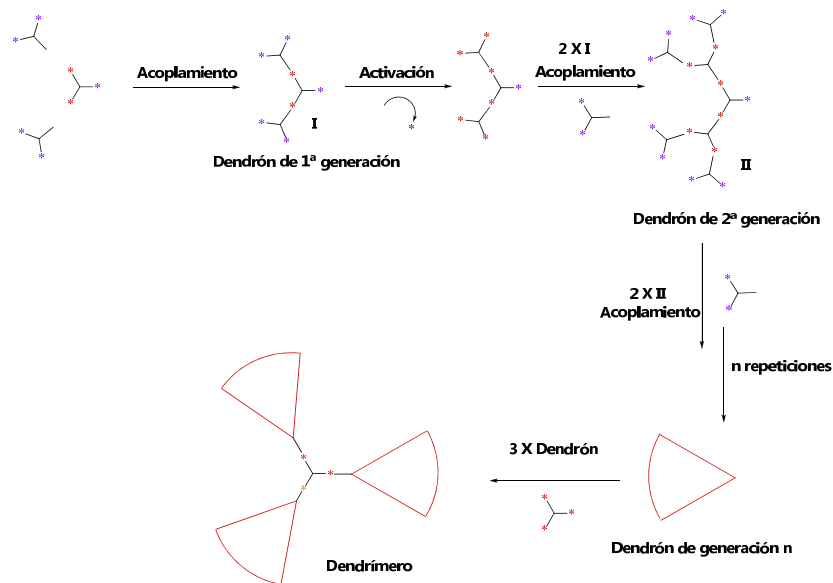


Esquema I.1. *Síntesis divergente.*

Su principal inconveniente es que, en la mayoría de los casos, requiere la utilización de un exceso de monómero con el fin de asegurar la reactividad de todas las posiciones periféricas y conseguir un crecimiento regular, lo que dificulta la purificación del compuesto obtenido. Además, el aumento de tamaño y exponencialmente el de grupos funcionales en la superficie, facilita la formación de defectos estructurales. Para que este método sea eficiente, las reacciones involucradas deben ser cuantitativas y deben proporcionar el menor número posible de subproductos, de modo que sea posible conseguir compuestos básicamente monodispersos.

- **Método convergente**, fue introducido por Fréchet en 1990 y la síntesis se realiza desde la periferia hacia el interior.^[10,18] El primer paso consiste en obtener una serie de moléculas hiperramificadas denominadas *dendrones* o *cuñas dendríticas*, que poseen una función reactiva en el punto focal. Estos dendrones pueden aumentar su tamaño hasta una determinada generación n . La formación del dendrímero se completa mediante un ensamblaje de estos

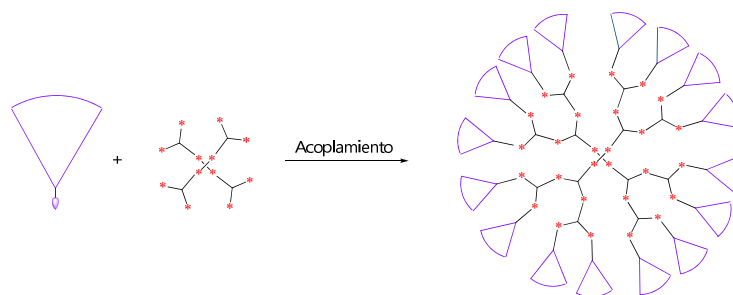
dendrones sobre un núcleo central polifuncional mediante una reacción de acoplamiento (Esquema I.2.).



Esquema I.2. *Síntesis convergente.*

La utilización de esta estrategia permite minimizar los defectos estructurales del dendrímero ya que se evita el uso de grandes cantidades de reactivos, lo que facilita la purificación. Sin embargo, si los dendrones son muy voluminosos, el ensamblaje final alrededor de un núcleo central puede estar impedido estéricamente.

Se han descrito otras técnicas de síntesis orientadas a minimizar los pasos necesarios para la obtención de dendrímeros de generaciones más altas. Éstas combinan los principios de los métodos convergente y divergente,^[19-22] de modo que se puede hablar de una síntesis mixta, (ver Esquema I.3.).



Esquema I.3. Síntesis mixta de dendrímeros.

Debido a los rápidos avances que se han producido en los últimos años en la elaboración de dendrímeros, ha aumentado el interés en la búsqueda de aplicaciones de estas macromoléculas. Gracias a su estructura y propiedades y, a la facilidad para modularlos, éstos se están aplicando en distintos campos de la ciencia y la tecnología. Así, se emplean en catálisis a nanoescala,^[23] como plantillas para la síntesis de nanopartículas y su estabilización^[24], como sensores químicos,^[25] micelas unimoleculares,^[26] los llamados “dendri-chips” que se utilizan para el desarrollo de nuevos materiales orgánicos-inorgánicos^[27-29] dentro del campo de la ciencia de los materiales, etc. y, más recientemente, han despertado un gran interés en el campo de la nanomedicina.^[5,30-35]

I.3. APLICACIONES DE LOS DENDRÍMEROS EN NANOMEDICINA.

La nanomedicina, por lo general, consiste en la monitorización, reparación, construcción y control de los sistemas biológicos a nivel celular utilizando materiales y estructuras diseñados a nivel nanoscópico. Se han encontrado numerosas aplicaciones de los dendrímeros en dicho campo y, gracias a la facilidad con la que se pueden modificar sus propiedades, su uso en este área está cada vez más extendido. Algunas de las aplicaciones de los dendrímeros en nanomedicina son, entre otras: transportadores de fármacos, agentes de transporte de biomoléculas en procesos de terapia génica o como

agentes terapéuticos. A continuación, se describen algunas de estas aplicaciones.

I.3.1. Dendrímeros en transporte de fármacos.

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es un proceso muy largo y costoso y aunque se superen estos problemas, en muchos casos los nuevos fármacos fallan en los ensayos clínicos al producir efectos adversos. La efectividad de los fármacos aumenta cuando éstos son capaces de dirigirse a sitios específicos y se liberan de forma controlada. Es por esta razón por la que en los últimos años los dendrímeros son los materiales que más han llamado la atención en este campo.

Las moléculas dendríticas pueden actuar como transportadores interactuando de dos formas distintas con el fármaco:

- Encapsulación del fármaco en la estructura dendrítica.
- Interacciones entre los grupos funcionales del dendrímero y el fármaco.

La existencia de oquedades en la estructura dendrítica permite la interacción de las ramas del dendrímero con compuestos farmacológicamente activos. La encapsulación de un fármaco puede también significar un mayor control en su liberación. La interacción entre el dendrímero y el fármaco puede ser simplemente física, o puede suponer una interacción no enlazante con la estructura del dendrímero. El tamaño de la macromolécula es un factor importante en el proceso de encapsulación de fármacos, ya que las generaciones pequeñas tienden a tener estructuras abiertas y amorfas, mientras que las generaciones mayores pueden adoptar una conformación esférica capaz de incorporar moléculas de fármaco. La encapsulación de fármacos se puede dar de distintas formas: formación de cajas dendríticas,^[36-38] (ver Figura I.2.),

formación de agregados y micelas dendríticas^[17] y, por último, formación de dendrímeros "desnucleados".^[39,40]

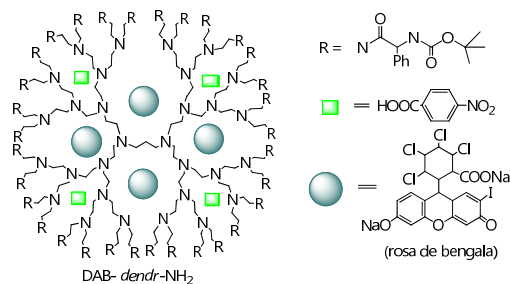


Figura I.2. Ejemplo de cajas dendríticas basadas en dendrímeros de PPI.

El número de moléculas huésped que pueden ser encapsuladas en un dendrímero está limitado por su estructura, sin embargo este número puede verse incrementado cuando se produce una interacción entre los grupos funcionales de la superficie del dendrímero y el fármaco. El número de grupos funcionales disponibles para la interacción con fármacos aumenta con cada generación. Los tipos de interacción existentes son (ver Figura I.3.): i) interacción electrostática entre fármaco y dendrímero^[41] y ii) unión covalente de fármacos al dendrímero.^[42]

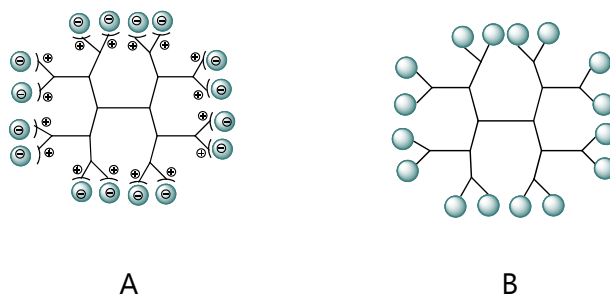


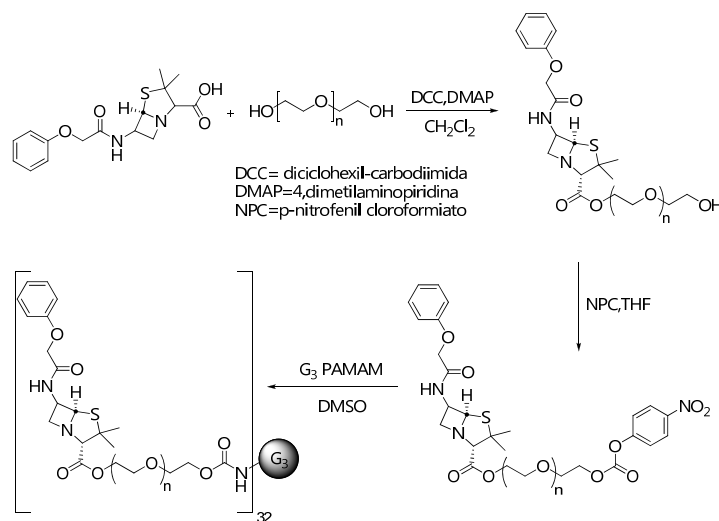
Figura I.3. Tipos de interacción entre dendrímero y fármaco:

(A) electrostática y (B) covalente.

Para que se produzca la unión electrostática, los grupos funcionales de la periferia del dendrímero deben ser ionizables. Este tipo de interacción suele

dotar a la macromolécula de suficiente solubilidad en agua. El fármaco que más extensamente se ha estudiado en el campo de la conjugación con sistemas PAMAM, es el antiinflamatorio no esteroideo Ibuprofeno. Se ha estimado que pueden interaccionar aproximadamente unas 40 moléculas de ibuprofeno con un dendrímero PAMAM de cuarta generación (con 128 grupos funcionales en la periferia) a pH 10.5, produciéndose una mejora considerable en la solubilidad del fármaco.^[43]

La unión covalente de fármacos a los grupos funcionales de la superficie dendrímica, a través de enlaces hidrolizables o biodegradables, permite un mayor control sobre la liberación del fármaco del que se tiene cuando la unión es de tipo electrostático. Un ejemplo es el ensayo llevado a cabo por el grupo de Yang y Lopina^[44], en el que se ha conjugado penicilina V con dendrímeros PAMAM de generaciones 2.5 y 3 (ver Esquema I.4.), a través de enlaces amida y éster, utilizando un espaciador de polietilenglicol (PEG). El uso de una unión tipo amida proporciona estabilidad, mientras que el enlace éster ofrece la posibilidad de la liberación controlada de la penicilina a través de una hidrólisis.



Esquema I.4. Conjugación de Penicilina V-4 a G₃ PAMAM.

Otro ejemplo de conjugación covalente es la unión de dendrímeros de Fréchet, que son sistemas poliariléter con grupos éster terminales, a residuos de folato.^[42] Se ha comprobado que un dendrímero de segunda generación, con 16 grupos éster, es capaz de conjugar una media de 12.6 residuos de folato, proporcionando un compuesto soluble a pH fisiológico. Estos conjugados se dirigen de forma específica a células tumorales, ya que en éstas los receptores de folato están sobreexpresados.

La facilidad con la que se puede modificar la superficie dendrímica, hace posible la unión de diferentes fármacos, sin embargo esto puede suponer una desventaja ya que se disminuye la solubilidad del conjugado. Este problema, en ocasiones, puede ser solucionado mediante la unión simultánea de cadenas de PEG (Polietilenglicol).^[45,46] Recientemente el grupo de Riguera y Fernández-Megía^[47] ha publicado la síntesis de dendrímeros vía click-chemistry funcionalizados en la periferia con cadenas de PEG y grupos sulfato, sulfonato o carboxilato que poseen demostrada actividad biológica. Estos sistemas anfífilicos se ordenan formando macromoléculas de polidispersidad muy baja, denominadas micelas PIC (micelas de complejos poliónicos estables), útiles para el transporte de fármacos de tamaño reducido.^[48]

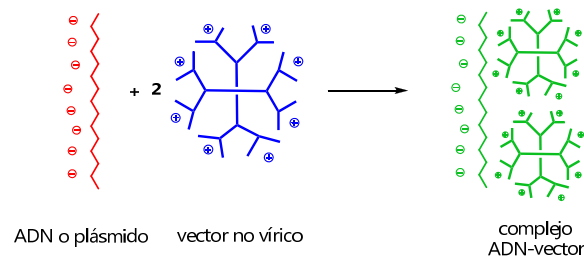
I.3.2. Dendrímeros en terapia génica.

La terapia génica (TG) se puede definir de forma sencilla como "la administración deliberada de material genético en tejido vivo con la intención de corregir un defecto genético específico". El objetivo de la transfección o internalización de material genético al interior celular, es modificar la expresión de un gen aumentándola o disminuyéndola. Para internalizar material genético como ADN o ARN en las células, fundamentalmente se utilizan dos métodos: i) uso de vectores virales y ii) uso de vectores no virales. Hasta ahora se han utilizado los vectores virales como una herramienta eficiente en el transporte de

material nucleico. Sin embargo su uso terapéutico está limitado debido a los riesgos que implica, tales como la posible respuesta inmune o inmunogenia,^[49,50] o la mutagénesis^[51] (inserción del material genético vírico en el genoma humano). De modo que los vectores no virales ofrecen una alternativa muy atractiva debido, fundamentalmente, a tres causas:

- Su síntesis puede ser fácilmente escalada y modificada.
- Presentan una gran flexibilidad con respecto al tamaño del material nucleico a transfectar.
- No provocan una respuesta inmune por parte del paciente, dato importante en el caso de ser administrados de manera continuada.

Sin embargo, hasta ahora los sistemas de transporte no virales han resultado ser menos efectivos que los virales, por eso sólo unos pocos han conseguido llegar a la fase de ensayo clínico. Los vectores no virales son a menudo especies catiónicas, de tal manera que el modo de actuación más común es a través de la interacción electrostática con biomoléculas cargadas negativamente (ver Esquema I.5.).



Esquema I.5. *Interacción electrostática entre un vector no vírico y material genético (ADN o plásmido).*

Para que una molécula sea aplicada como vehículo de transporte no viral, debe ser no tóxica, no inmunogénica y preferiblemente biodegradable.^[52] Los vehículos de transporte no víricos que más se han estudiado hasta ahora son los liposomas, los polímeros convencionales y los dendrímeros.

Liposomas catiónicos.

Los liposomas catiónicos son microesferas compuestas por una membrana lipídica que rodea un medio acuoso interno. Los primeros trabajos con lípidos catiónicos se remontan al año 1987 en los que se describía la utilización *in vitro* del sistema catiónico DOTMA (ver Figura I.4.), cuya actividad de transfección era de 5 a 100 veces mayor que la de los vehículos no virales utilizados hasta ese momento, como el fosfato de calcio y el dextrano.^[53] Desde entonces se ha desarrollado una gran variedad de lípidos catiónicos para la transferencia de ácidos nucleicos, un ejemplo de ellos son los sistemas CTAB y DMRIE (Figura I.4.).

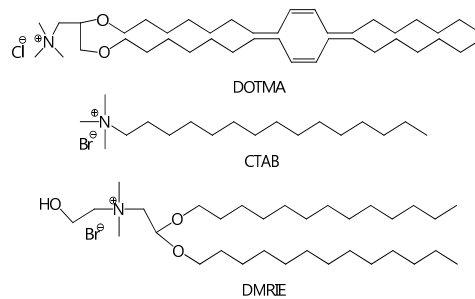


Figura I.4. *Liposomas catiónicos.*

Generalmente un lípido catiónico consta de una cabeza polar, en la que las cargas positivas las aportan uno o varios grupos amonio cuaternario y una cola hidrofóbica, que suele estar compuesta por cadenas hidrocarbonadas, saturadas o insaturadas, de tal forma que pueden interactuar con las cargas negativas de la molécula de ADN formando un complejo estable llamado lipoplejo o "*lipoplex*".

Las ventajas que presentan los liposomas catiónicos son:

- Protegen al material nucleico a transfectar de la degradación hasta su llegada al núcleo.
- Presentan una gran versatilidad con respecto al tamaño del ADN que pueden transportar.
- Es posible incluir en su estructura receptores específicos de la membrana lipídica, lo que hace que puedan ser dirigidos a tejidos de forma selectiva.

Sin embargo, como desventaja presentan: i) baja eficacia en la transfección, ii) baja solubilidad debido a la hidrofobia de su resto apolar, iii) cierto grado de toxicidad celular y iv) cierta inhibición por interacción con proteínas del suero.^[54]

Polímeros convencionales catiónicos.

Otro tipo de vectores no virales utilizados en terapia génica son los polímeros convencionales de naturaleza catiónica, los cuales pueden interaccionar con ADN formando complejos que se denominan poliplejos o "polyplexes".

Uno de los primeros sistemas de este tipo utilizados en terapia génica como vehículo de transporte no viral fue la polilisina (ver Figura I.5.), que es un polímero lineal biodegradable, propiedad importante para su uso en ensayos *in vivo*.^[55] Este polímero se convierte en una especie catiónica a través de la autoprotónación en agua.

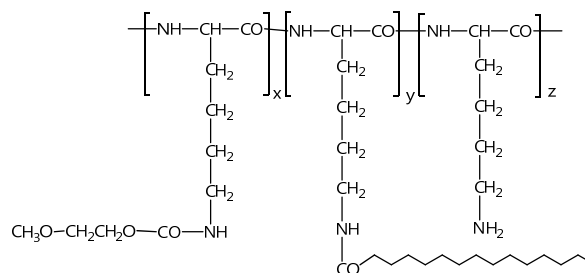


Figura I.5. Estructura de poli-L-lisina.

Sin embargo la polilisina presenta una elevada toxicidad, por lo que su uso se sustituyó por el de otro tipo de materiales poliméricos catiónicos basados en polietilenimina (PEI), que además de poseer una toxicidad menor presentan una mayor eficacia en la transfección. PEI es un polímero constituido por unidades repetidas de etilenamina^[56-58] (ver Figura I.6.), que al igual que la polilisina, sufre autoprotónación en medio acuoso proporcionando la especie catiónica.

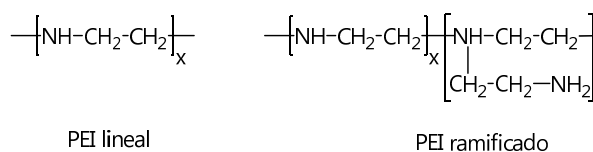


Figura I.6. Polímeros basados en polietilenimina.

Ambas estructuras catiónicas presentan alta solubilidad en agua y en la mayoría de los disolventes polares. Sin embargo, uno de los problemas que presentan es su elevada polidispersidad y esto es un factor relevante en cuanto a la evaluación de la toxicidad y a la eficacia de la transfección.^[57]

Dendrímeros catiónicos.

Las propiedades únicas de los dendrímeros, tales como su multivalencia, arquitectura globular altamente ramificada y su bien definido tamaño y peso molecular, es decir, su monodispersidad, hacen de ellos una clase de materiales

muy interesante para su uso como transportadores de material genético. Al complejo formado por un dendrímero catiónico y ADN o ARN se le denomina dendriplejo o "*dendriplex*".

Los primeros dendrímeros que se utilizaron para el transporte de material genético fueron los denominados PAMAM.^[59] Estas macromoléculas dendríticas generalmente se construyen a partir un núcleo de etilendiamina o amoniaco con cuatro o tres puntos de ramificación, respectivamente (ver Figura 1.7.).

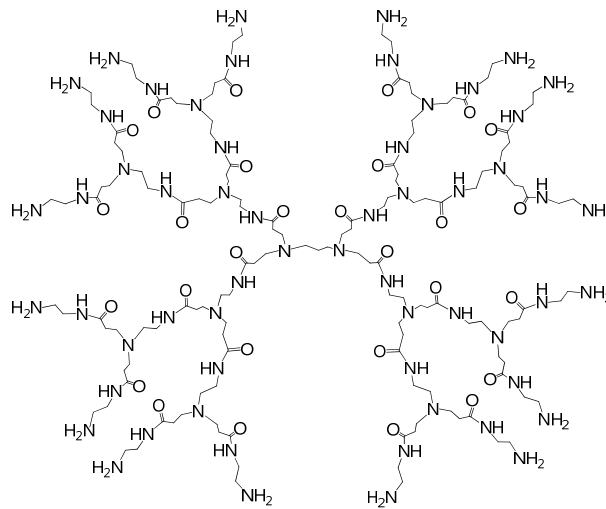


Figura 1.7. Dendrímero PAMAM de segunda generación.

Los dendrímeros PAMAM han demostrado ser unos buenos agentes de transfección debido a su elevada biocompatibilidad, no son tóxicos *in vitro*, son no inmunogénicos y a pH fisiológico se pueden solubilizar a través de la protonación parcial de los grupos amino terminales (aproximadamente se protona un 30%). Para protonar los grupos amino terciarios, debido a su relativamente bajo pKa, sería necesario un pH inferior al fisiológico. Por otro lado, los dendrímeros PAMAM son capaces de formar complejos estables con un gran número de biomoléculas, lo que hace que sean unas herramientas de gran interés en procesos terapéuticos.^[30,60,61]

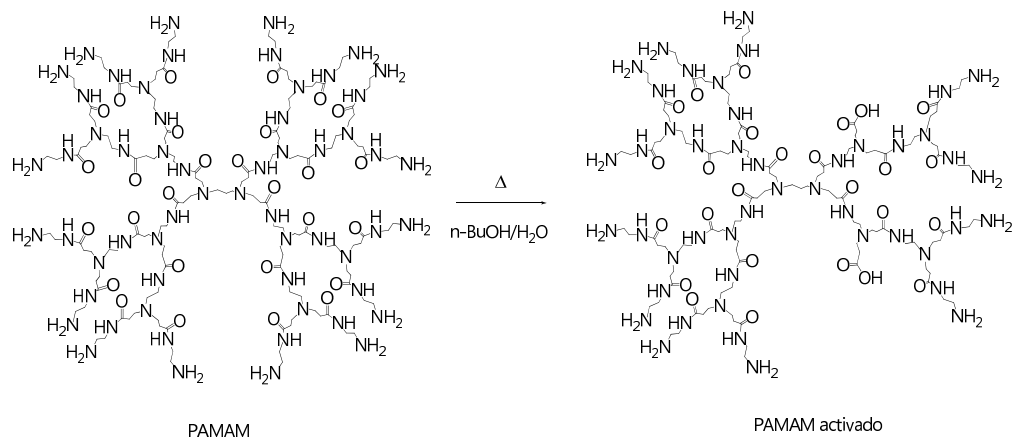
En el año 1993, Haensler y Szoka^[62] demostraron la elevada capacidad de los dendrímeros PAMAM para actuar como vehículos de transfección no virales. Utilizando plásmidos marcados con luciferasa y β -galactosidasa, determinaron que la eficiencia de la transfección depende tanto de la relación de cargas del complejo formado entre el dendrímero y el ADN, como del tamaño de la macromolécula. El resultado de estos estudios concretó que la mayor eficacia en la transfección de plásmido marcado se obtenía cuando la relación de cargas era 6/1 (grupos amino/fosfato) y con dendrímeros de cuarta generación o superior. Al reducir la relación de carga a 1/1 la eficacia de la transfección disminuía 2 ó 3 órdenes de magnitud.

Por otro lado, el grupo de Roberts^[63] llevó a cabo un estudio sobre propiedades biológicas de estos dendrímeros tales como la toxicidad *in vitro* e *in vivo*, inmunogenicidad y biodistribución. Los ensayos se llevaron a cabo con dendrímeros de 3^a, 5^a y 7^a generación, no encontrándose signos de inmunogenicidad en ninguno de ellos, pero sí se encontró una dependencia de la toxicidad con la generación, de modo que ésta aumenta al crecer el dendrímero. Así, el único que mostró posibles problemas de toxicidad fue el dendrímero de séptima generación.

La estabilidad de los complejos formados por dendrímeros PAMAM y oligonucleótidos (fragmentos de ADN de menor tamaño que los plásmidos), fue evaluada por Juliano y colaboradores,^[64,65] tanto en cultivos celulares como *in vivo*. Estos estudios confirmaron la alta eficacia en la transfección y la baja toxicidad que se había demostrado con anterioridad para este tipo de complejos dendrímero-ADN. Además, este grupo de investigación demostró que comparado con el oligonucleótido sólo, el complejo formado por el oligonucleótido y el dendrímero puede ser fácilmente transportado al núcleo celular y, como consecuencia de la formación del complejo dendrímero-oligonucleótido, la carga positiva del dendrímero, que es la responsable de la

toxicidad de estos compuestos, se ve neutralizada parcialmente, por lo que los efectos citotóxicos también disminuyen.

La utilización de dendrímeros con superficies muy saturadas de grupos terminales disminuye la eficacia del proceso de transfección. Se ha observado que dendrímeros PAMAM parcialmente fragmentados se muestran más eficaces en el proceso de transporte de material nucleico, debido a lo que se conoce como efecto paraguas.^[32,66] Este hecho posiblemente esté relacionado con la mayor flexibilidad estructural que se obtiene cuando estas macromoléculas se degradan parcialmente por tratamiento térmico en agua o en cualquier disolvente solvolítico como 1-butanol, 2-butanol, etc., (Esquema I.6.), de modo que estos dendrímeros están menos impedidos estéricamente, lo que permite una mayor compactación con el ADN a transfectar. Existen en el mercado kits basados en esta tecnología de degradación parcial dendrímica, como son los sistemas SuperFect™ y PolyFect™ que han demostrado ser eficientes en procesos de transfección.



Esquema I.6. Degradación parcial de un dendrímero PAMAM.

Otra familia de dendrímeros relevantes en terapia génica, se basan en unidades de polipropilenimina (PPI), con un núcleo de diamino butano (DAB).

El grupo de Uchegbu^[67,68] y, posteriormente el de Meijer,^[69] han evaluado la capacidad de estos dendrímeros para actuar como agentes de transfección. En este caso, también se ha encontrado una dependencia entre toxicidad y generación similar a la de los dendrímeros PAMAM. A medida que aumenta la generación, los dendrímeros van siendo más tóxicos y además disminuye la citotoxicidad al combinarse con el material genético. A diferencia de lo que ocurre con los dendrímeros PAMAM, en el caso de los PPI son los de más baja generación (G_2), los que mejores resultados han proporcionado en transfección.^[67]

La eficiencia relativa y la disponibilidad comercial de las macromoléculas dendríticas tipo PAMAM y PPI, ha supuesto que estos materiales y sus derivados hayan dominado el área del uso de dendrímeros en terapia génica hasta ahora. No obstante se están desarrollando otros sistemas dendríticos alternativos.

Majoral y colaboradores^[70] han preparado dendrímeros de fósforo, los cuales también se están aplicando en el ámbito de la terapia génica. La característica más importante de estos dendrímeros es su estabilidad térmica, que depende de los grupos terminales situados en la periferia del dendrímero, aunque prácticamente no se ve afectada por la generación.^[71] Además, estos sistemas son solubles en un amplio rango de pH.

Como agentes de transfección,^[72] se han probado las generaciones 1-5 de dendrímeros que contienen grupos amonio terminales, para la transfección del plásmido de la luciferasa en células de mamíferos, observándose un incremento de la transfección para las generaciones 1 a 3, mientras que a partir de la tercera generación, se produce una estabilización en la eficiencia de la transfección.^[73] De modo que las generaciones más altas ($G_3 - G_5$) con grupos amonio terminales, son las más eficientes en el proceso de transfección, siendo esta actividad similar a la de los dendrímeros PPI que es uno de los "estándares

químicos" más utilizado como referencia en transfección. Además la capacidad de transfección de estos dendrímeros depende de la naturaleza de las aminas terminales, de modo que las formas protonadas ($-NH_2$) son más eficientes que las metiladas ($-NMe_2$). Por otro lado, si el proceso de transfección se lleva a cabo en presencia de suero, la eficiencia de la transfección no se ve afectada por las proteínas séricas.^[72,73]

Además de estos tipos de dendrímeros existen otras familias que están siendo estudiadas como agentes de transfección en terapia génica como los dendrímeros anfífilicos con unidades lipofílicas e hidrofílicas unidas a un núcleo rígido publicados por Diederich y colaboradores^[74] o los sintetizados por el grupo de Rakoczy^[75] los cuales están compuestos por unidades amino-ácido lipofílicas. En la bibliografía también están descritas otras familias de dendrímeros con esqueleto carbosilano funcionalizados con grupos amino,^[76,77] que han demostrado ser herramientas útiles en procesos de transfección.^[78]

1.3.3. Dendrímeros como agentes terapéuticos.

Como ya se ha comentado, una de las aplicaciones más interesantes de los dendrímeros en nanomedicina es como vectores capaces de transportar agentes que tienen un propósito determinado. Por otro lado, las propiedades únicas de los sistemas dendriméricos tales como monodispersidad, multivalencia, forma, etc., pueden hacer que los dendrímeros actúen como fármacos por sí mismos. La multivalencia de estas macromoléculas es una característica esencial para que éstos puedan actuar como agentes terapéuticos, ya que la presencia de muchos grupos funcionales en la superficie dendrimérica facilita la interacción múltiple con el disolvente, membranas celulares o receptores de biomoléculas. Como consecuencia de la presencia de múltiples grupos funcionales, los dendrímeros tienden a presentar mayor solubilidad, reactividad y capacidad para unir moléculas. Esto repercute positivamente en el uso de los mismos en aplicaciones biomédicas ya que la unión múltiple a través

de efectos cooperativos puede aumentar la afinidad, aidez y especificidad de estas uniones.^[79]

Los dendrímeros se están estudiando como agentes terapéuticos en diferentes campos, algunos ejemplos son como agentes antivirales, antibacterianos, antipriónicos y como anticancerígenos (por ejemplo en terapia fotodinámica y en terapia de captura de neutrones por parte de átomos de boro). A continuación se resumen brevemente estas aplicaciones.

Agentes antivirales.

En los últimos años los dendrímeros están emergiendo como potenciales agentes antivirales, en especial para el tratamiento de enfermedades de transmisión sexual debidas al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)^[80] y al Virus de Herpes Simplex (VHS).^[81] Los dendrímeros con los que se empezó a trabajar eran de naturaleza PAMAM aniónicos con grupos sulfonato terminales y dendrímeros de tipo PPI, sin embargo ambos fueron descartados posteriormente a favor de macromoléculas basadas en polilisina debido a que, a pesar de poseer una actividad biológica similar, las condiciones sintéticas de estos son menos problemáticas.

Agentes antibacterianos.

De nuevo, la multivalencia de la superficie dendrimérica es muy útil para la unión de biocidas, lo que se puede utilizar para diseñar nuevos sistemas antimicrobianos efectivos.^[82] Por lo general, se trata de dendrímeros de naturaleza catiónica que se adhieren a la membrana bacteriana desestabilizándola, de modo que como consecuencia de esta unión la bacteria muere. Los dendrímeros PPI con grupos alquilamonio (Figura I.8.), son los que mejores resultados bactericidas han demostrado frente a bacterias tanto Gram+ como Gram-.^[83] Además, en este estudio se determinó que la actividad

antibacteriana depende de factores tales como la generación, la longitud de las cadenas hidrofóbicas de los grupos amonio y la naturaleza del contraión.

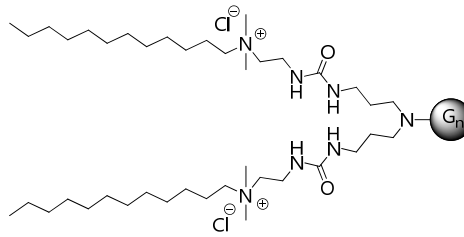


Figura I.8. Estructura de un dendrímero PPI antibacteriano.

Agentes antipriónicos.

Majoral y colaboradores^[73] demostraron en el año 2004 que los dendrímeros que contienen fósforo poseen una actividad antipriónica elevada. Los resultados obtenidos en estos estudios confirmaron las observaciones preliminares realizadas por el grupo de Scott y Prusiner con dendrímeros PAMAM y polímeros PEI.^[84,85]

En los capítulos centrales de esta memoria se llevará a cabo una profundización mayor sobre la posible aplicación de los dendrímeros como agentes antivirales, antibacterianos y antipriónicos.

Terapia fotodinámica.

Otra de las aplicaciones de los dendrímeros como agentes terapéuticos en sí, es la técnica de terapia fotodinámica (PDT), que es muy atractiva para el tratamiento del cáncer debido a que es menos invasiva que las técnicas actuales.^[86,87] La técnica PDT presenta múltiples ventajas con respecto a otros tratamientos contra el cáncer, ya que por lo general, la quimioterapia suele afectar tanto a los tejidos dañados como a los tejidos sanos. En este sentido PDT minimiza las secuelas porque la irradiación del tejido es selectiva y los fotosensibilizadores son inocuos en ausencia de luz láser.

El grupo de Edwards^[88] fue el primero en utilizar un dendrímero para esta técnica. Se trata de un dendrímero de poliamida con ácido 5-aminolevulínico (ALA) que es un precursor natural del fotosensibilizador protoporfirina IX. La mayoría de los fotosensibilizadores tienen escasa solubilidad en agua, por lo que suelen formar agregados que pueden disminuir la eficacia de la PDT.

Otro ejemplo son las porfirinas sustituidas con dendrones de tipo Fréchet^[89] (DPZns, Figura I.9.) que constituyen uno de los materiales más prometedores, ya que la funcionalización con cuñas dendríticas suficientemente grandes del anillo porfirínico, previene la formación de agregados aumentando la solubilidad en agua.

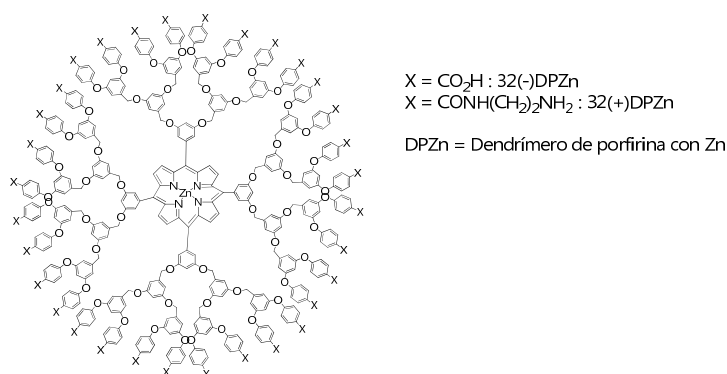


Figura I.9. Anillo de porfirina con núcleo de Zn, funcionalizado con dendrones de Fréchet.

Terapia de captura de neutrones por parte de átomos de boro (BNCT).

En los casos en los que el tumor es inoperable, se utiliza para su tratamiento la técnica denominada terapia de captura de neutrones por parte de átomos de boro (BNCT). Se trata de una terapia que consiste en la destrucción selectiva de tejidos mediante la irradiación de los átomos de ¹⁰B (que se encuentran aproximadamente en un 20% en el boro natural) con neutrones de baja energía térmica. Para que esta terapia sea eficiente es necesario localizar un gran número de átomos de ¹⁰B en el tejido diana. Además

el agente portador de ^{10}B debe ser selectivo y con baja citotoxicidad. Así, los dendrímeros son compuestos adecuados para ser utilizados como transportadores de boro debido a su estructura y a su multivalencia. El primer ejemplo de macromoléculas dendríticas que contienen boro fue sintetizado por el grupo de Barth.^[90] Se trata de dendrímeros PAMAM de segunda y cuarta generación, que contienen en la periferia el borano poliédrico $[\text{Na}(\text{CH}_3)_3\text{NB}_{10}\text{H}_8\text{NCO}]$. Para dirigir de forma efectiva estos sistemas hacia los tumores, se modificó la estructura del dendrímero introduciendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), ya que la mayoría de los gliomas expresan en gran proporción los receptores de EGF.^[91] Además, se puede unir a este dendrímero un grupo dansilo para poder monitorizarlo por espectrofluorimetría y una cadena de PEG para favorecer su solubilidad (Figura I.10.).

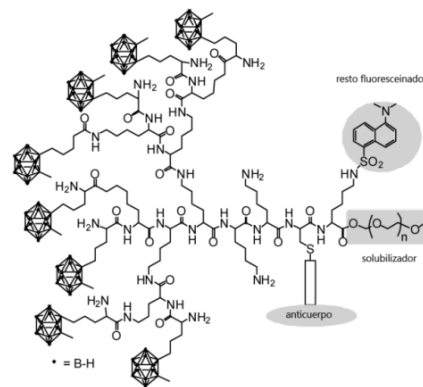


Figura I.10. Agente dendrítico para BNCT polifuncional.

Los estudios *in vivo* demuestran que tras la inyección intratumoral, el dendrímero se encontraba unas 10 veces más concentrado en las células tumorales que en las células sanas. Esto probablemente sea debido al efecto EPR (Efecto de Mejora de la Permeabilidad y Retención).^[92,93]

I.3.4. Dendrímeros aplicados al diagnóstico.

La formación de imágenes es una herramienta de gran utilidad en el campo de la nanomedicina, ya que proporciona información acerca del estado nativo de una gran cantidad de tejidos de forma no invasiva.

En los últimos años se están utilizando los dendrímeros como agentes de contraste^[94-96] para la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) *in vivo*. MRI es una técnica basada en la resonancia magnética nuclear con la que se puede dibujar un mapa de la densidad de protones midiendo los tiempos de relajación de los mismos. Las características de un buen agente de contraste son la biocompatibilidad, baja toxicidad y elevados tiempos de relajación T2 (tiempo de relajación transversal), lo que genera una buena relación señal/ruido, de modo que se realce la imagen. El aumento del tiempo de relajación T2 está relacionado con el tamaño, ya que las moléculas más grandes giran más despacio que las pequeñas, lo que hace que el intercambio con el protón del agua sea más lento, aumentando su tiempo de relajación.

Los agentes de contraste más utilizados hasta ahora para MRI clínica son los iones de Gd^{3+} y en menor proporción Mn^{2+} y Mn^{3+} . Éstos son muy tóxicos como iones libres, por lo que se suelen utilizar formando quelatos, sobre todo con los ácidos de la familia del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y del ácido (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) (DOTA).

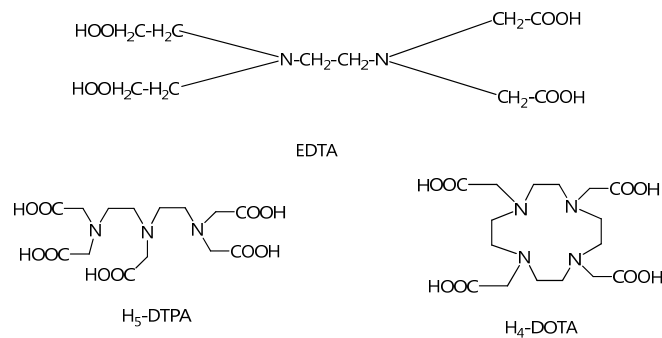


Figura I.11. Ligandos EDTA, H₅-DTPA y H₄-DOTA.

Debido a que su peso molecular no es elevado, estos quelatos difunden rápidamente hacia el exterior celular y son excretados fácilmente del torrente sanguíneo, esto hace que deban ser administrados en mayor cantidad. Los agentes de contraste dendríticos suponen una alternativa al uso de estos conjugados.^[35] El primer grupo en publicar el uso de dendrímeros como agentes de contraste MRI fue el de Wiener,^[97-99] que desarrolló una serie de quelatos del tipo [Gd(DTPA)] basados en dendrímeros PAMAM. Además, aprovechando el efecto de Mejora de la Permeabilidad y Retención (EPR),^[92,100] el tamaño de los dendrímeros permite su acumulación en tejido vascular no sano y su posterior visualización, lo que no sería posible con agentes de contraste de bajo peso molecular. Un ejemplo de estos dendrímeros es el denominado "Gadomer 17" (Figura I.12.), con átomos de Gd (III) en su superficie.

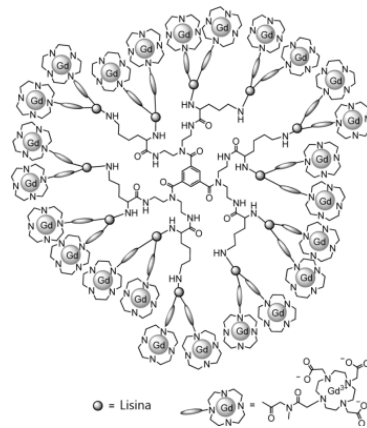


Figura I.12. Estructura del dendrímero "Gadomer 17".

Una forma diferente del uso de dendrímeros para el diagnóstico de enfermedades, es el que se lleva a cabo en el grupo de investigación de Riguera y Fernández-Megía,^[47] en el que se sintetizan dendrímeros constituidos por ácido trietilenglicolazido gálico (GATC), los cuales son capaces de formar las ya mencionadas micelas PIC, en las que se pueden transportar distintos agentes de contraste MRI.

Otra de las herramientas de diagnosis fundamental en medicina son los rayos-X. En esta técnica también son necesarios agentes de contraste, siendo los más adecuados los de elevado peso molecular, al igual que ocurre en MRI. Actualmente los dendrímeros están siendo estudiados como potenciales agentes de contraste para rayos-X. Krause y colaboradores han sintetizado un gran número de posibles agentes de contraste para rayos-X utilizando complejos organometálicos de bismuto y de estaño,^[101,102] basados en macromoléculas dendríticas.

La formación de imágenes microscópicas *in vivo*, basada en la fluorescencia de dos-fotones excitados (TPEF), está generando gran interés debido a la alta resolución espacial que proporciona y, a la posibilidad de obtener imágenes en mayor profundidad. El primer sistema dendrimérico que

contenía fluoróforos de absorción de dos-fotones (TPA), fue desarrollado por el grupo de Fréchet en el año 2000.^[103] La baja toxicidad y elevada solubilidad de los dendrímeros abre las puertas al uso de éstos para la obtención de imágenes *in vivo*, de este modo funcionarían como “nanodots orgánicos”,^[104-106] en sustitución de los puntos cuánticos (quantum dots, QD's), que son los que más se han utilizado hasta ahora.

A lo largo de esta introducción, se ha intentado reflejar de forma resumida los trabajos más representativos que se han llevado a cabo con dendrímeros en nanomedicina. No obstante, las contribuciones publicadas sobre los temas que se han tratado, son mucho más extensas que las que aquí se recogen.

I.4. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis*, **1978**, 155-158.
- [2] D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.*, **1985**, *17*, 117-132.
- [3] A. M. Naylor, W. A. Goddard, G. E. Kiefer, D. A. Tomalia, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 2339-2341.
- [4] D. A. Tomalia, A. M. Naylor, W. A. Goddard, *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.*, **1990**, *29*, 138-175.
- [5] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, *33*, 43-63.
- [6] A. W. Bosman, H. M. Janssen, M. E.W., *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 1665-1688.
- [7] R. L. Lescanec, M. Muthukumar, *Macromolecules*, **1990**, *23*, 2280-2288.
- [8] K. T. Welch, S. Arevalo, J. F. C. Turner, R. Gómez, *Chemistry-a European Journal*, **2005**, *11*, 1217-1227.
- [9] P. G. Degennes, H. Herve, *J. Phys. Lett.*, **1983**, *44*, L351-L360.
- [10] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Chem. Soc.-Chem. Commun.*, **1990**, 1010-1013.
- [11] G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle, *VCH, Weinheim, Germany*, **1996**.
- [12] G.R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle., *Wiley-VCH, Weinheim, Germany*, **2001**.
- [13] J. M. J. Fréchet, D. A. Tomalia, *Dendrimers and other Dendritic Polymers*, Wiley, New York, **2001**.
- [14] R. G. Denkewalter, J. Kolc, W. J. Lukasavage, *US Pat 4, 289, 872*, **1981**.
- [15] R. G. Denkewalter, J. Kolc, W. J. Lukasavage, *US Pat 4, 360, 646*, **1982**.
- [16] R. G. Denkewalter, J. F. Kolc, W. J. Lukasavage, *US Pat 4, 410, 688*, **1983**.
- [17] G. R. Newkome, Z. Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.*, **1985**, *50*, 2003-2004.
- [18] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 7638-7647.
- [19] T. Kawaguchi, K. L. Walker, C. L. Wilkins, J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 2159-2165.

- [20] G. Labbe, B. Forier, W. Dehaen, *Chem. Commun.*, **1996**, 2143-2144.
- [21] F. Zeng, S. C. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5326-5327.
- [22] V. Maraval, J. Pyzowski, A. M. Caminade, J. P. Majoral, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 6043-6046.
- [23] J. W. J. Knapen, A. W. van der Made, J. C. de Wilde, J. P. W. N. M. van Leeuwen, P. Wikens, D. M. Grove, G. v. Koten, *Nature*, **1994**, *372*, 659-660.
- [24] Y. H. Niu, R. M. Crooks, *Comptes Rendus Chimie*, **2003**, *6*, 1049-1059.
- [25] A. C. Chang, J. B. Gillespie, M. B. Tabacco, *Anal. Chem.*, **2001**, *73*, 467-470.
- [26] G. R. Newkome, B. D. Woosley, E. He, C. N. Moorefield, R. Guthier, G. R. Baker, G. H. Escamilla, J. Merrill, H. Luftmann, *Chem. Commun.*, **1996**, 2737-2738.
- [27] E. Trevisiol, V. Le Berre-Anton, J. Leclaire, G. Pratviel, A. M. Caminade, J. P. Majoral, J. M. Francois, B. Meunier, *New J. Chem.*, **2003**, *27*, 1713-1719.
- [28] A. M. Caminade, V. Maraval, R. Laurent, C. O. Turrin, P. Sutra, J. Leclaire, L. Griffe, P. Marchand, C. Baudoin-Dehoux, C. Rebout, J. P. Majoral, *C. R. Chim.*, **2003**, *6*, 791-801.
- [29] A. M. Caminade, J. P. Majoral, *J. Mater. Chem.*, **2005**, *15*, 3643-3649.
- [30] R. Esfand, D. A. Tomalia, *Drug Discov. Today*, **2001**, *6*, 427-436.
- [31] C. Düfes, I. F. Uchegbu, A. G. Schatzlein, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 2177-2202.
- [32] C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. J. Fréchet, F. C. Szoka, *Nature Biotechnology*, **2005**, *23*, 1517-1526.
- [33] S. Svenson, D. A. Tomalia, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 2106-2129.
- [34] A. D'Emanuele, D. Attwood, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 2147-2162.
- [35] W. D. Jang, K. M. K. Selim, C. H. Lee, I. K. Kang, *Prog. Polym. Sci.*, **2009**, *34*, 1-23.
- [36] J. Jansen, E. W. Meijer, E. M. M. de Brabander van den Berg, *9th Rolduc Polymer Meeting on Smart Polymer Materials and Products* (Rolduc Abbey, Netherlands) **1995**, pp. 27-33.
- [37] J. Jansen, E. W. Meijer, E. M. M. De Brabander van den Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 4417-4418.

- [38] J. F. G. A. Jansen, E. M. M. de Brabander van den Berg, E. W. Meijer, *Polym. Mater. Sci. Eng.*, **1995**, *73*, 123-124.
- [39] M. S. Wendland, S. C. Zimmerman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 1389-1390.
- [40] L. G. Schultz, Y. Zhao, S. C. Zimmerman, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2001**, *40*, 1962-1966.
- [41] N. Malik, E. G. Evagorou, R. Duncan, *Anti-Cancer Drugs*, **1999**, *10*, 767-776.
- [42] K. Kono, M. J. Liu, J. M. J. Fréchet, *Bioconjugate Chem.*, **1999**, *10*, 1115-1121.
- [43] O. M. Milhem, C. Myles, N. B. McKeown, D. Attwood, A. D'Emanuele, *Int. J. Pharm.*, **2000**, *197*, 239-241.
- [44] H. Yang, S. T. Lopina, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, **2003**, *14*, 1043-1056.
- [45] O. M. Milhem, H. Mobedi, N. Day, N. B. McKeown, D. Attwood, A. D'Emanuele, *Proc. Int. Symp. Control. Release bioact. Mater.*, **2001**, *28*, 329-330.
- [46] O. M. Milhem, H. Mobedi, N. Day, N. B. McKeown, D. Attwood, A. D'Emanuele, *Polym. Mater. Sci. Eng.*, **2001**, *84*, 721-722.
- [47] E. Fernández-Megía, J. Correa, R. Riguera, *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 3104-3111.
- [48] A. Sousa-Herves, E. Fernández-Megía, R. Riguera, *Chem. Commun.*, **2008**, 3136-3138.
- [49] R. G. Crystal, *Science*, **1995**, *270*, 404-410.
- [50] S. K. Tripathy, H. B. Black, E. Goldwasser, J. M. Leiden, *Nat. Med.*, **1996**, *2*, 545-550.
- [51] M. Elfinger, S. Uezguen, C. Rudolph, *Curr. Nanosci.*, **2008**, *4*, 322-353.
- [52] R. Duncan, S. Dimitrijevic, E. G. Evagorou, *STP Pharma Sci.*, **1996**, *6*, 237-263.
- [53] P. L. Felgner, T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, M. Danielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1987**, *84*, 7413-7417.
- [54] G. McLachlan, B. J. Stevenson, D. J. Davison, D. J. Porteous, *Gene Ther.*, **2000**, *7*, 384-392.
- [55] M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Niidome, H. Aoyagi, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, *13*, 510-517.

- [56] L. Wightman, R. Kircheis, V. Rosseler, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kursa, E. Wagner, *J. Gene. Med.*, **2001**, 3, 362-372.
- [57] K. Kunath, A. v. Harpe, D. Fischer, H. Petersen, V. Bickel, K. Voight, T. Kissel, *J. Control. Release*, **2003**, 89, 113-125.
- [58] T. Merdan, K. Kunath, H. Petersen, V. Bakowsky, K. H. Voight, J. Kopecek, T. Kissel, *Bioconjugate Chem.*, **2005**, 16, 785-792.
- [59] C. S. Braun, J. A. Vetro, D. A. Tomalia, G. S. Koe, C. R. Middaugh, *J. Pharm. Sci.*, **2005**, 94, 423-436.
- [60] V. J. Venditto, C. A. S. Regino, M. W. Brechbiel, *Mol. Pharm.*, **2005**, 2, 302-311.
- [61] D. M. Cui, Q. W. Xu, S. X. Gu, J. L. Shi, X. M. Che, *African J. Pharm. Pharmacol.*, **2009**, 3, 227-233.
- [62] J. Haensler, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.*, **1993**, 4, 372-379.
- [63] J. C. Roberts, M. K. Bhalgat, R. T. Zera, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1996**, 30, 53-65.
- [64] R. DeLong, K. Stephenson, T. Loftus, M. Fisher, S. Alahari, A. Nolting, R. L. Juliano, *J. Pharm. Sci.*, **1997**, 86, 762-764.
- [65] H. Yoo, R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 4225-4231.
- [66] M. X. Tang, C. T. Redemann, F. C. Szoka, *Bioconjugate Chem.*, **1996**, 7, 703-714.
- [67] B. H. Zinselmeyer, S. P. Mackay, A. G. Schatzlein, I. F. Uchegbu, *Pharm. Res.*, **2002**, 19, 960-967.
- [68] A. J. Hollins, M. Benboubetra, Y. Omid, B. H. Zinselmeyer, A. G. Schatzlein, I. F. Uchegbu, S. Akhtar, *Pharm. Res.*, **2004**, 21, 458-466.
- [69] F. Tack, A. Bakker, S. Maes, N. Dekeyser, M. Bruining, C. Elissen-Roman, M. Janicot, M. Brewster, H. M. Janssen, B. F. M. De Waal, P. M. Franssen, X. Lou, E. W. Meijer, *J. Drug Target.*, **2006**, 14, 69-86.
- [70] N. Launay, A. M. Caminade, R. Lahana, J. P. Majoral, *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.*, **1994**, 33, 1589-1592.
- [71] C. O. Turrin, V. Maraval, J. Leclaire, E. Dantras, C. Lacabanne, A. M. Caminade, J. P. Majoral, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 3965-3973.
- [72] C. Loup, M. A. Zanta, A. M. Caminade, J. P. Majoral, B. Meunier, *Chem. Eur. J.*, **1999**, 5, 3644-3650.

- [73] J. Solassol, C. Crozet, V. Perrier, J. Leclaire, F. Beranger, A. M. Caminade, B. Meunier, D. Dormont, J. P. Majoral, S. Lehmann, *J. Gen. Virol.*, **2004**, *85*, 1791-1799.
- [74] M. Guillot-Nieckowski, S. Eisler, F. Diederich, *New J. Chem.*, **2007**, *31*, 1111-1127.
- [75] R. J. Marano, I. Toth, N. Wimmer, M. Brankov, P. E. Rakoczy, *Gene Ther.*, **2005**, *12*, 1544-1550.
- [76] P. Ortega, J. F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesús, F. J. de la Mata, G. Fernández, J. C. Flores, R. Gómez, M. J. Serramía, M. A. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 1388-1396.
- [77] J. F. Bermejo, P. Ortega, L. Chonco, R. Eritja, R. Samaniego, M. Mullner, E. de Jesús, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez, A. Muñoz-Fernández, *Chemistry-a European Journal*, **2007**, *13*, 483-495.
- [78] L. Chonco, J. F. Bermejo, P. Ortega, D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, B. Klajnert, F. J. de la Mata, R. Eritja, R. Gómez, M. Bryszewska, M. A. Muñoz-Fernández, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1886-1893.
- [79] M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **1998**, *37*, 2755-2794.
- [80] M. Witvrouw, V. Fikkert, W. Pluymers, B. Matthews, K. Mardel, D. Schols, J. Raff, Z. Debyser, E. De Clercq, G. Holan, C. Pannecoque, *Mol. Pharmacol.*, **2000**, *58*, 1100-1108.
- [81] N. Bourne, L. R. Stanberry, E. R. Kern, G. Holan, B. Matthews, D. I. Bernstein, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, *44*, 2471-2474.
- [82] C. Z. Chen, S. L. Cooper, *Biomaterials*, **2002**, *23*, 3359-3368.
- [83] C. Z. S. Chen, N. C. Beck-Tan, P. Dhurjati, T. K. van Dyk, R. A. LaRossa, S. L. Cooper, *Biomacromolecules*, **2000**, *1*, 473-480.
- [84] S. Supattapone, H. O. B. Nguyen, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, M. R. Scott, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, *96*, 14529-14534.
- [85] S. Supattapone, H. Wille, L. Uyechi, J. Safar, P. Tremblay, F. C. Szoka, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, M. R. Scott, *J. Virol.*, **2001**, *75*, 3453-3461.
- [86] R. K. Pandey, G. Zhang, *Porphyrin handbook*, New York: Academic Press, **2000**, *6*, 157-230.
- [87] I. J. MacDonald, T. J. Dougherty, *J. Porphyr. Phthalocyanines*, **2001**, *5*, 105-129.

- [88] S. H. Battah, C. E. Chee, H. Nakanishi, S. Gerscher, A. J. MacRobert, C. Edwards, *Bioconjugate Chem.*, **2001**, *12*, 980-988.
- [89] G. D. Zhang, A. Harada, N. Nishiyama, D. L. Jiang, H. Koyama, T. Aida, *J. Control. Release*, **2003**, *93*, 141-150.
- [90] R. F. Barth, D. M. Adams, A. H. Soloway, F. Alam, M. V. Darby, *Bioconjugate Chem.*, **1994**, *5*, 58-66.
- [91] J. Capala, R. F. Barth, M. Bendayan, M. Lauzon, D. M. Adams, A. H. Soloway, R. A. Fenstermaker, J. Carlsson, *Bioconjugate Chem.*, **1996**, *7*, 7-15.
- [92] H. Kobayashi, M. W. Brechbiel, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 271.
- [93] Y. Matsamura, H. Maeda, *Cancer Res.*, **1986**, *46*, 6387-6392.
- [94] E. C. Wiener, M. W. Brechbiel, H. Brothers, R. L. Magin, O. A. Gansow, D. A. Tomalia, P. C. Lauterbur, *Magn. Reson. Med.*, **1994**, *31*, 1-8.
- [95] L. D. Margerum, B. K. Campion, M. Koo, N. Shargill, J. J. Lai, A. Marumoto, P. C. Sontum, *21st Rare Earth Research Conference* (Duluth, Mn) **1996**, pp. 185-190.
- [96] H. Kobayashi, M. W. Brechbiel, *Mol. Imaging*, **2003**, *2*, 1-10.
- [97] H. Kobayashi, S. Kawamoto, S. K. Jo, H. L. Bryant, M. W. Brechbiel, R. A. Star, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 388-394.
- [98] S. J. Wang, M. Brechbiel, E. C. Wiener, *Invest. Radiol.*, **2003**, *38*, 662-668.
- [99] S. Laus, A. Sour, R. Ruloff, E. Toth, A. E. Merbach, *Chem.-Eur. J.*, **2005**, *11*, 3064-3076.
- [100] E. Fernández-Megía, J. Correa, I. Rodríguez-Meizoso, R. Riguera, *Macromolecules*, **2006**, *39*, 2113-2120.
- [101] W. Krause, N. Hackmann-Schlichter, F. K. Maier, R. Muller, *Topics Curr. Chem.*, **2000**, *210*, 261-308.
- [102] H. Schumann, B. C. Wassermann, S. Schutte, J. Velder, Y. Aksu, W. Krause, B. Raduchel, *Organometallics*, **2003**, *22*, 2034-2041.
- [103] A. Adronov, J. M. J. Fréchet, *Chem. Commun.*, **2000**, 1701-1710.
- [104] T. R. Krishna, M. Parent, M. H. V. Werts, L. Moreaux, S. Gmouh, S. Charpak, A. M. Caminade, J. P. Majoral, M. Blanchard-Desce, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2006**, *45*, 4645-4648.

[105] O. Mongin, T. R. Krishna, M. H. V. Werts, A. M. Caminade, J. P. Majoral, M. Blanchard-Desce, *Chem. Commun.*, **2006**, 915-917.

[106] O. Mongin, C. Pouxel, A. C. Robin, A. Pla-Quintana, T. R. Krishna, G. Recher, F. Tiaho, A. M. Caminade, J. P. Majoral, M. Blanchard-Desce, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **2008**, 7040.



CAPÍTULO II

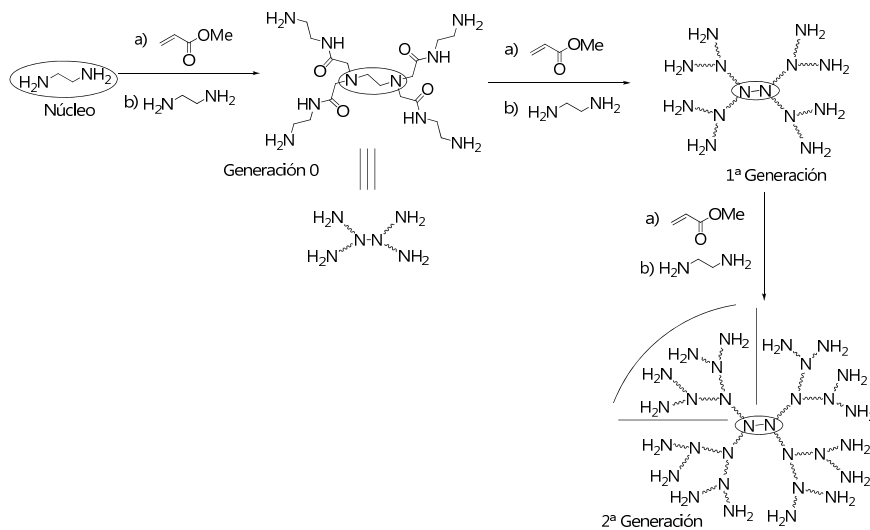
“DENDRÍMEROS CARBOSILANO CATIÓNICOS”

II.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

II.1.1. Síntesis de dendrímeros catiónicos.

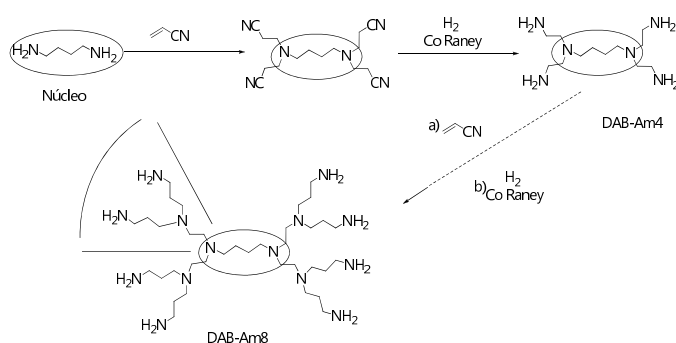
Los dendrímeros catiónicos que, hasta ahora más han sido estudiados en procesos biomédicos son los denominados PAMAM, los PPI y los dendrímeros que contiene átomos de fósforo. En los últimos años, los dendrímeros de tipo carbosilano han despertado un gran interés en este ámbito. Todos ellos tienen en común que presentan grupos amino terminales susceptibles de ser cuaternizados con distintos agentes cuaternizantes como HCl, MeI, etc. A continuación, se describirán brevemente los distintos métodos que existen en la bibliografía para la introducción de estos grupos amino:

- Los dendrímeros PAMAM se construyen a partir de un núcleo de etilendiamina o amino que contienen cuatro y tres puntos de ramificación, respectivamente.^[1] La adición de Michael de metacrilato al núcleo, seguida de amidación de los grupos éster formados en la etapa previa, conducen, a través de un mecanismo divergente, a la obtención de funcionalidades amino en la periferia del dendrímero (ver Esquema II.1.). La repetición sucesiva de las reacciones de adición y amidación permite obtener macromoléculas con un elevado número de grupos amino en la superficie, los cuales, tal y como ya se comentó en el Capítulo I de esta memoria, a pH fisiológico, proporcionan dendrímeros catiónicos mediante la protonación parcial de los grupos amino terminales. Por otro lado, se ha demostrado que la metilación de los grupos amino terciarios internos en los dendrímeros PAMAM con grupos hidroxilo terminales (PAMAM-OH) les confiere un mayor carácter catiónico, lo que les permite una interacción electrostática más efectiva con ADN y plásmidos, siendo ésta mayor a medida que aumenta el grado de cuaternización.^[2]



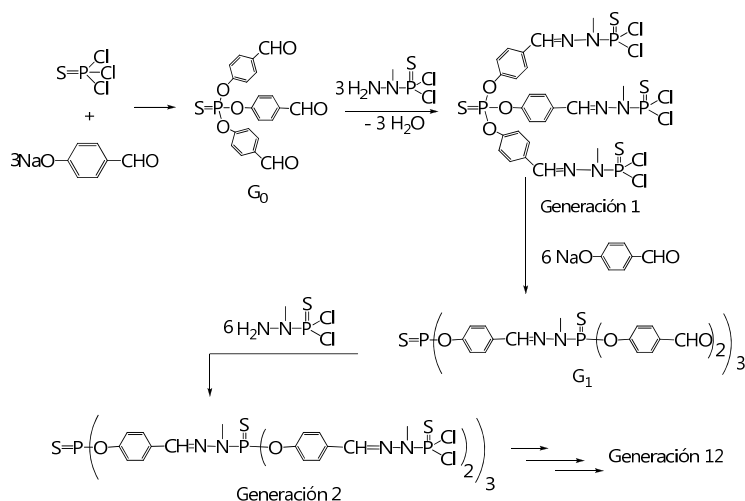
Esquema II.1. Síntesis divergente de dendrímeros PAMAM.

- Los dendrímeros de estructura polipropilenimino (PPI), se basan en la adición de Michael de acrilonitrilo a los grupos amino primarios del núcleo de butilendiamina (DAB), seguida de una hidrogenación de los grupos nitrilo para proporcionar grupos amino primarios terminales.^[3,4] Al igual que ocurre con los dendrímeros PAMAM, estos sistemas sufren autoprotoneación en agua de los grupos amino en función del pH (ver Esquema II.2.). Además, existen en la bibliografía estudios que demuestran que la cuaternización de los grupos amino primarios no sólo aumenta la solubilidad de estos compuestos, sino que les confiere la capacidad de actuar como vehículos de transporte y de liberar fármacos de forma controlada en función del pH.^[5]



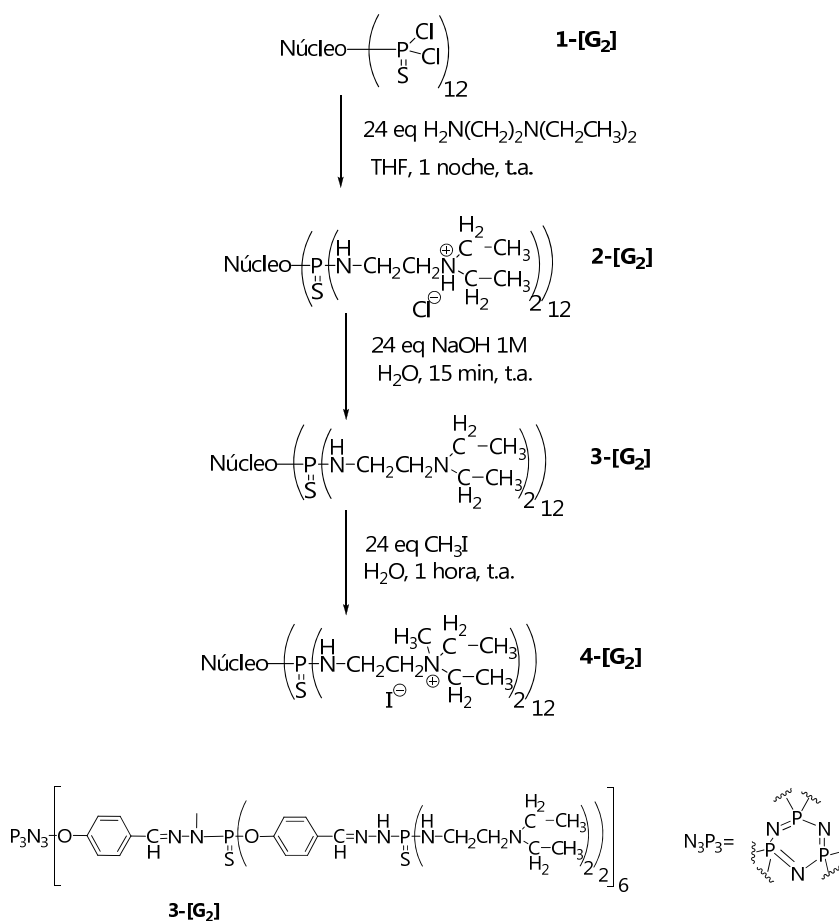
Esquema II.2. Síntesis de dendrímeros PPI.

- La síntesis de los dendrímeros de fósforo se basa en la repetición de dos etapas consecutivas. La primera de ellas es la reacción de un núcleo que contiene "n" equivalentes de *p*-hidroxibenzaldehído y la segunda, la condensación de la funcionalidad aldehído con $\text{H}_2\text{N}-\text{N}(\text{Me})-\text{P}(\text{S})\text{Cl}_2$. Esquema II.3.



Esquema II.3. Síntesis de dendrímeros de fósforo.

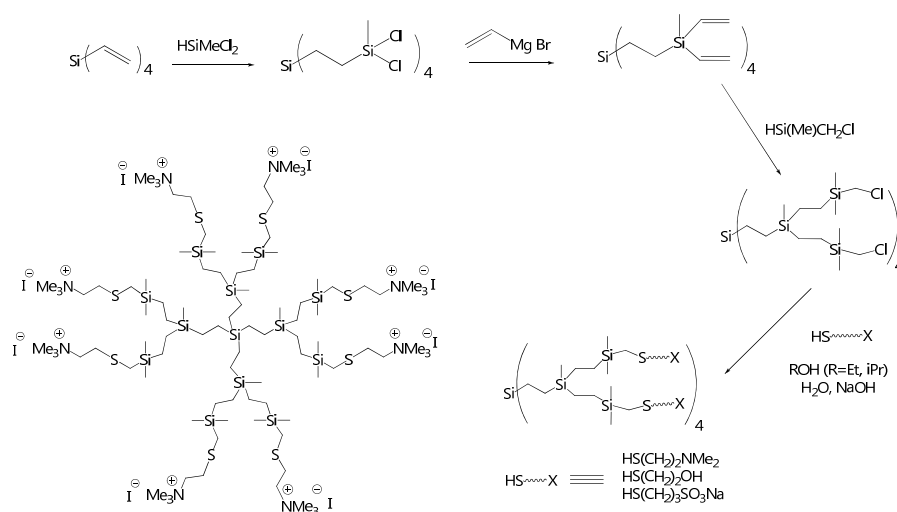
Estos dendrímeros contienen un esqueleto hidrofóbico funcionalizado con grupos $\text{P}(\text{S})\text{Cl}_2$ o CHO, los cuales también son hidrofóbicos. No obstante los sistemas dendríticos adquieren carácter soluble cuando los grupos funcionales soportan una carga, ya sea positiva (ver Esquema II.4.), o negativa.



Esquema II.4. Preparación de dendrímeros de fósforo metilados con ioduro como contraión.

• La obtención de dendrímeros carbosilano^[6] se realiza a través de una síntesis divergente basada en la secuencia iterativa de dos reacciones: alquenilación con reactivos de Grignard e hidrosililación con clorosilanos. La etapa de alquenilación se lleva a cabo con vinilmagnesio o alilmagnesio, mientras que la hidrosililación se produce con HSiMeCl₂ o HSiCl₃, si se trata de aumentar la generación, o bien con HSiMeCH₂Cl o HSiMe₂Cl para funcionalizar la periferia. Para esta funcionalización se utilizan diferentes aminas como pueden ser aminotioles^[6] (ver Esquema II.5.) y alcoholaminas.^[7] La

cuaternización de estos grupos amino terminales conduce a la formación de dendrímeros carbosilano solubles en agua.



Esquema II.5. Síntesis de dendrímeros carbosilano publicada por Seyferth.

Un caso particular de dendrímeros carbosilano, son los sintetizados por nuestro grupo de investigación.^[8] Estas macromoléculas se construyen a partir de dendrímeros precursores que contienen enlaces Si-Cl terminales,^[9-12] a través de un proceso de dos etapas:

- Alcoholisis de los enlaces terminales Si-Cl de los dendrímeros de partida con diferentes amino alcoholes como HO(CH₂)₂NMe₂.
- Cuaternización de las funcionalidades amino con MeI, lo que conduce a la formación de dendrímeros con grupos amonio terminales solubles en agua.

- Otro tipo de sistemas catiónicos que se están aplicando en terapia génica, como vehículos de transporte no virales, son los dendrones sintetizados por el grupo de Smith,^[13,14] los cuales utilizan como base los sistemas de Newkome,^[15-17] funcionalizados con grupos espermina en la periferia (ver Figura II.1.).

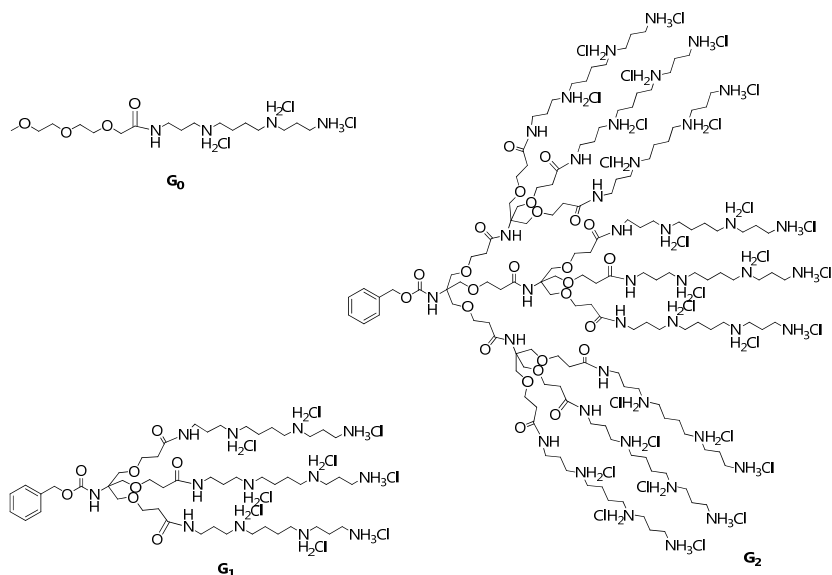


Figura II.1. Esperminas multivalentes dendríticas estudiadas como agentes de transfección.

II.2. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO.

Los dendrímeros carbosilano sintetizados hasta ahora por nuestro grupo de investigación poseen en su estructura enlaces Si-O, que se degradan paulatinamente en disolución acuosa.^[8] Es por este motivo, por el que se planteó como uno de los objetivos de este trabajo preparar una nueva familia de compuestos, en los que manteniendo las propiedades de solubilidad, dicho enlace fuera sustituido por uno que les confiriese mayor estabilidad en agua, como es un enlace Si-C.

II.2.1. Síntesis de dendrímeros precursores.

Los dendrímeros carbosilano precursores con grupos SiMe_2Cl , SiMeCl_2 , $\text{SiMe}(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2)_2$ o SiMe_2H en la periferia, se han preparado siguiendo los métodos descritos por Morán,^[11,18] van Leeuwen,^[9] Roovers^[10,19] y Seyferth.^[12]

Todos los dendrímeros se preparan a través de un método divergente mediante la repetición de dos reacciones: alquencilación utilizando reactivos de Grignard e hidrosililación con clorosilanos. Para las reacciones de hidrosililación se utilizó el catalizador de Speier.^[20]

Antes de continuar con la descripción de la síntesis de los dendrímeros carbosilano, 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.

De forma general los dendrímeros se nombrarán de acuerdo a la siguiente fórmula:



donde,

G: representa el esqueleto carbosilano.

n: se refiere a la generación, es decir, el número de capas que se han adicionado al núcleo central.

X: indica la naturaleza de los grupos funcionales que se localizan en la periferia del dendrímero.

m: representa el número de grupos funcionales terminales en el dendrímero.

En la Figura II.2., se muestra de modo esquemático la estructura del esqueleto carbosilano de estos sistemas:

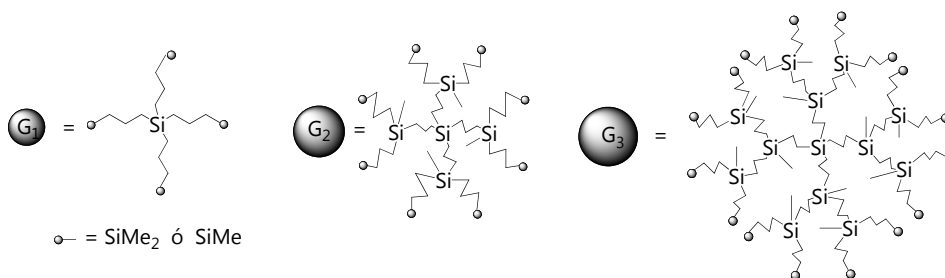


Figura II.2. Esqueleto carbosilano de los dendrímeros de generación 1-3.

Las generaciones son representadas en función del número de capas de Si en lugar del número de puntos de ramificación.

Un ejemplo de un dendrímero de segunda generación con enlaces Si-H terminales sería (ver Figura II.3.):

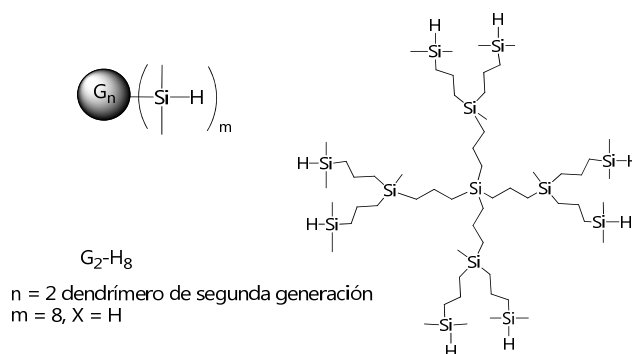


Figura II.3. Representación del dendrímero de segunda generación G_2-H_8 .

Para obtener dendrímeros carbosilano catiónicos solubles y estables en disolución acuosa, se han desarrollado dos estrategias fundamentales de síntesis:

- Hidrosililación de diferentes alilaminas con los dendrímeros carbosilano precursores que contienen enlaces Si-H terminales.
- Reacción de fenolisis de dendrímeros precursores que contienen enlaces Si-CH₂-Cl en la periferia con fenolaminas.

A continuación se hará un estudio detallado de los dendrímeros con grupos amino en la superficie, que son necesarios para la obtención de los dendrímeros catiónicos mediante cuaternización con diferentes agentes alquilantes, con los que se llevarán a cabo los ensayos biomédicos, realizados en este trabajo.

II.2.2. Dendrímeros funcionalizados mediante hidrosililación de la amina [(CH₂=CHCH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)].

Una vez sintetizados los dendrímeros precursores con grupos hidruro en la periferia se procedió a su funcionalización con N,N-dimetil-N'alil,N'etil-etilenodiamina [(CH₂=CHCH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)] **1**. Esta amina se ha elegido con el fin de obtener un enlace Si-C que es más estable termodinámicamente que el Si-O presente en los dendrímeros sintetizados con anterioridad en nuestro grupo de investigación, a la vez que se dispone de dos átomos de nitrógeno en cada rama del dendrímero, uno justo en la superficie y otro más interno.

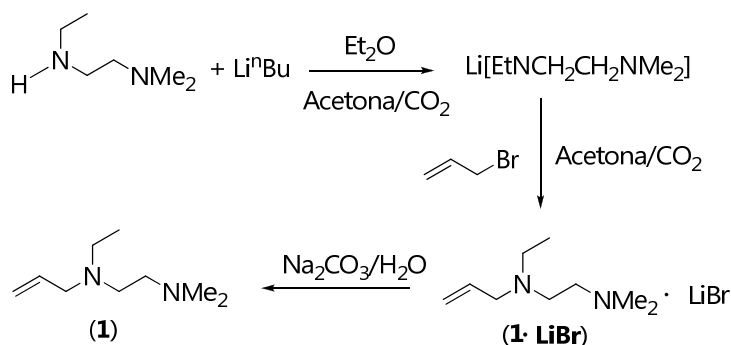
II.2.2.1. Estudio preparativo.

II.2.2.1.1. Síntesis de N,N-dimetil-N'alil,N'etil-etilenodiamina.

Esta diamina se prepara partiendo de la amina comercial N,N-dimetil-N'etil-etilenodiamina (EtNHCH₂CH₂NMe₂), la cual es tratada con ⁿBuLi en éter dietílico a -78°C. La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos, se procede entonces a enfriar de nuevo para añadir *in situ* bromuro de alilo (CH₂=CHCH₂Br).

Se obtiene así el aducto [(CH₂=CHCH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)]·LiBr **1·LiBr** como un sólido microcristalino blanco (en función de los datos de análisis elemental). El tratamiento de este compuesto con una disolución saturada de carbonato sódico en agua y la posterior extracción en dietil éter, proporciona la

alilamina **1**, libre de LiBr, que se aísla como un aceite transparente volátil con un rendimiento del 40% (ver Esquema II.6). El análisis posterior de los dos productos por ^1H -RMN en CDCl_3 confirma la existencia de las dos especies.



Esquema II.6. Síntesis de *N,N*-dimetil-*N'*alil,*N'*etil-etilenodiamina.

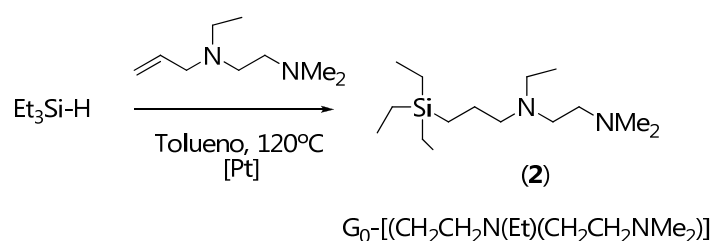
II.2.2.1.2. Síntesis de dendrímeros funcionalizados con grupos amino terminales.

Antes de funcionalizar nuestros dendrímeros de estructura carbosilano con este compuesto, es necesario establecer las condiciones de reacción generales. Para ello se sintetiza un "modelo" al que llamamos de generación cero, G_0 , ya que no llega a tener la estructura de un dendrímero, pero sí contiene la funcionalidad de la capa externa de los dendrímeros, que es la que en definitiva, determina su comportamiento.

Este compuesto monofuncional se obtiene a través de la hidrosililación de la alilamina **1** con trietilsilano (HSiEt_3) en tolueno como disolvente a 120°C y utilizando el catalizador de Karstedt^[21] (3-3.5% Pt en poli(dimetilsiloxano)). Así se aísla el compuesto $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)$ **2**, como un aceite marrón con buen rendimiento.

El compuesto monofuncional, que a partir de ahora se nombrará indistintamente como $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)$ ó G_0 - $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]$ **2**, se obtiene como resultado de la reacción de hidrosililación vía anti-Markovnikov de HSiEt_3 al doble enlace de la olefina

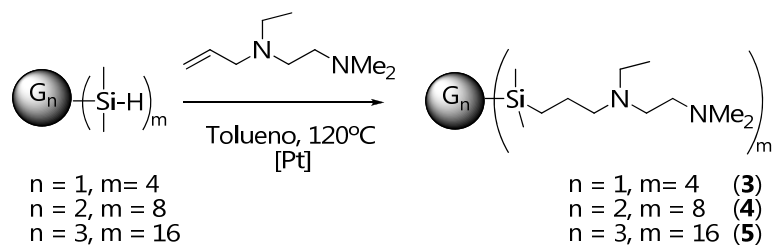
asimétrica **1**, lo que da lugar a una β -adición (ver Esquema II.7.). Estas condiciones regioselectivas se consiguen eligiendo adecuadamente las condiciones de reacción tales como el disolvente, la concentración de los reactivos, el catalizador y la temperatura.



Esquema II.7. Síntesis del compuesto **2**.

Antes de continuar conviene aclarar que, a lo largo de esta memoria, los derivados monofuncionales de cada familia de dendrímeros que se detallan, serán nombrados indistintamente de acuerdo a la nomenclatura establecida para el compuesto **2**.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la hidrosilación del doble enlace de la diamina, se lleva a cabo esta reacción utilizando los dendrímeros precursores $\text{G}_n\text{-H}_m$ con grupos Si-H terminales donde $n = 1, 2, 3$ y $m = 4, 8, 16$ respectivamente (ver Esquema II.8.), con 4, 8 y 16 equivalentes en cada caso, de la alilamina en tolueno a 120°C y con el catalizador de Karstedt. Se obtienen así los dendrímeros de primera, segunda y tercera generación $\text{G}_n\text{-}[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]_m$ ($n=1, m=4$ (**3**); $n=2, m=8$ (**4**); $n=3, m=16$ (**5**)), como aceites marrones con altos rendimientos tras purificarlos mediante cromatografía en columna de exclusión de tamaños (Esquema II.8.).



Esquema II.8. Síntesis de dendrímeros carbosilano con grupos diamino terminales.

Todos estos dendrímeros son solubles en disolventes orgánicos de uso común y disolventes clorados, sin embargo son insolubles en agua. Son estables al aire durante largos períodos de tiempo, si bien, al tratarse de aminas pueden adquirir humedad, por lo que es conveniente almacenarlos en atmósfera inerte.

En la Figura II.4., se muestran las estructuras propuestas para los compuestos **3-5**.

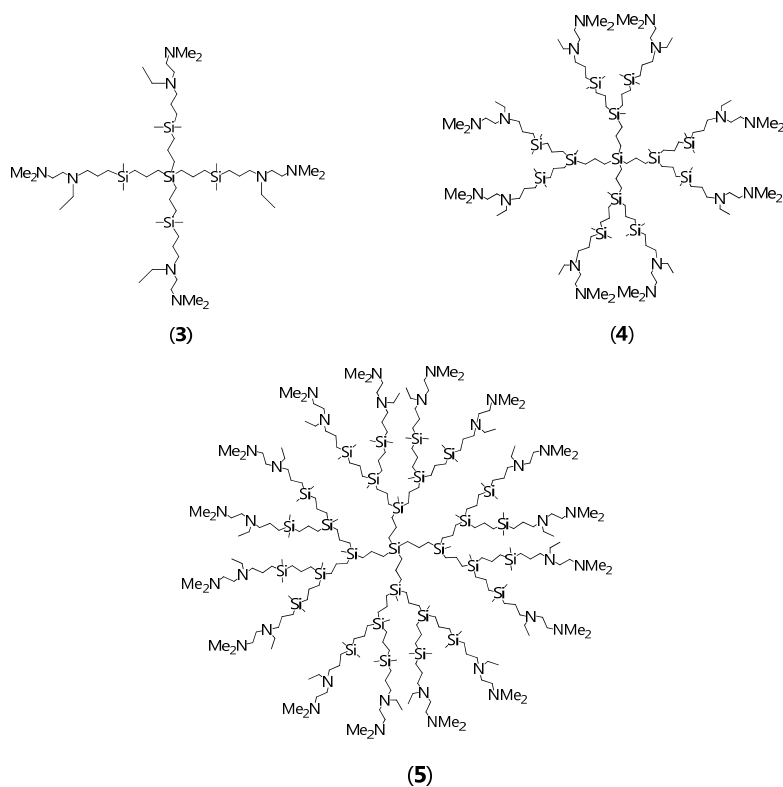
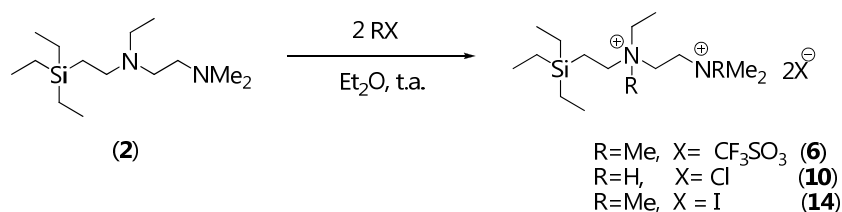


Figura II.4. Representación estructural de los compuestos **3-5**.

II.2.2.1.3. Síntesis de dendrimeros con grupos amonio en la periferia.

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, la naturaleza del contraión es un factor a tener en cuenta cuando se pretende dar un uso biológico a estas macromoléculas,^[22] ya que éste afecta no sólo al tamaño, también lo hace sobre la solubilidad y la reactividad. Los dendrimeros con grupos amino terminales preparados anteriormente fueron cuaternizados con agentes cuaternizantes tales como MeCF₃SO₃, HCl y MeI, para proporcionar macromoléculas con grupos amonio en la superficie.

En este caso también hemos considerado útil sintetizar en primer lugar un modelo sobre el que ensayar la reactividad. La reacción del compuesto G₀-[(CH₂CH₂CH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)] **2**, con un exceso de MeCF₃SO₃, HCl y MeI, respectivamente, en éter dietílico como disolvente y a temperatura ambiente, proporciona, tras eliminar el disolvente y los componentes volátiles de la mezcla, los compuestos G₀-[(CH₂CH₂CH₂)N⁺R(Et)(CH₂CH₂N⁺RMe₂) 2X⁻], donde R=Me, X=CF₃SO₃ (**6**), R=H, X=Cl (**10**) y R=Me, X=I (**14**). Estos compuestos se aíslan con altos rendimientos como sólidos blancos con una solubilidad en agua superior a 100 mg/ml (Esquema II.9.).



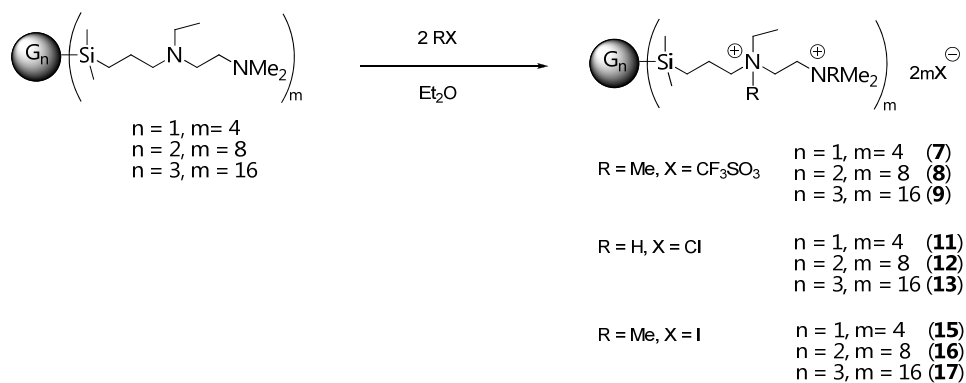
Esquema II.9. Síntesis de los compuestos

*G*₀-[(CH₂CH₂CH₂)N⁺R(Et)(CH₂CH₂N⁺RMe₂) 2X⁻], **6**, **10** y **14**.

A continuación se prepararon el resto de miembros de la familia de dendrimeros catiónicos a través de la cuaternización de los dendrimeros G_n-[(CH₂CH₂CH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)]_m **3**, **4** y **5**, en las condiciones establecidas en

el paso previo (Esquema II.7.). De este modo, al cuaternizar con MeCF_3SO_3 y MeI , se obtuvieron los dendrímeros catiónicos $G_n-[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}^+\text{R}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3) m\text{X}^-]$ donde para $\text{X}=\text{CF}_3\text{SO}_3$, $n=1$, $m=4$ (**7**), $n=2$, $m=8$ (**8**) y $n=3$, $m=16$ (**9**); para $\text{X}=\text{I}$, $n=1$, $m=4$ (**15**), $n=2$, $m=8$ (**16**) y $n=3$, $m=16$ (**17**). Cuando al reacción se lleva a cabo con un exceso de HCl se obtienen los dendrímeros $G_n-[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}^+\text{H}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{HMe}_2) m\text{Cl}^-]$ ($n=1$, $m=4$ (**11**), $n=2$, $m=8$ (**12**) y $n=3$, $m=16$ (**13**)) (ver Esquema II.10.).

Todos los dendrímeros catiónicos son estables y solubles en disolución acuosa. La solubilidad observada para los compuestos **7-9** y **15-17** es muy similar, siendo los que contienen como contraión al ión cloruro (**11-13**), los que mayor solubilidad presentan.



Esquema II.10. Síntesis de dendrímeros catiónicos.

En la Figura II.5., se muestran las estructuras propuestas para los dendrimeros **7-9**, **11-13** y **15-17**.

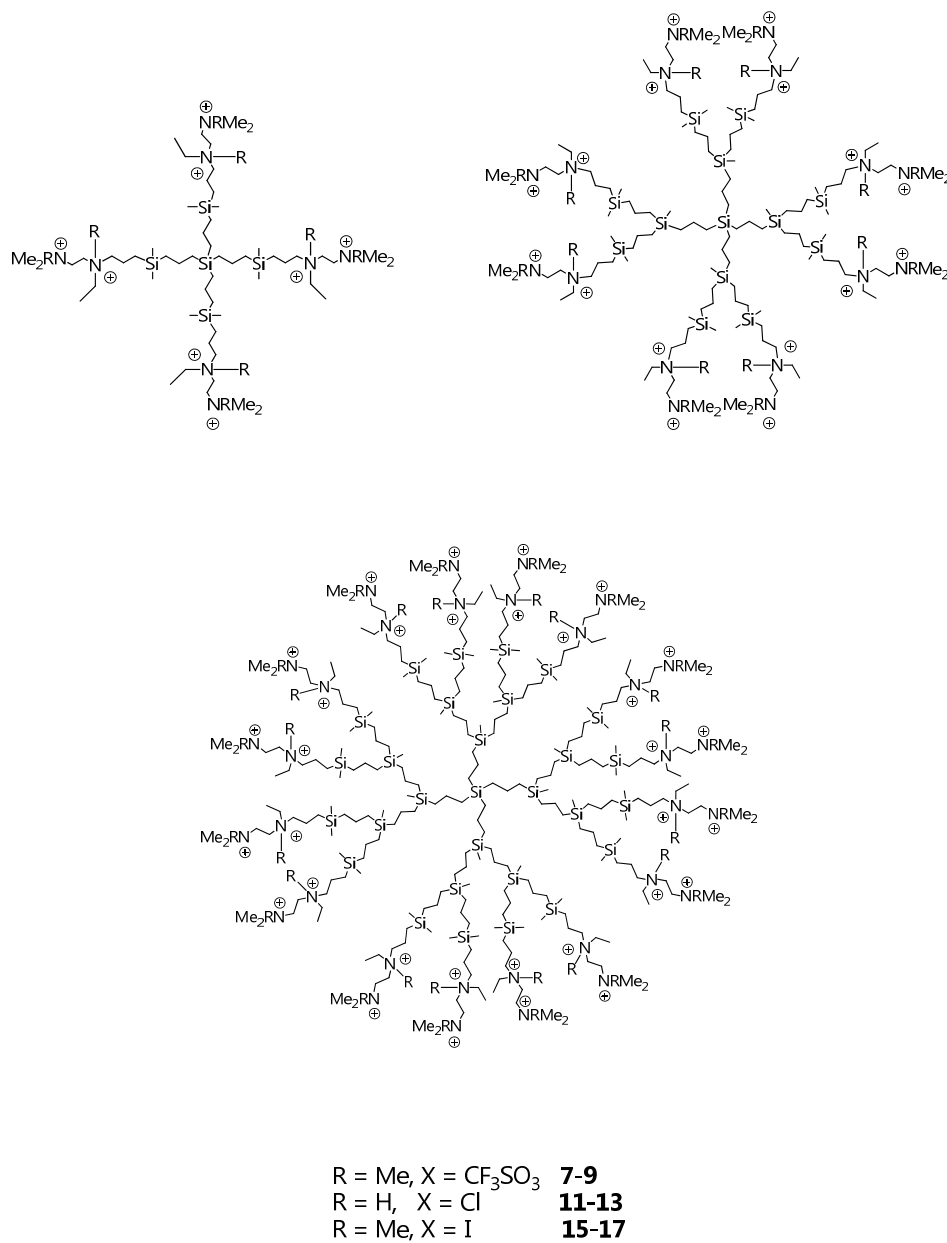


Figura II.5. Representación molecular de dendrimeros carbosilano catiónicos.

II.2.2.2. Estudio estructural.

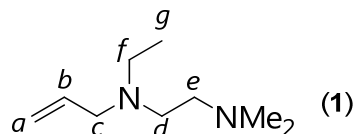
Todos los dendrímeros sintetizados y descritos en este capítulo, han sido caracterizados por técnicas de espectroscopía de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{29}Si , además de ^{19}F , ^{15}N cuando ha sido necesario. Para completar la caracterización se ha realizado análisis elemental de C, H y N, espectrometría de masas Maldi-TOF y APCI. Los datos completos de RMN se encuentran en el apartado experimental de esta memoria (capítulo VI), tras la descripción detallada de la síntesis de cada producto.

II.2.2.2.1. Dendrímeros con grupos amino terminales.

Los datos de RMN, Maldi-TOF, y APCI, son concordantes con la estructura propuesta para los compuestos **1-5** (ver Figura II.4.).

a) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Los datos de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C -RMN (δ en ppm, CDCl_3 como disolvente), de estos cinco compuestos se encuentran recogidos en las Tablas II.1., II.2., II.3. y II.4.



Grupo	^1H -RMN ppm	Grupo	^{13}C -RMN ppm
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$	5.83	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$	135.8
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$	5.10	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$	117.2
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$	3.08	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	57.5
$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	2.52	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2$	57.2
y		$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	51.0
NCH_2CH_3		NCH_2CH_3	47.7
$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	2.35	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	45.9
NMe_2	2.19	NCH_2CH_3	11.6
NCH_2CH_3	0.99		

Tabla II.1. Datos de ^1H y ^{13}C -RMN del compuesto **1** en CDCl_3 .

En el espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 , del compuesto N,N -dimetil- N' -alil, N' -etil-etilenodiamina **1** (ver Figura II.6.,**B**), es posible observar los desplazamientos típicos del sistema alilo a δ 5.83, 5.10 y 3.08 correspondientes a los protones H_b , H_a y H_c , respectivamente. El multiplete que aparece a δ 2.52 se asigna a los protones metilénicos de los grupos d y f , que proporcionan señales solapadas y el grupo metileno e , aparece a δ 2.35. Sin embargo, la especie **1**·LiBr (ver Figura II.6.,**A**), los protones metilénicos H_d , H_e y H_f , proporcionan tres señales bien diferenciadas a δ 2.52, 2.71 y 2.39, respectivamente. Los grupos metilo del fragmento dimetilamino de la especie **1**, proporcionan un singlete a δ 2.19 y a δ 0.99 se localiza un triplete que se corresponde con los grupos metilo (g), del fragmento etilo. En cuanto al espectro de ^{13}C -RMN, las señales correspondientes a los grupos del sistema alílico proporcionan señales a δ 135.8 (b), 117.2 (a) y 57.2 (c). Los grupos metileno unidos directamente a los átomos de nitrógeno d , e y f , dan señales localizadas a δ 51.0, 57.5 y 47.7, respectivamente y, los grupos metilo de los fragmentos dimetilamino y etilo se localizan a δ 45.9 y 11.6, respectivamente. Esta asignación se ha realizado en base a los experimentos monodimensionales NOESY 1D, TOCSY 1D y al experimento bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$.

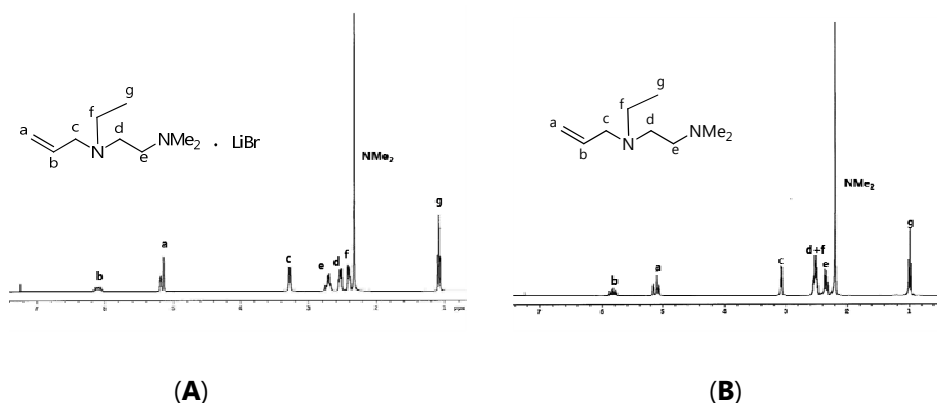
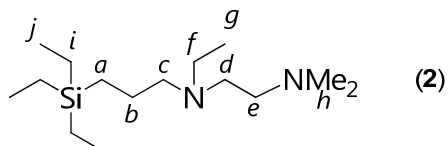


Figura II.6. Espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 de N,N -dimetil- N' -alil, N' -etil-etilenodiamina con LiBr coordinado (**A**) y libre de LiBr (**B**).

Cuando se lleva a cabo la reacción de hidrosililación de esta amina con trietilsilano, tal y como ya se ha comentado, se obtiene el compuesto **2**, observándose en el espectro de ^1H -RMN la desaparición de las señales correspondientes al sistema alílico de la diamina.



Grupo	^1H -RMN ppm	Grupo	^{13}C -RMN ppm
NCH ₂ CH ₃	2.51	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	58.1
y		NCH ₂ CH ₂ NMe ₂	57.7
NCH ₂ CH ₂ NMe ₂		NCH ₂ CH ₂ NMe ₂	51.6
NCH ₂ CH ₂ NMe ₂	2.36	NCH ₂ CH ₃	47.9
y		NMe ₂	45.9
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N		SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	21.3
NMe ₂	2.21	NCH ₂ CH ₃	11.6
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.40	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	8.9
NCH ₂ CH ₃	0.99	SiCH ₂ CH ₃	7.3
SiCH ₂ CH ₃	0.89	SiCH ₂ CH ₃	3.2
SiCH ₂ CH ₃	0.47		
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.41		

Tabla II.2. Datos de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN en CDCl_3 del compuesto **2**.

El espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 del compuesto **2**, presenta dos multipletes a δ 2.51 y 2.36; el primero de ellos contiene las resonancias pertenecientes a los grupos *d* y *f*, mientras que el segundo comprende las de los grupos *c* y *e*. Los protones del grupo dimetilamino *Hh*, aparecen como un singlete a δ 2.21. Los grupos metileno, que en la figura de la Tabla II.2., hemos llamado *b*, aparecen en el espectro como un multiplete localizado a δ 1.40, apareciendo los denominados *Ha* en torno a δ 0.41. El grupo metilo (*g*) del fragmento etilo unido a nitrógeno aparece como un triplete a δ 0.99. En cuanto

a los grupos metileno (*i*) y metilo (*j*) del fragmento etilo unido a silicio proporcionan, respectivamente, un cuartete y un triplete localizados a δ 0.47 y δ 0.89. En la Figura II.7., se muestra el espectro de ^1H -RMN de este compuesto.

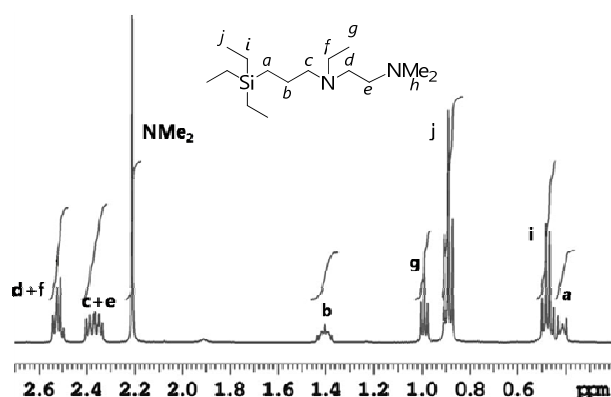


Figura II.7. Espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 del compuesto **2**.

En cuanto al espectro de ^{13}C -RMN en CDCl_3 para este compuesto (ver Figura II.8.), los átomos de carbono unidos directamente a nitrógeno *Cc*, *Ce*, *Cd* y *Cf* aparecen a δ 58.1, 57.7, 51.6 y 47.9, respectivamente. La señal que aparece a δ 45.9 se asigna al grupo metilo del fragmento $-\text{NMe}_2$. El átomo *Cb* proporciona una señal a δ 21.3 mientras que la señal localizada a δ 11.6 se asigna al *Cg* del grupo metilo del fragmento etilo unido a nitrógeno. El átomo de carbono unido directamente a silicio (*Ca*), proporciona una señal a δ 8.9 mientras que los grupos metileno y metilo de los fragmentos etilo unidos a silicio aparecen como dos señales localizadas a δ 7.3 (*Ci*) y 3.2 (*Cj*), respectivamente.

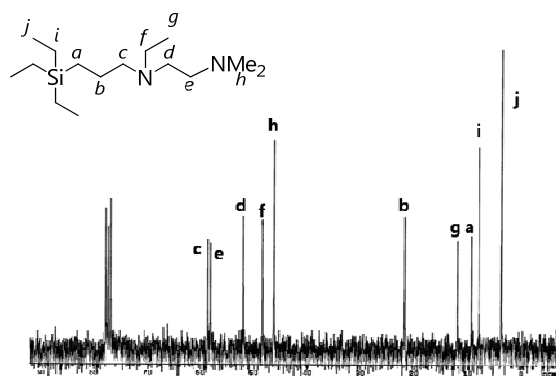


Figura II.8. Espectro de ^{13}C -RMN en CDCl_3 para el compuesto **2**.

Esta asignación se ha realizado en base a los experimentos monodimensionales NOESY 1D, TOCSY 1D y al experimento bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$.

Como ejemplo clarificador de esta asignación, en la Figura II.9., se muestran los espectros NOESY 1D y TOCSY 1D del compuesto **2**.

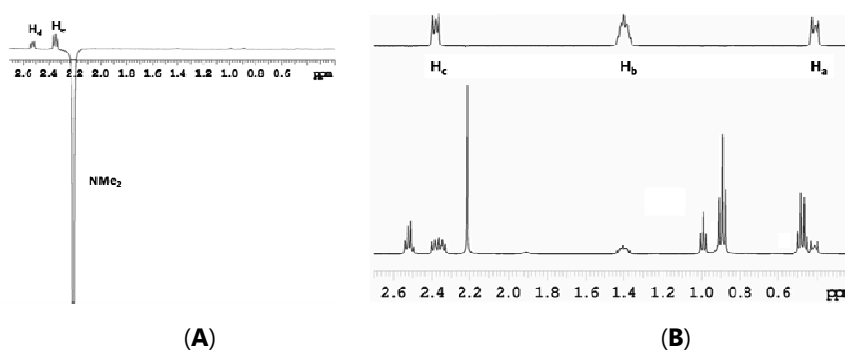


Figura II.9. Espectros monodimensionales (A) NOESY y (B) TOCSY del compuesto **2**.

El espectro monodimensional NOESY muestra un efecto NOE entre los protones metilénicos *d* y *e* y el grupo dimetilamino del compuesto G_0 - $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]$ **2**. La señal de mayor intensidad, localizada a δ 2.36, se corresponde con el grupo metileno más próximo en el espacio al

grupo dimetilamino, por tanto esta señal se asigna al grupo metileno (e). La señal localizada a δ 2.53, se asigna entonces, a los protones del grupo metileno (d). En el espectro TOCSY 1D se puede observar que los protones metilénicos a, b y c se encuentran relacionados entre sí formando parte de la misma cadena.

En cuanto al espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ del compuesto **2** (ver Figura II.10.), es posible observar una señal a δ -356 que se relaciona con los protones del grupo metilo del fragmento dimetilamino y en menor medida con Hd en posición β al grupo NMe_2 , de modo que se asigna al nitrógeno externo de la molécula. Además, aparece otra señal a δ -337 que se relaciona con los protones metilénicos de los grupos b, e y g respectivamente, que se asigna al nitrógeno más interno del compuesto **2**.

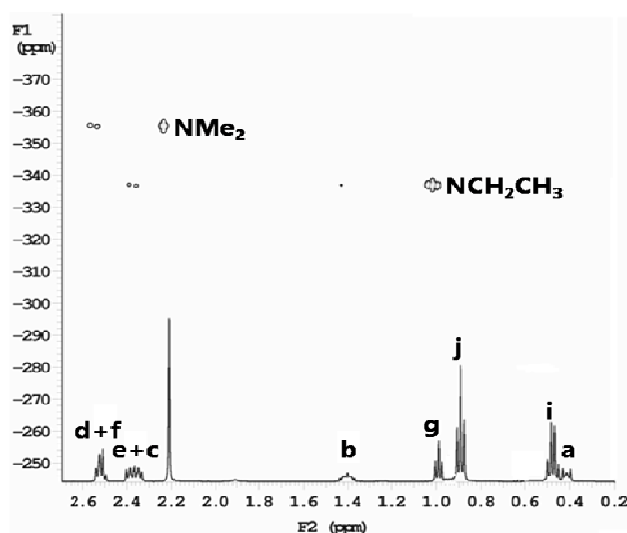
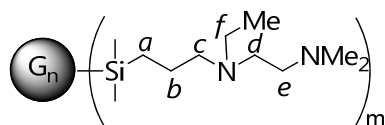


Figura II.10. Espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para el compuesto **2**.

Además, estas asignaciones se ajustan bien a las elucidadas teóricamente,^[23] con valores de -349 y -328, respectivamente.



Grupo	n=1, m=4 (3)	n=2, m=8 (4)	n=3, m=16 (5)
NCH ₂ CH ₃ y NCH ₂ CH ₂ NMe ₂	2.51	2.51	2.53
NCH ₂ CH ₂ NMe ₂ y SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	2.36	2.36	2.41
NMe ₂	2.20	2.21	2.21
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.39	1.38	1.40
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	1.26	1.27	1.27
NCH ₂ CH ₃	0.98	0.98	0.98
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.52	0.52	0.52
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.38	0.38	0.38
SiMe ₂		-0.08	-0.08
SiMe	-0.08	-0.012	-0.012

Tabla II.3. Datos de ¹H-RMN de los dendrímeros **3-5** en CDCl₃.

Con respecto a los sistemas dendríticos, los datos de ¹H-RMN en CDCl₃ del esqueleto carbosilano de los compuestos **3-5**, presentan desplazamientos químicos similares para las distintas generaciones, si bien las señales se van haciendo más anchas a medida que aumenta la generación.^[24] 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) a que se produce una restricción de la movilidad al aumentar la generación del dendrímero. Como ejemplo ilustrativo de este efecto se puede observar en la Figura II.11., los espectros de ¹H-RMN de los dendrímeros de primera generación **3** y de tercera generación **5**.

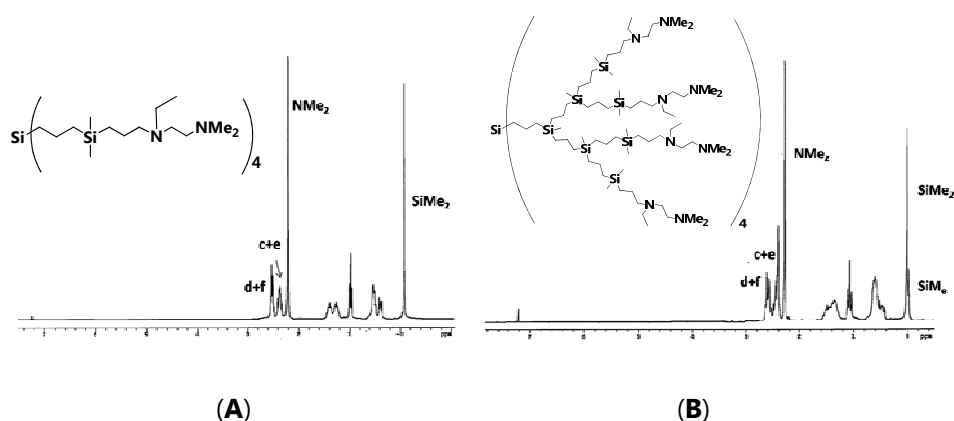
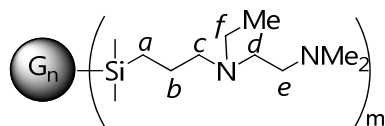


Figura II.11. ^1H -RMN de los dendrímeros G_1 - $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]_4$ **3** (A) y G_3 - $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]_{16}$ **5** (B).

Para las ramas $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ en los dendrímeros **3-5**, se pueden observar dos multipletes anchos, uno en torno a δ 1.27, que se corresponde con el grupo metileno central y otro localizado en torno a δ 0.52 correspondiente a los grupos metileno unidos directamente a silicio. En cuanto al grupo externo de las macromoléculas, los metilenos unidos directamente a nitrógeno, aparecen en el espectro como dos multipletes, uno alrededor de δ 2.51-2.53, que se asigna a los grupos metileno *f* y *d* (ver nomenclatura en la figura adjunta a la Tabla II.3.), que se solapan y, otro debido a los protones metilénicos *c* y *e* en torno a δ 2.36-2.41 que también aparecen solapados. Las resonancias observadas alrededor de δ 1.39 y δ 0.38 se asignan a los grupos metileno *b* y *a* respectivamente. El fragmento metilo del grupo etilo, aparece como un triplete a δ 0.98 y los protones del fragmento dimetilamino dan lugar a un singlete localizado alrededor de δ 2.21. Por último, los grupos metilo unidos a silicio proporcionan señales localizadas en la zona esperada, es decir, en torno a δ 0.0.



Grupo	n=1, m=4 (3)	n=2, m=8 (4)	n=3, m=16 (5)
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	57.9	57.9	58.0
NCH ₂ CH ₂ NMe ₂	57.7	57.7	57.8
NCH ₂ CH ₂ NMe ₂	51.6	51.7	51.7
NCH ₂ CH ₃	48.0	48.0	48.0
NMe ₂	45.9	45.9	46.0
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	21.4	21.5	21.5
Si(CH ₂) ₃ Si	20.3-17.5	20.1-17.7	20.2-17.5
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	13.0	13.0	13.1
NCH ₂ CH ₃	11.7	11.7	11.7
SiMe ₂	-3.3	-3.3	-3.2
SiMe		-5.0	-4.9

Tabla II.4. Datos de ¹³C-RMN de los dendrímeros **3-5** en CDCl₃.

Los datos de ¹³C-RMN en CDCl₃ obtenidos para estos compuestos **3-5** (Tabla II.4.), también están de acuerdo con las estructuras propuestas. En estos espectros, los grupos metileno unidos a nitrógeno muestran cuatro resonancias localizadas a δ 57.9 (c), 57.7 (e), 51.6 (d) y 48.0 (f). El grupo –NMe₂ aparece como un singlete a δ 45.9 y el metilo del grupo etilo unido directamente a nitrógeno aparece como un singlete a δ 11.7. Los grupos metileno de las ramas dendríticas SiCH₂CH₂CH₂Si proporcionan señales en un rango comprendido entre δ 21.5 y 17.7, dependiendo el número de señales incluidas en este intervalo de la generación del dendrímero. Los grupos metilo unidos a silicio proporcionan señales en torno a δ -3.3 (SiMe₂) y δ -5.0 (SiMe).

En la Figura II.12., se muestran el espectro de ^{13}C -RMN del dendrímero de segunda generación **4**.

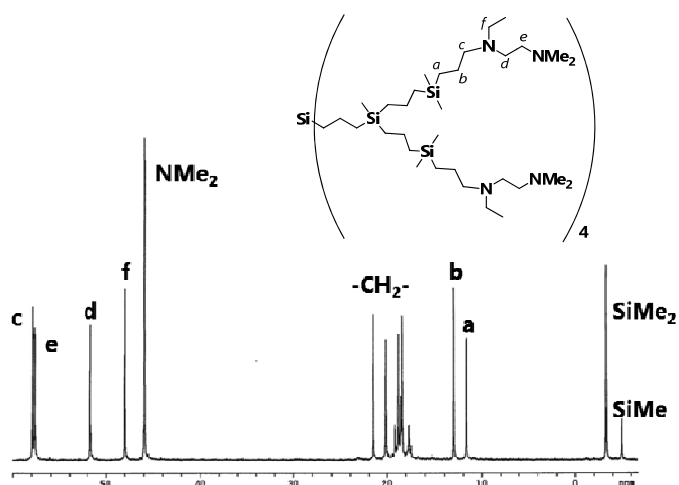
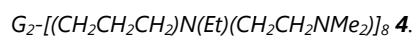


Figura II.12. Espectro de ^{13}C -RMN, del dendrímero



Las asignaciones de ^1H y ^{13}C -RMN propuestas para los compuestos **3-5** se ajustan bien a las realizadas para el sistema modelo G_0 - $[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]$ **2**, las cuales han sido corroboradas mediante experimentos gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ y gHMBC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$. En la Figura II.13., se muestra, a modo de ejemplo, el espectro gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ para el dendrímero de segunda generación $G_2-[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]_8$ **4**.

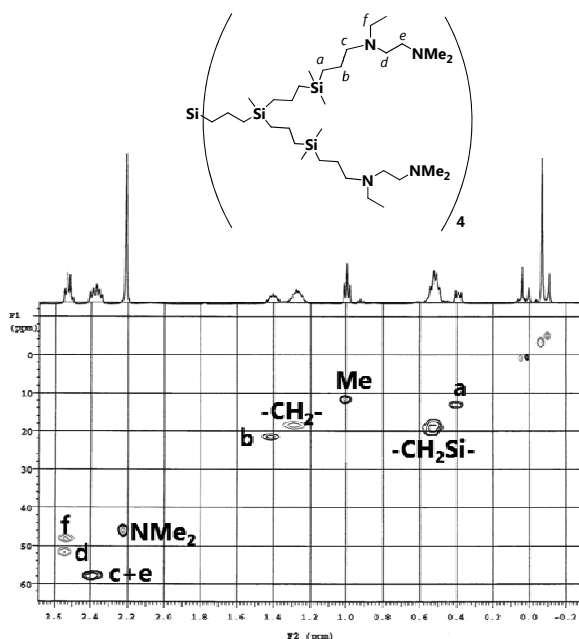


Figura II.13. Espectro gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ en CDCl_3 para el dendrímoro **4**.

En el espectro gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$, es posible observar la relación entre cada protón con su carbono correspondiente, lo que permite asignar de forma correcta las señales de los compuestos **3-5**.

En cuanto a los espectros de ^{29}Si -RMN, las resonancias obtenidas son las esperadas a pesar de que las señales correspondientes a los átomos de silicio más internos no se observan en las generaciones mayores. Los silicios internos no se detectan probablemente debido al solapamiento de las señales por la similitud de los entornos químicos de estos átomos y a la mayor relajación del átomo de silicio más interno. Así, en el espectro bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ para el dendrímoro **4** (ver Figura II.14.), es posible ver una señal en torno a δ 1.9 la cual está relacionada con el grupo SiMe_2 , por lo que se asigna al átomo de silicio más externo, mientras que el silicio inmediatamente anterior muestra una señal entorno a δ 1.0, relacionada con los protones del grupo SiMe .

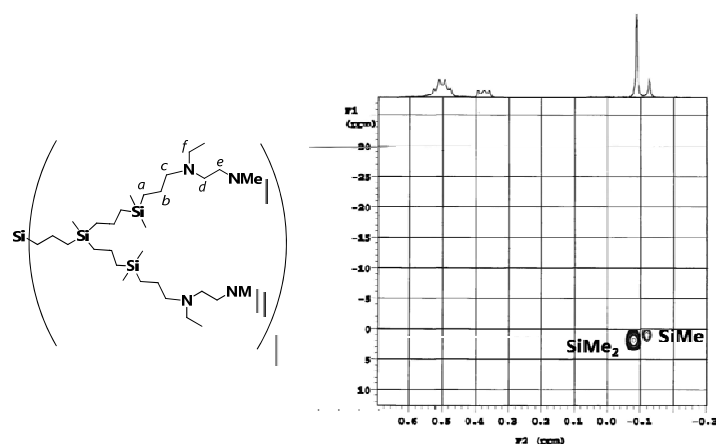


Figura II.14. Espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ en CDCl_3 para el compuesto **4**.

En cuanto a los datos de ^{15}N -RMN de los compuestos **3-5** se observan dos señales en torno a δ -356 y -337 que se corresponden con el nitrógeno externo y el interno de cada rama respectivamente,^[23] estas señales son idénticas a las observadas para el compuesto **2**. La asignación de los átomos de nitrógeno se ha hecho en base a experimentos gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$, del mismo modo que se hizo con el compuesto **2**. Todos los datos espectroscópicos observados con respecto a la matriz dendrímica hasta ahora, son concordantes con los descritos para otros dendrímeros carbosilano similares.^[7,25-27]

b) Espectrometría de masas.

En los espectros de masas Maldi-TOF realizado en ditranol, se observan los picos correspondientes al ión molecular de los dendrímeros **3** y **4**, sin embargo no fue posible detectar el pico del dendrímero de tercera generación **5**, debido posiblemente a que es más complicado producir la ionización de esta molécula, comparativamente mayor que las de las otras dos generaciones. Este comportamiento ha sido observado en otros dendrímeros de naturaleza carbosilano recogidos en la literatura.^[25,28-31]

c) *Medidas de radio hidrodinámico.*

Con el fin de determinar los radios hidrodinámicos de estas macromoléculas, se llevaron a cabo experimentos DOSY de los dendrímeros **3-5** en acetona deuterada. A través de la ecuación de Stokes-Einstein, es posible determinar el radio hidrodinámico de moléculas una vez determinado el coeficiente de difusión de las mismas por resonancia magnética nuclear.

$$r_H = \frac{K_B \cdot T}{6\pi\eta D} \quad \text{Ecuación de Stokes-Einstein}$$

donde:

r_H = radio hidrodinámico, en Å.

K_B = constante de Boltzman = $1.380662 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$.

D = coeficiente de difusión $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$.

η = viscosidad del medio, en cp.

T = temperatura a la que se realiza el experimento.

Se elige acetona- d_6 como disolvente para las medidas de difusión.

La viscosidad de la acetona deuterada se obtiene a partir de medidas de difusión a 25°C. Sabiendo que el radio hidrodinámico de ésta es de 1.53 Å y aplicando la ecuación de Stokes-Einstein, se obtiene $\eta(\text{C}_3\text{D}_6\text{O}) = 0.37 \text{ cp}$ ($3.69 \cdot 10^{-4} \text{ Kg/m} \cdot \text{s}$). Utilizando este valor de viscosidad calculado y, tras haber llevado a cabo las medidas de difusión de los dendrímeros usando TTMS (tetrakis-tetrametilsilano) como referencia,^[32] se obtienen los diámetros hidrodinámicos que se muestran en la Tabla II.5.:

Compuesto	disolvente	D comp. X 10 ⁻¹⁰	d _H comp. (nm)
3	C ₃ D ₆ O	9.30	1.28
4		7.64	1.58
5		5.90	1.92

Tabla II.5. *Diámetros hidrodinámicos de los dendrímeros 3-5.*

Estos valores de 1.28, 1.58 y 1.92 nm para los diámetros hidrodinámicos de estos compuestos **3-5** ponen de manifiesto el tamaño nanoscópico de estas macromoléculas.

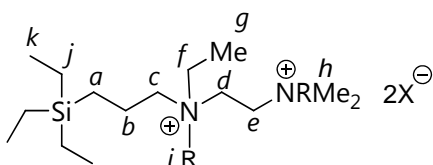
II.2.2.2.2. *Dendrímeros funcionalizados con grupos amonio.*

Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos para los derivados catiónicos **6-17**, son concordantes con las estructuras propuestas en la Figura II.5.

a) *Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.*

Los espectros de ^1H -RMN han sido registrados en DMSO- d_6 o en D_2O a temperatura ambiente. En estos disolventes las señales tienden a ser más anchas que las observadas en otros disolventes orgánicos, lo que se puede atribuir a la lipofilia del esqueleto carbosilano, que hace que en estos disolventes polares se encuentre menos extendido disminuyendo así la movilidad de las ramas del dendrímero. Los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN de los compuestos cuaternizados muestran un patrón de señales idéntico para el esqueleto carbosilano al observado en los correspondientes dendrímeros neutros **3-5**, a pesar de que a medida que aumenta la generación las señales se hacen aún más anchas que en el caso de los compuestos neutros.

Del mismo modo que ocurría con los dendrímeros neutros, en el caso de los derivados catiónicos es interesante llevar a cabo la caracterización de los compuestos monofuncionales $\text{G}_0\text{-}[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}^+\text{R}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{RMe}_2)2\text{X}^-]$, R=Me, X=CF₃SO₃ (**6**), R=H, X=Cl (**10**) y R=Me, X=I (**14**), con el fin de conocer los desplazamientos químicos del grupo funcional que se repetirá a lo largo de la familia de dendrímeros. Los datos más significativos de ^1H y ^{13}C -RMN para los compuestos **6**, **10** y **14** se encuentran en las Tablas II.6. y II.7., respectivamente.



Grupo	6	14	Grupo	10
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ RMe ₂	3.76	3.88	N ⁺ H	11.30
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ RMe ₂	3.74	3.80	N ⁺ HMe ₂	11.10
N ⁺ CH ₂ CH ₃	3.55	3.38	N ⁺ H (CH ₂) ₂ N ⁺ HMe ₂	3.48
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	3.24	3.29	N ⁺ HCH ₂ CH ₃	3.10
N ⁺ RMe ₂	3.14	3.19	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H	3.02
N ⁺ Me	3.01	3.05	N ⁺ HMe ₂	2.80
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	1.60	1.60	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H	1.65
N ⁺ CH ₂ CH ₃	1.26	1.26	N ⁺ HCH ₂ CH ₃	1.22
CH ₃ CH ₂ Si	0.92	0.91	SiCH ₂ CH ₃	0.91
CH ₃ CH ₂ Si	0.55	0.50	SiCH ₂ CH ₃	0.49
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	0.48	0.45	y	
			SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H	

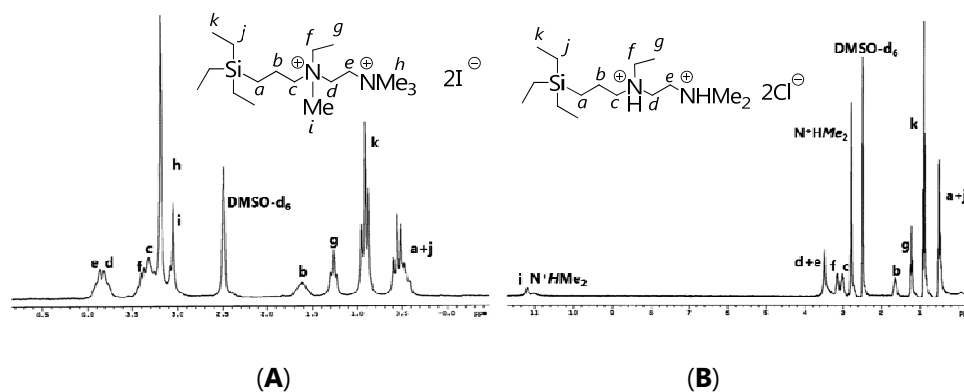
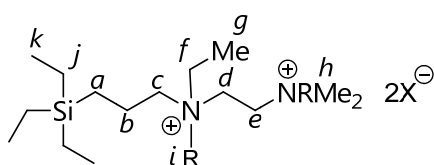
Tabla II.6. Datos de ¹H-RMN para los compuestos G₀-[(CH₂CH₂CH₂)N⁺R(Et)(CH₂CH₂N⁺RMe₂) 2X⁻], **6**, **10** y **14** en DMSO-d₆.

En el espectro de ¹H-RMN en DMSO-d₆ para los compuestos **6** y **14**, en los que el fragmento alquilante es un grupo metilo, la cuaternización de los grupos amino supone un desdoblamiento de las señales correspondientes a los protones metilénicos unidos directamente a nitrógeno (Hc, Hd, He, y Hf), de modo que éstas aparecen como cuatro multipletes localizados a mayor desplazamiento que para su análogo neutro **2**, entre δ 3.88 y δ 3.24. Además cabe que destacar que, a pesar de que en ambos compuestos el grupo alquilante es el mismo, los valores de δ no son similares. Estos hechos pueden ser debidos a la diferente capacidad para formar pares iónicos del anión triflato (CF₃SO₃⁻), y ioduro, respectivamente. Para los grupos metilo unidos a los átomos

de nitrógeno cargados, se produce un desplazamiento a mayores valores de frecuencia, registrándose los protones Hh y Hi a δ 3.14 y δ 3.01 (**6**) y δ 3.19 y δ 3.05 (**14**), respectivamente. Estas señales son las que se ven más afectadas por la cuaternización. Los protones metilénicos centrales Hb , se desplazan alrededor de 0.20 ppm hacia mayores valores de δ como consecuencia de la cuaternización de los grupos amino, dando lugar a un multiplete a δ 1.60. Las señales de los grupos metileno unidos a silicio Ha y Hj , así como los grupos metilo de los fragmentos etilo (k), apenas sufren modificación con respecto al derivado neutro **2**.

En cuanto al compuesto **10**, en el que la cuaternización de los grupos amino se lleva a cabo con HCl, los singletes anchos que aparecen a δ 11.30 y δ 11.10 se asignan a los protones unidos directamente a nitrógeno. Los protones metilénicos (Hc , Hd , He , y Hf), aparecen entre δ 3.48 y δ 3.02; sufren un menor desplazamiento hacia mayores valores de δ con respecto al derivado neutro **2** que los cuaternizados con el grupo metilo **6** y **14**, hecho que se puede explicar en función de la diferente densidad de carga que posee el nitrógeno al tener unido un protón, en el caso del compuesto **10** o un grupo metilo, en los compuestos **6** y **14**. Lo mismo ocurre con el grupo metilo unido al átomo de nitrógeno cargado Hh que sufre un menor desplazamiento, registrándose como un singlete a δ 2.80.

En la Figura II.15., se muestran los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **14** y **10** en DMSO- d_6 .


 Figura II.15. Espectros de ^1H -RMN en DMSO-d_6 de los dendrímeros **14** y **10**.


Grupo	6	14	Grupo	10
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$	63.3	63.3	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}$	54.2
$\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_3$	56.6	56.6	$\text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{HMe}_2$	49.0
$\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$	56.0	56.0	$\text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_3$	46.4
N^+Me_3	52.4	52.4	$\text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{HMe}_2$	44.7
$\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$	51.8	52.0	N^+HMe_2	41.8
N^+Me	46.9	47.1	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}$	17.3
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$	15.8	15.8	$\text{N}^+\text{HCH}_2\text{CH}_3$	7.8
$\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_3$	7.2	7.3	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}$	7.3
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$	6.8	6.8	SiCH_2CH_3	6.8
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$	6.7	6.7	SiCH_2CH_3	2.2
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$	2.1	2.1		

 Tabla II.7. Datos de ^{13}C -RMN de los compuestos **6**, **10** y **14** en DMSO-d_6 .

En el espectro de ^{13}C -RMN de estos compuestos se observa que, a diferencia de lo que ocurre en el espectro de ^1H -RMN, la cuaternización afecta

de la misma manera a los desplazamientos de los carbonos *c*, *d*, *e* y *f* para los compuestos **6** y **14**, hecho que es de esperar ya que la diferente interacción electrostática del anión afecta en menor medida al desplazamiento del carbono que al protón (ver Figura II.16.(A)). Así estos grupos metileno unidos directamente a nitrógeno, se localizan a δ 63.3 (*c*), 56.6 (*f*), 56.0 (*e*) y 51.9 (*d*). Los grupos metilo unidos directamente a nitrógeno externo aparecen a δ 52.4 (*h*) mientras que los unidos al nitrógeno interno lo hacen a δ 46.9 (**6**) y 47.1 (**14**). Los grupos metileno centrales *Cb*, aparecen a δ 15.8. En cuanto a los $-\text{CH}_2-$ unidos al átomo de silicio aparecen a δ 6.7 (*Ha*) y δ 2.1 (*Hj*). A δ 7.3 ppm aparece la señal correspondiente al metilo del grupo etilo unido nitrógeno (*k*).

Para el compuesto **10** (ver Figura II.16.(B)), los grupos $-\text{CH}_2-$ contiguos a nitrógeno se localizan a δ 54.2 (*c*), 49.0 (*f*), 46.4 (*d*) y 44.7 (*e*) mientras que a δ 41.8 aparecen los grupos metilo N^+HMe_2 .

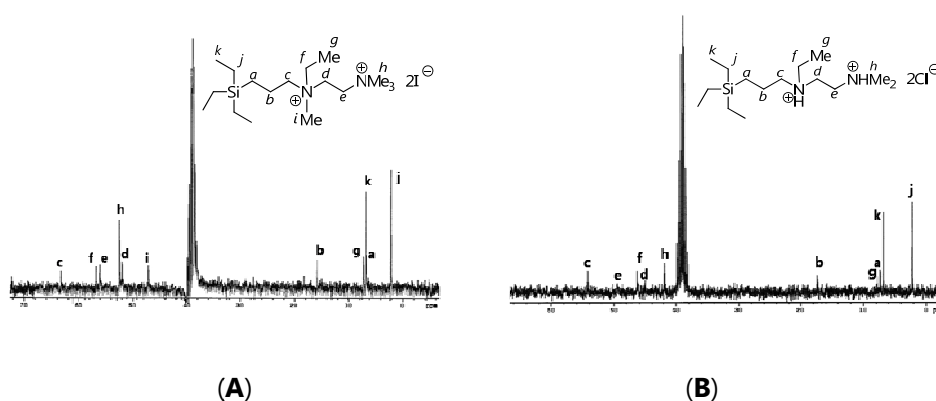


Figura II.16. Espectro de ^{13}C -RMN para los dendrimeros **14** (A) y **10** (B) en $\text{DMSO}-d_6$.

Esta asignación se ha realizado, al igual que en el derivado neutro, basándonos en los experimentos TOCSY 1D, HMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ y HMBC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$. En la Figura II.17., se muestran, a modo de ejemplo, los espectros TOCSY 1D, HMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ y HMBC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ para el derivado **14**.

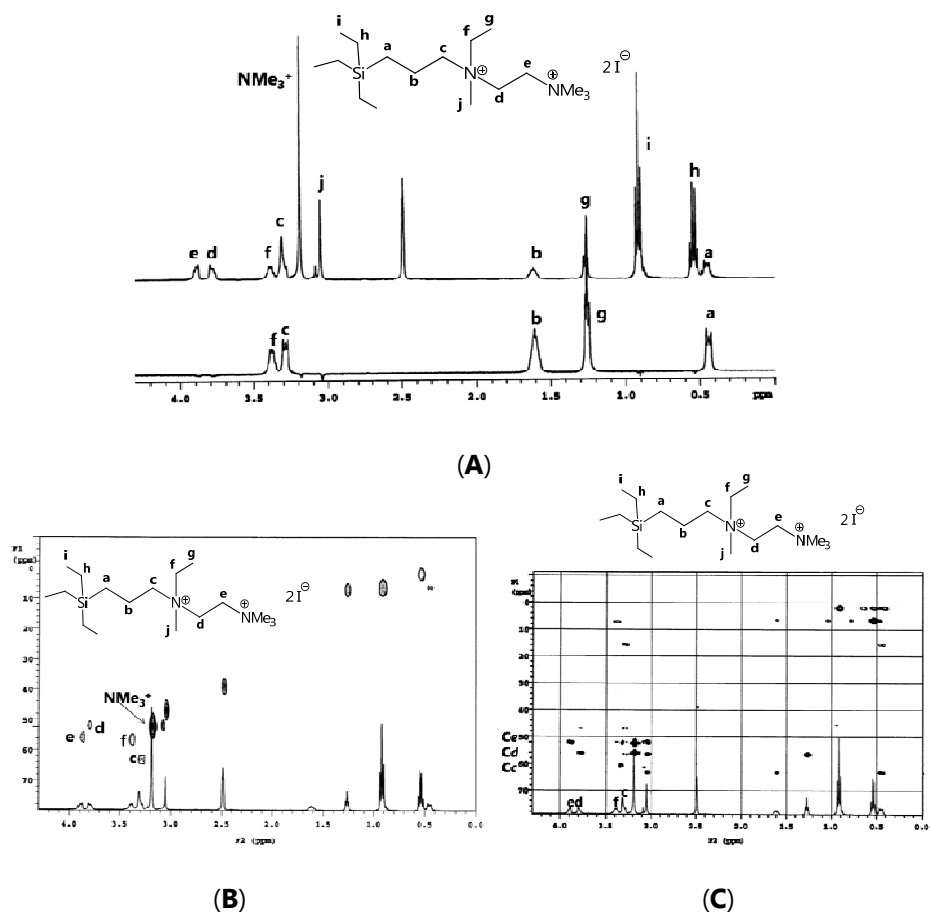
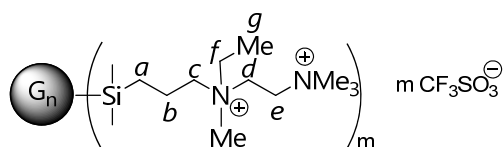


Figura II.17. (A) TOCSY 1D, (B) $gHMQC\{-^1H\text{-}^{13}C\}$ y (C) $gHMBC\{-^1H\text{-}^{13}C\}$ para el compuesto **14**.

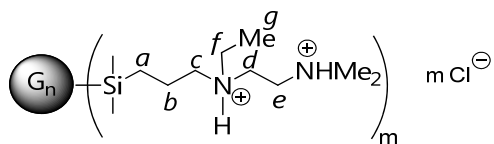
En el espectro TOCSY 1D se observa que los protones metilénicos Ha, Hb y Hc, están relacionados formando parte de la misma cadena; lo mismo ocurre con Hd y He. Por otro lado, en los espectros HMQC- $\{^1H\text{-}^{13}C\}$ y HMBC- $\{^1H\text{-}^{13}C\}$ es posible observar la correlación entre Hc y Cc, que aparece a 63.3 ppm, junto con la señal que aparece a δ 56.0, por lo que ésta se asigna a los Hd, de modo que la señal que a parece a δ 51.8 se asigna a los He.

Una vez asignadas las señales de los grupos funcionales externos, la asignación de las señales de protón para los componentes de la familia de dendrímeros catiónicos se puede llevar a cabo de forma sencilla tal y como se muestra en las Tablas II.8., II.9. y II.10.



Grupo	n = 1, m = 4 (7)	n = 2, m=8 (8)	n = 3, m = 16 (9)
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	3.81	3.80	3.78
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	3.76	3.76	
N ⁺ CH ₂ CH ₃ SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	3.15-3.20	3.15-3.20	3.15-3.20
N ⁺ Me ₃	3.15	3.15	3.15
N ⁺ Me	3.01	3.01	3.01
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	1.60	1.59	1.59
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si y N ⁺ CH ₂ CH ₃	1.25	1.25	1.24
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.56	0.52	0.51
Si CH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	0.39	0.38	0.38
SiMe ₂	-0.012	-0.027	-0.035
SiMe		0.118	-0.124

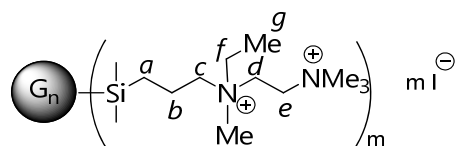
Tabla II.8. Datos de ¹H-RMN en DMSO-d₆ para los dendrímeros
G_n-{[(CH₂CH₂CH₂)N⁺(Me)(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃)]_m mCF₃SO₃⁻} **7-9**.



Grupo	n = 1, m = 4 (11)	n = 2, m=8 (12)	n = 3, m = 16 (13)
N ⁺ H	11.51	11.53	11.5
N ⁺ HMe ₂	11.35		3.56
N ⁺ H(CH ₂) ₂ N ⁺ HMe ₂	3.54	3.56	3.56
N ⁺ HCH ₂ CH ₃	3.15	3.17	3.17
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H	3.02	3.03	3.03
N ⁺ HMe ₂	2.80	2.81	2.82
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H	1.72	1.69	1.69
N ⁺ HCH ₂ CH ₃ γ	1.24	1.24	1.26
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si			
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.56	0.53	0.52
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H	0.43	0.44	
SiMe ₂	-0.03	-0.03	-0.03
SiMe		-0.10	-0.10

Tabla II.9. Datos de ¹H-RMN en DMSO-d₆ para los dendrímeros

$G_n - \{[(CH_2CH_2CH_2)N^+H(Et)(CH_2CH_2N^+HMe_2)]_m mCl^-\}$ **11-13**.



Grupo	n = 1, m = 4 (15)	n = 2, m = 8 (16)	n = 3, m = 16 (17)
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	3.93	3.95	4.00
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	3.85	3.87	3.90
N ⁺ CH ₂ CH ₃	3.33	3.31	3.42
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	3.41	3.42	
N ⁺ Me ₃	3.22	3.23	3.25
N ⁺ Me	3.08		3.17
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	1.63	1.63	1.65
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si y N ⁺ CH ₂ CH ₃	1.27	1.27	1.29
Si CH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.57	0.55	0.53
Si CH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺		0.46	
SiMe ₂	0.005	0.00	0.00
SiMe		-0.1	-0.1

Tabla II.10. Datos de ¹H-RMN para los dendrimeros

$G_n - \{[(CH_2CH_2CH_2)N^+(Me)(Et)(CH_2CH_2N^+Me_3)]_m mI^-\}$ **15-17** en DMSO-*d*₆.

De nuevo se encuentran diferencias en los desplazamientos de los protones Hc, Hd, He y Hf de los compuestos **7-9** y **15-17**, lo que se puede atribuir a la diferente capacidad de formación de pares iónicos del contraión.

De forma general, para el espectro de ¹H-RMN de los dendrimeros **7-9** (cuaternizados con CF₃SO₃Me), **11-13** (cuaternizados con HCl) y **15-17** (cuaternizados con MeI), la cuaternización de los grupos amino provoca un desplazamiento de entre 0.8 y 1.5 ppm a frecuencias mayores de las señales de los protones metilénicos Hc, Hd, He y Hf y para los grupos metilo unidos

directamente a los nitrógenos cargados (H_h y H_i), mientras que para los protones b y g se observan desplazamientos de menor magnitud (δ 0.3-0.4), ver asignación en las figuras de las Tablas II.8., II.9. y II.10. A partir de estas posiciones no se observa ningún desplazamiento químico importante debido a la presencia de la carga positiva en los átomos de nitrógeno. En cualquier caso, este efecto es más evidente en los derivados cuaternizados con MeCF_3SO_3 y MeI que con HCl . A modo de ejemplo, en la Figura II.18., se muestra el espectro de ^1H -RMN del derivado de segunda generación cuaternizado con MeCF_3SO_3 (**8**).

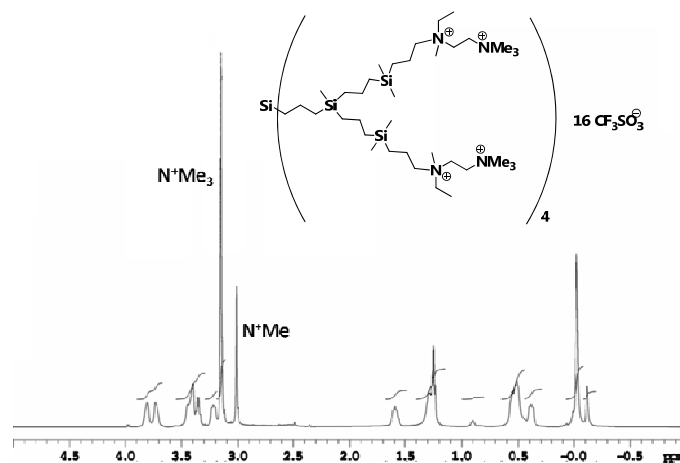
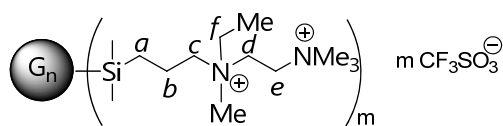


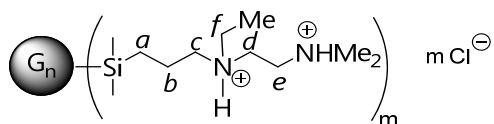
Figura II.18. Espectro de ^1H -RMN del dendrímero **8**.

En los espectros de ^{13}C -RMN en DMSO-d_6 (Tablas II.11., II.12. y II.13.), se observa un comportamiento análogo para los átomos de carbono, con respecto al efecto de la cuaternización.



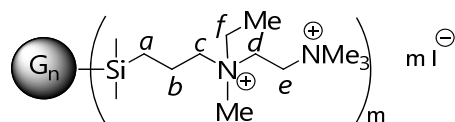
Grupo	n = 1, m = 4 (7)	n = 2, m=8 (8)	n = 3, m = 16 (9)
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	63.4	63.3	63.4
N ⁺ CH ₂ CH ₃	56.5	56.4	56.4
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	56.0	56.0	56.0
N ⁺ Me ₃	52.4	52.4	52.4
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	51.9	51.9	52.0
N ⁺ Me	46.9	46.9	46.9
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	18.3	18.8	18.8
Si(CH ₂) ₃ Si	17.5	17.7-15.7	17.7-15.7
	16.4		
	15.7		
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	10.7	10.6	10.5
N ⁺ CH ₂ CH ₃	7.1	7.1	7.1
SiMe ₂	-4.2	-4.2	-4.3
SiMe		-5.7	-5.74

Tabla II.11. Datos de ^{13}C -RMN en DMSO-d_6 para los dendrimeros 7-9.



Grupo	n = 1, m = 4 (11)	n = 2, m=8 (12)	n = 3, m = 16 (13)
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H	54.0	54.0	54.0
N ⁺ HCH ₂ CH ₂ N ⁺ HMe ₂	49.0	49.2	49.0
N ⁺ HCH ₂ CH ₃	46.3	46.3	46.3
N ⁺ HCH ₂ CH ₂ N ⁺ HMe ₂	44.8	44.8	44.6
N ⁺ HMe ₂	41.7	41.7	41.7
Si(CH ₂) ₃ Si	18.9	18.9	18.9-17.1
	17.6	17.6	
	17.1	17.1	
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H	16.4	16.4	
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺ H	11.2	11.2	11.2
N ⁺ HCH ₂ CH ₃	7.8	7.8	7.8
SiMe ₂	-3.9	-3.9	-3.9
SiMe		-5.3	-5.4

Tabla II.12. Datos de ¹³C-RMN en DMSO-d₆ para los dendrímeros **11-13**.



Grupo	n = 1, m = 4 (15)	n = 2, m = 8 (16)	n = 3, m = 16 (17)
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	63.3	63.3	63.3
N ⁺ CH ₂ CH ₃	56.6	56.6	56.6
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	56.0	56.0	56.0
N ⁺ Me ₃	52.5	52.5	52.5
N ⁺ CH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	52.0	52.0	52.1
N ⁺ Me	47.2	47.2	47.2
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	18.9	18.9	18.9
Si(CH ₂) ₃ Si	17.6	17.8 - 16.1	17.7 - 16.1
	16.4		
	16.0		
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N ⁺	10.6	10.6	10.6
N ⁺ CH ₂ CH ₃	7.4	7.5	7.5
SiMe ₂	-3.8	-3.8	-3.8
SiMe		-5.4	-5.3

Tabla II.13. Datos de ¹³C-RMN para los dendrímeros **15-17** en DMSO-d₆.

Las señales de los átomos de carbono de los dendrímeros son similares a las de los derivados monofuncionales **6**, **10** y **14**. Se observan cuatro señales localizadas a δ 63.3 (c), 56.6 (f), 56.0 (e) y 51.9 (d) que se corresponden con los grupos metileno unidos a nitrógeno y dos señales para los metilos unidos a nitrógeno a δ 52.4 (h) y 47.1 (i) en los dendrímeros cuaternizados con MeCF₃SO₃ (**7-9**) (ver Figura II.19.) y MeI (**15-17**). En el caso de los dendrímeros cuaternizados con HCl (**11-13**), las señales que aparecen a δ 54.0 (c), 46.3 (f), 44.8 (d) y 49.0 (e) se asignan a los metilenos unidos a nitrógeno mientras que a δ 41.7 se localizan los grupos metilo geminales.

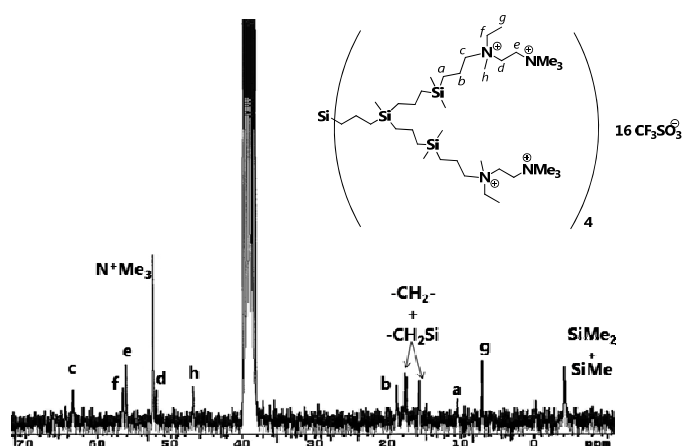


Figura II.19. Espectro de ^{13}C -RMN en $\text{DMSO-}d_6$ para el dendrímero **8**.

En cuanto a los espectros de ^{15}N -RMN determinados por gHMBC- $\{^1\text{H-}^{15}\text{N}\}$ de los dendrímeros **11-13** (cuaternizados con HCl), muestran dos señales aproximadamente a δ -340 y -325 mientras que los dendrímeros cuaternizados con MeCF_3SO_3 y MeI (**7-9** y **15-17**) muestran señales en torno a δ -331 y δ -320 que se corresponden, respectivamente con el nitrógeno externo e interno. En este caso también se produce un desplazamiento de las señales a valores mayores de δ con respecto a sus análogos neutros, como consecuencia de la carga positiva sobre los átomos de nitrógeno.^[23] La presencia de sólo dos señales confirma la cuaternización de todos los átomos de nitrógeno, incluso en el dendrímero de tercera generación. Como ejemplo ilustrativo, en la Figura II.20., se muestra el espectro gHMBC- $\{^1\text{H-}^{15}\text{N}\}$ del dendrímero **16**.

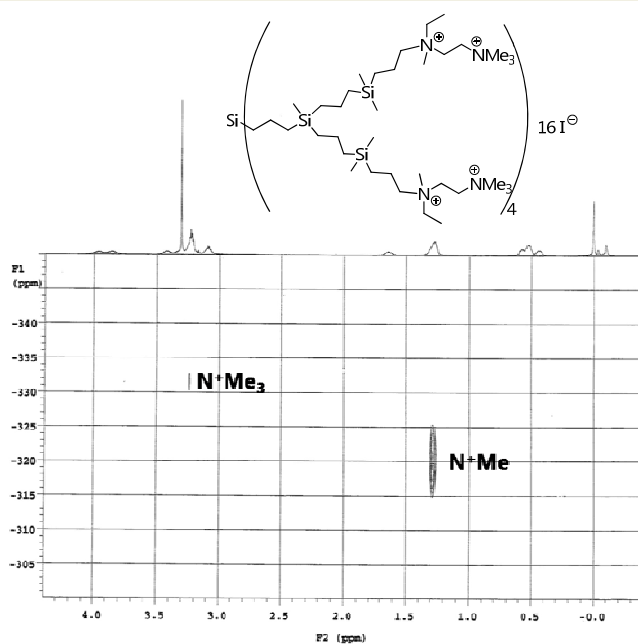


Figura II.20. Espectro de gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ en DMSO- d_6 para el compuesto **16**.

Para los dendrimeros **7-9** el espectro de ^{19}F -RMN muestra una señal aproximadamente a δ -78, este valor de resonancia indica que el ión triflato (CF_3SO_3^-), no se encuentra interaccionando con el catión, ya que si fuera éste el caso la señal se desplazaría en torno a 1-2 ppm.^[33]

Con el fin de obtener derivados con un único grupo amino cuaternizado, se llevó a cabo la reacción estequiométrica del dendrimer de segunda generación **4**, conteniendo ocho grupos amino en la periferia, con 8 equivalentes de MeI. Sin embargo, esto produjo una mezcla de productos donde es posible identificar, mediante experimentos de ^1H -RMN y gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ la presencia de ramas que contienen 1 ó 2 átomos de nitrógeno cuaternizados. En el espectro bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para esta mezcla (Figura II.21.), junto a las señales del dendrimer catiónico esperado ($\text{G}_2\text{-}[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)]_8 8\text{I}^-$), se observan señales correspondientes a ramas no metiladas. Este espectro muestra dos señales en torno a δ -331 y -342

que se corresponden con los nitrógenos externo cuaternizado e interno sin cuaternizar, respectivamente. También es posible observar dos señales débiles a δ -356 (nitrógeno interno) y -339 (nitrógeno externo), que se corresponden con las ramas no metiladas (ver Figura II.21.).

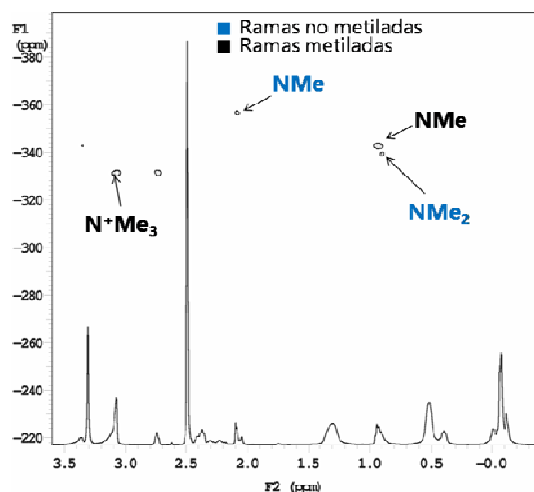


Figura II.21. Experimento gHMBC-¹H-¹⁵N en DMSO-*d*₆ para la mezcla de compuestos.

Sin embargo en el espectro de gHMBC-¹H-¹⁵N, nunca se observan las señales correspondientes a la cuaternización del átomo de nitrógeno interno, lo que sugiere que la cuaternización de los grupos amino se produce, inicialmente, en el nitrógeno externo progresando hacia el interno.

b) Espectrometría de masas.

Para los dendrímeros catiónicos **7-9**, **11-13** y **15-17**, se han llevado a cabo intentos de registrar espectros de Maldi-TOF en una matriz de ditranol, sin embargo no fue posible obtener resultados coherentes, posiblemente debido a la dificultad que presentan estas macromoléculas para ser fragmentadas por ionización.

c) Medidas de radios hidrodinámicos.

Al igual que se hizo con los dendrímeros neutros **3-5**, en el caso de los derivados cuaternizados con MeCF_3SO_3 , se ha determinado el radio hidrodinámico mediante medidas de coeficiente de difusión en RMN. Las medidas se realizaron en acetona y en agua, ambas deuteradas, a 25°C. En la Tabla II.14., se muestran los resultados más relevantes de este experimento.

Compuesto	Disolvente	D comp. x 10 ⁻¹⁰	d _H comp. (nm)
7	C ₃ D ₆ O	6.70	1.76
8		4.60	2.58
9		4.20	2.78
7	D ₂ O	3.50	1.38
8		4.00	2.16
9		2.00	2.34

Tabla II.14. Diámetros hidrodinámicos para los dendrímeros
 $G_n\text{-}\{[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}^+(\text{Me})(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)]_m \text{mCF}_3\text{SO}_3^-\}$ **7-9**.

De estos datos de difusión, se puede inferir que el tamaño de estos dendrímeros, como era de esperar, es mayor que el de sus análogos neutros siendo este aumento más acusado cuando el compuesto se disuelve en acetona. Este comportamiento se puede deber a que, aunque tanto acetona como agua son disolventes polares, el agua, debido a su constante dieléctrica (80 F/m), mayor que la de la acetona (20.7 F/m), en agua el esqueleto hidrofóbico carbosilano es probable que se encuentre menos "extendido" que en acetona, ya que según el criterio de "buen/mal disolvente", para estos compuestos de esqueleto apolar, el agua se comporta como un mal disolvente.^[34,35] Otra posible explicación se basa también en la polaridad de los disolventes: en agua los iones se encuentran totalmente separados rodeados de moléculas de disolvente (solvatados), mientras que en acetona es más favorable la formación de pares iónicos. De modo que en el experimento DOSY en agua

se medirá la difusión del catión rodeado de moléculas de agua, mientras que en acetona lo que se determinará es la difusión del catión junto con el anión y ambos rodeados de moléculas de disolvente. Esto también podría explicar el mayor tamaño de los dendrímeros catiónicos, comparado con los neutros.

e) *Estudios teóricos.*

En colaboración con el Dr. Marek Maly del Departamento de Física de la Universidad J. E. Purkinje de la República Checa, se ha llevado a cabo una modelización de estos dendrímeros carbosilano catiónicos. Este estudio teórico preliminar ha permitido llevar a cabo una comparación (Figuras II.22. y II.23.), de la estructura y tamaño de estas nuevas macromoléculas con las sintetizadas anteriormente en nuestro grupo de investigación.^[7]

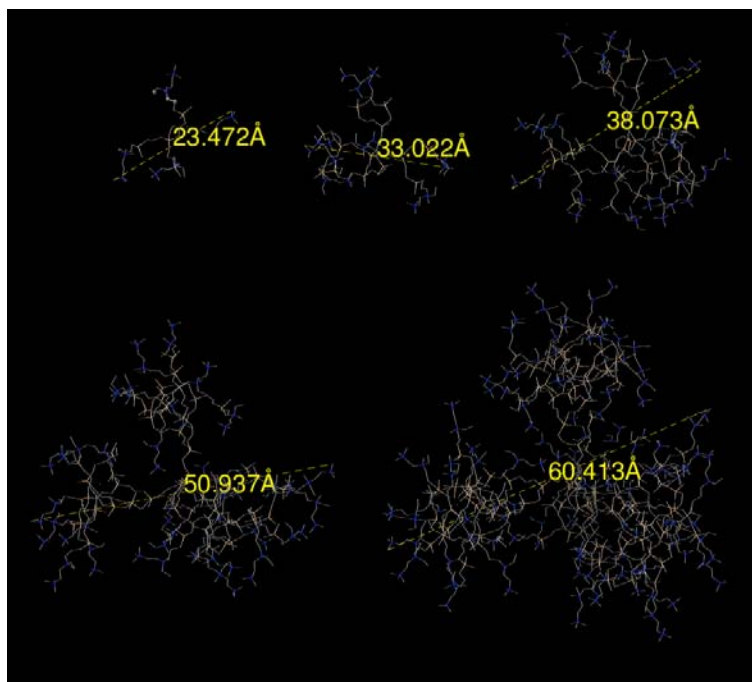


Figura II.22. Modelización y diámetros en Å de los dendrímeros G_n - $\{[(CH_2CH_2CH_2)N^+(Me)(Et)(CH_2CH_2N^+Me_3)]_m mX\}$ donde $n=1-5$, $m=8-128$ y $X = I$ ó CF_3SO_3 .

En la Figura II.22., es posible observar la estructura tridimensional de los dendrímeros $G_n - \{[(CH_2CH_2CH_2)N^+(Me)(Et)(CH_2CH_2N^+Me_3)]_m mX^-\}$ donde $n=1-5$, $m=8-128$ y $X^- = I$ ó CF_3SO_3 . Las estructuras en las que $n=1-3$, coinciden con los dendrímeros **7-9** y **15-17**, mientras que $n=4$ y 5 es una situación idealizada.

Este estudio confirma el hecho de que las generaciones menores poseen una estructura más abierta, mientras que al aumentar la generación las estructuras se van haciendo más densas y de conformación más esférica, a pesar de que la diferencia existente entre la segunda y la tercera generación es pequeña.

Además, mediante este estudio teórico ha sido posible determinar los diámetros de estas estructuras. Estos valores difieren de los calculados mediante DOSY debido a que este estudio teórico se ha hecho en ausencia de disolvente, por lo que los diámetros resultantes son mayores, ya que en un disolvente hidrofílico, estas estructuras tienden a plegarse.

También se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre los dendrímeros carbosilano estables presentados en esta memoria y los dendrímeros carbosilano preparados con anterioridad en nuestro grupo de investigación. En la Figura II.23., se puede apreciar que la estructura de los dendrímeros carbosilano catiónicos con enlace Si-O y con enlace Si-C no son muy diferentes, hecho que era de esperar, si bien el comportamiento en disolución acuosa de unos y otros difiere en lo que a solubilidad y estabilidad se refiere.

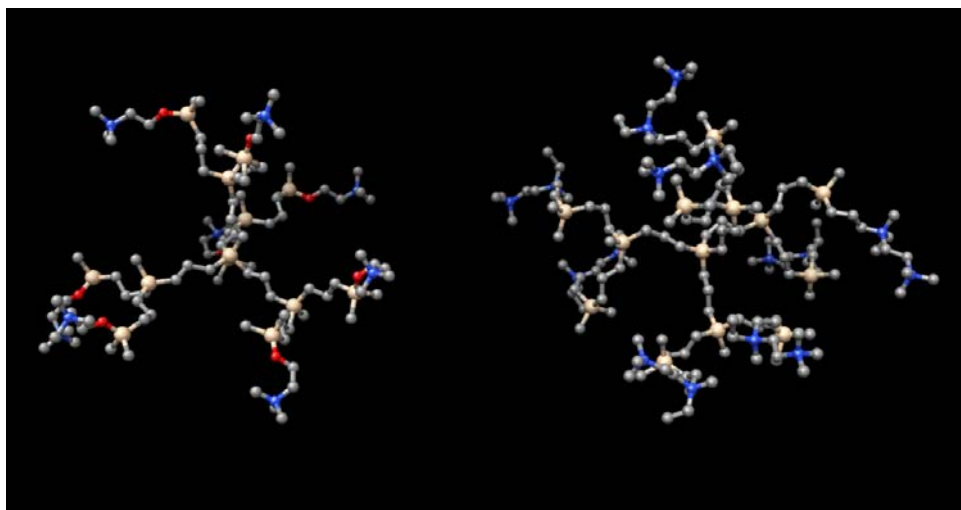
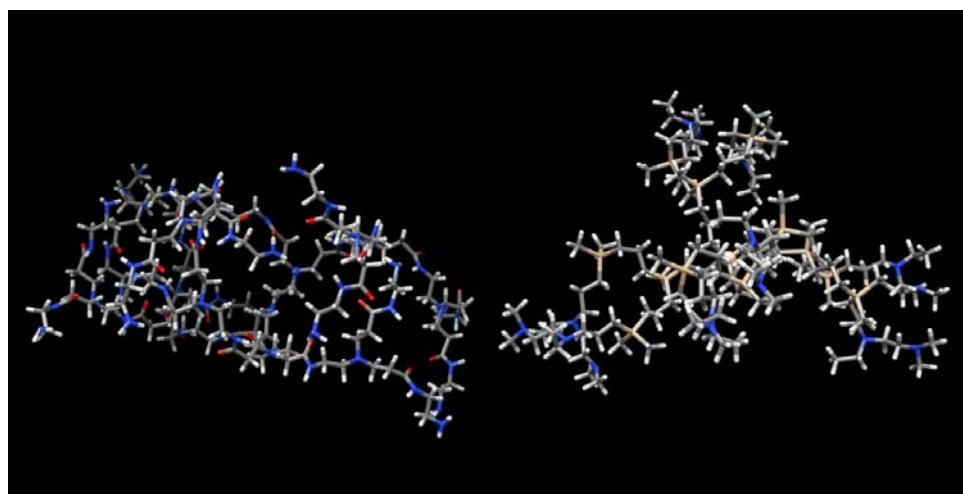
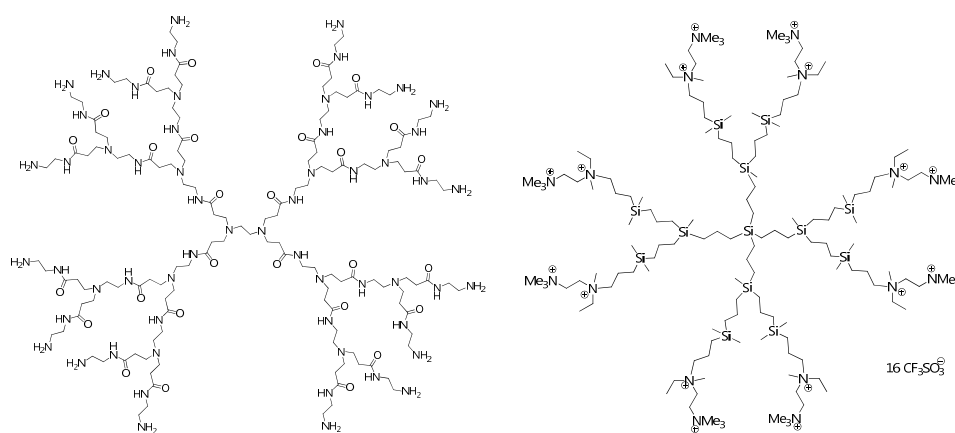


Figura II.23. Comparación entre los dendrímeros carboxilano de segunda generación con enlaces Si-O en su estructura y con enlaces Si-C.

Por otro lado, se han comparado estos dendrímeros carboxilano catiónicos con dendrímeros PAMAM. En la Figura II.24., es posible ver que la estructura de un dendrímero PAMAM de tercera generación es similar, en lo que al tamaño se refiere, a un dendrímero carboxilano catiónico de segunda generación. Sin embargo la estructura tridimensional del PAMAM es más cerrada que la del carboxilano (ver Figura II.24.(A)), a pesar de que la fórmula desarrollada de ambas moléculas (Figura II.24.(B)) es similar, lo que puede influir en su comportamiento como vehículo de transporte de fármacos o biomoléculas.



(A)



(B)

Figura II.24. Comparación entre un dendrímero PAMAM de tercera generación y el dendrímero carbosilano catiónico $G_2\text{-}\{[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}^+(\text{Me})(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)]_{16} 16\text{CF}_3\text{SO}_3^-\}$.**8**

(A), estructura modelada (B), estructura teórica.

II.2.3. Dendrímeros funcionalizados mediante hidrosililación de la amina $[(\text{CH}_2=\text{CHCH}_2)\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]$.

La elección de la amina [2-(4-alil-2-metoxi-fenoxi)-etil]-dimetil amina, se ha hecho en base a estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación.^[8] En este trabajo,^[8] se sintetizaron dendrímeros carbosilano que

contenían en su estructura un espaciador entre los grupos amonio terminales y los enlaces Si-O, con el fin de dotar a la molécula de una mayor estabilidad frente a los procesos de hidrólisis. Los estudios de estabilidad demostraron que de nuevo se produce la hidrólisis paulatina del enlace Si-O aunque de manera más lenta debido a la inclusión en la estructura de una molécula espaciadora. Para este tipo de dendrímeros se obtuvieron buenos perfiles de biocompatibilidad, además de ser capaces de unirse a oligonucleótidos. En la Figura II.25., se muestra a modo de ejemplo, la estructura de un dendrímero de segunda generación con 16 cargas positivas en la periferia.

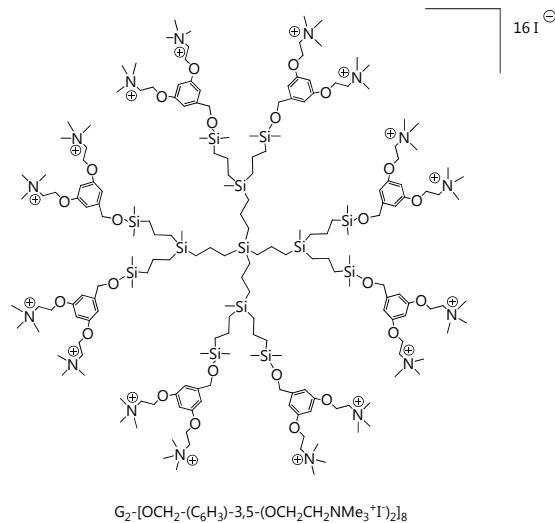
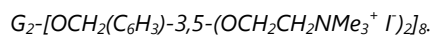


Figura II.25. Estructura del dendrímero de segunda generación

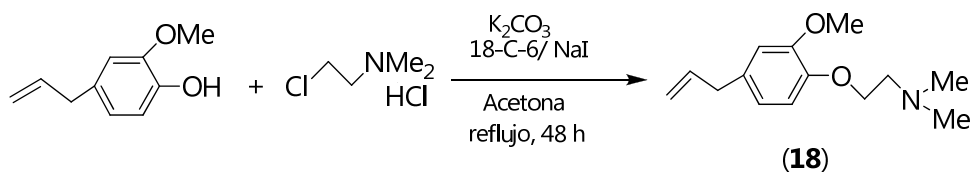


Por otro lado, la inclusión de un anillo aromático en el fragmento terminal de cada rama podría dotar al sistema de propiedades fluorescentes que resultarían útiles a la hora de estudiar las posibles aplicaciones biomédicas de estos dendrímeros, como se explicará más adelante en este capítulo.

II.2.3.1. Estudio preparativo.

II.2.3.1.1. Síntesis del compuesto [2-(4-alil-2-metoxi-fenoxi)-etil]-dimetil amina.

La amina **18** se prepara a partir del reactivo comercial [(CH₂=CH-CH₂)C₆H₃(OMe)(OH)], también llamado "eugenol", y de ClCH₂CH₂N⁺Me₂H, Cl⁻. La reacción se lleva a cabo en presencia de NaI/K₂CO₃ y de éter corona (18-Corona-6) en acetona a reflujo durante dos días. A continuación, se lleva a cabo una extracción líquido-líquido con CH₂Cl₂/H₂O. En la fase orgánica se separa la alilamina impurificada con el compuesto de partida "eugenol", que se elimina llevando a cabo extracción líquido-líquido con una disolución de HCl 1M en H₂O. En la fase acuosa se separa el compuesto [(CH₂=CHCH₂)C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)] en forma de sal de amonio, la cual se trata con una disolución de NaOH 1M en H₂O para extraer la especie amina en dietiléter. Tras evaporar el disolvente a vacío se aísla la alilamina [(CH₂=CHCH₂)C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)] **18** como un aceite de color amarillo con un rendimiento del 52%. Esquema II.11.

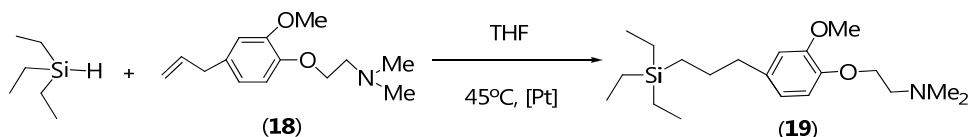


Esquema II.11. Síntesis del compuesto [2-(4-alil-2-metoxi-fenoxi)-etil]-dimetil amina **18**.

II.2.3.1.2. Síntesis de dendrímeros con grupos amino en la superficie.

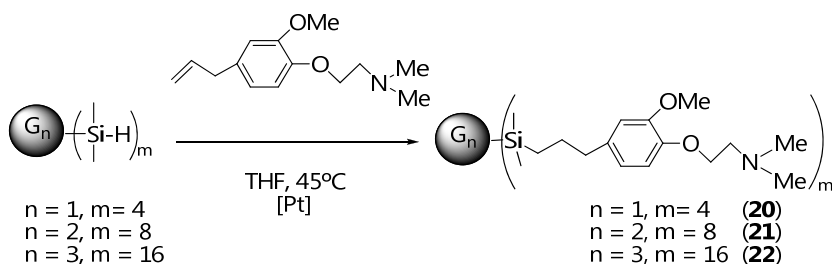
Una vez obtenida la alilamina **18**, al igual que se ha hecho con los dendrímeros funcionalizados con la diamina **1**, detallada con anterioridad en este capítulo, lo más apropiado es preparar el compuesto monofuncional G₀, para establecer las condiciones óptimas de reacción y a la vez facilitar la caracterización estructural de los demás miembros de la familia de dendrímeros.

El compuesto $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2[\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]$ **19**, se obtiene mediante reacción de hidrosilación de la alilamina **18** con trietilsilano en presencia del catalizador de Karstedt, utilizando THF como disolvente. La reacción se mantiene con agitación constante a 45°C durante 12 horas (ver Esquema II.12.). Tras evaporar el disolvente y lavar el residuo con hexano, se obtiene el compuesto **19** como un aceite amarillo con buenos rendimientos.



Esquema II.12. Síntesis del compuesto $G_0\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]_4$ **19**.

Los dendrímeros neutros de primera, segunda y tercera generación $G_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]_m$ **20**, **21** y **22**, se obtienen siguiendo el procedimiento establecido para el compuesto **19**, partiendo de los dendrímeros precursores $G_n\text{-H}_m$ con grupos Si-H terminales donde $n = 1, 2$ y 3 ; $m = 4, 8$ y 16 . De este modo se obtienen los dendrímeros **20-22** como aceites de color marrón (ver Esquema II.13.). Estos dendrímeros con grupos amino terminales son solubles en disolventes orgánicos de uso común (clorados, alifáticos y aromáticos).



Esquema II.13. Síntesis de dendrímeros $G_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]_m$ **20**, **21** y **22**.

En la Figura II.26., se muestran las estructuras propuestas para esta familia de dendrímeros con grupos amino terminales.

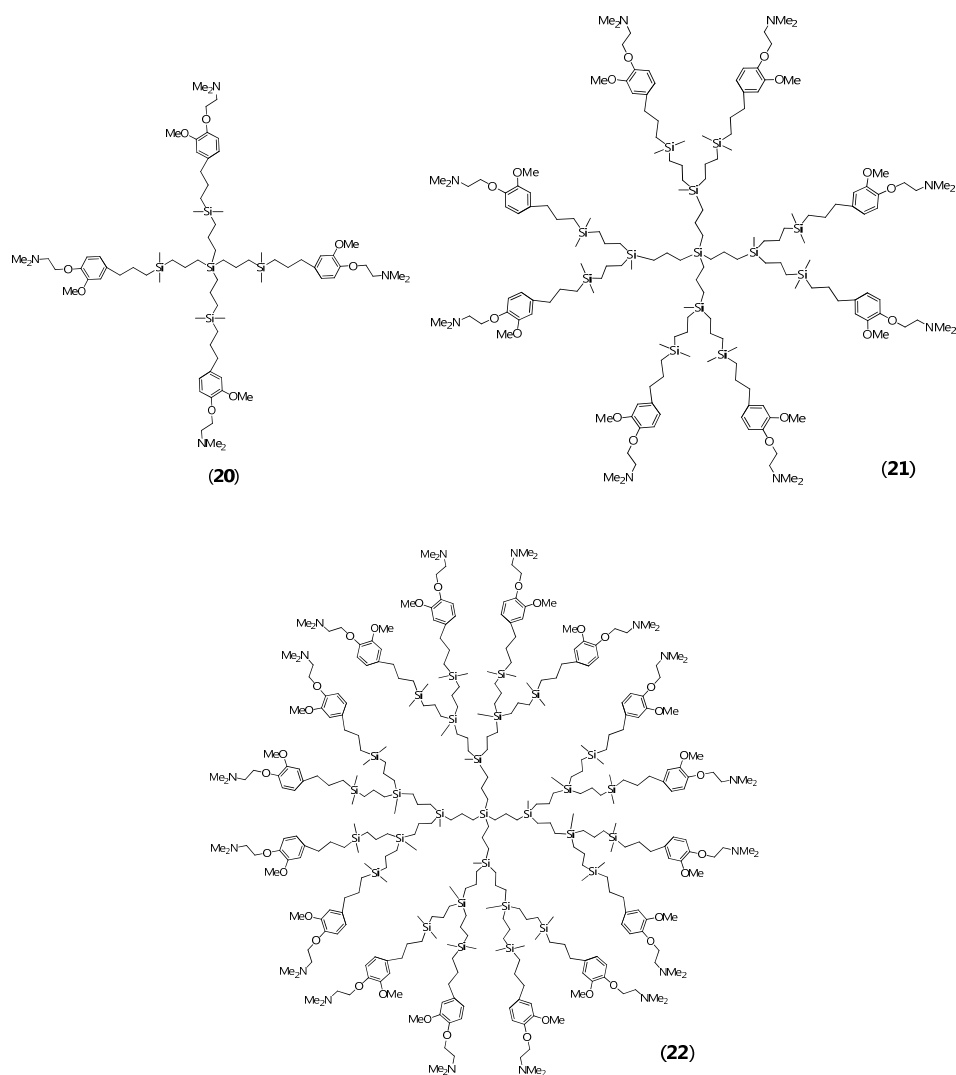
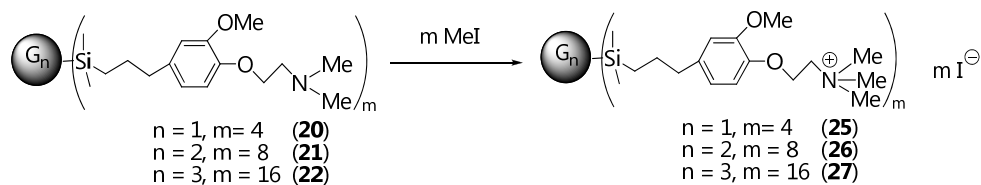


Figura II.26. Estructuras propuestas para los compuestos **20-22**.

II.2.3.1.3. Síntesis de dendrimeros con grupos amonio en la superficie.

La adición de un exceso de MeI 2M en éter dietílico sobre los compuestos **18** y **19**, conduce a la formación de los compuestos catiónicos $\{[(\text{CH}_2=\text{CHCH}_2)\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_3^+)], \text{I}^-\}$ **23**, y $\text{G}_0\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)], \text{I}^-\}$ **24** que, tras lavar con hexano y secar a vacío se obtienen como sólidos blancos con un elevado rendimiento. El

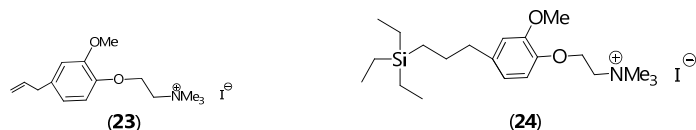
compuesto **24** es parcialmente soluble en agua, pero se puede disolver en agua completamente mediante la adición de pequeñas cantidades de DMSO (<5%). Siguiendo un procedimiento similar al descrito para **24**, se obtienen los dendrímeros **25**, **26** y **27** como sólidos blancos (Esquema II.14.).



Esquema II.14. Síntesis de dendrímeros



Estos dendrímeros no son solubles en disolución acuosa, lo que probablemente dificultaría su aplicación en procesos biológicos. Sin embargo, sí lo son tras la adición de pequeñas cantidades de DMSO (<5%), cantidad que permite la realización de ensayos biomédicos con estos compuestos en condiciones no tóxicas. En la Figura II.27., se muestran las estructuras propuestas para estos compuestos.



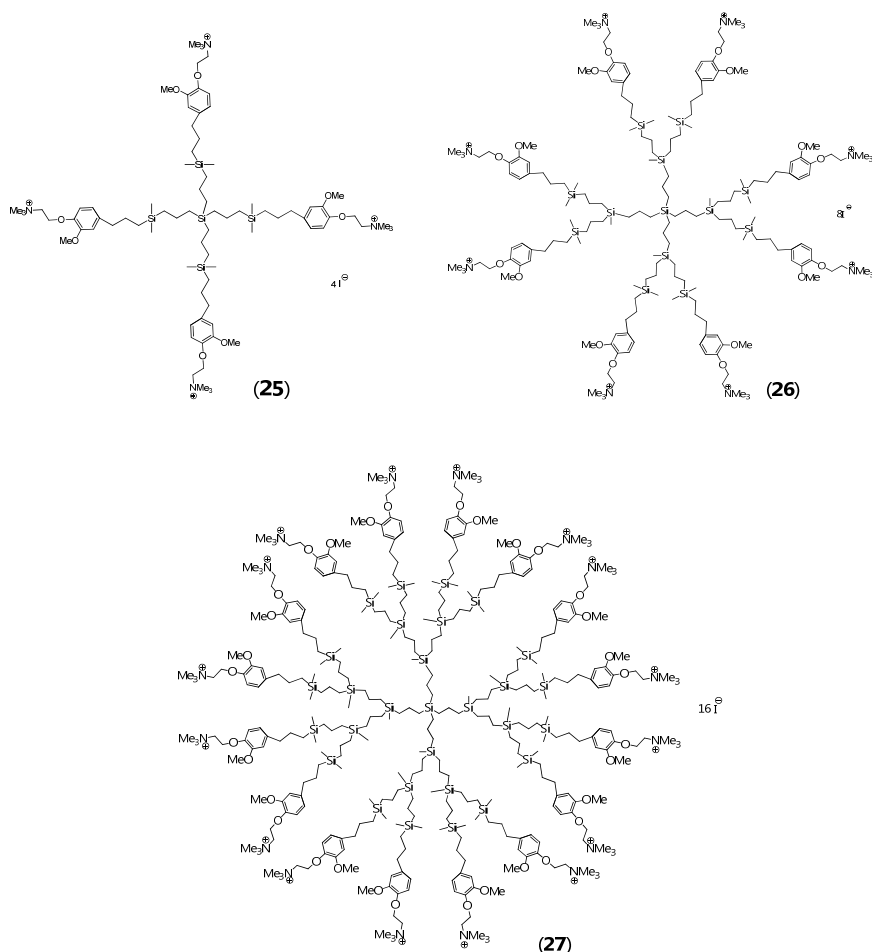


Figura II.27. Estructuras propuestas para los compuestos **23-27**.

II.2.3.2. Estudio estructural.

A continuación se llevará a cabo un estudio detallado de las características estructurales más importantes de los dendrímeros funcionalizados con la alilamina **18** y su posterior cuaternización con MeI.

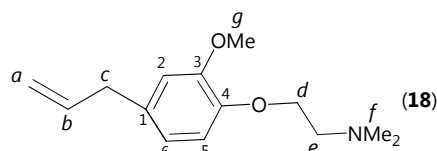
II.2.3.2.1. *Dendrímeros funcionalizados con grupos amino.*

La caracterización estructural de los compuestos **18-22** se ha llevado a cabo mediante análisis elemental de C, H y N, espectroscopía de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{29}Si , espectrometría de masas APCI para el ligando alilamina y, MALDI-TOF

para los dendrímeros. Esta caracterización confirma las estructuras propuestas en la Figura II.26.

a) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Los datos más significativos de ^1H y ^{13}C -RMN del compuesto **18** en CDCl_3 como disolvente, se encuentran recogidos en la Tabla II.15.



Grupo	^1H -RMN ppm	Grupo	^{13}C -RMN ppm
C_6H_3	6.79	C_6H_3	149.5 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$)
	6.68		146.5 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{OMe}$)
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	5.92		137.6 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$)
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	5.02		120.4, 113.8, 112.3 (C_6H_3)
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	4.07	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	133.2
CH_3O	3.81	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	115.6
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	2.52	$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	67.4
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	2.74	$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	58.1
NMe_2	2.31	CH_3O	55.8
		NMe_2	45.9
		$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	39.8

Tabla II.15. Datos de ^1H y ^{13}C -RMN del compuesto **18**.

El espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 (ver Figura II.28.), muestra un pseudodoublete a δ 6.79 correspondiente a los protones del C_2 del anillo bencílico y un multiplete a δ 6.68 que se asigna a los protones situados sobre los átomos de carbono C_6 y C_5 . Los grupos metileno del sistema alilo aparecen a δ 5.92, 5.02 y 2.52 (b , a y c , respectivamente). Los grupos metileno situados entre los átomos de oxígeno y nitrógeno proporcionan dos tripletes a δ 4.07 (d)

y 2.74 (e). A δ 3.81 se observa un singlete que se asigna al metilo (g) del grupo metóxido unido al anillo bencílico. Por último, los protones del grupo dimetilamino dan un singlete localizado a δ 2.31.

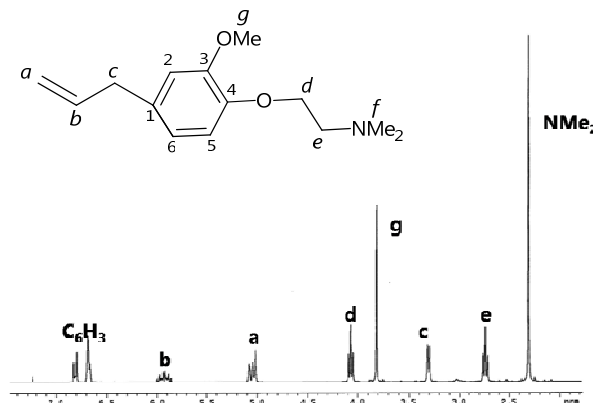


Figura II.28. ^1H -RMN del compuesto **18** en CDCl_3 .

En cuanto a los datos de ^{13}C -RMN, en la zona de frecuencias 150-110 ppm, se localizan las señales típicas del anillo bencílico. Los carbonos del sistema alilo (*Ca*, *Cb* y *Cc*) también aparecen en la zona del espectro esperada, es decir, a δ 133.2, 115.6 y 39.8, respectivamente. Los átomos de carbono de los grupos metileno *d* y *e*, aparecen a 67.4 y 58.1 ppm, respectivamente, mientras que la señal situada a δ 45.9, se asigna a los *Cf* de los grupos metilo del fragmento dimetilamino. En la Figura II.29., se muestra el espectro de ^{13}C -RMN en CDCl_3 para este compuesto.

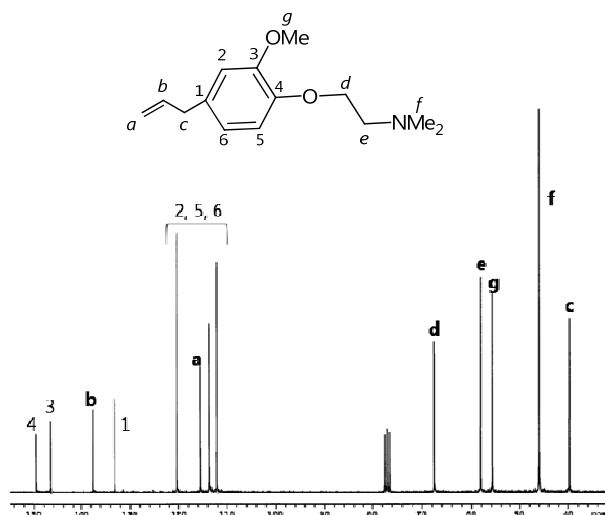


Figura II.29. Espectro de ^{13}C -RMN en CDCl_3 para el compuesto **18**.

Cuando se lleva a cabo la reacción de hidrosililación entre esta amina **18** y trietilsilano, al igual que ocurría con la diamina **1**, ya comentada en este capítulo, se forma la especie monofuncional, $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)$, hecho que se comprueba a través de la desaparición de las señales en ^1H -RMN propias del fragmento alilo y del protón unido a Si de $\text{Et}_3\text{Si-H}$ (ver Figura II.30.), apareciendo las señales que se detallan en la Tabla II.16., correspondientes al nuevo compuesto **19**.

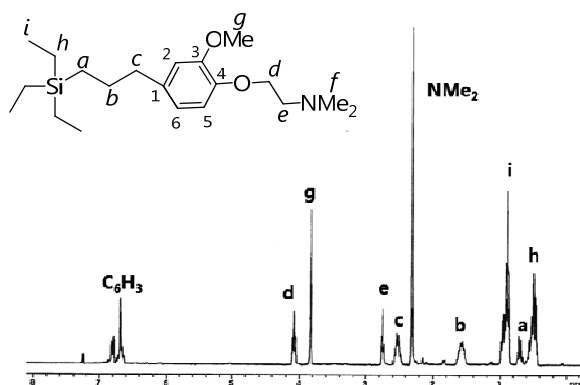
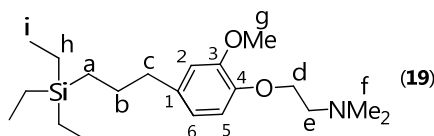


Figura II.30. Espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 del compuesto G_0^-
 $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]$.



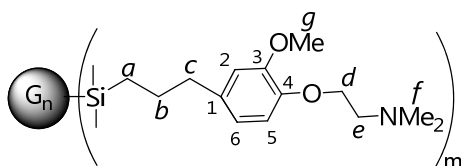
Grupo	^1H -RMN	Grupo	^{13}C -RMN
C_6H_3	6.80	C_6H_3	149.3 ($\text{C}_{\text{ipso}}\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$)
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	6.65		146.2 ($\text{C}_{\text{ipso}}\text{OMe}$)
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	4.07		136.0 ($\text{C}_{\text{ipso}}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$)
CH_3O	3.82		120.2, 113.6, 112.2 (C_6H_3)
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	2.74	$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	67.4
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	2.53	$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	58.2
NMe_2	2.31	CH_3O	55.8
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	1.57	NMe_2	46.0
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$	0.88	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	39.7
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	0.68	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	26.1
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Si}$	0.48	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	11.2
		SiCH_2CH_3	7.2
		SiCH_2CH_3	3.2

Tabla II.16. Datos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN para el compuesto **19** en CDCl_3 .

En el espectro de ^1H -RMN en CDCl_3 del compuesto **19** no se observa una variación importante en las señales de los protones del anillo bencílico ni de los protones *d*, *e*, *f* y *g* que no se ven afectados de forma apreciable por la reacción de hidrosililación, como tampoco se ven afectados los protones del grupo metileno unido al anillo aromático (*c*). Los protones metilénicos *H_b*, proporcionan un multiplete a δ 1.57, mientras que los unidos directamente a silicio (*a*), se localizan a δ 0.68. En cuanto a las señales del grupo etilo unido a silicio generan dos multipletes a δ 0.88 (*i*) y 0.48 (*h*).

En el espectro de ^{13}C -RMN se observan desplazamientos químicos muy similares a los de la amina **18**. Desaparecen las señales típicas del fragmento alilo, así las señales que aparecen a δ 39.7, 26.1 y 11.2 se asignan a los protones metilénicos *c*, *b* y *a*, respectivamente. El grupo etilo proporciona dos señales localizadas a δ 7.2 (*i*) y 3.2 (*h*).

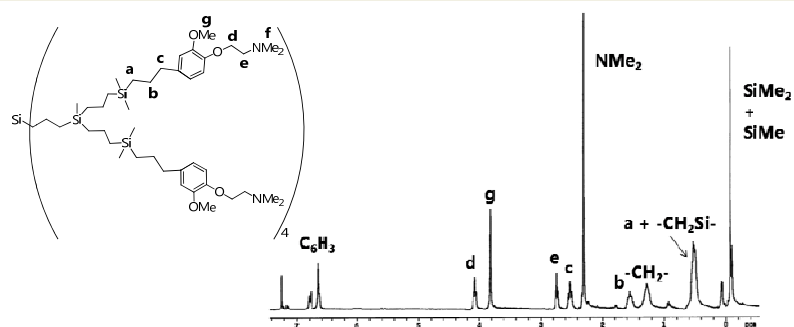
En cuanto a los dendrímeros, las señales del esqueleto carbosilano en los sistemas **20**, **21** y **22** proporcionan señales casi idénticas en CDCl_3 (ver Tabla II.17.), ensanchándose a medida que aumenta la generación del dendrímero, localizadas a δ 1.27 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$), 0.53 ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$ y $\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$), -0.07 (SiMe) y -0.10 (SiMe). El resto de señales correspondientes al fragmento amina son muy similares a las ya explicadas para el compuesto **19**.



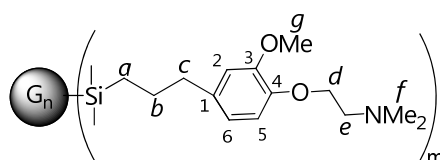
Grupo	20	21	22
C ₆ H ₃	6.80	6.80	6.76
	6.65	6.66	6.65
C ₆ H ₃ OCH ₂ CH ₂ NMe ₂	4.07	4.08	4.06
CH ₃ O	3.81	3.81	3.79
C ₆ H ₃ OCH ₂ CH ₂ NMe ₂	2.74	2.74	2.75
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃	2.52	2.52	2.51
NMe ₂	2.31	2.30	2.32
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃	1.55	1.55	1.55
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	1.28	1.28	1.27
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si y SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃	0.53	0.53	0.53
SiMe ₂	-0.07	-0.07	-0.07
SiMe		-0.10	-0.09

Tabla II.17. Datos de ¹H-RMN para los dendrímeros **20**, **21** y **22** en CDCl₃.

En la Figura II.31., se muestra a modo de ejemplo, el espectro de ¹H-RMN del dendrímero de segunda generación G₂-[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)]₈, en el que se muestran las señales más significativas de este tipo de dendrímeros.


 Figura II.31. Espectro de ^1H -RMN del dendrímero de segunda generación **21**.

En cuanto al espectro de ^{13}C -RMN en CDCl_3 (ver Tabla II.18.), las señales correspondientes al grupo periférico son prácticamente las mismas que las observadas en el compuesto **19**. Aquí, además es posible observar las señales correspondientes al esqueleto carbosilano localizadas en la zona de menores valores de δ , tal y como era de esperar.



Grupo	20	21	22
C_6H_3	149.4 (C_{ipso} $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$) 146.3 (C_{ipso} OMe) 136.0 (C_{ipso} $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$) 120.2, 113.7, 112.3 (C_6H_3)	149.4 (C_{ipso} $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$) 146.3 (C_{ipso} OMe) 136.0 (C_{ipso} $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$) 120.2, 113.7, 112.3 (C_6H_3)	149.7 (C_{ipso} $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$) 146.6 (C_{ipso} OMe) 136.4 (C_{ipso} $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$) 120.6, 113.9, 112.6 (C_6H_3)
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	67.5	67.4	67.4
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$	58.2	58.2	58.5
CH_3O	55.9	55.9	56.2
NMe_2	46.0	46.0	46.2
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	39.7	39.6	40.1
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	26.3	26.2	26.7
$\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{Si}$	20.3, 18.6, 17.5	20.1, 18.8, 18.6	20.6, 19.2, 18.9
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	15.4	15.4	15.8
SiMe_2	-3.3	-3.2	-2.8
SiMe		-4.9	-4.5

 Tabla II.18. Datos de ^{13}C -RMN de los dendrímeros **20-22** en CDCl_3 .

En la Figura II.32., se muestra el espectro de ^{13}C -RMN del dendrímero de segunda generación $\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]_8$ **21**.

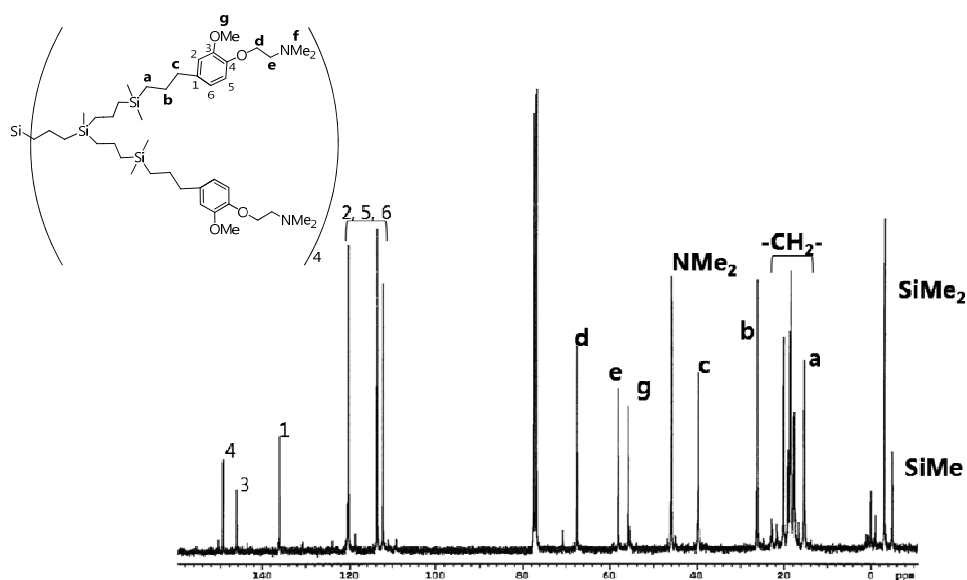


Figura II.32. Espectro de ^{13}C -RMN del dendrímero **21**.

La asignación de las señales tanto de ^1H como de ^{13}C -RMN para los compuestos **18-22**, se ha llevado a cabo basándose en la asignación realizada para compuestos análogos funcionalizados con grupos fenólicos sintetizados con anterioridad por nuestro grupo de investigación,^[27] los cuales fueron totalmente caracterizados mediante los experimentos bidimensionales, TOCSY 2D, HMBC y HSQC.^[36]

En el espectro de ^{29}Si -RMN de los tres compuestos (**20-22**) como norma general sólo se observan los átomos de silicio más externos. Los silicios internos, tal y como se ha comentado en la discusión de resultados de los dendrímeros anteriores, no se detectan por las mismas razones. Sin embargo, las señales son las esperadas para las tres generaciones, apareciendo en el espectro bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$, en torno a δ 1.7 la señal

correspondiente al átomo de silicio externo y a δ 1.00 el silicio inmediatamente anterior a éste.

b) *Espectrometría de masas.*

En el espectro de masas por electrospray (APCI) para el compuesto **18**, obtenido en CH₃OH/H₂O se observa la especie [M+H]⁺.

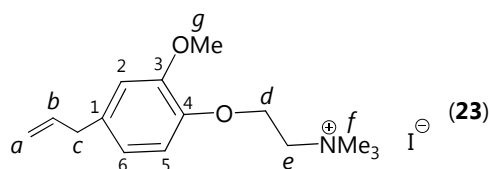
En cuanto a los dendrímeros, sólo ha sido posible observar el pico molecular mediante MALDI-TOF en el caso del dendrímero de primera generación **20** y, en este caso, el dato experimental confirma la existencia de esta macromolécula como especie monomolecular (datos recogidos en el capítulo dedicado a la parte experimental).

II.2.3.2.2. *Dendrímeros funcionalizados con grupos amonio.*

Los datos analíticos y espectroscópicos de los compuestos **23-27**, son concordantes con las estructuras propuestas en la Figura II.26.

a) *Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.*

Los datos de ¹H y ¹³C-RMN en DMSO-d₆ para el compuesto **23**, se encuentran recogidos en la Tabla II.19.



Grupo	$^1\text{H-RMN}$ ppm	Grupo	$^{13}\text{C-RMN}$ ppm
C_6H_3	6.99	C_6H_3	148.7 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$)
	6.68		144.5 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{OMe}$)
	6.71		133.4 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$)
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2 \text{C}_6\text{H}_3$	5.92		119.7, 114.3, 112.1 (C_6H_3)
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2 \text{C}_6\text{H}_3$	5.03	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	137.3
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$	4.37	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	115.1
CH_3O	3.75	$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$	63.6
y		$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$	62.6
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$		CH_3O	55.1
$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2 \text{C}_6\text{H}_3$	3.31	N^+Me_3	52.7
N^+Me_3	3.19	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	39.8

Tabla II.19. Datos de ^1H y ^{13}C -RMN para el compuesto **23** en DMSO-d_6 .

En el espectro de ^1H -RMN registrado en DMSO-d_6 , las señales del compuesto son más anchas y la cuaternización del grupo dimetilamino provoca un desplazamiento de las señales de los protones más próximos a este grupo a mayores valores de frecuencia. Así, He y Hf proporcionan dos señales a δ 3.75 y δ 3.19 respectivamente, aproximadamente a un valor de 1 ppm más que las de su análogo neutro, tal y como era de esperar según las tablas de elucidación de datos espectroscópicos de RMN^[37]. El grupo metileno d, sufre un desplazamiento menos acusado, ya que se encuentra más alejado del grupo cuaternizado, proporcionando una señal ancha a 4.37 ppm. Las señales del anillo bencílico se ven mínimamente afectadas por la cuaternización. En cuanto al grupo alilo, proporciona las señales esperadas a δ 5.92 (b), 5.03 (a) y 3.31 (c). En la Figura II.33., se muestra el espectro de ^1H -RMN en DMSO-d_6 de la amina cuaternizada con MeI.

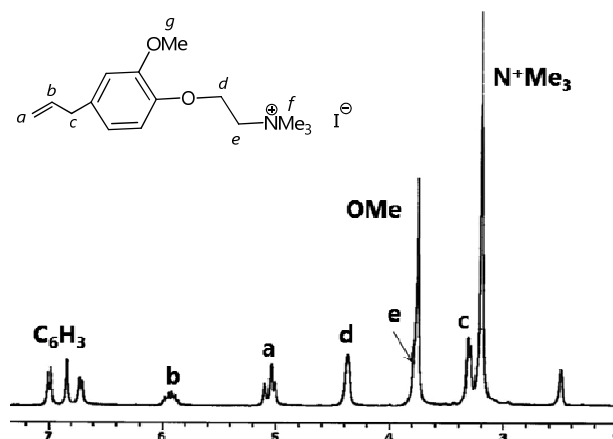


Figura II.33. Espectro de ^1H -RMN en DMSO-d_6 del compuesto **23**.

El espectro de ^{13}C -RMN en DMSO-d_6 , muestra un comportamiento similar, las señales que más afectadas se ven por la cuaternización son las correspondientes a los carbonos *d*, *e*, y *f* (ver Figura II.34.).

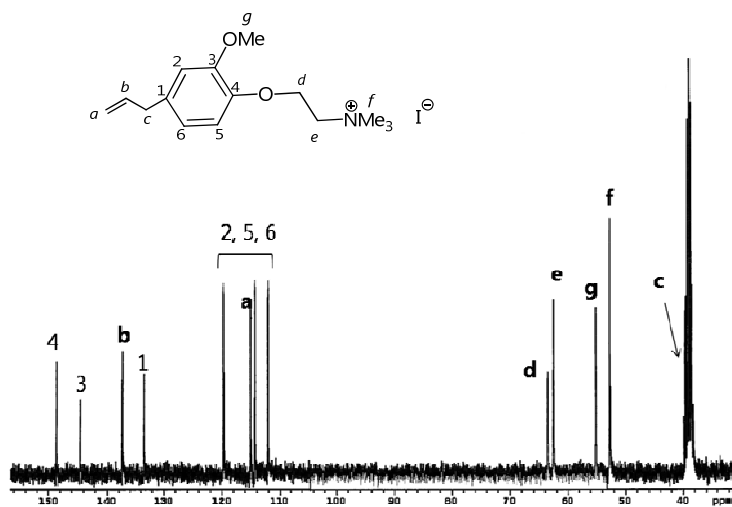
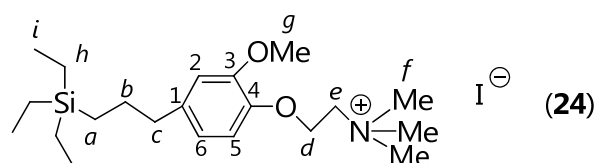


Figura II.34. Espectro de ^{13}C -RMN en DMSO-d_6 para el compuesto **23**.

La cuaternización del compuesto monofuncional **19** con MeI, conduce a la formación de la especie $\{[\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)] \text{I}^-\}$ **24**, cuyos datos espectroscópicos de RMN se recogen en la Tabla II.20.



Grupo	$^1\text{H-RMN}$ ppm	Grupo	$^{13}\text{C-RMN}$ ppm
C_6H_3	6.96	C_6H_3	148.5 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$)
	6.80		145.5 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{OMe}$)
	6.65		133.6 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$)
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$	4.35		119.5, 114.2, 112.1 (C_6H_3)
CH_3O	3.75	$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$	63.5
$\text{C}_6\text{H}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$		$\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3$	62.4
N^+Me_3	3.18	CH_3O	54.8
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	2.49	N^+Me_3	52.9
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	1.54	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	40.1
SiCH_2CH_3	0.87	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	26.2
SiCH_2CH_3	0.48	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$	11.3
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3$		SiCH_2CH_3	6.9
SiCH_2CH_3		SiCH_2CH_3	3.0

Tabla II.20. Datos de ^1H y $^{13}\text{C-RMN}$ en DMSO-d_6 de la especie **24**.

En los espectros de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ en DMSO-d_6 de este compuesto, es posible observar que la cuaternización del grupo dimetilamino provoca un desplazamiento de las señales de los grupos *f*, *d* y *e* a mayores valores de frecuencia con respecto al derivado neutro **19**, tal y como ocurre con el derivado catiónico **23**. Esta cuaternización apenas afecta al desplazamiento de las señales de los grupos bencilo y metóxido. La señal que aparece en el

espectro de ^1H -RMN a δ 3.18 se asigna, según las tablas,^[37] al grupo trimetilamonio. Las señales correspondientes al grupo trietilsililo, aparecen en la zona esperada con respecto a su análogo neutro.

A modo de ejemplo, en la Figura II.35., se muestra el espectro de ^1H -RMN del compuesto **24**.

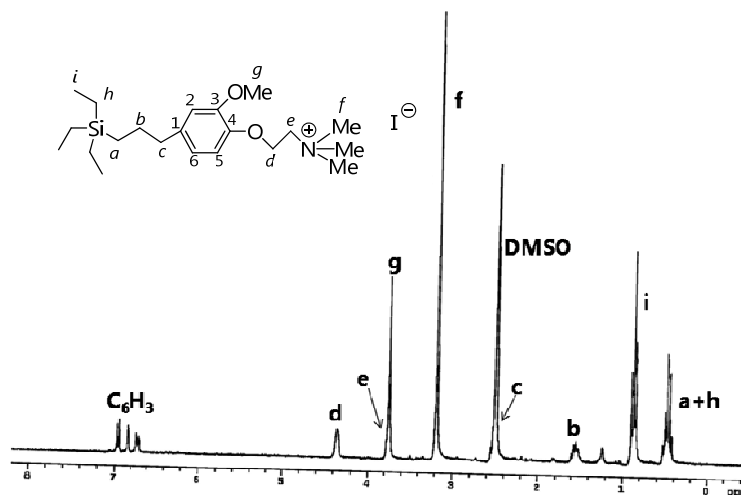
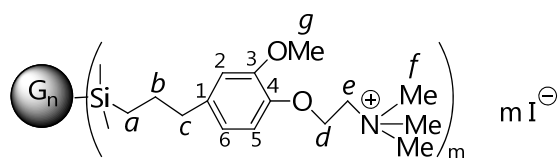


Figura II.35. Espectro de ^1H -RMN en DMSO-d_6 del compuesto **24**.

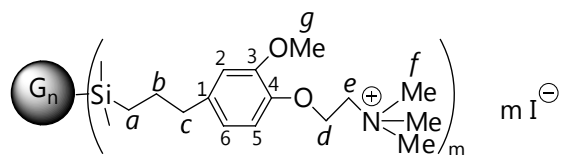
En lo que a los dendrímeros se refiere, en la Tabla II.21., se encuentran recogidos los datos de ^1H -RMN en DMSO-d_6 para los compuestos G_n - $\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)_m] \text{ mI}\}$ **25-27**.



Grupo	25	26	27
C ₆ H ₃	6.96	6.95	6.91
	6.79	6.78	6.71
	6.68	6.65	6.61
C ₆ H ₃ OCH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	4.34	4.33	4.31
CH ₃ O y C ₆ H ₃ OCH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	3.74	3.74	3.69
N ⁺ Me ₃	3.18	3.18	3.19
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃	2.49	2.49	2.49
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃	1.51	1.50	1.47
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	1.28	1.29	1.28
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃	0.51	0.52	0.49
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si			
SiMe ₂	-0.07	-0.09	-0.11
SiMe		-0.11	

Tabla II.21. Datos de ¹H-RMN en DMSO-d₆ para los dendrímeros **25**, **26** y **27**.

Para los dendrímeros catiónicos G_n-{[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂N⁺Me₃)_m] mI⁻} **25-27**, los datos de ¹H-RMN y de ¹³C-RMN del esqueleto carbosilano son muy similares en las tres generaciones, siendo más anchas a medida que aumenta la generación. En cuanto a las señales del grupo funcional amonio, los datos de protón y de carbono son los esperados según la asignación que se ha llevado a cabo en los compuestos **23** y **24**. Los datos de ¹³C-RMN en DMSO-d₆ de los dendrímeros catiónicos **25-27**, se encuentran en la Tabla II.22.



Grupo	25	26	27
C ₆ H ₃	148.6 (C _{ipso} OCH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃) 144.3 (C _{ipso} OMe) 135.9 (C _{ipso} CH ₂ CH ₂ CH ₂ Si-) 119.5, 114.2, 111.9 (C ₆ H ₃)	148.6 (C _{ipso} OCH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃) 144.3 (C _{ipso} OMe) 135.9 (C _{ipso} CH ₂ CH ₂ CH ₂ Si-) 119.5, 114.3, 111.9 (C ₆ H ₃)	148.6 (C _{ipso} OCH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃) 144.3 (C _{ipso} OMe) 135.8 (C _{ipso} CH ₂ CH ₂ CH ₂ Si-) 119.4, 114.4, 111.8 (C ₆ H ₃)
C ₆ H ₃ OCH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	63.6	63.6	63.6
C ₆ H ₃ OCH ₂ CH ₂ N ⁺ Me ₃	62.6	62.6	62.8
CH ₃ O	55.1	55.1	55.0
N ⁺ Me ₃	52.7	52.7	52.7
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃	39.0	39.0	39.0
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃	25.3	25.3	25.2
Si(CH ₂) ₃ Si	19.1, 17.6, 16.4	19.0, 17.7, 17.6	19.0, 17.7, 17.5
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ C ₆ H ₃	14.3	14.3	14.3
SiMe ₂	-3.7	-3.8	-3.9
SiMe		-5.4	-5.4

Tabla II.22. Datos de ¹³C-RMN para los dendrímeros **25-27** en DMSO-d₆.

En la Figura II.36., se muestran a modo de ejemplo, los espectros de ¹H y ¹³C-RMN para el dendrímero catiónico de primera generación G₁-
 {[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂N⁺Me₃)₄] 4I⁻} **25**.

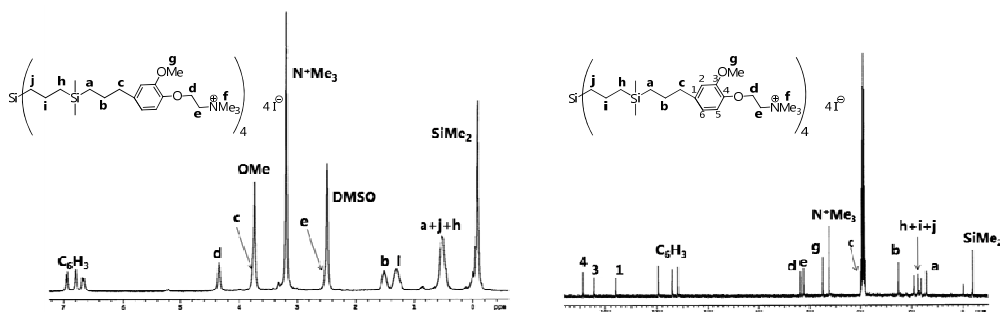


Figura II.36. Espectros de ¹H y ¹³C-RMN para el dendrímero **25** en DMSO-d₆.

En cuanto al espectro de ^{29}Si -RMN, al igual que ocurre con los dendrímeros ya descritos en este capítulo, sólo se observan las señales correspondientes a los átomos de silicio externos, apareciendo estas señales a δ 1.6 (átomo de silicio más externo) y δ 1.3 (átomo de silicio inmediatamente anterior al más externo).

b) *Espectrometría de masas.*

En el espectro de masas por APCI de la especie cuaternizada **23**, se detecta la especie $[\text{M}+2\text{H}-\text{I}]^+$ (datos experimentales reflejados en el capítulo dedicado a la parte experimental).

El espectro de masas MALDI-TOF (dendrímero **25**) y ESI-TOF (dendrímeros **26** y **27**), sólo permite ver el ión molecular en el caso del dendrímero de primera generación. Este comportamiento, de nuevo, coincide con el descrito en la bibliografía,^[25,28,30,31] para dendrímeros de elevado peso molecular.

II.2.4. Dendrímeros funcionalizados con otros ligandos amino terminales por alcoholisis de enlaces $\text{SiCH}_2\text{-Cl}$.

En este apartado se describe otra aproximación a la síntesis de dendrímeros catiónicos estables de naturaleza carbosilano. Para ello, se ha llevado a cabo la preparación de una nueva familia de dendrímeros en la que se ha sustituido la hidrosililación como método de introducción del ligando amino, por una reacción de fenólisis de enlaces $\text{SiCH}_2\text{-Cl}$. Se ha evitado llevar a cabo este tipo de reacción en dendrímeros que contienen enlaces Si-Cl , ya que esta situación daría lugar a sistemas dendríticos susceptibles de sufrir hidrólisis de los enlaces Si-OR . Esta última estrategia sintética ha sido utilizada con anterioridad por nuestro grupo de investigación.^[8] Así, se ha utilizado la fenolamina comercial $(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})$ para funcionalizar la periferia

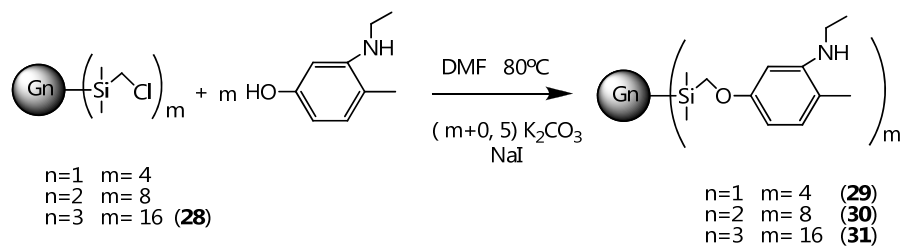
de dendrímeros carbosilano que contienen enlaces terminales $\text{SiCH}_2\text{-Cl}$. Para tal funcionalización, se lleva a cabo una sustitución nucleófila del átomo de cloro por este derivado fenólico en dendrímeros de 1^a, 2^a y 3^a generación del tipo $G_n\text{-(CH}_2\text{Cl)}_m$.

II.2.4.1. Estudio preparativo.

II.2.4.1.1. Síntesis de dendrímeros neutros.

Para la síntesis de esta nueva familia de dendrímeros se parte de los dendrímeros ya descritos $G_n\text{-(CH}_2\text{Cl)}_m$ ($n=1, m=4$; $n=2, m=8$)^[38] y $n=3, m=16$ (**28**). El dendrímero de tercera generación ha sido sintetizado siguiendo el mismo procedimiento que para G_1 y G_2 .

Sobre una disolución en DMF de estos compuestos, se añade la cantidad estequiométrica del reactivo comercial 3-(etilamino)-4-(metilfenol), $(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})$, una pequeña cantidad de NaI y un ligero exceso de K_2CO_3 . NaI se añade para sustituir Cl^- por I^- , que es mejor grupo saliente y K_2CO_3 para producir el medio básico necesario para desprotonar el ligando $(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})$ y que se produzca el ataque nucleofílico sobre el grupo $\text{-SiCH}_2\text{I}$. La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante a 80°C durante 48h. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente a vacío calentando con un baño de agua a 50°C y a continuación se lleva a cabo una extracción con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$. El producto obtenido se purifica a través de cromatografía en columna de exclusión por tamaños de poliestireno. De este modo se obtienen los dendrímeros $G_n\text{-[CH}_2\text{OC}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})]_m$ donde $n=1, m=4$ (**29**); $n=2, m=8$ (**30**) y $n=3, m=16$ (**31**) con rendimientos moderados. En el Esquema II.13., se muestra la síntesis de estos sistemas dendríticos. Se trata de aceites de color rojizo solubles en CH_2Cl_2 e insolubles en disolventes próticos.



Esquema II.13. Síntesis de los dendrímeros 29-31.

Las estructuras propuestas para esta nueva familia de compuestos se encuentran recogidas en la Figura II.37.

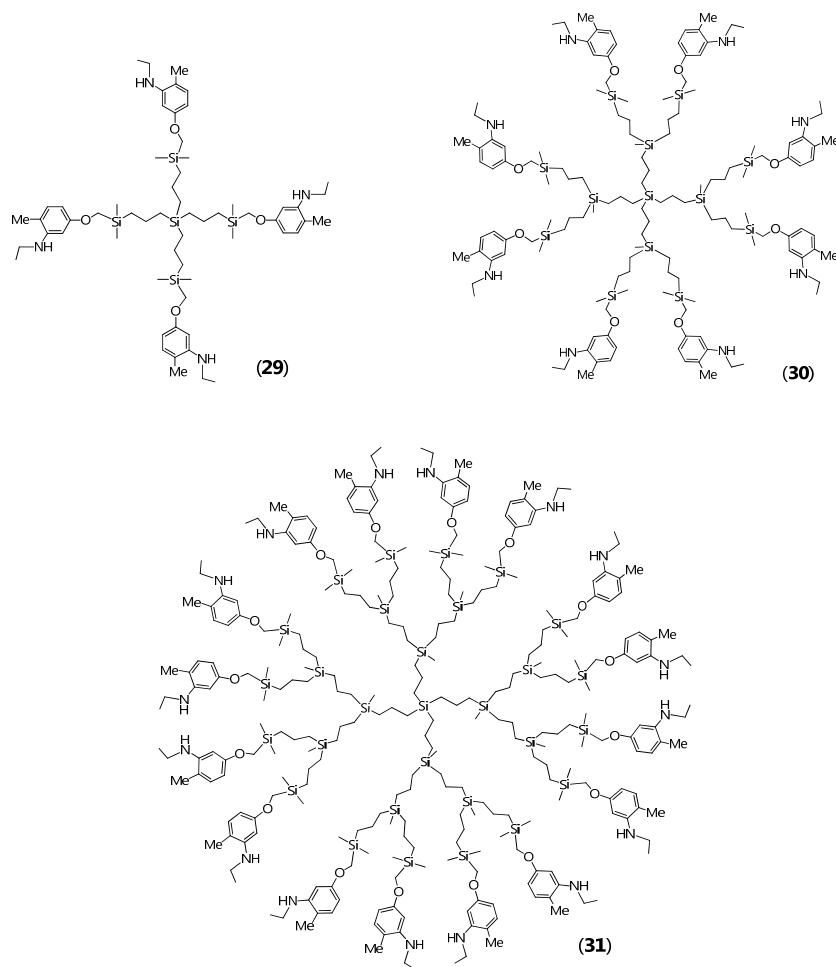
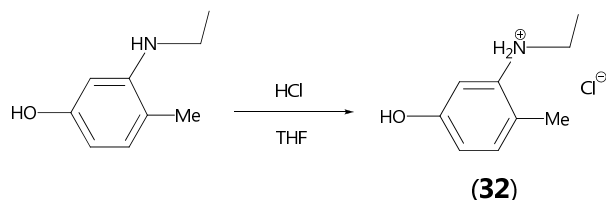


Figura II.37. Estructura de los dendrímeros $\text{G}_n\text{-}[\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})]_m$ 29-31.

II.2.4.1.2. Síntesis de dendrímeros catiónicos.

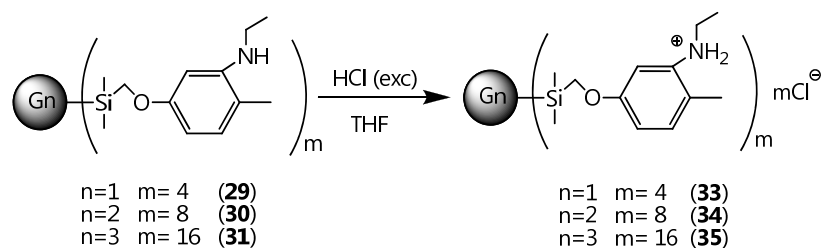
En este caso se ha utilizado como modelo el compuesto $(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})$, con el fin de obtener el denominado G_0 en los dendrímeros de las dos secciones anteriores de este capítulo (ver Esquema II.14.).



Esquema II.14. Síntesis del compuesto **32**.

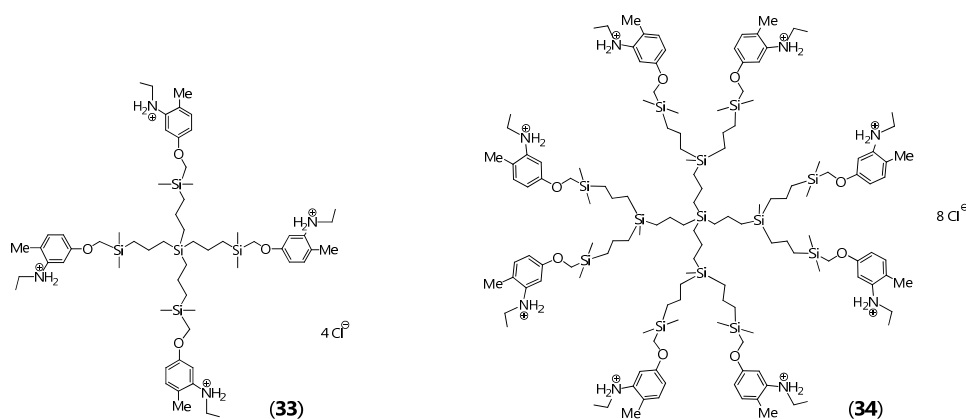
La adición de un equivalente de HCl 1M en dietil éter sobre el reactivo comercial $(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})$ previamente disuelto en THF, conduce a la formación del compuesto $\{[\text{HOC}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{Me})] \text{Cl}^-\}$ **32**, que tras ser lavado con éter dietílico frío se aísla como un sólido marrón con un rendimiento cuantitativo.

Para la obtención de los dendrímeros catiónicos **33-35**, se realiza el mismo procedimiento añadiéndose un exceso de HCl 1M en éter dietílico sobre una disolución de los compuestos **29-31** disueltos en THF. Esta mezcla se mantiene con agitación constante durante 48h, tiempo tras el cual se eliminan los componentes volátiles a vacío. De este modo se aíslan las macromoléculas $G_n\text{-}\{[\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{Me})]_m \text{mCl}^-\}$, $n=1$, $m=4$ (**33**), $n=2$, $m=8$ (**34**) y $n=3$, $m=16$ (**35**) como sólidos de color marrón con elevados rendimientos. Esquema II.15.

Esquema II.15. Síntesis de dendrímeros **33-34**.

Estos compuestos son insolubles en disolución acuosa y solubles en DMSO. En este caso ocurre lo mismo que con los dendrímeros anteriores, $\text{Gn}-\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)]_m \text{mI}^-\}$ **25-27**, su falta de solubilidad en disolventes próticos, como el agua, dificulta su aplicación en procesos biomédicos. No obstante, es posible disolverlos en una disolución de H_2O con menos de un 5% de DMSO con este fin, por lo que se podrán realizar los estudios pertinentes que serán explicados en el capítulo dedicado a las aplicaciones biomédicas de estas familias de dendrímeros.

Las estructuras propuestas para estos compuestos se muestran en la Figura II.38.



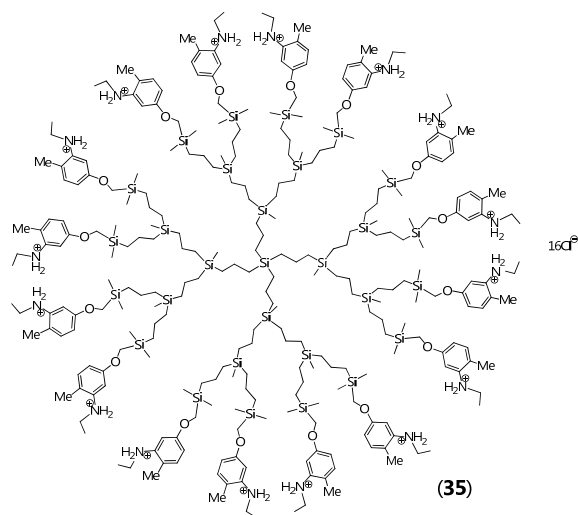


Figura II.38. Estructura de los dendrímeros $G_n\text{-}[\text{CH}_2\text{OC}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NH}_2^+\text{CH}_2\text{Me})]_m \text{mCl}$ **32-35**.

II.2.4.2. Estudio estructural.

II.2.4.2.1. Dendrímeros neutros.

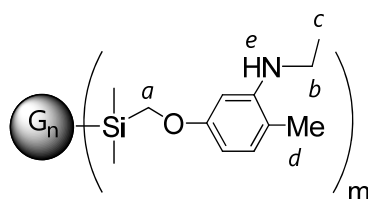
Los datos analíticos y espectroscópicos obtenidos para los compuestos **29-31** están de acuerdo con las estructuras propuestas en la Figura II.37.

a) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

En la Tabla II.22., se muestran los datos espectroscópicos de ^1H -RMN en CDCl_3 para los compuestos neutros. La asignación de las señales se ha realizado a partir de los datos espectroscópicos del compuesto comercial $(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})$ y de los dendrímeros carbosilano con enlaces $\text{-SiCH}_2\text{Cl}$ en la periferia descritos anteriormente.

Al producirse la sustitución nucleófila, debe desaparecer la señal localizada a δ 6.11, que se corresponde con el grupo hidroxilo del compuesto 3-(etilamino)-4-(metilfenol), mientras que en el caso de los dendrímeros, el singlete localizado a δ 2.83 asignado a los protones metilénicos unidos directamente a silicio y a cloro, se desplazarán a valores más altos de frecuencia

como consecuencia de la unión a oxígeno. El resto de señales son similares a las de los compuestos de partida.



Grupo	29	30	31
C ₆ H ₃	6.88	6.88	6.87
	6.22	6.21	6.23
SiCH ₂ O	3.51	3.52	3.51
NHCH ₂ CH ₃	3.32	3.31	3.32
NHCH ₂ CH ₃	3.15	3.15	3.13
C ₆ H ₃ CH ₃	2.03	2.03	2.03
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	1.35	1.28	1.26
NHCH ₂ CH ₃	1.27		
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.67	0.69	0.68
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.55	0.55	0.55
SiMe ₂	0.07	0.08	0.07
SiMe		-0.08	-0.10

Tabla II.23. Datos de ¹H-RMN en CDCl₃ para los compuestos **29-31**.

Como se puede observar en la Tabla II.23., no hay apenas variación en las señales que caracterizan a la familia de dendrímeros, si bien las señales del esqueleto carbosilano van siendo más anchas a medida que aumenta la generación, tal y como era de esperar. La señal correspondiente a los protones metilénicos unidos directamente a oxígeno (*a*), aparecen como un singlete a δ 3.51, es decir, se han desplazado aproximadamente 0.7 ppm a valores de frecuencia mayores, lo que confirma la formación del compuesto. En la Figura II.39., se muestran los espectros de ¹H-RMN de la especie (OH)C₆H₃(Me)(NHCH₂Me) y de los dendrímeros de primera generación G₁-(SiCH₂Cl)₄ y G₁-[CH₂OC₆H₃(Me)(NHCH₂Me)]₄ **29**.

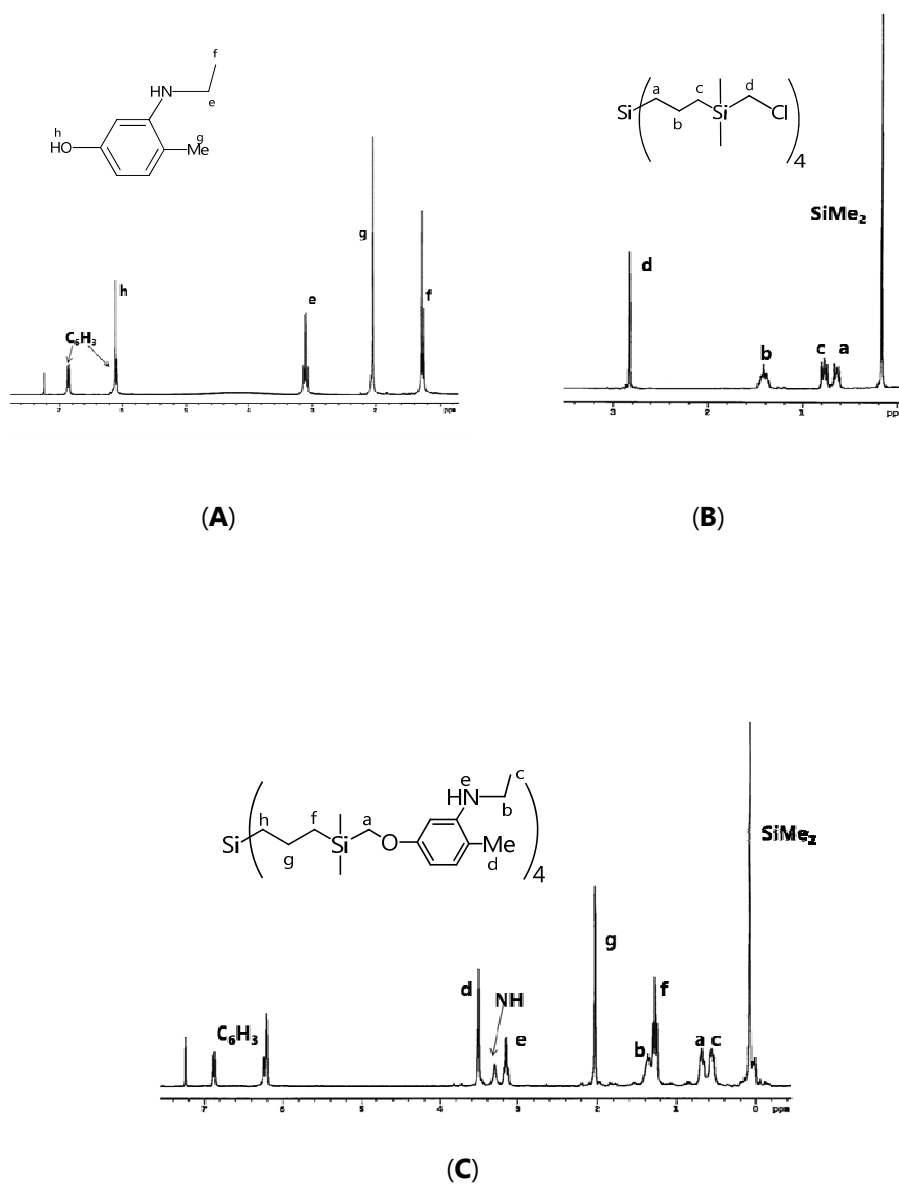
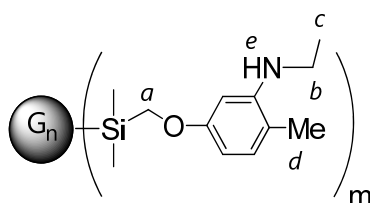


Figura II.39. Espectros de $^1\text{H-RMN}$ en CDCl_3 , del compuesto $(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})$ (A) y de los dendrímeros $\text{G}_1\text{-(SiCH}_2\text{Cl)}_4$ (B) y **29** (C).



Grupo	29	30	31
C ₆ H ₃	161.1 (C _{ipso} OCH ₂ Si)	161.5 (C _{ipso} OCH ₂ Si)	161.9 (C _{ipso} OCH ₂ Si)
	146.8 (C _{ipso} NHCH ₂ CH ₃)	147.2 (C _{ipso} NHCH ₂ CH ₃)	148.1 (C _{ipso} NHCH ₂ CH ₃)
	129.6 (C ₆ H ₃)	130.1 (C ₆ H ₃)	130.5 (C ₆ H ₃)
	113.3 (C _{ipso} CH ₃)	113.7 (C _{ipso} CH ₃)	113.6 (C _{ipso} CH ₃)
	100.5, 96.8 (C ₆ H ₃)	100.9, 97.2 (C ₆ H ₃)	101.4, 97.7 (C ₆ H ₃)
SiCH ₂ O	59.7	60.1	60.5
NHCH ₂ CH ₃	38.0	38.4	38.9
Si(CH ₂) ₃ Si	18.2, 18.0, 16.9	19.0-18.2	19.4-18.8
NHCH ₂ CH ₃	16.2	16.6	17.1
C ₆ H ₃ CH ₃	14.5	15.0	15.3
SiMe ₂	-5.0	-4.5	-4.1
SiMe		-4.9	-4.5

Tabla II.24. Datos de ¹³C-RMN en CDCl₃ para los dendrimeros **29-31**.

En el espectro de ¹³C-RMN ocurre lo mismo que en el de protón, las señales de los tres compuestos son prácticamente iguales. Entre δ 162 y δ 96 se localizan las señales propias del anillo bencílico. El carbono metilénico unido directamente a silicio y a oxígeno aparece en torno a δ 60, es decir, se desplaza aproximadamente 30 ppm con respecto a la misma señal en el derivado clorado. En la Figura II.40., se muestra a modo de ejemplo el espectro de ¹³C-RMN del derivado de primera generación G₁-[CH₂OC₆H₃(Me)(NHCH₂Me)]₄ **29**.

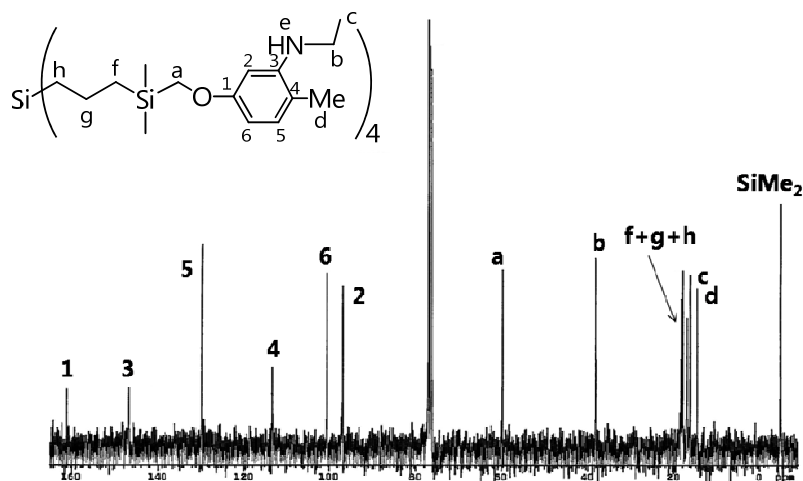


Figura II.40. Espectro de ^{13}C -RMN en CDCl_3 del compuesto **29**.

Para los tres compuestos, los átomos de carbono del fragmento etilo aparecen alrededor de δ 38.5 (e) y δ 16.5 ppm (c), mientras que el grupo metilo unido al anillo bencilo proporciona una señal en torno a δ 15 (d).

En el espectro bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ de estos dendrímeros, se observa la correlación entre el átomo de silicio y los protones del grupo dimetilsililo, no obstante, las señales correspondientes a los átomos de silicio más internos no se observan, tal y como viene ocurriendo en todos los compuestos descritos hasta ahora. De modo que en las especies de 1^a, 2^a y 3^a generación **29**, **30** y **31** respectivamente, se observa una señal en torno 0 ppm para el átomo de silicio externo y otra señal a δ 3.0 y 3.2 para el átomo de silicio inmediatamente anterior al externo en los dendrímeros de 2^a y 3^a generación, respectivamente. En la Figura II.41., se muestra el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ para el dendrímero de primera generación **29**.

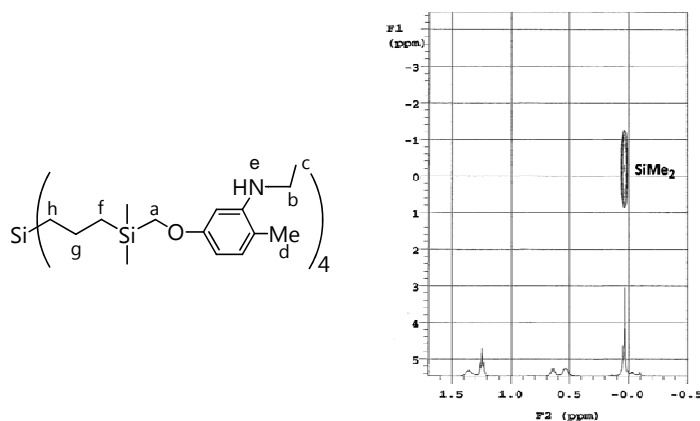


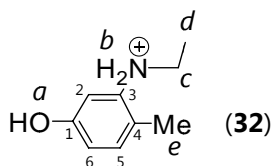
Figura II.41. Espectro $g\text{HMBC-}\{^1\text{H-}^{29}\text{Si}\}$ para el dendrímero de primera generación **29**.

II.2.4.2.2. Dendrímeros catiónicos.

Los datos espectroscópicos y analíticos de los compuestos cuaternizados con HCl 1M, confirman las estructuras propuestas en la Figura II.38.

a) *Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.*

Los datos espectroscópicos del compuesto **32** se encuentran en la Tabla II.25.

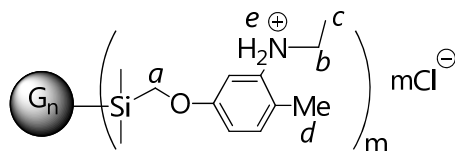


Grupo	$^1\text{H-RMN}$ ppm	Grupo	$^{13}\text{C-RMN}$ ppm
C_6H_3	7.08	C_6H_3	155.6 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{OCH}_2\text{Si}$ y C_6H_3)
	6.88		132.1 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ y C_6H_3)
	6.69		120.2 ($\text{C}_{\text{ipso}} \text{CH}_3$)
$\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	3.20		114.6 (C_6H_3)
$\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_3$	2.26	$\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	44.2
$\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	1.24	$\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_3$	15.6
		$\text{N}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	10.6

Tabla II.25. Datos de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ en DMSO-d_6 para el ligando cuaternizado **32**.

La cuaternización del grupo amino provoca un ensanchamiento de todas las señales del espectro de ^1H -RMN con respecto a las del ligando comercial. Las señales de los protones del anillo bencílico también se ven afectadas por la cuaternización, estas se desplazan a mayores valores de frecuencia, dando dos dobletes y un singlete ancho localizados entre δ 7.08 y δ 6.69, mientras que en el derivado neutro sólo aparecían dos señales, correspondientes a los protones de los C_5 y C_6 una de ellas y la otra al protón del C_2 , localizadas entre δ 6.89 y δ 6.09. El resto de señales (protones d y e), no se modifican prácticamente, sin embargo en el compuesto cuaternizado no es posible observar la señal del protón del grupo hidroxilo (a), mientras que en el ligando neutro éste aparecía a δ 6.11 solapado con una de las señales del anillo bencílico. En el espectro de ^{13}C -RMN registrado en DMSO-d_6 , se observan las señales del anillo bencílico en el intervalo δ 156-114. La señal correspondiente al carbono del grupo metileno del fragmento etilo aparece a δ 44.2. Los grupos metilo proporcionan dos señales a frecuencias más bajas, δ 15.6 para el metilo (e), unido directamente al anillo bencílico y δ 10.6 para el metilo (d), del fragmento etilo.

En cuanto a los dendrímeros catiónicos G_n - $\{[CH_2OC_6H_3(Me)(NH_2^+CH_2Me)]_m mCl\}$ **33-35**, los datos espectroscópicos se muestran en las Tablas II.26. y II.27.

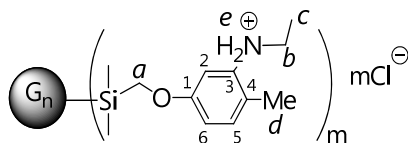


Grupo	33	34	35
C ₆ H ₃	7.12	7.03	7.04-6.89
	6.96	y	
	6.79	6.85	
SiCH ₂ O	3.55	3.52	3.52
N ⁺ H ₂			
N ⁺ H ₂ CH ₂ CH ₃	3.21	3.15	3.18
C ₆ H ₃ CH ₃	2.26	2.20	2.22
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	1.35	1.29	1.22
N ⁺ H ₂ CH ₂ CH ₃	1.24	1.21	
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.64	0.61-0.50	0.63-0.50
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.53		
SiMe ₂	0.03	-0.01	0.02
SiMe		-0.14	-0.14

Tabla II.26. Datos de ¹H-RMN en DMSO-d₆ para los compuestos G_n - $\{[CH_2OC_6H_3(Me)(NH_2^+CH_2Me)]_m mCl\}$ **33-35**.

La asignación tanto de los protones como de los átomos de carbono se ha realizado por ¹H-RMN, ¹³C-RMN, gHMBC- $\{^1H-^{13}C\}$ y gHMQC- $\{^1H-^{13}C\}$. La cuaternización del grupo amino provoca un ensanchamiento de todas las señales de los grupos más próximos a este grupo amonio, así se produce el solapamiento de la señal correspondiente a los protones del grupo metileno Ha, con la señal de los protones del grupo amonio, apareciendo esta señal a δ 3.55-3.52 para los tres dendrímeros. Al igual que ocurría en el compuesto **32**, el anillo

bencílico proporciona tres señales localizadas entre δ 7.12 y δ 6.79 ppm. El resto de señales apenas sufren variación como consecuencia de la cuaternización con HCl.



Grupo	33	34	35
C ₆ H ₃	159.3 (C _{ipso} OCH ₂ Si y C ₆ H ₃) 132.2 (C _{ipso} N ⁺ H ₂ CH ₂ CH ₃ y C ₆ H ₃) 121.3 (C _{ipso} CH ₃) 112.2 (C ₆ H ₃)	159.5 (C _{ipso} OCH ₂ Si y C ₆ H ₃) 132.4 (C _{ipso} N ⁺ H ₂ CH ₂ CH ₃ y C ₆ H ₃) 121.3 (C _{ipso} CH ₃) 112.2 (C ₆ H ₃)	159.5 (C _{ipso} OCH ₂ Si y C ₆ H ₃) 131.2 (C _{ipso} N ⁺ H ₂ CH ₂ CH ₃ y C ₆ H ₃) 121.3 (C _{ipso} CH ₃) 112.2 (C ₆ H ₃)
SiCH ₂ O	59.9	59.5	59.5
N ⁺ H ₂ CH ₂ C H ₃	43.7	39.8	39.8
C ₆ H ₃ CH ₃	24.6	29.5	29.5
Si(CH ₂) ₃ Si	17.5, 16.8, 16.2	17.4-15.8	17.3-15.8
N ⁺ H ₂ CH ₂ C H ₃	10.9	11.4	11.5
SiMe ₂	-5.1	-5.1	-5.1
SiMe			

Tabla II.27. Datos de ¹³C-RMN en DMSO-d₆ para los compuestos **33-35**.

Las señales correspondientes para estos compuestos en ¹³C-RMN, son muy similares en las tres generaciones y, tal y como era de esperar, los átomos de carbono del grupo funcional proporcionan señales prácticamente idénticas a las identificadas en el compuesto {[HO-C₆H₃(Me)(N⁺H₂CH₂Me)] Cl⁻} **32**. En cuanto a las señales del esqueleto carbosilano, son las esperadas tanto en ¹H como en ¹³C-RMN y, como viene siendo habitual en estos compuestos, se produce un ensanchamiento de las mismas a medida que aumenta la generación del dendrímero.

Al igual que ocurre con todas las familias de dendrímeros descritas hasta ahora en este trabajo, en el espectro gHMBC-¹H-²⁹Si no se observan las

señales correspondientes a los átomos de silicio internos, localizándose los más externos en torno a δ 1.2 y el inmediatamente anterior a δ 0.0.

b) *Espectrometría de masas.*

En el caso del dendrímero G_1 -{[CH₂OC₆H₃(Me)(NH₂⁺CH₂Me)]₄ 4Cl⁻} **33**, el espectro de masas llevado a cabo por la técnica de MALDI-TOF muestra la especie [M-4Cl]⁺, mientras que no ha sido posible registrar los espectros para los dendrímeros **34** y **35** por esta técnica.

II.3. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] C. Worner, R. Mulhaupt, *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.*, **1993**, 32, 1306-1308.
- [2] J. H. Lee, Y. B. Lim, J. S. Choi, Y. Lee, T. I. Kim, H. J. Kim, J. K. Yoon, K. Kim, J. S. Park, *Bioconj. Chem.*, **2003**, 14, 1214-1221.
- [3] E. M. M. de Brabander van den Berg, E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Edit. Engl.*, **1993**, 32, 1308-1311.
- [4] E. M. M. de Brabander van den Berg, A. Nijenhuis, M. Mure, J. Keulen, R. Reintjens, F. Vandenbooren, B. Bosman, R. Deraat, T. Frijns, S. Vanderwal, M. Castelijns, J. Put, E. W. Meijer, *International Symposium on New Macromolecular Architectures and Supramolecular Polymers* (Denver, Co) **1993**, pp. 51-62.
- [5] Z. Sideratou, D. Tsiourvas, C. M. Paleos, *Langmuir*, **2000**, 16, 1766-1769.
- [6] S. W. Krska, D. Seyferth, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 3604-3612.
- [7] P. Ortega, J. F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesús, F. J. de la Mata, G. Fernández, J. C. Flores, R. Gómez, M. J. Serramía, M. A. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 1388-1396.
- [8] P. Ortega, *Tesis Doctoral, Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá*, **2005**.
- [9] A. W. Van der Made, P. Van Leeuwen, J. C. de Wilde, R. A. C. Brandes, *Adv. Mater.*, **1993**, 5, 466-468.
- [10] L. L. Zhou, J. Roovers, *Macromolecules*, **1993**, 26, 963-968.
- [11] B. Alonso, I. Cuadrado, M. Moran, J. Losada, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, **1994**, 2575-2576.
- [12] D. Seyferth, D. Y. Son, A. L. Rheingold, R. L. Ostrander, *Organometallics*, **1994**, 13, 2682-2690.
- [13] M. A. Kostianen, G. Z. R. Szilvay, D. K. Smith, M. B. Linder, O. Ikkala, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2006**, 45, 3538-3542.
- [14] S. P. Jones, N. P. Gabrielson, D. W. Pack, D. K. Smith, *Chem. Commun.*, **2008**, 4700-4702.
- [15] G. R. Newkome, X. F. Lin, *Macromolecules*, **1991**, 24, 1443-1444.
- [16] G. R. Newkome, X. F. Lin, C. D. Weis, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, 2, 957-960.

- [17] J. K. Young, G. R. Baker, G. R. Newkome, K. F. Morris, C. S. Johnson, *Macromolecules*, **1994**, 27, 3464-3471.
- [18] I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada, C. M. Casado, C. Pascual, B. Alonso, F. Lobete, Eds; G. R. Newkome, *JAI press INC: Greenwich CT*, **1996**, 3.
- [19] J. Roovers, P. M. Toporowski, L. L. Zhou, *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 203, 200.
- [20] J. L. Speier, J. A. Webster, G. H. Barnes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 974-979.
- [21] B. D. Karsted, *US Patent 3*, **1973**, 775, 452.
- [22] C. Z. S. Chen, N. C. Beck-Tan, P. Dhurjati, T. K. van Dyk, R. A. LaRossa, S. L. Cooper, *Biomacromolecules*, **2000**, 1, 473-480.
- [23] G. C. Levy, R. L. Lichter., *Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy*, John Wiley & sons, **1979**.
- [24] K. Lorenz, R. Mulhaupt, H. Frey, U. Rapp, F. J. Mayerposner, *Macromolecules*, **1995**, 28, 6657-6661.
- [25] S. Arevalo, E. de Jesús, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez, *Organometallics*, **2001**, 20, 2583-2592.
- [26] J. M. Benito, E. de Jesús, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez, P. Gómez-Sal, *J. Organomet. Chem.*, **2002**, 664, 258-267.
- [27] S. Arevalo, E. de Jesús, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez, P. Gómez-Sal, P. Ortega, S. Vigo, *Organometallics*, **2003**, 22, 5109-5113.
- [28] C. Kim, I. Jung, *J. Organomet. Chem.*, **1999**, 588, 9-19.
- [29] M. Veith, R. Elsasser, R. P. Kruger, *Organometallics*, **1999**, 18, 656-661.
- [30] I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada, C. M. Casado, C. Pascual, B. Alonso, F. Lobete, *Advances in Dendritic Macromolecules; Newkome, G. R. Ed.; Jai Press Inc: Greenwich*, **1999**, 3, 151-191.
- [31] C. Kim, I. Y. Jung, *J. Organomet. Chem.*, **2000**, 599, 208-215.
- [32] C. Zuccaccia, N. G. Stahl, A. Macchioni, M. C. Chen, J. A. Roberts, T. J. Marks, **2004**, 126, 1448-1464.
- [33] T. Hayashida, H. Kondo, J. Terasawa, K. Kirchner, Y. Sunada, H. Nagashima, *J. Org. Chem.*, **2007**, 692, 382-394.
- [34] W. Banks, C. T. Greenwood, *Carbohydrate Res.*, **1968**, 7, 414-420.

[35] M. Rubinstein, R. H. Colby, *Polymer Physics*, Oxford University Press, **2003**.

[36] K. T. Welch, S. Arevalo, J. F. C. Turner, R. Gomez, *Chem. Eur. Journal*, **2005**, *11*, 1217-1227.

[37] E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon., *Tablas para la Elucidación Estructural por Métodos Espectroscópicos. 3ª edición.*, **1998**.

[38] D. de Groot, J. N. H. Reek, P. C. J. Kamer, P. van Leeuwen, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 1085-1095.



CAPÍTULO III

“APLICACIONES BIOMÉDICAS DE DENDRÍMEROS CATIONICOS”

III.1. DENDÍMEROS CARBOSILANO CATIONICOS EN BIOMEDICINA.

Las familias de dendrímeros que acaban de ser descritas han sido probadas en diferentes procesos biológicos:

- a) Como vehículos para el transporte de fármacos.
- b) Como vectores no virales en procesos de transfección de ácidos nucleicos.
- c) Como agentes terapéuticos (antibacterianos, antivirales y/o antiprionicos).

A continuación se describirán los resultados más relevantes de tales ensayos.

III.1.2. Dendrímeros como vehículos de transporte de fármacos.

Existen en la bibliografía estudios con dendrímeros PAMAM, que evalúan la capacidad de éstos para unir moléculas del fármaco antiinflamatorio Ibuprofeno,^[1] tal y como ya se comentó en la introducción de esta memoria. Además, se han utilizado dendrímeros que contienen grupos amino y amonio terminales como transportadores de agentes anti-acné^[2] y como transportadores de moléculas absorbentes de luz UV.^[3] Sin embargo, hasta ahora no se encuentran descritos en bibliografía dendrímeros de naturaleza carbosilano con esta capacidad.

La naturaleza catiónica de los sistemas descritos en el capítulo anterior, hace posible su uso como agentes de transporte de fármacos aniónicos. Para este estudio se eligieron dos familias de dendrímeros carbosilano catiónicos con estructura y propiedades diferentes:

- Dendrímeros carbosilano funcionalizados con la amina $[(\text{CH}_2=\text{CHCH}_2)\text{N}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]$ (N,N-dimetil-N'etil,N'etil-etilenodiamina). De entre estos, se ha elegido el dendrímero cuaternizado con MeI de segunda generación $\text{G}_2\text{-}\{[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}^+(\text{Me})(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)]_{16}\text{ } 16\text{I}^-\}$ **16**, para el estudio de su interacción electrostática con el fármaco aniónico Diclofenac sódico. Este estudio se ha llevado a cabo mediante espectroscopía UV ya que el dendrímero **16** no debe mostrar absorción en esta zona del espectro, mientras que el fármaco antiinflamatorio, debido a su estructura (ver Figura III.1.), sí dará lugar a una banda de absorción.

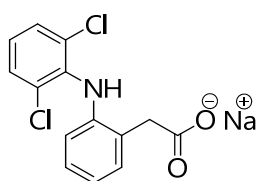


Figura III.1. Estructura química del Diclofenac sódico.

- Dendrímeros carbosilano funcionalizados con la amina $[(\text{CH}_2=\text{CHCH}_2)\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2)]$ (2-(4-alil-2-metoxi-fenoxi)-N,N-dimetiletanoamina). Se ha elegido el dendrímero de segunda generación cuaternizado con MeI, $\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)]_8\text{ } 8\text{I}^-\}$ **26** con objeto de estudiar la interacción electrostática con el fármaco aniónico Penicilina G potásica mediante espectrofluorimetría. La elección de este dendrímero se ha hecho basándonos en las propiedades fluorescentes que éste puede presentar debido a la presencia de un anillo aromático en su estructura. La Penicilina G (ver Figura III.2.), también presenta fluorescencia, por lo que la interacción entre ambas moléculas será determinada a través de la variación de la intensidad de fluorescencia.

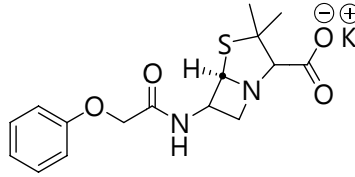


Figura III.2. Estructura de la Penicilina G potásica.

III.1.2.1. Estudio de la interacción del dendrímero 16 con Diclofenac.

Mediante este estudio ha sido posible determinar la longitud de onda de absorción ($\lambda_{abs.}$) del fármaco y del complejo formado por el dendrímero y el fármaco, ya que el dendrímero por sí sólo no absorbe luz UV. En la Figura III.3., se observa que la banda de absorción del fármaco libre aparece a 274.10 nm, sin embargo, cuando se mide la $\lambda_{abs.}$ del complejo formado por el dendrímero **16** y el fármaco aniónico, esta longitud de onda se desplaza desde 285.60 hasta 286.28 nm, al formarse el complejo en proporción dendrímero/fármaco de 1:1, 1:2, 1:4, 1: 6 y 1:8. De este resultado se puede deducir que se produce una interacción de tipo electrostático entre el dendrímero y el fármaco.

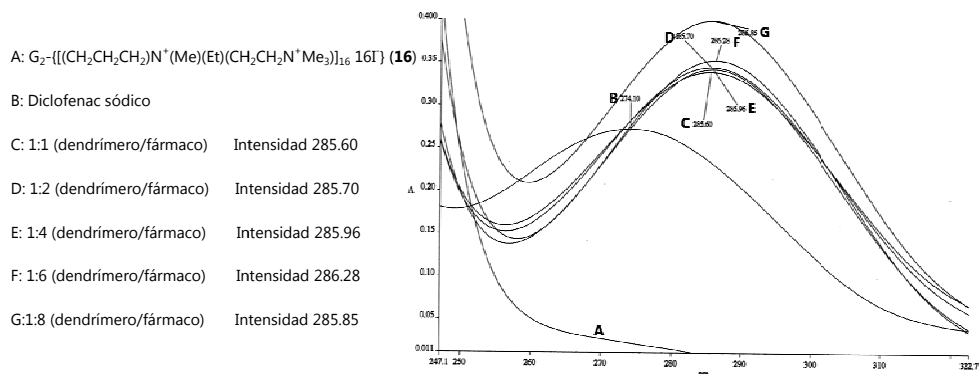


Figura III.3. Gráfica de espectroscopía UV para Diclofenac sódico y para el complejo **16**/Diclofenac en proporciones 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 y 1:8.

De la observación de la gráfica se puede decir que aparentemente el dendrímero es capaz de interactuar como mucho con 6 moléculas de Diclofenac, ya que la adición de 8 moléculas de fármaco produce un desplazamiento de la banda de absorción menor que el que se da al añadir 6 moléculas. Este desplazamiento podría ser explicado por la formación de una envoltura que cubriese los dos picos de absorción debidos al fármaco libre y al complejo dendrímero/fármaco. En todo caso, con este estudio se puede determinar de forma preliminar, que estos dendrímeros catiónicos puedan ser considerados como posibles agentes de transporte de fármacos en diversos procesos biomédicos.

III.1.2.2. Estudio de la interacción del dendrímero 26 con Penicilina.

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado técnicas espectrofluorimétricas ya que el dendrímero G₂-[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂N⁺Me₃)₈ 8I] **26**, posee propiedades fluorescentes.

Esta macromolécula catiónica es parcialmente soluble en disolución acuosa, sin embargo, como ya se ha comentado, se disuelve totalmente tras la adición de pequeñas cantidades de DMSO (<5%). Así, se han llevado a cabo medidas de fluorescencia con el derivado de segunda generación **26**, en una disolución de H₂O con un 5% de DMSO. Los resultados de estas medidas permiten elaborar de forma sencilla, una recta de calibrado, con la que es posible valorar la concentración de distintas disoluciones del dendrímero.

Para evaluar la capacidad del dendrímero **26** como transportador de fármacos, se ha utilizado Penicilina G potásica, el cual es un fármaco de naturaleza aniónica. La adición de una pequeña cantidad de antibiótico a la disolución del dendrímero, produce una disminución en la intensidad de la fluorescencia de éste. Este comportamiento se puede deber a que se produce la

interacción electrostática entre dicho fármaco y la macromolécula, si bien la cantidad de fármaco que el dendrímero es capaz de soportar está aún por determinar y será objeto de un estudio posterior. En la Figura III.4., se muestra una gráfica que ilustra la variación de la emisión de fluorescencia al añadir fármaco al compuesto **26**.

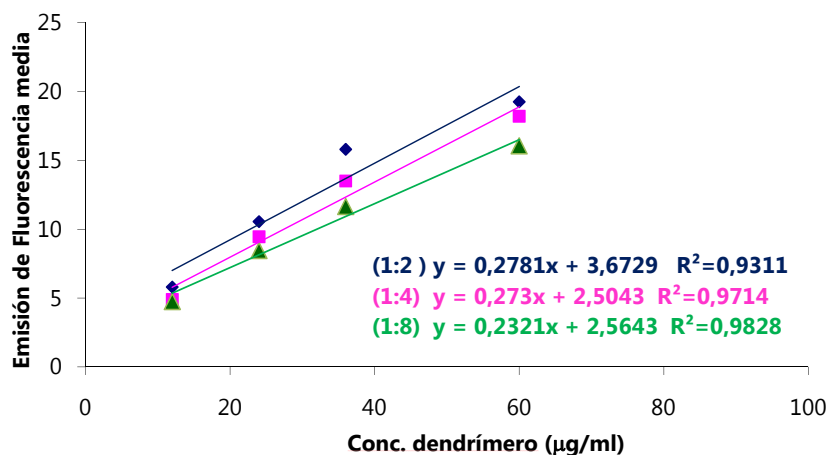


Figura III.4. Variación de la señal de fluorescencia del dendrímero **26** al añadir Penicilina G.

Este experimento se puede tener en cuenta con el fin de utilizar en un futuro estos sistemas G_n - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)_m \text{mI}^-]$ como agentes de transporte de fármacos, ya que sus propiedades fluorescentes pueden ayudar en la caracterización del complejo dendrímero/fármaco.

III.1.3. Dendrímeros catiónicos en terapia génica.

Hasta ahora los dendrímeros que más ampliamente han sido estudiados con este fin son los de naturaleza PAMAM, que contienen una periferia formada por grupos amino fácilmente protonables a pH fisiológico.

Los dendrímeros PAMAM han demostrado ser no citotóxicos en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Se ha encontrado una dependencia de la toxicidad con la

generación, de modo que ésta aumenta al aumentar el tamaño de la macromolécula.^[4,5] Por otro lado, se ha demostrado que la naturaleza y la densidad de grupos catiónicos también es un factor determinante en la toxicidad, de modo que en el caso de los grupos amino la toxicidad es mayor para una amina primaria que para una secundaria y que para una amina terciaria.^[6]

Estas macromoléculas catiónicas son capaces de transfectar moléculas de ADN y oligonucleótidos antisentido en proporción de cargas estequiométrica 1:1, sin embargo la eficiencia de la transfección mejora a mayores ratios dendrímero-ADN, ya que si el complejo posee una carga neta positiva, la interacción de éste con las cargas negativas de las membranas celulares favorece la transfección del material nucleico al interior celular. La eficacia de la transfección para los dendrímeros PAMAM aumenta con la generación, siendo una sexta generación la que mejores resultados ha proporcionado en este sentido.

Otra clase de sistemas dendríticos disponible comercialmente y que se utilizan en terapia génica son los dendrímeros PPI. Al igual que los dendrímeros PAMAM, la toxicidad en estas macromoléculas aumenta al aumentar la generación. La cuaternización de los dendrímeros PPI se ha utilizado con el fin de reducir su toxicidad, así se ha aumentado la biocompatibilidad de las generaciones mayores (G_3 y G_4) sin afectar a la menor toxicidad de G_1 y G_2 . No obstante, la generación que mejores resultados ha proporcionado en transfección es la segunda, por lo que este tipo de dendrímeros serán más útiles para el transporte de biomoléculas más pequeñas que el ADN.

El hecho de que tanto los dendrímeros PAMAM como PPI estén disponibles comercialmente y su relativa eficiencia en procesos de transfección, hace que hayan dominado hasta ahora el campo de estudio de estos sistemas

en terapia génica. Sin embargo, existen otros dendrímeros que se han desarrollado con este fin, como son los dendrímeros de fósforo descritos por Majoral.^[7] Al igual que los sistemas comentados anteriormente, los dendrímeros de fósforo con grupos amonio en la superficie poseen una elevada solubilidad en agua a pesar de poseer un esqueleto hidrofóbico. Estas macromoléculas, comparadas con el liposoma catiónico lipofectina (molécula de referencia en medidas de toxicidad), han resultado ser no citotóxicas. Además, dendrímeros de generaciones 2 a 5 con aminas terciarias protonadas o metiladas en la superficie, han resultado poseer una eficacia de la transfección de ADN similar a la de polímero catiónico PEI lineal de 22KDa, que se utiliza en transfección como referencia (ExgenTM), cuando se utilizan en ratios de carga 5:1. Los resultados demuestran que las generaciones más eficaces son la cuarta y la quinta, que tienen un tamaño de 60-70 Å, similar al de dendrímero G₆-PAMAM (68 Å), que es el que mejores resultados ha aportado hasta ahora.^[7] No obstante, los dendrímeros G₃-G₅ son los que proporcionan valores más constantes en la transfección. Además la eficacia de la transfección de estos compuestos depende de la naturaleza de las aminas terminales, siendo más activas las formas protonadas que las metiladas.

Otros sistemas que se han ensayado en procesos de terapia génica son los basados en los dendrones de Fréchet y Hawker^[8] (ver Figura III.5.). Pequeños dendrímeros anfifílicos^[9,10] también han resultado ser eficaces en procesos de transfección, incluso en presencia de suero.

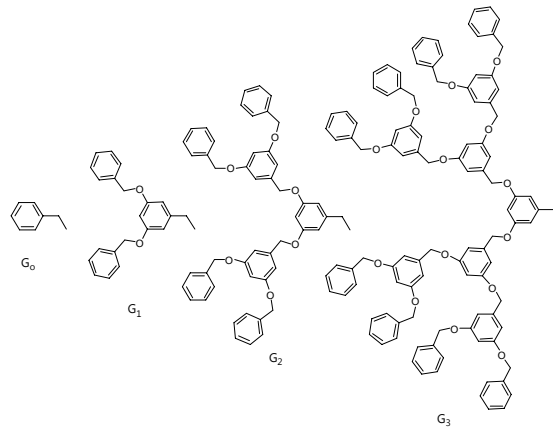


Figura III.5. Dendrones de Fréchet.

Hasta ahora se ha presentado un breve resumen de los dendrímeros catiónicos más utilizados en terapia génica como vehículos no virales. Otra clase de macromoléculas dendríticas que también se están mostrando útiles dentro del campo de la nanomedicina, como agentes de transfección, son los dendrímeros de tipo carbosilano, los cuales poseen un esqueleto lipofílico, que al ser convenientemente funcionalizados en la periferia con grupos polares o cargados, adquieren solubilidad en agua.

Un caso particular de este tipo de macromoléculas son las sintetizadas por nuestro grupo de investigación,^[11] los cuales, como ya hemos dicho, poseen un esqueleto hidrofóbico en el que existen enlaces Si-O y una superficie compuesta por grupos amonio, lo que les confiere solubilidad en agua.

La toxicidad de estos dendrímeros, al igual que ocurre con dendrímeros PAMAM y PPI, aumenta al aumentar la generación. Los dendrímeros de segunda generación con 8 y 16 cargas positivas en la periferia (Figura III.6.), son los que mejores perfiles de toxicidad poseen, siendo 1-5 μM el rango de concentración óptimo para su uso como vehículos de transporte no virales de oligonucleótidos y de pequeños fragmentos de ARN de interferencia, en diferentes líneas celulares.^[12-15]

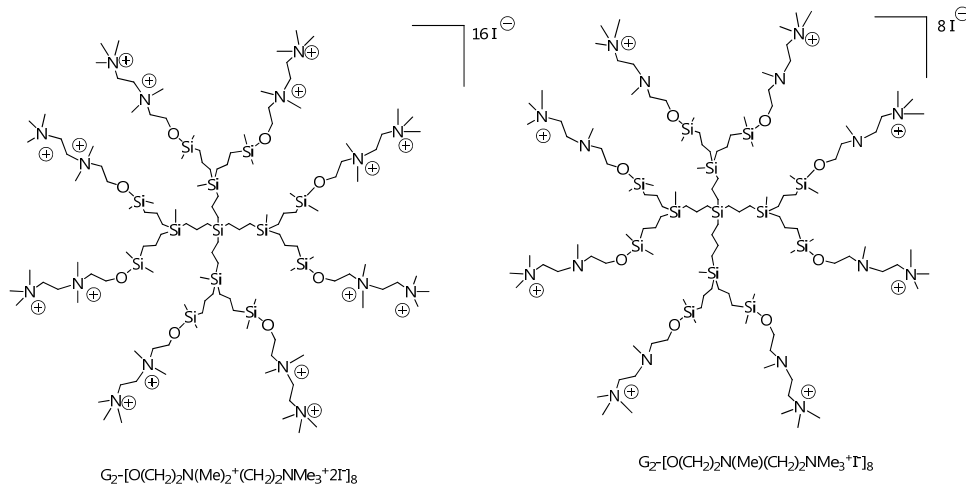


Figura III.6. Estructura de los dendrímeros carbosilano de segunda generación con 16 y 8 cargas positivas en la periferia.

Este tipo de sistemas son capaces de proteger al material nucleico de la degradación por parte de nucleasas y de las proteínas del suero, tales como la albúmina sérica bovina o humana. Esto se puede traducir en una disminución de la dosis de oligonucleótido o de fármaco aniónico necesaria para ejercer el efecto biológico deseado.^[16] Sin embargo, como ya se ha comentado, estas macromoléculas sufren un proceso de hidrólisis paulatina del enlace Si-O en disolventes próticos. Si bien esto podría ser una ventaja desde el punto de vista de la liberación controlada de biomoléculas o fármacos, puede suponer un obstáculo para otro tipo de aplicaciones en nanomedicina.

Es por este motivo por el que se planteó, como uno de los objetivos de este trabajo, la idea de la síntesis de dendrímeros carbosilano catiónicos, en los que, manteniendo la estructura de los ya comentados, se sustituyera el enlace Si-O por otro Si-C, más estable en medios próticos.

Se han probado como agentes de transfección los compuestos G_n- $[(CH_2CH_2CH_2)N^+R(Et)(CH_2CH_2N^+Me_3)_m mX^-]$, donde $n= 1, 2$ y 3 , $m= 8, 16$ y 32 y $X^- = CF_3SO_3^-$ (**7-9**), Cl^- (**11-13**), y I^- (**15-17**). Para ello se han realizado ensayos de i) formación de complejos dendrímero-ácido nucleico, ii) ensayos de toxicidad de los dendrímeros y, por último iii) ensayos de transfección de ese material nucleico en diferentes líneas celulares.

III.1.3.1. Formación de dendriplexes.

Dado que se han sintetizado dendrímeros estables en disolución acuosa, es interesante comprobar si éstos son capaces de unir material nucleico de una forma estable a lo largo del tiempo. También conviene comprobar la estabilidad de dicha unión en los diferentes valores de pH, como base para las distintas localizaciones anatómicas, celulares o tisulares, en las que el medio puede acidificarse o alcalinizarse.

La capacidad de retención de ácidos nucleicos (oligonucleótidos (ODN's) o ARN de interferencia (ARNi)), debido a la formación de complejos estables con los distintos dendrímeros (**11-13** y **15-17**), ha sido estudiada a través de electroforesis en geles de agarosa al 2%. Para este estudio se ha tenido en cuenta la influencia del contraión, por lo que se han elegido las dos familias de dendrímeros que más se diferencian estructuralmente debido a la presencia de un protón (**11-13**) o de un grupo metilo (**15-17**).

La formación de los complejos dendrímero-oligonucleótido se ha llevado a cabo en H_2O y en suero (PBS). Para este estudio se ha utilizado el oligonucleótido fluoresceinado TAR, que es una secuencia antisentido complementaria de un ARNm del virus VIH. Este oligonucleótido posee 16 bases y su secuencia es: 5'-fluoresceína-GCT CCC GGG CTC GAC C-3'. Los diferentes ensayos han revelado que la retención total del ODN se produce cuando la

formación del complejo con el dendrímero está en un ratio de carga (+/-) de 2:1. En la Figura III.7.(A), se puede observar que tanto el dendrímero $G_2\text{-}\{[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}^+\text{H}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{HMe}_2)]_{16}\text{ }^{16}\text{Cl}^-\}$ **12** como $G_2\text{-}\{[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}^+(\text{Me})(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)]_{16}\text{ }^{16}\text{I}^-\}$ **16**, son capaces de retener el oligonucleótido, lo que evidencia la existencia de una unión electrostática entre el dendrímero y el material nucleico. Además el complejo es perfectamente estable frente al tiempo (ver Figura III.7.(B)).

Liberación de oligonucleótido (tiempo)

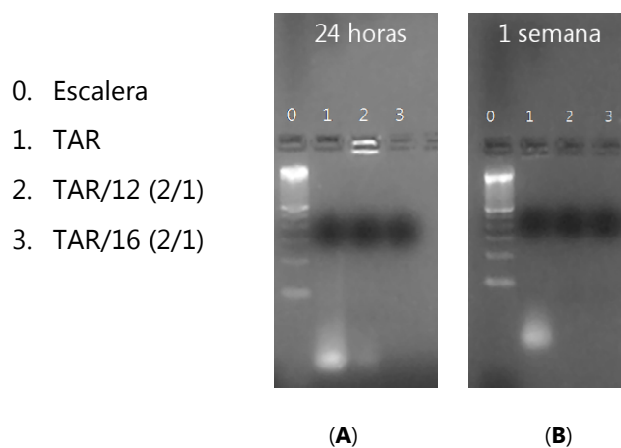


Figura III.7. Formación de dendriplexes en función del tiempo.

El estudio de la estabilidad del complejo formado frente al pH (ver Figura III.8.), revela que el sistema es estable en todo el rango de pH estudiado (pH=2-8), para ambos dendrímeros, ya que como consecuencia de la unión electrostática entre el dendrímero y el ODN, no se produce migración hacia el polo positivo del gel en ningún caso.

Liberación de oligonucleótido (pH)

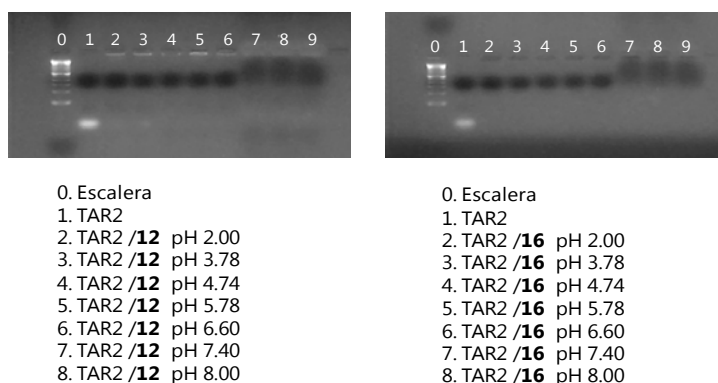


Figura III.8. Estabilidad de los dendriplexes en función del pH.

De esta forma se puede concluir que tanto en un ambiente ácido como el del estómago o en los endosomas-lisosomas, como en uno básico como el del intestino delgado, los complejos formados entre el dendrímero y el oligonucleótido permanecerían estables.

III.1.3.2. **Medidas de Toxicidad.**

La toxicidad de los dendrímeros G_n - $[(CH_2CH_2CH_2)N^+R(Et)(CH_2CH_2N^+Me_3)_m mX^-]$, donde $n= 1, 2$ y 3 , $m= 8, 16$ y 32 y $X^- = CF_3SO_3^-$ (**7-9**), Cl^- (**11-13**), y I^- (**15-17**), ha sido evaluada en la línea celular linfocítica PBL. El efecto tóxico de los dendrímeros por sí solos se ha medido a través de la evaluación de la actividad metabólica (ensayo MTT). Los resultados de toxicidad de las tres familias de dendrímeros se muestran en la Figura III.9.

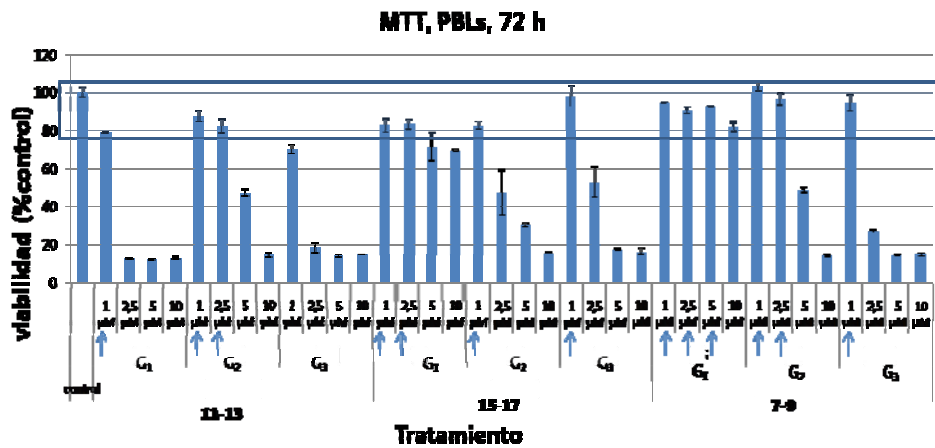


Figura III.9. Ensayo MTT para los dendrímeros 7-9, 11-13 y 15-17.

Así, se ha determinado que la toxicidad de los dendrímeros depende de la generación, de modo que al aumentar ésta, también lo hace la toxicidad. Además estos compuestos no son tóxicos en un rango de concentración de 1-5μM, siendo 5μM límite superior para el dendrímero de primera generación y 1μM para el de tercera generación.

También es posible determinar a partir de este ensayo, que los dendrímeros **11-13**, que presentan grupos amino con enlaces N-H, originan una mayor toxicidad. Para los compuestos **7-9** y **15-17**, aunque la influencia del contraión CF_3SO_3^- y I^- en la toxicidad no es muy importante, sí se evidencia que los dendrímeros $\text{G}_n\text{-}[(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)\text{N}^+\text{Me}(\text{Et})(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{Me}_3)_m \text{mCF}_3\text{SO}_3^-]$, presentan menor toxicidad que sus análogos con I^- como contraión.

Debido a la menor toxicidad presentada por esta familia de dendrímeros, se decidió elegirla para llevar a cabo el resto de ensayos de transfección.

III.1.3.3. Ensayos de transfección.

La capacidad de los dendrímeros para introducir material nucleico en el interior celular ha sido evaluada mediante citometría de flujo. Con este ensayo se determina el porcentaje de células viables que presentan fluorescencia, es decir, representa la transfección eficiente del oligonucleótido fluoresceinado al interior celular. En la Figura III.10., se representa el porcentaje de internalización del oligonucleótido TAR por las tres generaciones de dendrímeros catiónicos **7-9**. El oligonucleótido ensayado es capaz de internalizarse por sí mismo en una pequeña proporción, sin embargo la transfección es mayor cuando se utilizan los dendrímeros como agentes de transporte y ésta aumenta al aumentar la generación.

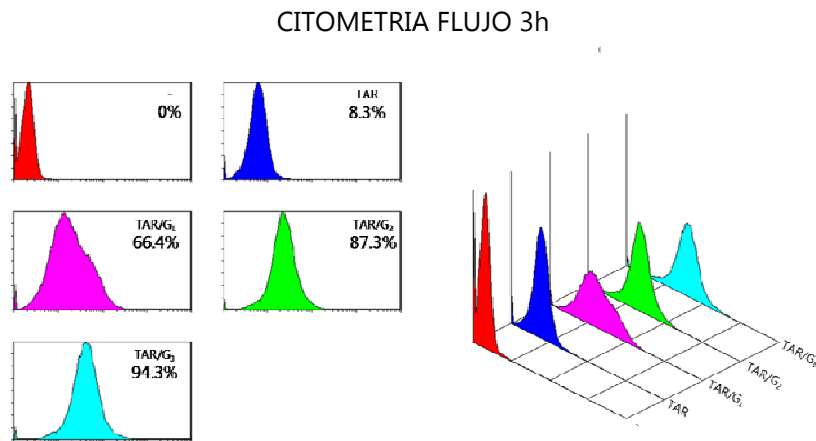


Figura III.10. Citometría de flujo a 3 horas para los complejos dendrímero-oligonucleótido.

En la Figura III.11., se muestran los resultados del análisis estadístico de seis experimentos independientes con los que ha sido posible determinar que el porcentaje de células transfectadas de forma eficiente es del 72%, 88% y 97% para los dendriplexes formados por el oligonucleótido TAR y los dendrímeros de primera, segunda y tercera generación, respectivamente.

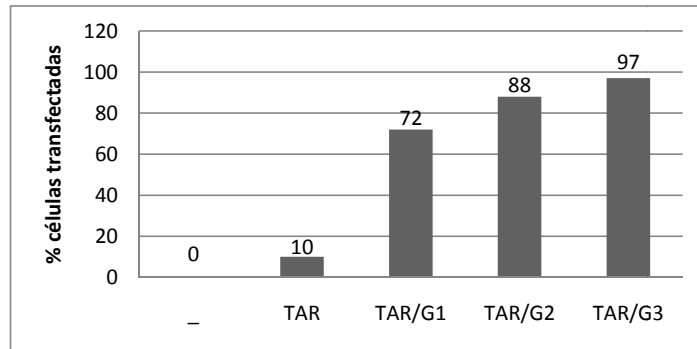


Figura III.11. Porcentaje de transfección para TAR y complejos dendrímero-oligonucleótido a partir del análisis de 6 experimentos independientes.

Por último, se ha confirmado la eficiencia del proceso de transfección utilizando microscopía confocal. En la Figura III.12., se pueden observar las imágenes del proceso de transfección obtenidas para el oligonucleótido sólo (A) y para los complejos formados con las tres generaciones de dendrímero (B, C y D).

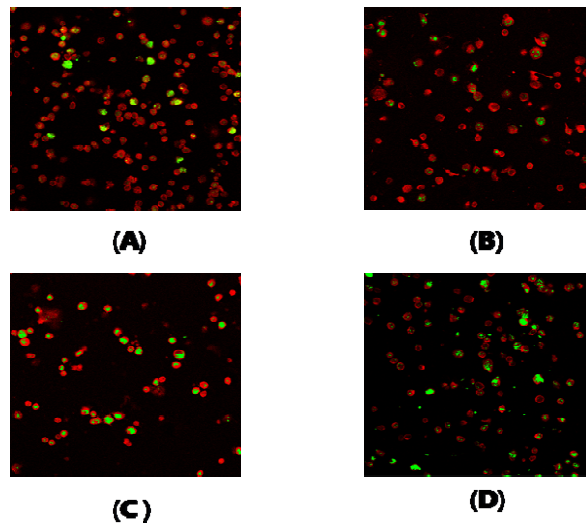


Figura III.12. Imágenes de microscopía confocal para los ensayos de transfección (A) del oligonucleótido TAR sólo y de los complejos (B) TAR/7, (C) TAR/8 y (D) TAR/9.

Las imágenes de microscopía confocal confirman los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, es decir, la transfección es más efectiva a medida que aumenta la generación del dendrímero. Sin embargo, ensayos funcionales *in vitro* de inhibición del VIH mediante medidas del antígeno p24 utilizando un ensayo ELISA, no muestran ningún efecto sobre la disminución de dicha carga viral.

Además, los dendrímeros **7-9** han sido evaluados como agentes de transfección de ARN de interferencia en células HepG2, línea celular aislada de un carcinoma hepatocelular.^[17] La citotoxicidad de estos sistemas se evaluó mediante un ensayo conjunto LDH/MTT. Del resultado obtenido se concluye que el uso de dendrímeros no aumenta la muerte celular por necrosis (ruptura de la membrana celular) para concentraciones relativas de 2x respecto a la cantidad de oligonucleótido, comparado con los transfectantes comerciales Oligofectamina (OF) y Lipofectamina (LF) (Figura III.14.).

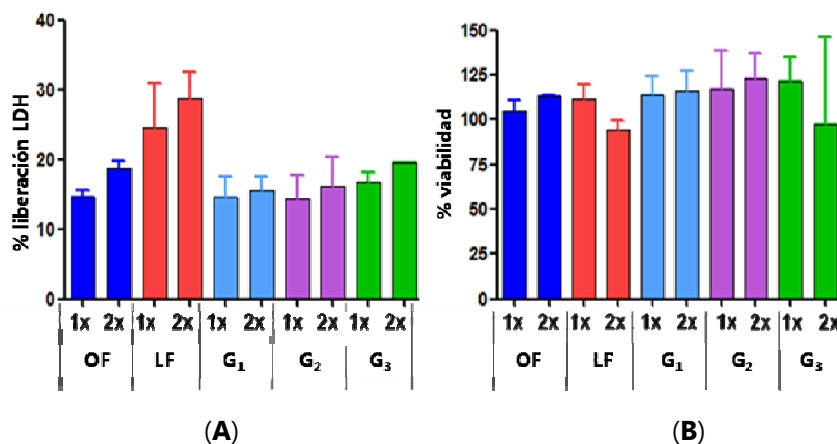


Figura III.14. **(A)** % de liberación de LDH; **(B)** % de viabilidad celular (% reducción de MTT).

También se evaluó la toxicidad a través de un estudio de la apoptosis celular mediante ensayo Western Blot (WB) de las proteínas PARP y proCaspasa 3, cuya fragmentación es indicativa de un proceso de apoptosis. En ambos experimentos no se observan fragmentos procedentes de la ruptura de la proteína, por lo que se concluye que los dendrímeros no provocan la muerte celular por apoptosis.

Estos ensayos son concordantes con los descritos para la línea celular PBL, comentados anteriormente.

La eficacia de la transfección se evaluó para el dendrímero de segunda generación $G_2-[(CH_2CH_2CH_2)N^+Me(Et)(CH_2CH_2N^+Me_3)_{16} 16CF_3SO_3^-]$ **8**, mediante un ensayo funcional en el que se determinó el silenciamiento de la fosfoproteína IRS-4.^[17] La eficacia de este silenciamiento y, por tanto de la transfección, se corroboró mediante un estudio morfológico de las células transfectadas en las condiciones óptimas, puesto que IRS-4 se ve implicado en la morfología de las mismas.

Los resultados de este ensayo de transfección mostraron una eficacia del 40% cuando se utiliza como transfectante el dendrímero **8** junto con ARNi, frente a un 0% para ARNi sólo. La falta de inhibición observada en los ensayos anti-VIH o la moderada capacidad observada en el silenciamiento de la fosfoproteína IRS-4 en el tratamiento del carcinoma hepático, puede ser debida a la alta estabilidad del compuesto dendrímero-oligonucleótido que no permite una disociación efectiva del material nucleico dentro de la célula. Una posible modificación del dendrímero que produjera un debilitamiento de esta interacción podría permitir una liberación más efectiva del oligonucleótido, si bien es cierto que aumentarían los procesos de desactivación. Aunque se encuentra fuera del alcance de esta Memoria, una posibilidad podría consistir

en la internalización de los grupos amonio, situación que tendrá que ser corroborada en un futuro.

Del resultado de los estudios realizados con los dendrímeros carboxilano catiónicos estables, se puede decir que estos compuestos y, en especial los que contienen triflato como contraión, son buenos candidatos para su aplicación como vehículos no virales en terapia génica.

III.1.4. Dendrímeros catiónicos como agentes terapéuticos.

Los dendrímeros catiónicos, tal y como se ha comentado en la introducción general de esta memoria, son capaces de actuar como agentes terapéuticos por sí mismos. La característica más importante para que tengan esta capacidad terapéutica es la multivalencia, de modo que la presencia de múltiples grupos funcionales favorece la interacción del dendrímero con otras moléculas, receptores de membranas celulares, etc.

Las actividades terapéuticas principales de los sistemas dendríticos son como agentes antibacterianos, agentes antivirales y agentes antiptióticos.

III.1.4.1. Capacidad bactericida de los dendrímeros catiónicos.

Debido a la multivalencia de la superficie dendrítica y a su tamaño, los dendrímeros pueden ser potentes biocidas. En general los dendrímeros con actividad antimicrobiana son catiónicos, aunque se han publicado algunos dendrímeros aniónicos que poseen esta capacidad.^[18-20]

Cuando un dendrímero catiónico entra en contacto con la membrana bacteriana, ésta es dañada por las cargas positivas de la macromolécula, de

modo que se produce la salida de las proteínas del citosol y la entrada del dendrímero a través de un mecanismo independiente de endocitosis.^[21] La desestabilización de la membrana^[22-24] implica el desplazamiento de los cationes divalentes estabilizadores de ésta, los cuales son muy importantes en la neutralización de los grupos aniónicos de los fosfolípidos que componen la membrana (Figura III.15.). En el caso de los dendrímeros catiónicos tal desplazamiento debe ocurrir a través de la competición con los cationes divalentes como calcio, o en el caso de los dendrímeros aniónicos por secuestro de estos cationes.

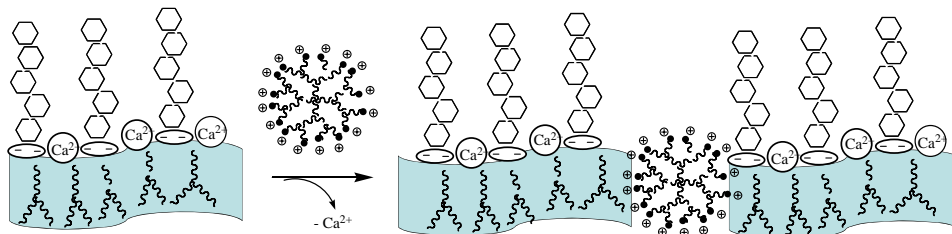
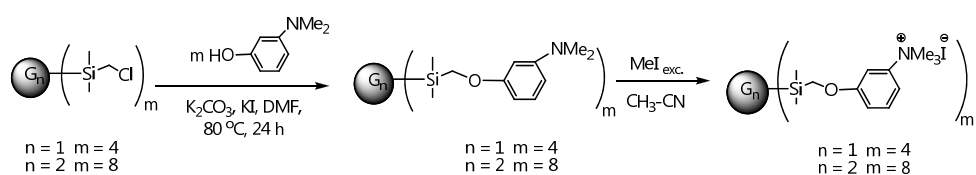


Figura III.15. Mecanismo de acción propuesto para un dendrímero catiónico antibacteriano.

El daño que produzca la macromolécula dendrítica en la membrana determina la capacidad de ésta para actuar como bactericida, lo cual depende de la cantidad de grupos catiónicos que el dendrímero posea en su superficie, de modo que lo esperado sería que la capacidad antimicrobiana aumente al aumentar la generación del dendrímero. Por otro lado hay que tener en cuenta el tamaño de estas moléculas, ya que deben atravesar la membrana y, la naturaleza de los grupos funcionales (grupos lipofílicos con cadenas alifáticas largas favorecen la entrada del dendrímero a través de la membrana citoplasmática).

En la bibliografía se ha descrito la elevada actividad biocida de dendrímeros PPI con grupos amonio en la periferia frente a bacterias Gram+ y Gram-. Las propiedades antibacterianas dependen, en este caso, de la generación del dendrímero, de la longitud de las cadenas hidrofóbicas y del contraión.^[22-24] También se han utilizado péptidos dendriméricos con el fin de obtener agentes antibacterianos. Los péptidos no poseen actividad bactericida por sí mismos, sin embargo se convierten en agentes potentes cuando se conjugan con un núcleo de polilisina.^[25] Otro ejemplo son los dendrímeros PAMAM, en concreto los derivados conjugados parcialmente con cadenas de PEG, que son especialmente activos frente a bacterias Gram-, mientras que apenas son tóxicos para las bacterias Gram+.^[26] Los sistemas dendríticos basados en polipropilenoaminas, llamadas Jeffaminas, poseen un amplio espectro de acción frente a bacterias tanto Gram+ como Gram-, siendo comparable su actividad a la de determinados antibióticos y agentes fungicidas.^[27]

Finalmente, dendrímeros carbosilano con grupos amonio en la superficie han resultado ser buenos agentes antibacterianos frente a bacterias Gram+ y Gram-.^[28] Se trata de dendrímeros carbosilano con grupos amonio terminales sintetizados a través de la reacción de fenolisis de los enlaces C-Cl de derivados funcionalizados en la periferia con grupos -SiCH₂Cl y la cuaternización posterior con MeI (ver Esquema III.1.).



Esquema III.1. Síntesis de dendrímeros carbosilano con capacidad antibacteriana.

La capacidad bactericida de estos sistemas depende de la multivalencia del sistema dendrítico, ya que incluso el dendrímero de primera generación, con 4 cargas positivas en la periferia, es alrededor de dos órdenes de magnitud más potente que su correspondiente derivado monofuncional. No obstante, la capacidad antibacteriana de estas moléculas está supeditada a una situación de compromiso entre el tamaño y el número de cargas en la periferia.

En este trabajo de investigación se han ensayado las propiedades bactericidas de los nuevos dendrímeros sintetizados.

Como agentes antibacterianos han sido probados los dendrímeros G_n - $[(CH_2CH_2CH_2)N^+Me(Et)(CH_2CH_2N^+Me_3)_m mI^-]$ **15-17** y comparados con el compuesto monofuncional G_0 - $[(CH_2CH_2CH_2)N^+Me(Et)(CH_2CH_2N^+Me_3) 2I^-]$ **14**. También se ha evaluado esta actividad bactericida con los dendrímeros de segunda generación que contienen $CF_3SO_3^-$ (**8**) y Cl^- (**12**) como contraión con el fin de observar la posible influencia del mismo. Por otro lado, se ha evaluado también la capacidad antibacteriana de los sistemas G_n - $[CH_2CH_2CH_2C_6H_3(OMe)(OCH_2CH_2N^+Me_3)_m mI^-]$ **25-27**.

La capacidad antibacteriana de los dendrímeros ha sido medida en términos de efecto bacteriostático o CMI (concentración mínima inhibitoria, la cual es la concentración mínima a la que el dendrímero es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano) y de efecto bactericida o CMB (concentración mínima bactericida, que se refiere a la concentración mínima a la que el dendrímero es capaz de matar a la bacteria) frente a bacterias Gram+ y Gram- como son *Staphilococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente. Para un mismo biocida y microorganismo la CMI debe ser menor o igual que la CMB ($CMI \leq CMB$). En la Tabla III.1., se muestran los resultados de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida, expresada en μM , para los diferentes compuestos.

Staphilococcus aureus (Gram +)

Dendrímero	G ₀		G ₁		G ₂		G ₃		Penicilina G	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
7-9					1.58	3.17				
11-13					42.49	84.98				
14-17	115.00	230.00	0.46	1.82	0.85	1.70	0.82	0.82	0.37	0.75
25-27			4.10	8.20	42.00	170.00	29.40	>58.80		

Escherichia coli (Gram -)

Dendrímero	G ₀		G ₁		G ₂		G ₃		Penicilina G	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
7-9					3.17	3.17				
11-13					42.49	84.98				
15-17	>920.00	>920.00	3.65	3.65	1.70	1.70	1.65	1.65	766.00	766.00
25-27			131.80	131.80	170.00	170.00	29.40	58.80		

Tabla III.1. Efecto bacteriostático (CMI) y bactericida (CMB) para los dendrímeros de segunda generación **8**, **12**, el compuesto monofuncional **14**, los dendrímeros **15-17** y **25-27** y Penicilina G, frente a bacterias Gram+ y Gram-.

En comparación con el derivado monofuncional **14**, los dendrímeros G_n- [(CH₂CH₂CH₂)N⁺Me(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃)_m mI] **15-17** muestran un elevado poder antibacteriano frente a bacterias tanto Gram+ como Gram-. Este mayor poder biocida, de entre 2 y 3 órdenes de magnitud, se puede deber al mayor número de grupos funcionales localizados en la superficie de las estructuras dendriméricas policatiónicas. Además, los datos muestran unos valores más pequeños de CMI y CMB en bacterias Gram+ que en Gram-. Este efecto

concuera con el observado en dendrímeros basados en lisina^[25] y debe estar relacionado con las diferencias estructurales existentes entre las paredes celulares de las bacterias. Las bacterias Gram+ contienen una membrana celular compuesta por una bicapa de proteoglicanos simple, mientras que las bacterias Gram- poseen una doble bicapa, lo que hace que estas bacterias sean más resistentes a los ataques externos. En el caso de las bacterias Gram-, se observa que los valores de CMI y CMB coinciden, lo que viene a significar que a esa concentración, los sistemas dendríticos no sólo inhiben el crecimiento de la bacteria, sino que también la matan. Este mismo comportamiento se observa en Gram+ para la tercera generación.

De los datos de la Tabla III.1., se puede observar que el poder bactericida (CMB) de los dendrímeros carbosilano aumenta con la generación.

Comparando los datos de los dendrímeros **15-17** con los del antibiótico comercial Penicilina G potásica (ver Tabla III.1.), la cual es un potente agente bactericida frente a bacterias Gram+, los dendrímeros catiónicos son dos órdenes de magnitud más activos frente a bacterias Gram- y algo menos activos frente a Gram+. Teniendo en cuenta que la penicilina no es un antibiótico para Gram-, los valores obtenidos para estos sistemas policatiónicos indican su elevado potencial como agentes antibacterianos.

Tal y como ya se comentó al inicio de este capítulo, el grado de ruptura de la membrana bacteriana depende básicamente de dos parámetros: i) el número de grupos cargados y ii) la biopermeabilidad del proceso, es decir, el tamaño y el peso molecular, así como de la presencia de grupos o dominios lipofílicos. En cuanto al primer punto, al aumentar la generación aumenta el número de grupos funcionales de modo que el sistema será más potente. En cuanto al segundo punto, si se tiene en cuenta el peso molecular y el tamaño de

los dendrímeros, esta tendencia debería ser la contraria, es decir, a mayor generación mayor tamaño y menor biopermeabilidad. Sin embargo, los dendrímeros usados son lo suficientemente pequeños como para atravesar las membranas de ambos tipos de células, debido a que sus pesos moleculares están en un rango de 2193 a 9713 y los tamaños de los sistemas neutros, medidos por DOSY, están alrededor de 1.3 y 2.0 nm, por lo que este factor no debería afectar mucho.^[29] Otro factor que afecta a la biopermeabilidad es la naturaleza de los grupos hidrofóbicos unidos a los átomos de nitrógeno cuaternario. Diferentes estudios realizados con polímeros catiónicos convencionales y con dendrímeros PPI con grupos amonio en la periferia muestran que la capacidad bactericida aumenta cuando estos se encuentran unidos a cadenas de 10-16 átomos de carbono.^[22-24,30] La lipofilia de los dendrímeros carbosilano es diferente a la de otros dendrímeros descritos en la bibliografía donde los grupos lipofílicos se encuentran en la superficie. En este caso los grupos amonio se encuentran unidos a un esqueleto muy lipofílico, lo que debe ayudar en la biopermeabilidad del proceso y esta lipofilia aumentará con la generación. La combinación de todos estos factores es de difícil racionalización, pero el hecho de que la actividad antibacteriana aumente con la generación implica que tanto la superficie cargada de las macromoléculas, como la lipofilia del esqueleto deben jugar un papel importante en la acción biocida.

La naturaleza del contraión también influye en la actividad bactericida de estas macromoléculas. De acuerdo con los valores de CMI, el dendrímero de segunda generación **12**, que contiene Cl⁻ como contraión, presenta un valor de CMI del orden de 50 y 12 veces menos efectivo frente a bacterias Gram+ y Gram- respectivamente, que el correspondiente compuesto con I⁻ como contraión (**16**) y, 27 (Gram+) y 13 (Gram-) menos que el que contiene CF₃SO₃⁻ (**8**). La disminución de la efectividad puede ser explicada en base a que el ión

ioduro forma pares iónicos más débiles con los grupos amonio que cloruro, de modo que deja al catión más expuesto. Así se produce una atracción electrostática más fuerte con las cargas negativas de la membrana bacteriana.^[23] Por otro lado, la naturaleza de las unidades de amonio también debe tener una influencia en la actividad bactericida, ya que los dendrímeros **8** y **16** con grupos N^+Me_3 poseen una menor hidrofilia que el **12** ya que la presencia de enlaces N-H en este último disminuye la biopermeabilidad y como consecuencia la actividad antibacteriana.

En cuanto a los dendrímeros G_n- $[CH_2CH_2CH_2C_6H_3(OMe)(OCH_2CH_2N^+Me_3)_m mI^-]$ **25-27**, se observa que la actividad bactericida frente a bacterias Gram+ y Gram- disminuye de la primera a la segunda generación, tal y como ocurre con los dendrímeros sintetizados anteriormente en nuestro grupo de investigación.^[28] En la tercera generación se produce un aumento de esta actividad, lo que puede ser debido al aumento de grupos funcionales cargados en la periferia del dendrímero. En cualquier caso, los valores de CMI y CMB son muy elevados en comparación con los dendrímeros $G_n-[(CH_2CH_2CH_2)N^+Me(Et)(CH_2CH_2N^+Me_3)_m mI^-]$ **15-17**, posiblemente debido a la diferencia de solubilidad existente entre ellos.

III.1.4.2. Capacidad antiviral de los dendrímeros catiónicos.

Los dendrímeros antivirales actúan como una célula diana artificial, ya que imitan la superficie de éstas. Por este motivo suelen ser dendrímeros de naturaleza aniónica, con grupos sulfonato o residuos de ácido siálico en la superficie, que emulan los carbohidratos ácidos presentes en la superficie de las células de mamíferos. No obstante, dependiendo del modo de acción, los dendrímeros antivirales pueden diseñarse con una superficie catiónica e incluso neutra, ya que, en lo que se refiere a las primeras etapas de la infección por un

virus, hay gran variedad de moléculas que pueden actuar inhibiendo la adhesión del virus a la membrana de la célula diana.

En la infección por el virus del Herpes Simplex, tanto dendrímeros policatiónicos (polilisina y poliarginina),^[31] como dendrímeros polianiónicos pueden inhibir la adsorción a la superficie celular. Esto se puede deber bien a la competencia entre el dendrímero catiónico y el virus por la asociación con receptores aniónicos de membrana o bien por la competición entre la célula y el dendrímero de naturaleza aniónica por la unión a algún componente catiónico del virus. En cualquier caso, la capacidad antiviral de los sistemas catiónicos está en cierto modo desfavorecida por la mayor toxicidad que poseen en comparación con los dendrímeros aniónicos.^[32]

En la bibliografía se encuentran descritos sistemas dendríticos de naturaleza carbosilano que han demostrado poseer esta capacidad antiviral. Se trata de dendrímeros carbosilano funcionalizados en la periferia con unidades de sialil (α 2→3) lactosa, los cuales han demostrado poseer actividad frente al virus de la gripe.^[33]

A continuación se hará una breve descripción de los ensayos llevados a cabo con los nuevos dendrímeros catiónicos como agentes antivirales frente al VIH. No obstante, en el capítulo dedicado a los dendrímeros carbosilano aniónicos de esta memoria se hará una descripción más detallada de la capacidad antiviral de los mismos frente a este virus.

Los dendrímeros cuaternizados con MeCF_3SO_3 **7-9**, debido a que son los que mejores perfiles de toxicidad mostraron en los ensayos de transfección, han sido utilizados como agentes antivirales en procesos de inhibición de la replicación del VIH en linfocitos activados.

Sabiendo las concentraciones a las que los dendrímeros no son tóxicos (1-5 μM), se trataron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con esta familia de dendrímeros en concentraciones 5 μM de G_1 , 1 μM de G_2 y 0.5 μM de G_3 . Como control de la inhibición de la replicación del VIH se utilizó el fármaco antirretroviral zidovudina o AZT 1 μM . Este fármaco actúa inhibiendo el enzima transcriptasa inversa, la cual es fundamental para la transcripción inversa de ARN viral en ADN. Los dendrímeros se han utilizado como pre-tratamiento, es decir, se han añadido al medio 2 horas antes de la infección. A las 72 horas de la infección se mide el antígeno p24 (marcador serológico de la infección por VIH) recogido en el sobrenadante por ensayo ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Los resultados, que se muestran en la Figura III.17., indican que los dendrímeros de segunda y tercera generación (**8** y **9**) inhiben un 45% la replicación del VIH, comparado con las células control, mientras que el de primera generación (**7**) no produce inhibición.

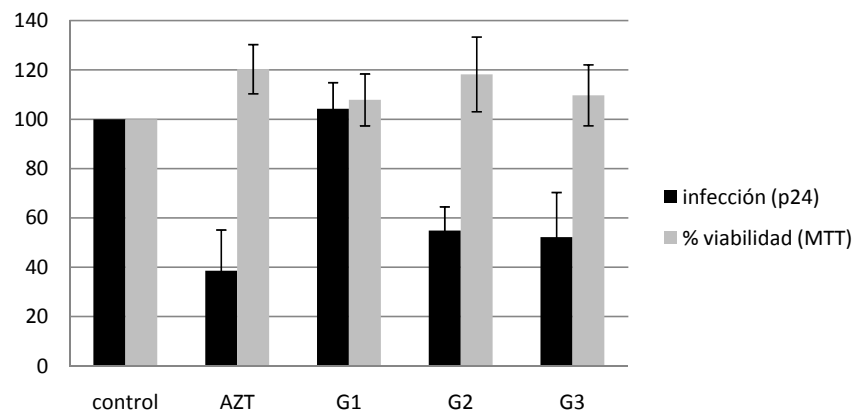


Figura III.17. Ensayo MTT y ELISA, tras 72 horas de tratamiento con el virus.

Además el ensayo MTT indica que el tratamiento con los dendrímeros no produce efectos tóxicos, de modo que las generaciones 2 y 3 provocan un

aumento de la eficiencia de la inhibición sin producir un aumento en la toxicidad, es decir, la inhibición no es producida por la muerte de la célula.

Esta es la primera vez que se utilizan dendrímeros carboxilano como posibles inhibidores de la replicación del VIH. Esto abre una posible nueva línea de investigación en la que sería interesante estudiar el mecanismo de inhibición del virus por parte de estos dendrímeros.

III.1.4.3. Capacidad antipriónica de los dendrímeros catiónicos.

Las proteínas priónicas se pueden encontrar en una forma celular normal PrP^c, la cual no es patógena ni contagiosa, o como el conformero anormal PrP^{Sc}. Esta forma anormal de la proteína se caracteriza por formar agregados que precipitan acumulándose en el tejido cerebral del individuo afectado, formando las denominadas placas amiloides, además de ser resistentes a la digestión por proteasas. Estos depósitos insolubles son la base de las llamadas enfermedades priónicas entre las que se encuentran las encefalías espongiiformes (enfermedad de Creutzfeldt-Jacobs o enfermedad de las vacas locas) y un número de otras enfermedades neurodegenerativas entre las que se encuentra el Alzheimer.

Dendrímeros tipo PAMAM, PPI^[34,35] y otras macromoléculas dendríticas, han demostrado ser capaces de eliminar el conformero anormal de la proteína priónica. En todos los casos se pone de manifiesto el aumento de la capacidad antipriónica al aumentar la generación. Por otro lado, Majoral y colaboradores^[36] estudiaron la capacidad antipriónica de los dendrímeros de fósforo. Estos dendrímeros no soportan ningún agente terapéutico, simplemente contienen grupos amonio en la periferia con cloruro como contraión y esto les hace funcionar como agentes terapéuticos en sí. Los resultados obtenidos evidencian que las generaciones estudiadas (3^a, 4^a y 5^a)

son capaces de inhibir la formación de la forma anormal PrP^{Sc} de la proteína priónica, además de eliminar los agregados de esta proteína de las células infectadas.

Hasta ahora no hay datos en la bibliografía que demuestren que los dendrímeros carboxilano catiónicos pueden actuar como agentes antipriónicos. En este sentido, nuestro grupo de investigación, en colaboración con el departamento de Biofísica General de la Universidad de Łódź en Polonia, ha llevado a cabo un estudio preliminar y comparativo en términos de tamaño (generación), composición y tipología, entre dendrímeros carboxilano con grupos amonio (dendrímeros **11-13** y **7-9**, respectivamente) y PAMAM con diferentes funcionalidades.

Estos experimentos se basan en la producción de fibras amiloides o agregados, a través de la exposición a condiciones desestabilizantes del péptido PrP 185-208, que es un fragmento de la proteína priónica humana. La formación de estos agregados se ha monitorizado utilizando tioflavina T cuya fluorescencia depende de la presencia de fibras amiloides.

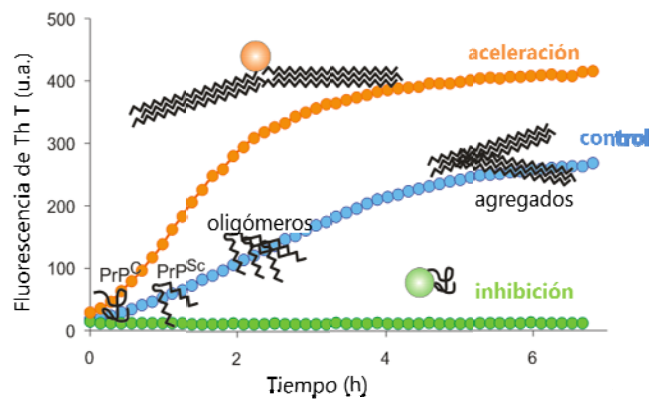
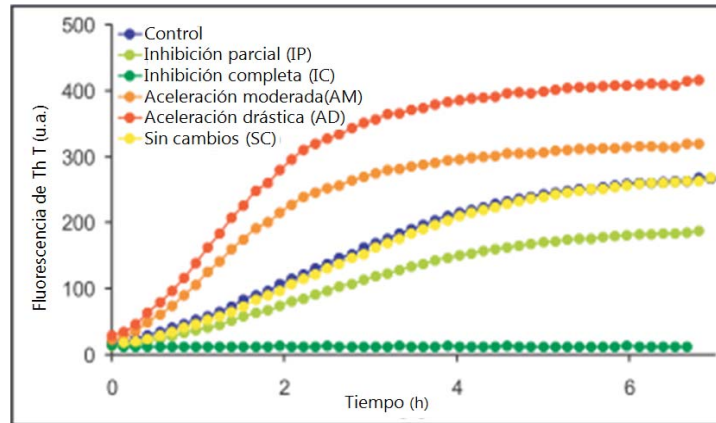


Figura III.17. Esquemización de la cinética de formación de las fibras amiloides (agregados) en presencia de sistemas que inhiben el proceso, comparado con otros que potencian la formación de estas fibras.

En la Figura III.17., se puede observar que en presencia de determinados compuestos, el proceso de formación de fibras amiloides es inhibido como consecuencia de la unión del conformero normal de la proteína priónica (PrP^c) a la macromolécula. La unión de esta proteína a una molécula que produce las condiciones desestabilizantes de la misma, da lugar a una aceleración del proceso de formación de agregados, con respecto al control.

En la Figura III.18., se muestra la actividad de dendrímeros PAMAM con distintos grupos amonio, comparada con la de dendrímeros carbosilano con grupos amonio terminales y a dos concentraciones diferentes.



PAMAM con núcleo de trietanolamina				
Generación	Grupos en la periferia	Grupo terminal	1 μM	10 μM
G₁	6	NMe ₂ Bz ⁺	AD	IP
G₂	12		AD	IC
G₃	24		AM	IC
G₄	48		IP	IC
G₁	6	NH ₃ ⁺	AM	IP
G₂	12		SC	IC
G₃	24		IP	IC
G₄	48		IP	IC
G₁	6	NMe ₂	AM	IP
G₂	12		AM	IP
G₃	24		AM	IC
G₄	48		IP	IC
Dendrímeros carbosilano			1 μM	10 μM
G₁ (7)	8	NMe ₃ ⁺	SC	SC
G₂ (8)	16		SC	IP
G₃ (9)	32		SC	IC
G₁ (11)	8	NHMe ₂ ⁺	SC	SC
G₂ (12)	16		SC	IP
G₃ (13)	32		SC	IC

Figura III.18. Comparación de la actividad antipirónica de PAMAM y dendrímeros carbosilano con grupos terminales similares.

Los dendrímeros carbosilano, tal y como se puede observar en la gráfica de la Figura III.18., no producen ningún tipo de aceleración de la formación de fibras amiloides cuando se utilizan en bajas concentraciones, mientras que la inhibición se produce a elevadas concentraciones de dendrímero para las generaciones 2 y 3, dándose la inhibición completa a medida que aumenta la generación. Sin embargo, en ningún momento se observa una aceleración del proceso de formación de agregados.

En el caso de los dendrímeros PAMAM, a bajas concentraciones y de forma general, se produce una aceleración del proceso, situación que se atenúa al aumentar la generación. Para concentraciones altas, todos los sistemas de tipo PAMAM inhiben el proceso, pasando de ser parcial a completo a medida que aumenta la generación (a partir de la segunda generación).

De este estudio se deduce que el esqueleto y los grupos funcionales de la periferia influyen en la formación de los agregados. Además el comportamiento de los dendrímeros carbosilano está de acuerdo con el publicado para dendrímeros PAMAM, PPI y de fósforo, es decir, la capacidad antipriónica aumenta con la generación.

Como conclusión se puede decir que estos dendrímeros carbosilano catiónicos pueden ser prometedores agentes antipriónicos.

III.2. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] O. M. Milhem, C. Myles, N. B. McKeown, D. Attwood, A. D'Emanuele, *Int. J. Pharm.*, **2000**, *197*, 239-241.
- [2] F. Snyder, B. A. Wolf, F. Snyder, "Keratolytic cosmetic compsns. for treating acne - contg. keratolytic agent complexed with carrier Patent". EP696451-A; US5449519-A; GB2292080-A; EP696451-A1; NO9503114-A; FI9503743-A; ZA9505621-A; JP8059425-A; AU9521798-A; CA2152640-A; BR9503559-A; SG32434-A1; NZ272727-A; MX184446-B; AU690251-B; GB2292080-B; IL114487-A; CA2152640-C; US5449519-C1; IN9500734-I2. Aug. 19, 1997.
- [3] S. G. Kluijtmans, J. B. Bouwstra, S. Kluijtmans, J. Bouwstra, "Ultraviolet-absorbing polymer useful in sunscreen composition comprises synthetic amine rich polymer covalently linked to aminobutadiene compound Patent". WO2006009451-A1; EP1784455-A1; JP2008507606-W; US2009130033-A1. Sept. 12, 1995.
- [4] R. Jevprasesphant, J. Penny, R. Jalal, D. Attwood, N. B. McKeown, A. D'Emanuele, *Int. J. Pharm.*, **2003**, *252*, 263-266.
- [5] E. Buhleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis*, **1978**, 155-158.
- [6] C. Dufes, I. F. Uchegbu, A. G. Schatzlein, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 2177-2202.
- [7] A. M. Caminade, J. P. Majoral, *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, *30*, 491-505.
- [8] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, **1990**, *112*, 7638-7647.
- [9] J. Janiszewska, Z. Urbanczyk-Lipkowska, *18th Polish Peptide Symposium (Wroclaw, POLAND)* **2005**, pp. 77-82.
- [10] L. Garrelly, B. Romestand, H. Collet, R. Pascal, A. Commeyras, *International Dendrimer Symposium 5, Toulouse, France*, **2007**, P-036.
- [11] P. Ortega, *Tesis Doctoral, Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá*, **2005**.
- [12] P. Ortega, J. F. Bermejo, L. Chonco, E. de Jesús, F. J. de la Mata, G. Fernández, J. C. Flores, R. Gómez, M. J. Serramía, M. A. Muñoz-Fernández, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 1388-1396.
- [13] J. F. Bermejo, P. Ortega, L. Chonco, R. Eritja, R. Samaniego, M. Mullner, E. de Jesús, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez, A. Muñoz-Fernández, *Chem.-Eur. J.*, **2007**, *13*, 483-495.

- [14] N. Weber, P. Ortega, M. I. Clemente, D. Shcharbin, M. Bryszewska, F. J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández, *J. Control. Release*, **2008**, *132*, 55-64.
- [15] I. Posadas, B. López-Hernández, M. I. Clemente, J. L. Jimenez, P. Ortega, J. de la Mata, R. Gómez, M. A. Muñoz-Fernández, V. Cena, *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, **2008**, *30*, 91-91.
- [16] L. Chonco, J. F. Bermejo-Martín, P. Ortega, D. Shcharbin, E. Pedziwiatr, B. Klajnert, F. J. de la Mata, R. Eritja, R. Gómez, M. Bryszewska, M. A. Muñoz-Fernández, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1886-1893.
- [17] S. García, *Tesis de Máster, Universidad de Alcalá*, **2009**.
- [18] A. Mecke, S. Uppuluri, T. M. Sassanella, D. K. Lee, A. Ramamoorthy, J. R. Baker, B. G. Orr, M. M. B. Holl, *Symposium on Membrane Biophysics* (Ann Arbor, MI) **2003**, pp. 3-14.
- [19] S. P. Hong, A. U. Bielinska, A. Mecke, B. Keszler, J. L. Beals, X. Y. Shi, L. Balogh, B. G. Orr, J. R. Baker, M. M. B. Holl, *Bioconjugate Chemistry*, **2004**, *15*, 774-782.
- [20] S. R. Meyers, F. S. Juhn, A. P. Griset, N. R. Luman, M. W. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 14444-14445.
- [21] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, *33*, 43-63.
- [22] C. Z. Chen, N. C. B. Tan, S. L. Cooper, *Chem. Commun.*, **1999**, 1585-1586.
- [23] C. Z. S. Chen, N. C. Beck-Tan, P. Dhurjati, T. K. van Dyk, R. A. LaRossa, S. L. Cooper, *Biomacromolecules*, **2000**, *1*, 473-480.
- [24] C. Z. Chen, S. L. Cooper, *Biomaterials*, **2002**, *23*, 3359-3368.
- [25] J. P. Tam, Y. A. Lu, J. L. Yang, *European Journal of Biochemistry*, **2002**, *269*, 923-932.
- [26] M. K. Calabretta, A. Kumar, A. M. McDermott, C. Z. Cai, *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 1807-1811.
- [27] M. Tulu, N. M. Aghatabay, M. Senel, C. Dizman, T. Parali, B. Dulger, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, *44*, 1093-1099.
- [28] P. Ortega, J. L. Copa-Patiño, M. A. Muñoz-Fernández, J. Soliveri, R. Gómez, F. J. de la Mata, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2008**, *6*, 3264-3269.
- [29] B. Rasines, J. M. Hernández-Ros, N. de las Cuevas, J. L. Copa-Patiño, J. Soliveri, M. A. Muñoz-Fernández, R. Gómez, F. J. de la Mata, *Dalton Trans.*, **2009**, 8704-8713.
- [30] E. R. Kenawy, S. D. Worley, R. Broughton, *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 1359-1384.

- [31] N. Langeland, L. J. Moore, H. Holmsen, L. Haarr, *J. Gen. Virol.*, **1988**, *69*, 1137-1145.
- [32] N. Malik, R. Wiwattanapatapee, R. Klopsch, K. Lorenz, H. Frey, J. W. Weener, E. W. Meijer, W. Paulus, R. Duncan, *9th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems* (Salt Lake City, Utah) **1999**, pp. 133-148.
- [33] H. Oka, T. Onaga, T. Koyama, C. T. Guo, Y. Suzuki, Y. Esumi, K. Hatano, D. Terunuma, K. Matsuoka, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, *18*, 4405-4408.
- [34] S. Supattapone, H. O. B. Nguyen, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, M. R. Scott, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, *96*, 14529-14534.
- [35] S. Supattapone, H. Wille, L. Uyechi, J. Safar, P. Tremblay, F. C. Szoka, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, M. R. Scott, *J. Virol.*, **2001**, *75*, 3453-3461.
- [36] J. Solassol, C. Crozet, V. Perrier, J. Leclaire, F. Beranger, A. M. Caminade, B. Meunier, D. Dormont, J. P. Majoral, S. Lehmann, *J. Gen. Virol.*, **2004**, *85*, 1791-1799.



CAPÍTULO IV

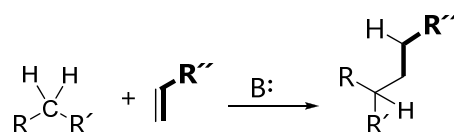
**“DENDRÍMEROS CARBOSILANO
ANIÓNICOS”**

IV.1. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS ANIÓNICOS.

Existen varios métodos para funcionalizar la periferia de los dendrímeros con grupos aniónicos, de entre los cuales cabe destacar la reacción de Adición de Michael, la técnica de Click Chemistry y reacciones de alcoholisis de enlaces R-Cl.

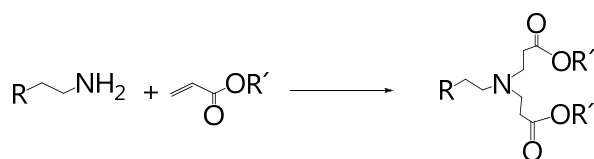
IV.1.1. Reacción de Adición de Michael.^[1,2]

En esta reacción se produce la adición nucleófila de un carbanión a un compuesto α,β -insaturado (ver Esquema IV.1.).



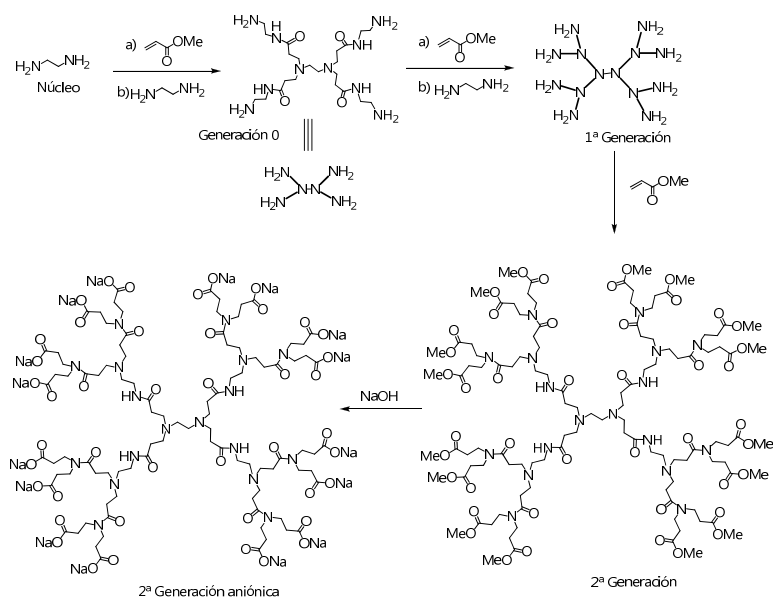
Esquema IV.1. Esquema general para la reacción de Adición de Michael.

Un caso concreto de este tipo de reacción es el que se produce entre una amina primaria y una olefina (Esquema IV.2.).



Esquema IV.2. Reacción de Adición de Michael entre una amina y una olefina.

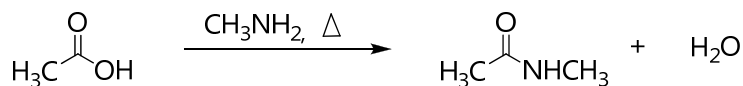
Como ejemplo de este tipo de reacción está la síntesis divergente de dendrímeros PAMAM, la cual se da por reacciones iterativas de Adición de Michael del núcleo de etilendiamina a metacrilato, la adición de hidróxido sódico a los grupos éster formados en la etapa previa a la amidación, necesaria para el crecimiento del dendrímero, conduce a la formación de grupos carboxilato aniónicos en la periferia de estos compuestos. (Esquema IV.3.).



Esquema IV.3. Síntesis de dendrímeros aniónicos tipo PAMAM vía reacción de Adición de Michael seguida de adición de NaOH.

IV.1.2. Formación de amidas.

La reacción entre un ácido carboxílico y una amina, conduce a la formación de amidas. Esquema IV.4.



Esquema IV.4. Reacción de amidación.

Este método de síntesis se ha utilizado para preparar dendrímeros de naturaleza PAMAM aniónicos con grupos naftilsulfonato terminales y dendrímeros de tipo PPI. No obstante, esta ruta ha resultado ser más sencilla para la síntesis de dendrímeros de polilisina con grupos sulfonato en la periferia. Un ejemplo de este tipo de sistemas es el dendrímero SPL 7013.^[3] La adición de

sucesiva de capas de L-lisina a un núcleo de bencidrilamino amida, proporciona un dendrímero con 32 grupos amino en la periferia (16 α -aminas y 16 ϵ -aminas de la capa de L-lisina más externa). El paso final de esta síntesis consiste en el ataque de 32 grupos de 1-(carboximetoxi)naftaleno-3,6-disulfonato sódico, los cuales se unen a la superficie del dendrímero a través de un enlace amida. A modo de ejemplo, en la Figura IV.1., se muestra la estructura del dendrímero SPL 7013. Este dendrímero con grupos sulfonato fue formulado más tarde con un gel hidrosoluble de Carbopol al que se ha llamado VivaGel.^{TM[3,4]} Hasta ahora este es el único agente terapéutico desarrollado a partir de un sistema dendrítico que se encuentra en fase clínica 3.

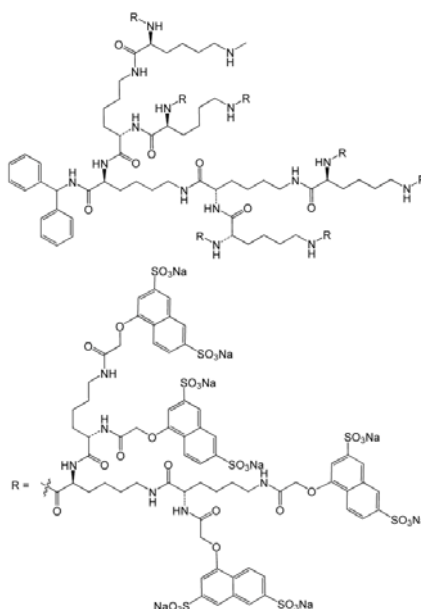


Figura IV.1. Estructura del dendrímero SPL 7013.

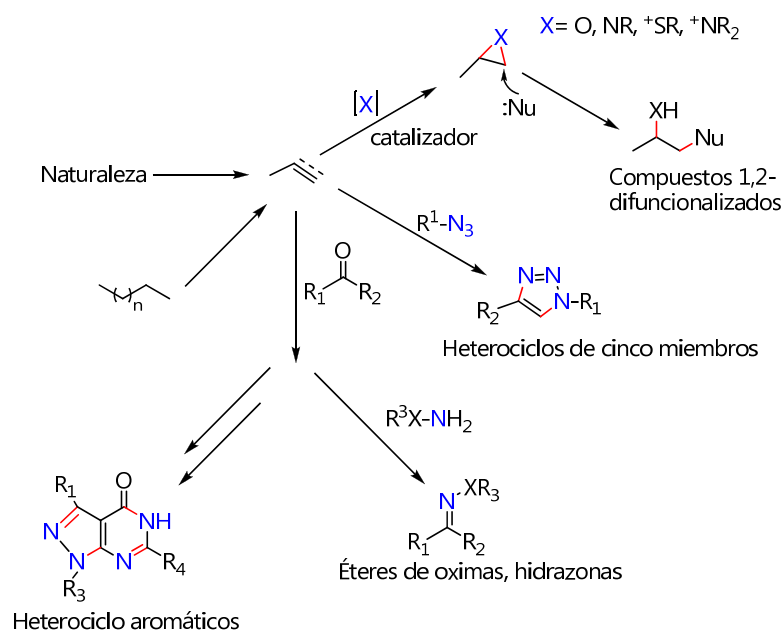
IV.1.3. Técnica Click Chemistry.

Este método, introducido en 2001 por K. Barry Sharpless,^[5] consiste en la generación de nuevas sustancias, de forma rápida y segura, mediante la unión de unidades modulares más pequeñas, formando enlaces C-heteroátomo-C.

Esta reacción debe ser modular y de amplio alcance, debe generar productos secundarios inofensivos, que puedan ser eliminados mediante métodos no cromatográficos y debe ser estereoespecífica. Para ello:

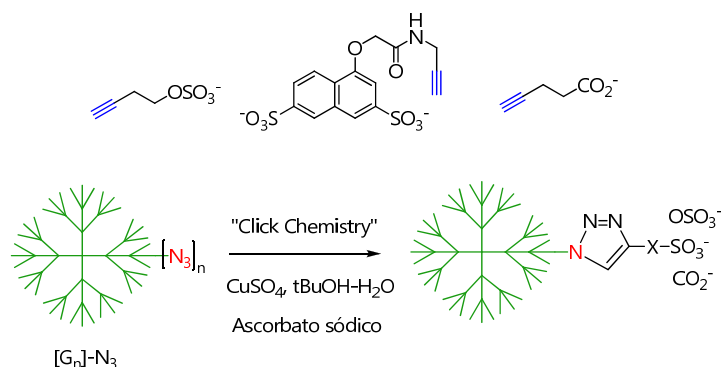
- Las condiciones de reacción deben ser simples.
- Los reactivos y compuestos de partida deben ser de fácil adquisición.
- Se debe dar en ausencia de disolvente o bien en uno cuya eliminación sea sencilla.
- Como producto de reacción, se debe aislar un único compuesto.
- Si se requiere purificación, ésta debe ser mediante métodos no cromatográficos, tales como cristalización o destilación.
- El producto debe ser estable en condiciones fisiológicas.

Los reactivos más útiles son las olefinas y los acetilenos, los cuales son atacados por otras moléculas que aportan el heteroátomo (ver Esquema IV.5).



Esquema IV.5. Reacciones Click Chemistry más favorables energéticamente.

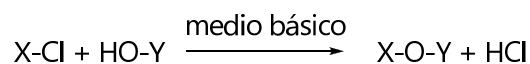
El método Click Chemistry, utilizado entre otros por Fernández-Megía y colaboradores,^[6] ha resultado ser eficaz para la síntesis de nuevos polímeros dendriméricos aniónicos que simulan a los glicosaminoglicanos. Para la formación de estos compuestos aniónicos es necesaria la presencia de una molécula que contenga en su estructura grupos azida (N_3) terminales, a los que poder unir vía "click" un triple enlace. Este tipo de enlace se encuentra presente en compuestos como los que se muestran en el Esquema IV.6.



Esquema IV.6. Formación compuestos a través de click-chemistry.

IV.1.4. Reacciones de alcoholisis de enlaces X-Cl.

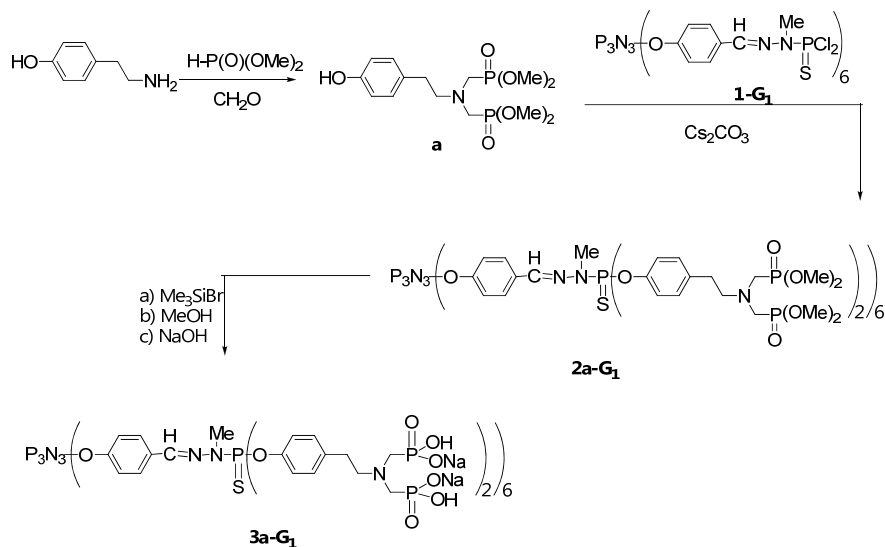
El fundamento de esta reacción se encuentra recogido en el Esquema IV.7.



Esquema IV.7. Reacción de alcoholisis de enlaces X-Cl.

Esta estrategia de síntesis ha sido aplicada para funcionalizar la periferia de dendrímeros con grupos fosfonato (sal sódica del ácido fosfónico).^[7] Estas estructuras dendríticas contienen átomos de fósforo en los puntos de ramificación. Para su síntesis se lleva a cabo una sustitución nucleófila de los átomos de cloro de los dendrímeros de fósforo descritos por Majoral 1- G_n

(n=0-2) por un fenol derivado de la tiramina (4-(2-aminoetil)fenol), el cual porta dos grupos dimetilfosfonato, en presencia de carbonato de cesio. El tratamiento posterior de este compuesto con bromuro de trimetilsililo, metanol e hidróxido sódico, proporcionan estos dendrímeros aniónicos (ver Esquema IV.8.).



Esquema IV.8. Síntesis del dendrímero de primera generación 3a-G₁ con grupos fosfonato en la periferia.

IV.1.5. Reacción de Williamson.

Esta reacción ha sido utilizada por Astruc y colaboradores^[8] para funcionalizar la periferia de dendrímeros que contienen átomos de iodo en la periferia.^[9-12] La reacción de estos derivados con metil-4-hidroxibenzoato proporciona dendrímeros con grupos benzoato terminales. Éstos son acidificados para dar lugar a grupos ácido. Posteriormente, los dendrímeros son disueltos en una disolución acuosa de NaOH para proporcionar los compuestos aniónicos con 81 grupos carboxilato terminales, los cuales son solubles en disolución acuosa. En la figura IV.2., se representa un dendrímero de segunda generación sintetizado por este método.

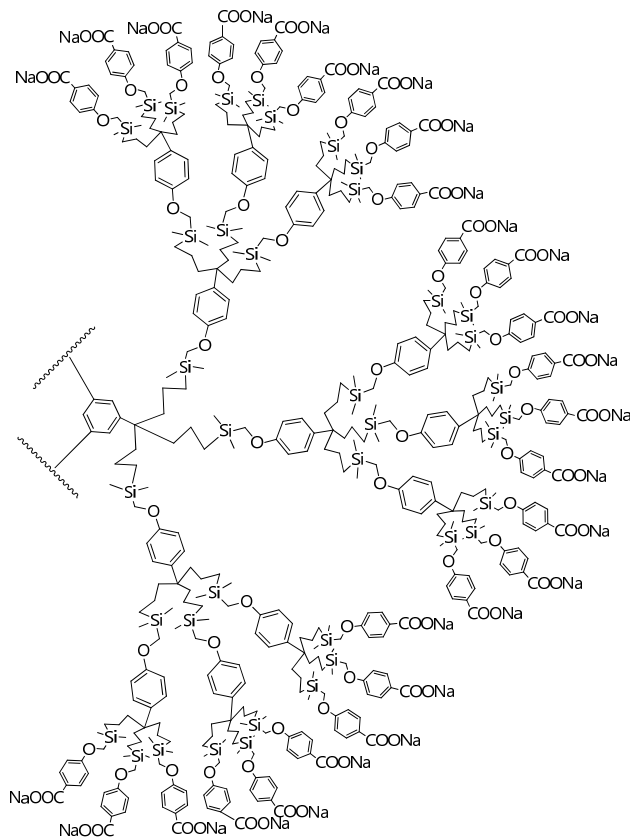


Figura IV.2. Dendrímoro de de segunda generación con 81 grupos carboxilato.

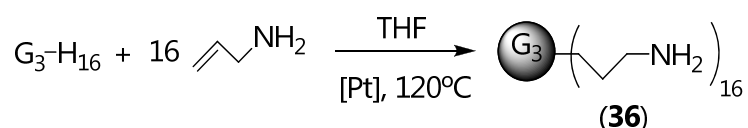
IV.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS CARBOSILANO ANIÓNICOS.

IV.2.1. Introducción. Síntesis de dendrimeros precursores.

En este capítulo, hemos centrado nuestra atención en la síntesis de dendrimeros carbosilano aniónicos que contienen grupos carboxilato y

sulfonato en la periferia, debido a las posibles aplicaciones biomédicas que éstos poseen. A continuación se hará un estudio detallado del procedimiento de síntesis y su caracterización estructural.

Todos los dendrímeros que se presentan en este apartado se han preparado a partir de dendrímeros carbosilano precursores de 1ª y 2ª generación que contienen grupos -NH_2 terminales, cuya síntesis se encuentra recogida en la bibliografía.^[13] En el capítulo dedicado a la parte experimental se describen la síntesis y los datos analíticos y espectroscópicos del dendrímero de tercera generación $\text{G}_3\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_{16}$ (**36**), el cual no estaba descrito con anterioridad y que ha sido necesario preparar como punto de partida para esta nueva familia (Esquema IV.9.).



Esquema IV.9. Síntesis del dendrímero de tercera generación **36**.

Para llevar a cabo esta reacción se sigue un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros de 1ª y 2ª generación, el cual supone un proceso de hidrosililación en THF de alilamina con el dendrímero de tercera generación que contiene enlaces Si-H terminales.

IV.2.2. Dendrímeros con grupos carboxilato en la periferia.

IV.2.2.1. Estudio preparativo.

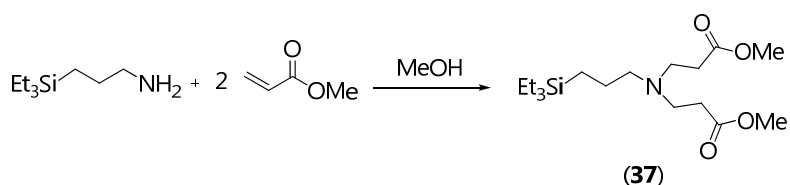
El esquema que se seguirá para la descripción de los compuestos, pasa por la síntesis, en primer lugar, de dendrímeros con grupos éster en la

superficie, para a continuación, describir la preparación de los dendrímeros aniónicos que dan título a este capítulo.

IV.2.2.1.1. Síntesis de dendrímeros con grupos éster terminales.

Tal y como viene siendo habitual en este trabajo, lo primero que se ha preparado ha sido el compuesto monofuncional G_0 , sobre el que se realizan los estudios de reactividad y caracterización estructural que posteriormente pueden ser extendidos al resto de componentes de la familia de dendrímeros.

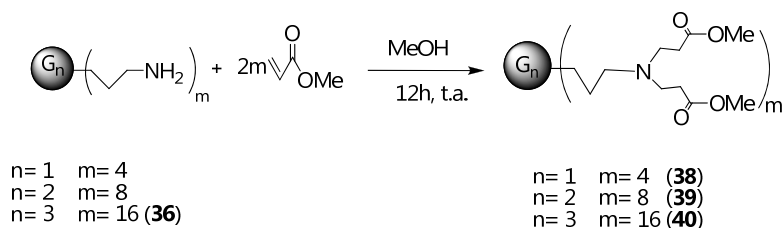
El compuesto $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2$ **37** (G_0), se prepara mediante una reacción de Adición de Michael, partiendo de una disolución en MeOH del compuesto $\text{Et}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$,^[13] sobre la que se añaden 2 equivalentes de acrilato de metilo. De este modo se aísla el compuesto **37** como un aceite incoloro con un rendimiento cuantitativo (ver Esquema IV.10.).



Esquema IV.10. Síntesis del compuesto **37**.

Tras haber establecido las condiciones óptimas para la síntesis de dendrímeros carbosilano con grupos éster en la periferia, se llevó a cabo esta reacción con los dendrímeros de primera, segunda y tercera generación que contienen grupos $-\text{NH}_2$ terminales $G_n-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_m$, donde $n=1, 2$; $m=4, 8$ y $n=3, m=16$ (**36**), sobre los que se añade un ligero exceso de acrilato de metilo en metanol. Tras 12 horas de agitación constante a temperatura ambiente, se obtienen los dendrímeros $G_n-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_m$, donde $n=1$,

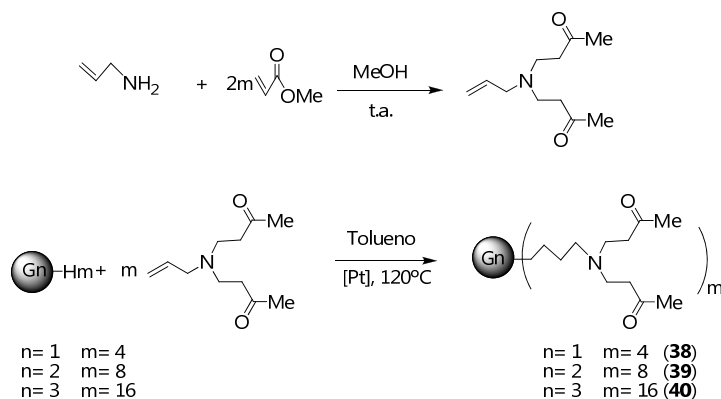
m=4 (**38**); n=2, m=8 (**39**) y n=3, m=16 (**40**), como aceites incoloros con elevados rendimientos, (Esquema IV.11.).



Esquema IV.11. Síntesis de dendrímeros neutros.

Los dendrímeros sintetizados de esta forma son solubles en disolventes orgánicos de uso común y disolventes clorados.

Los dendrímeros de 1^a, 2^a y 3^a generación **38-40**, se pueden preparar también a partir de la reacción de hidrosililación de los dendrímeros $\text{G}_n\text{-H}_m$ disueltos en tolueno con el reactivo $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2$,^[14] el cual ha sido sintetizado a través de una reacción de Adición de Michael de alilamina en metanol a acrilato de metilo a temperatura ambiente, utilizando el catalizador de Karstedt (Esquema IV.12.). Esta reacción minimiza el número de etapas necesarias para obtener estos compuestos.



Esquema IV.12. Síntesis de los dendrímeros **38-40** a través de hidrosililación.

En la Figura IV.3., se muestran las estructuras propuestas para estos dendrimeros.

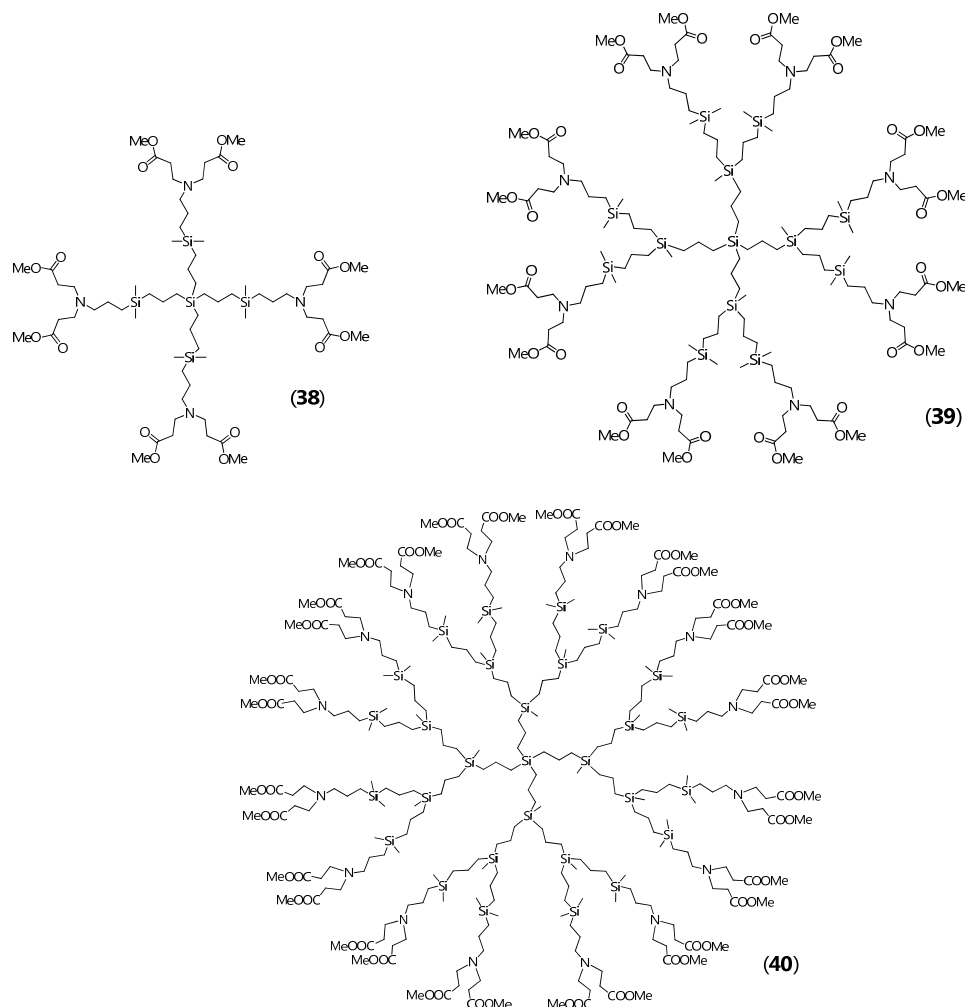
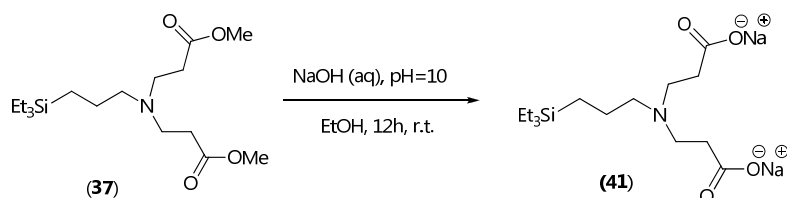


Figura IV.3. Representación estructural de los compuestos 38-40.

IV.2.2.1.2. Síntesis de dendrimeros con grupos carboxilato terminales.

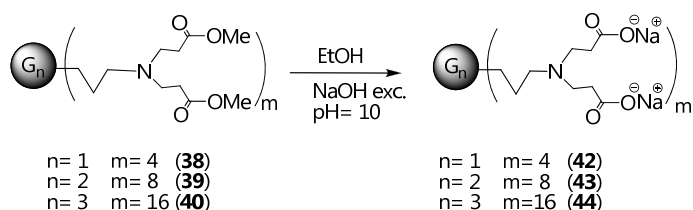
En primer lugar se preparó la especie monofuncional G_0 , partiendo de una disolución en EtOH del compuesto **37**, sobre el que se añade un exceso de una disolución acuosa de hidróxido sódico de pH=10. La mezcla de reacción se

mantiene con agitación constante durante 12h tras las cuales se elimina el disolvente a vacío y se lava con dietil éter. Tras purificar el compuesto por cromatografía en columna de exclusión de tamaños de Sephadex-25, se aísla el compuesto $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2$ **41**, como un sólido blanco con un rendimiento moderado, soluble en agua (ver Esquema IV.13.).



Esquema IV.13. Síntesis del compuesto monofuncional **41**.

A continuación se procedió a sintetizar el resto de componentes de la familia, tratando los dendrímeros $\text{G}_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_m$ **38-40** disueltos en etanol, con un exceso de una disolución acuosa de NaOH de pH=10. Operando de la misma forma que en el caso anterior, se aíslan los compuestos $\text{G}_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_m$, donde $n=1$, $m=4$ (**42**); $n=2$, $m=8$ (**43**) y $n=3$, $m=16$ (**44**), como sólidos blancos con una solubilidad en agua >100 mg/ml y con elevados rendimientos (Esquema IV.14.).



Esquema IV.14. Síntesis de los dendrímeros aniónicos **42-44**.

Las estructuras de estos compuestos se encuentran representadas en la Figura IV.4.

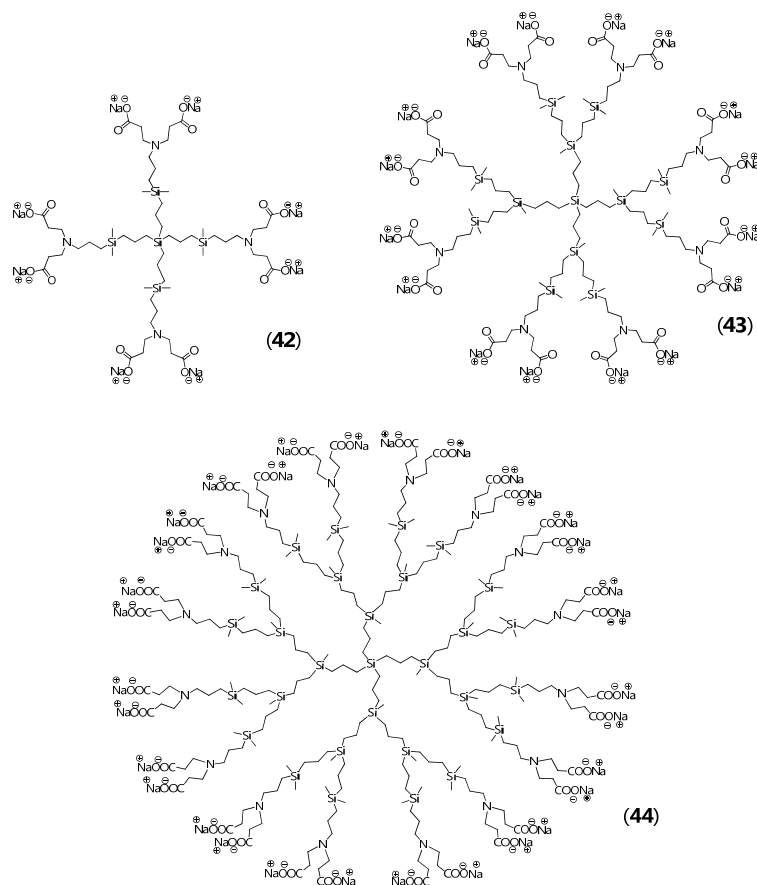


Figura IV.4. Estructura de los dendrimeros carbosilano aniónicos 42-44.

IV.2.2.2. Estudio estructural.

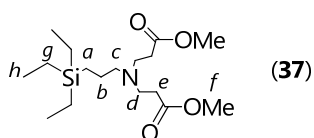
Los dendrimeros descritos hasta ahora han sido caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{29}Si . Además la caracterización se ha completado por análisis elemental de C, H y N, espectroscopía de masas Maldi-TOF y GPC en el caso de los compuestos con grupos éster terminales. También se ha llevado a cabo un estudio adicional del comportamiento ácido base en disolución acuosa para estas especies aniónicas.

IV.2.2.2.1. *Dendrímeros con grupos éster terminales.*

Los datos de análisis elemental, espectroscópicos, Maldi-TOF, y GPC son concordantes con las estructuras propuestas para los compuestos **37-40** (ver Esquema IV.12. y Figura IV.3.).

a) *Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.*

Los datos de ^1H y ^{13}C -RMN para el compuesto **37** se encuentran recogidos en la Tabla IV.1. El análisis de estos datos permite una mejor interpretación de los correspondientes a los demás miembros de la familia.



Grupo	^1H -RMN ppm	Grupo	^{13}C -RMN ppm
OMe	3.60	COOMe	173.0
NCH ₂ CH ₂ COOMe	2.71	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	57.6
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	2.38	OMe	51.4
y NCH ₂ CH ₂ COOMe		NCH ₂ CH ₂ COOMe	49.2
NCH ₂ CH ₂ COOMe		NCH ₂ CH ₂ COOMe	32.4
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.33	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	21.4
CH ₃ CH ₂	0.86	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	8.7
CH ₃ CH ₂	0.40	CH ₃ CH ₂	7.3
y SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N		CH ₃ CH ₂	3.2

Tabla IV.1. Datos de ^1H y ^{13}C -RMN en CDCl_3 , para el compuesto **37**.

En el espectro de ^1H -RMN del compuesto **37**, es posible observar un singlete en torno a δ 3.60 que se corresponde con los grupos metóxido (f) del fragmento éster. El triplete que aparece a δ 2.71 se asigna a los protones del

grupo metileno (*e*), directamente unido al átomo de nitrógeno (ver asignación en la figura adjunta a la Tabla IV.1.). Los protones metilénicos (*c* y *d*), aparecen como un multiplete localizado a δ 2.38, los protones del grupo metileno intermedio (*b*) proporcionan un multiplete a δ 1.33. Las señales correspondientes al sistema trietilsilano proporcionan las señales típicas a δ 0.86 correspondiente a los metilos del fragmento etilo (*h*) y un multiplete localizado a δ 0.40 que se asigna a los protones metilénicos (*a* y *g*) de los grupos metileno directamente unidos al átomo de silicio.

En el espectro de ^{13}C -RMN, se observa la señal correspondiente al carbono carbonílico (*i*) a δ 173.0, desplazamiento típico para este grupo cuando se encuentra unido a un grupo metóxido, el cual aparece a δ 51.4. Los carbonos unidos directamente al átomo de nitrógeno aparecen a δ 57.6 (*c*) y 49.2 (*d*). A δ 32.4 ppm se localiza el carbono unido directamente al carbono carbonílico (*e*) y a δ 21.4 el carbono (*b*), ver asignación en la figura de la Tabla IV.1. Los carbonos unidos al átomo de silicio aparecen a δ 8.7 (*a*) y 3.2 (*g*), mientras que el carbono del grupo metilo del fragmento etilo se localiza a δ 7.3 (*h*). En la Figura IV.5., se representan los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN del compuesto $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2$ **37**.

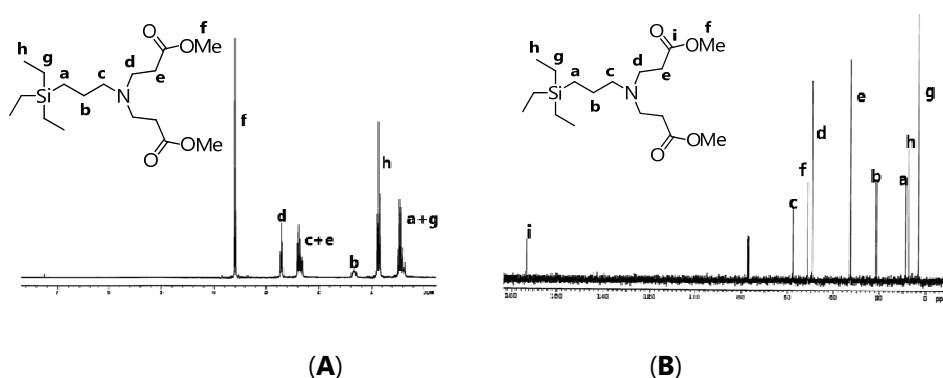
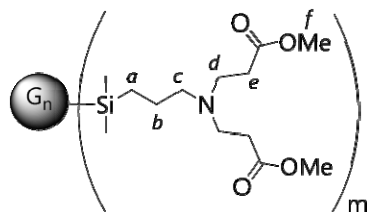


Figura IV.5. Espectros de ^1H (A) y ^{13}C RMN (B) para el compuesto **37**.

Una vez asignadas las señales del compuesto monofuncional, la asignación de las señales más relevantes de los compuestos G_n - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_m$ **38**, **39** y **40** se encuentran recogidas en las Tablas IV.2 y IV.3.

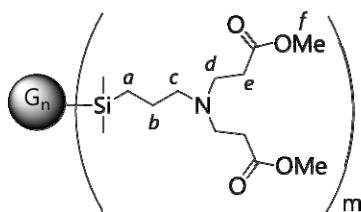


Grupo	n=1, m=4 (38)	n=2, m=8 (39)	n=3, m=16 (40)
OMe	3.64	3.64	3.63
NCH ₂ CH ₂ COOMe	2.75	2.75	2.74
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N y NCH ₂ CH ₂ COOMe	2.42	2.42	2.41
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si y SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.32	1.31	1.31
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.54	0.53	0.53
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.37	0.38	0.37
SiMe ₂	-0.07	-0.06	-0.07
SiMe		-0.1	-0.1

Tabla IV.2. Datos de ^1H -RMN de los dendrímeros **38-40** en CDCl_3 .

Tal y como se puede observar en la tabla adjunta, las señales correspondientes a los protones del esqueleto carbosilano son prácticamente idénticas en las tres generaciones de dendrímeros, si bien, como era de esperar las señales se van haciendo más anchas al aumentar la generación. Al pasar del compuesto monofuncional, $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2$ **37**, a los dendrímeros, se produce un ligero desplazamiento de las señales campo alto,

probablemente debido a la presencia del esqueleto carbosilano. En cuanto a las señales correspondientes al grupo funcional, no hay apenas diferencias con las comentadas para el compuesto monofuncional.



Grupo	n=1, m=4 (38)	n=2, m=8 (39)	n=3, m=16 (40)
COOMe	173.0	173.0	173.0
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	57.5	57.5	57.5
OMe	51.5	51.5	51.5
NCH ₂ CH ₂ COOMe	49.3	49.2	49.2
NCH ₂ CH ₂ COOMe	32.4	32.5	32.5
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	21.6	21.5	21.5
Si(CH ₂) ₃ Si	20.3, 18.5, 18.0	20.1 - 17.7	20.1-17.9
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	13.0	12.8	12.8
SiMe ₂	-3.3	-3.3	-3.3
SiMe		-5.0	-5.0

Tabla IV.3. Datos de ¹³C-RMN para los dendrímeros **38-40** en CDCl₃.

Del mismo modo que ocurre con los datos de ¹H-RMN, los de ¹³C-RMN son muy similares a los descritos para el compuesto monofuncional **37**. Con respecto a las señales correspondientes al esqueleto carbosilano son casi idénticas, de nuevo con la particularidad de que se van ensanchando a medida que aumenta la generación.

En la Figura IV.6., se muestra a modo de ejemplo, el espectro de ¹H -RMN del dendrímero de segunda generación G₂-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COOMe)₂]₈ **39**.

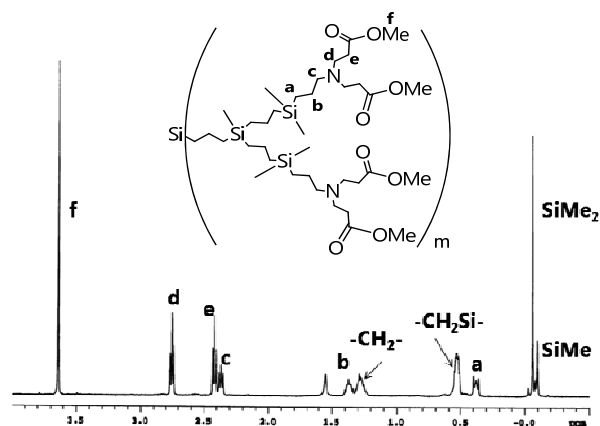


Figura IV.6. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ para el dendrímico **39** registrado en CDCl_3 .

La asignación de estas señales se ha corroborado teniendo en cuenta los datos obtenidos de los experimentos bidimensionales gHMBC- $\{^1\text{H-}^{13}\text{C}\}$ y gHMQC- $\{^1\text{H-}^{13}\text{C}\}$. En la Figura IV.7., se muestra el espectro gHMQC- $\{^1\text{H-}^{13}\text{C}\}$ del dendrímico **39** en el cual se puede observar de una forma sencilla la correlación existente entre cada protón y su carbono correspondiente. Además, se adjunta una ampliación de la zona entre 2 y 3 ppm del espectro gHMBC- $\{^1\text{H-}^{13}\text{C}\}$ (ver Figura IV.4. **B**), donde se puede ver la relación de Hc con Ca, Cb y Cd y la relación entre He y Cd. No se observa el pico cruzado entre Cc y He ya que están a cuatro enlaces de distancia.

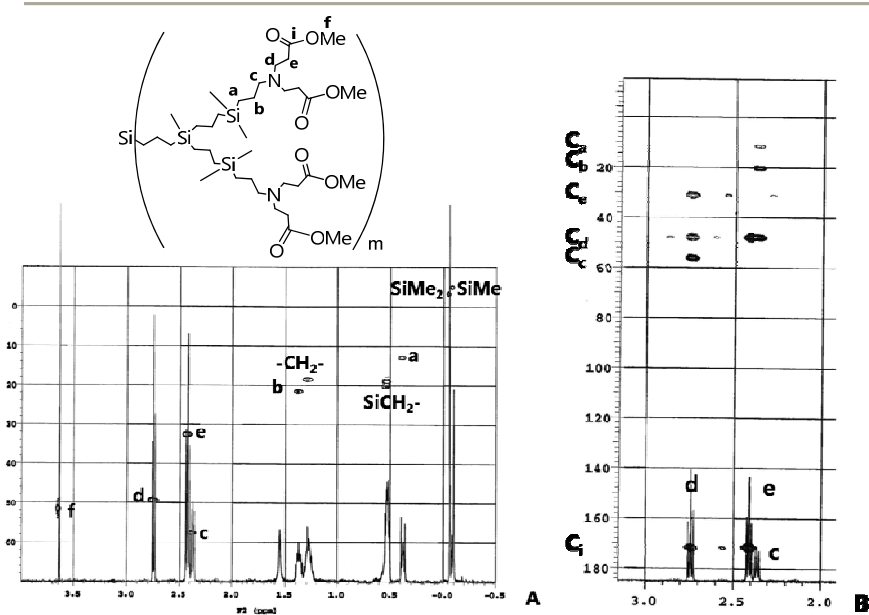


Figura IV.7. (A) $g\text{HMQC-}\{{}^1\text{H-}{}^{13}\text{C}\}$ y (B) ampliación de $g\text{HMBC-}\{{}^1\text{H-}{}^{13}\text{C}\}$ para el compuesto **39**.

Los datos obtenidos por $g\text{HMBC-}\{{}^1\text{H-}{}^{29}\text{Si}\}$, para los dendrimeros de primera, segunda y tercera generación muestran los átomos de silicio más externos del mismo modo que ocurre con todos los dendrimeros que se han preparado hasta ahora en este trabajo. Así, es posible observar para las tres generaciones una señal en torno a δ 1.9 que se asigna al átomo de silicio más externo ya que está relacionada con los protones metilénicos del grupo SiMe_2 , mientras que la señal que aparece en torno a δ 0.8 se relaciona con los protones del grupo SiMe . En la Figura IV.8., se muestra el espectro de ${}^{29}\text{Si}$ del dendrimer de tercera generación **40**.

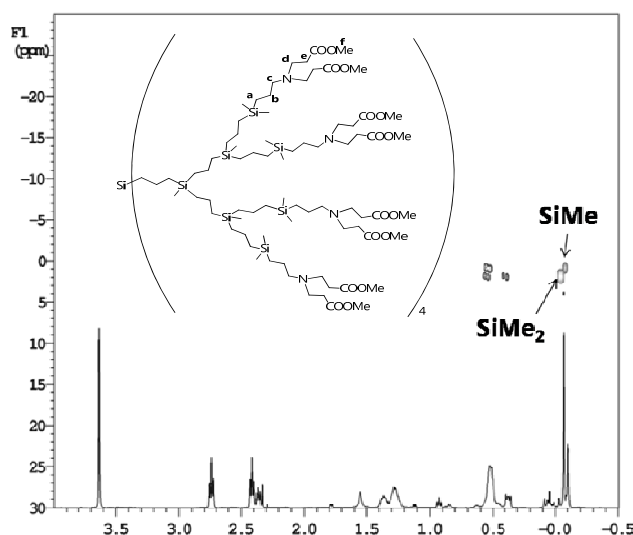


Figura IV.8. Espectro bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ para el dendrímoro **40**.

b) Cromatografía de permeabilización en gel.

Los tres dendrímeros se han sometido a cromatografía de permeabilización en gel (GPC) con el fin de obtener una idea de la polidispersidad en comparación con un patrón de poliestireno. En la Tabla IV.4., se observa que en los tres casos los resultados demuestran que estos sistemas son monodispersos, si bien el que mejores resultados proporciona es el compuesto de primera generación **38**, hecho que se puede deber a que a medida que el dendrímoro aumenta de tamaño se van produciendo defectos en la estructura que hacen que este se aleje de la monodispersidad ideal.

Dendrímoro	PDI (exp)
$\text{G}_1\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_4$ (38)	1.04
$\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_8$ (39)	1.30
$\text{G}_3\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_{16}$ (40)	1.30

Tabla IV.4. Polidispersidades de los dendrímeros **38-40** con respecto a poliestireno.

En la Figura IV.9., se muestra como ejemplo el cromatograma de GPC del dendrímero de primera generación G_1 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_4$ **38**, en el que se puede observar que la muestra es prácticamente monodispersa, ya que se observa un único pico bien definido localizado dentro de la recta patrón que proporciona el poliestireno.

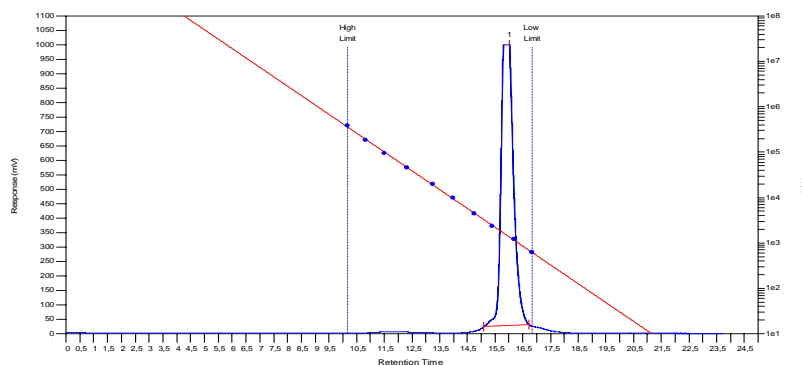


Figura IV.9. Cromatograma de permeabilización en gel para el dendrímero **38**.

c) Espectroscopía de masas.

En el espectro de masas Maldi-TOF es posible observar el pico molecular de las especies **38** y **39**, sin embargo no ha sido posible detectarlo en el dendrímero de tercera generación **40**, debido posiblemente a que la ionización es más difícil en esta molécula de mayor tamaño que las otras dos. En la Figura IV.10., se muestra, a modo de ejemplo, el ión molecular obtenido por Maldi-TOF del dendrímero de segunda generación G_2 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_8$ **39**.

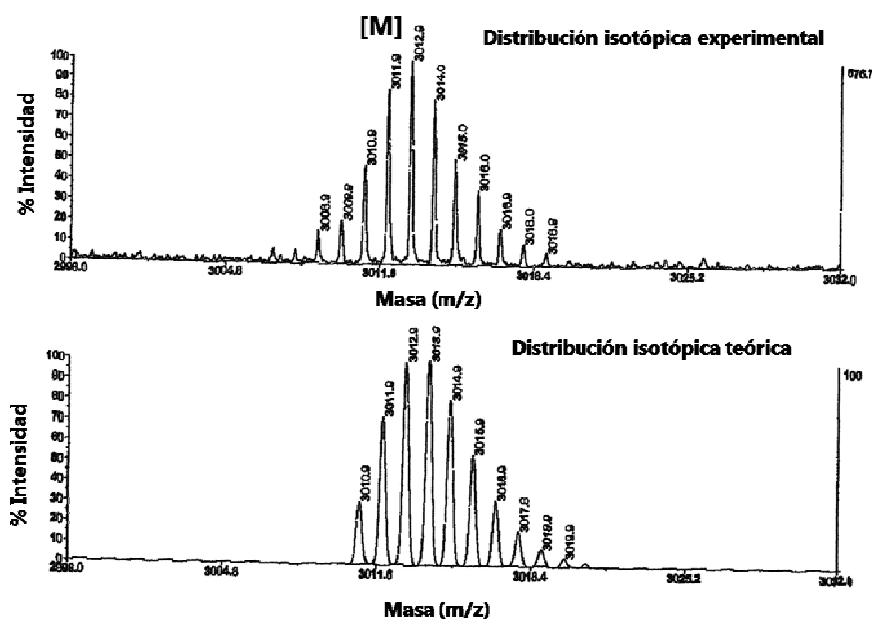


Figura IV.10. *Maldi-TOF para el dendrímico 39.*

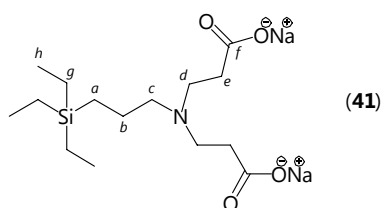
En el espectro Maldi-TOF, se observa en la distribución isotópica experimental la presencia de la especie [M].

IV.2.2.2.2. *Dendrímicos con grupos carboxilato en la superficie.*

Los datos espectroscópicos corroboran las estructuras propuestas en la Figura IV.4. para estas especies. Además se ha llevado a cabo una valoración potenciométrica para determinar el carácter ácido-base de las mismas.

a) *Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.*

Los datos de ^1H y ^{13}C -RMN para el compuesto $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2$ **41**, se encuentran recogidos en la Tabla IV.5.



Grupo	¹ H-RMN ppm	Grupo	¹³ C-RMN ppm
NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	2.47	NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	180.3
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	2.16	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	55.7
NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	2.07	NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	48.5
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.22	NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	33.1
CH ₃ CH ₂ Si	0.67	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	19.2
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.26	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	7.6
y		CH ₃ CH ₂ Si	6.1
CH ₃ CH ₂ Si		CH ₃ CH ₂ Si	1.9

Tabla IV.5. Datos de ¹H y ¹³C-RMN para el compuesto **41** en D₂O.

En el espectro de ¹H-RMN en D₂O del compuesto **41** se observa que, como consecuencia de la adición de NaOH al compuesto **37**, el singlete correspondiente al grupo metóxido ya no aparece. También cabe destacar que se resuelven mejor las señales correspondientes a los protones metilénicos *c*, *d* y *e*, que ahora aparecen como tres multipletes a δ 2.16 y 2.47 y 2.07, respectivamente. En cuanto al espectro de ¹³C-RMN de este compuesto **41**, es posible observar, como era de esperar, que la señal correspondiente al carbono del grupo metóxido, que en el compuesto **37** aparecía a δ 51.4, ahora ha desaparecido. El resto de señales son muy similares a las ya descritas para el compuesto neutro **37**. Como ejemplo, en la Figura IV.11., se muestran los espectros de ¹H y ¹³C-RMN en D₂O para el compuesto **41**.

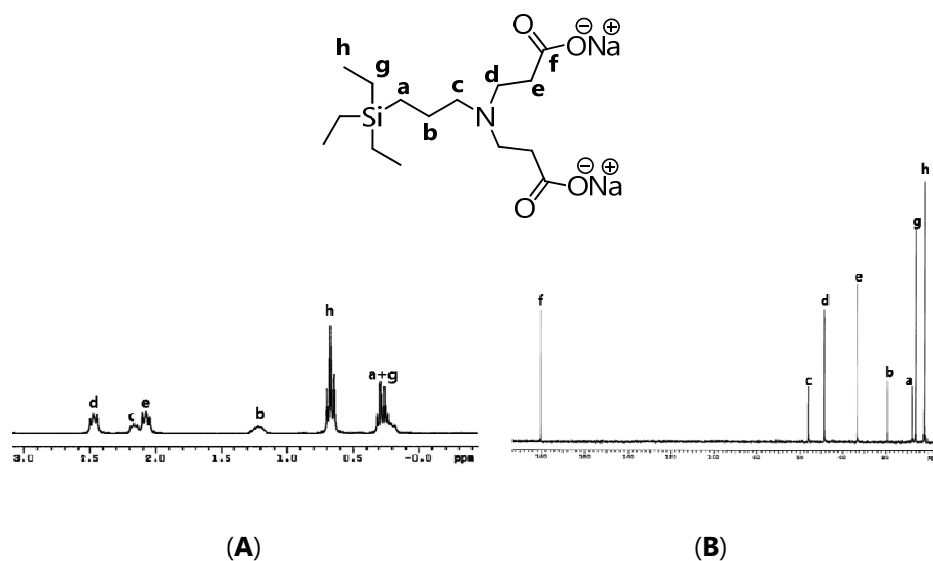
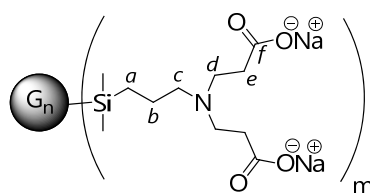


Figura IV.11. Espectros de (A) ^1H y (B) ^{13}C -RMN en D_2O para el compuesto **41**.

Una vez asignadas las señales del compuesto monofuncional **41**, la asignación de las señales para los miembros de las familias de dendrímeros correspondientes, es relativamente sencilla y se detalla a continuación.

Los espectros de los dendrímeros aniónicos con grupos carboxilato terminales $\text{G}_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_m$, donde $n=1$, $m=4$ (**42**); $n=2$, $m=8$ (**43**) y $n=3$, $m=16$ (**44**) han sido registrados en D_2O , disolvente en el cual las señales tienden a ser más anchas que en otros disolventes orgánicos, como ya se comentó en el Capítulo II de esta memoria.

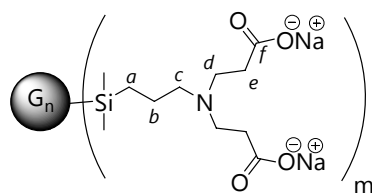
Los datos más significativos de ^1H y ^{13}C -RMN para estos compuestos, se encuentran recogidos en las Tablas IV.6. y IV.7.



Grupo	n=1, m=4 (42)	n=2, m=8 (43)	n=3, m=16 (44)
NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	2.57	2.61	2.54
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	2.27	2.31	2.22
NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	2.16	2.17	2.14
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.28	1.31	1.20
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	1.21	1.20	
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.43	0.42	0.42
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.27	0.26	0.25
SiMe ₂	-0.20	-0.17	-0.17
SiMe		-0.21	-0.25

Tabla IV.6. Datos de ¹H-RMN en D₂O para los dendrimeros 42-44.

Al pasar del compuesto monofuncional a los dendrimeros, se produce un desplazamiento de las señales a valores mayores de frecuencia debido al esqueleto carbosilano igual que ocurría con los dendrimeros con grupos éster terminales; pero en esencia las señales del grupo funcional aparecen en la zona esperada, es decir, entre δ 1.20 y 2.61. En cuanto a las señales correspondientes al esqueleto carbosilano, tanto en ¹H como en ¹³C-RMN (Tabla IV.7.), son las esperadas y son prácticamente idénticas para las tres generaciones, con el consiguiente ensanchamiento al aumentar la generación.



Grupo	n=1, m=4 (42)	n=2, m=8 (43)	n=3, m=16 (44)
NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	179.9	180.5	181.2
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	55.3	56.8	57.1
NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	48.6	49.7	49.6
NCH ₂ CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	32.7	33.7	34.3
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	19.0	19.9	20.3
Si(CH ₂) ₃ Si	18.4, 17.5, 15.9	19.3-17.9	19.5-18.0
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	11.4	12.7	13.0
SiMe ₂	-4.8	-3.4	-3.4
SiMe		-4.4	-4.5

Tabla IV.7. Datos de ¹³C-RMN en D₂O para los dendrímeros 42-44.

En la Figura IV.12., se muestran, a modo de ejemplo el espectro de ¹H-RMN del dendrímero de primera generación G₁-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]₄ 42.

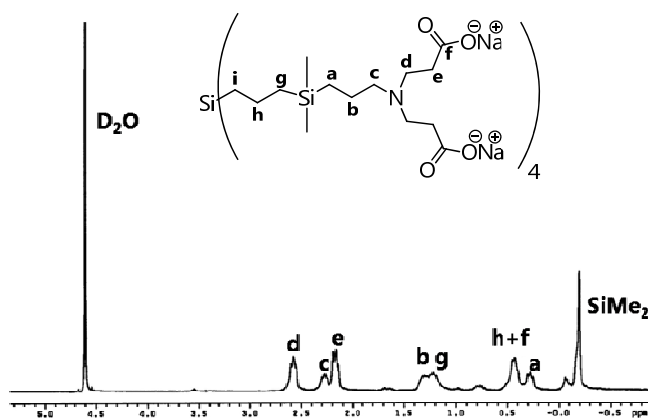


Figura IV.12. ¹H-RMN del dendrímero G₁-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]₄ 42 en D₂O.

Para llevar a cabo una asignación precisa de los protones de este compuesto y distinguir los protones metilénicos *d* y *e* (ver figura adjunta a la Tabla IV.5. ó IV.6.), se han realizado experimentos bidimensionales gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ y gHMBC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ en D_2O . En el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ del dendrímero de primera generación **42** (ver Figura IV.13.), es posible observar que para los protones que aparecen a δ 2.57, aparecen picos cruzados con los carbonos: *C_d* ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$) a δ 48.6, *C_f* ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$) a δ 179.9, *C_c* ($\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$) a δ 55.3 y *C_e* ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$) a δ 32.7. Esta correlación parece indicar que los protones que aparecen a δ 2.57 son los del grupo metileno *d*. La asignación se comprueba por la presencia de picos cruzados entre los protones que aparecen a δ 2.16 y los carbonos *C_f* ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$) a δ 179.9 y *C_d* ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+$) a δ 48.6, lo que parece concordar con la asignación de estos protones al grupo metileno *e*.

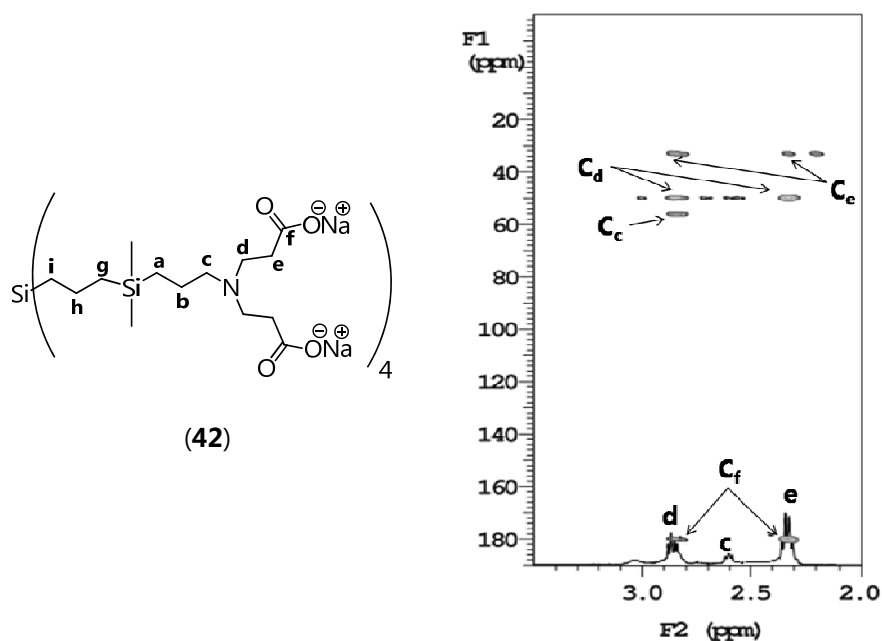


Figura IV.13. Experimento gHMBC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ para el dendrímero de primera generación **42**.

En el espectro de gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para estos compuestos se observa una señal en torno a δ -325 como consecuencia de la interacción entre el átomo de nitrógeno y los protones metilénicos He ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2$), lo que nos confirma que la interacción con los protones situados en posición β al N es más fuerte que con los situados en posición α . En la Figura IV.14., se muestra a modo de ejemplo el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para el dendrímero de primera generación G_1 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_4$ **42**.

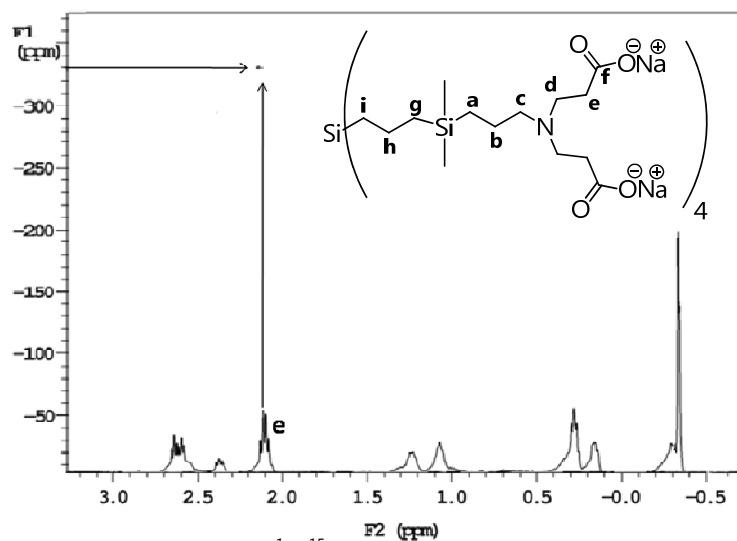


Figura IV.14. Espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para el dendrímero de primera generación **42**.

La asignación de los átomos de silicio se ha hecho mediante experimentos gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$. Como viene ocurriendo a lo largo de este trabajo, sólo es posible observar los átomos de silicio más externos. Así, es posible observar en los espectros de las tres especies señales en torno a δ 1.9, que se relacionan con los grupos SiMe_2 , mientras que las señales que aparecen en torno a δ 1.2 se relacionan con los protones metilénicos del grupo SiMe . En la Figura IV.15., se muestra como ejemplo el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ para el dendrímero G_2 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_8$ **43**.

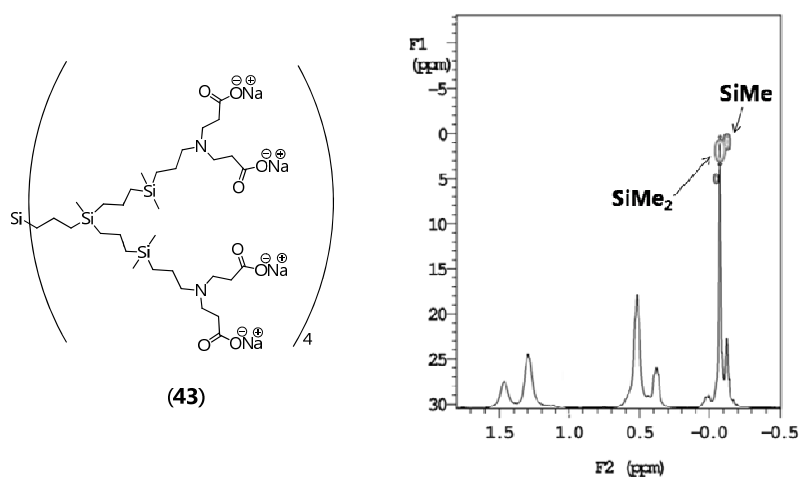


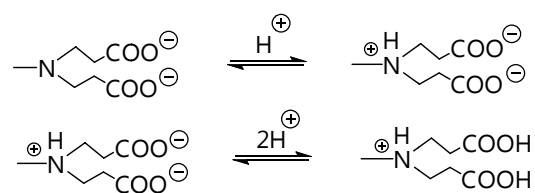
Figura IV.15. Espectro gHMBC- ^1H - ^{29}Si para el dendrímero de segunda generación **43**.

b) Comportamiento ácido base de los dendrímeros **42-44**.

Con el fin de obtener información acerca de nuestros dendrímeros aniónicos a la hora de ser aplicados en procesos biológicos, donde el pH es un factor determinante, nos propusimos estudiar el comportamiento ácido-base de estos sistemas, utilizando técnicas analíticas, en especial mediante valoración potenciométrica ácido-base y RMN.

b.1.) Valoración potenciométrica ácido-base.

En el Esquema IV.15., se representan los equilibrios ácido-base que estas especies aniónicas con grupos amino y carboxilato en la periferia, pueden experimentar en medio acuoso.



Esquema IV.15. Equilibrio ácido-base de especies carboxilato

La valoración ácido-base se ha realizado partiendo de las especies aniónicas $G_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_m$ **42-44**. Ésta se ha llevado a cabo con HCl mediante el método potenciométrico de pHmetría. En la Figura IV.16., se muestran las curvas de valoración de los dendrímeros $G_1\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_8$ **42**, $G_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_{16}$ **43** y $G_3\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_{32}$ **44**.

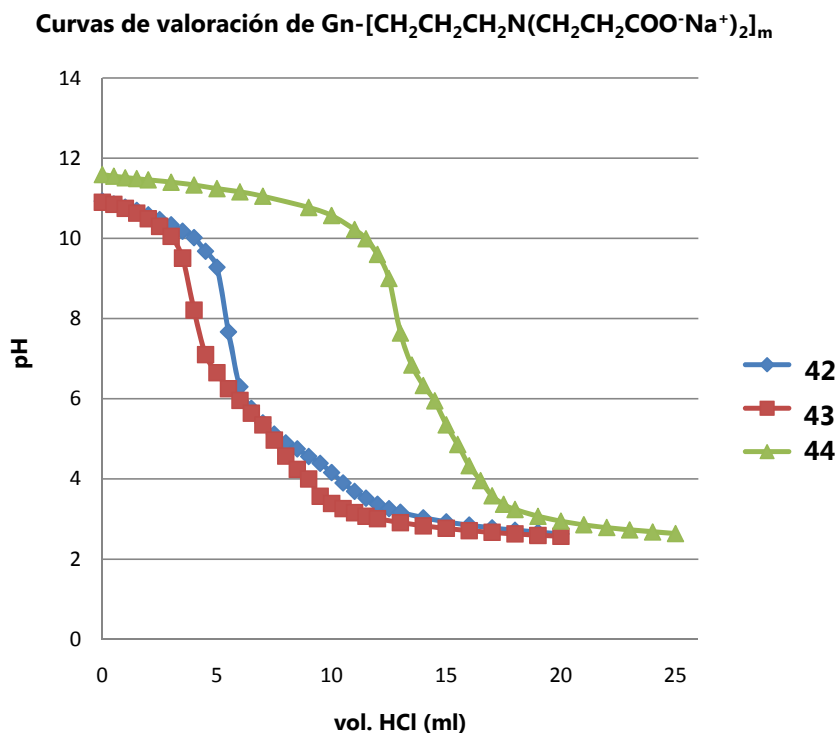


Figura IV.16. Curvas de valoración de los dendrímeros **42-44** con HCl.

Se parte de un pH inicial de en torno a 11 para las tres especies. En esta gráfica se aprecian dos puntos finales para las curvas de valoración de los tres compuestos, no obstante, con el fin de observar estos puntos de inflexión de una forma más clara, en la Figura IV.17. se muestra la primera derivada de la

curva de valoración del dendrímero de primera generación G₁-
 $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_8$ **42**.

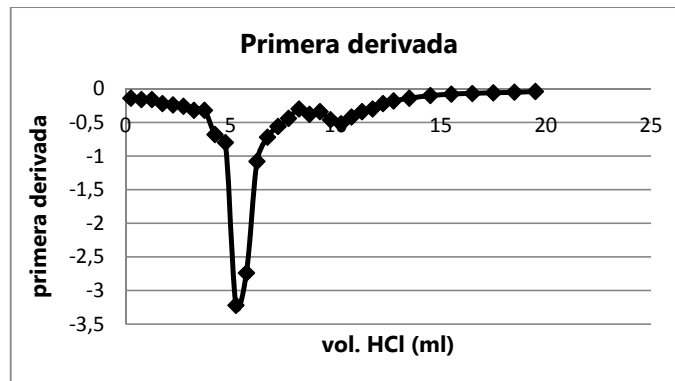


Figura IV.17. Primera derivada de la curva de valoración del compuesto **42**.

En esta gráfica el primer punto de inflexión se corresponde con la protonación del grupo amino y el segundo con la del grupo carboxilo.

Una vez obtenidas las curvas de valoración, el cálculo del valor de pKa es sencillo a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

$$pH = pKa + \log [B]/[HB]$$

En la Tabla IV.8., se representan los datos de pKa para los grupos amino y carboxilo.

G_n-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]_m							
Amino			Carboxilo				
	pKa	Ka		pKa	Ka		
G₁	10,4	10 ^{-10,4}	↓ basicidad	G₁	5	10 ⁻⁵	↑ acidez
G₂	10,7	10 ^{-10,7}		G₂	5,64	10 ^{-5,6}	
G₃	11,2	10 ^{-11,2}		G₃	6,6	10 ^{-6,6}	

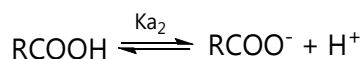
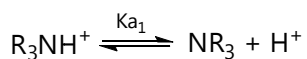


Tabla IV.8. Datos de pKa para los dendrímeros G_n-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]_m

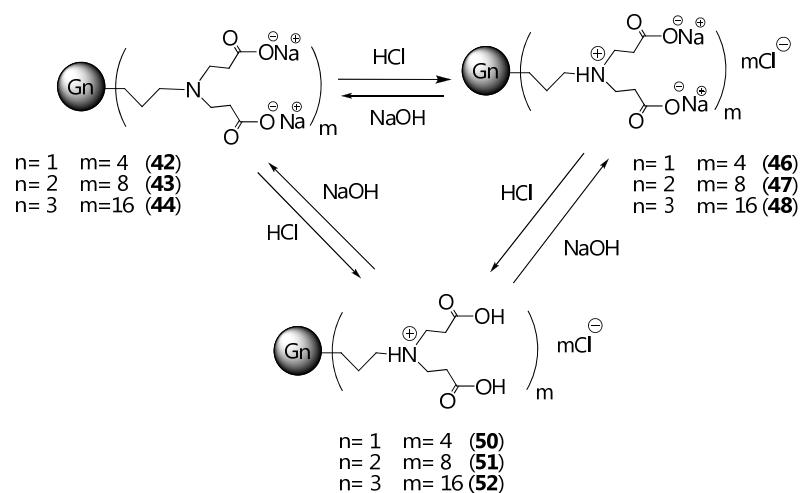
42-44.

Según los datos obtenidos se puede decir que existe un efecto dendrítico en la variación de la basicidad del grupo amino, ya que al aumentar la generación aumenta la basicidad de este grupo. En cuanto al grupo carboxilo, ocurre algo similar, al aumentar la generación disminuye la acidez.

Los valores de pKa encontrados para este tipo de compuestos son parecidos a los publicados para dendrímeros PPI funcionalizados con grupos carboxilato.^[15] En este estudio se determinó que el valor de pKa para el grupo amino se encuentra en torno a 10.4 y el del grupo carboxilo en torno a 4.40.

Esta valoración ácido-base de los dendrímeros carboxilano con grupos carboxilato terminales, permite intuir que las especies que existirán en

disolución acuosa, en los diferentes equilibrios, son las que se muestran en el Esquema IV.16.



Esquema IV.16. Especies existentes en disolución acuosa.

A pH fisiológico, según los valores de pKa obtenidos en este estudio, las especies predominantes serán las que contienen el nitrógeno protonado y el grupo carboxilo en forma de sal sódica (**46-48**).

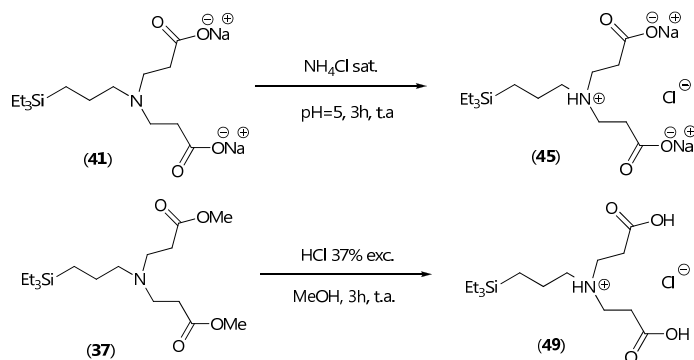
b.2.) Caracterización estructural de los compuestos **45-48** y **49-52**.

Para poder caracterizar las especies que se han detectado en disolución acuosa mediante valoración potenciométrica, ha sido necesario sintetizarlas y aislarlas.

b.2.1.) Estudio preparativo.

- Se ha sintetizado la especie monofuncional $[\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2 \text{Cl}^-]$ **45**, a partir de una disolución saturada de NH_4Cl sobre la que se añade el compuesto **41** ($(\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2$) (ver Esquema IV.17.). La utilización de

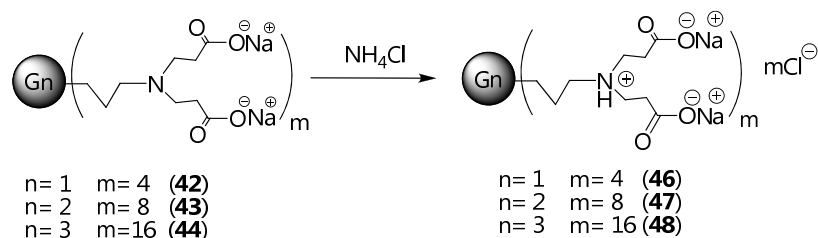
una disolución de NH_4Cl se debe a que en estas condiciones se obtiene un $\text{pH} \approx 5$, al cual es posible protonar el grupo amino sin protonar el carboxilo. El compuesto $[\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2 \text{Cl}^-]$ **49**, se sintetiza a partir de una disolución en MeOH del compuesto **37** ($\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2$) y de un exceso de HCl al 37%. De este modo se aíslan los compuestos monofuncionales **45** y **49**, como sólidos blancos con un rendimiento del 56 y 94%, respectivamente.



Esquema IV.17. Esquema de síntesis de los compuestos monofuncionales **45** y **49**.

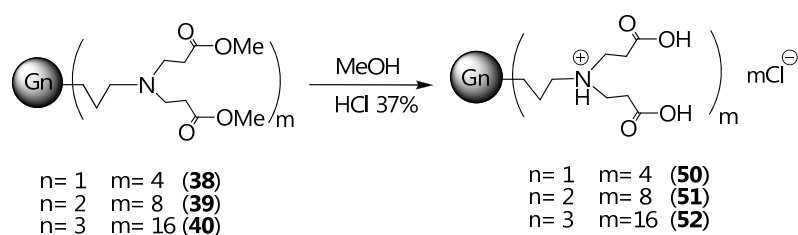
- Los compuestos $\text{G}_n\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_m \text{mCl}^-\}$, donde $n=1$, $m=4$ (**46**); $n=2$, $m=8$ (**47**) y $n=3$, $m=16$ (**48**), fueron preparados de un modo similar al descrito para el compuesto **45**. Partiendo de una disolución saturada de NH_4Cl a la cual se le añaden los dendrímeros $\text{G}_n\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_m \text{mCl}^-\}$ (**42-44**). Tras agitar a temperatura ambiente durante 2 horas y evaporar el disolvente a presión reducida, se lleva a cabo una extracción del residuo sólido con una disolución de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, en proporciones 60:40, 50:50 y 40:60 para los compuestos de primera, segunda y tercera generación, respectivamente. El aumento de la proporción de MeOH se debe a que al ir aumentando el tamaño del dendrímero también lo hace el número de grupos iónicos, con lo que la solubilidad en disolventes halogenados

va disminuyendo. De este modo se aíslan los dendrímeros G_n - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_m$ **46-48**, como sólidos de color blanco en bajos rendimientos (Esquema IV.18.).



Esquema IV.18. Síntesis de los dendrímeros **46-48**.

• conocidas las condiciones de reacción para la síntesis del compuesto **49**, se prepararon los dendrímeros G_n - $\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2]_m \text{Cl}^-\}$, donde $n=1$, $m=4$ (**50**); $n=2$, $m=8$ (**51**) y $n=3$, $m=16$ (**52**), a partir de una disolución en metanol de los dendrímeros neutros G_n - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2]_m$ **38-40** y un exceso de HCl al 37%. Tras agitar durante 3 horas a temperatura ambiente, evaporar el disolvente y los componentes volátiles a vacío y lavar el residuo resultante con éter frío, se aíslan los compuestos **50-52** como sólidos blancos con elevados rendimientos (Esquema IV.19.).



Esquema IV.19. Síntesis de los dendrímeros **50-52**.

Todos los compuestos que han sido descritos son estables térmicamente y solubles en disolventes próticos como el agua.

b.1.2.) Estudio estructural por espectroscopía de RMN.

La asignación de las señales de RMN de los componentes de cada familia, se ha realizado mediante un estudio conjunto de los compuestos $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2$ **41**, $[\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2 \text{Cl}^-]$ **45** y $[\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2 \text{Cl}^-]$ **49**. Las señales de ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{29}Si -RMN han sido asignadas mediante la realización de estudios bidimensionales gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$, gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ y gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$, en especial del compuesto **49**. En la Figura IV.18., se muestran los espectros de ^1H -RMN registrados en D_2O de los compuestos **41**, **45** y **49**.

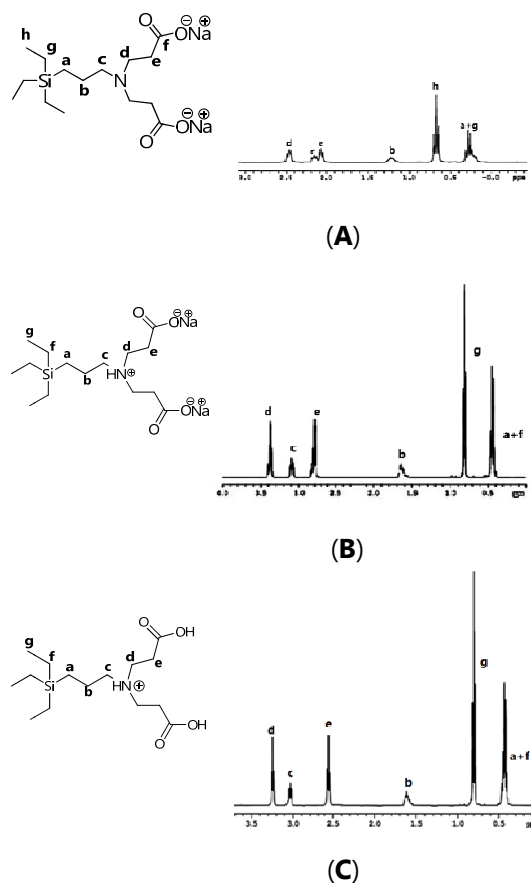


Figura IV.18. Espectros de ^1H -RMN en D_2O de los compuestos (A) **41**, (B) **45** y (C) **49**.

De la observación de los datos de ^1H -RMN de las tres especies (ver asignación detallada en la parte experimental de este trabajo), se deduce que la protonación sobre el grupo amino, produce un cambio drástico en los desplazamientos de los protones metilénicos más externos (Hc, Hd y He), al pasar de la especie **41** a la **45**. Sin embargo, este cambio no es tan acusado cuando se produce la protonación de los grupos carboxilato (al pasar del compuesto **45** al **49**) para los protones Hd y Hc, pero se observa un

desplazamiento del He a menor valor de frecuencia (aproximadamente -0.2 ppm) cuando se produce la protonación del grupo carboxilo.

Estos efectos los sufre, aunque en menor medida, el grupo metileno (*b*), ver asignación en la Figura IV.18., el cual se desplaza aproximadamente 0.4 ppm al pasar de la especie carboxilato **41** a las otras dos (**45** y **49**). En el espectro de ^{13}C -RMN (detallado en el capítulo dedicado a la parte experimental), de nuevo se observa un desplazamiento más pronunciado para los carbonos metilénicos Cc, Cd y Ce.

Para las especies **45** y **49**, se ha realizado el experimento bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$. A modo de ejemplo, en la Figura IV.19., se muestra el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ de la especie **49**.

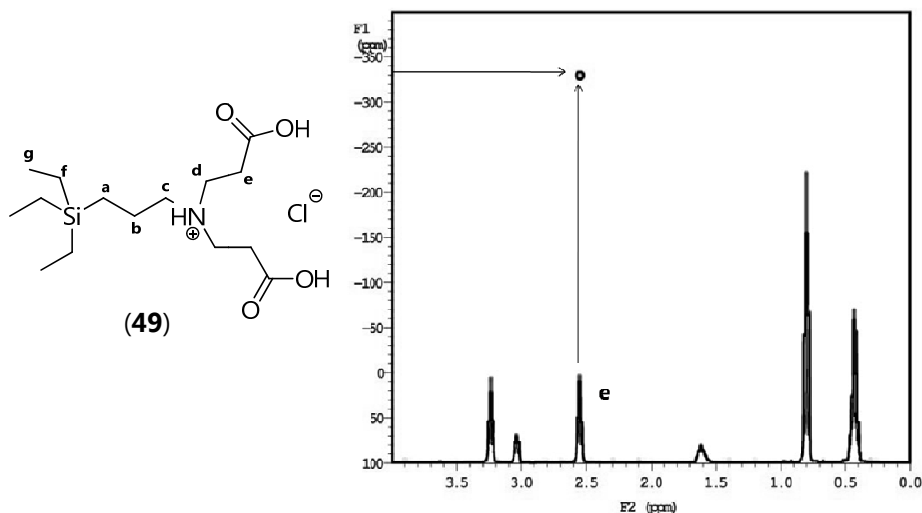


Figura IV.19. Experimento gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para el compuesto **49**.

En estos espectros es posible apreciar una única señal localizada a δ -330.0 y a δ -325.5, para los compuestos **45** y **49**, respectivamente, que se corresponde con la interacción entre el átomo de nitrógeno y los protones

metilénicos He. Sorprendentemente, para el compuesto **41**, esta señal aparece a -325.

En el espectro bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ del compuesto $[\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2 \text{Cl}^-]$ **49**, es posible observar a δ 7.0 las señales correspondientes a la interacción entre el átomo de silicio y los protones metilénicos del fragmento etilo, ver Figura IV.20.

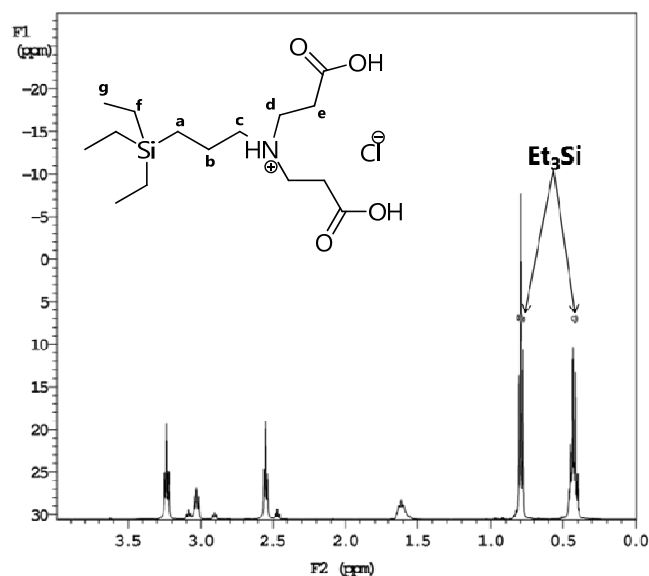


Figura IV.20. Espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ para el compuesto **49**.

Una vez descritas las especies monofuncionales, es sencillo llevar a cabo la asignación de los dendrímeros $\text{G}_n\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_m \text{mCl}^- \}$ **46-48** y $\text{G}_n\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2]_m \text{mCl}^- \}$ **50-52**.

En la Figura IV.21., se muestran, modo de ejemplo las estructuras propuestas para los dendrímeros de segunda generación $\text{G}_2\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_8 \text{8Cl}^- \}$ **47** y $\text{G}_2\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2]_8 \text{8Cl}^- \}$ **51**.

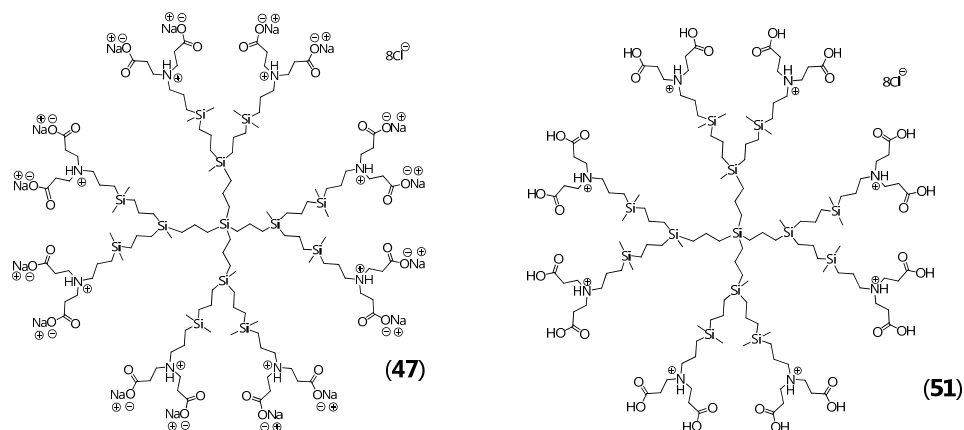


Figura IV.21. Estructuras propuestas para los dendrímeros **47** y **51**.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales correspondientes al grupo funcional son las esperadas según la asignación de los compuestos **45** y **49**. Los datos de ^{13}C -RMN son los esperados según la asignación llevada a cabo sobre los compuestos monofuncionales. No hay variación entre los datos de ^{13}C -RMN para el grupo funcional de los dendrímeros **46-48** y **50-52**. En cuanto a las señales que caracterizan al esqueleto carbosilano son también las que se esperaban y, a medida que aumenta la generación, las señales se resuelven peor.

En la Figura IV.22., se muestran a modo de ejemplo los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN del dendrímico de segunda generación G_2 - $\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_8, 8\text{Cl}^-\}$ **47**.

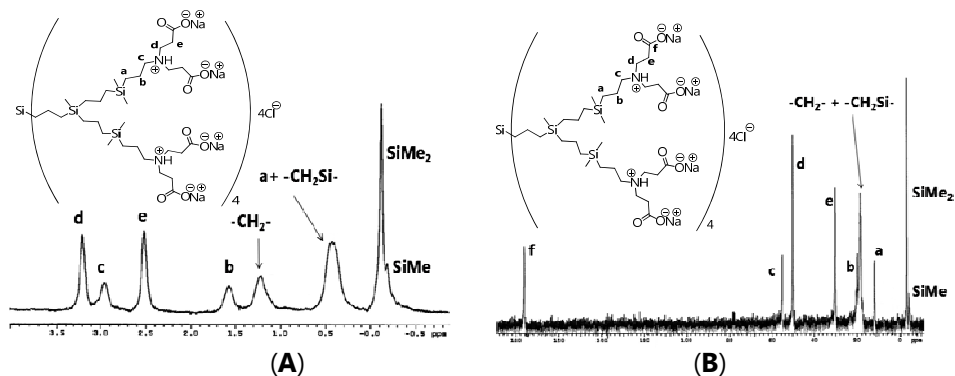


Figura IV.22. (A) ^1H y (B) ^{13}C -RMN del dendrimero **47**.

La asignación del átomo de nitrógeno se ha llevado a cabo mediante gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ (ver Figura IV.23.), para los dendrimeros de primera generación $\text{G}_1\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_4 \text{4Cl}^{\ominus}\}$ **46** y $\text{G}_1\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2]_4 \text{4Cl}^{\ominus}\}$ **50**. Para estos compuestos es posible asignar las señales que aparecen a δ -328 y a δ -325, respectivamente, al nitrógeno cuaternizado, ya que se observa el acoplamiento con los protones metilénicos del grupo e (ver asignación en la Figura IV.20.), al igual que ocurría con las especies monofuncionales **45** y **49**.

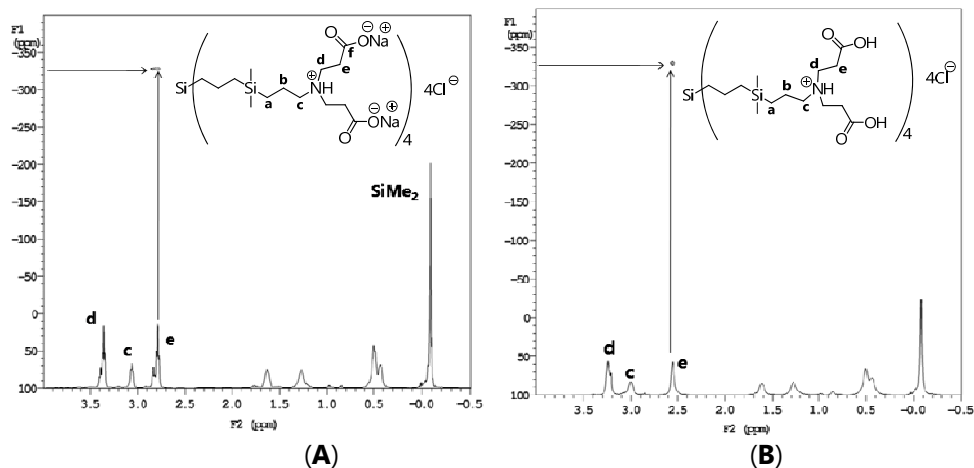


Figura IV.23. Espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para el dendrimer (A) **46** y (B) **50**.

En los espectros gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ de los dendrímeros G_n - $\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_m \text{mCl}^-\}$ **46-48**, sólo es posible observar los picos cruzados entre los protones metilénicos del grupo SiMe_2 y el átomo de silicio que aparece en torno a δ 2.3. En la Figura IV.24., se muestra, a modo de ejemplo, el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$, para el dendrímero de primera generación G_1 - $\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_4 \text{4Cl}^-\}$ **46**.

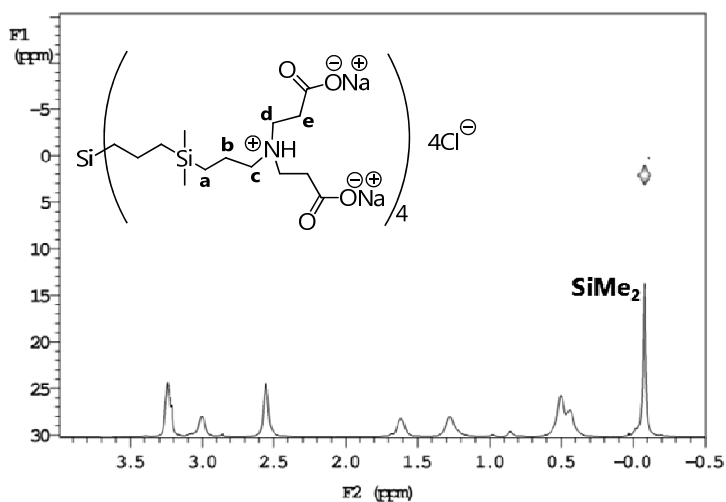


Figura IV.24. Espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ para el dendrímero **46**.

En cuanto a las señales correspondientes a los átomos de silicio, en el espectro de gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$, para los dendrímeros G_n - $\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2]_m \text{mCl}^-\}$ **50-52**, se observan las señales correspondientes a los átomos de silicio más externos. Así las señales que aparecen en torno a δ 2.2 para las tres generaciones, se relacionan con los protones metilénicos del grupo SiMe_2 , mientras que las correspondientes al grupo SiMe aparecen en torno a δ 1.1. En la Figura IV.25., se muestra como ejemplo ilustrativo el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ para el dendrímero de segunda generación G_2 - $\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_2]_8 \text{8Cl}^-\}$, **51**.

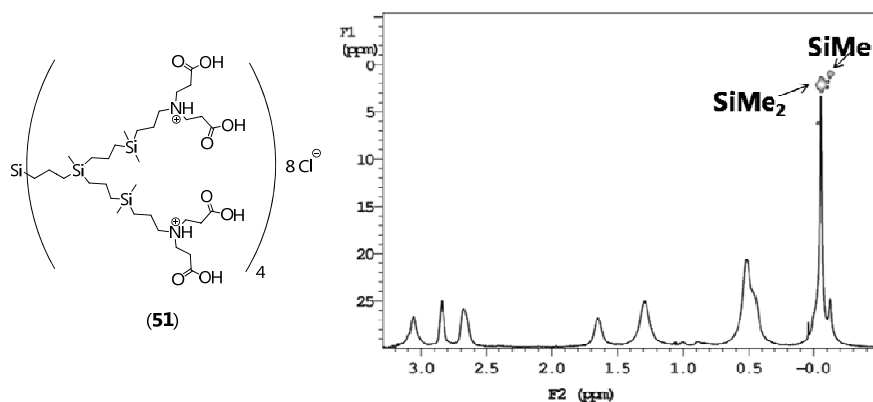


Figura IV.25. Espectro $gHMBC-{}^1H-{}^{29}Si$ para el dendrímero **51**.

Según los datos de análisis elemental, los derivados **45-48** podrían existir como especies zwitterionicas, en las que se perdería una molécula de NaCl. Una posibilidad es que el protón unido al átomo de nitrógeno pasaría a estabilizar la estructura formando puente entre éste y los átomos de oxígeno.

IV.2.3. Dendrimeros con grupos sulfonato en la periferia.

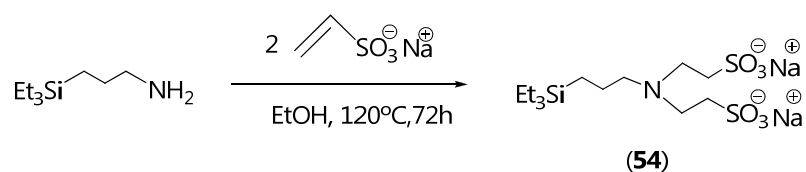
En un primer intento de obtener este tipo de dendrímeros, se sintetizó la alilamina $CH_2=CHCH_2N(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)_2$ **53**, (cuya síntesis se detalla en el capítulo dedicado a la parte experimental de este trabajo), con el fin de obtener una nueva familia de compuestos a través de la reacción de hidrosililación de ésta con los dendrímeros precursores G_n-H_m descritos en bibliografía.^[16]

No obstante los intentos de obtener los dendrímeros a través de este método resultaron infructuosos, por lo que se decidió desarrollar otra estrategia de síntesis basada en una reacción de Adición de Michael.

Los dendrímeros con grupos sulfonato que se describen en este apartado, se han preparado a partir de dendrímeros precursores que contienen grupos -NH_2 terminales.

IV.2.3.1. Estudio preparativo.

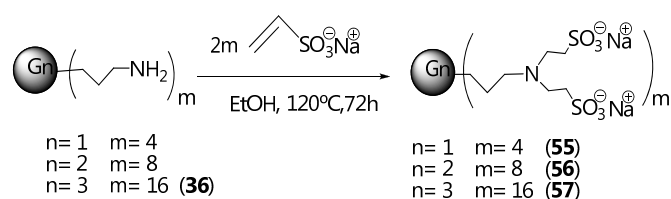
Tal y como se ha hecho con todos los compuestos descritos en este trabajo, se ha sintetizado, en primer lugar, el compuesto G_0 , $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2$ **54**, con el fin de obtener las condiciones de reacción y de llevar a cabo sobre él un estudio estructural que pueda ser trasladado a los componentes de la familia de dendrímeros, ver Esquema IV.20.



Esquema IV.20. Síntesis del compuesto $\text{Et}_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2$ **54**.

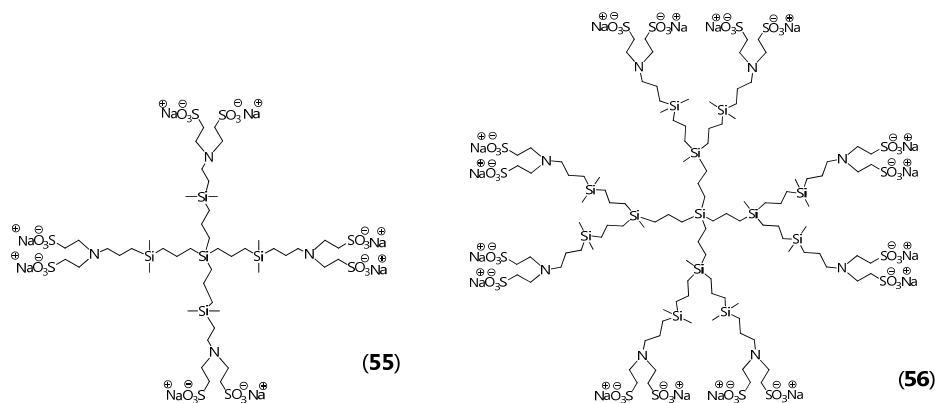
Tal y como se puede apreciar en el Esquema IV.19., el compuesto **54** se sintetiza a partir de la trietilsililpropanamina disuelta en etanol, a la cual se le añade la cantidad estequiométrica de vinilsulfonato sódico, $\text{CH}_2=\text{CHSO}_3\text{Na}$ (30% wt. en H_2O). Tras tres días de agitación constante a 120°C , el residuo sólido se lava con MeOH, así se aísla el compuesto **54** como un sólido blanco muy soluble en agua y con un rendimiento del 65%. Una vez obtenidas las condiciones de reacción de este compuesto, se procedió a llevar a cabo la síntesis de los dendrímeros $G_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_m$, donde $n=1$, $m=4$ (**55**); $n=2$, $m=8$ (**56**) y $n=3$, $m=16$ (**57**). Para ello se parte de una disolución

en EtOH de los dendrimeros precursores G_n -[CH₂CH₂CH₂NH₂]_m, (n=1, m=4; n=2, m=8)^[13] y , n=3, m=16 (**36**), sobre la que se añade CH₂=CHSO₃Na (30% wt. en H₂O). La mezcla de reacción se mantiene a 120°C con agitación constante durante 72 horas. Los productos obtenidos de esta manera se purifican lavando con MeOH. De este modo se aíslan los compuestos **55-57** como sólidos blancos con elevados rendimientos. Esta nueva familia de dendrimeros posee una solubilidad en agua superior a 100 mg/ml, dato a tener en cuenta desde el punto de vista biomédico. En el Esquema IV.21., se muestra la síntesis de estos compuestos.



Esquema IV.21. Síntesis de dendrimeros con grupos sulfonato en la periferia.

En la Figura IV.26., se muestran las estructuras propuestas para esta nueva familia de compuestos.



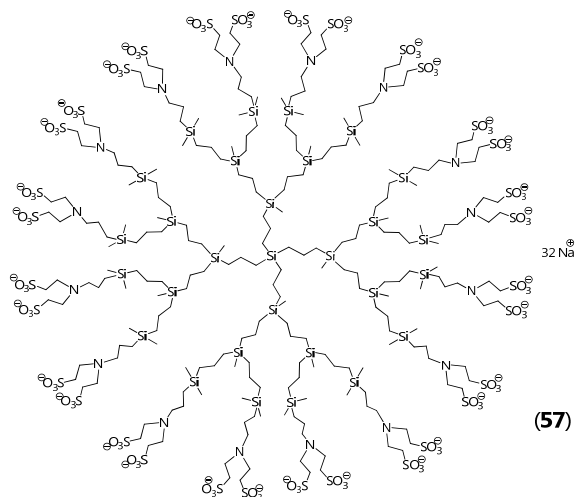


Figura IV.26. Estructura propuestas para los compuestos **55-57**.

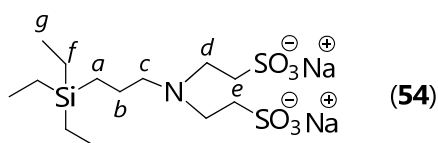
IV.2.3.2. Estudio estructural.

En primer lugar se detallará la caracterización estructural del compuesto monofuncional **54**, que permitirá realizar la caracterización posterior de los dendrímeros **55-57** de una forma más sencilla.

Los datos analíticos y espectroscópicos confirman las estructuras propuestas para estos compuestos en la Figura IV.26.

a) Espectroscopía de RMN.

En la Tabla IV.9., se muestran los datos de ^1H y ^{13}C -RMN para el compuesto monofuncional **54**.



Grupo	¹ H-RMN ppm	Grupo	¹³ C-RMN ppm
NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻ Na ⁺	2.87	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	55.7
NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻ Na ⁺	2.77	NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻ Na ⁺	46.8
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	2.32	NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻ Na ⁺	46.1
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.32	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	19.5
CH ₃ CH ₂ Si	0.72	SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	7.4
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.33	CH ₃ CH ₂ Si	6.1
y		CH ₃ CH ₂ Si	1.9
CH ₃ CH ₂ Si			

Tabla IV.9. Datos de ¹H y ¹³C-RMN para el compuesto **54** en D₂O.

En el espectro de ¹H-RMN en D₂O, aparecen dos multipletes a δ 2.87 y 2.77 que se asignan a los protones metilénicos He y Hd respectivamente, situados entre los átomos de nitrógeno y azufre. Los protones metilénicos Hc y Hb (ver figura adjunta a la Tabla IV.9.), aparecen como dos multipletes a δ 2.32 y 1.32, respectivamente, mientras que los protones Ha, unidos directamente a silicio aparecen solapados con los protones metilénicos Hf del fragmento etilo a δ 0.33. El grupo metilo del fragmento etilo se localiza a δ 0.72. En cuanto al espectro de ¹³C-RMN, las señales correspondientes a los carbonos Cd y Ce aparecen muy próximas, en torno a δ 46. Las señales que aparecen a δ 55.7, 19.5 y 7.4, se asignan a los carbonos de los grupos metileno centrales Cc, Cb y Ca, respectivamente. En cuanto a los carbonos del fragmento etilo unido directamente al átomo de silicio se localizan a δ 6.1 (f) y 1.9 (g).

En la Figura IV.27., se muestran los espectros de ¹H y ¹³C-RMN registrados en D₂O, del compuesto **54**.

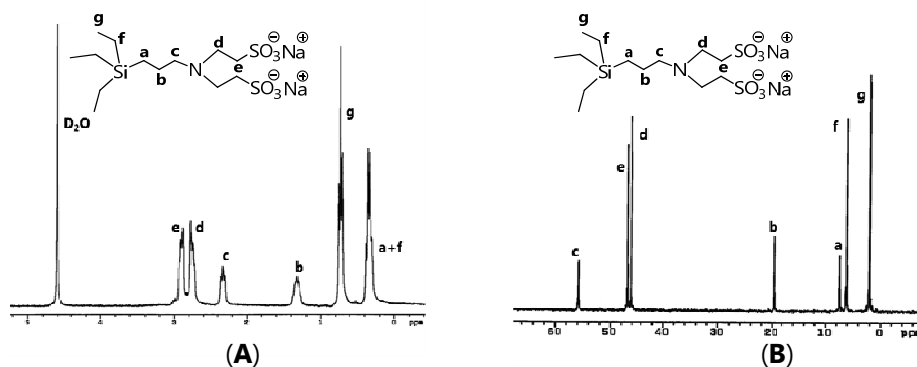


Figura IV.27. (A) ^1H y (B) ^{13}C -RMN para el compuesto **54**.

Mediante experimentos bidimensionales gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ y gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$, ha sido posible determinar la frecuencia a la que aparecen las señales de los átomos de nitrógeno y silicio. En el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ la señal localizada a δ -339.1, se asigna al átomo de nitrógeno ya que se observa el pico cruzado con los protones H_β situados en posición β al átomo de N (ver Figura IV.28.). En cuanto al experimento gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$, es posible observar dos señales localizadas a δ 6.8 que se relacionan con los protones H_a , H_f y H_g del fragmento trietilsililo, por lo que esta señal se corresponde con el átomo de silicio.

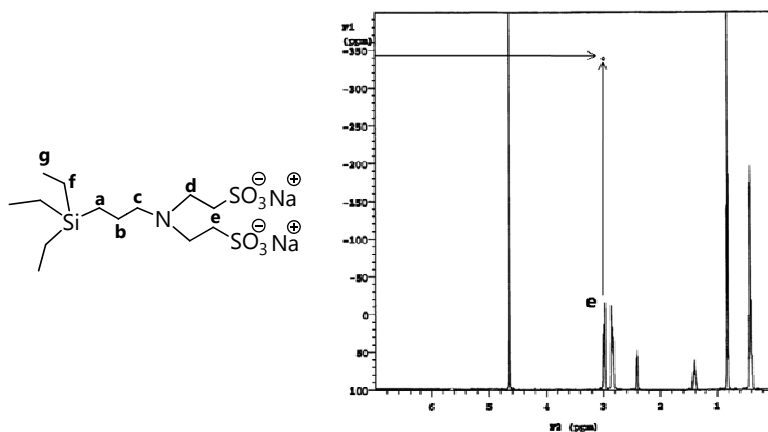
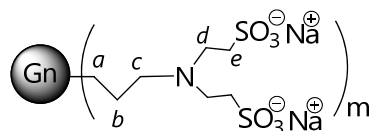


Figura IV.28. Espectro de gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para el compuesto **54**.

Debidamente caracterizado el compuesto **54**, la caracterización del resto de componentes de la familia de dendrimeros resulta menos complicada.

Los datos más importantes de ^1H -RMN para los dendrimeros **55-57** se encuentran recogidos en la Tabla IV.10.:



Grupo	n=1, m=4 (55)	n=2, m=8 (56)	n=3, m=16 (57)
NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻ Na ⁺	2.86	2.86	2.85
NCH ₂ CH ₂ SO ₃ ⁻ Na ⁺	2.77	2.76	2.78
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	2.27	2.28	2.27
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	1.39	1.21	1.24
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	1.21		
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ Si	0.42	0.43	0.44
SiCH ₂ CH ₂ CH ₂ N	0.30	0.28	
SiMe ₂	-0.20	-0.16	-0.15
SiMe		-0.21	

Tabla IV.10. Datos de ^1H -RMN para los compuestos **55-57** en D₂O.

En los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en D₂O, se observa que apenas existe variación en los desplazamientos químicos para las señales del grupo funcional de los tres dendrimeros con respecto al derivado **54**. Lo mismo ocurre con las señales que caracterizan al esqueleto carbosilano, son muy similares en los tres compuestos pero se ensanchan al aumentar la generación. En la Figura IV.29., se muestra, a modo de ejemplo el espectro de ^1H -RMN del dendrimer de segunda generación **56**.

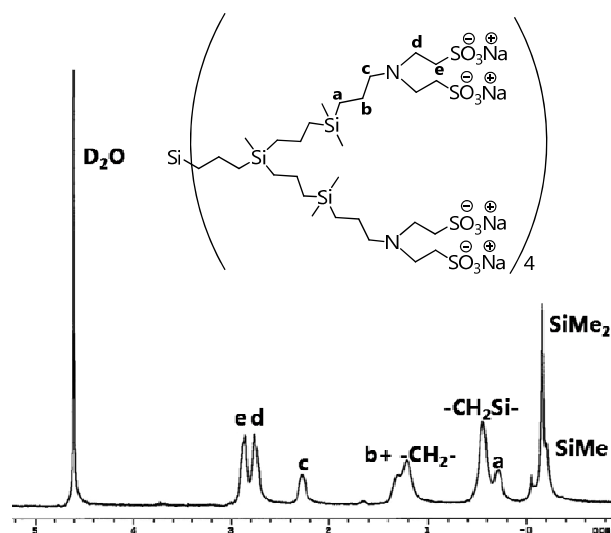
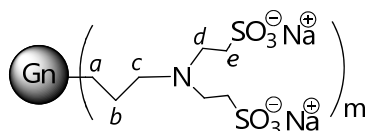


Figura IV.29. Espectro de ^1H -RMN para el dendrímero **56** registrado en D_2O .

En la Tabla IV.11., se recogen los datos de ^{13}C -RMN para esta familia de dendrímeros.



Grupo	n=1, m=4 (55)	Grupo	n=2, m=8 (56)	n=3, m=16 (57)
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	56.5	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	56.9	57.1
$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+$	47.8	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+$	48.0	47.9
$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+$	47.0	$\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+$	46.7	47.1
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$	20.4	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	20.1	20.6
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$	19.4	$\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{Si}$	18.5-17.7	20.0-18.0
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	18.5	$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	12.4	12.7
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$	16.9	SiMe_2	-3.5	-3.4
$\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$	12.3	SiMe	-4.4	-4.4
SiMe_2	-3.8			

Tabla IV.11. Datos de ^{13}C -RMN en D_2O para los compuestos **55-57**.

La asignación exacta de los grupos *d* y *e* (ver figura adjunta a las Tablas IV.10. ó IV.11.), se ha podido llevar a cabo con ayuda de los experimentos bidimensionales gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ y gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$, los cuales, se han realizado sobre el dendrímero de segunda generación $\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_8$ **56**. En estos espectros (ver Figura IV.30.), es posible apreciar que estos dos grupos metileno proporcionan picos cruzados con los átomos de carbono localizados a δ 47.0 y 47.8 (gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$). Si se analiza el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para este compuesto, se observa que la señal que aparece a δ -339.1, correspondiente al átomo de N, está relacionada con el grupo metileno cuyo carbono aparece a δ 47.0 y, como ya se sabe, la constante de acoplamiento N- H_β es más fuerte que la de N- H_α , lo que indica que este grupo metileno es el que se ha asignado como *e*.

En la Figura IV.30., se muestran los espectros bidimensionales para el dendrímero de segunda generación $\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_8$ **56**.

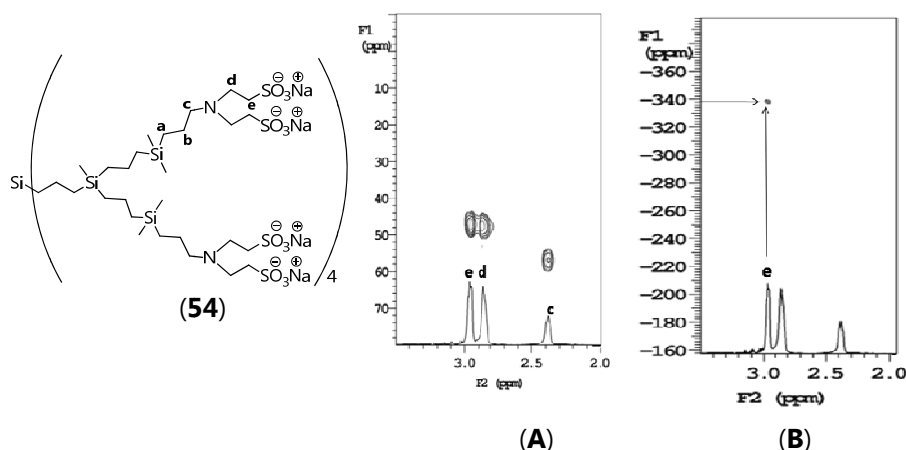


Figura IV.30. Experimentos bidimensionales gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ y gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ para el dendrímero **56**.

En el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ de las tres especies, una vez más, sólo se observan los silicios más externos, de modo que las señales que aparecen en torno a δ 2.0 se asignan a los protones de los metilos del fragmento $-\text{SiMe}_2$, mientras que la que aparece a δ 1.1 se asigna a los grupos SiMe .

b) *Espectrometría de masas.*

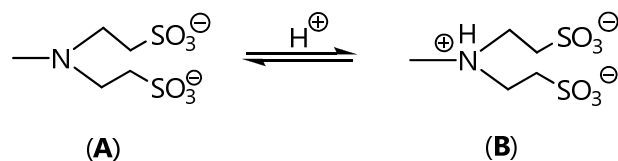
El espectro de Maldi-TOF para el dendrímero de primera generación G_1 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_4$ **55**, muestra la especie $[\text{M}-8\text{Na}-7\text{H}]^-$. En el caso de los dendrímeros de segunda y tercera generación **56** y **57**, en este espectro no ha sido posible identificar las especies moleculares.

c) *Estudio del carácter ácido base de los dendrímeros 55-57.*

Del mismo modo que ocurría con los dendrímeros con grupos carboxilato en la periferia, comentados en este capítulo, los dendrímeros con grupos sulfonato son susceptibles de ser valorados en disolución acuosa a través de un equilibrio ácido base. Éste comportamiento, se ha estudiado mediante valoración potenciométrica ácido-base y espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

c.1.) *Valoración potenciométrica ácido-base.*

En el Esquema IV.22., se representa los equilibrios ácido-base que estas especies aniónicas con grupos amino y sulfonato en la periferia, pueden experimentar en medio acuoso.



Esquema IV.22. *Equilibrio ácido-base que se produce en disolución acuosa para los dendrímeros con grupos sulfonato 55-57.*

A diferencia de lo que ocurría con los dendrímeros con grupos carboxilato, al disolver estas macromoléculas en agua y valorar con HCl, se obtienen curvas de valoración en las que sólo se aprecia un punto de inflexión, para los dendrímeros $G_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_m$ **55-57**. En la Figura IV.31., se muestran dichas curvas para estos compuestos.

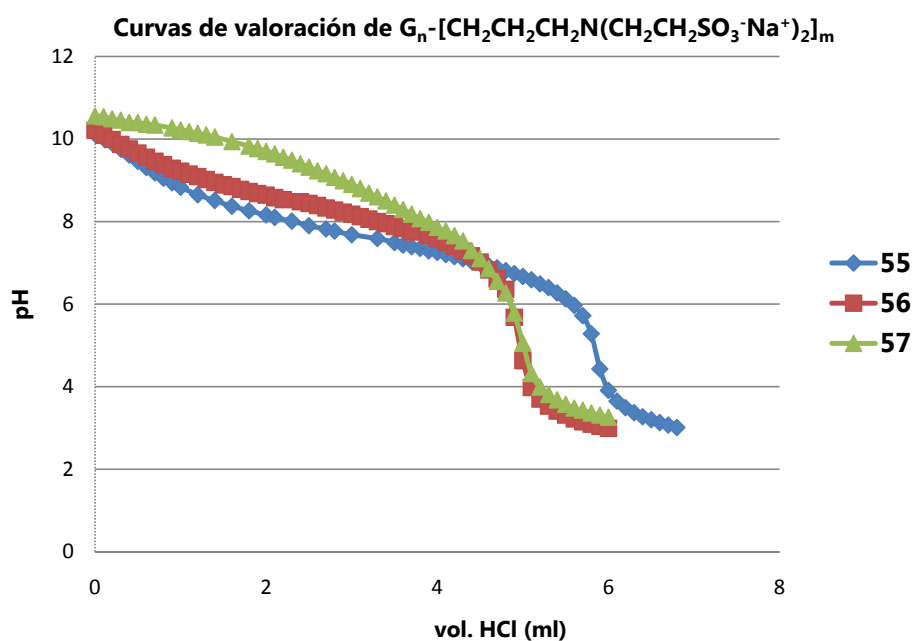


Figura IV.31. Curvas de valoración para los dendrímeros **55-57**.

Al observar la gráfica de la primera derivada para el dendrímero de segunda generación $G_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_{16}$ **56** (ver Figura IV.32.), se observa que hay un único punto final que se debe a la protonación del grupo amino, no observándose la protonación del grupo sulfonato en el rango de medida del experimento.

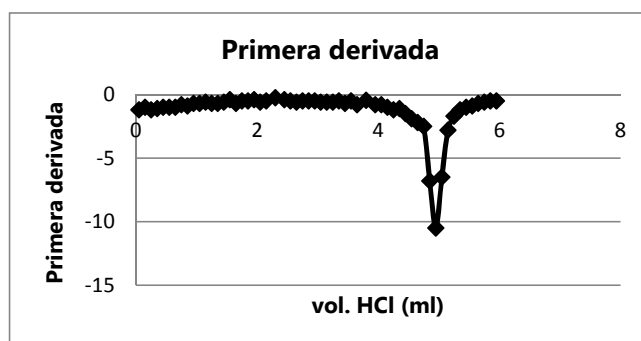


Figura IV.32. Primera derivada para el compuesto **56**.

El valor de pKa se calcula de nuevo a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

En la Tabla IV.12., se encuentran recogidos los datos de pKa para el grupo amino:

G_n-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]_m		
	Amino	
	pKa	Ka
G ₁	5,28	10 ^{-5,28}
G ₂	5,68	10 ^{-5,68}
G ₃	5,05	10 ^{-5,05}

Tabla IV.12. Valores de pKa para el grupo amino de los dendrímeros **55-57**.

A la vista de estos resultados no se puede decir que exista un efecto dendrítico en lo que a los valores de pKa se refiere, ya que este valor llega a un máximo para la segunda generación, disminuyendo al pasar a la tercera. Este efecto puede deberse a que el dendrímero de tercera generación, **57**, es menos

soluble en agua que los otros dos, lo que puede llevar a errores en la valoración ácido-base.

En todo caso estos dendrímeros $G_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_m$, se comportan en disolución acuosa de manera similar a los tampones de tipo MES, MOPS y MOBS, llamados también Good Buffers^[17] (ver Figura IV.33.), cuyo valor de pKa oscila entre 6.17 y 7.60. El valor bajo encontrado en los dendrímeros **55-57** frente a estos tampones de Good puede deberse a la presencia de un segundo fragmento sulfonato sobre el átomo de N. El efecto inductivo adicional de este fragmento puede ser el responsable de dicho valor.

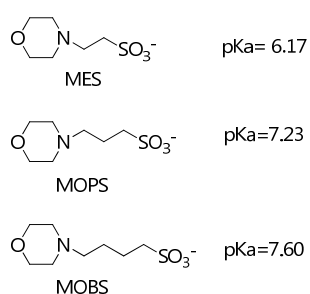
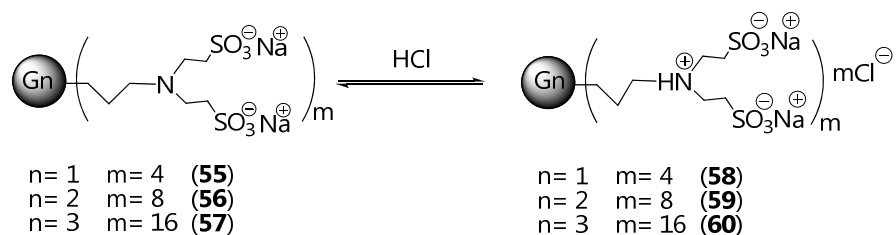


Figura IV.33. Valores de pKa para los tampones de Good MES, MOPS y MOBS.

Conocer el estado en el que se encontrarán estas sustancias a diferentes valores de pH puede ser un dato relevante a la hora de llevar a cabo un estudio biomédico con estos dendrímeros, ya que el pH varía de un medio celular a otro.

Basándonos en este estudio ácido-base, se propone el siguiente equilibrio, ver Esquema IV.23.



Esquema IV.23. Especies existentes en disolución acuosa.

A pH fisiológico la especie mayoritaria en disolución será la que contiene el grupo amino sin protonar, mientras que a un $\text{pH} \leq 5$, predominará la especie protonada, según los valores de pKa.

c.2.) *Caracterización estructural de los compuestos 58-60.*

Para poder llevar a cabo un estudio espectroscópico de las especies **58-60**, ha sido necesario sintetizarlas y aislarlas.

c.2.1.) *Estudio preparativo.*

Para la síntesis de los dendrímeros $\text{G}_n\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+)]_2\}_m \text{mCl}^-$ **58-60**, se parte de una disolución acuosa de los dendrímeros $\text{G}_n\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+)]_2\}_m$ **55-57** sobre la que se añade un exceso de HCl 1M en dietil éter. Tras mantener la mezcla así preparada con agitación constante durante 12 horas, se eliminan los componentes volátiles y el exceso de HCl por evaporación a presión reducida.

Así se aíslan los dendrímeros $\text{G}_n\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+)]_2\}_m \text{mCl}^-$ donde $n=1$, $m=4$ (**58**); $n=2$, $m=8$ (**59**) y $n=3$, $m=16$ (**60**), como sólidos blancos solubles en disolución acuosa con un rendimiento moderado.

En la Figura IV.34., se muestra a modo de ejemplo, la estructura propuesta para el dendrímero de segunda generación $\text{G}_2\text{-}\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+)]_2\}_8, 8\text{Cl}^-$ **59**.

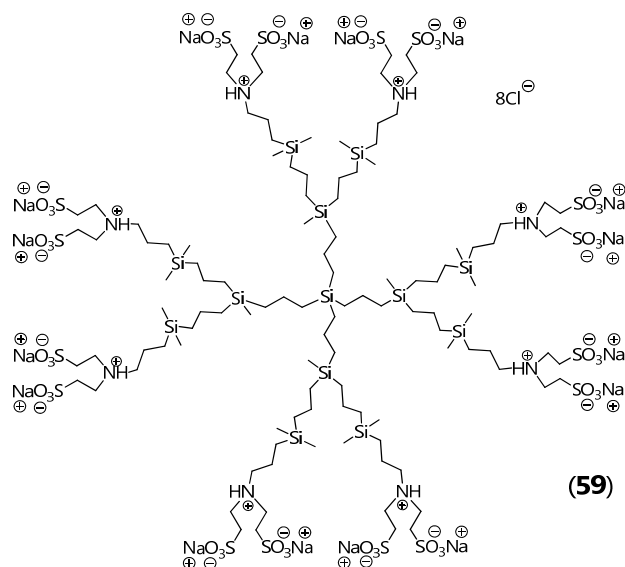


Figura IV.34. Estructura propuesta para el dendrímero **59**.

c.2.2.) Estudio estructural por espectroscopía de RMN.

En el espectro de ^1H -RMN en D_2O para estas especies, es posible apreciar que la protonación del grupo amino provoca un desplazamiento de aproximadamente 0.5 ppm de las señales cercanas al grupo amonio hacia valores mayores de frecuencia (ver asignación detallada en el capítulo dedicado a la descripción experimental). Las señales más afectadas por esta protonación son las de los protones de los metilenos unidos directamente a los átomos de nitrógeno. Las señales correspondientes al esqueleto carbosilano no sufren una variación significativa con respecto a los derivados sulfonato **55-57**. Lo que sí es destacable es que en estos compuestos la resolución de las señales es bastante difusa y más cuanto mayor es la generación del dendrímero. Según los datos de ^{13}C -RMN en D_2O , la protonación del grupo amino no afecta prácticamente al desplazamiento químico de los carbonos de estos nuevos dendrímeros (**58-60**), con respecto a los anteriores (**55-57**). Sin embargo, sí es apreciable un

ensanchamiento generalizado de todas las señales con respecto a las de los compuestos con grupos sulfonato en la periferia, sobre todo al aumentar la generación.

A modo de ejemplo, en la Figura IV.35., se muestran los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en D_2O , del dendrímero de primera generación G_1 - $\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_4\text{Cl}^-\}$ **58**.

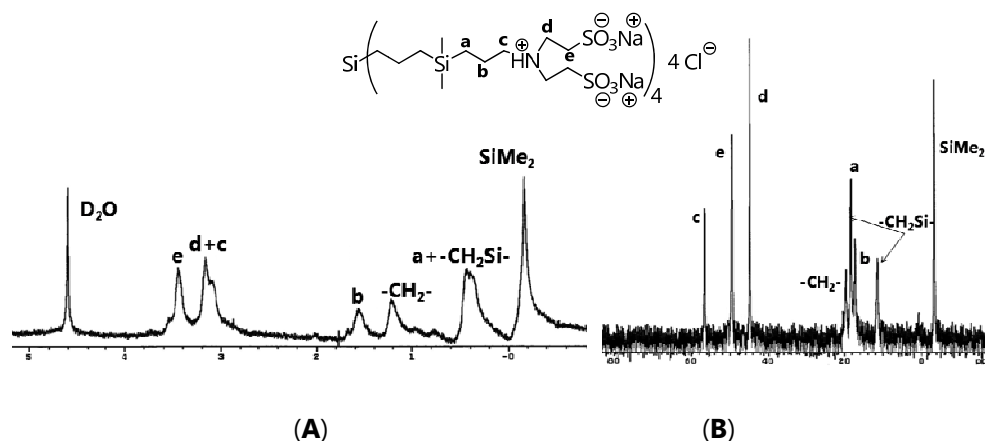


Figura IV.35. (A) ^1H y (B) ^{13}C -RMN para el dendrímero de primera generación **58**.

Con el fin de determinar si la protonación produce algún efecto en el desplazamiento químico del átomo de nitrógeno, se ha realizado un experimento bidimensional gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ sobre el dendrímero de primera generación G_1 - $\{[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_4\text{Cl}^-\}$ **58**. Este espectro proporciona una señal a δ -338.5. Este desplazamiento se diferencia en 0.6 ppm del desplazamiento correspondiente al átomo de nitrógeno del análogo aniónico **55**. Por lo tanto la cuaternización no afecta a este desplazamiento de forma significativa.

En lo que a los espectros de gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ se refiere, las señales que aparecen en torno a δ 2.2, se asignan a los protones metilénicos del grupo

SiMe₂ y las que aparecen sobre δ 1.0, a los protones del grupo SiMe. En la Figura IV.36., se muestra a modo de ejemplo, el espectro gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ del dendrimer de primera generación **58**.

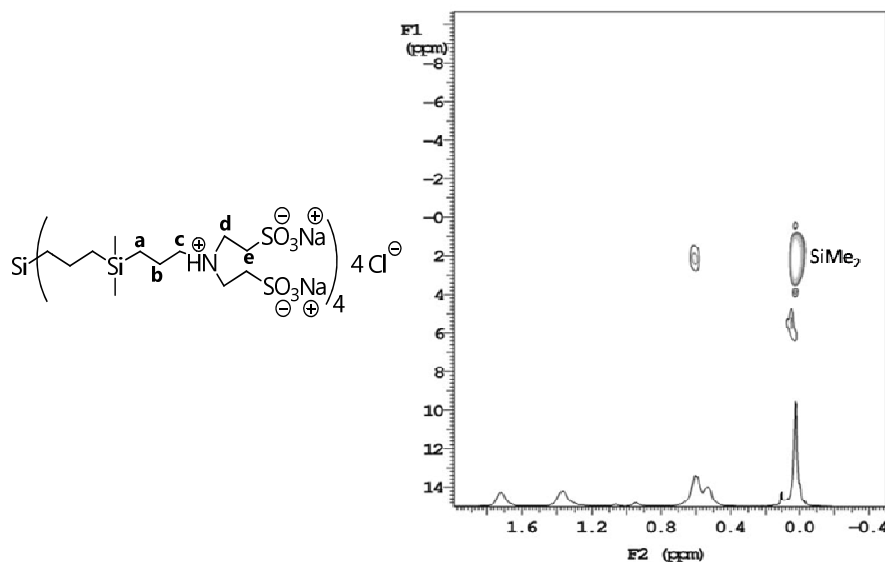


Figura IV.36. Experimento gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ para el dendrimer de primera generación **58**.

Según los datos de análisis elemental, estos derivados podrían existir como especies zwitterionicas al igual que ocurría con los compuestos **45-48**

Como conclusión, se puede decir que se ha optimizado un método sencillo para la preparación de dendrimeros carbosilano aniónicos, los cuales, se comportan de una manera versátil debido a la posibilidad de proporcionar otras especies solubles en disolución acuosa, a través de equilibrios ácido-base.

IV.3. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] A. Michael, *J. Prakt. Chem.*, **1887**, 36, 349-356.
- [2] E. P. Kohler, H. Potter, *Journal of the American Chemical Society*, **1935**, 57, 1316-1321.
- [3] T. D. McCarthy, P. Karellas, S. A. Henderson, M. Giannis, D. F. O'Keefe, G. Heery, J. R. A. Paull, B. R. Matthews, G. Holan, *Molecular Pharmaceutics*, **2005**, 2, 312-318.
- [4] R. J. Mumper, M. A. Bell, D. R. Worthen, R. A. Cone, G. R. Lewis, J. R. A. Paull, T. R. Moench, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **2009** 35, 515-524.
- [5] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2001**, 40, 2004-2021.
- [6] A. Sousa-Herves, E. Fernández-Megía, R. Riguera, *Chem. Com.*, **2008**, 3136-3138.
- [7] L. Griffe, M. Poupot, P. Marchand, A. Maraval, C. O. Turrin, O. Rolland, P. Metivier, G. Bacquet, J. J. Fournie, A. M. Caminade, R. Poupot, J. P. Majoral, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2007**, 46, 2523-2526.
- [8] C. Ornelas, E. Boisselier, V. Martinez, I. Pianet, J. R. Aranzaes, D. Astruc, *Chem. Commun.*, **2007**, 5093-5095.
- [9] G. R. Newkome, Z. Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 2003-2004.
- [10] V. Sartor, L. Djakovitch, J. L. Fillaut, F. Moulines, F. Neveu, V. Marvaud, J. Guittard, J. C. Blais, D. Astruc, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 2929-2930.
- [11] J. Ruiz, G. Lafuente, S. Marcen, C. Ornelas, S. Lazare, E. Cloutet, J. C. Blais, D. Astruc, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 7250-7257.
- [12] C. Ornelas, D. Mery, J. C. Blais, E. Cloutet, J. R. Aranzaes, D. Astruc, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2005**, 44, 7399-7404.
- [13] P. Ortega, *Tesis Doctoral, Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Alcalá*, **2005**.
- [14] T. R. C. Inc., *Toronto Research Chemicals Inc.*, M282275.
- [15] R. C. van Duijvenbode, A. Rajanayagam, G. J. M. Koper, M. Baars, B. F. M. de Waal, E. W. Meijer, M. Borkovec, *Macromolecules*, **2000**, 33, 46-52.
- [16] D. Seyferth, D. Y. Son, A. L. Rheingold, R. L. Ostrander, *Organometallics*, **1994**, 13, 2682-2690.

[17] D. B. Rorabacher, A. Kandededara, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 3140-3144.



CAPÍTULO V

**“APLICACIONES BIOMÉDICAS DE
DENDRÍMEROS ANIÓNICOS”**

V.1. DENDRÍMEROS CARBOSILANO ANIÓNICOS EN BIOMEDICINA.

Como se viene diciendo a lo largo de todo este trabajo, los dendrímeros, debido sobre todo a la multivalencia de su superficie, son herramientas muy útiles en diversos campos de la medicina.

Además, se ha podido comprobar que los dendrímeros aniónicos pueden tener una actividad biológica en sí mismos, es decir, pueden actuar como agentes terapéuticos, ya que se pueden sintetizar de forma que contengan en su superficie grupos funcionales capaces de originar interacciones con células o con receptores virales, de modo que interrumpen la acción que el virus puede ejercer sobre la célula, la cual se produce en los primeros estadios de la infección viral.

Para poder entender la actuación de los dendrímeros aniónicos como agentes antivirales, conviene tener unas nociones sobre cómo se produce el ciclo infectivo de un virus. En nuestro caso trabajaremos con el VIH, cuyo ciclo de vida se esquematiza en seis pasos:

1. Enlace y fusión. El ciclo de vida del VIH comienza cuando se une a un receptor CD4 y a uno de los dos co-receptores en la superficie de un linfocito T (CCR5 ó CXCR4). A continuación el virus se fusiona con la célula anfitriona. Tras la fusión, el virus libera su material nucleico (ARN), dentro de la célula anfitriona.
2. Transcripción inversa. El enzima viral transcriptasa inversa convierte la cadena simple de ARN viral en la cadena doble de ADN vírico.
3. Integración. El nuevo ADN viral se integra en el núcleo de la célula anfitriona donde un enzima vírico llamado integrasa combina éste con el ADN de la célula. A este ADN del VIH integrado se le llama provirus.
4. Transcripción. Cuando la célula infectada recibe una señal para volverse activa, el provirus utiliza un enzima de la célula anfitriona llamada

polimerasa del ARN para crear nuevas copias del material génico del virus y segmentos más cortos de ARN conocido como ARN mensajero (ARNm). Este ARNm se utiliza como patrón para la formación de cadenas largas de proteínas del VIH.

5. Ensamblaje. El enzima viral llamado proteasa divide las cadenas largas de proteínas del VIH en pequeñas proteínas individuales. A medida que las pequeñas proteína virales se unen con las copias del ARN del VIH, se ensambla una nueva partícula de virus.

6. Gemación. El nuevo virus ensamblado sale de la célula anfitriona. Durante la gemación el nuevo virus acapara parte de la envoltura externa de la célula. A esta envoltura, que actúa como recubrimiento, le brotan combinaciones de proteínas y azúcares, que se conocen como glucoproteínas del VIH. Estas glucoproteína son necesarias para que el virus se una a los receptores CD4 y a los co-receptores. Las nuevas copias de VIH puedan ahora pasar a infectar a otras células.

En la Figura V.1., se pueden apreciar los seis pasos del ciclo de vida del VIH.

Se ha podido comprobar que los dendrímeros actúan como agentes antivirales en el momento del enlace y fusión del ciclo viral, o bien, a nivel de la transcripción inversa.

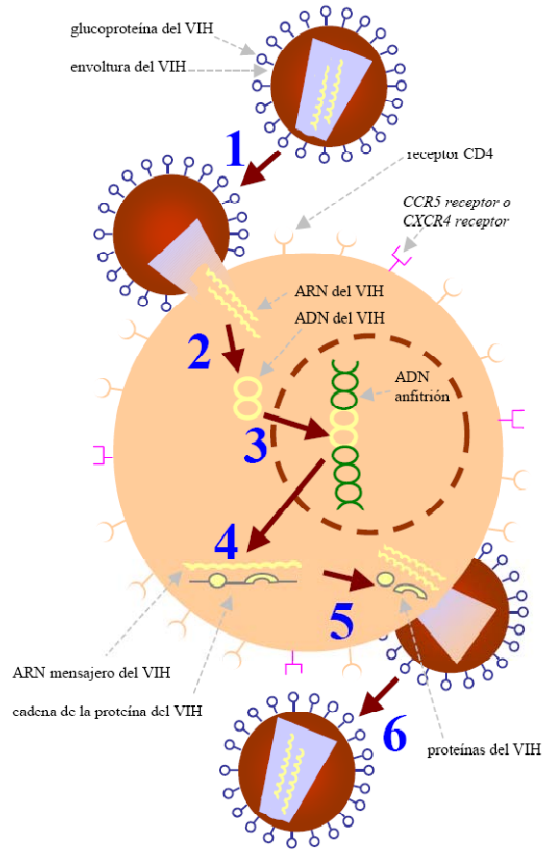


Figura V.1. Ciclo vital del VIH.

Tal y como se muestra en la Figura V.2., se puede observar que existe una competencia entre el dendrímero polianiónico y la célula para unirse al virus. La unión electrostática del dendrímero a la superficie positiva del virus impide que éste interactúe con la membrana celular negativa, impidiendo así la infección.

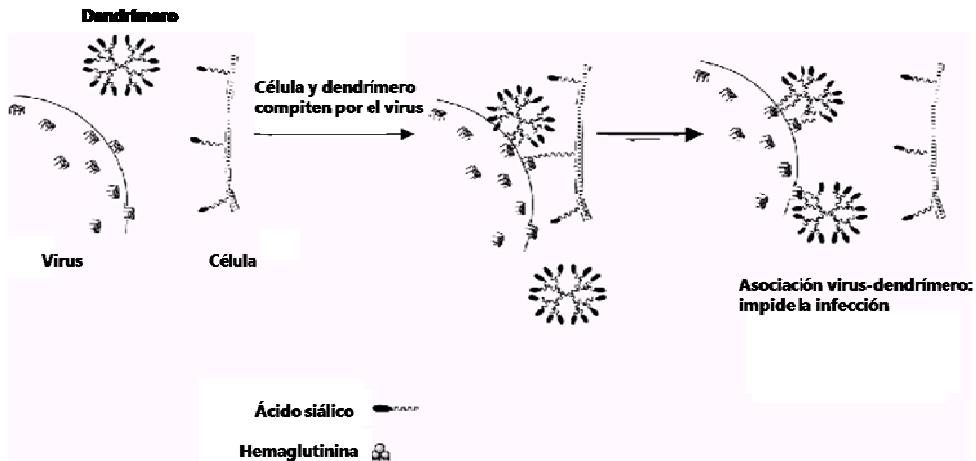


Figura V.2. Mecanismo de interferencia dendrítico-virus.

Hasta ahora los dendrímeros más utilizados como agentes antivirales contienen un esqueleto que puede ser de diferente naturaleza, funcionalizado con distintos grupos terminales, que son principalmente de tres tipos: carbohidratos, péptidos y grupos aniónicos.

V.1.1. Dendrimeros con grupos carbohidrato en la periferia.

Se trata de los dendrímeros que más ampliamente han sido estudiados como agentes antivirales. Comúnmente se les denomina *glicodendrimeros*.^[1-3] Se trata de dendrímeros clásicos funcionalizados con grupos carbohidrato, los cuales interactúan de forma específica con los receptores específicos de lectina que son proteínas situadas en la superficie viral.

El virus con el que existe un mayor número de estudios es el de la gripe, el cual se adhiere a las glicoproteínas de la célula huésped a través de la glicoproteína hemaglutinina viral (HA). Varios estudios han demostrado la inhibición de la HA a través la unión con glicoconjugados de ácido siálico.^[4-7] Reuter y colaboradores fueron los primeros en utilizar dendrímeros

funcionalizados con ácido siálico como terapia contra el virus de la gripe.^[8] Otro ejemplo son dendrímeros PAMAM de cuarta generación que contienen ácido siálico conjugado.^[9,10] La actividad de estos compuestos ha sido probada *in vitro* e *in vivo* utilizando un modelo de neumonía gripal en ratas^[9] y, la acción antiviral en este caso se basa en la unión del dendrímero a la superficie viral. Sin embargo, existen pocos ejemplos de dendrímeros carbosilano que se hayan aplicado en este campo. Un estudio reciente,^[11] ha demostrado que glicodendrímeros carbosilano funcionalizados con unidades de sialil $\alpha(2\rightarrow3)$ lactosa son capaces de bloquear la proteína hemaglutinina del virus de la gripe.

V.1.2. Dendrímeros peptídicos.

De las tres clases de sistemas dendríticos antivirales, estos son los menos estudiados hasta ahora. Se trata de dendrímeros clásicos, generalmente de naturaleza catiónica, que contienen enlaces peptídicos,^[12] ya sea en su esqueleto o en los grupos periféricos. La mayoría de ellos están basados en un sistema peptídico antigénico múltiple (MAP).^[13,14] Generalmente no constan de un núcleo, por lo que es más apropiado hablar de dendrones que de dendrímeros clásicos. En cualquier caso estos sistemas se utilizan en prevención de infecciones ya que son capaces de imitar a los receptores y a los ligandos que intervienen en las interacciones agente patógeno-célula diana.

Un ejemplo de inhibición es el dendrímero peptídico basado en una secuencia de ocho residuos de la tercera región variable (bucle V3) de la proteína gp120 del VIH-1 (se trata de una glicoproteína de la superficie del virus). Este dendrímero peptídico ha demostrado inhibir la infección por VIH-1 en células CD4.^[15,16]

V.1.3. Dendrímeros polianiónicos.

La presencia de cargas negativas en la superficie de estas moléculas hace que sean capaces de actuar frente a diferentes agentes patógenos. Se sabe que distintos tipos de virus como VIH,^[17-20] VHS,^[3,20,21] Gripe,^[11,19,20,22] y Ébola,^[3,19,20] se unen a compuestos polianiónicos. Además se ha comprobado que polisacáridos sulfatados son inhibidores típicos de infecciones víricas.^[23,24]

Los dendrímeros se pueden diseñar de forma que se unan a los receptores celulares o al virus, de modo que interfieren en el primer paso del ciclo infectivo del virus impidiendo la unión de éste a la célula.

Hasta ahora los más estudiados han sido los dendrímeros con grupos sulfonato y carboxilato en la periferia. Un ejemplo de ellos son los dendrímeros de polilisina sintetizados por Bourne y colaboradores,^[21] los cuales son capaces de bloquear la infección por VHS en células *in vitro*, además de actuar como profilácticos cuando son administrados 30 minutos antes de la exposición intravaginal al virus en ratones.^[25] A estos resultados hay que sumarle el hecho de que los dendrímeros con grupos sulfonato interfieren en los últimos pasos del ciclo infectivo del virus VHS, es decir, en la replicación del VHS mediante la inhibición de la síntesis de ADN viral en las células infectadas.^[17,26] Estos resultados indican que los dendrímeros aniónicos pueden ser herramientas útiles no sólo en la prevención de la infección viral, sino también como inhibidores de la replicación del virus.

En otro estudio, se ha demostrado que dendrímeros tanto con grupos carboxilato como sulfonato, son capaces de inhibir la infección por VIH en células *in vitro*^[17,27,28] y, los dendrímeros polianiónicos inhiben la entrada del virus en la célula, e inhiben la actividad de dos enzimas virales, la retrotranscriptasa inversa y la integrasa, lo que indica que esos derivados polianiónicos pueden actuar en diferentes ciclos replicativos del VIH

dependiendo de cómo se integren y se sitúen en la célula. Otros estudios más recientes, muestran que dendrímeros con grupos sulfonato protegen a macacos hembra frente a la infección vaginal del virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS). Dentro de este apartado hay que destacar el dendrímero ya mencionado en el capítulo anterior, SPL7013, el cual es un compuesto basado en lisina con grupos naftaleno disulfónico en su superficie y es el principio activo de un gel microbicida vaginal llamado VivaGel[®]. Se trata de un potente inhibidor frente a diferentes cepas del VIH-1, que actualmente se encuentra en fase clínica muy avanzada, para la prevención de la transmisión vaginal del VIH y del herpes genital. También se han preparado otros dendrímeros similares al SLP7013 utilizando esqueletos tipo PAMAM y PPI, que presentan actividades biológicas similares, pero se han descartado para su uso comercial debido a las dificultades en el proceso de síntesis.

Por otro lado, se ha publicado la síntesis de dendrímeros basados en un esqueleto que contiene átomos de fósforo, funcionalizados en la superficie con grupos aniónicos fosfonato.^[29] Estos dendrímeros muestran gran actividad en la activación y multiplicación de células "natural killers" (NK). Estos datos son prometedores ya que abren la posibilidad del uso de inmunoterapias antivirales o anticancerígenas, donde un gran número de células NK podrían ser necesarias.

Existe gran variedad de dendrímeros aniónicos que pueden actuar como agentes antivirales basados en esqueletos de tipo PAMAM, polilisina, DAB-Am, dendrímeros de poliacrilamida, con núcleo de fullereno, etc. No obstante, no hay descritos en la bibliografía dendrímeros de estructura carbosilano aniónicos que presenten actividad antiviral. Es por este motivo por el que se planteó como uno de los objetivos de este trabajo de investigación, la síntesis de dendrímeros polianiónicos de estructura carbosilano con el fin de estudiar su comportamiento frente al virus del VIH.

V.2. ENSAYOS BIOMÉDICOS CON DENDRÍMEROS POLIANIÓNICOS.

Se ha evaluado el efecto como agentes terapéuticos de los dendrímeros $G_n-[CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2COO^-Na^+)_2]_m$ **42-44** y $G_n-[CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)_2]_m$ **55-57**. Para ello, se han realizado estudios con el fin de determinar su carácter antiviral, antiinflamatorio y antibacteriano.

V.2.1. Evaluación de la capacidad antiviral de los dendrímeros polianiónicos.

Los dendrímeros carboxilato con grupos carboxilato y sulfonato en la superficie, han sido sometidos a estudios de biocompatibilidad e inhibición del VIH en las líneas celulares epiteliales vaginales (HEC-1A, (Human Endometrial Carcinoma Cells)) y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP). La línea celular inmortalizada (se está dividiendo constantemente) HEC-1A, se utiliza como modelo de la primera barrera celular del epitelio vaginal, mientras que la línea CMSP es más fisiológica (son linfocitos de pacientes que duran un tiempo determinado) y actúa como modelo de una segunda barrera celular que se encuentra al traspasar el epitelio vaginal.

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de la toxicidad de estos dendrímeros polianiónicos en las dos líneas celulares mencionadas. Adicionalmente se ha estudiado la toxicidad en hematíes humanos mediante un ensayo que evalúa la presencia de hemaglutinación (agregación de los hematíes) y hemólisis. De este modo, se cuantifica la liberación de hemoglobina ya que los dendrímeros estarán en contacto con la sangre.

A continuación, se pasó a evaluar la capacidad de estos dendrímeros para inhibir la internalización del virus en las dos líneas celulares (HEC-1A y CMSP).

V.2.1.1. Ensayos de Toxicidad.

La toxicidad de estos compuestos se ha establecido analizando los rangos de su biocompatibilidad mediante diferentes técnicas como las que se mencionan a continuación:

i) Evaluación de la integridad de la membrana mediante tinciones con Azul Tripán (TB), que es un compuesto coloreado de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar en las células que tienen la membrana alterada. Por tanto, en la observación de la población celular en un microscopio óptico, una célula viva en perfecto estado se observará incolora mientras que una célula muerta o muy alterada se observará azul.

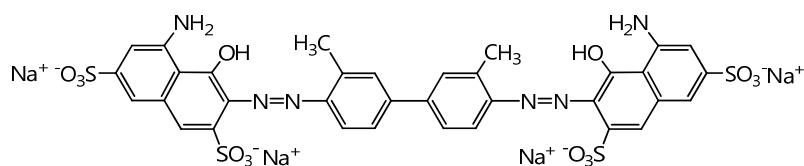


Figura V.3. Estructura del Azul Tripán (TB).

ii) Ensayo LDH. El ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) se utilizó para evaluar el daño en la superficie de la membrana celular debido a la presencia de los distintos grupos periféricos aniónicos de los dendrímeros. LDH es un enzima que se encuentra en el citoplasma y que se libera debido a la lisis celular (ruptura de la membrana). El ensayo de LDH, por lo tanto, es una medida de la integridad de la membrana, que se basa en la oxidación de LDH a piruvato y la

reducción de sales de tetrazolio a cristales de formazán por el piruvato. La detección se lleva a cabo mediante colorimetría.

iii) Evaluación de la actividad mitocondrial utilizando ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio). Este ensayo se realiza para tener una idea de si hay efectos tóxicos sobre el metabolismo celular. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células viables para reducir el MTT en cristales de formazán insolubles en agua y solubles en DMSO, que se analizan mediante colorimetría.

A continuación se hará un resumen de los resultados de toxicidad obtenidos para los dendrímeros **42-44** y **55-57**.

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad en células HEC-1A y CMSP a concentraciones crecientes de dendrímero (0, 1, 10, 20 y 50 μM), durante 24h mediante la técnica de Azul Tripán. Este ensayo proporciona de forma rápida una idea general de la concentración tóxica de los dendrímeros. En la Figura V.4., se muestran los resultados obtenidos para células HEC-1A.

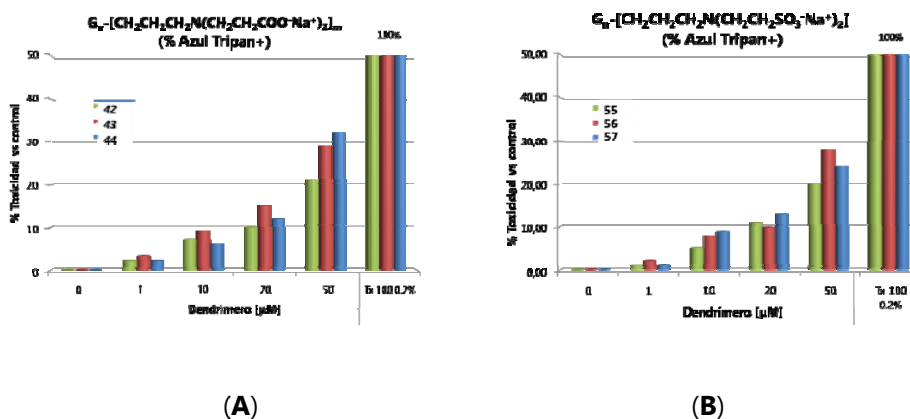


Figura V.4. Resultados de la tinción con Azul Tripán de células HEC-1A para los dendrímeros **42-44** (A) y **55-57** (B).

El resultado de este ensayo, tanto en células HEC-1A como en CMSP, muestra que, a partir de una concentración de 20 μM de los dendrímeros **42-44 (A)** y **55-57 (B)**, hay más de un 10% de células con tinción azul (muertas), por lo que se decidió centrar los estudios de viabilidad celular en una concentración de 10 μM , a la que se asegura que estos compuestos no son tóxicos.

Para evaluar el daño que estos dendrímeros pueden causar en la membrana celular, mediante la formación de poros por interacción con diversos receptores celulares o bien por interacción electrostática con zonas positivas de la misma, se llevaron a cabo ensayos de liberación del enzima lactato deshidrogenasa (LDH) al medio. Estos estudios se complementaron con el estudio de la actividad mitocondrial de las células (MTT).

En la Figura V.5., se muestra el resultado de estos experimentos conjuntos (LDH y MTT), en la línea celular HEC-1A.

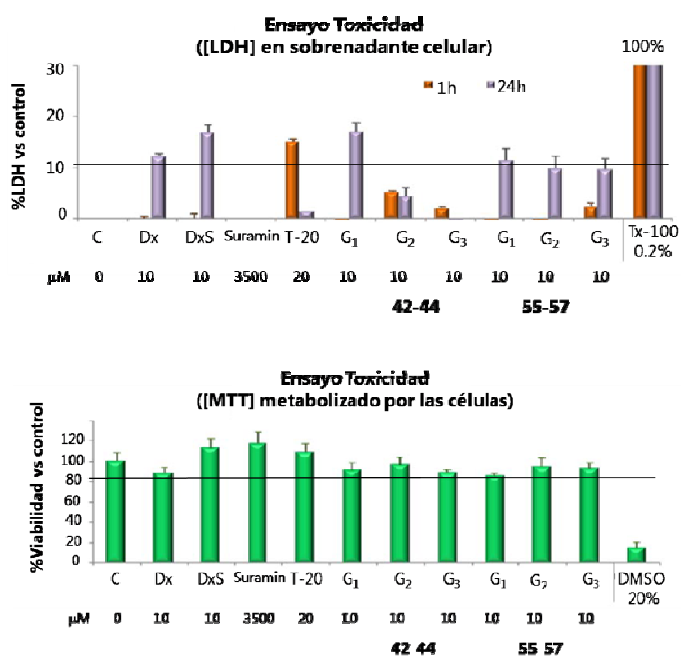


Figura V.5. Ensayo LDH y MTT para los dendrímeros **42-44** y **55-57** en células HEC-1A.

Los márgenes de aceptabilidad indicados para ambos ensayos son, no más del 10% de LDH en sobrenadante y no más de una disminución del 20% en la actividad metabólica celular. A las 24 horas de tratamiento, las células tratadas con una molécula inerte como el dextrano (Dx), mostró cerca de un 10% de concentración de LDH en el sobrenadante respecto al control. El dextrano con grupos sulfato en la periferia (DxS) mostró similar toxicidad. De esta manera, un 10% de LDH se consideró aceptable a las 24 horas debido a que la presencia de una molécula externa inocua, parece estar ocasionando una ligera perturbación en las células con una membrana celular menos íntegra.

En cuanto al ensayo MTT, se obtuvieron niveles de producción de cristales de formazán por encima de un 80% para los compuestos **42-44** y **55-57** y se determinó que la concentración de dendrímero de 10 μM es biocompatible con el metabolismo celular de las HEC-1A.

Suramin (Sigma[®]) y T-20 o Fuzeon[®] (Roche[®]) son fármacos que inhiben, respectivamente, la retrotranscripción y la fusión del VIH a la membrana celular. Tx-100 (Tritón X-100) se utiliza como control positivo en LDH, mientras que en MTT se utiliza DMSO al 20%. Con los dendrímeros **55-57**, se obtuvieron unos perfiles de toxicidad similares mediante ensayo LDH, a una concentración de 10 μM todos muestran un % de LDH en sobrenadante inferior al 10%. La viabilidad celular se estableció paralelamente mediante ensayo MTT de las HEC-1A tratadas 24h con los dendrímeros $G_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_m$ **42-44** y $G_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_m$ **55-57**.

Para determinar la toxicidad en una línea más fisiológica, se evaluó la toxicidad en CMSP, que es el modelo de la segunda barrera celular del epitelio vaginal, mediante ensayos LDH y MTT. Para este experimento se eligieron los dendrímeros de segunda generación **43** y **56** con grupos carboxilato y sulfonato respectivamente.

En la Figura V.6., se puede observar que tanto por LDH como por MTT, la viabilidad celular es similar a la observada con estos ensayos en células HEC-1A. Además estos resultados muestran una mayor viabilidad con respecto a la obtenida mediante tinción con Azul Tripán.

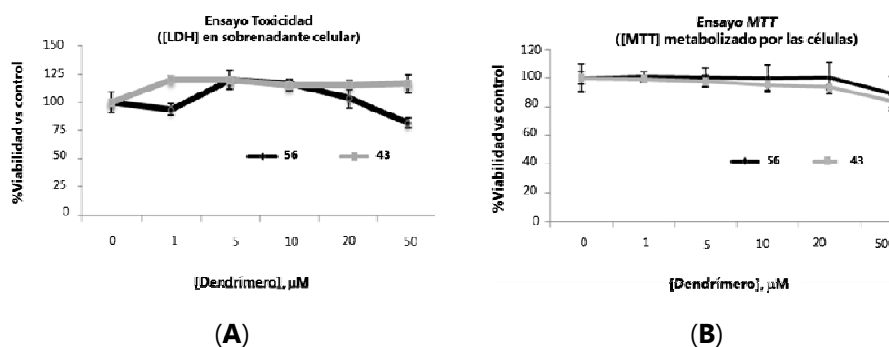


Figura V.6. Ensayos (A) LDH y (B) MTT en CMSP para los dendrímeros **43** y **56**.

En la Figura V.6., se observa que los dendrímeros G_2 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- \text{Na}^+)_2]_8$ **43** y G_2 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^- \text{Na}^+)_2]_8$ **56**, provocan un bajo daño a la membrana celular, además de una óptima actividad mitocondrial de las células cuando se utilizan a una concentración de $10 \mu\text{M}$.

V.2.1.2 Estudio de inhibición en células HEC-1A.

Ensayo de internalización e inhibición del VIH.

El ensayo de internalización se realizó para cuantificar el número de partículas virales que se encontraban en el interior de las células previamente tratadas 1h con los dendrímeros **43** y **56**, antes de la infección, es decir, como pre-tratamiento. Tras 3h de infección con el virus, se determinó por inmunoensayo enzimático (ELISA p24, INNOTEST™ HIV antigen mAB,

Innogenetics®) la cantidad de antígeno p24 (proteína viral) que había sido liberado al sobrenadante tras la lisis (ruptura) de la membrana celular. Figura V.7.

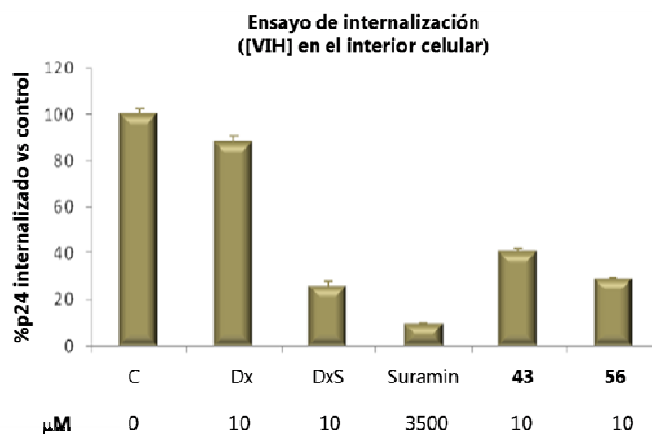


Figura V.7. Ensayo de internalización del VIH en células HEC-1A en presencia de los dendrímeros **43** y **56**.

En la Figura V.7., se recogen los resultados de este experimento. Tras la infección con el virus, la cantidad de antígeno p24 detectado por ELISA es un 60 y 70%, respectivamente, menor para las células tratadas con los dendrímeros **43** y **56**, antes de la infección con respecto al control. Los resultados obtenidos con el compuesto **56**, con respecto al **43**, parecen indicar que este permite una menor internalización del virus ya que la cantidad de antígeno p24 es aproximadamente un 10% menor. Esto hizo que se seleccionase el dendrímero **56** para poner a punto el resto de ensayos. Hay que destacar que, aunque con respecto al fármaco Suramin, el dendrímero con grupos sulfonato **56** permite una mayor internalización del virus, éste se ha utilizado en una concentración de 10 μM, mientras que Suramin se utiliza a 3500 μM. Por lo que la actividad del dendrímero como inhibidor de la internalización del VIH se puede considerar buena.

Para corroborar el estudio anterior, se llevó a cabo un ensayo de inhibición en una monocapa. Este tipo de ensayos se llevaron a cabo para reproducir de la mejor forma posible la función que el dendrímero G_2 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_8$ **56**, desarrollaría en la superficie del endometrio y estudiar el paso del virus a través de la mucosa estratificada del epitelio vaginal. Con este fin se utilizaron dispositivos de Transwell (ver Figura V.8.), los cuales son pocillos con un soporte permeable de policarbonato de 0.4 μm de poro, que permiten recrear el fenómeno de transcitosis (transporte de macromoléculas desde un espacio extracelular a otro a través del citoplasma de una célula por medio de una vesícula endocítica y no a través del espacio intercelular), debido a la posibilidad de formar una monocapa perfecta de células adherentes en su interior y recolectar información de los sobrenadantes de la cara apical (externa) y basolateral (interna), de la monocapa.

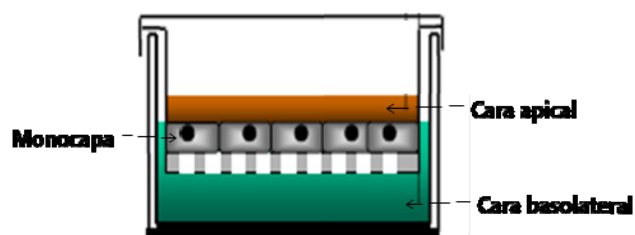


Figura V.8. Dispositivo de Transwell.

La concentración de dendrímero G_2 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_8$ **56** se redujo de 10 μM a 5 μM para evitar cualquier posible daño a la monocapa perfectamente formada en las membranas de Transwell. El ensayo se realizó con dos cepas diferentes de VIH: VIH-1 NL4.3 y VIH-1 Bal, que utilizan distintos co-receptores de la célula diana para la infección (CXCR4 y CCR5 respectivamente), con el fin de determinar si esto tiene algún efecto en la inhibición (ver Figura

V.9.). VIH-1 NL4.3 es la cepa predominante a lo largo de la infección y con una replicación más rápida, mientras que VIH-1 Bal es la cepa viral mayoritaria en la primoinfección (primeros estadios de la infección por VIH).

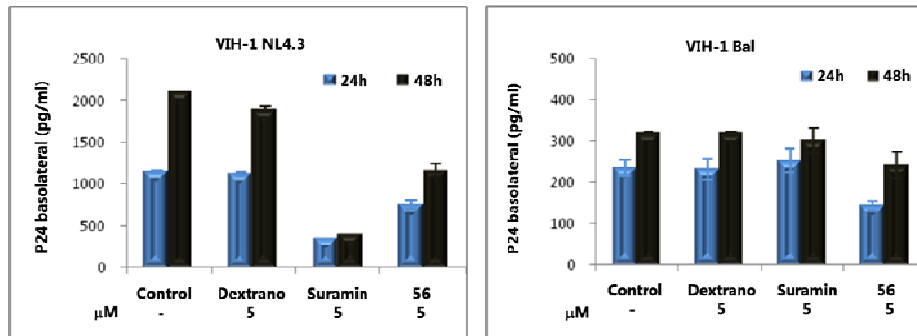


Figura V.9. Efecto del dendrímero **56** sobre el paso de las partículas de VIH a través de la monocapa de células HEC-1A.

En este ensayo se observa que el dendrímero G_2 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_8$ **56** produce una reducción del paso de las partículas de las dos cepas del virus a través de la monocapa, pero hay que destacar que en el caso del VIH-1 Bal, el control positivo (Suramin) posee un efecto inhibitor menor (prácticamente nulo) que la del dendrímero.

V.2.1.3 Ensayos de inhibición en CMSP.

Una vez evaluada la actividad como pre-tratamiento, del dendrímero con grupos sulfonato **56**, en la línea celular HEC-1A, es conveniente estudiar la actividad de éste como post-tratamiento en lo que constituiría una segunda barrera celular de protección del epitelio vaginal. Así, se han evaluado estos efectos en CMSP estimuladas, es decir, susceptibles de ser infectadas. Figura V.10.

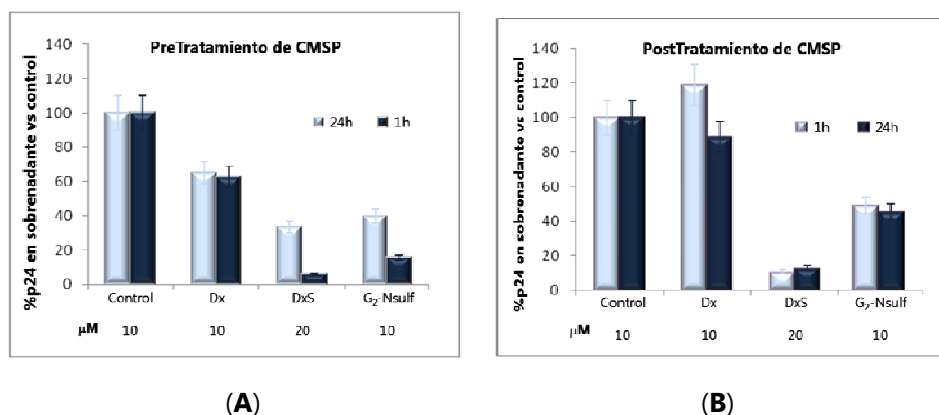


Figura V.10. Efecto profiláctico (A) y terapéutico (B), del dendrímero **56**.

En este experimento, el compuesto **56** mostró un 80% de inhibición frente al control a tiempos cortos de 1h, en los ensayos de pre-tratamiento de las células con el dendrímero antes de la infección por el VIH-1 NL4.3 y un 60% en los ensayos de post-tratamiento a 24h. No obstante el dendrímero actúa mejor como agente profiláctico, ya que la cantidad de antígeno p24 detectada por ELISA en el sobrenadante es menor cuando el compuesto **56** se utiliza como pre-tratamiento a tiempos cortos.

Como conclusión se confirman las dos aplicaciones de este dendrímero (pre y post-tratamiento) en un sistema más fisiológico como es una línea primaria linfoide.

V.2.2. Evaluación del efecto antiinflamatorio.

Se sabe que en células que se encuentran en un proceso inflamatorio la infección por parte del VIH está favorecida, de modo que si se comprueba que el dendrímero $G_2-[CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2SO_3^-Na^+)_2]_8$ **56** posee un efecto antiinflamatorio, este tendría un valor añadido a la hora de ser utilizado como agente antiviral. Es por este motivo por el que el compuesto **56** fue sometido a

un ensayo de capacidad antiinflamatoria. Para llevar a cabo este experimento se utilizó la línea celular Jurkat que se emplea en estudios sobre la comunicación celular en linfocitos T (responsables de coordinar la respuesta inmune celular). Estas células fueron transfectadas con los plásmidos indicadores pTNF-luc y pNF- κ B-luc. Estos plásmidos están marcados con luciferasa para poder llevar a cabo un seguimiento de la cascada de reacciones que se producen en el proceso inflamatorio, ya que codifican para TNF α y NF- κ B que son dos moléculas implicadas en dicho proceso

TNF α interactúa con receptores en las células endoteliales, lo que produce un aumento de la permeabilidad vascular permitiendo el acceso de los leucocitos a la zona infectada. NF- κ B-luc es una proteína marcada con luciferasa que regula la transcripción de ADN. Una mala regulación de esta proteína puede desencadenar enfermedades inflamatorias.

A continuación, las células fueron estimuladas durante 16h con el fin de desencadenar la cascada de reacciones que dan lugar al proceso inflamatorio. Como agentes estimulantes de dicho proceso se utilizaron las moléculas que aparecen en las Figuras V.11., (A) y (B). Estas moléculas son:

i) TNF α . Se trata de una hormona que transmite información a través de todo el organismo y que regula la actividad de la célula que la produce.

ii) Anticuerpo monoclonal anti-TNF α (aTNF α), que inhibe a la citoquina TNF α .

iii) Diferentes concentraciones (5 y 10 μ M) del dendrímero aniónico G₂-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₈ **56**.

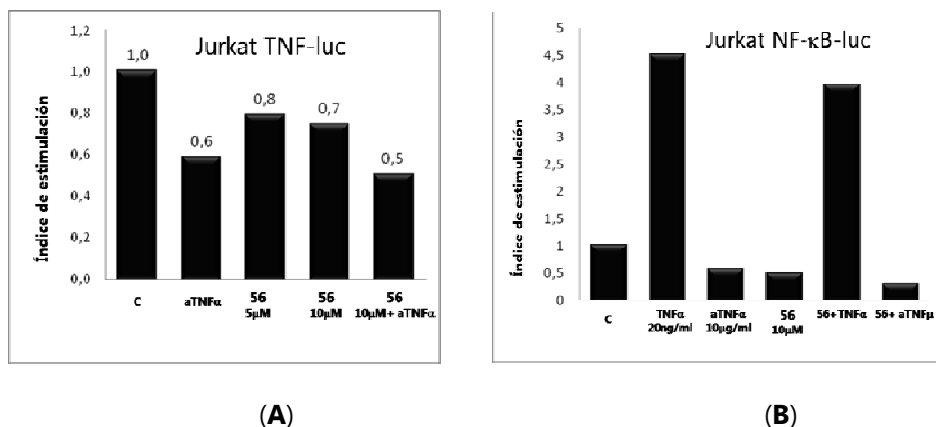


Figura V.11. Inflamación de células Jurkat frente a diferentes estímulos.

En la Figura V.11.(A), se ha cuantificado la cantidad de TNF-luc. El control se refiere al máximo índice de estimulación de las células con TNF α . Al añadir a las células estimuladas el anticuerpo monoclonal aTNF α , se produce una disminución de la producción de TNF-luc, lo que indica que disminuye la inflamación. Cuando estas células son tratadas con concentraciones crecientes del dendrímero **56**, se produce también una disminución del índice de estimulación, la cual es más acusada cuando las células se tratan con el dendrímero **56** y aTNF α de manera conjunta.

En la Figura V.11.(B), se cuantifica la producción de NF- κ B-luc. El control representa, de nuevo, la estimulación con TNF α . Al estimular las células con más moléculas de TNF α , se produce un aumento de la producción de NF- κ B-luc, aumenta la inflamación. Al añadir el anticuerpo aTNF α , se produce una disminución de la inflamación. La adición 10 μ M (37 mg/ml) del dendrímero G₂-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₈ **56**, produce un efecto similar al de aTNF α , por lo tanto se reduce la inflamación. El dendrímero está actuando como agente antiinflamatorio.

Si estas células se vuelven a estimular con una mezcla de $\text{TNF}\alpha$ y el dendrímero **56**, el aumento de la producción de $\text{NF-}\kappa\text{B-luc}$ es menor que si se estimulan sólo con $\text{TNF}\alpha$, por lo tanto se comprueba que el dendrímero está ejerciendo un efecto antiinflamatorio.

Por otro lado, se produce un efecto sinérgico entre el compuesto **56** y el anticuerpo $\alpha\text{TNF}\alpha$, ya que la acción conjunta de estos hace que la producción de $\text{NF-}\kappa\text{B-luc}$ sea aún menor que si se utilizan el dendrímero o el anticuerpo monoclonal solos, por lo que disminuye más la inflamación.

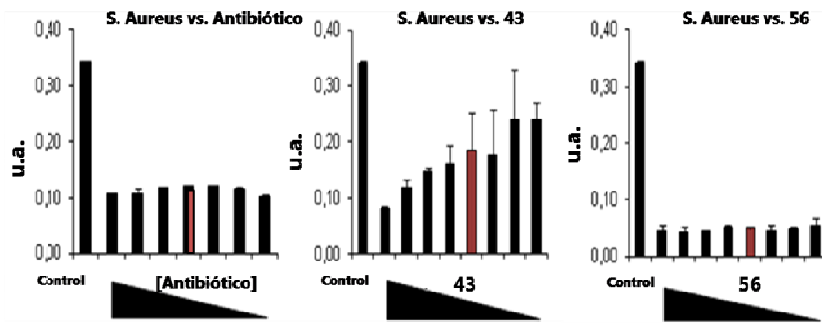
Por lo tanto, el dendrímero **56**, se puede considerar como un agente antiinflamatorio, lo que potencia su actividad como antiviral frente al VIH.

V.2.3. Evaluación del efecto antibacteriano.

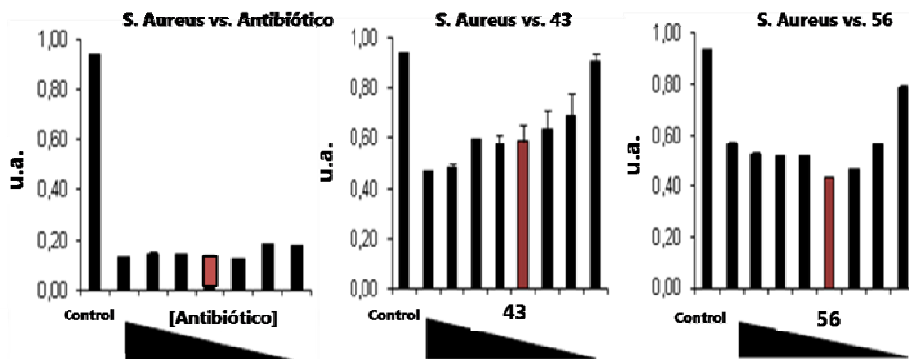
Como ya se ha comentado, cuando se produce un episodio inflamatorio el ataque del VIH es más favorable. El proceso inflamatorio se puede dar por múltiples causas, de entre ellas cabe destacar la acción de las bacterias, por lo que también es interesante llevar a cabo un estudio preliminar de la actividad bactericida de estos sistemas polianiónicos.

Con el fin de analizar la capacidad antibacteriana de los dendrímeros $\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_8$ **43** y $\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_8$ **56**, se ha estudiado el efecto bacteriostático y bactericida (capacidad para frenar el crecimiento bacteriano y matar a la bacteria respectivamente), en bacterias Gram+ como es *Staphylococcus aureus*, como modelo de experimentación, frente ampicilina (Gobemicina[®], Laboratorios Normon), el cual es un antibiótico de la familia de las penicilinas capaz de internalizarse en bacterias Gram+ y en algunas Gram-.

En la Figura V.13., se muestra el efecto bacteriostático y bactericida de ambos dendrímeros. Se cumple en ambos casos que el efecto bactericida \geq efecto bacteriostático. Para este estudio se han utilizado concentraciones decrecientes tanto de antibiótico como de los dendrímeros **43** y **56**.



(A)



(B)

Figura V.13. Efecto bacteriostático (A) y bactericida (B) de los dendrímeros **43** y **56**.

En la Figura V.13.(A), se observa que a concentraciones decrecientes de ambos dendrímeros la capacidad bacteriostática del dendrímero **43** decrece, sin embargo para el dendrímero **56** dicha actividad se mantiene constante a lo

largo del rango de concentraciones ensayado (de 160 μM a 1.25 μM), al igual que ocurre con el antibiótico. En todo caso, a una concentración de 10 μM , el dendrímero con grupos sulfonato **56** es un agente antibacteriano más potente que su análogo terminado en grupos carboxilato **43**.

En cuanto al efecto bactericida, en la Figura V.13.(B), se puede observar que, a una concentración de 10 μM , barra en rojo, los dendrímeros **43** y **56** presentan respectivamente un 40% y un 60% de efecto bactericida, de modo que el dendrímero $\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_8$ **56**, es ligeramente más efectivo que el dendrímero $\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{Na}^+)_2]_8$ **43**. No obstante ambas moléculas poseen un efecto bactericida menor que la del antibiótico Gobemicina.

Este ensayo de capacidad antibacteriana confiere un valor añadido al uso dendrímero $\text{G}_2\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)_2]_8$ **56** como agente antiviral, ya que el efecto antibacteriano de éste hace posible que disminuya la proliferación bacteriana, reduciendo de este modo el riesgo de aparición de un proceso inflamatorio, que como se ha comentado, está relacionado con una mayor probabilidad de infección por VIH.

V.3. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1996**, 6, 692-702.
- [2] W. B. Turnbull, S. A. Kalovidouris, J. F. Stoddart, *Chem.-Eur. J.*, **2002**, 8, 2988-3000.
- [3] J. Rojo, R. Delgado, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2004**, 54, 579-581.
- [4] M. N. Matrosovich, L. V. Mochalova, V. P. Marinina, N. E. Byramova, N. V. Bovin, *FEBS Lett.*, **1990**, 272, 209-212.
- [5] N. E. Byramova, L. V. Mochalova, I. M. Belyanchikov, M. N. Matrosovich, N. V. Bovin, *J. Carbohydr. Chem.*, **1991**, 10, 691-700.
- [6] R. Roy, F. O. Andersson, G. Harms, S. Kelm, R. Schauer, *Angew. Chem.-Int. Edit. Engl.*, **1992**, 31, 1478-1481.
- [7] G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 3789-3800.
- [8] J. D. Reuter, A. Myc, M. M. Hayes, Z. H. Gan, R. Roy, D. J. Qin, R. Yin, L. T. Piehler, R. Esfand, D. A. Tomalia, J. R. Baker, *Bioconjug. Chem.*, **1999**, 10, 271-278.
- [9] K. Matsuoka, M. Terabatake, Y. Saito, C. Hagihara, Y. Esumi, D. Terunuma, H. Kuzuhara, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1998**, 71, 2709-2713.
- [10] K. Matsuoka, H. Oka, T. Koyama, Y. Esumi, D. Terunuma, *Tetrahedron Letters*, **2001**, 42, 3327-3330.
- [11] H. Oka, T. Onaga, T. Koyama, C. T. Guo, Y. Suzuki, Y. Esumi, K. Hatano, D. Terunuma, K. Matsuoka, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2008**, 18, 4405-4408.
- [12] K. Sadler, J. P. Tam, *Reviews in Molecular Biotechnology*, **2002**, 90, 195-229.
- [13] J. P. Tam, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1988**, 85, 5409-5413.
- [14] J. P. Tam, *J. Immunol. Methods*, **1996**, 196, 17-32.
- [15] N. Yahy, J. M. Sabatier, S. Baghdiguiian, F. Gonzalezscarano, J. Fantini, *J. Virol.*, **1995**, 69, 320-325.
- [16] E. Carrier, K. Mabrouk, M. Moulard, *J. Peptide Res.*, **2000**, 56, 427-437.
- [17] M. Witvrouw, V. Fikkert, W. Pluymers, B. Matthews, K. Mardel, D. Schols, J. Raff, Z. Debyser, E. De Clercq, G. Holan, C. Pannecouque, *Mol. Pharmacol.*, **2000**, 58, 1100-1108.

- [18] C. S. Dezzutti, V. N. James, A. Ramos, S. T. Sullivan, A. Siddig, T. J. Bush, L. A. Grohskopf, L. Paxton, S. Subbarao, C. E. Hart, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, *48*, 3834-3844.
- [19] A. Rosa Borges, C.-L. Schengrund, *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, **2005**, *5*, 247-254.
- [20] J. Rojo, R. Delgado, *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, **2007**, *6*, 151-174.
- [21] N. Bourne, L. R. Stanberry, E. R. Kern, G. Holan, B. Matthews, D. I. Bernstein, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2000**, *44*, 2471-2474.
- [22] J. I. Sakamoto, T. Koyama, D. Miyamoto, S. Yingsakmongkon, K. Hidari, W. Jampangern, T. Suzuki, Y. Suzuki, Y. Esumi, K. Hatano, D. Terunuma, K. Matsuoka, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2007**, *17*, 717-721.
- [23] M. Witvrouw, E. DeClercq, *General Pharmacology-the Vascular System*, **1997**, *29*, 497-511.
- [24] R. F. Schinazi, M. Brettreich, A. Hirsch, *US patent and Trademark Office number 2003036562*, **2003**.
- [25] D. I. Bernstein, L. R. Stanberry, S. Sacks, N. K. Ayisi, Y. H. Gong, J. Ireland, R. J. Mumper, G. Holan, B. Matthews, T. McCarthy, N. Bournel, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2003**, *47*, 3784-3788.
- [26] Y. H. Gong, B. Matthews, D. Cheung, T. Tam, I. Gadawski, D. Leung, G. Holan, J. Raff, S. Sacks, *Antiviral Res.*, **2002**, *55*, 319-329.
- [27] D. W. Dixon, A. F. Gill, L. Giribabu, A. N. Vzorov, A. B. Alam, R. W. Compans, *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, *99*, 813-821.
- [28] T. D. McCarthy, P. Karellas, S. A. Henderson, M. Giannis, D. F. O'Keefe, G. Heery, J. R. A. Paull, B. R. Matthews, G. Holan, *Mol. Pharm.*, **2005**, *2*, 312-318.
- [29] L. Griffe, M. Poupot, P. Marchand, A. Maraval, C. O. Turrin, O. Rolland, P. Metivier, G. Bacquet, J. J. Fournie, A. M. Caminade, R. Poupot, J. P. Majoral, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2007**, *46*, 2523-2526.



CAPÍTULO VI

“PARTE EXPERIMENTAL”

VI.1. CONDICIONES GENERALES DE TRABAJO.

La mayoría de las reacciones que se describen en esta memoria, así como la manipulación de los reactivos y productos, se han llevado a cabo en condiciones de atmósfera inerte utilizando técnicas de Schlenk en línea de vacío/argón (argón tipo UN-45, suministrado por la empresa Air Liquide, con cantidades de O₂ y H₂O ≤ 3 ppm). Cuando la manipulación y caracterización de los productos era más sensible al aire o la humedad, se utilizó una caja seca MBraun, modelo MB 150-GII, con contenidos de O₂ inferior a 1 ppm y de H₂O inferior a 0.1 ppm.

VI.2. PRODUCTOS DE PARTIDA UTILIZADOS.

Los disolventes orgánicos empleados en la síntesis, salvo la acetona, metanol, etanol y el agua deuterada, que se emplearon sin tratamiento previo, fueron purificados, secados, destilados y recogidos bajo atmósfera inerte utilizando métodos tradicionales tal y como se describe en la bibliografía.^[1] En la tabla VI.1., se recogen los disolventes deuterados y desecantes utilizados en este trabajo.

Disolvente	Desecante
CDCl ₃	CaH ₂
CD ₂ Cl ₂	CaH ₂
C ₆ D ₆	Sodio
Acetona-d ₆	Tamiz molecular 4 Å*
CD ₃ CN	Tamiz molecular 4 Å*
DMF	Tamiz molecular 4 Å

* Sin destilación

Tabla VI.1. Disolventes y desecantes empleados.

En el caso de los disolventes orgánicos hexano, dietil éter, tolueno, THF y diclorometano se empleó el sistema de purificación tipo MB-SPS. 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.

En la tabla VI.2., se recogen los reactivos de partida utilizados, la casa comercial que los suministra. Todos los reactivos comerciales se han utilizado tal y como se recibieron de la casa comercial a excepción de NEt_3 que se secó con CaH_2 y se destiló posteriormente antes de su uso.

Reactivo	Casa comercial	Reactivo	Casa comercial
HSiClMe_2	ABCR	$\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.03M en MeOH	Aldrich
HSiCl_2Me	Aldrich	K_2CO_3	Panreac
HSiEt_3	SDS	NaI	Panreac
$\text{EtSi}(\text{Me})_2\text{CH}_2\text{Cl}$	Aldrich	HCl 1.0 M en dietil éter	Aldrich
SiCl_4	Aldrich	$(\text{CH}_2\text{CHCH}_2)\text{C}_6\text{H}_3(\text{OMe})(\text{OH})$ "Eugenol"	Aldrich
$\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{MgBr}$	Aldrich	MgSO_4 anhidro	Panreac
LiAlH_4	Aldrich	CaCO_3 anhidro	Panreac
Alilamina	Aldrich	$\text{CH}_2\text{CHSO}_3\text{Na}$ 30% wt en agua	Aldrich
$\text{EtNH}(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$	Aldrich	$\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Me}$	Aldrich
18-Corona-6	Aldrich	NaOH	Panreac
MeI 1.0 M en dietil éter	Aldrich	$\text{CH}_2\text{CHCOOMe}$	Aldrich
${}^n\text{BuLi}$ 2.5 M en dietil éter	Aldrich	$\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{Br}$	Aldrich
Catalizador de Karsted	Aldrich	$(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})$	Aldrich
NEt_3	Fluka		

Tabla VI.2.- Reactivos y productos utilizados.

Los dendrímeros con estructura carbosilano con enlaces Si-Cl terminales $\text{G}_n\text{-Cl}_m$ ^[2] con grupos hidruro $\text{G}_n\text{-H}_m$ ^[2,3] con grupos $-\text{CH}_2\text{Cl}$ tales como

$G_n(\text{CH}_2\text{Cl})_m$,^[4] y con grupos $-\text{NH}_2$ en la periferia del tipo $\text{Et}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $G_n-[(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]_m$,^[5] fueron preparados según los métodos descritos en la bibliografía. Por otro lado, el reactivo $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Me})_2$, se ha preparado utilizando alilamina y acrilato de metilo en exceso.^[6]

VI.3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES.

Análisis elemental de C, H, N y S.

Los análisis cuantitativos de C, H, N y S de los compuestos que se han sintetizado en este trabajo, se han realizado en el Centro de Apoyo a la Investigación en Química de la Universidad de Alcalá en un microanalizador LECO CHNS-932. Para los compuestos higroscópicos, las muestras se prepararon en atmósfera inerte dentro de la caja seca utilizando cápsulas cilíndricas de aluminio las cuales, después de introducir el compuesto, se sellan para evitar la entrada de aire o humedad.

Espectroscopía de RMN.

Los espectros de RMN se registraron en equipos Varian modelos Unity-500+, Unity-300, Mercury-300 o Gemini-200. Todos ellos se han realizado a temperatura ambiente (25°C). Los desplazamientos químicos (δ), se expresan en ppm y se referencian respecto a SiMe_4 (TMS) como referencia externa (0.00 ppm), tomando como referencia interna la señal residual de ^1H , ^{13}C y de ^{29}Si de los disolventes deuterados, mientras que los desplazamientos químicos de ^{15}N y ^{19}F se referencian respecto a CH_3NO_2 y CFCl_3 como referencia externa.

Los coeficientes de difusión se han medido a 25°C usando el pulso Dbppste (DOSY Bipolar Pulse Simulated Echo) en un equipo Varian NMR 500 equipado con una unidad de temperatura variable con precisión ± 0.1 °C, un amplificador Performa IVPFG y, una sonda Z-PFG de triple resonancia de 5 mm.

La calibración de la intensidad del PFG strength (DAC_to_G unit), se realizó con una muestra estándar H₂O/HDO (2Hz) suministrada por Varian ($D = 13.4 \times 10^{-10}$ m²/s a 25°C). Los datos de difusión se adquirieron con 64 escaneos, pw90, tiempo de adquisición de 3 s, retardo de relajación 2 s, en cada uno de los 15 pasos de la matriz de nivel del gradiente entre 1 y 50 G/cm (50 ms de retraso de difusión y 2 ms de tiempo total de defocusing). Los datos experimentales (32 K x 1 K) se trataron con el software para DOSY de VNMRJ2.1B.

Espectroscopía UV.

Los espectros de UV han sido registrados en un espectrómetro Perkin-Elmer UV-Vis Lambda-18 entre 200 y 800 nm, equipado con un detector fotomultiplicador de doble haz.

Cromatografía de Permeación en Gel (GPC).

Los cromatogramas de los dendrímeros **38-40**, se obtuvieron en la Planta Piloto de Química Fina de la Universidad de Alcalá, en un equipo de HPLC analítico VARIAN INERT, equipado con un detector ELSD (Evaporative Light Scattering) de fotodiodo capaz de trabajar en un rango de temperatura de 30-300°C y a una presión máxima de 150 psi. El sistema de bombeo modelo INERT 9012, está equipado con un detector GPC-Varian PLS 1000.ECC 25, un inyector automático modelo AL-200 y un horno de columna modelo 510. El equipo se completa con una columna Plgel Mixed-D (300 X 7.5 mm) de Polymer Laboratories. Como eluyentes se han utilizado THF y H₂O y como referencia se utiliza polietileno.

Espectrometría de masas.

Los espectros de masas obtenidos por las técnicas de CG, APCI, ESI y Maldi-TOF se llevaron a cabo en el Centro de Apoyo a la Investigación en Química de

la Universidad de Alcalá en un espectrómetro Termo Quest Finnigan Automass Multispectrometer (APCI), empleando acetonitrilo como disolvente y diclorometano en el caso de CG, o en un equipo Agilent G3250AA LC/MSD TOF Multi (Maldi) utilizando una matriz de 1,8,9-trihidroxiantraceno (ditranol). También se realizaron análisis de masas Maldi-TOF y ESI-TOF en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SidI), en el área de espectrometría de masas de la universidad Autónoma de Madrid. Las muestras para Maldi-TOF en este caso también se prepararon en una matriz de ditranol, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y en ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACC), cuando la muestra así lo requería y, los espectros se registraron en un espectrómetro Ultraflex III de Bruker equipado con un láser de nitrógeno emitiendo a 337 nm, operando en modo de reflexión con un voltaje acelerado en el rango de 23-25 kV. En el caso de los análisis por ESI-TOF las muestras se introdujeron vía infusión directa en un espectrómetro de masas con analizador híbrido QTOF, modelo QSTAR pulsar i de la casa comercial Applied Biosystems.

Valoración Potenciométrica.

La valoración de los dendrímeros **42-44** y **55-57** se ha llevado a cabo en el departamento de Química Analítica de la Universidad de Alcalá mediante una valoración potenciométrica ácido-base con un pHmetro DISMADEL, código 2502+5050, con el cual es posible detectar el punto de equivalencia ya que en este punto el pH experimenta un gran cambio. De la representación gráfica del pH medido frente al volumen de valorante gastado se puede obtener una curva de valoración. Este tipo de valoraciones son muy exactas, ya que con frecuencia el punto final (punto de inflexión de la curva) coincide con el punto de equivalencia. Como agente valorante se prepararon disoluciones de HCl 0.0105 y 0.0102M, las cuales fueron valoradas previamente por triplicado con el patrón primario Na_2CO_3 0.001M.

Espectrofluorimetría.

Las medidas de fluorescencia se han realizado en el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacológica de la Universidad de Alcalá en un espectrofluorímetro Simazu RF-540. La longitud de onda de excitación a la que se ha tomado las medidas es de 285 nm, registrándose la señal de fluorescencia a una longitud de onda de 315 nm.

Los ensayos biomédicos se han realizado en el Laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid.

Electroforesis en gel y microscopía confocal.

Para las pruebas de electroforesis se emplearon geles de agarosa al 3%, de doble pocillo y con pequeñas cantidades de bromuro de etidio que permite visualizar de forma más sencilla el ADN. Para la realización de la electroforesis se aplica un campo de 100 V durante 30 min. Las fotografías digitales de los geles se obtienen tras la exposición de éstos a la luz ultravioleta utilizando un software de Kodak para fotografía de geles teñidos.

En el caso de la microscopía confocal, se utiliza un microscopio confocal modelo Leica TCD SP2 en diferentes líneas de excitación: 405, 488 y 514 nm con un objetivo de contraste diferencial óptico. Tras la captura de las imágenes del medio celular, estas son analizadas mediante un software de Leica. 3.1.

Tinciones con Azul Tripan.

Se preparó una solución con Azul Tripan (Sigma® al 0,8%). Las células tratadas con los dendrímeros se centrifugaron y se decantó el sobrenadante;

tras resuspender el sedimento celular, se trató con la solución de Azul Tripán durante 30 segundos, procediéndose a centrifugación-lavado posteriormente con PBS (suero) dos veces. Las células se observaron bajo microscopía óptica y se contaron las positivas para la presencia de Azul Tripán (células azules, muertas) en relación con el porcentaje de células negativas (células vivas). Para ello se seleccionó un campo amplio con al menos 100 células cada vez.

Ensayo MTT.

Tras el tiempo deseado de incubación de las distintas poblaciones celulares con diferentes concentraciones de dendrímeros en placa de 96 pocillos (100.000 células/pocillo respectivamente), y con 3 pocillos como control positivo de inactividad celular [20% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma®)], el sobrenadante que contenía dendrímero se retiró y se sustituyó por 200 µl de un medio de cultivo sin suero ni rojo fenol (Opti-MEM®). Además de los 200 µl de Opti-MEM®, se añadieron 20 µl de MTT filtrado previamente para conseguir su esterilidad (Azul de Tiazolil, Sigma®) en PBS a una concentración de 5 mg/ml (concentración final en pocillo de 0,5 mg MTT/ml). Después de 4 horas de incubación en condiciones de cultivo, se procedió a la centrifugación de la placa a 2000 r.p.m. 10 minutos y a la posterior retirada del sobrenadante con el exceso MTT que no reaccionó. Los cristales de formazán se observaron al microscopio de contraste de fase y se disolvieron posteriormente con 200 µl de DMSO. La placa se agitó a 700 r.p.m. en un agitador Eppendorf® para asegurar la correcta disolución de dichos cristales. La concentración de formazán se determinó por espectrofotometría utilizando un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm con una referencia de 690 nm. El espectrofotómetro se calibró a 0 utilizando Opti-MEM® sin células. La viabilidad celular relativa (%) respecto del control (células sin tratar) se calculó en base a la fórmula: $[A] \text{ test} /$

[A] control x 100. Cada concentración de dendrímero se ensayó por triplicado, siguiendo las directivas del ATCC.

Ensayo de LDH.

Se dispensaron en placa de 96 pocillos de fondo redondo 1×10^5 células/pocillo en un volumen de 100 μl de medio completo y se añadió el dendrímero en un volumen de 100 μl , para obtener un volumen final en el pocillo de 200 μl . Controles: 1. 200 μl de medio completo sin células (background control); 2. 100 μl de células + 100 μl de medio completo; 3. 100 μl de células + 100 μl de tritón X-100 al 0,2%; 4. 100 μl de células + 100 μl con el dendrímero a la concentración deseada. Se incubaron en condiciones de cultivo durante las primeras 24h. Se centrifugó la placa a 1500 r.p.m. 10 minutos y se retiraron 100 μl de sobrenadante, con cuidado de no llevarse las células. Se añadió 100 μl de mezcla de reacción preparada en el momento sobre los 100 μl de sobrenadante y se incubó a temperatura ambiente 30 minutos y en oscuridad. Finalmente, se midió a 490 nm y 690 nm de referencia. La citotoxicidad se obtuvo de la siguiente fórmula: $\text{Citotoxicidad (\%)} = (4 - 2)/(3 - 2) \times 100$

Actividad antimicrobiana.

Los ensayos de actividad bactericida se han llevado a cabo en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Alcalá. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los productos se determinó en microplacas de 96 pocillos, utilizando los métodos estándar ISO 20776-1. 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). Se preparan cuatro disoluciones madre de los productos disolviendo 0.01024 g, 0.0128 g, 0.0016 g y 0.0020 g de los compuestos en 30 μl de dimetil sulfóxido (DMSO), cuando la muestra lo requería y, se llevaron hasta los volúmenes finales de 10 ml, 100 ml, 100 ml y 1000 ml con agua destilada estéril, respectivamente. Las microplacas se incubaron a 37°C durante 24 h utilizando un lector de microplacas ELX808iu (Bio-Tek Instruments). La concentración mínima bactericida (CMB) se calcula inoculando 3 μl de las muestras utilizadas para el cálculo de CMI, en una placa de Petri con agar Mueller–Hinton (ref. 02–136, Scharlau). Tras 24 h de incubación a 37°C, se midió la presencia de colonias.

VI.4. DESCRIPCIÓN DE LAS PREPARACIONES.

VI.4.1. Dendrímeros funcionalizados mediante hidrosililación de la amina [(CH₂=CHCH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)].

VI.4.1.1. Preparación de [(CH₂=CHCH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)] (1).

Sobre una disolución en Et₂O (250 ml) de la amina comercial EtNHCH₂CH₂NMe₂ (7.5 g, 64.5 mmol) se añade en frío y lentamente BuLi (64.5 mmol, 25.8 ml). Se deja que la reacción progrese a temperatura ambiente durante 30 minutos y se procede a bajar la temperatura a –70°C de nuevo con un baño de CO₂/Acetona. Se añade entonces CH₂=CHCH₂Br (7.81 g, 64.5 mmol). La mezcla así preparada se deja agitando a temperatura ambiente durante 12 horas, tras evaporar el disolvente se obtiene un sólido blanco que resulta ser el aducto de la amina con LiBr. Para su purificación se disuelve este aducto en éter dietílico y se hace extracción líquido-líquido con 50x3 ml de una disolución de Na₂CO₃/H₂O. La fase orgánica se seca durante 3 horas con MgSO₄, se filtra a

vacío y se evapora en trompa de agua (bajo vacío) obteniendo así la amina pura como un líquido volátil de color amarillo (4.01 g, 40%).

Datos para **1**: **RMN-¹H (CDCl₃)**: δ 5.83 (m, 1H, CH₂=CHCH₂-), 5.10 (m, 2H, CH₂=CHCH₂-), 3.08 (m, 2H, CH₂=CHCH₂-), 2.52 (m, 4H, -NCH₂CH₂NMe₂ y -NCH₂CH₃), 2.35 (m, 2H, -NCH₂CH₂NMe₂), 2.19 (s, 6H, -NMe₂), 0.99 (t, *J*_{H-H}=7.1 Hz, 3H, -NCH₂CH₃).

RMN-¹³C (CDCl₃): δ 135.8 (CH₂=CHCH₂-), 117.2 (CH₂=CHCH₂-), 57.5 (-NCH₂CH₂NMe₂), 57.2 (CH₂=CHCH₂-), 51.0 (-NCH₂CH₂NMe₂), 47.7 (-NCH₂CH₃), 45.9 (-NCH₂CH₂NMe₂), 11.6 (-NCH₂CH₃).

RMN-¹⁵N {¹H} (CDCl₃): δ -355.8 (NMe₂), -338.6 (NCH₂CH₃).

Análisis elemental C₉H₂₀N₂: Calc %: C, 69.23; H, 12.82; N, 17.95; Exp. % C, 69.61; H, 12.35; N, 17.15.

MS (CG en CH₂Cl₂): *m/z* Calc. 157; Exp. 157.

Datos para **1**·LiBr: **RMN-¹H (CDCl₃)**: δ 6.14 (m, 1H, CH₂=CHCH₂-), 5.18 (m, 2H, CH₂=CHCH₂-), 3.28 (m, 2 H, CH₂=CHCH₂-), 2.71 (q, 2H, -NCH₂CH₃), 2.52 (m, 2H, -NCH₂CH₂NMe₂ ó -NCH₂CH₂NMe₂), 2.39 (m, 2H, -NCH₂CH₂NMe₂ ó -NCH₂CH₂NMe₂), 2.32 (s, 6H, -NMe₂), 1.09 (t, *J*_{H-H}=7.3 Hz, 3H, -NCH₂CH₃).

Análisis elemental BrC₉H₂₀LiN₂: Calc. %: C, 44.46; H, 8.29; N, 11.52; Exp. %: C, 44.32; H, 7.70; N, 11.56.

VI.4.1.2. Preparación de [(Et₃SiCH₂CH₂CH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)] (**2**).

Sobre la diamina [(CH₂=CHCH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)] **1** (0.28 g, 1.82 mmol) preparada como se ha descrito anteriormente, se añade una disolución de trietilsilano (HSiEt₃) (0.21 g, 1.82 mmol) en tolueno (3 ml) y 1 gota del catalizador de Karsted. Esta mezcla se deja agitando durante 24h a 120°C. Tras

evaporar el disolvente se obtiene el compuesto **2** como un aceite de color marrón, que se purifica mediante cromatografía en columna de exclusión por tamaños de Bio-Beads S-X1 con tolueno como eluyente (0.36 g, 73%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 2.51 (m, 4H, -NCH₂CH₃ y -NCH₂CH₂NMe₂), 2.36 (m, 4H, -NCH₂CH₂NMe₂ y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.21 (s, 6H, -NMe₂), 1.40 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.99 (t, *J*_{H-H}=7.1 Hz, 3H, -NCH₂CH₃), 0.89 (t, *J*_{H-H}=8.0 Hz, 9H, -SiCH₂CH₃), 0.47 (m, 6H, -SiCH₂CH₃), 0.41 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N-).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 58.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 57.7, (-NCH₂CH₂NMe₂), 51.6 (-NCH₂CH₂NMe₂), 47.9 (-NCH₂CH₃), 45.9 (-NMe₂), 21.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 11.6 (-NCH₂CH₃), 8.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 7.3 (-SiCH₂CH₃), 3.2 (-SiCH₂CH₃).

RMN-¹⁵N {¹H} (CDCl₃): δ -355.7 (NMe₂), -338.1 (NCH₂CH₃).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ 7.0 (G₀-Si).

MS (APCI en CH₃CN/H₂O): *m/z* Calc. 272.26 [M]; Exp. 273.27 [M+H]⁺.

Análisis elemental C₁₅H₃₆N₂Si: Calc. %: C, 66.17; H, 13.23; N, 10.29; Exp. %: C, 65.41; H, 12.83; N, 9.57.

VI.4.1.3. Preparación de G₁-[(CH₂CH₂CH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)]₄ (**3**).

Sobre la diamina [(CH₂=CHCH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)] **1** (0.79 g, 5.04 mmol) preparada como se ha descrito anteriormente, se añade una disolución del dendrímero G₁-H₄ (0.52 g, 1.20 mmol) en tolueno (3 ml) y 1 gota del catalizador de Karstedt. Esta mezcla se deja agitando durante 12 h a 120°C. Tras evaporar el disolvente se obtiene el compuesto **3** como un aceite de color marrón, que se purifica mediante cromatografía en columna de exclusión por tamaños de Bio-Beads S-X1 con tolueno como eluyente (1.1 g, 87%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 2.51 (m, 16H, -NCH₂CH₃ y -NCH₂CH₂NMe₂), 2.36 (m, 16H, -NCH₂CH₂NMe₂ y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.20 (s, 24H, -NMe₂), 1.39 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.26 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.98 (t, *J*_{H-H}=7.1 Hz, 12H, -NCH₂CH₃), 0.52 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.38 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.08 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 57.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 57.7, (-NCH₂CH₂NMe₂), 51.6 (-NCH₂CH₂NMe₂), 48.0 (-NCH₂CH₃), 45.9 (-NMe₂), 21.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.3, 18.5, 17.5 (-Si(CH₂)₃Si-), 13.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 11.7 (-NCH₂CH₃), -3.3 (-SiMe₂).

RMN-¹⁵N {¹H} (CDCl₃): δ -356.0 (NMe₂), -337.8 (NCH₂CH₃).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ 0.6 (G₀-Si), 1.95 (G₁-Si).

MS (MALDI-TOF en Ditranol disuelto en THF): *m/z* Calc. 1057.9 [M]; Exp. 1058.0 [M+H]⁺.

Análisis elemental C₅₆H₁₃₂N₈Si₅: Calc. %: C, 63.56; H, 12.57; N, 10.59; Exp. %: C, 63.11; H, 12.10; N, 10.07.

VI.4.1.4. Preparación de G₂-[(CH₂CH₂CH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)]₈ (**4**).

El dendrímero de segunda generación se prepara de un modo similar al descrito para **3**, partiendo de la diamina [(CH₂=CHCH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)] **1** (0.35 g, 2.18 mmol) y del dendrímero G₂-H₈ (0.31 g, 0.26 mmol). Se obtiene de este modo el compuesto **4** como un aceite de color amarillo, que se purifica mediante cromatografía en columna de exclusión por tamaños de Bio-Beads S-X1 con tolueno como eluyente (0.51 g, 79%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 2.51 (m, 32H, -NCH₂CH₃ y -NCH₂CH₂NMe₂), 2.36 (m, 32H, -NCH₂CH₂ NMe₂, -SiCH₂CH₂CH₂ N-), 2.21 (s, 48H, -NMe₂), 1.38 (m, 16H, -

SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.27 (m, 24H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.98 (t, $J_{H-H}=7.1$ Hz, 24H, -NCH₂CH₃), 0.52 (m, 48H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.38 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.08 (s, 48H, -SiMe₂), -0.012 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 57.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 57.7 (-NCH₂CH₂NMe₂), 51.7 (-NCH₂CH₂NMe₂), 48.0 (-NCH₂CH₃), 45.9 (NMe₂), 21.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.1-17.7 (-Si(CH₂)₃Si-), 13.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 11.7 (-NCH₂CH₃), -3.3 (-SiMe₂), -5.0 (-SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (CDCl₃): δ -356.0 (NMe₂), -337.8 (NCH₂CH₃).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ (G₀-Si) no se observa, 1.0 (G₁-Si), 1.9 (G₂-Si).

MS (MALDI-TOF en Ditranol disuelto en THF): *m/z* Calc. 2429.0 [M]; Exp. 2429.2 [M].

Análisis elemental C₁₂₈H₃₀₀N₁₆Si₁₃: Calc. %: C, 63.29; H, 12.45; N, 9.23; Exp. %: C, 61.98; H, 11.93; N, 7.86.

VI.4.1.5. Preparación de G₃-[(CH₂CH₂CH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)]₁₆ (**5**).

El dendrímero de tercera generación se prepara siguiendo el mismo procedimiento descrito para los dendrímeros de 1^a y 2^a generación partiendo de la diamina [(CH₂=CHCH₂)N(Et)(CH₂CH₂NMe₂)] **1** (0.70 g, 3.36 mmol) y del dendrímero G₃-H₁₆ (0.50 g, 0.19 mmol). Se obtiene de este modo el dendrímero **5** como un aceite viscoso de color marrón, que se purifica mediante cromatografía en columna de exclusión por tamaños de Bio-Beads S-X1 con tolueno como eluyente (0.97 g, 99%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 2.53 (m, 64H, -NCH₂CH₃ y -NCH₂CH₂NMe₂), 2.41 (m, 64H, -NCH₂CH₂NMe₂ y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.21 (s, 96H, -NMe₂), 1.40 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.27 (m, 56H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.99 (t, $J_{H-H}=7.2$ Hz, 48H, -

NCH₂CH₃), 0.52 (m, 112H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.38 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.08 (s, 96H, -SiMe₂), -0.12 (s, 36H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 58.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 57.8 (-NCH₂CH₂NMe₂), 51.7 (-NCH₂CH₂NMe₂), 48.0 (-NCH₂CH₃), 46.0 (-NMe₂), 21.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.2- 17.5 (-Si(CH₂)₃Si-), 13.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 11.7 (-NCH₂CH₃), -3.2 (-SiMe₂), -4.9 (-SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (CDCl₃): δ -356.0 (NMe₂), -338.0 (NCH₂CH₃).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 0.9 (G₂-Si), 1.9 (G₃-Si).

Análisis elemental C₂₇₂H₆₃₆N₃₂Si₂₉: Calc. %: C, 63.18; H, 12.40; N, 8.67; Exp. %: C, 61.7; H, 11.62; N 7.81.

VI.4.1.6. Preparación de [(Et₃SiCH₂CH₂CH₂)N⁺(Me)(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃) 2CF₃SO₃⁻] (6).

Sobre una disolución del compuesto **2** (0.30 g, 1.15 mmol) en éter dietílico (25 ml), se añade un exceso de CF₃SO₃Me (0.7 ml, 6.52 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 48h a temperatura ambiente para después eliminar el exceso de CF₃SO₃Me lavando con éter dietílico. De este modo se obtiene el compuesto **6** como un sólido blanco soluble en agua (0.55 g, 84%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 3.76, 3.74 (m, 2 H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃ solapada con m, 2H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 3.35 (m, 2H, -N⁺CH₂CH₃), 3.24 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺), 3.14 (s, 9H, -N⁺Me₃), 3.01 (s, 3H, -N⁺Me), 1.60 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 1.26 (t, J_{H-H}=1.7 Hz, 3H, -N⁺CH₂CH₃), 0.92 (t, J_{H-H}=8.0 Hz, 9H, CH₃CH₂Si-), 0.55 (m, 6H, CH₃CH₂Si-), 0.48 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 63.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 56.6 (-N⁺CH₂CH₃), 56.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 52.4 (-N⁺Me₃), 51.8 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 46.9 (-N⁺Me), 15,8 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 7.2 (-N⁺CH₂CH₃), 6.8 (CH₃CH₂Si-), 6.7 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 2.1 (CH₃CH₂Si-).

RMN-¹⁹F {¹H} (DMSO): δ -73.84 CF₃SO₃.

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ 7.5 (G₀-Si).

MS (ESI⁺/TOF en H₂O/MeOH/NH₄HCOO 5 mM): m/z Calc. 600.22 [M]; Exp. 451.25 [M-CF₃SO₃]⁺.

Análisis elemental C₁₉H₄₂F₆N₂O₆S₂Si: Calc. %: C, 37.99; H, 7.05; N, 4.66; S, 10.67; Exp. %: C, 37.62; H, 7.12; N, 4.87; S, 10.87.

VI.4.1.7. Preparación de

G₁-{[(CH₂CH₂CH₂)N⁺(Me)(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃)]₄ 8CF₃SO₃⁻} (7).

Sobre una disolución del dendrímero **3** (0.54 g, 0.51 mmol) en éter dietílico (25 ml), se añade un exceso de CF₃SO₃Me (0.67 ml, 6.11 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 48h a temperatura ambiente para después eliminar el exceso de CF₃SO₃Me lavando con éter dietílico. De este modo se obtiene el dendrímero **7** como un sólido blanco soluble en agua (1,18 g, 98%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 3.81, 3.76 (m, 8H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃ solapado con m, 8H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 3.15 (m, 16H, -N⁺CH₂CH₃ y -SiCH₂CH₂CH₂ N⁺- solapado con s, 36H, -N⁺Me₃), 3.01 (s, 12H, -N⁺Me), 1.60 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 1.25 (m, 20H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -N⁺CH₂CH₃), 0.56 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.39 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), -0.012 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO): δ 63.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 56.5 (-N⁺CH₂CH₃), 56.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 52.4 (-N⁺Me₃), 51.9 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 46.9 (-N⁺Me), 18.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 17.5, 16.4, 15.7 (-Si(CH₂)₃Si-), 10.7 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 7.1 (-N⁺CH₂CH₃), -4.2 (-SiMe₂).

RMN-¹⁹F{¹H} (DMSO): δ -78.19 CF₃SO₃.

RMN-²⁹Si{¹H} (DMSO): δ 0.65 (G₀-Si), 2.60 (G₁-Si).

Análisis elemental C₇₂H₁₅₆F₂₄N₈O₂₄S₈Si₅: Calc. %: C 36.47; H, 6.63; N, 4.73; S, 10.82; Exp. %: C, 36.47; H, 6.59; N, 4.84; S, 10.91.

VI.4.1.8. Preparación de

G₂-{[(CH₂CH₂CH₂)N⁺(Me)(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃)]₈ 16CF₃SO₃⁻} (8).

El dendrímero de segunda generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el dendrímero de primera generación **7**, partiendo de una disolución de **4** (0.35 g, 0.014 mmol), éter dietílico (25 ml) y un exceso de CF₃SO₃Me (0.31 ml, 2.86 mmol).

De este modo se obtiene el compuesto **8** como un sólido blanco (0.70 g, 97%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 3.80, 3.76 (m, 16H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃, solapado con m, 16H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 3.15 (m, 32 H, -N⁺CH₂CH₃ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺- solapado con s, 72 H, -N⁺Me₃), 3.01 (s, 24 H, -N⁺Me), 1.59 (m, 16 H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 1.25 (m, 48 H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -N⁺CH₂CH₃), 0.52 (m, 48 H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.38 (m, 16 H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), -0.027 (s, 48 H, -SiMe₂), -0.118 (s, 12 H, -SiMe).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO): δ 63.3 (-SiCH₂CH₂CH₂ N⁺-), 56.4 (-N⁺CH₂CH₃), 56.0 (-N⁺CH₂CH₂ N⁺Me₃), 52.4 (-N⁺Me₃), 51.9 (-NCH₂CH₂ N⁺Me₃), 46.9 (N⁺Me), 18.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 17.7-15.7 (-Si(CH₂)₃Si-), 10.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 7.1 (-N⁺CH₂CH₃), -4.2 (-SiMe₂), -5.7 (-SiMe).

RMN-¹⁹F{¹H} (DMSO): δ -78.22 CF₃SO₃.

RMN-²⁹Si{¹H} (DMSO): δ (G₀-Si) no se observa, 1.1 (G₁-Si), 2.5 (G₂-Si).

Análisis elemental C₁₆₀H₃₄₈F₄₈N₁₆O₄₈Si₁₆: Calc. %: C, 38.02; H, 6.94; N, 4.43; S, 10.15; Exp. %: C, 38.93; H, 6.64; N, 4.25; S, 9.98.

VI.4.1.9. Preparación de

G₃-{[(CH₂CH₂CH₂)N⁺(Me)(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃)]₁₆ 32CF₃SO₃⁻} (9).

El dendrímero de tercera generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para **8**, partiendo de una disolución de **5** (0.41 g, 0.079 mmol) en éter dietílico (25 ml) y un exceso de CF₃SO₃Me (0.35 ml, 3.18 mmol). De este modo se obtiene el dendrímero **9** como un sólido blanco (0.66 g, 80%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 3.78 (m, 64H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 3.15 (m, 64H, -N⁺CH₂CH₃ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺ solapado con s, 144H, -N⁺Me₃), 3.01 (s, 48H, -N⁺Me), 1.59 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 1.24 (m, 88H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y N⁺CH₂CH₃), 0.51 (m, 112H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.38 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), -0.035 (s, 96H, -SiMe₂), -0.124 (s, 36H, -SiMe).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO): δ 63.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺), 56.4 (-N⁺CH₂CH₃), 56.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 52.4 (-N⁺Me₃), 52.0 (-NCH₂CH₂N⁺Me₃), 46.9 (-N⁺Me),

18.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 17.7-15.7 (-Si(CH₂)₃Si-), 10.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 7.1 (-N⁺CH₂CH₃), -4.3 (-SiMe₂), -5.74 (-SiMe).

RMN-¹⁹F{¹H} (DMSO): δ -77.77 CF₃SO₃.

RMN-²⁹Si{¹H} (DMSO): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 1.1 (G₂-Si), 2.4 (G₃-Si).

Análisis elemental C₃₃₆H₇₃₂F₉₆N₃₂O₉₆S₃₂Si₂₉: Calc. %: C, 38.72; H, 7.08; N, 4.30; S, 9.85; Exp. %: C, 37.61; H, 6.79; N 4.27; S, 9.82.

VI.4.1.10. Preparación de [(Et₃SiCH₂CH₂CH₂)N⁺H(Et)(CH₂CH₂N⁺HMe₂)₂Cl⁻] (10).

Sobre una disolución del compuesto **2** en THF (25 ml) (0.42 g, 1.5 mmol), se añade un exceso de HCl 1M en éter dietílico (7.0 ml, 6.89 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a temperatura ambiente y con agitación constante 48h. A continuación se evapora el disolvente en la línea de vacío para obtener el compuesto **10** como un sólido blanco (0.51 g, 96%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 11.30-11.10 (s ancho, 1H, N⁺H, solapado con s ancho, 1H, N⁺HMe₂), 3.48 (m, 4H, -N⁺H (CH₂)₂N⁺HMe₂), 3.10 (m, 2H, -N⁺HCH₂CH₃), 3.02 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.80 (s, 6H, N⁺HMe₂), 1.65 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.22 (t, 3H, -N⁺HCH₂CH₃), 0.91 (t, 9H, SiCH₂CH₃) 0.49 (m, 8H, -SiCH₂CH₃ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 54.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H), 49.0 (-N⁺HCH₂CH₂N⁺HMe₂), 46.4 (-N⁺HCH₂CH₃), 44.7 (-N⁺HCH₂CH₂N⁺HMe₂), 41.8 (N⁺HMe₂), 17.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 7.8 (-N⁺HCH₂CH₃), 7.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 6.8 (-SiCH₂CH₃), 2.2 (-SiCH₂CH₃).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -340.4 (N⁺HMe₂), -325.3 (N⁺H).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ 7.2 (G₀-Si).

MS (ESI⁺/TOF en H₂O/MeOH/NH₄HCOO 5mM): m/z Calc. 344.22 [M]; Exp. 273 [M-2Cl]⁺.

Análisis elemental C₁₅H₃₈Cl₂N₂Si: Calc. %: C, 52.15; H, 11.09; N, 8.11; Exp. %: C, 51.75; H, 10.35; N, 7.45.

VI.4.1.11. Preparación de

G₁-{[Si(CH₂CH₂CH₂)N⁺H(Et)(CH₂CH₂N⁺HMe₂)]₄ 8Cl⁻} (11).

El dendrímero de primera generación se sintetiza partiendo de una disolución del dendrímero **3** (0.46 g, 0.043 mmol) en THF (25 ml) y de un exceso de HCl 1M en éter dietílico (7.0 ml, 6.89 mmol). La mezcla se mantiene con agitación constante durante 48h. Tras evaporar el disolvente a vacío se obtiene el compuesto **11** como un sólido blanco soluble en agua (0.55 g, 95%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 11.51-11.35 (s ancho, 4H, N⁺H, solapado con s ancho, 4H, N⁺HMe₂), 3.54 (m, 16 H, -N⁺H(CH₂)₂N⁺HMe₂), 3.15 (m, 8H, -N⁺HCH₂CH₃), 3.02 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.80 (s, 24H, -N⁺HMe₂), 1.72 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.24 (m, 20H, -N⁺HCH₂CH₃ y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.56 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.43 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.03 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 54.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H), 49.0 (-N⁺HCH₂CH₂N⁺HMe₂), 46.3 (-N⁺HCH₂CH₃), 44.8 (-N⁺HCH₂CH₂N⁺HMe₂), 41.7 (-N⁺HMe₂), 18.9, 17.6, 17.1 (-Si(CH₂)₃Si-), 16.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 7.8 (-N⁺HCH₂CH₃), -3.9 (-SiMe₂).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -340.3 (N⁺HMe₂), -325.1 (N⁺H).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ 0.9 (G₀-Si), 2.5 (G₁-Si).

MS (MALDI/TOF en Ditranol disuelto en THF): m/z Calc. 1343.75 [M]; Exp. 1057.98 [M-8Cl-3H]⁺.

Análisis elemental C₅₆H₁₄₀Cl₈N₈Si₅: Calc. %: C, 49.83; H, 10.45; N, 8.30; Exp. %: C, 50.68; H, 11.30; N, 7.43.

VI.4.1.12. Preparación de

G₂-{[(CH₂CH₂CH₂)N⁺H(Et)(CH₂CH₂N⁺HMe₂)]₈ 16Cl⁻} (12).

El dendrímero de segunda generación se sintetiza siguiendo el mismo procedimiento que para el dendrímero de 1^a generación **11**, partiendo de una disolución del dendrímero **4** (0.37 g, 0.015 mmol) en THF y de un exceso de HCl 1M en éter dietílico (3 ml, 3.05 mmol). La mezcla se mantiene con agitación constante durante 48h. Tras evaporar el disolvente a vacío se obtiene el compuesto **12** como un sólido blanco soluble en agua (0.42 g, 91%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 11.53 (m, 8H, N⁺H solapado con m, 8H, N⁺HMe₂), 3.56 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂N⁺HMe₂), 3.17 (m, 16H, -N⁺HCH₂CH₃), 3.03 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.81 (s, 48H, N⁺HMe₂), 1.69 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.24 (m, 48H, -N⁺HCH₂CH₃ y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.53 (m, 48H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.44 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.03 (s, 48H, -SiMe₂), -0.10 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 54.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.2 (-N⁺HCH₂CH₂N⁺HMe₂), 46.3 (-N⁺HCH₂CH₃), 44.8 (-N⁺HCH₂CH₂N⁺HMe₂), 41.7 (N⁺HMe₂), 18.9, 17.6, 17.1 (-Si(CH₂)₃Si-), 16.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 7.8 (-N⁺HCH₂CH₃), -3.9 (-SiMe₂), -5.3 (-SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -340.5 (N⁺HMe₂), -325.0 (N⁺H).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ (G₀-Si) no se observa, 1.1 (G₁-Si), 2.3 (G₂-Si).

Análisis elemental C₁₂₈H₃₁₆Cl₁₆N₁₆Si₁₃: Calc. %: C, 51.04; H 10.57, N 7.44;
Exp. %: C 51.29, H 10.79, N 7.02.

VI.4.1.13. Preparación de

G₃-{[(CH₂CH₂CH₂)N⁺H(Et)(CH₂CH₂N⁺HMe₂)]₁₆ 32Cl⁻} (13).

El dendrímero de tercera generación se sintetiza siguiendo el mismo procedimiento que para los dendrímeros de 1^a y 2^a generación, partiendo de una disolución del dendrímero **5** (0.31 g, 0.06 mmol) en THF y de un exceso de HCl 1M en éter dietílico (2.5 ml, 2.45 mmol). La mezcla se mantiene con agitación constante durante 48h. Tras evaporar el disolvente a vacío se obtiene el compuesto **13** como un sólido blanco soluble en agua (0.39 g, 98%).

RMN-¹H (DMSO): δ 11.5 (m ancho, 32H, N⁺H, solapado a N⁺HMe₂), 3.56 (m, 64H, -N⁺H(CH₂)₂N⁺HMe₂), 3.17 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₃), 3.03 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.82 (s, 96H, N⁺HMe₂), 1.69 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.26 (m, 104H, -N⁺HCH₂CH₃ y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.52 (m, 144H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.03 (s, 96H, -SiMe₂), -0.10 (s, 36H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 54.0 (-SiCH₂CH₂CH₂ N⁺H-), 49.0 (-N⁺HCH₂CH₂N⁺HMe₂), 46.3 (-N⁺HCH₂CH₃), 44.6 (-N⁺HCH₂CH₂N⁺HMe₂), 41.7 (N⁺HMe₂), 18.9-17.1 (-Si(CH₂)₃Si-) y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 7.8 (-N⁺HCH₂CH₃), -3.9 (-SiMe₂), -5.4 (-SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -340.5 (N⁺HMe₂), -325.0 (N⁺H).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 1.1 (G₂-Si), 2.3 (G₃-Si).

Análisis elemental C₂₇₂H₆₆₄Cl₃₂N₃₂Si₂₉: Calc. %: C 51.58, H 10.57, N 7.08;
Exp. %: C 50.58, H 10.43, N 7.02.

**VI.4.14. Preparación de [(Et₃SiCH₂CH₂CH₂)N⁺Me(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃)
2I] (14).**

Sobre una disolución del compuesto **2** (0.31 g, 1.15 mmol) en THF (25 ml), se añade un exceso de una disolución 2M de MeI (0.5 ml, 2.31 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 48 h a temperatura ambiente para después eliminar el exceso de MeI a vacío. De este modo se obtiene el compuesto **14** como un sólido blanco soluble en agua (0.51 g, 79%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 3.88 (m, 2H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 3.80 (m, 2H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃) 3.38 (m, 2H, -N⁺CH₂CH₃), 3.29 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 3.19 (s, 9H, -N⁺Me₃), 3.05 (s, 3H, -N⁺Me), 1.60 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 1.26 (t, J_{H-H} = 1.7 Hz, 3H, -N⁺CH₂CH₃), 0.91 (t, J_{H-H} = 8.0 Hz, 9H, -SiCH₂CH₃) 0.50 (m, 6H, -SiCH₂CH₃), 0.45 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 63.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺), 56.6 (-N⁺CH₂CH₃), 56.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 52.4 (-N⁺Me₃), 52.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 47.1 (-N⁺Me), 15.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 7.3 (-N⁺CH₂CH₃), 6.8 (-SiCH₂CH₃), 6.7 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 2.1 (-SiCH₂CH₃).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -331.5 (N⁺Me₃), -320.6 (N⁺Me).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ 7.5 (G₀-Si).

MS (ESI⁺/TOF en H₂O/MeOH/NH₄HCOO 5 mM); *m/z* Calc. 556.12 [M];
Exp. 429.22 [M-I]⁺.

Análisis elemental C₁₇H₄₂I₂N₂Si: Calc. %: C, 36,70; H, 7,61; N, 5,03; Exp. %: C, 37,04; H, 7,17; N, 5,19.

VI.4.1.15. Preparación de

G₁-{[(CH₂CH₂CH₂)N⁺(Me)(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃)]₄ 8I⁻} (15).

Sobre una disolución del dendrímero **3** (1.04 g, 0.98 mmol) en THF (25 ml), se añade un exceso de una disolución 2M de MeI (0.49 ml, 7.88 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 48h a temperatura ambiente para después eliminar el disolvente y el exceso de MeI a vacío. De este modo se obtiene el compuesto **15** como un sólido blanco soluble en agua (0.31 g, 94%.)

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 3.93 (m, 8 H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 3.85 (m, 8H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 3.41 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 3.33 (m, 8H, -N⁺CH₂CH₃), 3.22 (s, 36H, -N⁺Me₃), 3.08 (s, 12H, N⁺Me), 1.63 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 1.27 (m, 20H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -N⁺CH₂CH₃), 0.57 (16H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.43, (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 0.005 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 63.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 56.6 (-N⁺CH₂CH₃), 56.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 52.5 (-N⁺Me₃), 52.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 47.2 (-N⁺Me), 18.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 17.6, 16.4, 16.0 (-Si(CH₂)₃Si-), 10.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 7.4 (-N⁺CH₂CH₃), -3.8 (-SiMe₂).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -332.1 (N⁺Me₃), -320.2 (N⁺Me).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ 0.7 (G₀-Si), 2.6 (G₁-Si).

Análisis elemental C₆₄H₁₅₆I₈N₈Si₅: Calc. %: C, 35,04; H, 7,17; N, 5,11; Exp. %: C, 36,74; H, 7,15; N, 5,61.

VI.4.1.16. Preparación de

G_2 -{[(CH₂CH₂CH₂)N⁺(Me)(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃)]₈ 16I⁻} (16).

El dendrímero de segunda generación se prepara de siguiendo un procedimiento similar al descrito para **15**, partiendo de una disolución de **4** (1.18 g, 0.48 mmol) en THF (25 ml) y un exceso de una disolución 2M de MeI (1.2 ml, 7.75 mmol). De este modo se obtiene el dendrímero **16** como un sólido blanco (2.11 g, 92%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 3.95 (m, 16H, -N⁺CH₂CH₂ N⁺Me₃), 3.87 (m, 16H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 3.31 (m, 24H, -N⁺CH₂CH₃), 3.42 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 3.23 (s, 96H, -N⁺Me₃ y -N⁺Me), 1.63 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 1.27 (m, 56H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -N⁺CH₂CH₃), 0.55 (m, 48H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.46 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 0.00 (s, 48H, -SiMe₂), -0.10 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C{¹H} (DMSO): δ 63.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 56.6 (-N⁺CH₂CH₃), 56.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 52.5 (-N⁺Me₃), 52.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 47.2 (-N⁺Me), 18.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 17.8 - 16.1 (-Si(CH₂)₃Si-), 10.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 7.5 (-N⁺CH₂CH₃), -3.8 (-SiMe₂) -5.4 (-SiMe).

RMN-¹⁵N{¹H} (DMSO): δ -331.4 (N⁺Me₃), -320.0 (N⁺Me).

RMN-²⁹Si{¹H} (DMSO): δ (G₀-Si) no se observa, 1.1 (G₁-Si), 2.8 (G₂-Si).

Análisis elemental C₁₄₄H₃₄₈I₁₆N₁₆Si₁₃: Calc. %: C, 36.80, H, 7.46; N, 4.77; Exp. %: C, 38.26; H, 7.00; N, 4.77.

VI.4.1.17. Preparación de

G_3 -{[(CH₂CH₂CH₂)N⁺(Me)(Et)(CH₂CH₂N⁺Me₃)]₁₆ 32I⁻} (17).

El dendrímero de tercera generación se prepara de siguiendo un procedimiento similar al descrito para los de 1^a y 2^a generación partiendo de una disolución de **5** (0.31 g, 0.06 mmol) en THF (25 ml) y de un exceso de una disolución 2M de MeI (0.15 ml, 2.37 mmol) para asegurar la total cuaternización. De este modo se obtiene el dendrímero **17** como un sólido blanco (0.58 g, 99 %).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 4.00 (m, 32H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃) 3.90 (m, 32H, -N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 3.42 (m, 64H, -N⁺CH₂CH₃ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺- solapadas), 3.25 (s, 144H, -N⁺Me₃), 3.17 (s, 48H, -N⁺Me), 1.65 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 1.29 (m, 104H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -N⁺CH₂CH₃), 0.53 (m, 144H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺- solapadas), 0.00 (s, 96H, -SiMe₂), -0,10 (s, 36H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 63.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 56.6 (-N⁺CH₂CH₃), 56.0 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 52.5 (-N⁺Me₃), 52.1 (-N⁺CH₂CH₂N⁺Me₃), 47.2 (-N⁺Me), 18.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 17.7 - 16.1 (-Si(CH₂)₃Si-), 10.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺-), 7.5 (-N⁺CH₂CH₃), -3.8 (-SiMe₂) -5.3 (-SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -332.0 (N⁺Me₃), -320.0 (N⁺Me).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 1.2 (G₂-Si), 2.5 (G₃-Si).

Análisis elemental C₃₀₄H₇₃₂I₃₂N₃₂Si₂₉: Calc. %: C, 37.59; H, 7.60; N, 4.61; Exp. %: C, 38.26; H, 7.00; N, 4.77.

VI.4.2. Dendrímeros funcionalizados mediante hidrosililación de la amina [(CH₂=CHCH₂)C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)].

VI.4.2.1. Preparación de [(CH₂=CHCH₂)C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)] (18).

Este ligando alilamina se prepara a partir del reactivo comercial 2-metoxi-4-(2-propenil)fenol [(CH₂=CH-CH₂)C₆H₃(OMe)(OH)], comúnmente llamado "eugenol", (8.0 g, 48.7 mmol) y de ClCH₂CH₂N⁺Me₂H, Cl⁻ (8.02 g, 55.7 mmol). La reacción se lleva a cabo en presencia de NaI y K₂CO₃ (26.93 g, 195.0 mmol), éter corona (18-C-6) (2.57 g, 9.74 mmol) y acetona como disolvente. La mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 48h. A continuación se lleva a cabo una extracción líquido-líquido con CH₂Cl₂/H₂O. En la fase orgánica se separa el compuesto **18** impurificado con el compuesto de partida "eugenol", que se elimina llevando a cabo extracción líquido-líquido con una disolución de HCl 1M en H₂O. En la fase acuosa se separa el compuesto **18** en forma de sal de amonio, la cual se trata con una disolución de NaOH 1M en H₂O para extraer el ligando **18** en éter dietílico. Esta fase orgánica se seca con MgSO₄ durante 3h tras las cuales se evapora el disolvente a vacío. Se aísla así el compuesto **18** como un aceite de color amarillo (6.04 g, 52%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.79 (d, 1H, C₆H₃), 6.68 (m, 2H, C₆H₃), 5.92 (m, 1H, CH₂=CHCH₂C₆H₃-), 5.02 (m, 2H, CH₂=CHCH₂C₆H₃-), 4.07 (t, J_{H-H}=6.2 Hz, 2H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 3.81 (s, 3H, CH₃O-), 3.30 (d, J_{H-H}=6.8 Hz, 2H, CH₂=CHCH₂C₆H₃-), 2.74 (t, J_{H-H}=6.2 Hz, 2H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 2.31 (s, 6H, -NMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 149.5 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂NMe₂), 146.5 (C_{ipso} unido a -OMe), 137.6 (C_{ipso} unido a CH₂=CHCH₂-), 133.2 (CH₂=CHCH₂C₆H₃-

), 120.4, 113.8, 112.3 (C₆H₃), 115.6 (CH₂=CHCH₂C₆H₃-), 67.4 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 58.1 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 55.8 (CH₃O-), 45.9 (-NMe₂), 39.8 (CH₂=CHCH₂C₆H₃-).

MS (APCI en CH₃CN/H₂O): *m/z* Calc. 235.16 [M]; Exp. 236.16 [M+H]⁺.

Análisis elemental C₁₄H₂₁NO₂: Calc. %: C, 71.46; H, 8.99; N, 5.95; Exp. %: C, 71.01; H, 8.63; N, 5.91.

VI.4.2.2. Preparación de [Et₃SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)] (**19**).

Sobre una disolución de la amina [(CH₂=CHCH₂)C₆H₃(OMe)(CH₂CH₂NMe₂)] **18** (0.21 g, 0.87 mmol) en THF (1 ml), se añade Et₃SiH (0.17 ml, 1.04 mmol) y 3 gotas de una disolución del catalizador de Karstedt [(3-3.5% en Pt) en poli(dimetilsiloxano)]. La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante a 45°C durante 12h. Tras evaporar el disolvente a vacío se lava el residuo con hexano (2x5 ml). Para eliminar los restos de catalizador se lleva a cabo una cromatografía por exclusión de tamaños en columna de Bio-Beads S-X1 con tolueno como eluyente. De este modo se obtiene el compuesto **19** como un aceite amarillo (0.22 g, 78%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.80 (m, 1H, C₆H₃), 6.65 (m, 2H, C₆H₃), 4.07 (t, 2H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 3.82 (s, 3H, CH₃O-), 2.74 (t, *J*_{H-H}=6.1 Hz, 2H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 2.53 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 2.31 (s, 6H, -NMe₂), 1.57 (m ancho, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 0.88 (m, 9H, CH₃CH₂Si-), 0.68 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 0.48 (m, 6H, CH₃CH₂Si-).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 149.3 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂NMe₂), 146.2 (C_{ipso} unido a -OMe), 136.0 (C_{ipso} unido a -CH₂CH₂CH₂Si-), 120.2, 113.6, 112.2

(C₆H₃), 67.4 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 58.2 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 55.8 (CH₃O-), 46.0 (-NMe₂), 39.7 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 26.1 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 11.2 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 7.2 (-SiCH₂CH₃), 3.2 (-SiCH₂CH₃).

VI.4.2.3. Preparación de

G₁-[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)]₄ (**20**).

Sobre una disolución del dendrímero G₁-H₄ (0.5 g, 1.16 mmol) en THF (3 ml) se adiciona la amina **18** (1.09 g, 4.64 mmol) y 1 gota de una disolución de catalizador de Karsted [(3-3.5% en Pt) en poli(dimetilsiloxano)]. La mezcla así preparada se agita durante 12h a 45°C. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente a vacío y el residuo obtenido se lava con hexano (2x5 ml) y se cromatografía en columna de Bio-Beads. Tras evaporar el disolvente se aísla el dendrímero **20** como un aceite amarillo (1.60 g, 99%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.80 (m, 4H, C₆H₃), 6.65 (m, 8H, C₆H₃), 4.07 (t, J_{H-H}=6.2 Hz, 8H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 3.81 (s, 12H, CH₃O-), 2.74 (t, J_{H-H}=6.2 Hz, 8H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 2.52 (t J_{H-H}=7.5 Hz, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 2.31 (s, 24H, -NMe₂), 1.55 (m ancho, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 1.28 (m ancho, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.53 (m, 16H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), -0.07 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 149.4 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂NMe₂), 146.3 (C_{ipso} unido a -OMe), 136.0 (C_{ipso} unido a -CH₂CH₂CH₂Si-), 120.2, 113.7, 112.3 (C₆H₃), 67.5 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 58.2 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 55.9 (CH₃O-), 46.0 (-NMe₂), 39.7 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 26.3 (-SiCH₂CH₂CH₂Ph-), 20.3, 18.6, 17.5 (Si(CH₂)₃Si-), 15.4 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), -3.3 (-SiMe₂).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ (G₀-Si) no se observa, 1.60 (G₁-Si).

MS (MALDI/TOF en Ditranol disuelto en THF): m/z Calc. 1373.9 [M]; Exp. 1373.9 [M].

Análisis elemental $C_{76}H_{136}N_4O_8Si_5$: Calc. %: C, 66.42; H, 9.97; N, 4.08%.
Exp. %: C, 65.11; H, 9.70; N, 3.73%.

VI.4.2.4. Preparación de G_2 -[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)]₈ (21).

El dendrímero de segunda generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **20**, partiendo de G_2 -H₈ (0.32 g, 0.27 mmol), del ligando amina [(CH₂=CHCH₂)C₆H₃(OCH₂CH₂NMe₂)] **18** (0.51 g, 2.17 mmol) y 1 gota de una disolución de catalizador de Karsted. De este modo, se obtiene el dendrímero **21** como un aceite de color amarillo oscuro (0.38 g, 48%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.80 (m, 8H, C₆H₃), 6.66 (m, 16H, C₆H₃), 4.08 (t, J_{H-H} =6.0 Hz, 16H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 3.81 (s, 24H, CH₃O-), 2.74 (t, J_{H-H} =6.2 Hz, 16H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 2.52 (t, J_{H-H} =7.9 Hz, 16, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 2.30 (s, 48H, -NMe₂), 1.55 (m ancho, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 1.28 (m ancho, 24H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.53 (m ancho, 64H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), -0.07 (s, 48H, -SiMe₂), -0.10 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 149.4 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂NMe₂), 146.3 (C_{ipso} unido a -OMe), 136.0 (C_{ipso} unido a -CH₂CH₂CH₂Si-), 120.2, 113.7, 112.3 (C₆H₃), 67.4 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 58.2 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 55.9 (CH₃O-), 46.0 (-NMe₂), 39.6 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 26.2 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 20.1, 18.8, 18.6 (-Si(CH₂)₃Si-), 15.4 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), -3.2 (-SiMe₂), -4.9 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ 1.00 (G₁-Si); 1.70 (G₂-Si).

Análisis elemental C₁₆₈H₃₀₈N₈O₁₆Si₁₃: Calc. %: C, 65.91; H, 10.14; N, 3.66; Exp. %: C, 64.81; H, 9.44; N, 3.24.

VI.4.2.5. Preparación de

G₃-[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂NMe₂)]₁₆ (22).

El dendrímero de tercera generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros de 1^a y 2^a generación, partiendo de G₃-H₁₆ (0.42 g, 0.16 mmol), de la amina **18** (0.71 g, 2.70 mmol) y 1 gota de una disolución de catalizador de Karsted. De este modo, se obtiene el compuesto **22** como un aceite de color marrón (0.78 g, 77%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.76 (m, 16H, C₆H₃), 6.65 (m, 32H, C₆H₃), 4.06 (t, $J_{H-H}=6.0$ Hz, 32H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 3.79 (s, 48H, CH₃O-), 2.75 (t, $J_{H-H}=6.0$ Hz, 32H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 2.51 (t, $J_{H-H}=7.3$ Hz, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 2.32 (s, 48H, -NMe₂), 1.55 (m ancho, 24H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 1.27 (m ancho, 56H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.53 (m ancho, 144H, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), -0.07 (s, 96H, -SiMe₂), -0.09 (s, 36H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 149.7 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂NMe₂), 146.6 (C_{ipso} unido a -OMe), 136.4 (C_{ipso} unido a -CH₂CH₂CH₂Si-), 120.6, 113.9, 112.6 (C₆H₃), 67.4 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 58.5 (-C₆H₃OCH₂CH₂NMe₂), 56.2 (CH₃O-), 46.2 (-NMe₂), 40.1 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 26.7 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 20.6, 19.2, 18.9 (-Si(CH₂)₃Si-), 15.8 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), -2.8 (-SiMe₂), -4.5 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 1.0 (G₂-Si); 1.8 (G₃-Si).

Análisis elemental C₃₅₂H₆₅₂N₁₆O₃₂Si₂₉: Calc. %: C, 65.69; H, 10.21; N, 3.48; Exp. %: C, 65.26; H, 9.91; N, 3.42.

VI.4.2.6. Preparación de
{[(CH₂=CHCH₂)C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂N⁺Me₃), I⁻] (23).

Sobre una disolución del ligando **18** (0.78 g, 3.31 mmol) en dietil éter, se añade un ligero exceso de una disolución 2M de MeI (0.5 ml, 8.01 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 12h, tras las cuales se elimina el disolvente y el exceso de MeI a vacío para obtener el compuesto **23** como un sólido blanco parcialmente soluble en agua. (1.19 g, 95%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.99 (m, 1H, C₆H₃), 6.68 (m, 1H, C₆H₃), 6.71 (m, 1H, C₆H₃), 5.92 (m, 1H, CH₂=CHCH₂C₆H₃-), 5.03 (m, 2H, CH₂=CHCH₂C₆H₃-), 4.37 (m, 2H, -C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 3.75 (s ancho, 5H, CH₃O- y -C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃, solapadas), 3.31 (m, 2H, CH₂=CHCH₂Ph-), 3.19 (s, 9H, -N⁺Me₃).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 148.7 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂N⁺Me₃), 144.5 (C_{ipso} unido a -OMe), 137.3 (CH₂=CHCH₂C₆H₃-), 133.4 (C_{ipso} unido a -CH₂CH₂CH₂Si-), 119.7, 114.3, 112.1 (C₆H₃), 115.1 (CH₂=CHCH₂C₆H₃-), 63.6 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 62.6 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 55.1 (CH₃O-), 52.7 (-N⁺Me₃), 39.8 (CH₂=CHCH₂C₆H₃-).

MS (APCI en CH₃CN/H₂O): *m/z* Calc. 379.10 [M]; Exp. 250.18 [M-I]⁺.

Análisis elemental C₁₅H₂₆INO₂: Calc. %: C, 47.50; H, 6.91; N, 3.69; Exp. %: C, 47.17; H, 6.19; N, 3.75.

VI.4.2.7. Preparación de
{[Et₃SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂N⁺Me₃), I⁻] (24).

Sobre una disolución del compuesto **19** (0.07 g, 0.22 mmol) en éter dietílico (3 ml), se añade un exceso de una disolución 2M de MeI (0.05 ml, 0.8

mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 48h para después eliminar el exceso de MeI evaporando a presión reducida. El residuo resultante se lava con hexano (2x5 ml) y se seca a vacío. De este modo se obtiene el compuesto **24** como un sólido blanco (0.1 g, 93%) parcialmente soluble en agua.

RMN-¹H (DMSO): δ 6.96 (m, 1H, C₆H₃), 6.80 (m, 1H, C₆H₃), 6.65 (m, 1H, C₆H₃), 4.35 (t, 2H, -C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 3.75 (s, 5H, CH₃O- y -C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃ solapada), 3.18 (s, 9H, -N⁺Me₃), 2.49 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-, solapada con la señal de DMSO), 1.54 (m ancho, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 0.87 (m, 9H, CH₃CH₂-), 0.48 (m, 8H, CH₃CH₂- y -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃- solapadas).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 148.5 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂N⁺Me₃), 145.5 (C_{ipso} unido a -OMe), 133.6 (C_{ipso} unido a -CH₂CH₂CH₂Si-), 119.5, 114.2, 112.1 (C₆H₃), 63.5 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 62.4 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 54.8 (CH₃O-), 52.7 (-N⁺Me₃), 40.1, 26.2, 11.3 (-Si(CH₂)₃C₆H₃-), 6.9 (-SiCH₂CH₃), 3.0 (-SiCH₂CH₃).

VI.4.2.8. Preparación de

G₁-{[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂N⁺Me₃)]₄ 4I} (25).

Sobre una disolución del dendrímero de primera generación **20**, (0.61 g, 0.44 mmol) en éter dietílico (3 ml), se añaden 0.5 ml de una disolución 2M de MeI en éter dietílico (8.01 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 48h a temperatura ambiente para después eliminar el exceso de MeI por evaporación a presión reducida. El residuo resultante se lava con hexano (2x5 ml) y se seca a vacío obteniendo así un sólido blanco parcialmente soluble en agua, que se identifica como **25**, (0.79 g, 92%).

RMN-¹H (DMSO): δ 6.96 (m, 4H, C₆H₃), 6.79 (m, 4H, C₆H₃), 6.68 (m, 4H, -C₆H₃), 4.34 (m, 8H, -C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 3.74 (s, 12H, CH₃O- y m, 8H, -C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃ solapada), 3.18 (s, 36H, -N⁺Me₃), 2.49 (m, 8H, -Si-CH₂CH₂CH₂C₆H₃-, solapada con señal de DMSO), 1.51 (m ancho, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-) 1.28 (m ancho, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.51 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃ solapada con m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), -0.07 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 148.6 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂N⁺Me₃), 144.3 (C_{ipso} unido a -OMe), 135.9 (C_{ipso} unido a -CH₂CH₂CH₂Si-), 119.5, 114.2, 111.9 (C₆H₃), 63.6 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 62.6 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 55.1 (CH₃O-), 52.7 (-N⁺Me₃), 39.0 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-, solapada con la señal de DMSO), 25.3 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 19.1, 17.6, 16.4 (-Si(CH₂)₃Si-), 14.3 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), -3.7 (-SiMe₂).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ (Go-Si) no se observa, 1.7 (G₁-Si).

Análisis elemental C₈₀H₁₄₈I₄N₄O₈Si₅: Calc. %: C, 49.48; H, 7.68; N, 2.88; Exp. %: C, 50.97; H, 7.91; N 2.58.

VI.4.2.9. Preparación de

G₂-{[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂N⁺Me₃)]₈ 8I⁻} (26).

El dendrímero de segunda generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para **25**, partiendo de (0.38 g, 0.13 mmol) del compuesto **21** y 0.07 ml de una disolución 2M de MeI en éter dietílico (1.12 mmol). De esta forma se obtiene el compuesto **26** como un sólido de color blanco parcialmente soluble en agua (0.45 g, 85%).

RMN-¹H (DMSO): δ 6.95 (m, 8H, C₆H₃), 6.78 (m, 8H, C₆H₃), 6.65 (m, 8H, C₆H₃), 4.33 (m, 16H, -C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 3.74 (s, 24H, CH₃O- y m, 16H, -C₆H₃OCH₂CH₂NMe₃⁺ solapada), 3.18 (s, 72H, -N⁺Me₃), 2.49 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-, solapada con señal de DMSO), 1.50 (m ancho, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-) 1.29 (m ancho, 24H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.52 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃- solapada con m, 48H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), -0.09 (s, 48H, -SiMe₂), -0.11 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 148.6 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂N⁺Me₃), 144.3 (C_{ipso} unido a -OMe), 135.9 (C_{ipso} unido a -CH₂CH₂CH₂Si-), 119.5, 114.3, 111.9 (C₆H₃), 63.6 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 62.6 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 55.1 (CH₃O-), 52.7 (-N⁺Me₃), 39.0 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-, solapada con la señal de DMSO), 25.3 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 19.0, 17.7, 17.6 (Si(CH₂)₃Si), 14.3 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), -3.8 (-SiMe₂), -5.4 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ (Go-Si) no se observa, 1.3 (G₁-Si) y 1.6 (G₂-Si).

Análisis elemental C₁₇₆H₃₃₂I₈N₈O₁₆Si₁₃: Calc. %: C, 50.37; H, 7.97; N, 2.88; Exp.%: C, 50.08; H, 7.67; N, 2.66.

VI.4.2.10. Preparación de

G₃-{[CH₂CH₂CH₂C₆H₃(OMe)(OCH₂CH₂N⁺Me₃)]₁₆ 16I} (27).

El dendrímero de tercera generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros **25** y **26**, partiendo de (0.22 g, 0.03 mmol) del compuesto **22** y 0.04 ml de una disolución 2M de MeI en éter dietílico (0.70 mmol). De esta forma se obtiene el compuesto **27** como un sólido de color blanco parcialmente soluble en agua (0.185 g, 78%).

RMN-¹H (DMSO): δ 6.91 (m, 16H, C₆H₃), 6.71 (m, 16H, C₆H₃), 6.61 (m, 16H, C₆H₃), 4.31 (m, 32H, -C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 3.69 (s, 48H, CH₃O- y m, 32H, -C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃ solapada), 3.19 (s, 144H, -N⁺Me₃), 2.49 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-, solapada con la señal de DMSO), 1.47 (m ancho, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-) 1.28 (m ancho, 56H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.49 (m, 144H, -SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃- y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), -0.11 (s ancho, 132H, -SiMe₂ y -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 148.6 (C_{ipso} unido a -OCH₂CH₂N⁺Me₃), 144.3 (C_{ipso} unido a -OMe), 135.8 (C_{ipso} unido a -CH₂CH₂CH₂Si-), 119.4, 114.4, 111.8 (C₆H₃), 63.6 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 62.8 (-C₆H₃OCH₂CH₂N⁺Me₃), 55.0 (CH₃O-), 52.7 (-N⁺Me₃), 39.0 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-, solapada con la señal de DMSO), 25.2 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), 19.0, 17.7, 17.5 (-Si(CH₂)₃Si-), 14.3 (-SiCH₂CH₂CH₂C₆H₃-), -3.9 (-SiMe₂), -5.4 (-SiMe).

Análisis elemental C₃₆₈H₇₀₀I₁₆N₁₆O₃₂Si₂₉: Calc. %: C, 61.02; H, 9.50; N, 2.22; Exp. %: C, 60.42; H, 8.44; N 2.64.

VI.4.3. Dendrímeros funcionalizados con otros ligandos amino terminales por alcoholisis de enlaces SiCH₂-Cl.

VI.4.3.1. Preparación de G₃-(CH₂Cl)₁₆ (28).

Sobre una disolución en tolueno (3 ml) del dendrímero de 2^a generación G₂-(CH₂CH=CH₂)₈ (1.00 g, 0.59 mmol), se añaden 1.21 ml (9.69 mmol) de HSi(Me)₂CH₂Cl, y tres gotas del catalizador de Speier. La mezcla de reacción se calienta a 60 °C durante 12h. Posteriormente se elimina el disolvente y el exceso de silano a vacío, el aceite resultante se purifica con hexano como eluyente, a

través de una filtración con celite y carbón activo. Así, se obtiene el dendrímero de tercera generación **28** como un aceite incoloro (2.03 g, 99%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 2.75 (s, 32H, -CH₂Cl), 1.33 (m, 56H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.68 (m, 32H, -CH₂SiCH₂Cl), 0.53 (m, 80H, -SiCH₂-), 0.08 (s, 96H, -SiMe₂), -0.08 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 30.4 (-CH₂Cl), 18.9-18.2 (Si(CH₂)₃Si-), -4.3 (-SiMe₂), -5.0 (-SiMe).

Análisis elemental C₁₄₄H₃₃₂Cl₁₆Si₂₉: Calc. %: C, 50,19; H, 9,71; Exp. %: C, 50,06; H, 9,60.

VI.4.3.2. Preparación de G₁-[CH₂OC₆H₃(Me)(NHCH₂Me)]₄ (**29**).

Sobre una disolución del dendrímero G₁-(CH₂Cl)₄ (0.92 g, 1.47 mmol) en DMF (100 ml), se adiciona el reactivo comercial (OH)C₆H₃(Me)(NHCH₂Me) (0.89 g, 5.87 mmol). La reacción se lleva a cabo en presencia de NaI y K₂CO₃ (0.91 g, 6.60 mmol). La mezcla así preparada se agita durante 24h a 80°C. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente a vacío calentando con un baño de agua a 50°C. El residuo obtenido se trata mediante extracción líquido-líquido con 50x3 ml de una disolución de CH₂Cl₂/H₂O. De este modo se obtiene el dendrímero **29** como un aceite marrón-rojizo que se purifica mediante cromatografía por exclusión de tamaños, en columna de Bio-Beads S-X1 con tolueno como eluyente (0.64 g, 40%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.88 (m, 4H, C₆H₃), 6.22 (m, 8H, C₆H₃), 3.51 (s, 8H, -SiCH₂O-), 3.32 (s ancho, 4H, -NHCH₂CH₃), 3.15 (m, 8H, -NHCH₂CH₃), 2.03 (s, 12H, -C₆H₃CH₃), 1.35 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 1.25 (t, J_{H-H}=6.9, 12H, -NHCH₂CH₃), 0.67 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.55 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.07 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 161.1 (C_{ipso} unido a -OCH₂Si-), 146.8 (C_{ipso} unido a -NHCH₂CH₃), 129.6 (C₆H₃), 113.3 (C_{ipso} unido a -CH₃), 100.5, 96.8 (C₆H₃), 59.7 (-SiCH₂O-), 38.0 (-NHCH₂CH₃), 18.2, 18.0, 16.9 (Si(CH₂)₃Si-), 16.2 (-NHCH₂CH₃), 14.5 (-C₆H₃CH₃), -5.0 (-SiMe₂).

MS (MALDI/TOF en Ditranol disuelto en THF): *m/z* Calc. 1084.69 [M]; Exp. 1085.69 [M+H]⁺.

Análisis elemental C₆₀H₁₀₄N₄O₄Si₅: Calc. %: C, 66.36; H, 9.65; N, 5.16; Exp. %: C 65.20; H, 9.32; N, 4.86.

VI.4.3.3. Preparación de G₂-[CH₂OC₆H₃(Me)(NHCH₂Me)]₈ (30).

El dendrímero de segunda generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **29**, partiendo de G₂-(CH₂Cl)₈ (1.89 g, 1.21 mmol) y del reactivo comercial (OH)C₆H₃(Me)(NHCH₂Me) (1.46 g, 9.64 mmol). La reacción se lleva a cabo en presencia de cantidades catalíticas de NaI y de K₂CO₃ (1.42 g, 10.2 mmol). De este modo, se obtiene el dendrímero **30** como un aceite de color marrón (1.10 g, 27%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.88 (m, 8H, C₆H₃), 6.21 (m, 16H, C₆H₃), 3.52 (s, 16H, -SiCH₂O-), 3.31 (s ancho, 8H, -NHCH₂CH₃), 3.15 (m, 16H, -NHCH₂CH₃), 2.03 (s, 24H, -C₆H₃CH₃), 1.28 (m, 48H, SiCH₂CH₂CH₂Si y -NHCH₂CH₃), 0.69 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂SiCH₂O-), 0.55 (m, 32H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.08 (s, 48H, -SiMe₂), -0.08 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 161.5 (C_{ipso} unido a -OCH₂Si-), 147.2 (C_{ipso} unido a -NHCH₂CH₃), 130.1 (C₆H₃), 113.7 (C_{ipso} unido a -CH₃), 100.9, 97.2 (C₆H₃), 60.1 (-SiCH₂O-), 38.4 (-NHCH₂CH₃), 19.0, 18.7, 18.6, 18.4, 18.3, 18.2 (-Si(CH₂)₃Si-), 16.6 (-NHCH₂CH₃), 15.0 (-C₆H₃CH₃), -4.5 (-SiMe₂), -4.9 (-SiMe).

Análisis elemental $C_{136}H_{244}N_{808}Si_{13}$: Calc. %: C, 65.74; H, 9.90; N, 4.51; Exp. %: C 64.60; H, 9.31; N, 3.88.

VI.4.3.4. Preparación de G_3 -[CH₂OC₆H₃(Me)(NHCH₂Me)]₁₆ (**31**).

El dendrímero de tercera generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros de 1^a y 2^a generación **29** y **30**, partiendo de G_3 -(CH₂Cl)₁₆ (1.20 g, 0.35 mmol) y del reactivo comercial (OH)C₆H₃(Me)(NHCH₂Me) (0.84 g, 5.55 mmol). La reacción se lleva a cabo en presencia de NaI y K₂CO₃ (0.79 g, 0.35 mmol). De este modo, se obtiene el compuesto **31** como un aceite de color marrón (1.10 g, 27%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 6.87 (m, 16H, C₆H₃), 6.23 (m, 32H, C₆H₃), 3.51 (s, 32H, -SiCH₂O-), 3.32 (s ancho, 16H, -NHCH₂CH₃), 3.13 (m, 16H, -NHCH₂CH₃), 2.03 (s, 48H, -C₆H₃CH₃), 1.26 (m, 104H, SiCH₂CH₂CH₂Si y -NHCH₂CH₃), 0.68 (m, 32H, -CH₂SiCH₂O-), 0.55 (m, 80H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.07 (s, 96H, -SiMe₂), -0.10 (s, 36H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 161.9 (C_{ipso} unido a -OCH₂Si-), 148.1 (C_{ipso} unido a -NHCH₂CH₃), 130.5 (C₆H₃), 113.6 (C_{ipso} unido a -CH₃), 101.4, 97.7 (C₆H₃), 60.5 (-SiCH₂O-), 38.9 (-NHCH₂CH₃), 19.4-18.8 (-Si(CH₂)₃Si-), 17.1 (-NHCH₂CH₃), 15.3 (-C₆H₃CH₃), -4.1 (-SiMe₂), -4.5 (-SiMe).

Análisis elemental $C_{288}H_{524}N_{16}O_{16}Si_{29}$: Calc. %: C, 65.49; H, 10.00; N, 4.24; Exp. %: C 63.07; H, 9.89; N, 3.71.

VI.4.3.5. Preparación de {[HO₂C₆H₃(Me)(N⁺H₂CH₂Me)] Cl⁻} (32).

Sobre una disolución del reactivo comercial (OH)C₆H₃(Me)(NHCH₂Me) (0.32 g, 2.13 mmol) en THF (20 ml), se añaden 3 ml de HCl 1M en dietil éter (3.0 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 12h, tras las cuales se evapora el disolvente a vacío. El residuo resultante se lava con éter dietílico (2x25 ml), de este modo se obtiene el compuesto **32** como un sólido cristalino de color marrón-rojizo (0.32 g, 99%).

RMN-¹H (DMSO): δ 7.08 (m, 1H, C₆H₃), 6.88 (m, 1H, C₆H₃), 6.69 (m, 1H, C₆H₃), 3.20 (q, *J*_{H-H}=7.0 Hz, 2H, -N⁺H₂CH₂CH₃), 2.26 (s, 3H, CH₃Ph-), 1.24 (t, *J*_{H-H}=7.0 Hz, 3H, -N⁺H₂CH₂CH₃).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 155.6 (C_{ipso} unido a -OCH₂Si solapado con C₆H₃), 132.1 (C_{ipso} unido a -N⁺H₂CH₂CH₃ solapado con C₆H₃), 120.2 (C_{ipso} unido a -CH₃), 114.6 (C₆H₃), 44.2 (-N⁺H₂CH₂CH₃), 15.6 (-CH₃), 10.6 (-N⁺H₂CH₂CH₃).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -318.2 (-N⁺H₂CH₂Me).

MS (ESI⁺/TOF en H₂O/MeOH/NH₄HCOO 5mM): m/z Calc. 187.08 [M]; Exp. 152.11 [M-Cl]⁺.

VI.4.3.6. Preparación de G₁-{[CH₂OC₆H₃(Me)(N⁺H₂CH₂Me)]₄ 4Cl⁻} (33).

Sobre una disolución del dendrímero de primera generación **29**, (0.77 g, 0.70 mmol) en THF (20 ml), se añaden 6 ml de una disolución 1M de HCl en éter dietílico (6.0 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 48h a temperatura ambiente para después eliminar el exceso de HCl evaporando a presión reducida. El residuo resultante se lava con éter dietílico

(2x5 ml) en frío y se seca a vacío obteniendo así un sólido cristalino marrón que se identifica como **33**, (0.79 g, 89%).

RMN-¹H (DMSO): δ 7.12 (m, 4H, C₆H₃), 6.96 (m, 4H, C₆H₃), 6.79 (m, 4H, C₆H₃), 3.55 (s, 8H, -SiCH₂O-), 3.21 (q, $J_{H-H}=6.9$ Hz, 8H, -N⁺H₂CH₂CH₃), 2.26 (s ancho, 12H, -C₆H₃CH₃), 1.35 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 1.24 (t $J_{H-H}=7.0$ Hz, 12H, -N⁺H₂CH₂CH₃), 0.64 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.53 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.03 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 159.3 (C_{ipso} unido a -OCH₂Si solapado con C₆H₃), 132.2 (C_{ipso} unido a -N⁺H₂CH₂CH₃ solapado con C₆H₃), 121.3 (C_{ipso} unido a -CH₃), 112.2 (C₆H₃), 59.9 (-SiCH₂O-), 43.7 (-N⁺H₂CH₂CH₃), 24.6 (-C₆H₃CH₃), 17.5, 16.8, 16.2 (-Si(CH₂)₃Si-), 10.9 (-N⁺H₂CH₂CH₃), -5.1 (SiMe₂).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ (G₀-Si) no se observa, -0.2 (G₁-Si).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -314.5 (-N⁺H₂CH₂Me).

MS (MALDI/TOF en Ditranol disuelto en THF): m/z Calc. 1228.60 [M]; Exp. 1085.73 [M-4Cl]⁺.

Análisis elemental C₆₀H₁₀₈Cl₄N₄O₄Si₅: Calc. %: C, 58.50; H, 8.84; N, 4.55; Exp. %: C 57.80; H, 8.29; N, 4.24.

VI.4.3.7. Preparación de G₂-{[CH₂OC₆H₃(Me)(N⁺H₂CH₂Me)]₈ 8Cl} (34).

El dendrímero de segunda generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el dendrímero **33**, partiendo de (0.65 g, 0.21 mmol) del compuesto **30** y 3.4 ml de una disolución 1M de HCl en éter dietílico (3.40 mmol). De esta forma se obtiene el compuesto **34** como un sólido de color marrón insoluble en agua (0.63 g, 97%).

RMN-¹H (DMSO): δ 7.03 y 6.85 (m, 48H, C₆H₃), 3.52 (m, 32H, -SiCH₂O-), 3.15 (m, 16H, -N⁺H₂CH₂CH₃), 2.20 (s ancho, 24H, -C₆H₃CH₃), 1.29 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 1.21 (m, 24H, N⁺H₂CH₂CH₃), 0.61-0.50 (m, 48H, SiCH₂CH₂CH₂Si), -0.01 (s, 48H, -SiMe₂), -0.14 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 159.5 (C_{ipso} unido a -OCH₂Si solapado con C₆H₃), 132.4 (C_{ipso} unido a -N⁺H₂CH₂CH₃ solapado con C₆H₃), 121.3 (C_{ipso} unido a -CH₃), 112.2 (C₆H₃), 59.5 (-SiCH₂O-), 39.8 (-N⁺H₂CH₂CH₃ solapada con la señal de DMSO), 29.5 (-C₆H₃CH₃), 17.4-15.8 (-Si(CH₂)₃Si-), 11.4 (-N⁺H₂CH₂CH₃), -5.1 (-SiMe₂ y -SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -315.5 (-N⁺H₂CH₂Me)

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ (G₀-Si) no se observa, 1.2 (G₁-Si), -0.02 (G₂-Si).

ANÁLISIS ELEMENTAL C₁₃₉H₂₆₀Cl₈N₈O₈Si₁₃: Calc. %: C, 59.19; H, 9.29; N, 3.97; Exp. %: C 58.72; H, 9.48; N, 3.50.

VI.4.3.8. Preparación de G₃-{[CH₂OC₆H₃(Me)(NH₂⁺CH₂Me)]₁₆ 16Cl} (35).

El dendrímero de tercera generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros de 1^a y 2^a generación **33** y **34**, partiendo del compuesto **31** (0.19 g, 0.04 mmol) y un exceso (1.2 ml) de una disolución 1M de HCl en éter dietílico (1.2 mmol). De esta forma se obtiene el dendrímero **35** como un sólido de color marrón insoluble en agua (0.16 g, 78%).

RMN-¹H (DMSO): δ 7.04-6.89 (m, 96H, C₆H₃), 3.52 (m, 32H, -SiCH₂O-), 3.18 (m, 32H, -N⁺H₂CH₂CH₃), 2.22 (s ancho, 48H, -C₆H₃CH₃), 1.22 (m, 104H,

SiCH₂CH₂CH₂Si y -N⁺H₂CH₂CH₃), 0.63-0.50 (m, 112H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.02 (s, 96H, -SiMe₂), -0.14 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 159.5 (C_{ipso} unido a -OCH₂Si solapado con C₆H₃), 131.2 (C_{ipso} unido a -N⁺H₂CH₂CH₃ solapado con C₆H₃), C_{ipso} unido a -CH₃ y C₆H₃ no se observan, 59.5 (-SiCH₂O-), 39.8 (-N⁺H₂CH₂CH₃ solapada con la señal de DMSO), (-C₆H₃CH₃) no se observa, 17.3-15.8 (Si(CH₂)₃Si), 11.5 (-N⁺H₂CH₂CH₃), -5.2 (-SiMe₂ y -SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -315.6 (-N⁺H₂CH₂Me).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 1.5 (G₂-Si) y 0.0 (G₃-Si).

Análisis elemental C₂₉₁H₅₄₈Cl₁₆N₁₆O₁₆Si₂₉: Calc. %: C, 59.15; H, 9.35; N, 3.79; Exp. %: C 58.64; H, 8.87; N, 3.99.

VI.4.4. Preparación de G₃-(CH₂CH₂CH₂NH₂)₁₆ (36).

El dendrímero de tercera generación se prepara partiendo de una disolución del dendrímero G₃-H₁₆ (0.74 g, 0.28 mmol), disuelto en la mínima cantidad de THF (3 ml). Sobre esta disolución se añade un exceso de alilamina (1 ml, 13.3 mmol) y dos gotas del catalizador de Speier. La mezcla se calienta a 120°C en una ampolla durante 12h, tras las cuales se elimina el exceso de alilamina y el disolvente evaporando a presión reducida. El residuo se disuelve en CH₂Cl₂ para purificarlo mediante filtración con celite y carbón activo. La disolución obtenida se lleva a sequedad eliminando el disolvente a vacío, de este modo se obtiene el compuesto **36** como un aceite incoloro (0.81 g, 82%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 2.63 (t, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂NH₂), 1.38-1.26 (m, 88H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂NH₂), 0.51 (m, 144H, -SiCH₂CH₂CH₂Si-), -0.06 (s, 96H, -SiMe₂), -0.11 (s, 96H, -SiMe).

RMN-¹³C{¹H}(CDCl₃): δ 45.2 (-SiCH₂CH₂CH₂NH₂), 27.9 (-SiCH₂CH₂CH₂NH₂), 19.7-18.0 (Si(CH₂)₃Si), 11.9 (-SiCH₂CH₂CH₂NH₂), -3.7 (-SiMe₂), -5.3 (-SiMe).

²⁹Si{¹H}-RMN (CDCl₃): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 1.00 (G₂-Si) y 2.1 (G₃-Si).

Análisis elemental C₁₇₆H₄₂₈N₁₆Si₂₉: Calc. %: C, 58.98; H, 12.04; N, 6.25; Exp. %: C, 58.16; H, 11.95; N, 6.58.

VI.4.5. Dendrímeros con grupos éster terminales.

VI.4.5.1. Preparación de [Et₃SiCH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COOMe)₂] (**37**).

Sobre una disolución en MeOH del compuesto Et₃Si(CH₂)₃NH₂ (0.50 g, 2.83 mmol), preparado utilizando condiciones descritas en bibliografía para compuestos similares,^[7] se añade el reactivo comercial acrilato de metilo, CH₂=CHCOOMe (0.51 ml, 5.67 mmol). La mezcla así preparada se mantiene a temperatura ambiente y con agitación constante durante 12h, tras las cuales se elimina el disolvente a vacío. De este modo se obtiene el compuesto **37** como un aceite incoloro (0.9 g, 99%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.60 (s, 6H, -OMe), 2.71 (m, 4H, -NCH₂CH₂COOMe), 2.38 (m, 6H, -SiCH₂CH₂CH₂N- y -NCH₂CH₂COOMe), 1.33 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.86 (t, *J*_{H-H}=7.9 Hz, 9H, CH₃CH₂-), 0.40 (m, 8H, CH₃CH₂- y -SiCH₂CH₂CH₂N-).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 173.0 (-COOMe), 57.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 51.4 (-OMe), 49.2 (-NCH₂CH₂COOMe), 32.4 (-NCH₂CH₂COOMe), 21.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 8.7 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 7.3 (CH₃CH₂-), 3.2 (CH₃CH₂-).

MS (MALDI/TOF en ACC disuelto en THF): *m/z* Calc. 3578,73 [M]; Exp. 3573.5 [M-5H]⁺.

Análisis elemental C₁₇H₃₅NO₄Si: Calc. %: C, 59.09; H, 10.21; N, 4.05; Exp. %: C, 58.97; H, 9.98; N, 3.89.

VI.4.5.2. Preparación de G₁-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COOMe)₂]₄ (38).

Método 1. El dendrímero de primera generación se prepara de un modo similar al descrito para el compuesto **37**, partiendo de una disolución del dendrímero G₁-[(CH₂)₃NH₂]₄ en MeOH (0.88 g, 1.34 mmol) y de un ligero exceso de acrilato de metilo, CH₂=CHCOOMe (1 ml, 11.1 mmol). De este modo se obtiene el compuesto **38** como un aceite incoloro (1.79 g, 99%).

Método 2. Sobre una disolución en tolueno del dendrímero G₁-H₄ (0.24 g, 0.05 mmol), se añade CH₂=CHCH₂N(CH₂CH₂COOMe)₂ (0.5 g, 2.18 mmol) y 1 gota de una disolución de catalizador de Karstedt [(3-3.5% en Pt) en poli(dimetilsiloxano)]. La mezcla así preparada se mantiene con agitación constante a temperatura ambiente durante 12h, tras las cuales se elimina el disolvente por evaporación a vacío. De este modo se obtiene el dendrímero **38** que se purifica por cromatografía en columna de exclusión por tamaños de Bio-Beads S-X1 con tolueno como eluyente, como un aceite incoloro (0.58 g, 80%).

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.64 (s, 24H, -OMe), 2.75 (m, 16H, -NCH₂CH₂COOMe), 2.42 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N- y -NCH₂CH₂COOMe), 1.32 (m, 16H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.54 (m, 16H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.37 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.07 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 173.0 (-COOMe), 57.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 51.5 (-OMe), 49.3 (-NCH₂CH₂COOMe), 32.4 (-NCH₂CH₂COOMe), 21.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.3, 18.5, 18.0 (Si(CH₂)₃Si-), 13.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.3 (-SiMe₂).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ 0.8 (G₀-Si), 1.9 (G₁-Si).

MS (MALDI/TOF en Ditranol disuelto en THF): m/z Calc. 1348.8 [M]; Exp. 1349.8 [M+H]⁺.

Análisis elemental $C_{64}H_{128}N_4O_{16}Si_5$: Calc. %: C, 56.93; H, 9.56; N, 4.15; Exp. %: C 57.09; H, 10.06; N, 4.34.

GPC: PDI exp: 1.04.

VI.4.5.3. Preparación de G_2 -[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COOMe)₂]₈ (**39**).

El dendrímero de segunda generación se sintetiza siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **38** partiendo del dendrímero G_2 -[(CH₂)₃NH₂]₈ en MeOH (0.65 g, 0.39 mmol) y de un ligero exceso de acrilato de metilo, CH₂=CHCOOMe (1 ml, 11.1 mmol). De este modo se obtiene el compuesto **39** como un aceite incoloro (1.09 g, 92%). Este compuesto puede también ser sintetizado mediante el *método 2* descrito para la especie **38**.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.64 (s, 48H, -OMe), 2.75 (m, 32H, -NCH₂CH₂COOMe), 2.42 (m, 48H, -NCH₂CH₂COOMe y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.31 (m, 40H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.53 (m, 48H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.38 (m, 16H, SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.06 (s, 48H, -SiMe₂), -0.1 (s, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 173.0 (-COOMe), 57.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 51.5 (-OMe), 49.2 (-NCH₂CH₂COOMe), 32.5 (-NCH₂CH₂COOMe), 21.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.1 - 17.7 (Si(CH₂)₃Si-), 12.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.3 (-SiMe₂) - 5.0 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ (G₀-Si) no se observa; 0,78 (G₁-Si), 1.88 (G₂-Si).

MS (MALDI/TOF en Ditranol disuelto en THF): m/z Calc. 3009.85 [M]; Exp. 3012.85 [M+3H]⁺.

Análisis elemental $C_{144}H_{292}N_8O_{32}Si_{13}$: Calc. %: C, 57.40; H, 9.77; N, 3.72;
Exp. %: C 56.76; H, 9.78; N, 3.88.

GPC: PDI exp: 1.3.

VI.4.5.4. Preparación de G_3 -[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COOMe)₂]₁₆ (**40**).

El dendrímero de tercera generación se prepara del mismo modo que los dendrímeros de 1^a y 2^a generación, partiendo del dendrímero **36** disuelto en MeOH (0.25 g, 0.06 mmol), y de un ligero exceso de acrilato de metilo, CH₂=CHCOOMe (1 ml, 11.1 mmol). De este modo se obtiene el compuesto **40** como un aceite incoloro (0.39 g, 99%). Al igual que los compuestos **38** y **39**, este dendrímero puede ser sintetizado mediante el *método 2* descrito con anterioridad.

RMN-¹H (CDCl₃): δ 3.63 (s, 96H, -OMe), 2.74 (m, 64H, -NCH₂CH₂COOMe), 2.41 (m, 96H, -NCH₂CH₂COOMe y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.31 (m, 88H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.53 (m, 112H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.37 (m, 32H, SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.07 (s, 96H, -SiMe₂), -0.1 (s, 36H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (CDCl₃): δ 173.0 (-COOMe), 57.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 51.5 (-OMe), 49.2 (-NCH₂CH₂COOMe), 32.5 (-NCH₂CH₂COOMe), 21.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.1-17.9 (Si(CH₂)₃Si-), 12.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.3 (-SiMe₂) - 5.0 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (CDCl₃): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 0.8 (G₂-Si) y 1.9 (G₃-Si).

Análisis elemental $C_{304}H_{620}N_{16}O_{64}Si_{29}$: Calc. %: C, 57.60; H, 9.86; N, 3.54;
Exp. %: C 58.38; H, 9.86; N, 3.08.

GPC: PDI exp: 1.3.

VI.4.6. Dendrimeros con grupos carboxilato en la superficie.

VI.4.6.1. Preparación de [Et₃SiCH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂] (41).

Sobre una disolución en etanol del compuesto **37** (0.91 g, 2.83 mmol), se añade un exceso de una disolución de hidróxido sódico de pH=10. Esta mezcla se deja agitando durante 12h a temperatura ambiente. Tras evaporar el disolvente y lavar con éter dietílico, se lleva a cabo una cromatografía por exclusión de tamaños en columna de Sephadex utilizando agua como eluyente. De este modo se aísla el compuesto **41** como un sólido blanco (0.66 g, 65%) soluble en agua.

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.47 (m, 4H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.16 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.07 (m, 4H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.22 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.67 (t, *J*_{H-H}=7.9 Hz, 9H, CH₃CH₂Si-), 0.26 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂N y CH₃CH₂Si-).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 180.3 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 55.7 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 48.5 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 33.1 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 19.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 7.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 6.1 (CH₃CH₂Si-), 1.9 (CH₃CH₂Si-).

Análisis elemental C₁₅H₂₉NNa₂O₄Si: Calc. %: C, 49.84; H, 8.09; N, 3.88; Exp. %: C, 50.01; H, 9.20; N, 3.98.

VI.4.6.2. Preparación de G₁-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]₄ (42).

Sobre una disolución del dendrímero **38** (1.80 g, 1.34 mmol) en etanol, se añade un exceso de una disolución acuosa de hidróxido sódico de pH=10. Esta mezcla se mantiene con agitación constante durante 2h a temperatura

ambiente. Tras evaporar el disolvente, lavar con éter dietílico y cromatografiar en columna de exclusión por tamaños, se obtiene el compuesto **42** como un sólido blanco (1.86 g, 98%), soluble en agua.

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.57 (m, 8H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.27 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.16 (m, 16H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.28 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.21 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.43 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.27 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N), -0.20 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 179.9 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 55.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 48.6 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 32.7 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 19.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 18.4, 17.5, 15.9 (Si(CH₂)₃Si), 11.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -4.8 (-SiMe₂).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -322.6 (-N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 1.8 (G₁-Si).

MS (MALDI/TOF en Ditranol disuelto en THF): *m/z* Calc. 1412.45 [M]; Exp. 1344.28 [M-3Na+H]⁺.

Análisis elemental C₅₆H₁₀₄N₄Na₈O₁₆Si₅: Calc. %: C, 47.57; H, 7.41; N, 3.96; Exp. %: C 46,15; H, 7.53; N, 3.62.

VI.4.6.3. Preparación de G₂-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]₈ (**43**).

El dendrímero de segunda generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **42**. Partiendo de una disolución del dendrímero de segunda generación **39** (1.05 g, 0.35 mmol). Tras evaporar el disolvente, lavar con éter dietílico y purificar mediante

cromatografía en columna de Sephadex, se obtiene el compuesto **43** como un sólido blanco (1.06 g, 97%), soluble en disolución acuosa.

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.61 (m 32H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.31 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.17 (m, 32H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.31 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.20 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.42 (m, 48H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.26 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.17 (s ancho, 48H, -SiMe₂), -0.21 (s ancho, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 180.5 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 56.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 49.7 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 33.7 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 19.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 19.3-17.9 (Si(CH₂)₃Si), 12.7 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.4 (-SiMe₂), -4.4 (-SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -329 (-N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 1.2 (G₁-Si) y 1.9 (G₂-Si).

Análisis elemental C₁₂₈H₂₄₄N₈Na₁₆O₃₂Si₁₃: Calc. %: C, 48.96; H, 7.83; N, 3.57; Exp. %: C, 49.03; H, 7.79; N, 3.31.

VI.4.6.4. Preparación de G₃-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]₁₆ (**44**).

El dendrímero de tercera generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros de 1^a y 2^a generación, **42** y **43**, partiendo de una disolución del dendrímero **40** (0.39 g, 0.07 mmol). Tras evaporar el disolvente, lavar con éter dietílico y cromatografiar el residuo, se obtiene el compuesto **44** como un sólido blanco (1.07 g, 95%) soluble en agua.

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.54 (m, 64H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.22 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.14 (m, 64H, -NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.20 (m, 88H, -SiCH₂CH₂CH₂N-, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.42 (m, 112H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.25 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.17 (s ancho, 96H, -SiMe₂), -0.25 (s ancho, 36H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 181.2 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 57.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 49.6 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 34.3 (-NCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 20.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 19.5-18.0 (Si(CH₂)₃Si), 13.0 (-SiCH₂CH₂CH₂N), -3.4 (-SiMe₂), -4.5 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 1.1 (G₂-Si) y 2.0 (G₃-Si).

Análisis elemental C₂₇₂H₅₂₄N₁₆Na₃₂O₆₄Si₂₉: Calc. %: C, 49.55; H, 8.01; N, 3.40; Exp. %: C, 48.85; H, 7.68; N, 3.17.

VI.4.6.5. Preparación de [Et₃SiCH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂ Cl⁻] (45).

Sobre una disolución acuosa saturada de NH₄Cl, se añade el compuesto **41** (0.32 g, 0.88 mmol), la mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 2h, transcurrido este tiempo se evapora el disolvente a vacío calentando con un baño de agua a 50°C. El residuo obtenido se extrae con CH₂Cl₂. De este modo se obtiene el compuesto **45** como un sólido blanco soluble en agua (0.16 g, 56%).

Solubilidad > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.17 (m, 4H, -N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.96 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 2.48 (m, 4H, -N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.54 (m, 2H, -

SiCH₂CH₂CH₂N⁺H⁻), 0.73 (t, $J_{H-H}=7.9$ Hz, 9H, CH₃CH₂Si⁻), 0.36 (m, 8H, CH₃CH₂Si⁻ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H⁻).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 176.9 (-COO⁻Na⁺), 55.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H⁻), 49.9 (-N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 30.1 (-N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 18.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H⁻), 7.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H⁻), 6.7 (CH₃CH₂Si⁻), 2.5 (CH₃CH₂Si⁻).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -330 (-N⁺H[(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ 7.0 (G₀-Si).

Análisis elemental C₁₅H₃₀ClNNa₂O₄Si: Calc. %: C, 45.28; H, 7.60; N, 3.52; Exp. %: C, 52.87; H, 8.20; N, 3.82.

VI.4.6.6. Preparación de G₁-{[CH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]₄4Cl⁻} (46).

El dendrímero de primera generación se prepara de un modo similar al descrito para el compuesto **45**, partiendo de una disolución saturada de NH₄Cl a la cual se le añade el dendrímero **42** (0.19 g, 0.13 mmol). Tras agitar durante 2h y evaporar el disolvente a presión reducida, se lleva a cabo una extracción del residuo sólido con una disolución de CH₂Cl₂/MeOH (60:40). A continuación se evapora el disolvente a vacío. De este modo se obtiene el compuesto **46** como un sólido blanco soluble en agua (0.1 g, 60%).

Solubilidad > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.24 (m, 16H, -N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.93 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H⁻), 2.48 (m, 16H, -N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.54 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H⁻), 1.19 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si⁻), 0.42 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si⁻ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H⁻), -0.16 (s ancho, 6H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 176.5 (-COO⁻Na⁺), 55.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.8 (-N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 30.2 (-N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 19.7 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 18.6, 18.2, 17.3 (Si(CH₂)₃Si-), 11.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.4 (-SiMe₂).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -328 (-N⁺H[(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 2.2 (G₁-Si).

Análisis elemental C₅₆H₁₀₈Cl₄N₄Na₈O₁₆Si₅: Calc. %: C, 43.13; H, 6.98; N, 3.59; Exp. %: C, 51.87; H, 7.98; N, 4.10.

VI.4.6.7. Preparación de G₂-{[CH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]₈ 8Cl⁻} (47).

El dendrímero de segunda generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **46**, partiendo de una disolución saturada de NH₄Cl a la cual se le añade el dendrímero **43** (0.01 g, 3.18 x 10⁻³ mmol). La extracción del residuo sólido se realiza con una disolución de CH₂Cl₂/MeOH (50:50). De este modo se obtiene el compuesto **47** como un sólido blanco soluble en agua (0.003 g, 40%).

Solubilidad > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.20 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.95 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.52 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.57 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.21 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.42 (m, 64H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.12 (s ancho, 48H, -SiMe₂), -0.19 (-SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 176.3 (-COO⁻), 55.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.8 (-N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 30.1 (-N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 19.8-18.3 (Si(CH₂)₃Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.4 (-SiMe₂), -4.3 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 2.3 (G₂-Si).

Análisis elemental C₁₂₈H₂₅₂Cl₈N₈Na₁₆O₃₂Si₁₃: Calc. %: C, 44.80; H, 7.40; N, 3.26; Exp. %: C, 49.60; H, 8.07; N, 3.41.

VI.4.6.8. Preparación de G₃-{[CH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂COO⁻Na⁺)₂]₁₆16Cl⁻} (48).

El dendrímero de tercera generación se prepara siguiendo un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros de 1^a y 2^a generación **46** y **47**, partiendo de una disolución saturada de NH₄Cl a la cual se le añade el dendrímero **44** (0.13 g, 0.02 mmol). La extracción del residuo sólido se lleva a cabo con una disolución de CH₂Cl₂/MeOH (40:60). De este modo se obtiene el compuesto **48** como un sólido blanco soluble en agua (0.03 g, 30%).

Solubilidad > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.20 (m, 64H, -N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 2.96 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.53 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 1.57 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.21 (m, 56H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.42 (m, 144H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.12 (s ancho, 132H, -SiMe₂ y -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 176.2 (-COO⁻Na⁺), 55.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.8 (-N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 30.0 (-N⁺HCH₂CH₂COO⁻Na⁺), 19.9-18.0 (Si(CH₂)₃Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.3 (-SiMe₂), -4.4 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si), (G₁-Si) y (G₂-Si) no se observan, 2.3 (G₃-Si).

Análisis elemental C₂₇₂H₅₄₀Cl₁₆N₁₆Na₃₂O₆₄Si₂₉: Calc. %: C, 45.52; H, 7.58; N, 3.12; Exp. %: C, 51.87; H, 7.70; N, 2.96.

VI.4.6.9. Preparación de [Et₃SiCH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂ Cl⁻] (49).

Para la síntesis de este compuesto se parte de una disolución en MeOH del compuesto **37** (1.33 g, 4.14 mmol) y de un exceso de HCl al 37%. La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 3h. Tras eliminar el disolvente y los componentes volátiles por evaporación a vacío, se obtiene el compuesto **49** como un sólido blanco (1.38 g, 94%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.29 (m, 4H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 2.99 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.72 (m, 4H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 1.56 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 0.73 (t, J_{H-H} = 9.9 Hz, 9H, CH₃CH₂Si-), 0.35 (m, 8H, CH₃CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 173.2 (-COOH), 55.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 48.0 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 27.3 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 17.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 6.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 5.7 (CH₃CH₂Si-), 2.0 (CH₃CH₂Si-).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -325.5 (-N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ 7.0 (G₀-Si).

Análisis elemental C₁₅H₃₂ClNO₄Si: Calc. %: C, 50.90; H, 9.11; N, 3.96; Exp. C, 50.08; H, 8.76; N, 3.89.

VI.4.6.10. Preparación de G_1 -{[CH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂]₄ 4Cl⁻} (50).

El dendrímero de primera generación se prepara de un modo similar al descrito para el compuesto **49**, partiendo de una disolución en MeOH del dendrímero **38** (1.36 g, 1.01 mmol), y de un exceso de HCl al 37%. La mezcla de reacción se mantiene temperatura ambiente y con agitación constante durante 3h, tras las cuales se elimina el disolvente y los componentes volátiles por evaporación a vacío calentando con un baño de agua a 50°C. El residuo resultante se lava con dietil éter frío (2x25ml), así se obtiene el compuesto **50** como un sólido blanco (1.17 g, 84%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.30 (m, 16H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 2.99 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.70 (m, 16H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 1.57 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.21 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.44 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.15 (s ancho, 6H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 174.0 (-COOH), 55.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.1 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 28.4 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 19.6, 18.5, 18.2 (Si(CH₂)₃Si), 17.2 (SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.6 (-SiMe₂).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -325 (-N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 2.2 (G₁-Si).

Análisis elemental C₅₆H₁₁₆Cl₄N₄O₁₆Si₅: Calc. %: C, 48.61; H, 8.45; N, 4.05; Exp. C, 48.78; H, 8.41; N, 4.00.

VI.4.6.11. Preparación de G_2 -{[CH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂]₈ 8Cl⁻} (51).

El dendrímero de segunda generación se prepara de siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **50**, partiendo de una disolución del dendrímero **39** (1.0 g, 0.33 mmol) en MeOH y de un exceso de HCl al 37% (2.65 mmol). De este modo se obtiene el compuesto **51** como un sólido blanco (0.98 g, 96%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.30 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 3.01 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.74 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 1.57 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.20 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.42 (m, 64H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.14 (s ancho, 60H, -SiMe₂ y -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 173.8 (-COOH), 55.3 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.1 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 28.4 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 19.6-17.0 (Si(CH₂)₃Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.5 (-SiMe₂ y -SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 1.1 (G₁-Si) y 2.2 (G₂-Si).

Análisis elemental C₁₂₈H₂₆₈Cl₈N₈O₃₂Si₁₃: Calc. %: C, 49.91; H, 8.77; N, 3.64; Exp. %: C, 50.64; H, 8.61; N, 3.45.

VI.4.6.12. Preparación de G_3 -{[CH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂COOH)₂]₁₆ 16Cl⁻} (52).

El dendrímero de tercera generación se prepara de siguiendo un procedimiento similar al descrito para los dendrímeros de 1^a y 2^a generación, **50** y **51**, partiendo de una disolución del dendrímero **40** (1.0 g, 0.17 mmol) en

MeOH, sobre la que se añade un exceso HCl al 37%. De este modo se obtiene el compuesto **52** (0.8 g, 80%) como un sólido blanco soluble en agua.

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.29 (m, 64H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 3.00 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 2.71 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂COOH), 1.57 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.19 (m, 56H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.40 (m, 144H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.14 (s ancho, 132H, -SiMe₂ y -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 174.6 (-COOH), 55.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.4 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 28.9 (-N⁺HCH₂CH₂COOH), 19.8-17.2 (Si(CH₂)₃Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.5 (-SiMe₂), -4.4 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si), (G₁-Si) y (G₂-Si) no se observan, 2.5 (G₃-Si).

Análisis elemental C₂₇₂H₅₇₂Cl₁₆N₁₆O₆₄Si₂₉: Calc. %: C, 50.47; H, 8.91; N, 3.46; Exp. %: C, 50.99; H, 8.61; N, 2.99.

VI.4.7. Dendrimeros con grupos sulfonato en la periferia.

VI.4.7.1. Preparación de [CH₂=CHCH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂] (53).

Sobre una disolución del reactivo comercial CH₂=CHSO₃Na 30% wt. en H₂O (6.12 ml, 16.7 mmol), se añade la amina CH₂=CHCH₂NH₂ (0.5 ml, 6.66 mmol). La mezcla de reacción se mantiene con agitación constante durante 48h a 120°C. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente a vacío. Tras lavar el residuo sólido con Et₂O frío se obtiene el compuesto CH₂=CHCH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂ **53**, como un sólido pulverulento blanco (2.14 g, 86%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (DMSO): δ 5.75 (m, 1H, CH₂CHCH₂N-), 5.12 (m, 2H, CH₂CHCH₂N-), 2.98 (m, 2 H, CH₂CHCH₂N-), 2.65 (m, 4H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.61 (m, 4H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺).

RMN-¹³C {¹H} (DMSO): δ 135.7 (CH₂CHCH₂N-), 117.0 (CH₂CHCH₂N-), 56.4 (CH₂CHCH₂N-), 48.6 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 47.9 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -337.4 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺).

MS (ESI-/TOF en H₂O/H₂O/NH₄HCOO 5mM): *m/z* Calc. 317.0 [M]; Exp. 294.01 [M-Na]⁻.

Análisis elemental C₇H₁₃NNa₂O₆S₂: Calc. %: C, 26.50; H, 4.13; N, 4.41; S, 20.21; Exp. %: C, 25.61; H, 5.04; N, 3.89; S, 16.94.

VI.4.7.2. Preparación de [Et₃SiCH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂] (54).

Sobre una disolución del compuesto Et₃SiCH₂CH₂CH₂NH₂ (0.2 g, 1.14 mmol) en etanol, se añade el reactivo comercial CH₂=CHSO₃Na 30% wt. en H₂O (0.83 ml, 2.26 mmol). Esta mezcla se deja agitando durante 3 días a 120°C. Tras evaporar el disolvente a vacío el residuo sólido se lava con MeOH (3x25 ml). De este modo se obtiene el compuesto Et₃SiCH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂ **54**, como un sólido blanco (0.32 g, 65%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.87 (m, 4H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.77 (m, 4H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.32 (m, 4H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.32 (m, 2H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 0.72 (t, *J*_{H-H}=7.6 Hz 9H, CH₃CH₂Si-), 0.33 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N- y CH₃CH₂Si-).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 55.7 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 46.8 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 46.1 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 19.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 7.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 6.1 (CH₃CH₂Si-), 1.9 (CH₃CH₂Si-).

RMN-¹⁵N {¹H} (DMSO): δ -338.5 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺).

RMN-²⁹Si {¹H} (DMSO): δ 6.8 (G₀-Si).

Análisis elemental C₁₃H₂₉NNa₂O₆S₂Si: Calc. %: C, 36.01; H, 6.74; N, 3.23; S, 14.79; Si, 6.48; Exp. %: C, 35.00; H, 6.09; N, 2.71; S, 15.94.

VI.4.7.3. Preparación de G₁-[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₄ (55).

Sobre una disolución del dendrímero G₁-[CH₂CH₂CH₂NH₂]₄, (1.16 g, 1.75 mmol) en etanol, se añade el reactivo comercial CH₂=CHSO₃Na 30% wt. en H₂O (5.16 ml, 14.0 mmol). Esta mezcla se deja agitando durante 3 días a 120°C. Transcurrido este tiempo se elimina la disolución sobrenadante por filtración y el residuo sólido se lava con MeOH (3x25 ml). De este modo se obtiene el dendrímero **55** como un sólido blanco (2.25 g, 73%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.86 (m, 16H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.77 (m, 16H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.27 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.39 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.21 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.42 (m, 16H, SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.30 (m, 8H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.20 (s, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 56.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 47.8 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 47.0 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 20.4 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), 19.4 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), 18.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N-) 16.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 12.3 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), -3.8 (-SiMe₂).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -339.1 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 1.8 (G₁-Si).

MS (MALDI/TOF en Ditranol disuelto en THF): *m/z* Calc. 1760.38 [M]; Exp. 1569.33 [M-8Na-7H]⁻.

Análisis elemental $C_{52}H_{116}N_4Na_8O_{24}S_8Si_5$: Calc. %: C, 35.44; H, 6.63; N, 3.18; S, 14.56; Exp. %: C, 34.54; H, 6.56; N, 3.02; S, 15.28.

VI.4.7.4. Preparación de G_2 -[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₈ (56).

Sobre una disolución del dendrímero G_2 -[CH₂CH₂CH₂NH₂]₈ (0.5 g, 0.31 mmol) en etanol, se añade CH₂=CHSO₃Na 30% wt. en H₂O (1.8 ml, 4.91 mmol). Esta mezcla se deja agitando durante 3 días a 120°C. Transcurrido este tiempo se elimina la disolución sobrenadante por filtración y el residuo sólido se lava con MeOH (3x25 ml). De este modo se obtiene el dendrímero **56** como un sólido blanco (0.91 g, 80%).

Solubilidad en agua >100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.86 (m, 32H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.76 (m, 32H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.28 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.21 (m, 40H, -SiCH₂CH₂CH₂N- y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.43 (m, 48H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂Si-), 0.28 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.16 (s ancho, 48H, -SiMe₂), -0.21 (s ancho, 12H, -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 56.9 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 48.0 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 46.7 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 20.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 18.5-17.7 (Si(CH₂)₃Si), 12.4 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), -3.5 (-SiMe₂), -4.4 (-SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -348.5 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 1.1 (G₁-Si), 2.1 (G₂-Si).

Análisis elemental $C_{112}H_{244}N_8Na_{16}O_{48}S_{16}Si_{13}$: Calc. %: C, 36.19; H, 6.62; N, 3.01; S, 13.80; Exp. %: C, 36.06; H, 7.04; N, 2.63; S, 13.91.

VI.4.7.5. Preparación de G_3 -[CH₂CH₂CH₂N(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₁₆ (57).

Sobre una disolución del dendrímero **36** (0.52 g, 0.14 mmol) en etanol, se añade el reactivo comercial CH₂=CHSO₃Na 30% wt. en H₂O (1.70 ml, 4.64 mmol). Esta mezcla se deja agitando durante 3 días a 120°C. Transcurrido este tiempo se filtra la disolución sobrenadante y el residuo sólido se lava con MeOH (3x25 ml). De este modo se obtiene el dendrímero **57** como un sólido blanco (0.79 g, 73%).

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 2.85 (m, 64H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.78 (m, 64H, -NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 2.27 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N-), 1.24 (m, 88H, -SiCH₂CH₂CH₂N- y SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.44 (m, 144H, SiCH₂CH₂CH₂Si-, -SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N-), -0.15 (s ancho, 132H, -SiMe₂ y -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 57.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 47.9 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 47.1 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 20.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N-), 20.0-18.0 (Si(CH₂)₃Si), 12.7 (-SiCH₂CH₂CH₂Si-), -3.4 (-SiMe₂), -4.4 (-SiMe).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -349.7 (-NCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 1.2 (G₂-Si), 2.0 (G₃-Si).

Análisis elemental C₂₂₄H₄₉₂N₁₆Na₃₂O₉₆S₃₂Si₂₉: Calc. %: C, 35.76; H, 6.59; N, 2.98; S, 13.64; Exp. %: C, 36.93; H, 6.19; N, 2.58; S, 12.86.

VI.4.7.6. Preparación de G_1 -{[CH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₄ 4Cl⁻} (58).

Sobre una disolución del dendrímero **55** (0.05 g, 0.03 mmol), en agua, se añade un exceso de una disolución de HCl 1M en dietil éter (0.5 ml, 0.23 mmol).

La mezcla así preparada se mantiene con agitación constante durante 12h, tras las cuales se elimina el disolvente y los componentes volátiles por evaporación a vacío. El residuo resultante se lava con éter dietílico (2x25 ml) y se purifica mediante cromatografía en columna de exclusión por tamaños de Sephadex utilizando agua como eluyente. De este modo se aísla el compuesto **58** como un sólido blanco (0.04 g, 80%), soluble en agua.

Solubilidad en agua > 100 mg/ml.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.44 (m, 16H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 3.16 (m, 24H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.56 (m, 16H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H- y -SO₃⁻Na⁺), 1.21 (m, 8H, SiCH₂CH₂CH₂Si-) 0.42 (m, 9H, SiCH₂CH₂CH₂Si- y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.16 (s ancho, 24H, -SiMe₂).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 56.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 49.4 (-N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 44.8 (-N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 19.6 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), 18.5 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), 18.2 (SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 17.2 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 11.4 (SiCH₂CH₂CH₂Si-), -3.5 (-SiMe₂).

RMN-¹⁵N {¹H} (D₂O): δ -338.5 (-N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 2.3 (G₁-Si).

Análisis elemental C₄₈H₁₀₈Cl₄N₄Na₈O₂₄S₈Si₅: Calc. %: C, 31.20; H, 5.89; N, 3.03; S, 13.88; Exp. %: C, 34.52; H, 6.57; N, 3.03; S, 13.88.

VI.4.7.7. Preparación de G₂-{[CH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₈8Cl} (59).

El dendrímero de segunda generación se prepara de un modo similar al descrito para el compuesto **58**, partiendo de una disolución en agua del dendrímero **56** (0.07 g, 0.02 mmol) y de un exceso de una disolución 1M en

dietil éter de HCl (0.5 ml, 0.3 mmol). El residuo resultante se lava con éter dietílico (2x25 ml) y se purifica mediante cromatografía en columna de exclusión por tamaños de Sephadex utilizando agua como eluyente. De este modo se obtiene el compuesto **59** como un sólido blanco (0.04 g, 60%), soluble en agua.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.47 (m, 32H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 3.17 (m, 48H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.58 (m, 32H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H- y -SO₃⁻Na⁺), 1.23 (m, 24H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.46 (m, 64H, SiCH₂CH₂CH₂Si y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.11 (s ancho, 60H, -SiMe₂ y -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 55.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 48.4 (-N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 43.9 (-N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 20.5-17.1 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H- y Si(CH₂)₃Si), 10.6 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -3.3 (-SiMe₂ y -SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) no se observa, 0.7 (G₁-Si) y 2.2 (G₂-Si).

Análisis elemental C₁₁₂H₂₅₂Cl₈N₈Na₁₆O₄₈S₁₆Si₁₃: Calc. %: C, 33.56; H, 6.34; N, 2.80; S, 12.80; Exp. %: C, 36.93; H, 6.74; N, 2.80; S, 13.97.

VI.4.7.8. Preparación de G₃-{[CH₂CH₂CH₂N⁺H(CH₂CH₂SO₃⁻Na⁺)₂]₁₆16Cl} (60).

El dendrímero de tercera generación se prepara de un modo similar al descrito para los compuestos **58** y **59**, partiendo de una disolución en agua del dendrímero **57** (0.06 g, 0.008 mmol) y de un exceso de una disolución 1M en dietil éter de HCl (0.5 ml, 0.3 mmol). El residuo resultante se lava con éter dietílico (2x25 ml) y se purifica mediante cromatografía en columna de exclusión por tamaños de Sephadex utilizando agua como eluyente. De este modo se obtiene el compuesto **60** como un sólido blanco (0.04 g, 60%), soluble en agua.

RMN-¹H (D₂O): δ 3.47 (m, 64H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 3.16 (m, 96H, -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺ y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 1.57 (m, 64H, -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H- y -SO₃⁻Na⁺), 1.21 (m, 56H, SiCH₂CH₂CH₂Si), 0.44 (m, 144H, SiCH₂CH₂CH₂Si y -SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), -0.11 (s ancho, 132H, -SiMe₂ y -SiMe).

RMN-¹³C {¹H} (D₂O): δ 56.5 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-), 44.9 (-N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺ y -N⁺HCH₂CH₂SO₃⁻Na⁺), 20.0-17.8 (-SiCH₂CH₂CH₂N⁺H-, Si(CH₂)₃Si- y -Si(CH₂)₃Si-), 11.6 (-SiCH₂CH₂CH₂Si-), -3.3 (-SiMe₂), -4.4 (-SiMe).

RMN-²⁹Si {¹H} (D₂O): δ (G₀-Si) y (G₁-Si) no se observan, 1.1 (G₂-Si) y 2.4 (G₃-Si).

Análisis elemental C₂₄₃H₅₄₆Cl₁₆N₁₆Na₃₂O₉₆S₃₂Si₂₉: Calc. %: C, 34.86; H, 6.57; N, 2.68; S, 12.26; Exp. %: C, 38.87; H, 6.84; N, 2.90; S, 13.42.

VI.5. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] D. D. Perrin, W. L. F. Amarego, 3^o Ed. *Pergamon Press Ltd. Oxford*, **1988**.
- [2] A. W. Van der Made, P. Van Leeuwen, J. C. de Wilde, R. A. C. Brandes, *Adv. Mater.*, **1993**, 5, 466-468.
- [3] I. Cuadrado, M. Morán, J. Losada, C. M. Casado, C. Pascual, B. Alonso, F. Lobete, Eds; *G. R. Newkome, JAI press INC: Greenwich CT*, **1996**, 3.
- [4] S. W. Krska, D. Seyferth, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 3604-3612.
- [5] P. Ortega, *Tesis Doctoral, Departamento de química Inorgánica, Universidad de Alcalá*, **2005**.
- [6] T. R. C. Inc., *Toronto Research Chemicals Inc., M282275*
- [7] J. F. Bermejo, P. Ortega, L. Chonco, R. Eritja, R. Samaniego, M. Mullner, E. de Jesús, F. J. de la Mata, J. C. Flores, R. Gómez, A. Muñoz-Fernández, *Chem.-Eur. J.*, **2007**, 13, 483-495.



CAPÍTULO VII

“CONCLUSIONES”

El trabajo descrito en esta memoria permite establecer las siguientes conclusiones:

I.- Se han diseñado dos estrategias sintéticas para la preparación de dendrímeros de estructura carbosilano con grupos amino terminales estables a la humedad: i) reacciones de hidrosililación de dendrímeros con grupos Si-H periféricos a diferentes alilaminas, como por ejemplo, N,N-dimetil-N'alil,N'etil-etilenodiamina y [2-(4-alil-2-metoxi-fenoxi)-etil]-dimetil amina y, ii) reacciones de fenólisis de dendrímeros conteniendo grupos $-\text{SiCH}_2\text{Cl}$ en la periferia con diferentes amino fenoles, como por ejemplo 3-(etilamino)-4-(metilfenol).

II.- La reacción de cuaternización de los grupos amino periféricos en los dendrímeros anteriores con diferentes agentes cuaternizantes como MeCF_3SO_3 , HCl y MeI, conduce a la formación de dendrímeros catiónicos solubles en agua. Algunos de estos derivados requieren la adición de pequeñas cantidades de DMSO (menos de un 5%) para su completa solubilización.

III.- Se han diseñado dos estrategias sintéticas para la preparación de dendrímeros de estructura carbosilano con grupos carboxilato terminales estables y solubles en agua. El primer método consiste en la reacción de adición de Michael de dendrímeros carbosilano con grupos $-\text{NH}_2$ terminales sobre acrilato de metilo, permitiendo la síntesis de dendrímeros con grupos éster en la superficie. Un segundo procedimiento alternativo se basa en la hidrosililación de la alilamina $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe})_2$ con dendrímeros que contienen enlaces Si-H terminales. Estos compuestos se transforman fácilmente en dendrímeros aniónicos con grupos carboxilato terminales, mediante la adición de NaOH.

IV.- La Adición de Michael de dendrímeros carbosilano con grupos $-NH_2$ terminales sobre $CH_2=CHSO_3Na$ (vinilsulfonato de sodio) permite, de una manera sencilla y directa, la síntesis de dendrímeros aniónicos con grupos sulfonato en la periferia.

V.- La solubilidad de los sistemas dendríticos iónicos en agua es un compromiso entre el carácter lipofílico del esqueleto carbosilano y el carácter hidrofílico de los grupos cargados periféricos, dado que ambos factores aumentan con la generación. No obstante, la solubilidad en agua de los dendrímeros carbosilano iónicos sintetizados en este trabajo disminuye al aumentar la generación, hecho que se atribuye a la prevalencia de la naturaleza hidrofóbica del esqueleto carbosilano.

VI.- Todos los dendrímeros sintetizados en este trabajo han sido caracterizados de forma adecuada mediante análisis elemental de C, H, N y S, espectrometría de masas Maldi-TOF, ESI-TOF y APCI y espectroscopía de RMN multinuclear. La aplicación de diversos experimentos mono y bidimensionales de RMN ha permitido la correcta caracterización estructural de los compuestos. Los resultados obtenidos son consistentes con la alta simetría que presentan estas macromoléculas. De este estudio estructural se puede concluir que:

- VI.1.- La funcionalización de la periferia del dendrímero con diferentes grupos funcionales no afecta al desplazamiento químico del esqueleto carbosilano. No obstante, se produce un ensanchamiento de las señales al amentar la generación.
- VI.2.- Mediante experimentos de difusión (DOSY) de RMN, ha sido posible determinar el radio hidrodinámico de las especies dendríticas amino **3-5** y amonio **7-9**, tanto en agua como en acetona deuteradas, estableciéndose que estos compuestos tienen un

tamaño de entre 1 y 3 nm, lo que hace que se puedan considerar como nanoestructuras aptas para su aplicación en nanomedicina.

VII.- Modelos computacionales de los dendrímeros catiónicos **7-9** y **11-13**, permiten obtener una idea de la conformación espacial de estas estructuras para ser comparadas con los dendrímeros comerciales PAMAM y con los dendrímeros carboxilato con enlaces Si-O preparados con anterioridad en nuestro grupo de investigación. De este estudio se concluye que los nuevos dendrímeros carboxilato catiónicos presentan una estructura más abierta que los correspondientes derivados PAMAM, y muy similar a la de dendrímeros carboxilato con enlaces Si-O en su estructura inestables en disolución acuosa. Esta diferencia puede tener su repercusión en su uso en aplicaciones biomédicas

VIII.- Se ha establecido un protocolo para la valoración ácido-base de los dendrímeros aniónicos **42-44** y **55-57**. Así, se ha podido determinar que en disolución acuosa, para las especies carboxilato **42-44**, el primer grupo que se protona es el grupo amino, produciéndose la protonación posterior del grupo carboxilato. En el caso de los compuestos sulfonato **55-57**, existe un único punto final asociado a la protonación del grupo amino y debido a la gran acidez de los grupos sulfonato. En el caso de los dendrímeros carboxilato, el grupo amino aumenta su carácter básico al aumentar la generación, pudiéndose asociar este hecho a la existencia de un efecto dendrítico. En el caso de los dendrímeros con grupos sulfonato este efecto no es tan evidente.

IX.- Los estudios mediante espectroscopía UV y espectrofluorimetría de los dendrímeros catiónicos de segunda generación **16** y **26**, han demostrado la capacidad de estos para actuar como vehículos de transporte de fármacos.

- IX.1.- El desplazamiento de la banda de absorción del fármaco Diclofenac sódico cuando se añade el dendrímero **16** evidencia una interacción de tipo electrostático entre ambos compuestos.
- IX.2.- Se ha determinado, a través de medidas de fluorescencia, la interacción electrostática entre el fármaco aniónico Penicilina G y el dendrímero catiónico **26**.

X.- El estudio de la capacidad para actuar como agentes de transfección en Terapia Génica de los compuestos **7-9**, **11-13** y **15-17**, permite concluir lo siguiente:

- X.1.- Todos los dendrímeros catiónicos ensayados son capaces de formar compuestos estables con oligonucleótidos vía interacción electrostática tanto en agua como en suero, como lo demuestra los estudios de electroforesis. Estos compuestos son estables en el tiempo y en todo el rango de pH (2.5-8) utilizado.
- X.2.- Se ha estudiado la biocompatibilidad de los dendrímeros carboxilano solos y de los compuestos formados entre estos dendrímeros y los oligonucleótidos fluoresceinados Rev y TAR, en las líneas celulares neuronales U87-MG y SK-N-MC y en la linfocítica PBL. La toxicidad, en todos los casos, aumenta con la generación del dendrímero, encontrándose unos márgenes de biocompatibilidad entre 1 y 5 μM . En cuanto a la influencia del contraión, no es muy relevante en lo que a toxicidad se refiere, no obstante, los dendrímeros cuaternizados con MeCF_3SO_3 (**7-9**), mostraron los mejores perfiles de biocompatibilidad, por lo que se eligieron para continuar con el estudio como posibles agentes de transfección.
- X.3.- Los dendrímeros **7-9** son capaces de transfectar el material nucleico al interior celular, como lo demuestran las medidas de

citometría de flujo y microscopía confocal siendo este proceso dependiente de la generación del dendrímero; al aumentar la generación la transfección es más efectiva.

- X.4.- Ensayos funcionales de inhibición del VIH no muestran efecto alguno. Ello puede ser debido a la alta estabilidad del compuesto dendrímero-oligonucleótido que no permite la disociación efectiva del material nucleico dentro de la célula.

XI.- Los dendrímeros carbosilano catiónicos **7-9**, **11-13** y **15-17** han sido estudiados también como agentes terapéuticos en sí mismos, observándose lo siguiente:

- XI.1.- Los dendrímeros de primera a tercera generación cuaternizados con MeI, **15-17** y los de segunda generación que contienen CF_3SO_3^- (**8**) y Cl^- (**12**) como contraión han demostrado poseer un efecto antibacteriano importante, tanto frente a bacterias Gram+, como Gam-. Este poder bactericida, expresado en términos de CMB, aumenta con la generación. Al comparar estos datos con los del antibiótico Penicilina G, en forma de su sal potásica, se concluye que los dendrímeros carbosilano catiónicos pueden actuar como potentes agentes antibacterianos ya que, a diferencia del antibiótico comercial, los dendrímeros son activos frente a los dos tipos de bacterias estudiados. Además este efecto antibacteriano depende del contraión, siendo el orden de efectividad: $\text{I}^+ > \text{CF}_3\text{SO}_3^- > \text{Cl}^-$. o de la naturaleza del grupo amonio.

- XI.2.- Los dendrímeros catiónicos de segunda y tercera generación con CF_3SO_3^- como contraión **8** y **9** respectivamente, han resultado ser efectivos en la inhibición del VIH en CMSP en concentraciones no

citotóxicas (1-5 μM), abriendo una vía de investigación basada en nanosistemas antivirales de naturaleza catiónica.

- XI.3.- Los dendrímeros carboxilano catiónicos sintetizados **7-9** y **11-13** han resultado tener un comportamiento antipriónico diferente al de los dendrímeros PAMAM con funcionalidades similares. En este sentido los sistemas carboxilano no producen una aceleración en la formación inicial de fibras amiloides, produciendo la inhibición total a elevadas concentraciones, a diferencia de lo que ocurre con los PAMAM, que a bajas concentraciones producen una aceleración drástica en la formación de agregados, inhibiendo a concentraciones elevadas.

XII.- Se ha llevado a cabo un estudio de la capacidad antiviral, antiinflamatoria y bactericida de los dendrímeros polianiónicos con grupos carboxilato y sulfonato en la superficie **42-44** y **55-57**. De este estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- XII.1.- Los dendrímeros polianiónicos **42-44** y **55-57**, no son tóxicos en un rango de concentraciones de 1-10 μM en las líneas celulares HEC-1A y CMSP.
- XII.2.- Las segundas generaciones de ambas familias (**43** y **56**) son las más eficaces en la inhibición del VIH en estas líneas celulares. El dendrímero aniónico **56**, muestra mejores resultados en la inhibición de la internalización del virus en células HEC-1A (que sirven como modelo de la primera barrera celular del epitelio vaginal), que su análogo con grupos carboxilato **43**, no obstante ambos podrían ser considerados como agentes profilácticos para evitar la infección por VIH.

- XII.3.- El dendrímero **56** impide la infección de nuevas células en un sistema más fisiológico como es una línea primaria linfoide (CMSP), la cual sirve como modelo de la segunda barrera celular (postratamiento).
- XII.4.- El dendrímero **56** presenta además un carácter antiinflamatorio, ya que es capaz de inhibir el proceso inflamatorio por sí sólo y, de actuar como potenciador del efecto antiinflamatorio del anticuerpo monoclonal α TNF α . Esto se traduce en una mejora en el efecto antiviral de este dendrímero con grupos sulfonato en la periferia, ya que la infección por VIH está favorecida cuando existe un proceso inflamatorio.
- XII.5.- Los dendrímeros **43** y **56** funcionan también como agentes antibacterianos al presentar una capacidad bacteriostática y bactericida importante, siendo el dendrímero **56** más potente que el **43** frente a bacterias Gram+. De nuevo este resultado le proporciona un valor añadido al dendrímero **56**, ya que la infección bacteriana es una de las causas de los procesos inflamatorios, que a su vez facilitan el ataque viral.



SUMMARY

INTRODUCTION.

Dendrimers are hyperbranched macromolecules with well-defined structures. A typical dendrimer is comprised of three different topological parts in which fascinating chemistry can occur in: a focal core, building blocks with several interior layers composed of repeating units and multiple peripheral functional groups. Its versatility lies in the ease with which they can be designed and modified according to the application that they wish to make. These macromolecules, basically, are built using two techniques: divergent method, developed independently by Denkewalter, Tomalia and Newkome groups and, convergent method introduced by Fréchet in 1990.

There is currently significant interest in dendrimers as a result of their potential applications, including light harvesting and energy transfer, nanoscale catalysis, chemical sensors, unimolecular micelles, enzyme mimics, encapsulation of guest molecules, molecular recognition, diagnostic agents, and gene and drug delivery. Particularly, the structural precision of dendrimers has motivated numerous studies aimed at biomedical applications.

Some of the applications of dendrimers in nanomedicine are as drug delivery agents and biomolecules for gene therapy processes or as therapeutic agents, which include their use as antibacterial, antiviral and antiprionic agents. As transfection vehicles for gene therapy, the most common mode of action of these compounds is through the electrostatic interaction with negatively charged biomolecules (e.g. oligonucleotides (ODN) or small interference RNA (siRNA)). The major advantage of dendrimers over other non-viral vehicles is their uniform structure and the versatility with which their skeletons and surfaces can be modified, allowing a precise characterization of the complex [nucleic acid/vector] and a more accurate and systematic analysis of the transfection process.

These macromolecules can also act as therapeutic agents themselves, the main therapeutic activities of dendritic systems are as antibacterial, antiviral and as antiprionic systems. In these cases, the multivalency of dendrimers is an important factor. In general, dendrimers with antimicrobial or antiprionic capacity are cationic, although anionic dendrimers with biocide capability have been published. The most widely used dendrimers as antiviral agents are those containing carbohydrates in the periphery, peptides and anionic groups such as carboxylate and sulfonate.

This work describes the synthesis and structural characterization of ionic carbosilane dendrimers (cationic and anionic) soluble and stable in aqueous solution together with their applications in biomedicine.

RESULTS AND DISCUSSION.

The dendrimers described below are represented conform to the following general formula: G_n-X_m , where G: represents the carbosilane skeleton; n: refers to the generation; X: indicates the nature of the functional groups located in the periphery of the dendrimer and m: represents the number of terminal functional groups. All dendrimers synthesized in this work have been appropriately characterized by elementary analysis of C, H, N and S, mass spectrometry MALDI-TOF, ESI-TOF and APCI and NMR spectroscopy. The application of several NMR techniques as TOCSY 1D, NOESY 1D, gHMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$, gHMBC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$, gHMBC- $\{^1\text{H}-^{15}\text{N}\}$ and gHMBC- $\{^1\text{H}-^{29}\text{Si}\}$ has allowed correct structural characterization of compounds. The NMR data obtained are consistent with the high symmetry presented by these macromolecules.

CATIONIC CARBOSILANE DENDRIMERS.**Synthesis of dendrimers with terminal amino groups.**

We have designed new amine-terminated carbosilane dendrimers using two different strategies of synthesis:

i) hydrosilylation of different allylamines with dendrimers, up to the third generation, containing Si-H peripheral groups as those depicted in the Figure 1, in the presence of a platinum catalyst.

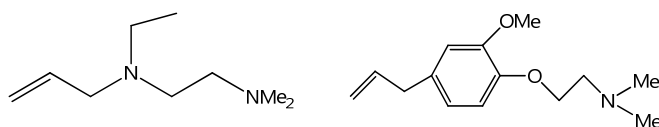


Figure 1.

ii) phenolysis reactions of dendrimers, up to third generation, with terminal SiCH_2Cl groups with the amino-phenol derivative $(\text{OH})\text{C}_6\text{H}_3(\text{Me})(\text{NHCH}_2\text{Me})$.

Synthesis of dendrimers with terminal ammonium groups.

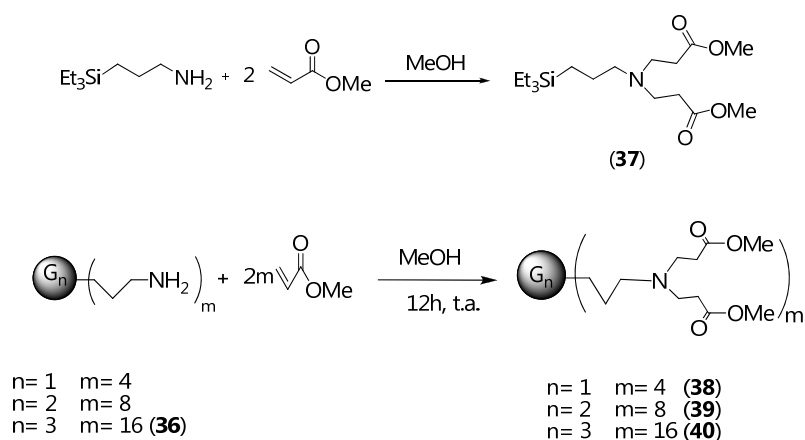
The reaction of quaternization of the peripheral groups in the amino-terminated carbosilane dendrimers described above with different agents as MeCF_3SO_3 , HCl and MeI , leads to the formation of water-soluble cationic dendrimers. Some of these derivatives require the addition of small amounts of DMSO (less than 5%) for complete dissolution in water.

Figure 2 shows, for example, the proposed structure for second generation cationic dendrimers prepared in this work, which are consistent with the analytical and spectroscopic data obtained for them.

ANIONIC CARBOSILANE DENDRIMERS.

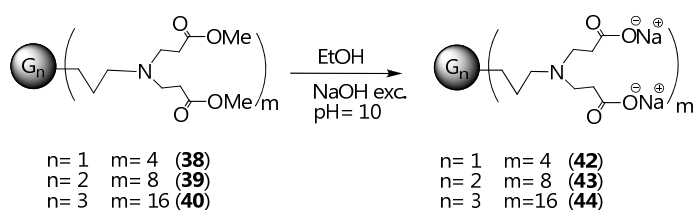
Synthesis of dendrimers with terminal carboxylate groups.

The Michael Addition reaction of carbosilane dendrimers with terminal -NH₂ groups on methyl acrylate allows to obtain dendrimers with ester groups on the surface (see Scheme 1). These dendrimers with peripheral ester groups, may also be prepared by an alternative procedure consisting in the hydrosilylation of the allylamine CH₂=CHCH₂N(CH₂CH₂COOMe)₂ with dendrimers containing terminal Si-H bonds,



Scheme 1.

These compounds can be easily transformed into anionic dendrimers with terminal carboxylate groups, by adding NaOH. See Scheme 2.



Scheme 2.

The Figure 3 shows the proposed structure for the second generation dendrimer, **43**. This structure is consistent with the analytical and spectroscopic data for these compounds.

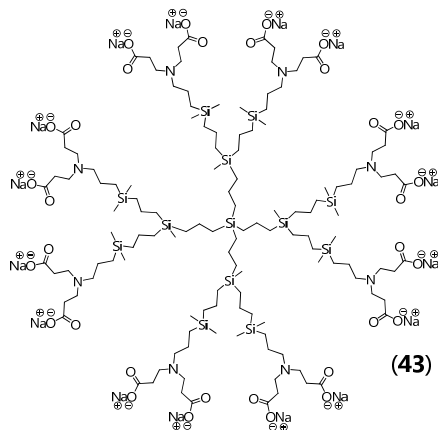
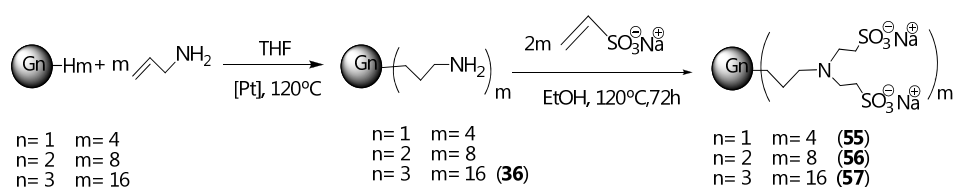


Figure 3.

Synthesis of terminated sulfonate groups dendrimers.

The Michael Addition reaction of carbosilane dendrimers with -NH_2 terminal groups over $\text{CH}_2=\text{CHSO}_3\text{Na}$, allows the synthesis of anionic dendrimers with sulfonate groups on the periphery, of general formula $\text{G}_n\text{-}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+)]_m$, where $n=1, m=4$; $n=2, m=8$ and $n=3, m=16$, for 1st, 2nd and 3rd generation respectively. See Scheme 3.



Scheme 3.

Figure 4, shows a proposed structure for the second generation dendrimer. This structure is consistent with analytical and spectroscopic data for these compounds.

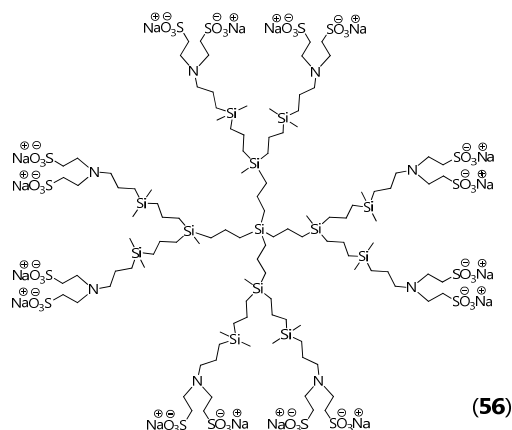


Figure 4.

It has been established a protocol for the acid-base titration of anionic dendrimers with carboxylate and sulfonate terminal groups. Thus, it has been determined that in aqueous solution, the carboxylate derivatives, are protonated first over the nitrogen of the amino group, and then in a second stage, occurs the subsequent protonation of the carboxylate group. In the case of sulfonate derivatives, there is a single endpoint due to the high acidity of sulfonate groups. Thus, in aqueous medium, only is possible to find the species containing the protonated nitrogen of the amino group. A dendritic effect has been observed in the dendrimers with carboxylate groups on the surface, as the pKa values of these compounds increases on increasing the dendrimer generation, indicating that the amino group becomes more basic in higher generations.

BIOMEDICAL ASSAYS WITH IONIC CARBOSILANE DENDRIMERS.

Cationic carbosilane dendrimers, **16** and **26**, have the ability to act as drug transport vehicles since we have demonstrated that these dendrimers interact with different drugs through an electrostatic interaction. The shift of the absorption band in the UV-VIS spectrum of the sodium salt of Diclofenac when

is in the presence of dendrimer **16** suggests that there is an electrostatic interaction between both compounds. In the case of dendrimer **26**, we have seen this electrostatic interaction with the drug Penicillin G, due to the fluorescence emission properties of this compound.

Cationic carbosilane dendrimers, **7-9**, **11-13** and **15-17**, have shown also ability to act as transfection agents in gene therapy procedures. All tested cationic dendrimers, are capable of forming stable complexes with TAR oligonucleotide (observed by agarose gel electrophoresis), both in water and serum, over time (1 week) and the pH range (2.5-8). This determines that these complexes may be candidates for use as non viral vectors in any type of physiological tissue. In addition, the maximum retention of ODN comes at a (+/-) charge ratio of 2:1.

The toxicity of carbosilane dendrimers alone and dendriplexes formed between these dendrimers and fluoresceinated Rev and TAR oligonucleotides has been studied in neuronal cell lines U87-MG, SK-N-MC and in the lymphocytic line PBL. The toxicity, in all cases, increases on increasing dendrimer generation, finding a biocompatibility limits between 1 and 5 μ M. The influence of the counterion, is not very relevant in toxicity terms, however, MeCF₃SO₃ quaternized dendrimers (**7-9**), showed the best biocompatibility profiles, so they were chosen to continue the studies as possible agents of transfection. The ability of dendrimers **7-9** to act as non viral vector for the internalization of nucleic acids (oligonucleotides and siRNA) into PBL's has been determined by flow cytometry and confocal spectroscopy. All dendrimers are able to transfect nucleic material into the cells but high generations are more effective. However, these dendrimers failed in all functional anti-HIV assays tested, probably due to the strong interaction observed between dendrimer and oligonucleotide that avoid efficient nucleic material liberation within the cell.

Cationic carbosilane dendrimers, **7-9**, **11-13** and **15-17**, can also act as therapeutic agents by themselves. The results obtained, show that the dendrimers from first to third generation quaternized with MeI, **15-17** and the second generation dendrimers containing CF_3SO_3^- (**8**) and Cl^- (**12**) as counterions, presents a significant antibacterial activity, against both Gram+, and Gram- bacteria. The bactericidal power, expressed in terms of the MBC increases on increasing dendrimer generation. By comparing these data with those of the antibiotic penicillin G, in the form of potassium salt, it is concluded that cationic carbosilane dendrimers can act as powerful antibacterial agents because, unlike the commercial antibiotic, dendrimers are active against both types of bacteria studied. In addition, this antibacterial effect depends on the counterion, with the order of effectiveness: $\text{I}^- > \text{CF}_3\text{SO}_3^- > \text{Cl}^-$ or the ammonium group nature.

The second and third generation dendrimers, **8** and **9**, have proved to be effective inhibiting HIV infection in PBMC when are used at a non-cytotoxic concentration (1-5 μM).

Some of the cationic carbosilane dendrimers synthesized in this work, have also demonstrated to have an antiprionic effect with a different behaviour of that shown by the PAMAM dendrimers with the same peripheral groups. In this sense carbosilane systems do not produce acceleration in the initial formation of amyloid fibers, producing total inhibition at high concentrations, unlike what happens with PAMAM, which at low concentrations produce a dramatic acceleration in the formation of aggregates, inhibiting at high concentrations.

Anionic carbosilane dendrimers, **42-44** and **55-57**, with carboxylate and sulfonate groups respectively on the surface, showed capacity to act as

therapeutic agents with antiviral or antibacterial activity. These derivatives seem to have also an anti-inflammatory ability.

The polyanionic dendrimers are not toxic in a concentration range of 1-10 mM in HEC-1A and PBMC cell lines. The second generation dendrimers of both families (**43** and **56**), are more effective inhibiting HIV infection in these cell lines. The anionic dendrimer **56** shows better results in the internalization inhibition of the virus in HEC-1A cells (which serve as model for the first vaginal epithelial cell barrier), than its analog with carboxylate groups **43**. However, both of them could be considered as prophylactic agents (microbicides) to prevent HIV infection.

The dendrimer **56** has been used to carry out a more thorough study in order to determine its capacity as a prophylactic and therapeutic agent, using a more physiological system (a primary lymphoid line (PBMC), which serves as a model of the second cellular barrier of the vaginal epithelium). This study has shown that dendrimer **56** prevents infection of new cells (prophylactic) and, when cells are infected and treated with the dendrimer, it prevents viral replication (therapeutic). In addition, preliminary data showed that this compound can inhibit itself the inflammatory process, besides acting as an enhancer of anti-inflammatory monoclonal antibody α TNF. This results into an added value for the dendrimers acting as microbicides.

The bactericidal effect of dendrimers **43** and **56** has been measured against commercial antibiotic Gobemycin[®] (ampicillin), in terms of bactericidal and bacteriostatic activity. The results show that both dendrimers possess antibacterial capabilities, being dendrimer **56** more powerful than **43** versus Gram+ bacteria. Again, this result gives added value to the dendrimer **56**, because bacterial infection is one of the causes of inflammatory processes, which facilitates viral attack.

CONCLUSIONS.

1.- Ammine terminated carbosilane dendrimers have been prepared using two strategies of synthesis: hydrosilylation of different allylamines with precursor dendrimers containing terminal Si-H bonds and the phenolysis reaction of different aminophenol compounds with dendrimer containing terminal Si-CH₂Cl bonds.

2.- Quaternization of ammine functionalized dendrimers with different agents such as MeI, HCl and MeCF₃SO₃, provides cationic dendrimers stable and soluble in aqueous solution. Diffusion (DOSY) NMR experiments and computational models, have determined that the sizes of the cationic dendrimers are between 1-3 nm, which enables them to be used in different biomedical processes.

3.- Anionic carbosilane dendrimers, with terminal carboxylate or sulfonate units, can be easily prepared through different processes that includes a Michael Addition reaction. These anionic dendrimers are water soluble but solubility decreases when the dendrimer generation increases, due to the hydrophobic nature of the carbosilane skeleton.

These anionic compounds suffer reversible protonation and deprotonation processes depending on the pH of the medium. In the case of dendrimers with carboxylate groups, protonation occurs initially in the amino group and later in the carboxylic part, whereas in the case of dendrimers with sulfonate groups, in aqueous solution, is only possible to detect species where the amino group is protonated.

4.- Cationic dendrimers can be considered as potential drug delivery systems since they present electrostatic interactions with different anionic drugs.

Cationic dendrimers can be also used as non viral vectors for gene therapy processes acting as transfecting agents. Cationic carbosilane dendrimers form complexes, called dendriplexes, with nucleic acids (oligonucleotides or siRNA). These dendriplexes are non toxic in a concentration range of 1-5 μM , are able to transfect nucleic material into different types of cells. Unfortunately, they failed when functional anti-HIV assays were conducted because of the strong interaction shown by dendrimers and oligonucleotides. A decrease of such interaction like the internment of the ammonium charged groups may facilitate the nucleic material liberation. But this situation is out of the scope of this Memory.

Other biomedical application of cationic dendrimers is their use as therapeutic agents by themselves. In these sense, the carbosilane dendrimers described in this work have shown antibacterial (against Gram+ and Gram- bacteria), antiviral or antiprionic activity.

5.- Anionic dendrimers have demonstrated to have antiviral capacity against HIV used in non-cytotoxic concentrations (1-10 μM) in the HEC-1A and PBMC cell lines. The second generation dendrimer with sulfonate groups at the periphery, showed the best results in the internalization inhibition of the virus. These compounds prevent infection of new cells (prophylactic effect) and, when cells are infected and treated with the dendrimer, it prevents viral replication (therapeutic effect). Furthermore, preliminary tests show that this compound can inhibit the inflammatory process itself, besides acting as an enhancer of anti-inflammatory monoclonal antibody $\text{aTNF}\alpha$ and has some antibacterial properties. These results enhance the antiviral capacity as the viral infection is favored if there is an inflammatory process and the latter can be induced by bacterial processes. Therefore, the anti-inflammatory and antibacterial behaviours afford added values of their use as microbicides.