

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

**Síntesis de dendrímeros como potenciales
acarreadores de fármacos
anticancerígenos: Taxol y Metotrexato**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIA
E INGENIERÍA DE MATERIALES

P R E S E N T A:

M. en C. DELIA SOTO CASTRO

TUTORA: Dra. Patricia Guadarrama Acosta



MÉXICO, D. F

2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

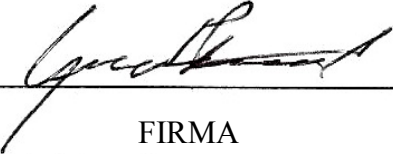
JURADO ASIGNADO

Presidente: DR. JOSÉ NORBERTO FARFÁN GARCÍA
Vocal DR. MIKHAIL ZOLOTUKHIN
Vocal DRA. MARIA DEL PILAR CARREÓN CASTRO
Vocal DRA. PATRICIA GUADARRAMA ACOSTA
Secretario DR. ERNESTO RIVERA GARCÍA

LABORATORIO DE MATERIALES FUNCIONALES ORGÁNICOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES
UNAM

TUTOR DE TESIS

DRA. PATRICIA GUADARRAMA ACOSTA


FIRMA

AGRADECIMIENTOS

Por los apoyos económicos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por la beca otorgada con número de registro 202247 para la realización de los estudios de doctorado.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico, DGAPA, por la beca otorgada por parte de los proyectos IN-101109/21 e IN-101109/22, dentro del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT, de la UNAM.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, ICyT-DF, por la beca otorgada para la conclusión de tesis.

Muy especialmente:

A la Dra. Patricia Guadarrama Acosta por la dirección de esta tesis, por todo su apoyo, sugerencias y tiempo dedicado.

Al M. en C. Gerardo Cedillo, al Ing. Miguel Ángel Canseco, a la M. en C. Teresa Ramírez-Apan y a la M. en C. Carmen Márquez por las determinaciones realizadas, fundamentales en la realización de ese trabajo.

Al personal del Instituto de Investigaciones y Materiales por las facilidades para la realización de este proyecto

A los miembros del jurado por sus aportaciones y sugerencias.

Con mucho cariño:

A mis Padres, mis hermanos y mi esposo, por todo el apoyo, cariño y comprensión que me brindan día con día

A mis amigos, que se cuentan con una mano, por todo su apoyo y por los buenos momentos que espero seguir compartiendo por muchos años más

A Jorge Armando Cruz, por el apoyo incondicional en etapas difíciles.

¡GRACIAS!

*Dedico este trabajo a mi hija,
Valeria, que se convirtió en el
motor de mi vida desde que
supe que nacería. Por quién,
más que nunca, estoy
aprendiendo día a día y a quién
espero motivar y educar para
que sea una buena persona.*

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE PROYECTO

Parte de los resultados obtenidos con esta investigación fueron publicados y presentados como a continuación se enumera.

Artículo

Soto-Castro, D., Cruz-Morales, J. A., Ramírez, A. M. T. and Guadarrama, P., “Synthesis of Non-Cytotoxic Poly(Ester-Amine) Dendrimers as Potential Solubility Enhancers of Drugs. Methotrexate as Case of Study”, *Molecules*, 2010, 15(11), 8082-8097; doi:10.3390/molecules15118082

Congresos

- **Delia Soto Castro** y Patricia Guadarrama Acosta, poster: Síntesis de nuevos dendrímeros como potenciales acarreadores de fármacos a base de 3-amino-1-propanol N-alkilado, *5ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica*, Zacatecas, México, **2009**.
- **Delia Soto Castro**, Jorge A. Cruz Morales, María Teresa Ramírez Apan y Patricia Guadarrama Acosta, presentación oral: Síntesis de nuevos dendrímeros no citotóxicos como potenciadores de la solubilidad de fármacos, *Segunda escuela de nanomedicinas 2010 y 1er Simposio Latinoamericano de Nanomedicinas*, La Plata, Argentina, del 25 al 29 de octubre de **2010**.
- **Delia Soto Castro** y Patricia Guadarrama Acosta, presentación oral: Síntesis de PAMAM funcionalizado con tris(hidroximetil)aminometano como plataforma para la liberación de fármacos anticancerígenos, *NANOMEX 10*, Cuernavaca, México, del 17 al 19 de Noviembre de **2010**.

INDICE GENERAL

	Pg.
RESUMEN	10
ABSTRACT	12
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	
2.1 Cáncer	19
2.1.1 Fármacos anticancerígenos	20
2.1.2 Metotrexato (MTX)	21
2.1.3 Taxol	22
2.1.4 Terapia Macromolecular	24
2.2 Dendrímeros	26
2.2.1 Estructura y nomenclatura	27
2.2.2 Síntesis de dendrímeros	
2.2.2.1 Método divergente	27
2.2.2.2 Método convergente	28
2.2.2.3 Síntesis en doble etapa	30
2.2.3 Propiedades fisicoquímicas	32
2.2.4 Propiedades idóneas en sistemas biológicos	34
2.2.5 Caracterización	36
2.2.6 Aplicaciones	37
2.2.6.1 Dendrímeros como acarreadores de fármacos	37
2.2.6.2 Complejos dendriméricos o endo-receptores	38
2.2.6.3 Conjugados dendriméricos o exo-receptores	40
2.2.6.4 Dendrímeros en terapia contra el cáncer	41
CAPÍTULO III. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	45
3.1.1 Objetivos específicos	45
CAPÍTULO IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
4.1 Reactivos y disolventes	46
4.2 Equipos	46
4.3. Síntesis de dendrímeros de PAMAM con núcleo de etiléndiamina	
Dendrímero de PAMAM con 4 terminales éster (1)	47
Dendrímero de PAMAM G=1.5 con 8 terminales éster (2)	47
Dendrímero de PAMAM G=2.5 con 16 terminales éster (3)	48
Dendrímero de PAMAM G=2.5 modificado con TRSI con 4 terminales	

alcohol (4)	48
4.4 Síntesis de dendrímeros aminoéster	
Dendrón (5)	49
Procedimiento general para los dendrímeros con terminales ter-butil éster	49
Procedimiento general para la hidrólisis del grupo ter-butil éster	50
4.4.1 Dendrímero aminoéster con núcleo de ácido adípico (DA)	
DA con 4 terminales ter-butil éster (6)	50
DA con 4 terminales ácido carboxílico (7)	51
DA con 8 terminales ter-butil éster (8)	51
DA con 8 terminales ácido carboxílico (9)	52
4.4.2 Dendrímeros aminoéster con núcleo de etiléndiamina (DE)	
Híper-núcleo de etiléndiamina 4 terminales ter-butil éster (10)	52
Híper-núcleo de etiléndiamina 4 terminales ácido carboxílico (11)	53
DE con 8 terminales ter-butil éster (12)	53
DE con 8 terminales ácido carboxílico (13)	54
4.5 Síntesis de conjugados dendriméricos	
4.5.1 Dendrímero 4con MTX y AF (14)	54
4.5.2 Dendrímero 4con taxol	
2'-Hemisuccinato de taxol (15)	55
N-Succinimidil Difenil Fosfato (SDPP) (16)	55
Taxol N-hidroxisuccinimidil éster (17)	55
Formación del conjugado dendrímero 4-taxol (18)	56
4.6 Ensayo del porcentaje de inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas cancerígenas y linfocitos humanos (MT2) a 50 µM.	
Líneas celulares y medios de cultivo	56
Ensayo de porcentaje de inhibición en el crecimiento celular.	57
4.8 Preparación de muestras para UV-vis de los conjugados dendriméricos	58
4.9 Detalles Computacionales	58
4.10 Formación de complejos dendrímero-fármaco	
Procedimiento general para la formación de complejos dendrímero-fármaco	59
Complejos en agua	59
Complejos en PBS	59
Determinación de solubilidad máxima de MTX	60
Liberación de MTX por descenso del pH	60
CAPÍTULO V. ANÁLISIS DE RESULTADOS: SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS	
5.1 Estrategia sintética	61
5.2 Dendrímeros de PAMAM con núcleo de etiléndiamina	66
5.3 Dendrímeros aminoéster.	73
5.3.1 Dendrímeros con núcleo de ácido adípico	74
5.3.2 Dendrímeros con núcleo de etiléndiamina	78

CAPÍTULO VI. EVALUACIÓN DE DENDRÍMEROS COMO POTENCIALES ACARREDORES DE FÁRMACOS	
6.1 Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular de los dendrímeros y sus posibles metabolitos	81
6.2 Conjugados Dendriméricos	
6.2.1 Estudio con MTX y AF	82
6.2.1.1 Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular de los conjugados dendriméricos con MTX	97
6.2.2 Estudio con Taxol	98
6.3 Dendrimeros como potenciadores de la solubilidad	
6.3.1. Estudio con MTX	105
6.3.1.1 Formación de complejos en agua	106
6.3.1.2 Formación de complejos en PBS	108
6.3.1.3 Evaluación del porcentaje de inhibición de los complejos dendrímero-MTX	111
6.3.2 Estudio con Taxol	112
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES	113
PERSPECTIVAS	115
Anexo 1 Efecto del disolvente en experimento de RMN dendrímero 12	116
Anexo 2 Presencia de DCU en el DA G2	117
Anexo 3 Caracterización espectroscópica complementaria de los compuestos sintetizados	118
Anexo 4 Hidrólisis del dendrón interno para pruebas in vitro.	144
Anexo 5 Curva de calibración del ácido fólico	146
Referencias	147

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AcOEt	Acetato de Etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido fólico
ARN	Ácido ribonucleico
BC	Número de puntos de ramificación en cada generación)
C^X	Concentración de la especie X
CCF	Cromatografía en capa fina
<i>d</i>	Señal doble
DA	Dendrímero amino-éster con núcleo de ácido adípico
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DCU	Diciclohexilurea
DE	Dendrímero amino-éster con núcleo de etiléndiamina
DhFR	Dihidrofolato reductasa
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	N,N-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDC	1-etil-3-[(3-dimetilamino)propil]-carbodiimida
EPR	Factor de incremento de permeabilidad y retención
ESI	Ionización por electrospray
ETDA	Etiléndiamina
FAB	Bombardeo con átomos rápidos
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
G	Generación dendrimerica
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HCT-15	Adenocarcinoma colorectal
HER2	Receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
Hex	Hexano
J	Constante de acoplamiento
K562	Leucemia mielógena crónica
M	Masa molecular
<i>m</i>	Señal múltiple
MALDI	Ionización/ desorción láser asistida por matriz
MCF-7	Adenocarcinoma mamario
M_{RU}	Masa molecular de la unidad terminal
M_t	Masa molecular de la unidad repetitiva
MT2	Linfocitos humanos normales
MTX	Metotrexato
N_b	Multiplicidad de las ramas
N_c	Multiplicidad del núcleo
NHS	N-hidroxisuccinimidil
PAMAM	Poliamidoamina

PBS	Solución salina buffer de fosfatos
PC-3	Adenocarcinoma prostático
PEG	Polietilenglicol
PEO	Polióxido de etileno
pf	Punto de fusión
PPI	Polipropilenimina
q	Señal quintuple
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Señal simple
SDPP	N-succinimidil difenilfosfato
SKLU-1	Adenocarcinoma pulmonar
t	Señal triple
tBuOH	ter-butanol
TFA	Ácido trifluoroacético
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
U251	Glioblastoma (cáncer cerebral)
UV-Vis	Ultravioleta-visible
Z	Número de grupos superficiales
λ	Longitud de onda
ϵ_{λ}^X	Coefficiente de absortividad de la especie X a una longitud de onda dada
ζ	Zeta

RESUMEN

Los dendrímeros son macromoléculas monodispersas que se caracterizan por presentar una estructura tridimensional bien definida y un alto número de grupos terminales que les brindan propiedades únicas de solubilidad y multifuncionalidad. Dichas características abren una amplia gama de aplicaciones potenciales en el área de medicina (diagnóstico y aplicaciones terapéuticas¹), así como en otras áreas de la química y la ingeniería de materiales. Especialmente en el área de farmacia, donde existe un serio problema de hidrofobicidad que limita la eficiencia de muchos fármacos, los dendrímeros han sido estudiados para actuar como potenciales acarreadores-liberadores de fármacos, ya sea mediante la formación de conjugados (uniendo covalentemente fármaco-dendrímero) o vía complejos de inclusión mediante interacciones no covalentes.²

En este contexto, el presente trabajo describe por un lado, la síntesis del PAMAM G2.5 funcionalizado con el tris(hidroxi-metil-aminometano) (TRIS) (dendrímero **4**) para la formación de conjugados dendriméricos; y por otro, la síntesis de dos nuevos dendrímeros de amino-éster con terminales de ácido carboxílico (dendrímeros **9** y **13**) estudiados como potencializadores de la solubilidad de fármacos.

Para la formación de los conjugados dendriméricos, la reacción de sustitución con el TRIS de las terminales metil éster por hidroxilos en el PAMAM G2.5, permite tener grupos hidroxilo en la periferia, lo que le brinda completa solubilidad en agua, previene interacciones no específicas con las paredes celulares (en consecuencia disminuye la citotoxicidad) y además en un solo paso de reacción deja grupos adecuados en la superficie para anclar moléculas vía enlaces éster, en este caso de ácido fólico (AF, que actúe como anzuelo ya que las células cancerígenas tienen sobreexpresados los receptores folato) y de metotrexato (MTX, fármaco anticancerígeno).

La reacción de acoplamiento del AF y del MTX al dendrímero **4** se realizó en un solo paso, dejando al azar la distribución de estas moléculas en el conjugado. Como resultado se obtuvieron dos conjugados dendriméricos completamente solubles en agua, uno que solo contiene MTX y otro que tiene tanto moléculas de AF como de MTX. Ambos conjugados, de acuerdo a los resultados de los estudios in vitro para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento celular en diferentes líneas celulares

cancerígenas humanas, así como en células sanas MT-2 (linfocitos humanos), indican que el porcentaje de inhibición del MTX en los conjugados es muy similar al del MTX (disuelto en DMSO) libre en células cancerígenas, pero la citotoxicidad hacia las MT-2 decrece drásticamente e incluso en el caso del conjugado con AF y MTX favorece el crecimiento de esta línea celular. En este mismo escenario se probó la formación de conjugados con el Taxol, sin embargo, la cantidad tan baja de fármaco anclado sólo permitió obtener resultados cualitativos, evidenciando el incremento de solubilidad de este fármaco en agua.

Por otro lado, los nuevos dendrímeros amino-éster con terminales de ácido carboxílico sintetizados (dendrímeros **9** y **13**) y sus posibles productos de degradación demostraron ser inocuos de acuerdo a la evaluación in vitro del % de inhibición en la línea celular sana MT-2. Si bien estos dendrímeros no pueden actuar como agentes encapsulantes, si demostraron potencializar la solubilidad del MTX en medios acuosos a pH 7 y 7.4 mediante la formación de estructuras supramoleculares y ambos presentan una liberación del fármaco al bajar el pH. Estos dendrímeros han demostrado, además de solubilizar al MTX, mantener la citotoxicidad de éste hacia diferentes líneas celulares cancerígenas y abatirla en la línea sana MT-2.

¹ a) Stiriba, S-E., Frey, H., Haag, R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1329-1334; b) Lee, C.C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M. J., Szoka, F.C., *Nature Biotech.*, **2005**, 23, 1517-1526. c) Halkes, S. B. A., Vrasidas, I., Rooijer, G. R., Van den Berg, A. J. J., Liskamp, R. M. J., Pieters, R. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 1567-1570. d) Aulenta, F., Hayes, W., Rannard, S., *Eur. Polym. J.*, **2003**, 39, 1741. e) Boas, U., Heegaard, P. M. H., *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 43-63.

² Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J. W., Meijer, E. W., Paulus, W., Duncan, R., *J. Cont. Rel.*, **2000**, 65, 133-148

ABSTRACT

Dendrimers are monodisperse macromolecules characterized by a well-defined three-dimensional structure and a high number of peripheral groups that provide them unique properties of solubility and multifunctionality. These features open a wide range of potential applications in the field of medicine (diagnostic and therapeutic applications¹) as well as in other areas of chemistry and materials engineering. Especially in the pharmaceutical area, where hydrophobicity is a serious problem because it limits the efficiency of many drugs, dendrimers have been designed to act as potential drug delivery systems, either through conjugates formation (covalently linking drug-dendrimer) or via inclusion complexes by noncovalent interactions.²

In this context, this work describes on one hand, the synthesis of G2.5 PAMAM functionalized with tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) (dendrimer **4**) for the formation of drug conjugated dendrimer, and secondly, the synthesis of two new amino-ester dendrimers with carboxylic acid as end groups (dendrimers **9** and **13**), these were probed as solubility enhancers of drugs.

The dendrimeric conjugate was achieved by the substitution reaction of methyl ester end groups in PAMAM G2.5 with TRIS, thereby leaving hydroxyl groups on the periphery, improving in this way the solubility in water, preventing nonspecific interaction to the cell walls (and thus decreases the cytotoxicity). Also, in a single step reaction, the end groups on the surface are ready to anchor molecules via ester bonds. In this case we attach folic acid (FA, acts as target moiety because cancer cells over expressed folate receptors) and methotrexate (MTX, anti-cancer drug).

The coupling reaction of FA and MTX on dendrimer **4** was performed in one step, leaving a random distribution of these molecules in the conjugate. As a result, we obtained two dendrimeric conjugates completely water soluble; one containing only MTX and the other conjugate bearing both AF and MTX. According to the results of *in vitro* studies to determine the percentage of inhibition of cell growth in human cancer cell lines, as well as healthy cells MT-2 (human lymphocytes), the percentage of inhibition of MTX in conjugates is very similar to free MTX (dissolved in DMSO) towards cancer cells, but cytotoxicity towards MT-2 decreases drastically and even in the case of AF combined with MTX promotes growth in this cell line. In this scenario, we tested the formation of conjugates with Taxol, however, the amount of loaded drug

was not enough for quantitative characterization, and only qualitative results show the increased solubility of the drug in water.

On the other hand, the new amino-ester dendrimers with carboxylic acid end groups (dendrimers **9** and **13**) and their possible degradation products could be considered as innocuous, according to *in vitro* evaluation of percentage of inhibition in healthy cells lines MT-2. While these dendrimers cannot act as encapsulating agents, they can virtually enhance the solubility of MTX in aqueous medium at pH 7 and 7.4, by means of formation of supramolecular structures and both show the release of the drug by lowering the pH. These dendrimers have shown also the solubilization of MTX, maintaining its cytotoxicity towards different cancer cell lines, but decreasing in the MT-2 cell line.

¹ a) Stiriba, S-E., Frey, H., Haag, R., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1329-1334; b) Lee, C.C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M. J., Szoka, F.C., *Nature Biotech.*, **2005**, 23, 1517-1526. c) Halkes, S. B. A., Vrasidas, I., Rooijer, G. R., Van den Berg, A. J. J., Liskamp, R. M. J., Pieters, R. J., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 1567-1570. d) Aulenta, F., Hayes, W., Rannard, S., *Eur. Polym. J.*, **2003**, 39, 1741. e) Boas, U., Heegaard, P. M. H., *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 43-63.

² Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J. W., Meijer, E. W., Paulus, W., Duncan, R., *J. Cont. Rel.*, **2000**, 65, 133-148.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

En nuestro país, como en muchos otros países en desarrollo, las cifras de muerte debido al cáncer son alarmantes, en el año 2006 se publicaban las siguientes:

- *Cada dos horas muere en México una mujer por cáncer cérvicouterino*
- *Diez mujeres fallecen diariamente por cáncer de mama en México*

Y tras casi 5 años la situación no ha cambiado, se pronostica que en los años subsecuentes se convierta en la segunda causa de muerte entre los hispanos. Esta enfermedad, que se caracteriza por el crecimiento incontrolado y propagación de células anormales, puede *prevenirse*, sin embargo, debido a la falta de información y al mal seguimiento de los casos detectados tempranamente, la mayoría de las veces es necesario que los pacientes sean sometidos a diferentes tratamientos como cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica o una combinación de éstos, dependiendo de factores como el tipo y ubicación del cáncer, de si la enfermedad se ha extendido, de la edad y salud general del paciente entre otros. Desafortunadamente la falta de especificidad de los fármacos anticancerígenos provoca daños en células y tejidos sanos y causa efectos secundarios que en casos extremos pueden llegar a generar otros tipos de cáncer por su alta toxicidad en el sistema gastrointestinal o el hígado.

Dada la importancia del problema, a través del tiempo se han planteado diversas soluciones para aumentar la solubilidad y la especificidad de los fármacos, sin afectar su actividad farmacológica. Entre las posibilidades se plantea el uso de micelas, de liposomas, polímeros híper-ramificados y más recientemente de dendrímeros y polimerosomas. Aún cuando los más estudiados son los liposomas por la facilidad de síntesis, los dendrímeros poseen características que los colocan como los mejores candidatos para ésta y otras muchas aplicaciones como lo sugieren los numerosos estudios de Tomalia, Frechet y Baker Jr , entre muchos más.

Los dendrímeros están formados por un núcleo a partir del cual emergen capas concéntricas, que eventualmente generan una estructura globular con huecos interiores con ambientes químicos específicos (con posibilidad de encapsular moléculas de menor tamaño) y una superficie con un alto número de grupos terminales determinados *a priori*, que le brindan propiedades de solubilidad y multifuncionalidad únicas (permiten anclar vía covalente fármacos para formar un conjugado dendrimérico). Justamente estas características les abren una amplia gama de aplicaciones potenciales en medicina: como agentes de imagen, como acarreadores-liberadores de fármacos contra el cáncer o la artritis reumatoide, por mencionar algunas, y como agentes virales, siendo ésta última aplicación una realidad con VIVAGEL ®, uno de los pocos productos comerciales a base de dendrímeros.

Con estos antecedentes, en el presente trabajo se estudiará la síntesis de dendrímeros de PAMAM y dos nuevos dendrímeros no citotóxicos a base de grupos amino y éster, completamente solubles en agua que permitan evaluar los dos escenarios del acarreamiento de fármacos hidrofóbicos: 1) la formación de complejos, mediados por interacciones intermoleculares, lo que permitirá la solubilidad del fármaco en agua sin inhibir sus propiedades anticancerígenas y reducirá la citotoxicidad en células sanas; 2) formación de conjugados dendriméricos, con los que se lograría el mismo objetivo pero además la liberación del fármaco sería más específica al requerirse de medios con pH ácido para el rompimiento del enlace dendrímero-fármaco.

Este trabajo consta de 6 capítulos con las siguientes temáticas: En el 2º capítulo se presenta una revisión bibliográfica de la problemática del cáncer y del tema de dendrímeros, su síntesis y algunas aplicaciones en el área farmacéutica. En el capítulo 3 se describen los objetivos generales y particulares. En el 4º se detalla la parte experimental, mientras que en el 5 se hace un análisis de los resultados de síntesis y caracterización de los dendrímeros obtenidos. Posteriormente, en el capítulo 6, se analiza la formación de los conjugados dendriméricos entre PAMAM G2.5 funcionalizado con tris(hidroximetil)aminometano. Por un lado, con MTX (fármaco anticancerígeno) y AF (fungiendo como anzuelo); y por otro, con Taxol (fármaco anticancerígeno). Además, se presenta la formación de complejos entre los nuevos dendrímeros amino-éster y el MTX. Para ambos escenarios se realizaron pruebas *in vitro*, evaluando el porcentaje de inhibición en el crecimiento celular de los dendrímeros,

el fármaco y los conjugados y complejos. En las conclusiones se concentran los principales resultados del presente trabajo y finalmente se encuentran varios anexos con información espectroscópica y de otra índole complementaria.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

Uno de cada cinco hombres hispanos y una entre seis mujeres fallecerán de cáncer, convirtiéndose éste en la segunda causa de muerte entre la comunidad hispana.

Se denomina cáncer a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado y la propagación de células anormales. Su causa se debe a factores tanto externos (tabaco, organismos infecciosos, alimentación deficiente, sustancias químicas y radiación) como internos (mutaciones heredadas, hormonas, problemas inmunitarios y mutaciones debidas al metabolismo). Los factores causales pueden ejercer su acción en conjunto o en secuencia para iniciar o promover la carcinogénesis. Aunque puede prevenirse, debido a la falta de información y al mal seguimiento de los casos detectados tempranamente, la mayoría de las veces es necesario que los pacientes sean sometidos a diferentes tratamientos como cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica o una combinación de éstos, dependiendo de factores como el tipo y ubicación del cáncer, de si la enfermedad se ha extendido, de la edad y salud general del paciente entre otros. Frecuentemente estos tratamientos pueden dañar también células y tejidos sanos y causar efectos secundarios que en casos extremos llegan a generar otros tipos de cáncer; tal es el caso de algunos medicamentos empleados en quimioterapia que, aunque son muy efectivos, son altamente tóxicos para el sistema gastrointestinal o el hígado.¹

Si bien existe una gran diversidad en el tratamiento contra el cáncer, la quimioterapia es una de las mejores herramientas para combatir tanto el cáncer localizado como del metastásico. Sin embargo, a pesar de la alta eficacia que presentan los fármacos empleados, éstos no atacan de manera específica las células cancerígenas y se distribuyen en todos los órganos. Por ello es de gran interés modificar las vías de administración, creando nuevos vehículos que los hagan más específicos y que eviten que las células cancerígenas generen mecanismos de resistencia.²

2.1.1 Fármacos anticancerígenos

Como ya se dijo, uno de los tratamientos de mayor éxito contra el cáncer es la quimioterapia. Entre los fármacos anticancerígenos, cuyo uso es más recurrente, se encuentran los *anti-metabolitos* y los *derivados de alcaloides*.

En términos generales, los *fármacos anti-metabolitos* son agentes químicos con estructura similar a un metabolito requerido por las células para reacciones bioquímicas normales, pero suficientemente diferentes como para lograr detener la división celular. Dentro de esta categoría se encuentran los análogos del ácido fólico (AF), como pemetrexed, trimetoprim y metotrexato (MTX). Las estructuras de los anti-metabolitos y su similitud estructural con el AF se muestran en la figura 2.1. En negritas se resaltan las partes que conservan del AF.

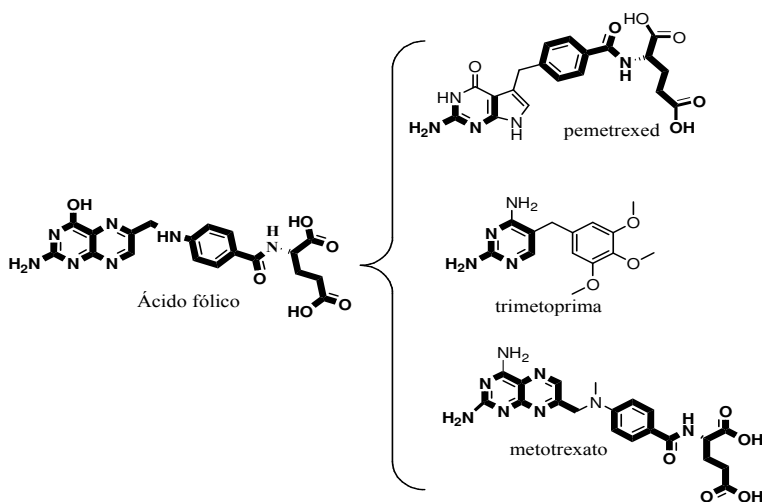


Figura 2.1. Fármacos anti-metabolitos de ácido fólico.

Por otro lado, los *fármacos derivados de alcaloides* son usados en el tratamiento del cáncer debido a que son capaces de inhibir la división celular al detener la dinámica (polimerización-depolimerización) de la tubulina, que es una etapa indispensable en el crecimiento celular. Entre los alcaloides más utilizados en terapia contra el cáncer están el paclitaxel o taxol, el docetaxel y la colchicina, cuyas estructuras se muestran en la figura 2.2.

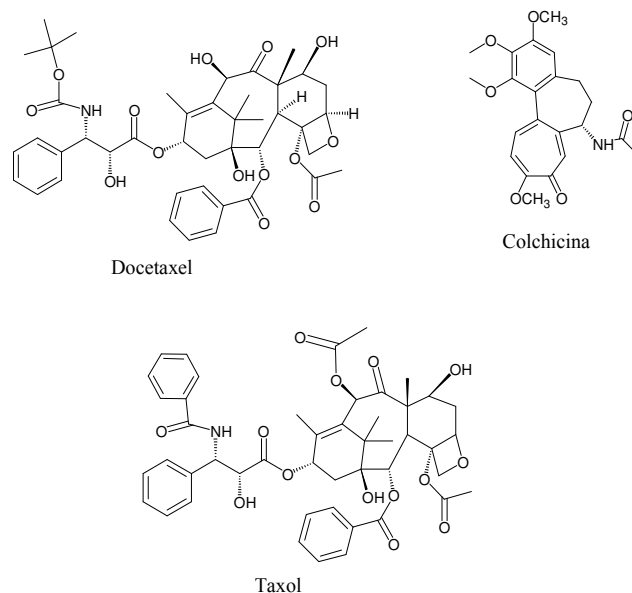


Figura 2.2 Fármacos derivados de alcaloides

El Metotrexato y el Taxol son fármacos de especial interés ya que han demostrado gran eficiencia terapéutica contra diferentes tipos de cáncer, sobre todo de ovario y de mama. No obstante, su uso clínico extensivo se ha visto mermado debido a la alta hidrofobicidad que presentan, lo que limita su aplicación por la necesidad de vehículos apropiados para su administración y liberación en el sitio y dosis requeridos.

2.1.2 Metotrexato

El Metotrexato,³ abreviado MTX y originalmente conocido como Ametopterina, fue descubierto en 1974 cuando el grupo de investigación liderado por Sidney Farber mostró que el MTX, análogo del AF, y desarrollado por Yellapragada Subbarao Lederle, producía mejoras considerables en niños con leucemia linfoblástica aguda.⁴ A partir de entonces se comenzó a investigar el uso de MTX contra otras enfermedades y hoy en día está aprobado no solo para el tratamiento de cáncer en la sangre, sino para muchos otros tipos de cáncer como coriocarcinoma, leucemia linfocítica aguda, linfoma de células grandes, linfoma de alto grado, cáncer de cabeza y cuello, de mama, de vejiga, cáncer osteogénico y otras enfermedades como la artritis reumatoide, desordenes dermatológicos y algunas condiciones ginecológicas, entre otras.⁵

El MTX tiene una estructura muy similar al AF, como se observa en la figura 2.1; debido a esta similitud compite por los sitios de reconocimiento del AF en la enzima dihidrofolato reductasa (DhFR). El AF debe ser reducido a ácido tetrahidrofólico por la

DhFR para la síntesis de timidina y nucleósidos necesarios para que la síntesis de ADN y la replicación celular ocurran. La inhibición competitiva de esta enzima bloquea la síntesis del tetrahidrofolato, produce el agotamiento de los nucleótidos precursores y por lo tanto la inhibición de la síntesis de ADN, ARN, timidilatos^a (el timidilato es un éster del ácido timidílico que consiste en un grupo funcional fosfato, una pentosa (monosacárido) llamada desoxirribosa y una base nitrogenada llamada timina, que se encuentra en las moléculas de ADN, indispensables para la división celular) y proteínas necesarias para el crecimiento celular. El MTX es específico en la fase S del ciclo celular, es decir, de la fase de síntesis, de replicación del ADN. Por lo tanto, tiene mayor toxicidad en células que se dividen más rápidamente, como las cancerígenas, las células de la mucosa oral y gastrointestinal, así como las células de la sangre y de la médula ósea, que son las que se replican más frecuentemente.

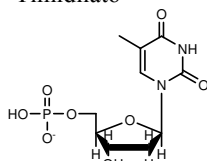
Debido a la falta de especificidad y a las altas dosis empleadas en tratamientos contra el cáncer, el MTX causa serios efectos clínicos secundarios; los más frecuentes son anemia, neutropenia,^b mielosupresión, mucositis, náuseas, vómito, hepatotoxicidad, entre otros.^{6,7}

Al igual que muchos fármacos, el MTX también presenta problemas de solubilidad y nula especificidad; esta problemática se ha tratado de minimizar al emplear acarreadores de fármacos: Ejemplos de éstos son la polilisisina,⁸ nanocápsulas de poliacrilamida, nanopartículas de polialquil-cianoacrilatos, polietilenglicol,^{9,10} liposomas¹¹ y la propuesta más reciente es el anclaje covalente del fármaco en la superficie de un dendrímero que actúe como acarreador, uniendo también moléculas sobre expresadas según el tipo de cáncer, como el AF o el anticuerpo herceptin (HER2)¹², sin embargo, aún nada es concluyente al respecto.

2.1.3 Taxol¹³

El Taxol o Paclitaxel, fue descubierto por el Research Triangle Institute (RTI) en 1967 cuando Monroe E. Wall y Mansukh C. Wani¹⁴ aislaron el compuesto que se encuentra en la corteza del árbol llamado Tejo del pacífico, *taxus brevifolia*, y observaron que

^a Timidilato



^b Disminución de neutrófilos en la sangre, lo que predispone al organismo a infecciones.

poseía actividad antitumoral en un amplio rango de tumores. Desde entonces, ha sido empleado en el tratamiento de cáncer de pulmón, ovario, mama, colon, cabeza y cuello, melanoma múltiple, mieloma,^{15,16,17} y formas avanzadas del Sarcoma de Kaposi.¹⁸

La estructura del taxol esta conformada por un diterpeno cíclico derivado del núcleo del taxano. Posee un anillo oxetano de cuatro miembros y una cadena amídica, como se puede ver en la figura 2.2.

La alta eficiencia de este fármaco se debe a que actúa como agente de estabilización de los microtúbulos que promueven la polimerización de la tubulina. Al unirse el taxol a los microtúbulos impide que éstos se desensamblen y por lo tanto no se puede llevar a cabo la separación de las nuevas células (unidas entre sí por los microtúbulos) en el proceso de mitosis. La división celular se detiene y la muerte es inducida. Sin embargo, su administración se ve obstaculizada por la poca solubilidad en agua. Para tratar de solucionar el problema, actualmente se emplean excipientes como el Cremophor EL (aceite de ricino polietoxilado) combinado con etanol o con polisorbato 80 (Tween 80).² Ambas combinaciones son biológica y farmacológicamente activas y se ha demostrado que su uso presenta efectos adversos clínicamente importantes, incluyendo reacciones de hipersensibilidad aguda y neuropatía periférica^e. Otros de los problemas que presenta este fármaco es la falta de especificidad y las dosis elevadas que deben administrarse de éste para lograr el efecto terapéutico deseado. En la práctica clínica se han observado serias reacciones adversas tales como neurotoxicidad, reducción en la función de la médula ósea, lo cual puede resultar en anemia, ritmo cardiaco rápido o irregular, fiebres, escalofríos, dolor de la espalda, sensación de adormecimiento de las manos o pies, sangre en heces y orina, náusea, vómito, dificultad al respirar y pérdida de cabello, entre otras.¹³

Existe entonces una necesidad clara de desarrollar formulaciones alternativas del taxol para mejorar su solubilidad en medios acuosos. Hasta ahora se han desarrollado varias propuestas como el uso de emulsiones,¹⁹ micelas,²⁰ liposomas²¹, nanopartículas,^{22,23} ciclodextrinas,²³ pastas e implantes;²⁴ polímeros hiper-ramificados.²⁵ Sin embargo, aún ninguna muestra una clara superioridad, queda mucho trabajo por realizarse para encontrar el acarreador óptimo para aumentar la solubilidad del Taxol en medios acuosos y disminuir la citotoxicidad sistémica que presenta.

^e La **neuropatía periférica** es una insuficiencia de los nervios que llevan la información hasta y desde el cerebro y la médula espinal, lo cual produce dolor, pérdida de la sensibilidad e incapacidad para controlar los músculos

2.1.4 Terapia Macromolecular²⁶

El usos de las macromoléculas (polímeros lineales y ramificados, micelas poliméricas, liposomas y más recientemente los dendrímeros) como acarreadores de fármacos tienen su origen en los años 50 cuando Jatzkewitz, con la finalidad de desarrollar una formulación de liberación prolongada, unió covalentemente la mescalina al polímero poli-(N-vinilpirrolidona) con un dipéptido (glicil-L-leucina) como espaciador. Después de casi tres décadas, en 1986 Matsumura y Maeda reportaron que los conjugados poliméricos se localizan preferentemente en el tejido tumoral,²⁷ lo que ha hecho de los conjugados una herramienta especialmente atractiva contra el cáncer.

La mayor ventaja que presentan los conjugados macromoleculares es el incremento en la vida media de circulación dentro del organismo. La prolongación del tiempo de circulación les permite utilizar las anomalías vasculares de los tejidos de los tumores sólidos, gracias al efecto llamado “aumento de permeabilidad y retención” (EPR, Enhanced Permeability and Retention) que presentan. El efecto EPR facilita la extravasación y acumulación de medicamentos poliméricos más selectivamente en los tejidos tumorales, y esta selectividad puede conducir a mayores beneficios terapéuticos con menos efectos sistémicos adversos. Esto contrasta con los fármacos convencionales de bajo peso molecular, donde la concentración intratumoral disminuye rápidamente en paralelo con la concentración plasmática. El efecto EPR también entra en funcionamiento en los tejidos inflamatorios, lo que justifica el desarrollo y uso de esta clase de fármacos en enfermedades infecciosas e inflamatorias.

De los diversos estudios realizados en el área de terapia macromolecular destacan dos aspectos que pueden hacer más promisorio su uso como acarreadores-liberadores de fármacos: 1) para favorecer la entrada de las macromoléculas a la célula y 2) para propiciar la liberación del fármaco mayoritariamente en el sitio adecuado.

1. Específicamente hablando de macromoléculas solubles en medios acuosos, la biodistribución y velocidad de entrada en las células de los conjugados se puede manipular al incluir en los acarreadores moléculas anzuelo (anticuerpos, AF, etc.) para las que existan receptores en las células. De esta forma se puede hacer uso de los tres mecanismos de entrada a las células por endocitosis: fagocitosis, pinocitosis y endocitosis mediada por un receptor como se ilustra en la figura 2.3.²⁸

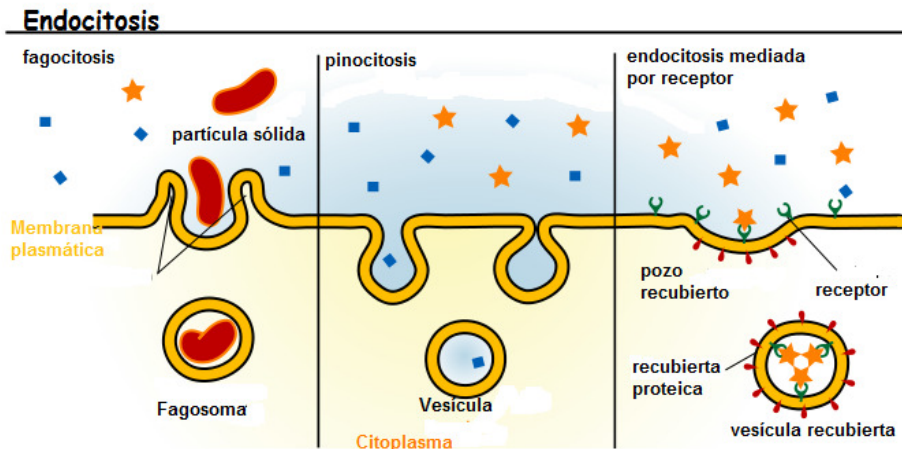


Figura 2.3 mecanismos de endocitosis de acarreadores macromoleculares. Destacando que la endocitosis mediada por receptor es la más rápida.

- Ya que las macromoléculas finalmente se localizan en el compartimiento lisosomal, es conveniente unir el fármaco al acarreador mediante un espaciador sensible al pH lisosomal, para que se libere en este sitio y a partir de ahí pueda ser redistribuido en la célula y ejercer su acción terapéutica. Los espaciadores que pueden ser incluidos además de los sensibles al pH, son aquellos que puedan ser degradados por alguna de las enzimas que contiene el lisosoma, por ejemplo secuencias de oligopéptidos como la secuencia glicilfenilalanilleucilglicil (GFLG), que es susceptible a la catepsina lisosomal B y se sabe que es estable en circulación.

Las ventajas de la terapia macromolecular en comparación con la terapia convencional (fármaco libre) se resumen en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Terapia convencional vs terapia macromolecular	
Terapia convencional	Terapia Macromolecular
Problemas de solubilidad	→ Mejora la solubilidad en agua
Entrada celular por difusión	→ Entrada celular por endocitosis (habilidad para superar la resistencia a las drogas)
No tiene acumulación preferencial	→ Acumulación preferencial en tumores sólidos
Posible incorporación de anzuelo...	→ Marcaje efectivo (incorporación de anzuelos celulares e intracelulares)
Rápida eliminación	→ Eliminación lenta
Toxicidad sistémica no específica	→ Decece la toxicidad sistémica

2.2 Dendrimeros

La estructura dendrimerica posee una geometria muy recurrente en la naturaleza y en nuestra vida cotidiana, generalmente cuando una propiedad necesita ser optimizada. Un ejemplo clasico²⁹ son los motivos dendriticos que poseen los arboles, tanto en la superficie de la tierra como debajo de esta. En la superficie para exponer el maximo de sus hojas a la luz del sol, que es indispensable para el proceso de fotosintesis y bajo tierra una red dendrimerica de raices es excelente para optimizar la captacion de agua.

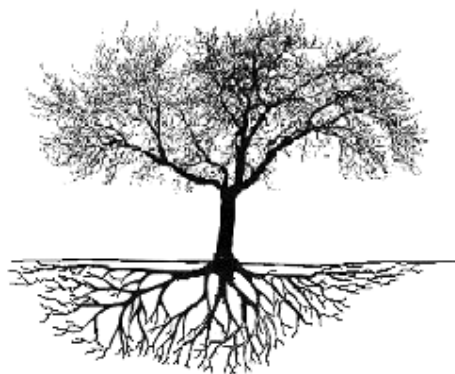


Figura 2.4. Árbol mostrando la estructura dendrimerica sobre y bajo la tierra.

Otros ejemplos son las células en el sistema nervioso central y en cerebro que crecen con estructuras dendriticas para la optimización de transferencia de información, entre sí y con el medio.

Debido a las ventajas que las estructuras dendriticas presentan para la optimización de ciertos procesos, actualmente el estudio de los dendrimeros, como se demuestra por el crecimiento exponencial de publicaciones y los más de 100 nuevos dendrimeros, es una de las áreas de mayor crecimiento en la química moderna.³⁰

Con la primera síntesis controlada de un dendrimer por Vögtle³¹ y colaboradores en 1978, nombrado por ellos como “molécula cascada”, se vislumbró el potencial que éstos tenían de actuar como contenedores de moléculas más pequeñas. A raíz de esto, 6 años después, el grupo de Tomalia³² reportó una nueva clase de polímeros con una estructura macromolecular bien definida con grupos amina internos y externos, llamándolos “dendrimeros”, siendo esta familia, conocida como PAMAM, la más ampliamente estudiada y con el mayor número de aplicaciones hoy en día.^{33,34,35}

2.2.1 Estructura y nomenclatura

Un dendrímero (del griego *dendrón*=árbol y *mero*=parte) es una macromolécula altamente ramificada que presenta una estructura tridimensional bien definida con tendencia a la globularidad a altas generaciones. Estructuralmente está compuesto de múltiples unidades monoméricas perfectamente ramificadas que emanan radialmente del núcleo. Moviéndonos del núcleo hacia fuera, el número exacto de capas concéntricas o puntos ramificados definen las “generaciones”, nombradas como 1G, 2G, 3G, etc. Así, en un dendrímero pueden diferenciarse tres partes:³⁶ núcleo, interior (dendrones de xG) y grupos superficiales como se muestra en la figura 2.5.

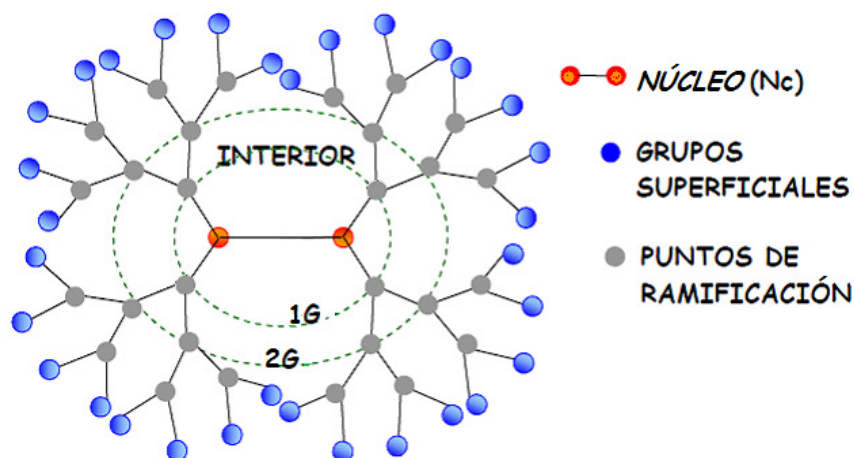


Figura 2.5. Estructura dendrímica

2.2.2 Síntesis de dendrímeros

En la bibliografía, la síntesis de los dendrímeros se divide básicamente en dos métodos: divergente y convergente. Ambos consisten en una repetición de reacciones y cada repetición da lugar al crecimiento de una o más nuevas generaciones^d.

2.2.2.1 Método divergente

En el método divergente^{37,38} el dendrímero es sintetizado desde un núcleo multifuncional que actúa como punto de partida, desde este núcleo comienzan a crecer las generaciones al hacerlo reaccionar con unidades monoméricas que constan de un sitio reactivo y dos o más no reactivos. Una vez que se realiza la primera adición, se purifica y funcionaliza la periferia para continuar el crecimiento, como se esquematiza

^d Cabe mencionar que la numeración de las generaciones no siempre es consistente, algunos autores se refieren al núcleo como G=0 y algunos otros la describen como el dendrímero después del primer ciclo de reacción.

en la figura 2.6. Esta secuencia de pasos se repite hasta alcanzar el crecimiento deseado o la generación de De Gennes^{39,40} en la cual por impedimento estérico es imposible continuar con un crecimiento perfecto.

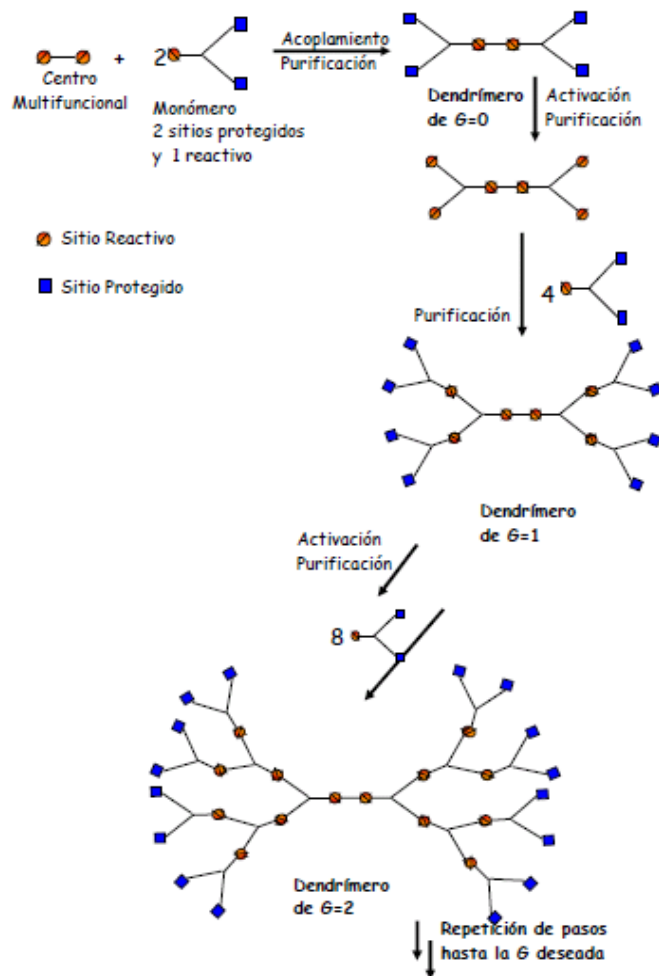


Figura 2.6. Esquema de síntesis divergente

2.2.2.2 Método convergente

El método convergente⁴¹ propuesto por Fréchet en 1990, surge para corregir las deficiencias que la síntesis divergente presenta, entre ellas la difícil purificación y la imposibilidad de detectar pequeños defectos estructurales en cada nueva generación. En el método convergente dos o más unidades periféricas se hacen reaccionar con otra unidad base simple que posee dos o más sitios activos y un sitio inactivo (punto focal). El producto es una nueva rama de mayor tamaño que es ahora activada en el punto focal para hacerse reaccionar con la unidad base. Estos pasos se repiten hasta que el dendrón alcanza el crecimiento deseado y finalmente se activa el punto focal para hacerlo

reaccionar con un núcleo y obtener el dendrúmero (figura 2.7). Con esta estrategia se limita el número de reacciones secundarias en cada paso, logrando así mejorar la purificación de los intermediarios y haciendo la síntesis del material libre de defectos.

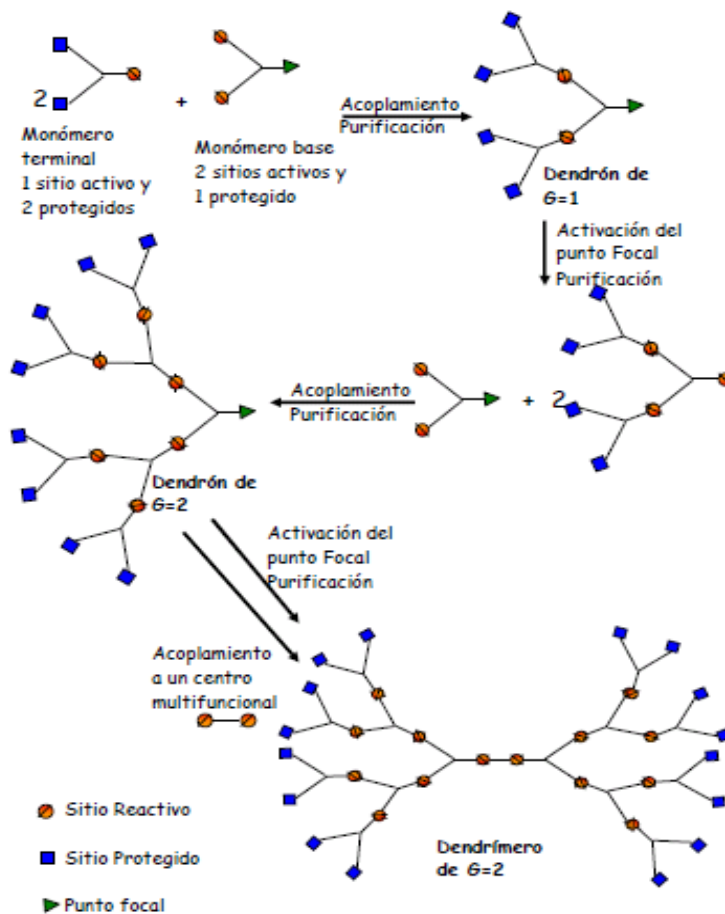


Figura 2.7. Esquema de síntesis convergente

En términos generales se dice que la síntesis divergente presenta mayores problemas que la convergente.³² El mayor problema de la síntesis divergente se presenta cuando las reacciones no ocurren completamente, dando lugar a defectos estructurales que se acarrean hasta la última generación por que los defectos no pueden ser detectados a tiempo. Por ello, la pureza de los dendrimeros obtenidos en esta síntesis es gobernada por la estadística y al igual que para la síntesis convergente, esto se ve reflejado en la polidispersidad. En el caso de la síntesis convergente, debido a la disminución de pasos de síntesis, y a que el número de sitios reactivos se mantiene constante, es menos probable que existan defectos y los que se presentan son separados en el proceso de purificación, dando lugar a una síntesis libre de defectos.

2.2.2.3 Síntesis en doble etapa

Se han desarrollado otras estrategias de síntesis que permiten obtener dendrímeros de mayor generación con menos pasos de reacción. La síntesis en doble etapa⁴² a grandes rasgos consiste en hacer crecer un hiper-núcleo por la vía convergente y paralelamente se crecen los dendrones con la misma estrategia para finalmente unirlos y obtener el dendrímero en menos pasos de reacción y con menor posibilidad de defectos estructurales, como se ilustra en la figura 2.8.

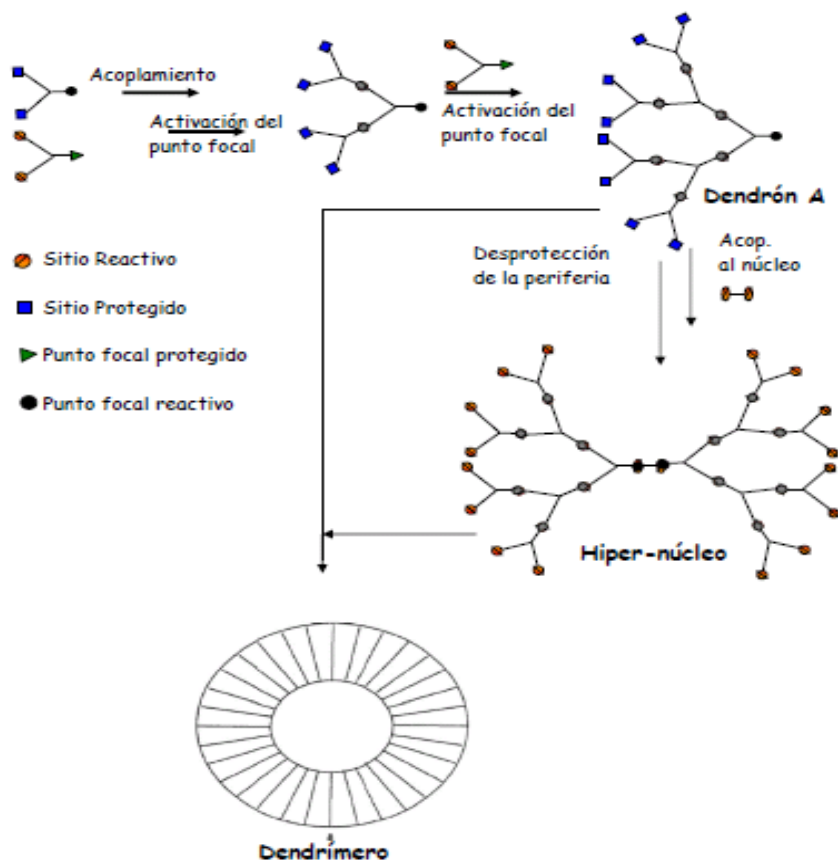


Figura 2.8. Esquema de síntesis en doble etapa

Existen otras técnicas como el crecimiento doblemente exponencial,⁴³ que en principio representa mayores ventajas, sin embargo, aun con las ventajas que implican las diferentes estrategias de síntesis, los dendrímeros comerciales más conocidos y cuyo estudio es amplio en diversas áreas son obtenidos vía divergente. Dos ejemplos clásicos son los dendrímeros de PoliAMidoAMina⁴⁴ (PAMAM) y el de PoliPropilenImina⁴⁵ (PPI), cuyas rutas de síntesis se muestran en las figuras 2.9 y 2.10 respectivamente.

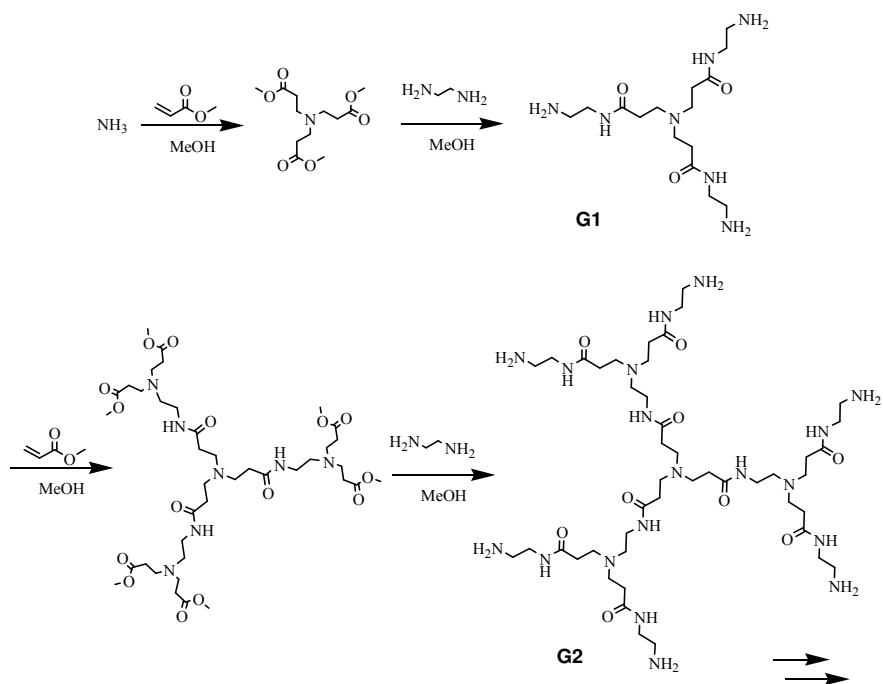


Figura 2.9. Síntesis del dendrímero poliamidoamina (PAMAM)

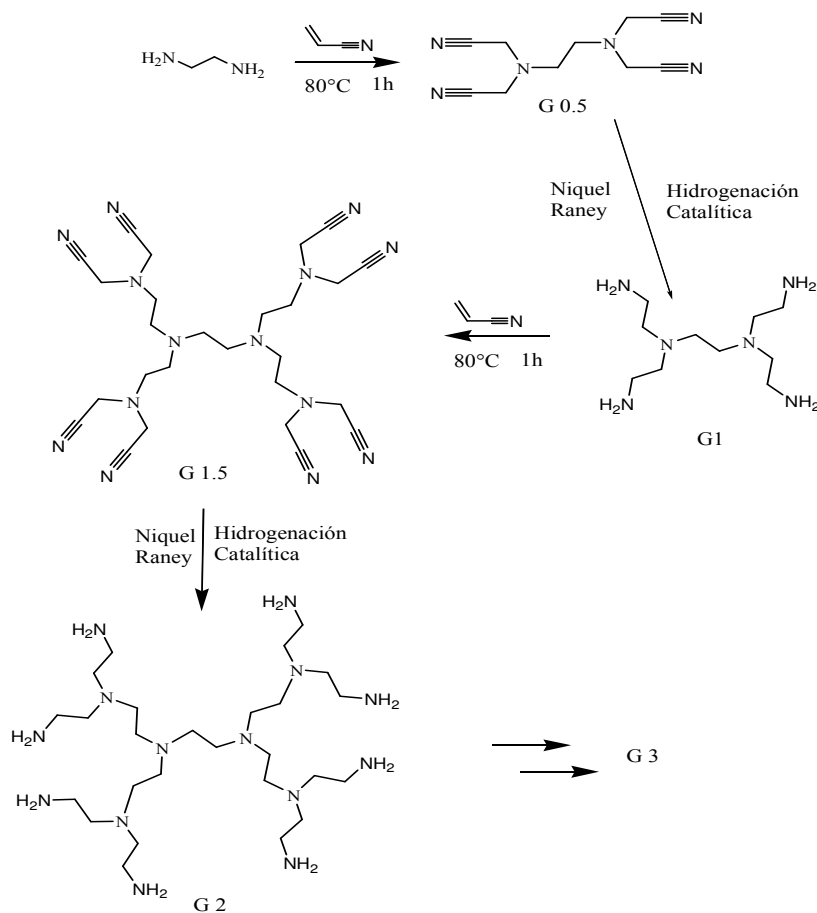


Figura 2.10. Síntesis del dendrímero polipropilenimina (PPI)

Independientemente del método usado para sintetizar dendrímeros, las estructuras obtenidas son las macromoléculas con la más definida y perfecta estructura primaria que se conoce hoy en día. Además, son las únicas macromoléculas para las cuales se puede saber *a priori* su masa molecular (M), el número de grupos funcionales en la periferia (Z) y el número de puntos de ramificación en cada generación (BC), que corresponde al número de enlaces covalentes formados por generación, todo ello en función de la generación (G) y de las multiplicidades del núcleo (N_c) y de las ramas (N_b), de acuerdo a las siguientes ecuaciones.³³

$$Z = N_c N_b^G$$

$$BC = N_c \left[\frac{N_b^G - 1}{N_b - 1} \right]$$

$$M = M_c + N_c \left[M_{Ru} \left(\frac{N_b^G - 1}{N_b - 1} \right) + M_t N_b^G \right]$$

M_{Ru} y M_t , se refieren a los pesos moleculares de la rama unitaria y de la rama terminal respectivamente.

Como puede verse de la definición matemática de Z, se observa que el número de grupos superficiales crece de forma exponencial con G, mientras que el diámetro del dendrímero es una función lineal de G, esto dará lugar a una generación específica, formándose una estructura geoméricamente cerrada, y en esa misma generación el crecimiento completo del dendrímero será imposible, debido a que el volumen disponible para acomodar la siguiente generación es insuficiente.^e

2.2.3 Propiedades fisicoquímicas

Debido a la estructura que presentan los dendrímeros y al alto control que se tiene en su síntesis, éstos exhiben propiedades claramente diferentes a sus análogos lineales^f que se hacen evidentes a altas generaciones. Una de las más importantes para aplicaciones biomédicas es la monodispersidad, es decir, todas las moléculas poseen la misma masa molecular.

^e Cabe mencionar que la nomenclatura respecto a la Generación, es diferente según el autor, la aplicación de las ecuaciones anteriores es válida cuando a la primer capa se le considera como 0G, sin embargo, autores como Tomalia consideran a esa 0G como 1G. En el presente trabajo se seguirá la nomenclatura de los primeros autores, ajustando las ecuaciones para su correcta aplicación cuando sea necesario.

^f Entiéndase por análogo un polímero con la misma unidad repetitiva y de peso promedio equivalente al del dendrímero en comparación

Si bien es cierto que a bajas generaciones los dendrímeros aún son estructuras abiertas en formas de discos o cilindros compactos, a generaciones mayores a 4 la macromolécula adopta una forma más globular y compacta,⁴⁶ lo que hace que su viscosidad intrínseca disminuya y la temperatura de transición vítrea sea baja. Además, dicha estructura sugiere que poseen diferentes microambientes en el interior y en la superficie. En el *interior* de la molécula se pueden formar cavidades en la zona central de la estructura o bien canales debido al doblamiento de las ramas, dependiendo de las multiplicidades del núcleo (Nc) y de las ramas (Nb), de su naturaleza hidrofóbica o hidrofílica y del disolvente, dando con ello la propiedad única de encapsulamiento.⁴⁷ En la *superficie* otra de las características únicas de los dendrímeros se hace presente, ya que el número de grupos superficiales crece exponencialmente con la generación, favoreciendo así las interacciones con el disolvente, con diversas superficies, con otras moléculas o con entidades biológicas cuando es el caso, así mismo los grupos externos son los que definen la reactividad del dendrímero. Además, los grupos superficiales son susceptibles de funcionalizarse incorporando, por ejemplo, sitios de reconocimiento específico, o anclando diferentes moléculas anzuelo en función de la aplicación que se requiera.^{48,49} Así, las tres partes del dendrímero pueden ser diseñadas con precisión para obtener las propiedades deseadas según la aplicación del dendrímero⁵⁰ (acarreamiento de fármacos, sensores moleculares, vectores, etc.).

A diferencia de la mayoría de los polímeros, los dendrímeros presentan un efecto muy característico ante los cambios de pH debido a la presencia de grupos funcionales susceptibles de protonarse, lo que provoca una expansión o una contracción de la estructura según el tipo de interacciones; por ejemplo, los dendrímeros de PPI y PAMAM con grupos amina en la periferia y en el interior, a pH alto (pH 10) presentan una estructura compacta, adoptando una forma más esférica (globular) donde las fuerzas de repulsión entre las ramas dendriméricas y la superficie alcanzan un mínimo. A pH neutro, teóricamente, las ramas con terminales positivamente cargadas tienden a doblarse hacia el interior para interactuar con las aminas terciarias internas. Finalmente, a pH bajo (pH=4) adoptan una conformación extendida debido a la repulsión electrostática entre las cargas positivas de los grupos amonio. La figura 2.11 muestra las conformaciones teóricas que adoptaría el PAMAM G6 ante diferente pH.⁵¹ Estos cambios conformacionales tan característicos de los dendrímeros sugieren, en aplicaciones de acarreamiento de fármacos, una liberación controlada por un cambio de pH, donde de un ambiente ligeramente superior al neutro (pH= 7.4) a uno ácido se

abriría la estructura, lo que permitiría la liberación del fármaco.

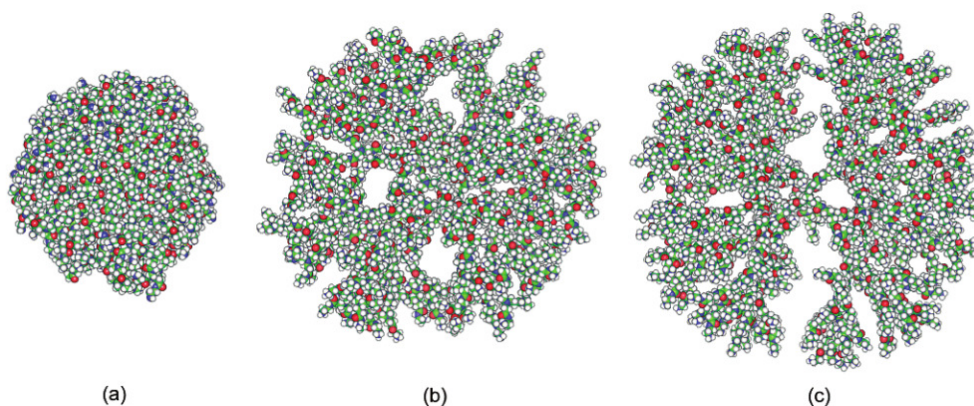


Figura 2.11. Conformaciones del dendrímero PAMAM a diferente pH. a) pH alto, aminas no protonadas, b) pH neutro, aminas primarias protonadas y c) pH bajo, todas las aminas protonadas.

En el mismo sentido, los dendrímeros también se ven afectados en su conformación debido a la fuerza iónica del medio. En el caso del PPI, estudios teóricos muestran que a altas concentraciones de sales en el medio generan una estructura compacta, mientras que a bajas concentraciones la estructura es abierta.⁵² Por lo tanto, la fuerza iónica es otro factor que puede emplearse como una fuerza motriz para la liberación de sustancias. Otras propiedades fisicoquímicas de gran relevancia y que deben ser determinadas son el potencial ζ , peso molecular, tamaño, carga superficial y número de grupos superficiales, ya que de éstas depende el comportamiento de los dendrímeros en sistemas vivos y sus valores son comparables con los de entidades biológicas como proteínas, virus o bacterias.⁵³

2.2.4 Propiedades idóneas en sistemas biológicos

Cuando los dendrímeros se diseñan con fines médicos (diagnóstico o acarreamiento de fármacos) existen ciertas características básicas deseables para que puedan aplicarse en sistemas biológicos,^{33,54} y se enlistan a continuación:

- Solubilidad en medios acuosos
- Biocompatibilidad^g y biodegradabilidad

^g Cabe mencionar que no existe una definición clara de biocompatibilidad, sin embargo, algunas de las características que esto implica son la citotoxicidad y la hemocompatibilidad.

- No citotóxicos
- No hemotóxicos
- Biopermeabilidad (en algunos casos es necesario que tengan la habilidad de cruzar barreras, por ejemplo los intestinos, barreras de tejido sanguíneo, membranas celulares, etc.)
- Capacidad de permanecer en circulación tiempos adecuados (los necesarios para tener el efecto clínico deseado)
- No ser inmunogénicos

Se ha visto que las características antes mencionadas dependen básicamente del tipo y número de grupos superficiales.⁵⁵ Al respecto diversos estudios, principalmente realizados con el dendrímero PAMAM, han sentado las primeras generalidades que pueden resumirse como sigue.³⁴

- *Biocompatibilidad:* Se ha reportado que la citotoxicidad de los dendrímeros está relacionada con la masa molecular, la carga superficial y la concentración. En general a mayor concentración, mayor toxicidad. En cuanto a los grupos terminales, los dendrímeros neutros o aniónicos (específicamente PAMAM G 2.5 y G 3.5) presentan menor citotoxicidad que los catiónicos (G2, G3, G4). Y respecto a la generación, se ha visto que los de G2 muestran menor citotoxicidad que generaciones mayores G3 y G4. La hemólisis presenta una dependencia similar a la citotoxicidad, salvo que para terminales catiónicas se da a todas generaciones.
 - La citotoxicidad de los dendrímeros con terminales amino puede disminuirse mediante una modificación parcial o total de la periferia al introducir cadenas de ADN o grupos neutros o aniónicos mediante, por ejemplo, reacciones de acetilación o peguilación⁴⁴ (adición de cadenas de polietilenglicol (PEG)= polióxido de etileno (PEO)).
- *Biopermeabilidad:* La habilidad de los dendrímeros de biopermeear en niveles intracelulares así como la capacidad de cruzar barreras epiteliales (intestino) o endoteliales (torrente sanguíneo) debe ser tomado en consideración, ya que de esta habilidad depende el éxito de un acarreador para alcanzar los sitios adecuados. La velocidad de permeación de los dendrímeros en administración oral esta relacionada con los grupos terminales y la generación en el siguiente

orden (para PAMAM): $G4-NH_2 \approx G4-OH > G3-PEG$. La alta permeación que muestran los dendrímeros con terminales amina se explica por las interacciones entre la superficie dendrímica cargada positivamente y la membrana celular cargada negativamente, lo que en principio es causa de la citotoxicidad y hemólisis que presentan. En cuanto a las terminales R-OH y PEG, los autores⁵⁶ sugieren que la permeación es debida a una endocitosis absorptiva y no se ha determinado que causen hemólisis.

- *Tiempo de circulación:* El tiempo de eliminación del cuerpo depende fuertemente del tamaño y del peso molecular (generación) del dendrímero. Los dendrímeros de altas generaciones con terminales catiónicas son eliminados rápidamente de circulación, mientras que los dendrímeros aniónicos o neutros tienen mayor tiempo de circulación, posiblemente debido a la pobre permeabilidad transendotelial. Al administrar un conjugado dendrímérico es necesario que no sea eliminado con demasiada rapidez, ya que podría salir del organismo sin realizar su función. Algunos autores^{57,58,59} sugieren la modificación de la superficie con cadenas de PEG para neutralizar la superficie y aumentar el tamaño, con esta modificación se evita una eliminación temprana mediada por macrófagos y se aumenta el tiempo de circulación, con lo cual aumenta la posibilidad de alcanzar el sitio de acción y liberar el fármaco.
- *Inmunogenicidad:* En general, los dendrímeros con terminales catiónicas y alto peso molecular generan respuesta inmune. No obstante, nuevamente la técnica de modificar la superficie con cadenas de ADN⁶⁰ o PEG reduce la inmunogenicidad. También se ha visto que otros grupos superficiales como los hidroxilo y algunos carbohidratos suprimen los efectos inmunogénicos.

2.2.5 Caracterización

La caracterización^{61,44} de los dendrímeros puede verse desde dos puntos de vista muy distintos. El primero, desde una caracterización meramente química, empleando la Resonancia Magnética Nuclear (RMN: 1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P) y Espectrometría de masas con ionización suave como FAB o ElectroSpray (ESI). Estas técnicas permiten dilucidar la estructura y detectar defectos estructurales y/o impurezas, sobre todo a bajas generaciones. Sin embargo, a altas generaciones, ninguna de esas técnicas puede revelar pequeñas cantidades de material con defectos estructurales, razón por la cual a la par se han ido desarrollando técnicas más especializadas y de mayor resolución como lo es

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption / Matriz Asistida de Desorción Láser) que hasta hoy es la más adecuada para caracterizar y detectar errores estructurales debido a su alta sensibilidad. El segundo, desde un punto de vista de la química de polímeros empleando la microscopía electrónica, para la visualización de los dendrímeros y sus agregados, la cromatografía de permeación en gel (GPC Gel Permeation Chromatography) para determinar el peso molecular y la polidispersidad y la Dispersión de Luz Dinámica para determinar el radio de giro y el hidrodinámico.

2.2.6 Aplicaciones

La estructura bien definida, la forma globular compacta y el control que se puede llegar a tener sobre el tamaño, la forma, la monodispersidad y las funcionalidades superficiales, hacen de los dendrímeros excelentes candidatos potenciales en diferentes aplicaciones; por ejemplo, en el diseño de sensores de gas basado en metalodendrímeros, como vehículos para medicamentos,⁶¹ como antenas moleculares. En el área de medicina como agentes terapéuticos en la “técnica de captura de neutrón de boro”; lo que representa un método para el tratamiento de formas poco curables de cáncer, con fines de diagnóstico,⁶² como posibles modelos de sistemas biológicos tales como las proteínas globulares,³³ como agentes antivirales^{63,64,65} con actividad contra infecciones de herpes simple, entre otras.

2.2.6.1 Dendrímeros como Acarreadores de Fármacos

Los dendrímeros, como se menciona anteriormente, pueden poseer cavidades estables con ambientes químicos predeterminados, característica que los coloca como excelentes candidatos para fungir como acarreadores y liberadores de fármacos. Potencialmente, los dendrímeros pueden ser usados como agentes acarreadores en al menos dos formas: la primera, formando complejos dendriméricos, como *endo-receptores*, cuando ocurre un encapsulamiento de los fármacos en el interior del dendrímero, mediado por diferentes interacciones no covalentes; y la segunda, formando conjugados dendriméricos, como *exo-receptores*, cuando las moléculas son unidas covalentemente o vía interacciones electrostáticas a la superficie del dendrímero, formando así un conjugado dendrimérico.⁶⁶

2.2.6.2 Complejos dendriméricos o Endo-Receptores

Diversos estudios han mostrado que las cavidades internas de las estructuras dendriméricas pueden ser usadas para encapsular fármacos básicamente con dos estrategias. La primera estrategia para el encapsulamiento de moléculas huésped en dendrímeros fue reportada por Meijer y colaboradores,^{67,68} quienes publicaron que moléculas como el ácido p-nitrobenzoico y el colorante Rosa de Bengala podían ser físicamente atrapadas en las cavidades del dendrímero PPI de altas generaciones, cuando un derivado de aminoácido se utilizaba como grupo superficial, ya que la última capa formada está densamente empacada e impide que las moléculas encapsuladas salgan, dando lugar a la formación de una “caja dendrimérica” (figura 2.12). La cantidad de moléculas huésped encapsuladas es directamente proporcional a la forma y tamaño de éstas, así como a la cantidad, forma y tamaño de las cavidades internas disponibles en el dendrímero.

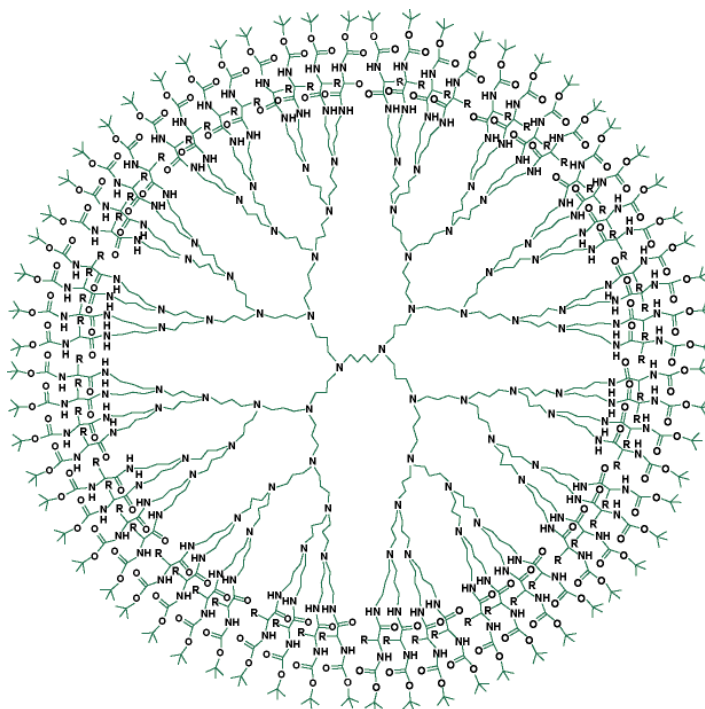


Figura 2.12. Caja dendrimérica

La segunda estrategia de encapsulamiento está basada en múltiples interacciones no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, hidrofóbicas o iónicas. Se ha sugerido que el mecanismo que domina este proceso se basa en interacciones coulómbicas que atraen al huésped hacia el interior del anfitrión, mientras que los puentes de hidrógeno lo

mantienen unido en el interior.³⁴ Al respecto, diversos trabajos se han realizado; Newkome y colaboradores³² reportaron dendrímeros de poliamidoéter que contenían moléculas de 2,6-dicilaminopiridina unidas mediante puentes de hidrógeno. Otro caso es el de las “cápsulas dendriméricas” que encapsulan mediante interacciones no covalentes moléculas hidrofóbicas de 10-hidroxicamptotecina (**10HCPT**) en dendrímeros de poliglicerol^{69,70} (PGLSA-COONa). Este estudio demuestra la mejora en la solubilidad del 10HCPT sin la pérdida de actividad anticancerígena de la molécula (figura 2.13). Un caso similar es el reportado por diversos autores^{71,72,73} quienes coinciden en que se pueden formar complejos altamente solubles a partir del PAMAM. Esos dendrímeros son capaces de encapsular y solubilizar moléculas ácidas, insolubles en agua e hidrofóbicas, tales como el ácido benzoico, el ácido salicílico y el 2,6-dibromonitrofenol, en el caso del dendrímero de segunda generación aproximadamente 46 moléculas de ácido benzoico pueden ser disueltas, unidas mediante las interacciones iónicas que se dan entre la funcionalidad ácido y los nitrógenos terciarios (básicos) del dendrímero. En el mismo escenario se encuentra el encapsulamiento de la indometacina, se cree que el aumento de solubilidad se debe al internamiento de ésta y a las interacciones intermoleculares electrostáticas entre el grupo carboxílico de la droga y las aminas primarias de la superficie del dendrímero⁷⁴ por tres familias de dendrímeros, demostrando la potencialidad de éstos de actuar como agentes encapsulantes sin inhibir la actividad del fármaco. Otros muchos ejemplos de encapsulamiento de fármacos como el metotrexato pueden encontrarse en la literatura.^{34,75,76,77}

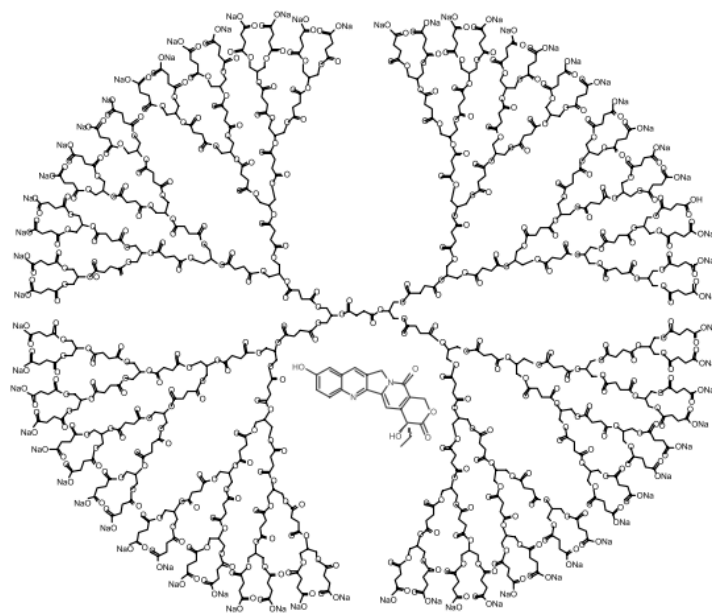


Figura 2.13. Dendriéster encapsulando camptotecinas

Cabe mencionar que la formación de compuestos de inclusión también está dominada por el proceso de reconocimiento molecular, principalmente por los factores de complementariedad química y geométrica, y aunque las cavidades en dendrímeros no son precisamente rígidas, sí las dimensiones y afinidad química entre huésped y anfitrión no son las necesarias, es posible que se de la formación de compuestos de semi-inclusión, donde solo una parte del fármaco esté encapsulada.³³ Aun cuando el diseño de la caja dendrímica es muy atractivo, su uso en aplicaciones de transporte de fármacos está limitado por las condiciones requeridas para remover la capa densamente empacada y tener acceso al contenido. En contraste, la estrategia de encapsular moléculas huésped mediante interacciones intermoleculares es más atractiva por la simplicidad que presenta y por que los fármacos serían más fácilmente accesibles. Aunque mediante el encapsulamiento se logra aumentar la solubilidad y disminuir la toxicidad, se ha visto que no se tiene un control en la velocidad de liberación, ya que ésta se puede dar simplemente por la alta dilución en el torrente sanguíneo, por cambios de pH o cambios físicos en el medio. La falta de control en la liberación puede representar una desventaja si lo que se desea es una liberación prolongada, sin embargo, también puede verse como una ventaja, dado que se alcanzan concentraciones más altas en corto tiempo.⁷⁸

2.2.6.3 Conjugados dendrímicos o Exo-Receptores

La posibilidad de modificar la superficie de los dendrímeros abre las puertas a una muy variada gama de compuestos acarreadores y liberadores de fármacos, ya que es posible unir los fármacos a la superficie del dendrímero vía enlaces covalentes o mediante interacciones electrostáticas, formando así lo que se conoce como conjugado dendrímico. Esta estrategia para el acarreamiento de fármacos presenta muchas ventajas, además de aumentar la solubilidad y en algunos casos disminuir la toxicidad sistémica de los fármacos, se logra hacer más selectiva la acumulación, aumentar el tiempo de circulación y liberar más lentamente, dado que generalmente la liberación implica el rompimiento de enlaces covalentes en condiciones ácidas. Otra ventaja es que la capacidad de carga se puede aumentar relativamente fácil al aumentar los grupos superficiales³⁵ sin necesidad de crecer la generación. Para ello se puede modificar la superficie con grupos como el TRIS, que en un solo paso triplica el número de grupos superficiales y deja terminales hidroxilo, o con cadenas de polietilenglicol (PEG), que si bien no aumenta los grupos terminales, sí aumenta la longitud y peso molecular del

acarreador y en consecuencia su tamaño. La modificación de la superficie con PEG, además de incrementar la capacidad de carga, principalmente por encapsulamiento, mejora favorablemente las propiedades biológicas como se describe en apartados anteriores.

Aunque esta metodología es muy llamativa, debe tenerse en cuenta que existe un límite, aún no establecido, al aplicarse para acarrear fármacos hidrofóbicos o mejorar su solubilidad, ya que al unirlos a la superficie existe una cantidad máxima de fármaco que puede soportar el dendrímero para evitar que el complejo obtenido sea hidrofóbico.

2.2.6.4 Dendrímeros en terapia contra el cáncer

Debido al potencial que han demostrado tener los dendrímeros como acarreadores de fármacos, y a las ventajas que presentan sobre los fármacos libres (incremento en el tiempo de vida media en el plasma, disminución de toxicidad, aumento de solubilidad, etc), actualmente han despertado un especial interés para aplicaciones en la terapia contra el cáncer. Aunque se ha estudiado tanto la estrategia de formar complejos como la de formar conjugados, han tenido mayor auge estos últimos.

Una de las razones para “preferir” los conjugados sobre los complejos es la falta de control que presentan éstos últimos en la liberación, como lo describe Kojima y colaboradores⁷⁹ quienes, mediante la unión de cadenas de PEG a la superficie de PAMAM de diferentes generaciones, obtuvieron un dendrímero capaz de encapsular moléculas anticancerígenas como metotrexato y adriamicina (figura 2.14). Sin embargo, observaron que no había control en la liberación de los fármacos y que ésta dependía fuertemente del medio. En contraste hay estudios como el realizado por Frechet,⁸⁰ con adriamicina unida covalentemente a un dendrímero de poliéster mediante un enlace sensible a pH's bajos, que sugieren que para que los conjugados liberen el fármaco en las células cancerígenas debe existir una internalización a la célula vía endosomal, para que en la etapa de endosoma acidificado se dé la liberación del fármaco por la ruptura del enlace sensible como se esquematiza en la figura 2.15. Cabe mencionar que contrario a lo que puede ocurrir con los complejos, mientras el conjugado se mantenga en circulación no se dará la liberación.

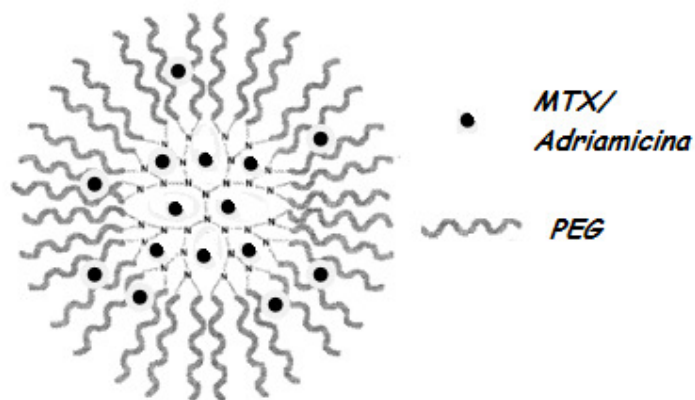


Figura 2.14. Esquema de PAMAM modificado con PEG encapsulando moléculas de adriamicina y metotrexato

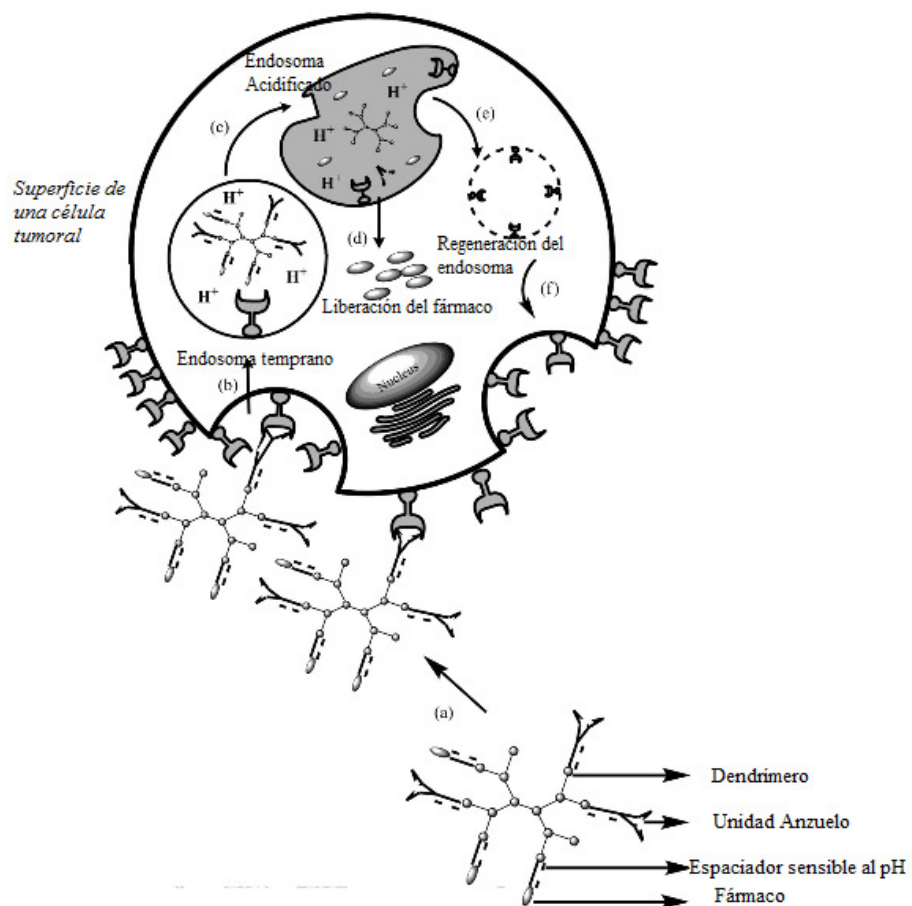


Figura 2.15. Esquema de liberación de un fármaco anclado mediante un espaciador sensible al pH: (a) asociación al receptor, (b) absorción endosomal, (c) ruptura del enlace entre fármaco y espaciador debido al bajo pH del endosoma, (d) liberación del fármaco siguiendo un efecto de explosión, (e, f) regeneración del receptor

Específicamente en los conjugados contra el cáncer, el modificar la periferia con el ácido fólico (vitamina B) es una técnica muy recurrente gracias a Wiener⁸¹ y su grupo, quienes fueron los primeros en reportar la gran afinidad que expresaban las células cancerosas (de ovario, riñón, mama, tumores cerebrales, entre otros) hacia sus complejos, polímeros quelatos con gadolinio, modificados con folato. La presencia de la Hidrofolato Reductasa (hFR, receptores de folato) sobre las membranas de las células es la responsable de la sobreexpresión (20 veces más en células cancerosas comparadas con aquellas células no cancerosas) que éstas presentan y gracias a la alta especificidad de la hFR, se ha visto que los dendrímeros modificados con fólico se internalizan. Este fenómeno genera una gran acumulación de los conjugados en las células cancerígenas, lo que por ende permite mayor acumulación del fármaco anticancerígeno y mayor actividad anticancerígena. A este tipo de grupos en la superficie se les conoce como grupos de anclaje o anzuelos porque suelen ir directamente a un sitio de reconocimiento, lo que hace más dirigido su camino en el organismo.

Además del ácido fólico, los carbohidratos constituyen otra importante clase de unidades de reconocimiento biológico. Por ejemplo, Gabius⁸² y colaboradores demostraron que ciertas neoglicoproteínas (figura 2.16) presentan sitios de enlace específico en cultivos de células de tumores cancerígenos de mama, de colon y de leucemia. Y dado que para lograr alta afinidad en el reconocimiento molecular son necesarias estructuras tipo clúster (racimo), los dendrímeros, por la multivalencia que poseen, son los candidatos ideales para anclar, además del fármaco, este tipo de anzuelos generando una mayor especificidad para la acumulación en células cancerígenas.

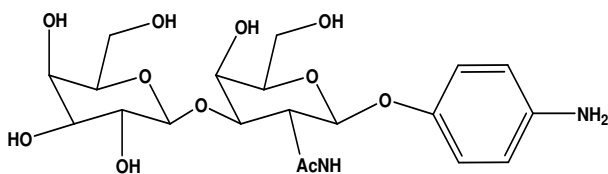


Figura 16. Neo-glicoproteína de afinidad específica en células cancerígenas

Diversos trabajos realizados en la síntesis de glicodendrímeros,⁸³ así como las pruebas biológicas realizadas, ponen de manifiesto la potencialidad de éstos de actuar como acarreadores y liberadores de fármacos en células específicas o de inhibidores de adhesión microbiana.⁸⁴ Además, la simple modificación de la superficie dendrímica con glucosa aumenta la solubilidad, la biocompatibilidad y disminuye grandemente la

citotoxicidad, como se ha demostrado con el PAMAM, ^{85,86,87,88} lo que coloca a la glucosa como otro candidato en la modificación de la superficie dendrímica para mejorar sus propiedades biológicas.

Además de la incorporación de moléculas anzuelo (orientadoras) en la superficie del dendrímero para favorecer la acumulación selectiva en células tumorales cancerígenas, los dendrímeros, al igual que los polímeros, muestran el efecto conocido como **EPR**⁸⁷ (Enhanced Vascular Permeability and Retention). Este efecto se presenta en tumores sólidos, debido a que su vasculatura tiene un comportamiento anormal. Por un lado, la permeabilidad se incrementa, mientras que el drenaje linfático es limitado, así que con el paso del tiempo los dendrímeros que tienen un tiempo de circulación adecuado logran acumularse en el intersticio tumoral y existe mayor posibilidad de que sean endocitados en las células; el EPR puede considerarse como “targeting” pasivo.

Como puede verse, si bien el uso de dendrímeros como acarreadores de fármacos presenta muchas ventajas (estructuras monodispersas, alta solubilidad, posibilidad de encapsular o anclar fármacos, etc), aún tiene serios inconvenientes (citotoxicidad, bajo control en la liberación) en lo que diversos grupos de trabajo están realizando esfuerzos para subsanarlos, entre ellos el nuestro. Al respecto, en el presente trabajo se presentan dos nuevas propuestas: la primera es un nuevo dendrímero biodegradable y no citotóxico capaz de mejorar la solubilidad del MTX y actuar como acarreador y liberador de fármacos; la segunda propuesta es un conjugado dendrímérico a base de PAMAM de G2.5 modificado con el grupo TRIS en su superficie, con moléculas de AF como anzuelo y MTX como fármaco, ambos unidos mediante enlaces éster susceptibles al rompimiento en condiciones de pH bajo.

CAPÍTULO III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Diseñar y establecer una ruta de síntesis viable experimentalmente para la obtención de dendrímeros con características específicas para llevar a cabo la función de acarreo de fármacos, especialmente de anticancerígenos como el metotrexato y el taxol.

3.1.1. Objetivos específicos

- Llevar a cabo el diseño, la síntesis y caracterización de nuevas estructuras dendriméricas con grupos formadores de puentes de hidrógeno en el interior y grupos hidroxilo ó carboxilatos en la periferia para garantizar una buena solubilidad en medios acuosos.
- Formar complejos huésped-anfitrión (dendrímero-MTX y/o dendrímero-Taxol).
- Sintetizar y caracterizar dendrímeros de PAMAM de generación 2.5 con terminales hidroxilo para la formación de conjugados mediante enlaces éster.
- Formar conjugados dendriméricos entre PAMAM generación 2.5 con terminales hidroxilo y MTX y AF.
- Formar conjugados dendriméricos entre PAMAM generación 2.5 con terminales hidroxilo y el taxol.
- Caracterizar los complejos y conjugados formados.
- Evaluar, *in vitro*, las propiedades de citotoxicidad de los nuevos dendrímeros así como de los complejos y conjugados formados.

CAPÍTULO IV. *DESARROLLO EXPERIMENTAL*

4.1 *Reactivos y disolventes*

Todos los reactivos y disolventes están comercialmente disponibles y fueron empleados sin previa purificación, las compañías de adquisición se mencionan más adelante. Los disolventes (DMSO y DMF) para las reacciones de esterificación y formación de conjugados se secaron con CaH_2 (5% w/v) toda la noche, se filtraron y posteriormente se destilaron a vacío justo antes de usarse, para garantizar condiciones anhidras.

Aldrich Co. Etiléndiamina (ETDA), ter-butilacrilato, metilacrilato, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), 3-amino-1-propanol, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), dicitlihexilcarbodiimida (DCC), N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), ácido fólico (AF), taxol, ácido trifluoroacético (TFA), terbutanol, dimetilsulfóxido (DMSO), trietilamina (TEA), piridina (Py) y Acetonitrilo.

J.T. Baker: Carbonato de potasio, ácido adípico e hidruro de calcio.

TecsiQuim: Diclorometano(DCM), acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH), N,N-dimetilformamida (DMF), hidróxido de amonio(NH_4^+OH), acetona y hexano (Hex).

4.2 *Equipos:*

Resonancia Magnética Nuclear: Espectrómetro Bruker 400 MHz (^1H , ^{13}C); Varian Unity 300 MHz (^1H , ^{13}C), Referencia: Tetrametilsilano (Me_4Si , 0.00 ppm) 200 MHz (^1H), todos los espectros fueron hechos en solución. *Espectrometría de Infrarrojo:* Espectrómetro FTIR serie Perkin-Elmer Paragon rango 4500-700 cm^{-1} , Espectrómetro FTIR-ATR Nicolet-6700 rango 4500-700 cm^{-1} . *Espectrometría de masas:* Espectrómetro de Masas Jeol JSM AX102A (FAB^+), Bruker Daltonic Data Analysis 3.2 para ESI. *Espectrometría UV-vis:* Espectrómetro UNICAM UV 300. Software Vision32. *Puntos de Fusión:* Fueron determinados sin corrección en un Fisher Electrothermal 9000 en capilar abierto. Centrifuga Cole Parmer 17250 a 3400 rpm. Ultrasonido Cole Parmer 8893.

El monitoreo de las reacciones se hizo mediante cromatografía en capa fina (CCF) empleando placas de gel de sílice y una lámpara de UV o una solución de KMnO_4 como reveladores. Los valores de las constantes de acoplamiento, J (Hz), fueron determinados

usando el programa SpinWorks 3.1.6.0 de la Universidad de Manitoba para obtener lecturas de desplazamientos más exactas.

4.3. Síntesis de dendrímeros de PAMAM con núcleo de etiléndiamina

Dendrímero de PAMAM con 4 terminales éster (1).

Se diluyen 2 g (33 mmol) de etiléndiamina (ETDA) en 30 mL de metanol, se sella el matraz, se purga y se aísla de la luz. Posteriormente se inyectan 14.3 mL (158 mmol) de metilacrilato y se deja transcurrir la reacción por 48 h. Se monitorea por CCF usando AcOEt como eluyente hasta que desaparece la mancha correspondiente a la ETDA y se observa un solo producto. Se concentra a vacío para obtener 13.35 g de aceite translucido (rendimiento cuantitativo). Estado físico: Aceite translucido. Rendimiento: cuantitativo.

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm^{-1}): 2946, 2821 (C-H saturado.) 1733 (C=O). RMN ^1H (δ (ppm): Acetona- d_6 , 2.05): 2.43 (t, 8H, $-\text{CCH}_2\text{COO}-$, $J=6.98\text{Hz}$); 2.51 (s, 4H, $-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$), 2.75 (t, 8H, $-\text{NCH}_2\text{C}-$, $J=6.98\text{Hz}$), 3.61 (s, 12H, $-\text{COOCH}_3$). ^{13}C (δ (ppm): Acetona- d_6 , 30.56); 34.28 ($-\text{CCH}_2\text{COO}-$), 51.67($-\text{NCH}_2\text{C}-$), 52.54 ($-\text{COOCH}_3$), 54.11 ($-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$), 174.2($-\text{CCOOC}-$). FAB+ teórico $m/z=405.5$; exp. $m/z=405.5$

Dendrímero de PAMAM $G=1.5$ con 8 terminales éster (2).

2 g (4.9 mmol) del compuesto **1** (dendrímero con 4 terminales éster) se disuelven en 20 mL de metanol y se adicionan gota a gota a una solución de 22.3 g (371 mmol) de ETDA en 50 mL de metanol (el matraz es purgado y aislado de la luz). La reacción transcurre por 7 días a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentra y se lava repetidamente con t-BuOH para eliminar la ETDA hasta que no se detecta por GC. Aunque quedan rastros de t-BuOH, éstos no interfieren en la siguiente reacción. Posteriormente 2.3 g (4.45 mmol) del producto tetra-aminado se disuelven en 30 mL de metanol, se purga el matraz, se aísla de la luz y se inyectan 3.9 mL (42.7 mmol) de metilacrilato. La reacción se deja por 48 horas, tras lo cual se concentra la mezcla de reacción para obtener 5.09 g del dendrímero **2**. Estado físico: Aceite ámbar. Rendimiento de dos pasos: 95%.

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm^{-1}): 3304 (NH); 2951, 2823 (C-H saturado.); 1729, 1644 (C=O). RMN (Acetona- d_6) ^1H (δ (ppm)): 2.46 (t, 24H, $-\text{CCH}_2\text{COO}-$, $-\text{CCH}_2\text{CON}-$,

J= 6.83Hz); 2.56 (t, 8H, -CCH₂N-, J= 6.53Hz), 2.76 (t, 20H, -NCH₂C-, -N(CH₂)₂N-, J= 6.83Hz), 2.88 (t, 8H, -NCH₂C-, J= 6.83Hz), 3.24 (t, 8H, -CONHCH₂C-, J= 6.43Hz), 3.64 (s, 24H, -COOCH₃). ¹³C (δ(ppm)): (Acetona-d₆); 33 (-CCH₂CON-, -CCH₂COO-), 38(-CONHCH₂C-), 49 (-NCH₂C-, -COOCH₃), 52 (-NCH₂C-), 53 (-CCH₂N-), 54 (-N(CH₂)₂N-), 172(-CCONH-), 173(-CCOOC-). ESI (+MS) m/z teórica (1206.4); m/z exp.: 1206.0 y un m/z de 1227.5

Dendrímero de PAMAM G=2.5 con 16 terminales éster (3).

3.5 g (2.9 mmol) del dendrímero **2** (G=1.5) se disuelven en 40 mL de metanol y se adicionan lentamente a una solución de 48 g (798.6 mmol) de ETDA. Después de 9 días a temperatura ambiente se concentra y lava repetidamente con t-BuOH para eliminar la ETDA remanente. Posteriormente 3.3 g (2.3 mmol) del producto octa-aminado se disuelven en 60 mL de metanol, se purga el matraz, se aísla de la luz y se inyectan 4 mL (44.3 mmol) de metilacrilato. La reacción se deja por 48 horas, tras lo cual se concentra la mezcla de reacción para obtener 5.94 g del dendrímero **3** como un aceite ámbar. Estado físico: Aceite ámbar oscuro. Rendimiento de dos pasos: 92 %

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm⁻¹): 3305.1 (NH); 2951.7, 2823.5 (C-H aliph.); 1729.9, 1643.1(C=O). RMN (CDCl₃) ¹H (δ(ppm)): 2.36 (t, 24H, -CCH₂CON-, J=6.50Hz), 2.43 (t, 32H, -CCH₂COO-, J=6.60Hz), 2.50-2-61 (m, 28H, -CCH₂N-, -N(CH₂)₂N-), 2.74 y 2.80 (2t, 56H, -NCH₂C-, J=6.70Hz y J=6.61Hz), 3.22 a 3.30 (m ancho, 24H, -CONHCH₂C-), 3.62 (s, 48H, -COOCH₃). ¹³C (δ(ppm)): (CDCl₃); 31.2(-CCH₂CON-); 32.6 (-CCH₂COO-), 37.2(-CONHCH₂C-), 49.2 (-NCH₂C-, -CCH₂N-); 49.7 (-CCH₂N-, -N(CH₂)₂N-); 51.7 (COOCH₃), 52.8 (-NCH₂C-), 171(-CCONH-), 173(-CCOOC-). ESI (+MS) teórica m/z=2807.6; exp.: m/z=2807.9 y una superior a m/z=2840.7

Dendrímero de PAMAM G=2.5 modificado con TRIS con 48 terminales alcohol (4).

Se prepara una suspensión de 1.03 g (8.54 mmol) de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y 1.18 g (8.54 mmol) de carbonato de potasio en 15 mL de DMSO anhidro, a ésta se le adiciona una solución de 1 g (0.35 mmol) del dendrímero **3** en 5 mL de DMSO anhidro y se lleva a 70 °C por 72 h en atmosfera de N₂. Después se concentra a vacío hasta eliminar el DMSO, el aceite se disuelve en la mínima cantidad de agua y se precipita con acetona. Este procedimiento se repitió varias veces para obtener como

producto 0.74 g de sólido ligeramente amarillo y extremadamente higroscópico. Posteriormente se deja a vacío por una noche.

Como método alternativo, esta reacción se puede realizar en metanol a ebullición y se monitorea por FT-IR hasta que la banda alrededor de 1733 cm^{-1} , asociada al carbonilo del metiléster desaparezca. Para este compuesto se requieren 7 días y el tratamiento es igual al detallado anteriormente. El rendimiento con esta metodología aumenta al 70% (1.03 g); además, el metanol es más fácilmente removido. Estado físico: Sólido ligeramente amarillo

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm^{-1}): 3287.4 (NH, OH), 2938.8 (C-H saturado.) 1635.1 (C=O). RMN (D_2O) ^1H (δ (ppm)): 2.36-2.42 (m, 56H, $-\text{CCH}_2\text{COO}-$); 2.54-2.70 (m, 36H, $-\text{CCH}_2\text{N}-$, $-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$), 2.74-2.87 (m, 56H, $-\text{NCH}_2\text{C}-$), 3.25-3.34 (m, 36H, $-\text{CONHCH}_2\text{C}-$); 3.74(s, 96, $-\text{CCH}_2\text{OH}$). ^{13}C (δ (ppm)): (D_2O); 33.55 ($-\text{CCH}_2\text{COO}-$), 37.22 ($-\text{OCNHCH}_2\text{C}-$), 49.52($-\text{NCH}_2\text{C}-$), 50.46 ($-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$), 51.79 ($-\text{CCH}_2\text{N}-$), 61.33 ($-\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), 62.42 ($-\text{HNC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$), 175.75($-\text{CCONH}-$).

4.4 Síntesis de dendrímeros aminoéster

Dendrón (5)

En un matraz purgado con N_2 y aislado de la luz se diluyen 5 g (66.57 mmol) de 3-amino-1-propanol en 30 mL de metanol, posteriormente se inyectan 22.183 g (173.08 mmol) de ter-butil acrilato. Después de 24 h se concentra a vacío dando lugar a 22.06 g de aceite translucido incoloro (rendimiento cuantitativo). Estado físico: Aceite translucido incoloro. Rendimiento: cuantitativo.

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm^{-1}): 3413 (OH), 2975, 2932, 2830 (C-H saturado.), 1723 (C=O). RMN (CDCl_3) ^1H (δ (ppm)): 1.39 (s, 18H, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.64 (q, 2H, $-\text{CCH}_2\text{C}-$), 2.35 (t, 4H, $-\text{CCH}_2\text{COO}-$, $J=7.21\text{Hz}$), 2.57 (t, 2H, $-\text{C}(\text{CH}_2)\text{N}-$, $J=5.55\text{Hz}$), 2.69 (t, 4H, $-\text{NCH}_2\text{C}-$, $J=7.21\text{Hz}$), 3.68 (t, 2H, $\text{HOCH}_2\text{C}-$, $J=5.55\text{Hz}$). ^{13}C (δ (ppm)): (CDCl_3 , 77), 27.9 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.2 ($-\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}-$), 33.1 ($-\text{CCH}_2\text{COO}-$), 49.2 ($-\text{NCH}_2\text{C}-$), 52.7 ($-\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$), 62.8 ($\text{HOCH}_2\text{C}-$), 80.4($-\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$) y 171.6($-\text{CCOOC}-$).

Procedimiento general para los dendrímeros con terminales ter-butil éster

A una suspensión de ácido carboxílico, dendrón (5) y DMAP en 12 mL de DMF, se le adiciona gota a gota una solución de EDC (1-etil-3-[(3-dimetilamino)propil]-

carbodiimida) o DCC (diciclohexilcarbodiimida) en DMF. Posteriormente la mezcla de reacción se agita en baño de hielo por una hora y se deja alcanzar la temperatura ambiente y se mantiene en agitación por 24 h. La reacción puede ser monitoreada por CCF hasta que no se aprecian cambios. La mezcla de reacción se concentra a presión reducida para dar un aceite ámbar que se purifica por cromatografía en columna de sílica usando acetato de etilo con 1% hidróxido de amonio (AcOEt:NH₄⁺OH al 1%) como eluyente.

Procedimiento general para la hidrólisis del grupo ter-butil éster

1 g de dendrímero con terminales ter-butil éster se disuelve en 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA) con 3 gotas de agua. La hidrólisis se puede monitorear por CCF. Una vez concluida la reacción, el TFA es evaporado a presión reducida para obtener un aceite muy viscoso ligeramente café; éste se tritura repetidamente con una mezcla 50:50 hexano-diclorometano (Hex:DCM) hasta que desaparece el TFA. Finalmente el producto se seca a alto vacío.

4.4.1 Dendrímero aminoéster con núcleo de ácido adípico (DA)

DA con 4 terminales ter-butil éster (6).

En un matraz purgado con argón se disuelven 2 g (6.8 mmol) de ácido adípico, 13.61 g (40.8 mmol) de dendrón y 0.17 g (1.3 mmol) de DMAP en 12 mL de DMF seca y recién destilada. De manera independiente, se disuelven 3.38 g (16.4 mmol) de DCC (20% exceso) en 5 mL de DMF anhidra y se adicionan lentamente y en baño de hielo a la mezcla anterior (1 h). Tras 24 h de reacción la mezcla se concentra, se filtra la DCU (diciclohexilurea) por celita y se pasa por columna de sílica eluyendo con AcOEt/NH₄⁺OH 1%, para obtener 5.05 g de aceite ligeramente amarillo. Estado físico: Aceite ligeramente amarillo. Rendimiento: 96 %

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm⁻¹): 2970, 2933, 2820 (C-H aliph.), 1724.8 (C=O). RMN (Acetona d₆) ¹H (δ (ppm)): 1.42 (s, 36H, -C(CH₃)₃), 1.64 (m, 4H, -C(CH₂)₂C-), 1.76 (m, 4H, -CCH₂C-), 2.34 (t, 12H, -CCH₂COO-, J=7.14Hz), 2.50 (t, 4H, -CCH₂N-, J=6.88 Hz), 2.70 (t, 8H, -NCH₂C-, J=7.14Hz), 4.08 (t, 4H, -COOCH₂C-, J=6.50Hz). ¹³C (δ (ppm)): (Acetona d₆), 25 (-C(CH₂)₂C-), 27 (-CCH₂COO-), 28 (-C(CH₃)₃), 34 (- (CH₂)₃CH₂COO -), 34 (-CCH₂COO-), 49.8 (-NCH₂C-), 50 (-CCH₂N-), 63(-

COOCH₂C-), 79 (-COOC(CH₃)₃), 171 (-COO(CH₃)₃), 173 (-CCOOC-). FAB (+MS) teórica m/z=774; exp.: m/z=773

DA con 4 terminales ácido carboxílico (7).

Se disuelven 2 g (2.58 mmol) of **6** en 4 mL de ácido trifluoroacético (TFA). Una vez aplicado el procedimiento general se obtienen 1.38 g del compuesto **7** como una espuma blanca altamente higroscópica. Estado físico: Espuma blanca. Rendimiento: 98 %

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm⁻¹): 2220 a 3600 (COOH bandas anchas y débiles), 2973 (C-H saturado), 1730 and 1658 (C=O). RMN (MeOD+HCl) ¹H (δ (ppm)): 1.66 (m, 4H, -C(CH₂)₂C-), 2.20 (m, 4H, -CCH₂C-), 2.42 (t, 4H, -(CH₂)₃CH₂COO-, J= 6.05), 2.88 (t, 8H, -CCH₂COO-, J= 6.57Hz), 3.48 (t, 8H, -NCH₂C-, J= 7.62Hz), 3.74 (t, 4H-CCH₂N-, J= 6.57Hz), 4.21 (t, 4H, -COOCH₂C-, J=5.93Hz). ¹³C (δ (ppm)): (MeOD): 23.0 (-C(CH₂)₂C-), 28.0 (-CCH₂C-), 28.4 (-CCH₂COO-), 33.0 (-(CH₂)₃CH₂COO -), 48.5 (-NCH₂C-), 49.5 (-CCH₂N-), 61 (-COOCH₂C-), 172 (-CCOOC-) y 171 (-CCOOH). FAB (+MS) teórica m/z=549.7; exp.: m/z=549

DA con 8 terminales ter-butil éster (8).

En un matraz purgado con argón se disuelven 2.4 g (4.39 mmol) de dendrímero **7**, 11.65 g (35.16 mmol) de dendrón (**5**) y 0.726 g (5.86 mmol) de DMAP en 12 mL de DMF seca y recién destilada. De manera independiente, se disuelven 8.18 g (52.69 mmol) de EDC en 5 mL de DMF anhidra y se adicionan lentamente y en baño de hielo a la suspensión anterior (1 h). Tras 24 h de reacción la mezcla se concentra y purifica por columna de sílica, eluyendo con AcOEt/NH₄⁺OH 1%, para obtener 3.67 g de aceite ligeramente amarillo. Rendimiento: 46.4 %

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm⁻¹): 2974, 2933, 2819 (C-H saturado), 1723(C=O). RMN (MeOD) ¹H (δ (ppm)): 1.44 (s, 72H, -C(CH₃)₃), 1.65 (m, 4H, -C(CH₂)₂C-), 1.76 (m, 12H, -CCH₂C-), 2.33 (t, 20H, -CCH₂COO-, J=6.90Hz), 2.42-2.55 (m, 12H, -CCH₂N- y 8H, -CCH₂COO- (intermedios)), 2.70 (t, 16H, -NCH₂C- J=6.90Hz), 2.77(t, 8H, -NCH₂C- J=7.02Hz), 4.08 (t, 12H, -COOCH₂C-). ¹³C (δ (ppm)): (MeOD): 25.6 (-C(CH₂)₂C-), 27.8 (-CCH₂C-), 28.5 (-CCH₂C-), 28.5 (-C(CH₃)₃), 33.8 (-CCH₂COO-), 34.8 (-(CH₂)₃CH₂COO-), 34.9 (-CCH₂COO-), 50.6 (-NCH₂C-), 51.4 (-CCH₂N-), 61.4 (-COOCH₂C-), 63.9 (-COOCH₂C-), 81.67 (-COOC(CH₃)₃), 173.8 (-COO(CH₃)₃) y

174.2 (-CCOOC-). FAB (+MS) teórica $m/z=1802.3$; exp.: (FAB+) $m/z=1801$ y $m/z=1803$ (ESI).

DA con 8 terminales ácido carboxílico (9).

Se disuelven 1.5 g (0.83 mmol) del dendrímero **8** en 3 mL de TFA. Una vez aplicado el procedimiento general se obtienen 1.08 g del compuesto **9** como una espuma blanca altamente higroscópica. Estado físico: Espuma blanca. Rendimiento: 96%.

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm^{-1}): 2220 a 3600 (COOH ancha y débil), 2944 (C-H saturado), 1722 and 1659 (C=O). RMN (MeOD) ^1H (δ (ppm)): 1.62 (m, 4H, -C(CH₂)₂C-), 2.02 (q, 12H, -CCH₂C-), 2.34 (t, 4H, -OCCH₂(CH₂)₂CH₂CO-, J=7.05Hz), 2.98 (t, 24H, -NCH₂CH₂COO-, J=6.70Hz), 3.38 (t, 12H, -CCH₂N-, J=7.23Hz), 3.53 (t, 12H, -NCH₂C-, J=6.70Hz), 3.73 (t, 12H, -COOCH₂C-, J=5.73Hz). ^{13}C (δ (ppm) (MeOD)): 25.39 (-C(CH₂)₂C-), 27.12 (-OCCH₂C-), 29.63 (-CCH₂COOH), 34.44 (-CCH₂COO-), 50.81 (-NCH₂C-), 54.28 (-CCH₂N-), 60.43 (-COOCH₂C-), 172.41(-CCOO-). FAB (+MS) teórica $m/z=1354.4$; exp.: (FAB+) $m/z=1354$.

4.4.2 Dendrímeros aminoéster con núcleo de etiléndiamina (DE).

Híper-núcleo de etiléndiamina 4 terminales ter-butil éster (10).

En un matraz purgado con Ar se disuelven 2 g (33mmol) de ETDA y 30 mL de metanol, se aísla de la luz y posteriormente se inyectan 16.2 mL (0.11 mol) de ter-butil acrilato. Después de 48 h se concentra a presión reducida para obtener 18.9 g del producto como un sólido blanco con $p_f=42$ °C. Estado físico: Sólido blanco. Rendimiento: cuantitativo.

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm^{-1}): 2970, 2818 (C-H saturado.); 1715 (C=O). RMN (MeOD) ^1H (δ (ppm)): 1.47 (s, 36H, -C(CH₃)₃); 2.36 (t, 8H, -CCH₂COO-, J=7.00Hz); 2.53 (s, 4H, -N(CH₂)₂N-); 2.73 (t, 8H, -NCH₂C-, J=7.00Hz). ^{13}C (δ (ppm)): (MeOD); 28.43 (-C(CH₃)₃); 34.77 (-CCH₂COO-); 51.00 (-N(CH₂CH₂)₂); (53.12 (-N(CH₂)₂N-); 81.53 (-COOC(CH₃)₃); 173.63 (-COO(CH₃)₃).

Híper-núcleo de etiléndiamina 4 terminales ácido carboxílico (11).

Se disuelve 1 g (1.89 mmol) of **10** en 2 mL de TFA. Una vez aplicado el procedimiento general y tras triturar varias veces en diclorometano/hexano precipita un sólido blanco, se filtra y seca por una noche a vacío dando 0.65 g de producto. Una alternativa para purificar más rápido este compuesto es disolver en una cantidad mínima de agua y agregar acetona para precipitar, sin embargo, por esta vía el rendimiento es del 75%. Estado físico: Sólido blanco. Rendimiento: 99%

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm^{-1}): 2256 a 3120 (COOH ancha y débil); 2992-3011 (C-H saturado), 1710, 1651 (C=O). RMN (D_2O) ^1H (δ (ppm)): 2.94 (t, 8H, -CCH₂COOH, J=6.30Hz), 3.54 (t, 8H, -NCH₂C-, J=6.30Hz), 3.79 (s, 4H, -N(CH₂)₂N-). ^{13}C (δ (ppm)): (D_2O); 28.3(-CCH₂COO-), 47.8(-N(CH₂)₂N-), 50.3(-NCH₂C-) and 174.0 (-CCOOH).

DE con 8 terminales ter-butil éster (12).

En un matraz purgado con Ar se forma una suspensión de 1.5 g (4.3 mmol) del híper-núcleo (**11**), 11.51 g (34.72 mmol) de dendrón y 0.726 g (5.68 mmol) de DMAP en 12 mL de DMF seca y recién destilada. De manera independiente, se disuelven 8.02g (51.66mmol) de EDC en 5 mL de DMF anhidra y se adicionan lentamente y en baño de hielo a la suspensión anterior (1 h). Tras 24 h de reacción la mezcla se concentra y purifica por columna de silica, eluyendo con AcOEt/NH₄⁺OH 1%, para obtener 3.1 g de aceite ligeramente amarillo. Rendimiento: 45 %.

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm^{-1}): 2972, 2819 (C-H saturado) 1723 (C=O). RMN (CDCl_3) ^1H (δ (ppm)): 1.40 (s, 72H, -C(CH₃)₃); 1.72 (q, 8H, -CCH₂C-); 2.30 (t, 16H, -CCH₂COO-, J=6.92Hz); 2.42 (q deformado, 8H, -NCH₂C- y 8H, -CCH₂COO-)^h; 2.49 (s, 4H, -N(CH₂)₂N-); 2.67 (t, 16H, -NCH₂C-, J=6.92Hz); 2.74 (t, 8H, -CCH₂N-, J=6.92Hz); 4.04 (t, 8H, -COOCH₂C-, J=6.36Hz). ^{13}C (δ (ppm)): (CDCl_3); 26.78 (-CCH₂C-); 27.95 (-C(CH₃)₃); 32.64 (-CCH₂COO-); 33.71 (-CCH₂COO-); 49.44 (-NCH₂C-); 49.69 (-NCH₂C-); 50.08 (-CCH₂N-); 52.36 (-N(CH₂)₂N-); 62.61 (-COOCH₂C-); 80.05 (-COOC(CH₃)₃); 171.68 (-COO(CH₃)₃); 172.35 (-CCOOC-). FAB (+MS) teórica m/z=601.1; exp.: (FAB+) m/z=1601 y m/z=1603 (ESI).

^h Esta señal quintuple deformada, obtenida cuando se diluye la muestra en CDCl_3 , se logra separar en dos señales triples ligeramente traslapadas cuando se corre en MeOD como se observa en el anexo 1.

DE con 8 terminales ácido carboxílico (13).

Se disuelve 1 g (0.62 mmol) del dendrímero **12** en 2 mL de TFA. Una vez aplicado el procedimiento general se obtienen 0.69 g del compuesto **13** como una espuma ligeramente café altamente higroscópica. Rendimiento: 97 %

Datos espectroscópicos: FT-IR (cm^{-1}): 2220 a 3600 (COOH extendido y débil), 2981 (C-H saturado), 1724, 1660 (C=O). RMN (MeOD) ^1H (δ (ppm)): 2.02 (q, 8H, $-\text{CCH}_2\text{C}-$), 2.98 (t, 16H, $-\text{CCH}_2\text{COO}-$, $J=6.68\text{Hz}$), 3.06 (t, 8H, $-\text{CCH}_2\text{COO}-$, $J=6.68\text{Hz}$), 3.35 (s, 4H, $-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$), 3.38 (t, 8H, $-\text{NCH}_2\text{C}-$, $J=7.18\text{Hz}$), 3.53 (t, 16H, $-\text{NCH}_2\text{C}-$, $J=6.68\text{Hz}$), 3.65 (t, 8H, $-\text{CCH}_2\text{N}-$, $J=6.68\text{Hz}$), 3.73 (t, 8H, $-\text{COOCH}_2\text{C}-$, $J=5.72\text{Hz}$). ^{13}C (δ (ppm)): (MeOD): 26.9 ($-\text{CCH}_2\text{C}-$), 29.6 ($-\text{CCH}_2\text{COO}-$), 50.7 ($-\text{CCH}_2\text{N}-$, $-\text{NCH}_2\text{C}-$), 54.2 ($-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-$), 60.5 ($-\text{COOCH}_2\text{C}-$), 172.3 ($-\text{CCOOC}-$ y $-\text{COOH}$). FAB (+MS) teórica $m/z=1153$; exp.: (FAB+) $m/z=1153$ y $m/z=1155.1$ (ESI)

4.5. Síntesis de conjugados dendriméricos.

4.5.1. Dendrímero 4 con MTX y AF (14)

En un matraz previamente purgado con argón se disuelven 0.5 g (0.12 mmol) de dendrímero **4** y 17.7 mg (0.145 mmol) de DMAP (0.33 eq. respecto a los grupos COOH a esterificar) en 15 mL de DMSO. Por separado, en recipientes purgados con Ar se disuelven 0.1 g (0.22 mmol) de MTX en 10 mL de DMSO y 0.1 g (0.22 mmol) de AF en 10 mL de DMSO. En otro recipiente se disuelven 108.9 mg (0.53 mmol) de DCC (1.2 eq. respecto a los grupos COOH a esterificar) en 3 mL de DMSO. El matraz con el dendrímero **4** y el DMAP se mantiene con agitación vigorosa y se le adicionaron simultánea y muy lentamente (3 h) el MTX, AF y DCC en solución. Una vez terminada la adición, se deja la reacción por 48 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se concentra a presión reducida ($75\text{ }^\circ\text{C}$) y se redisuelve en 3 mL de MeOH, para que precipite la DCU, el AF y el MTX que no reaccionaron o dimerizaron, para ser removidos por filtración. La solución filtrada se mantiene en refrigeración una noche para permitir que termine de precipitar la DCU y filtrarla. Una vez removida la DCU que precipitó (corroborado por IR), se concentra hasta llegar a un aceite muy viscoso (0.82 g) que se redisuelve en 1 mL de metanol y 3 gotas de agua, se separa en dos fracciones que se pasan por una columna de Sephadex-LH-20, eluyendo con MeOH para obtener 4 fracciones etiquetadas como F1, F2, F3 y F4 de composición y

concentración diferentes. Los resultados y espectros se muestran en el capítulo 6. La recuperación de conjugados útiles fue del 69.6%, ya que se esperaban 691 mg y entre las fracciones 3 y 4 solo se recuperaron 481 mg.

4.5.2. Dendrímero 4 con taxol

2'-Hemisuccinato de taxol (15)

A una solución de 25 mg de Taxol y 3.6 mg (1.23 equivalentes) de anhídrido succínico en 1.5 mL de CH₂Cl₂ a temperatura ambiente, se le agregan 3.4 μL de piridina seca. La mezcla de reacción se mantiene en agitación por 3 días a temperatura ambiente, entonces se concentra a vacío. El residuo se redissuelve en 1 mL de CH₂Cl₂ y se purifica por columna de silica, eluyendo inicialmente con una mezcla Hex:AcOEt 1:4, gradualmente se va aumentando al polaridad con AcOEt, para obtener 24.5 mg de producto (rendimiento del 88%). FAB (+MS) teórica m/z=954; exp.: (FAB+) m/z=954. RMN ¹H se encuentra en el capítulo 6.

N-Succinimidil Difenil Fosfato (SDPP)⁸⁹ (16)

El SDPP fue sintetizado siguiendo el protocolo de Ogura y col. adecuando los tiempos de reacción. Se pesan 1.1509 g (10 mmol) de N-Hidroxisuccinimida en un matraz y se adicionan 6 mL de CH₂Cl₂, se sella y purga por 20 minutos con N₂, tras lo cual se adicionan de manera independiente y en un lapso de 30 minutos 2.25 mL (10.9 mmol) de DPP-Cl y 1.52 mL (10.9 mmol) de TEA. Se deja transcurrir la reacción por 1 h para concentrar a vacío, quedando una miel con sólido que se tritura con éter etílico (3 x 8 mL), dando un sólido blanco que se filtra y redissuelve en AcOEt. Esta nueva fase orgánica se lava con agua desionizada (3 x 10 mL), se seca con MgSO₄ anhidro para dar una solución translúcida, se concentra y tritura una vez más con 15 mL de éter etílico para obtener 1.42 g de sólido blanco con punto de fusión de 87-88°C. Rendimiento: 40.9 %

Datos espectroscópicos: NMR (CDCl₃) ¹H (δ(ppm)): 2.77 (s, 4H, (CH₂)₂COO-); 7.25 (m, 2H, H₃), 7.36 (m, 8H, H_{2,4,5}).

Taxol N-hidroxisuccinimidil éster (17)

Se forma una solución de 27 mg (0.0283mmol) de Taxol-NHS y 14.74 mg (0.042 mmol) 1.5 equivalentes de SDPP en 1.5 mL de acetonitrilo, a esta solución se le

adicionan 15 μ L (4.3 equivalentes) de trietilamina. La reacción se mantiene en agitación por 12 h y se concentra a vacío. El residuo se redissuelve en 2.5 mL de AcOEt y 1 mL de hexano y se purifica por sílica gel, eluyendo con AcOEt:Hex (2.5:1) para obtener 0.21 mg (73% de rendimiento). RMN 1 H se encuentra en el capítulo 6.

Formación del conjugado dendrímico 4-taxol (18)

En una mezcla de 10 mL de DMF y 3.5 mL de DMSO, recién destilados, se disuelven 12.4 mg (0.012 mmol) de Taxol-NHS y se le adicionan 31.7 mg (16.52 mmol) de hidrocloreto de 1-[3(dimetilamino)-propil]-3-etilcarbodiimida (EDC-HCl). Se mantiene en agitación por 2 h en atmósfera de N_2 . Posteriormente se adiciona gota a gota (1.5 h) a una solución de 50 mg (0.0118 mmol) del dendrímico **4** en suficiente DMSO. Esta reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente por 5 días. El disolvente se evapora a presión reducida a 72°C, el material viscoso obtenido se redissuelve en 1 mL de metanol y 5 gotas de agua, se filtra con filtro de jeringa de 200 nm (NALGENE) y se inyecta a una columna de Sephadex-LH20 que se eluye con MeOH. De la columna se separan dos fracciones (una de 12 mg y otra de 32 mg) que corresponde a un 72% de la masa total esperada.

4.6. Ensayo del porcentaje de inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas cancerígenas y linfocitos humanos (MT-2) a 50 μ M.

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* se llevaron a cabo en el Instituto de Química (U.N.A.M.), en la unidad de pruebas de actividad biológica a cargo de la académica M. Teresa Ramírez Apan, siguiendo el protocolo de Monks y colaboradores⁹⁰, que consiste en poner en contacto el material a una concentración dada con las diferentes líneas celulares y monitorear la inhibición ó proliferación de las células, por tinción con sulforodamida B.

Líneas celulares y medios de cultivo

Los dendrímeros, metabolitos, complejos, conjugado y fármaco fueron evaluados *in vitro* (por triplicado) en contra de líneas celulares de cáncer humano: HCT-15 (adenocarcinoma de colon humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano), K562 (leucemia mieloide crónica humana), U251 (glioblastoma humano), PC-3 (adenocarcinoma de próstata humano), SKLU-1 (adenocarcinoma de pulmón humano).

Todas las líneas celulares, tanto tumorales como sanas (linfocitos), fueron suministradas por el National Cancer Institute (Estados Unidos). Los cultivos celulares usados fueron preservados bajo el medio celular RPMI-1640, que especifica la suplementación con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 10000 unidades/mL de penicilina sódica, 10000 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de estreptomina y 25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B (Gibco), además de 1% de aminoácidos no esenciales, manteniendo el cultivo bajo una atmósfera con humedad del 5% a temperatura de 37 °C. Posteriormente fueron expuestos por 48h a los diferentes dendrímeros y posibles compuestos de degradación a una concentración de 50 μM en agua.

Ensayo de porcentaje de inhibición en el crecimiento celular.

El porcentaje de inhibición en el crecimiento celular, después del tratamiento de las líneas de células cancerosas y las células normales con los compuestos de la prueba, se determinó usando el tinte unión de proteínas sulforodamina B (SRB) en los ensayos de microcultivo para medir el crecimiento celular, como lo describe Monks y col. Las células fueron retiradas de los frascos de cultivo de tejidos mediante el tratamiento con tripsina, y se diluyen con medio fresco. A partir de estas suspensiones celulares, 100 μL , con 5.000-10.000 células por pozo, se pipetearon en placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar) y el material se incubó a 37 °C durante 24 h en una atmósfera con 5% de CO_2 . Posteriormente, una solución de los dendrímeros obtenidos por dilución de los stocks (100 μL) se añadió a cada pocillo. Los cultivos fueron expuestos durante 48 horas al compuesto a una concentración de 50 μM . Después del período de incubación, las células se fijaron al sustrato de plástico mediante la adición de 50 μL de solución acuosa de ácido tricloroacético al 50% en frío. Las placas se incubaron a 4 °C durante 1 h, se lavaron con agua del grifo H_2O y se secaron con aire. Las células fijadas con el ácido tricloroacético se tiñeron mediante la adición de 0.4% SRB. La solución libre de SRB se eliminó por lavado con una solución acuosa al 1% de ácido acético. Las placas se secaron al aire, y el colorante unido se solubiliza mediante la adición de solución buffer Tris 10 mM (100 μL). Las placas se colocaron en un agitador durante 5 minutos, y la absorción se determinó a 515 nm utilizando un lector de placas ELISA (Bio-Tex Instruments).

4.8 Preparación de muestras para UV-vis de los conjugados dendriméricos

Las muestras se preparan pesando una cantidad de x mg de cada fracción (**F1**, **F2**, **F3** y **F4**), en un matraz aforado de 5 mL, posteriormente se afora con solución salina buffer de fosfatos a pH 7.4 (PBS) y finalmente se realiza la dilución adecuada para obtener lecturas dentro del rango de la linealidad (tabla 4.1). Para **F2** no se realizaron diluciones dada la baja concentración de analito, mientras que para las fracciones 3 y 4 se realizaron 3 diluciones para obtener un valor promedio.

	Alicuota (mL) aforada a 5 mL	$A_{(\lambda=282)}$	$A_{(\lambda=300)}$
F1 (2.9 mg)	1.6	0.687	0.663
	3	0.959	0.941
	original	1.800	1.786
F2 (3.2mg)	original	0.960	0.867
F3 (1.8 mg)*	0.5	---	0.508
	0.7	---	0.667
	1	---	0.882
F4 (0.9mg)	0.7	0.908	0.758
	1	1.211	1.015
	2	2.427	2.029

*Debido a que solo contiene MTX, se usó la curva de calibración para el MTX a 304 nm ($A_{304}=32265.09[C]$) y los valores de absorbancia que se encuentran en la tabla son a $\lambda=302$ nm por ser el máximo para estos espectros.

4.9. Detalles Computacionales

Los dendrímeros **9** y **13**, el MTX y los complejos formados entre ellos fueron equilibrados mediante una búsqueda conformacional en medio acuoso con una constante dielectrica de 81 y el campo de fuerza OPLS2001⁹¹, usando el Metodo Estadístico de Monte Carlo⁹² incluido en el software Macromodel. El algoritmo de Múltiples Mínimos (MCMM)^{93,94} sin límites en el número de variables de torsión en la búsqueda fue usado. Las superficies Hidrofóbicas-Hidrofílicas (en anaranjado y azul respectivamente) fueron generadas por un procedimiento de mapeo siguiendo el algoritmo de Goodford⁹⁵ usando Maestro⁹⁶ con una caja de 6Å.

4.10. Formación de complejos dendrímero-fármaco.

Procedimiento general para la formación de complejos dendrímero-fármaco

El procedimiento general para la formación de complejos implica, en primer lugar, la formación de la sal de las terminales de ácido carboxílico del dendrímero con NaOH (cantidades equimolares), moliendo en un mortero de ágata sin disolvente; acto seguido se adicionan cinco equivalentes de MTX para obtener una pasta (sal de dendrímero/MTX). Esta pasta se disuelve en el medio en cuestión (agua ó PBS) hasta alcanzar un volumen de 5 mL en un matraz aforado, obteniéndose un complejo soluble. La solución del complejo se sonica durante 20 minutos y se deja equilibrar en la oscuridad durante una noche. Posteriormente, la solución se centrifuga durante 10 minutos a 3400 rpm. Finalmente, el sobrenadante se filtra a través de un filtro de jeringa ANOTOP 25, con un tamaño de poro de 400 nm. Los complejos formados con este método permanecen estables por varias semanas tanto en agua como en PBS.

Complejos en agua.

Complejo Dendrímero 9-MTX

La formación de este complejo se realizó moliendo 11.7 mg (0.866×10^{-5} mol) de dendrímero con 2.7 mg (6.93×10^{-5} mol) de NaOH y posteriormente se agregaron 25.5 mg (5.61×10^{-5} mol) de MTX. Con el objetivo de obtener un buen espectro de UV-vis, se realizó una dilución de 0.2 mL en 5 mL. La absorbancia a $\lambda=302$ nm fue de 1.261.

Complejo Dendrímero 13-MTX

La formación de este complejo se realizó moliendo 10mg (0.866×10^{-5} mol) de dendrímero con 2.7 mg (6.93×10^{-5} mol) de NaOH y posteriormente se agregaron 25.5 mg (5.61×10^{-5} mol) de MTX. Con el objetivo de obtener un buen espectro de UV-vis se realizó una dilución de 0.2 mL en 5 mL. La absorbancia medida a $\lambda=302$ nm fue de 0.827.

Complejos en PBS

Complejo Dendrímero 9-MTX

La formación de este complejo se realizó moliendo 17 mg (1.25×10^{-5} mol) de dendrímero con 3.9 mg (9.98×10^{-5} mol) de NaOH y posteriormente se agregaron 25.5 mg (5.61×10^{-5} mol) de MTX. Con el objetivo de obtener un buen espectro de UV-vis se

realizó una dilución de 0.06 mL aforada a 5 mL. La absorbancia a $\lambda=304$ nm fue de 1.265.

Complejo Dendrímico13-MTX

La formación de este complejo se realizó moliendo 14.4 mg (1.25×10^{-5} mol) de dendrímico con 3.9 mg (9.98×10^{-5} mol) de NaOH y posteriormente se agregaron 3.9 mg (9.98×10^{-5} mol) 25.5 mg (5.61×10^{-5} mol) de MTX. Con el objetivo de obtener un buen espectro de UV-vis se realizó una dilución de 0.06 mL en 5 mL. La absorbancia medida a $\lambda=304$ nm fue de 1.138.

Determinación de solubilidad máxima de MTX.

Para determinar la solubilidad del MTX en los diferentes medios, se colocan 5 mg de MTX en un matraz aforado de 5 mL, la solución se agita durante 30 min., se sonica durante 20 minutos y se deja equilibrar en la oscuridad durante una noche. Después de centrifugar durante 10 minutos a 3400 rpm, el sobrenadante se filtra a través de un filtro de jeringa ANOTOP 25 con un tamaño de poro de 400 nm. Para obtener una lectura confiable dentro del rango de la ley de Lambert-Beer, se realizan las diluciones necesarias.

Solubilidad máxima del MTX en agua.

Siguiendo el protocolo y haciendo una dilución de 0.3 mL de la solución original aforando a 5 mL, se obtuvo un valor de absorbancia de 0.457, medido a 302 nm.

Solubilidad máxima del MTX en agua

Aplicando el protocolo establecido para la solubilidad máxima del MTX ahora en PBS, y haciendo una dilución de 0.3 mL de la solución original aforando a 5 mL, se obtuvo un valor de absorbancia de 0.716 medida a $\lambda=304$ nm.

Liberación de MTX por descenso del pH

A las soluciones de los complejos en PBS se les ajustó el pH con gotas de HCl al 10% hasta llegar a pH 4, posteriormente se sonicen las soluciones por 20 minutos y se dejan equilibrar por una noche, tras lo cual se centrifugan por 10 minutos y se filtran por una membrana con un tamaño de poro de 400 nm. De las soluciones filtradas se toman las alícuotas pertinentes y se aforan en solución buffer a pH 7.4 para obtener el espectro UV-Vis y poder cuantificar la cantidad de MTX.

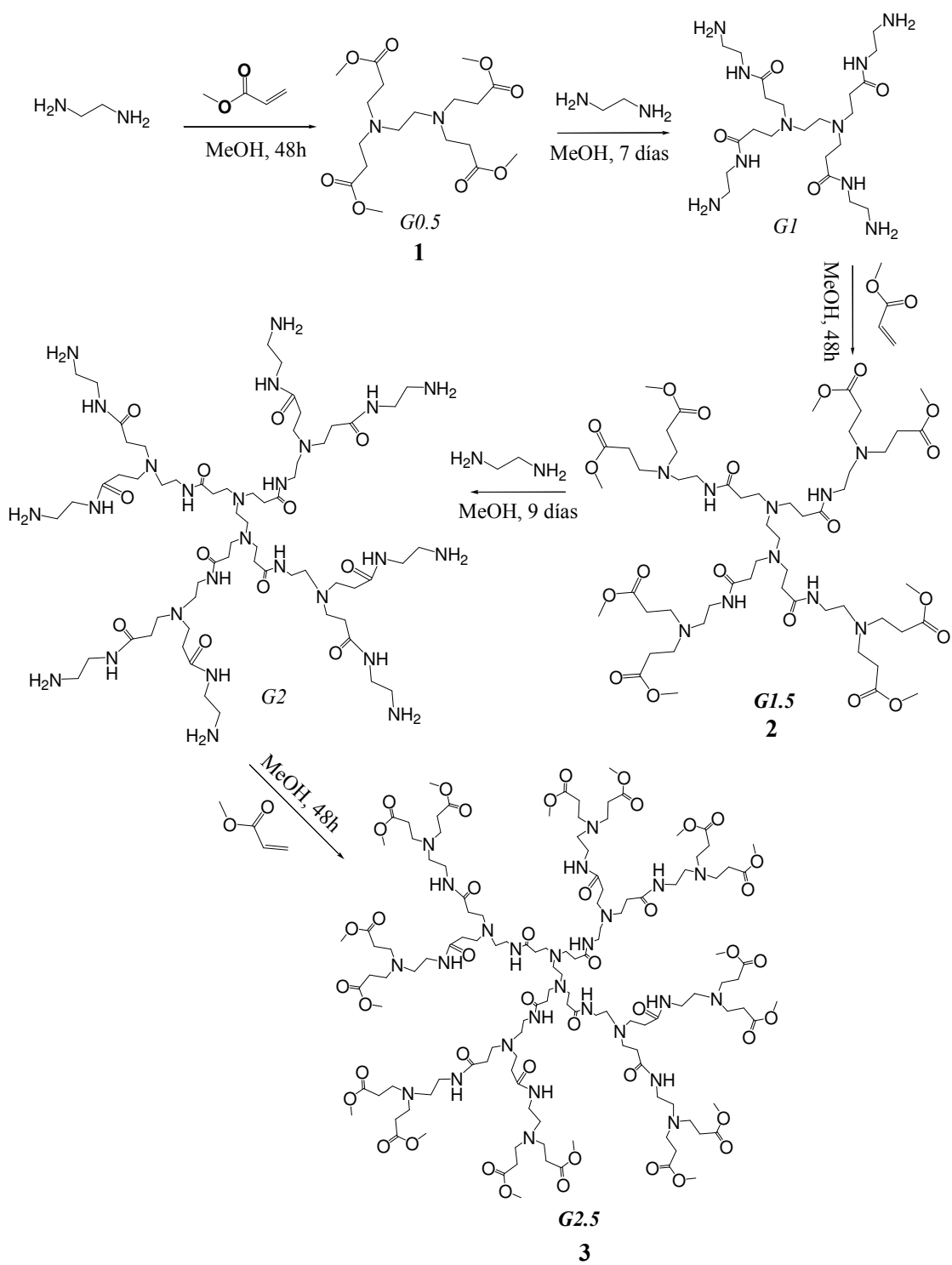
CAPÍTULO V. ANÁLISIS DE RESULTADOS:

SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS

5.1. Estrategia sintética

Como se mencionó, desde hace unos años se han venido haciendo grandes esfuerzos por sintetizar materiales perfectamente definidos con propiedades específicas que les permitan actuar como acarreadores y liberadores de fármacos; con esta finalidad se llevó a cabo la síntesis de tres familias de dendrímeros. Una de ellas es la del PAMAM con núcleo de etiléndiamina hasta la generación G2.5 siguiendo la metodología descrita por Twyman⁷³ y col., que corresponde a una síntesis divergente y se muestra en el esquema 5.1. Las otras dos familias son nuevos dendrímeros de amino-éster y difieren entre sí únicamente en el núcleo, en un caso se usó ácido adípico para obtener la familia DA y en el otro etiléndiamina, dando lugar a los dendrímeros etiquetados con DE. La estrategia de síntesis para estos dendrímeros podría llamarse pseudo-divergente, ya que para disminuir el número de etapas se formó el dendrón de G1⁹⁷ (esquema 5.3), evitando en cada generación 2 etapas de reacción, la protección de la amina y la desprotección una vez realizado el acoplamiento, y su respectiva purificación, como se ilustra en el esquema 5.2, comparando la síntesis del dendrímero DE G1.5. La ruta sintética, para los dendrímeros DA G1 y G2 con terminales de ácido carboxílico se muestra en el esquema 5.4, mientras que para el dendrímero DE con las mismas terminales se muestra en el esquema 5.5.

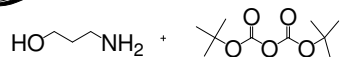
Cabe mencionar que las terminales COOH en los dendrímeros abre la posibilidad de seguir creciendo generacionalmente, o bien pueden ser modificados en la periferia en función de los grupos terminales necesarios. En el caso de los dendrímeros de PAMAM G2.5, los grupos terminales fueron modificados mediante una reacción de sustitución, empleando el grupo tris(hidroximetil)aminometano para tener grupos OH en la periferia y con ello favorecer la solubilidad en medios acuosos y decrecer la citotoxicidad al eliminar las aminas primarias en la superficie. La ruta de síntesis se muestra en el esquema 5.6.



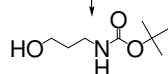
Esquema 5.1. Ruta de síntesis del PAMAM con núcleo de etiléndiamina

Síntesis Divergente

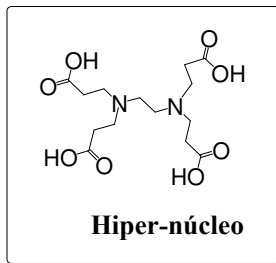
Etapa 1 Protección de monómero



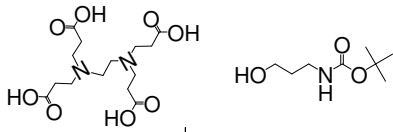
Protección ↓ Purificación



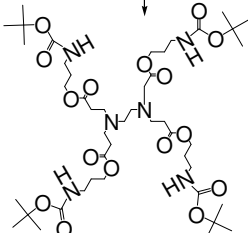
Monómero N-protégido



Etapa 2 Acoplamiento

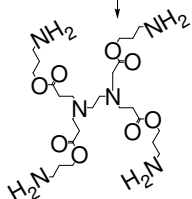


Acoplamiento ↓ Purificación



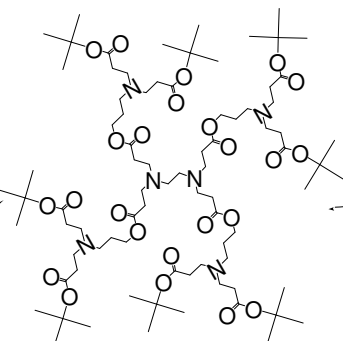
Etapa 3 Desprotección

Desprotección ↓ Purificación



Etapa 4 Alquilación

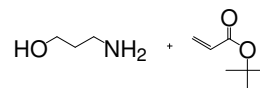
Alquilación ↓ Purificación



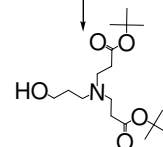
Dendrímero G 1.5

Síntesis pseudo-divergente

Alquilación Etapa 1

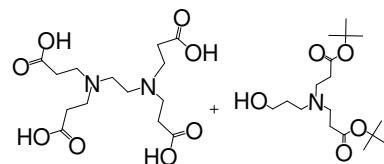


Alquilación ↓ Purificación



Dendrón G1

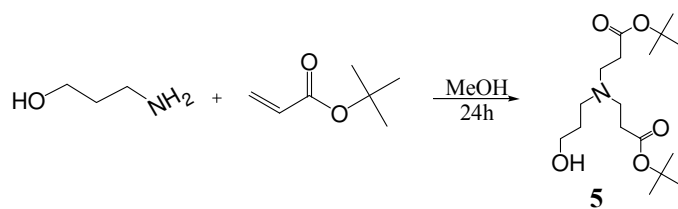
Acoplamiento Etapa 2



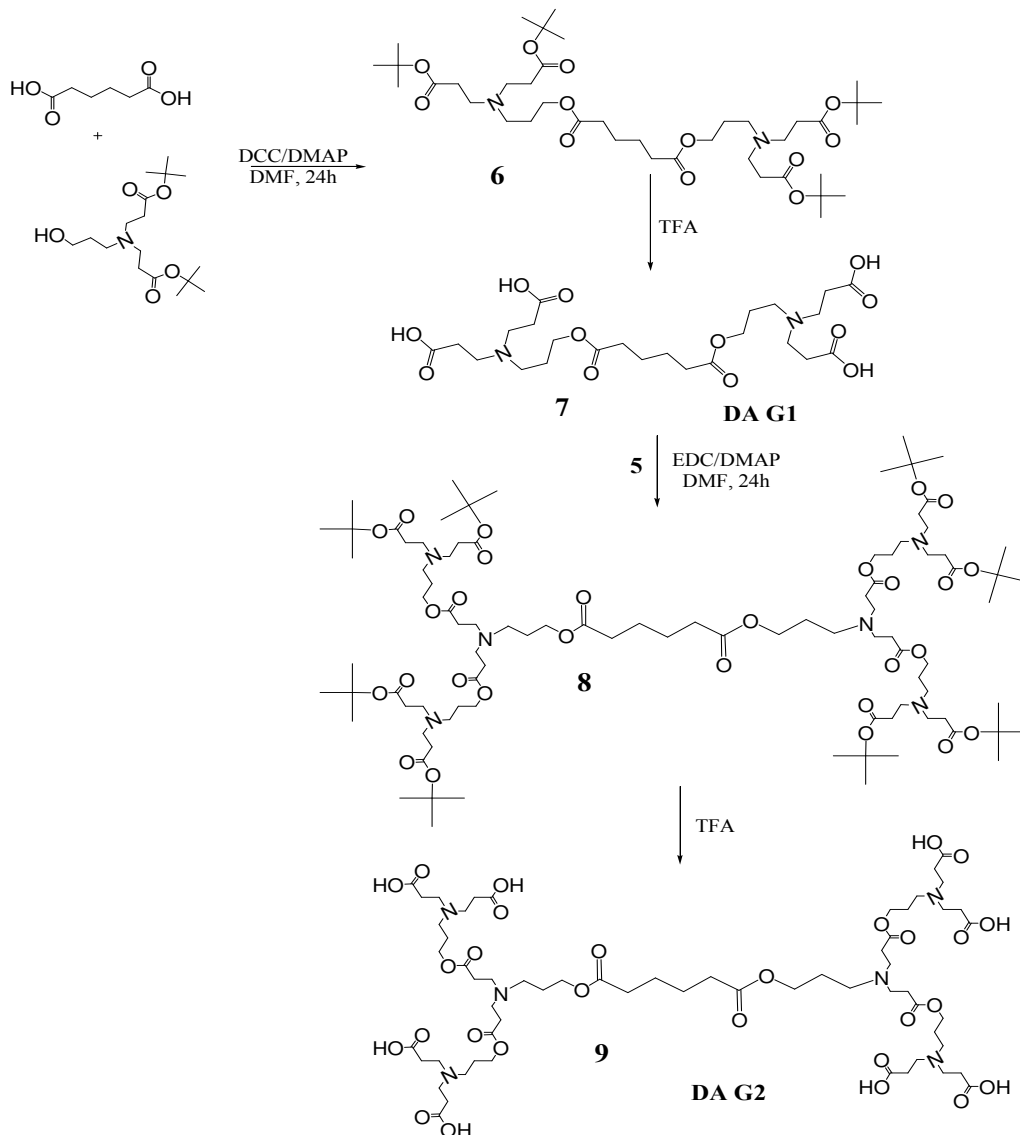
Acoplamiento

Purificación

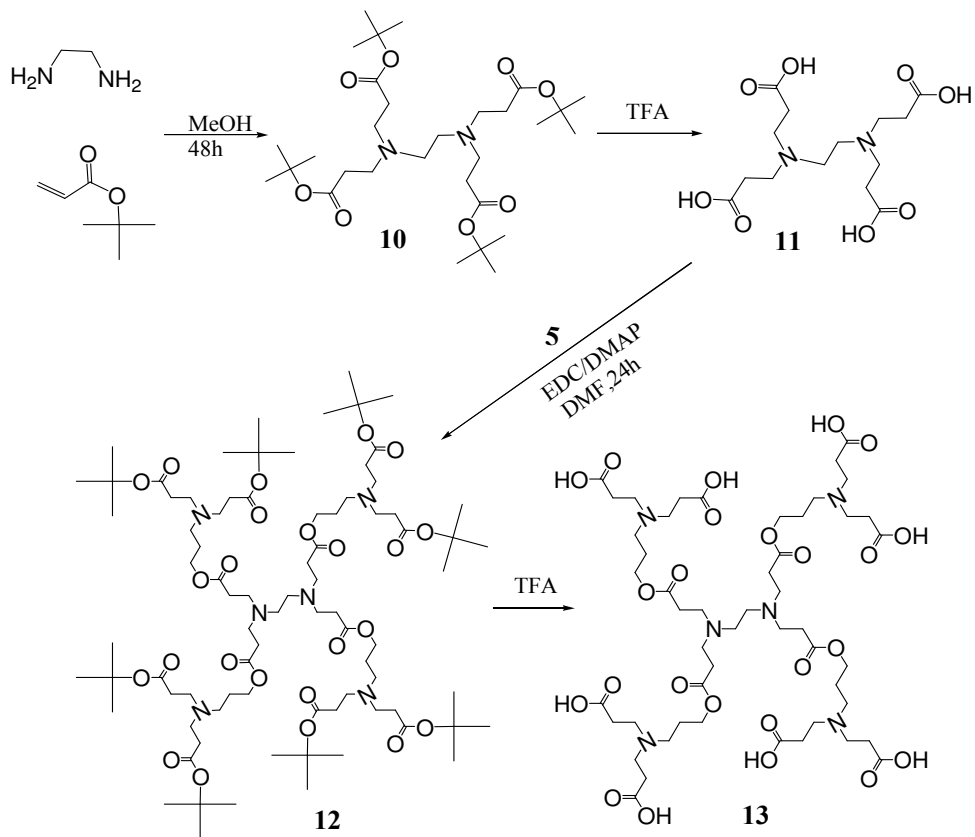
Esquema 5.2. Diferencia entre la síntesis pseudo-divergente y la divergente.



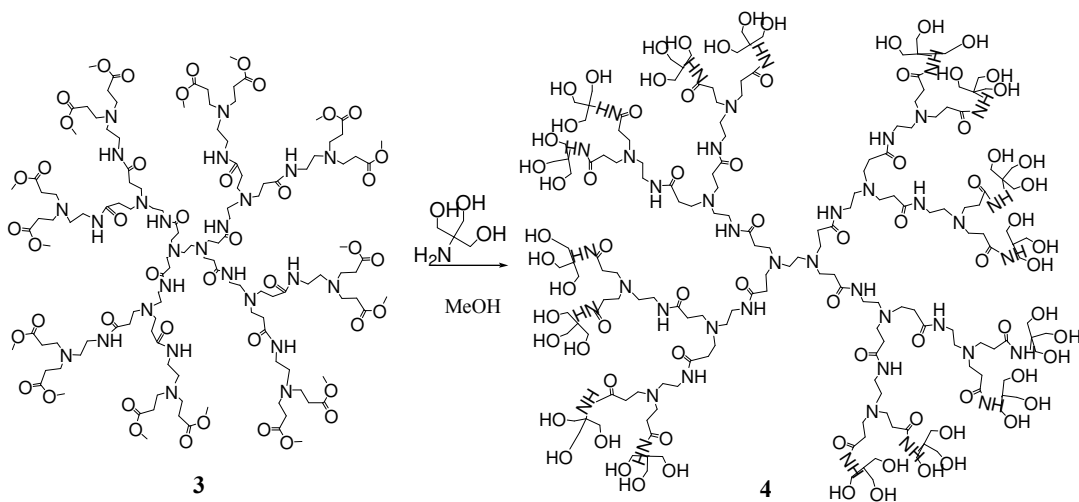
Esquema 5.3. Ruta de síntesis para el dendrón de G1



Esquema 5.4. Ruta de síntesis para los dendrímeros amino-éster con núcleo de ácido adípico (DA) G1 y G2.



Esquema 5.5. Ruta de síntesis para el dendrímero amino-éster con núcleo de etilendiamina (DE) de G1.5



Esquema 5.6. Modificación de la superficie con TRIS para el PAMAM G2.5.

5.2. Dendrímeros de PAMAM con núcleo de etiléndiamina

La síntesis de los dendrímeros de PAMAM hasta la G2.5, acorde al esquema 5.1, se lleva a cabo en MeOH y temperatura ambiente. Sin embargo, pese a las condiciones suaves, son necesarios tiempos de reacción largos y altas diluciones para evitar la formación de subproductos, en el mismo sentido cabe mencionar que la temperatura debe ser mantenida por debajo de los 50 °C para evitar que se den reacciones de descomposición. Otra de las cualidades de estas reacciones es que cada paso puede ser monitoreado mediante CCF usando AcOEt como eluyente. La obtención de los productos deseados se comprobó como a continuación se describe.

La obtención del producto **1** se corroboró por varias técnicas espectroscópicas. Por RMN de ^1H se observan dos señales triples, una a 2,43 ppm asociada a los protones del metileno adyacente al carbonilo y otra a 2,51 ppm asignado al CH_2 posterior a la amina (figura 5.2). Además, por espectrometría de masas se confirma la obtención del compuesto **1** por el pico con un valor de m/z de 405 asociado al ión molecular y el pico en 202 que corresponde al esperado para el compuesto con dos cargas (figura 5.1). El crecimiento de la G0.5 a G1.5 (compuesto **2**) se determinó, en primera instancia por las nuevas bandas en el espectro de infrarrojo de la amida, en 3304 cm^{-1} por la vibración del hidrógeno de la amida y en 1644 cm^{-1} por el carbonilo de la misma. Además, aparecen nuevas señales en el espectro de RMN ^1H , por ejemplo la señal triple a 3.24 ppm que corresponde a los protones del metileno adyacente al NH de la amida como se aprecia en la figura 5.2, donde se comparan los espectros de las generaciones 0.5, 1.5 y 2.5. En RMN ^{13}C se ven claramente dos señales de carbonilos, correspondientes al del éster y al de la amida (figura 5.3). En el caso de la espectroscopia de masas, se obtiene un valor superior al esperado, por ello se realizó una separación mediante cromatografía de líquidos acoplada a masas, mediante la cual fue posible discernir entre dos compuestos, uno con m/z de 1206.5, la esperada, y otro de $m/z=1227.5$ (figura 5.4). Este último valor se explica por la presencia de un ión Na^+ , en lugar de un H^+ , en la muestra cargada que llega al detector. Además, en el espectro con la especie cargada con iones H^+ se observa un pico con un valor de $m/z=603.9$, correspondiente a la especie con dos cargas y uno más a $m/z=402.7$ asociable a la especie con 3 cargas.

[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Martinez-Marcos-007 Date : 02-Dec-120 09:13
 Sample: 2878 DCM JeolFX505HR
 Note : Javier-Perez
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.60 min Scan# : (15,18) Temp : 216.6 deg.C
 BP : m/z 192.0000 Int. : 1600.00
 Output m/z range : 10.0000 to 419.0653 Cut Level : 0.00 %

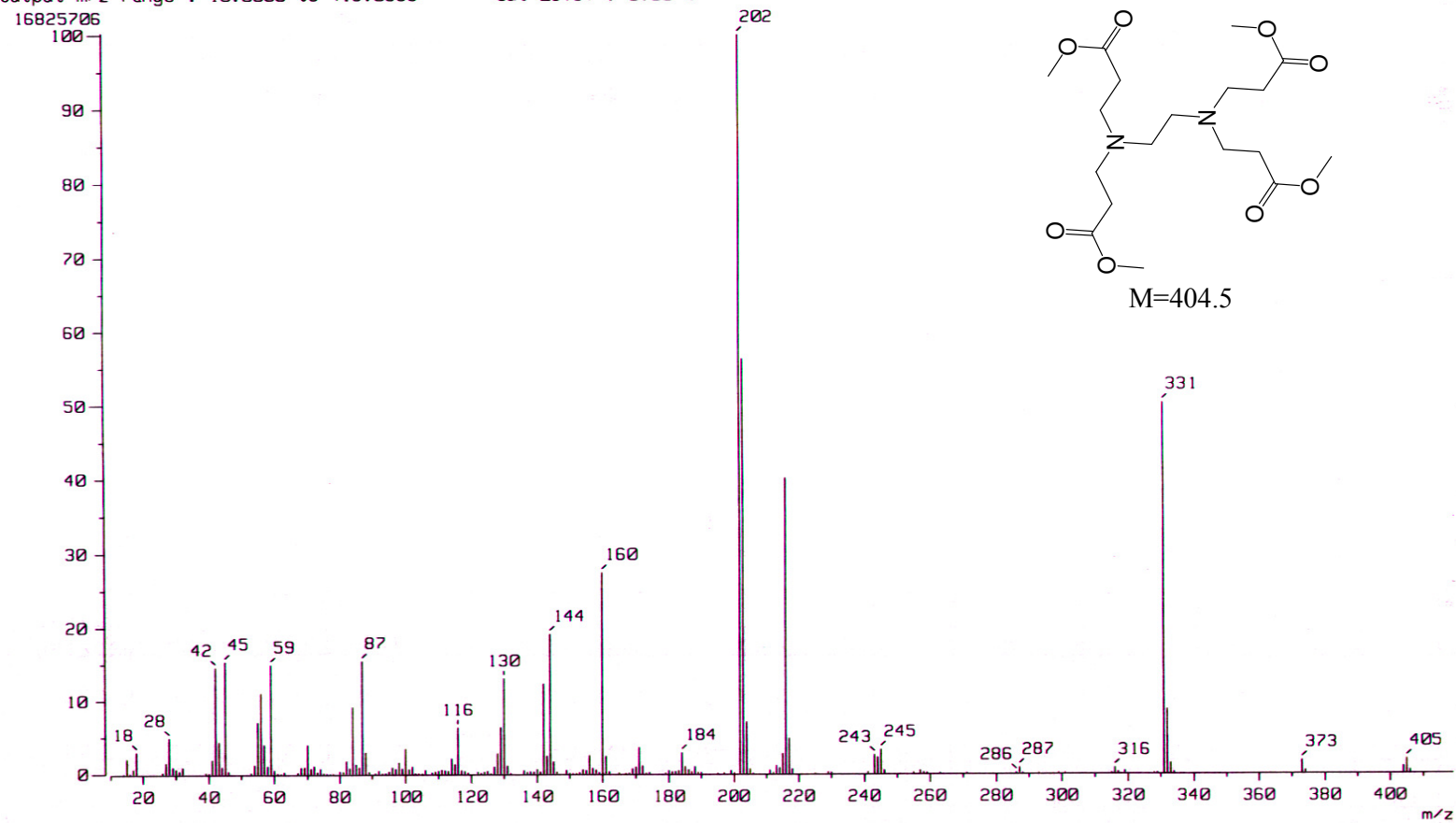


Figura 5.1. Espectro de FAB+ del PAMAM G0.5 (1)

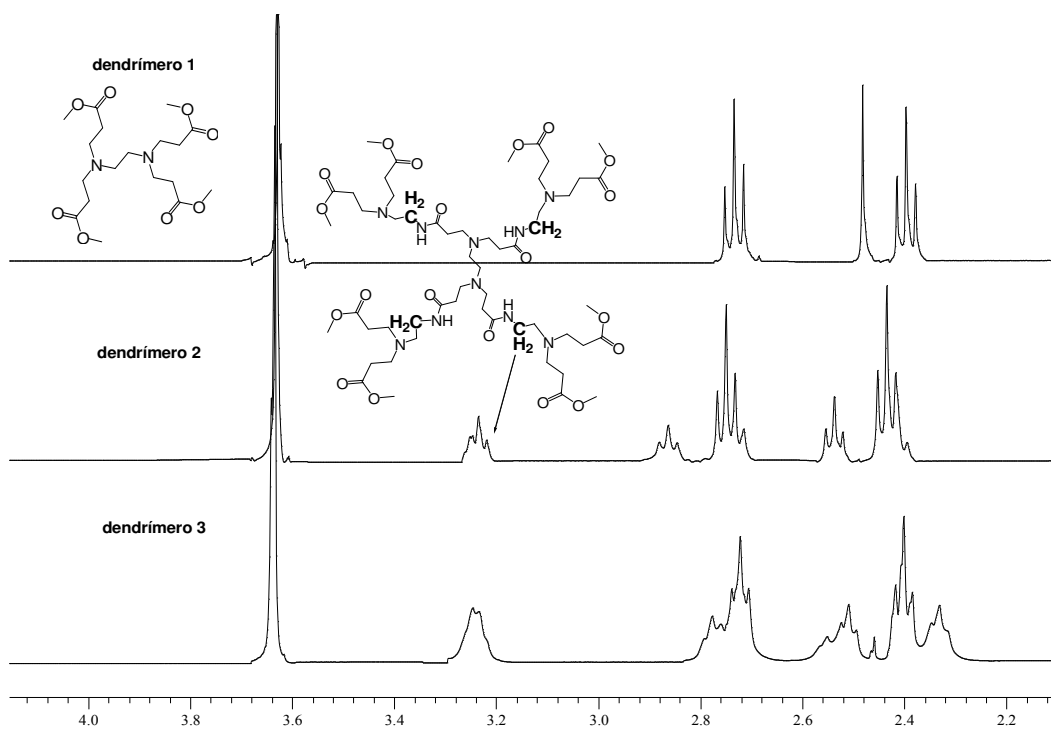


Figura 5.2. Espectros de RMN de ^1H de los dendrímeros **1**, **2** y **3**. Los dos primeros se realizaron acetona- d_6 y el tercero en CDCl_3 . Se aprecian las nuevas señales al pasar de G0.5 (1) a G1.5 (2) y al pasar a G2.5 el cambio más notorio es el ensanchamiento de las señales.

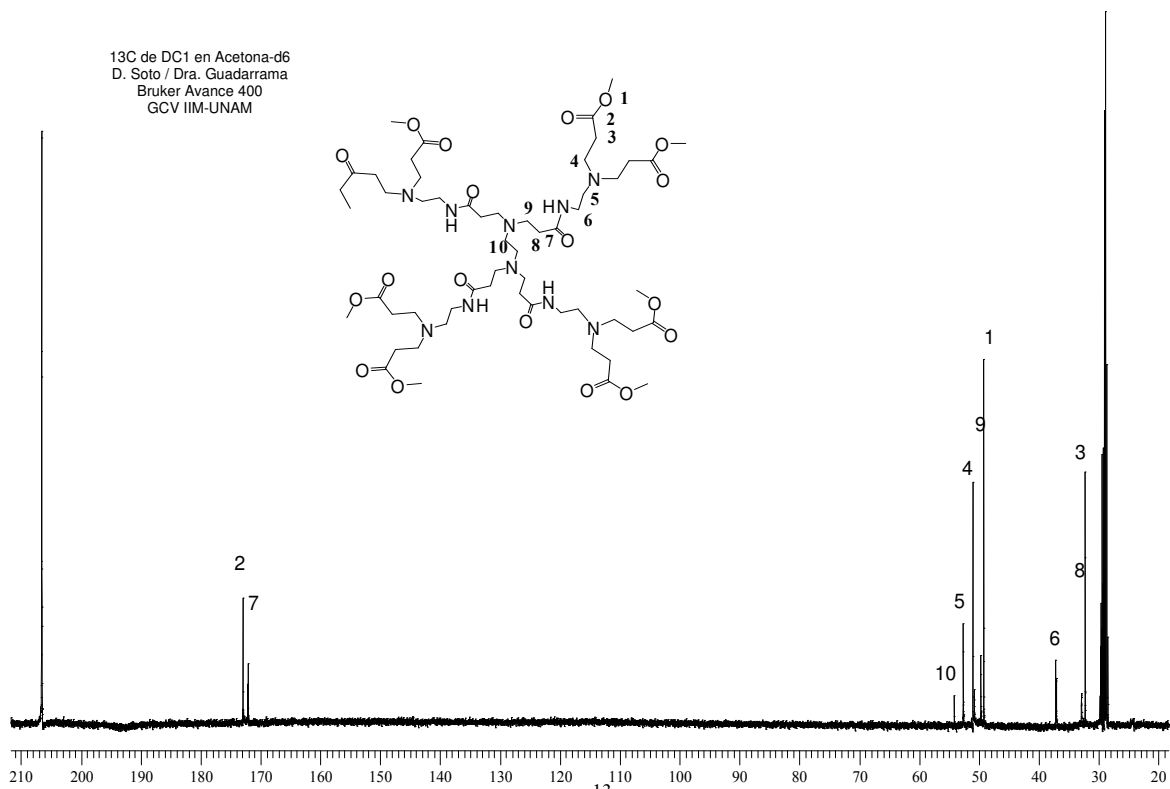
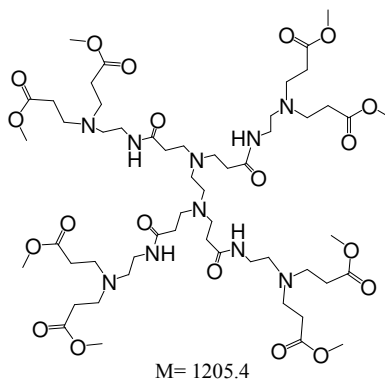
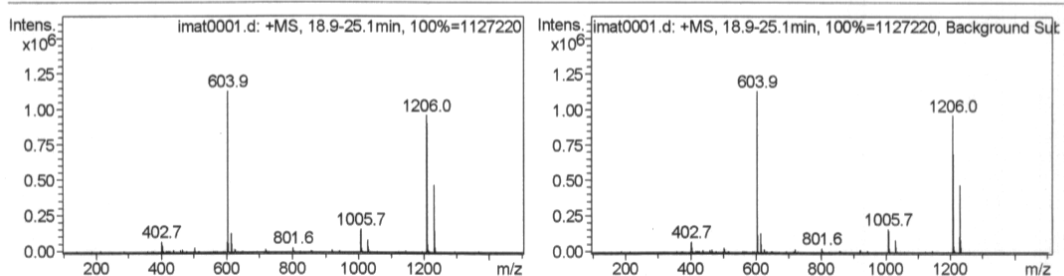


Figura 5.3. Espectro de RMN ^{13}C del dendrímoro **2**.



Reporte de Espectros de Masas

Cmpd 1, 21.1 min



Cmpd 2, 30.9 min

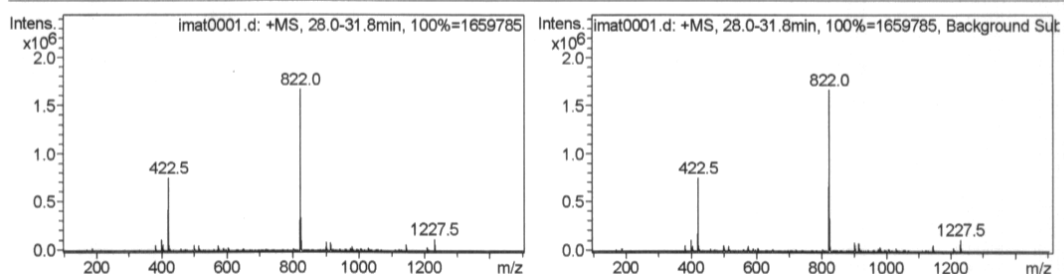


Figura 5.4. Espectro de ESI (+MS) del PAMAM G1.5 (dendrímtero **2**). Tras una separación cromatográfica.

Al igual que para el dendrímtero **2**, el PAMAM G2.5 (**3**) se corroboró por infrarrojo, resonancia y masas, si bien no existen cambios notorios entre los respectivos espectros, en resonancia se aprecia un ensanchamiento de las señales (figura 5.3) y hay un aumento en el valor relativo de las integrales en el espectro de ^1H . Nuevamente la técnica concluyente fue la espectroscopia de masas (figura 5.5), donde se obtuvo el valor de m/z correspondiente al ion molecular de 2807.9 y un valor superior al esperado de 2840.7, éste último se puede asociar al dendrímtero de PAMAM G2.5 con una molécula de metanol encapsulada, que por el tipo de radiación no se destruye.

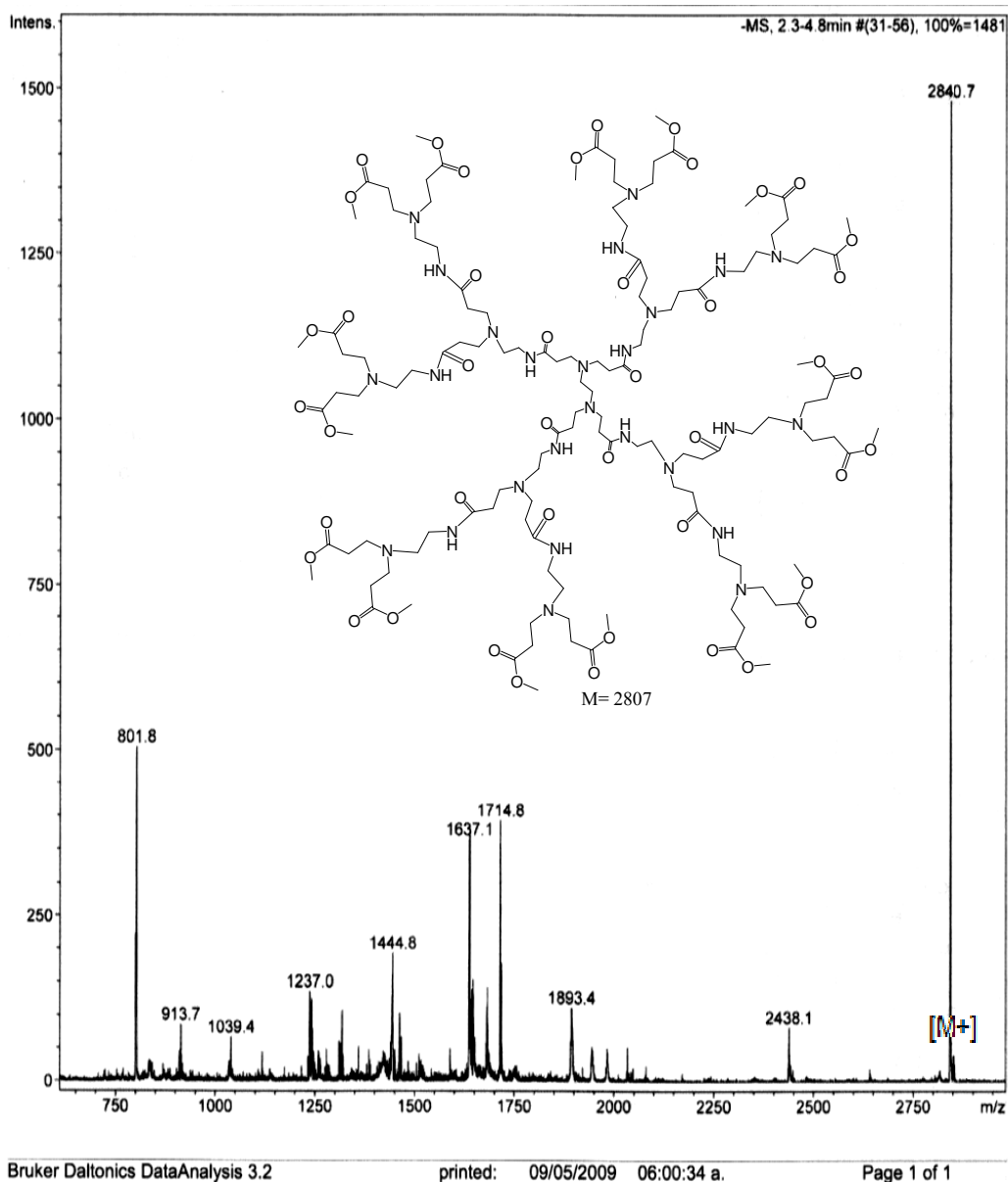


Figura 5.5. Espectro de ESI (+MS) del PAMAM G2.5 (3)

Una vez obtenido el PAMAM G2.5 que posee 16 grupos metiléster terminales, se hizo reaccionar con el TRIS, con la finalidad de triplicar el número de grupos superficiales y hacer más afín el dendrímero con organismos vivos. Además, se tendrían en la periferia grupos hidroxilo para unir vía enlaces éster moléculas de MTX o AF, o cualquier otra que posea un ácido carboxílico para anclarse. Cuando la reacción se lleva a cabo en metanol, el avance es fácilmente monitoreado por infrarrojo, ya que en el espectro se puede apreciar la desaparición de la banda del carbonilo del éster terminal en 1729 cm^{-1} al transformarse a carbonilo de amida en 1635 cm^{-1} (fig. 5.6). Sin embargo, por las otra

técnicas también se parecían cambios muy notorios que indican que se tiene el producto deseado, en el caso de la resonancia de ^1H se observan señales muy anchas debido a que la interacción de los protones con el disolvente impide que se relajen por completo, también se observa una señal simple debido a los protones del metileno adyacente a los grupos hidroxilo terminales (figura 5.7). Y en el espectro de ^{13}C se logran ver dos señales correspondientes a las aminas internas y externas del dendrímero.

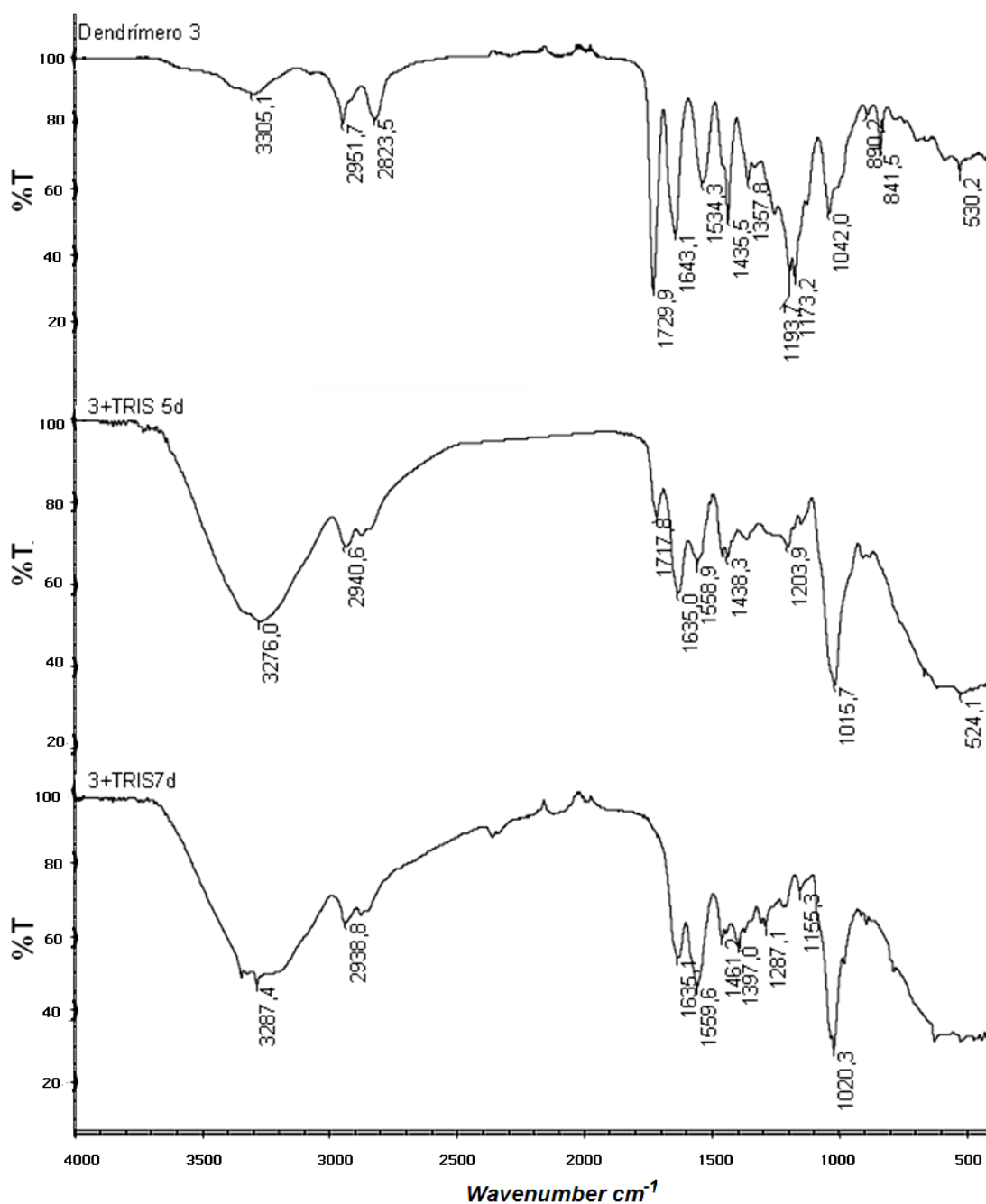


Figura 5.6. Espectros FT-IR del seguimiento de la reacción de funcionalización del PAMAM G2.5 con TRIS. a) dendrímero 3; b) 5d de reacción y c) 7 días de reacción.

^1H de DC25OH en D_2O
Dra. Guadarrama
Bruker Avance 400
GCV IIM-UNAM

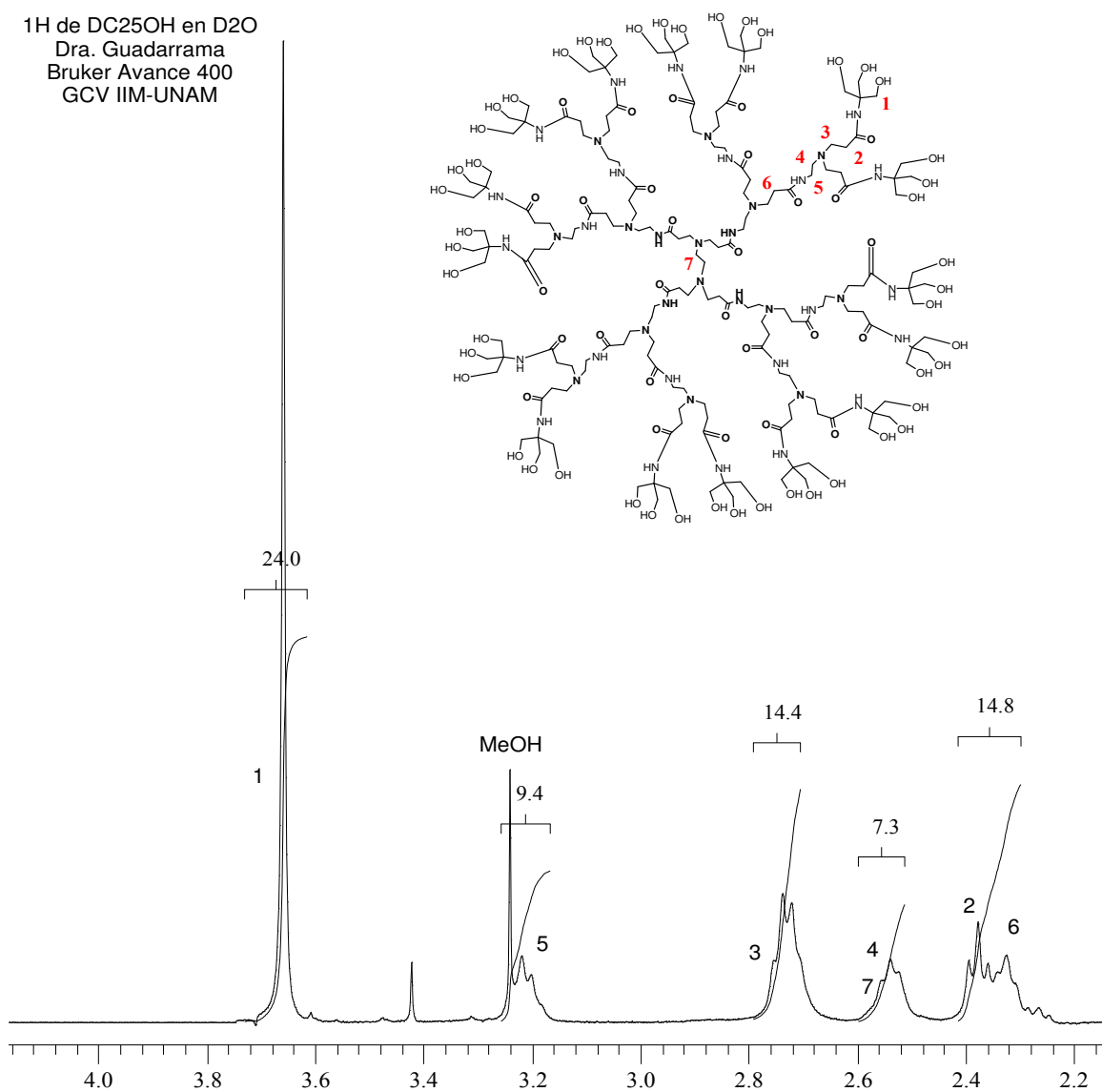


Figura 5.7. Espectro de ^1H RMN del PAMAM G2.5 funcionalizado con TRIS (4)

En resumen, la síntesis de cada uno de dendrímeros de PAMAM, aunque requiere de altas diluciones, adiciones lentas en algunos pasos y tiempo de reacción largos, da altos rendimientos y su pureza puede ser evaluada por técnicas comunes de espectroscopia. Cabe mencionar que si no se controla la dilución, la temperatura y la velocidad de adición se pueden generar estructuras cíclicas⁴⁴ no deseadas que se caracterizan por la aparición de un conjunto de señales alrededor de 2 ppm en el espectro de ^1H

5.3. Dendrímeros aminoéster.

Teniendo en cuenta las principales características que los materiales con bio-aplicaciones deben tener, el diseño de los dendrímeros aminoéster fue hecho considerando tres elementos importantes que influyen en su desempeño: i) *alta flexibilidad* que favorece el proceso de encapsulamiento y puede mejorar la solubilidad, ii) la presencia de *grupos éster*, que promueve la biodegradabilidad de los compuestos, ya que se rompen en el cuerpo y, al mismo tiempo, pueden inducir la formación de puentes de hidrógeno, y iii) *ácidos carboxílicos como grupos terminales* ($pK_a \sim 5$), con lo que se predispone a que sean no citotóxicos, ya que debería ser prácticamente desprotonados a pH de la sangre (7,4), lo que conduciría a la formación de entidades aniónicas que impiden la adherencia a las paredes de los vasos sanguíneos por repulsiones electrostáticas.⁹⁸ Además, diversos estudios han demostrado que los dendrímeros con terminales aniónicas son menos tóxicos y hemolíticos que sus contrapartes catiónicos.^{48,69, 80,99} Bajo estos conceptos se realizó la síntesis de los dendrímeros **9** y **13** mostrados en los esquemas 5.4. y 5.5, respectivamente.

La síntesis del dendrón (**5**) a partir del 3-amino-1-propanol procede en 24h con rendimiento cuantitativo, este dendrón posee un grupo alcohol como punto focal y dos ésteres terbutílicos como grupos terminales (esquema 5.3), con lo cual se garantiza su acoplamiento a los núcleos con terminales de ácido carboxílico, vía enlaces éster, por un solo punto sin lugar a reacciones secundarias. La estructura se corrobora fácilmente por las proporciones en los valores de integración de los portones en la resonancia de 1H , por ejemplo, de la señal triple en 3.68 ppm correspondiente a los protones de metileno adyacente al alcohol respecto al triplete en 2.35 ppm asignado a los protones metílicos adyacentes al carbonilo (figura 5.8).

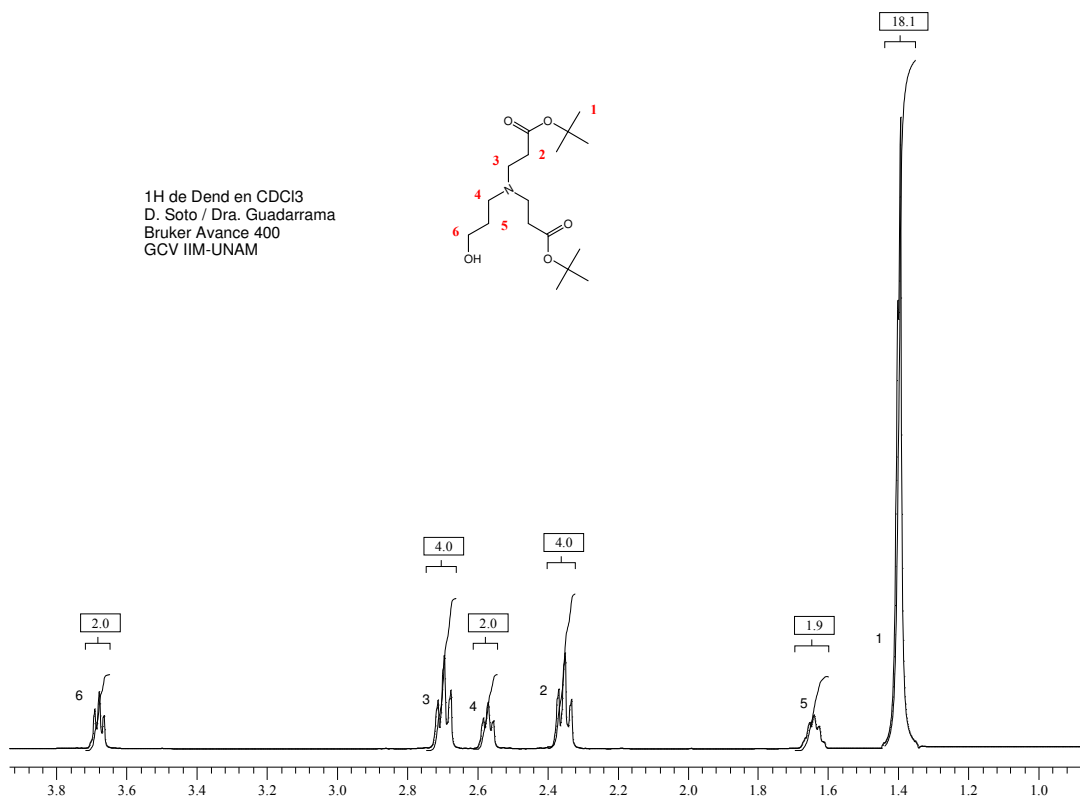


Figura 5.8. Espectro de RMN ^1H del dendrón (5)

5.3.1. Dendrímeros con núcleo de ácido adípico

De acuerdo al esquema 5.4, el acoplamiento de ácido adípico con el dendrón **5** (1:6 proporción) en presencia del sistema DCC / DMAP permite obtener el dendrímero **6** con un alto rendimiento (96%) como un aceite ligeramente amarillo. Es importante remarcar que el DMF debe estar completamente seco, de lo contrario el rendimiento se reduce a un 30-35%. Este nuevo compuesto se corroboró por la comparación entre las señales correspondientes a los protones terbutílicos (singulete de 36 H, en 1.42 ppm) contra las señales del ácido adípico distribuidas en 1.64 y 1.76 ppm. Por ^{13}C se observan dos señales en carbonilos, correspondientes a los ésteres terbutílicos e internos. Finalmente por FAB+ se comprobó por los valores de $m/z=773$ y $m/z=388$ asignados al ión molecular y a la especie bi-cargada, respectivamente.

La hidrólisis del dendrímero **6** para generar **7** (dendrímero de G1 con terminales de ácido carboxílico) fue gracias a la selectividad que presenta el ácido trifluoroacético para hidrolizar únicamente los ésteres terbutílicos, ya que con otros ácidos comúnmente empleados para estas hidrólisis, como el ácido fórmico, se pueden romper también los

ésteres internos y por ende el dendrímero, además en sólo 2 horas se obtienen rendimientos de más del 95%. La hidrólisis total es fácilmente monitoreada por la desaparición de la señal en 1.42 ppm asociada a los protones terbutílicos en el espectro de resonancia de ^1H , así como por la ausencia de la señal del carbono cuaternario por ^{13}C . Este tipo de compuestos, presenta un espectro de IR muy característico donde existen varios grupos carboxílicos factibles de intercambiar protones o formar puentes de hidrógeno presentan un espectro de IR muy característico con una banda muy prolongada y de baja intensidad desde 3600 a 2200 cm^{-1} atribuida a los grupos COOH terminales y una banda ensanchada para los grupos carbonilo alrededor de 1730 cm^{-1} . Estas características se aprecian en todos los dendrímeros con terminales de ácido carboxílicos como se retomará más adelante.

El sistema DCC/DMAP fue usado para acoplar nuevamente el dendrón **5** al dendrímero **7** y obtener la 2^a generación (**8**), sin embargo, pese a que se obtuvieron muy buenos rendimientos (>86%) se presentó un serio inconveniente, ya que la dicitclohexilurea (DCU), subproducto de la reacción, es fuertemente retenida por el dendrímero, como se corroboraba por las señales a 3.21 ppm en los espectros de resonancia de ^1H (anexo 2). Se hicieron muchos esfuerzos sin éxito por remover la DCU, filtración por papel y por celita, centrifugado, diálisis con membranas flexibles y rígidas y separación por tamaños en columna de Sephadex LH-20. Por tal inconveniente, fue necesario cambiar de agente acoplante. Se eligió la N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), ya que la urea generada es muy polar y puede ser fácilmente removida por columna. No obstante, la desventaja con este agente es que los rendimientos bajan hasta ~45%, tanto de éste dendrímero como de su análogo con núcleo de etiléndiamina (que presentó el mismo problema con la DCU). Sin embargo, el inconveniente presentado con la DCU, es un primer indicio de la capacidad de estos nuevos dendrímeros de encapsular moléculas hidrofóbicas.

Después de purificar por columna de silica con $\text{AcOEt}:\text{NH}_4^+\text{OH}$ (1%), se obtuvo el dendrímero **8** con un rendimiento del 46.4%, su estructura fue corroborada por resonancia de ^1H , donde el radio de señales entre 1.44 y 1.65 ppm corresponde con el esperado para la nueva relación de protones terbutílicos y los protones de los metilenos centrales del adípico. En los espectros de masas por ESI y por FAB+ llama la atención un pico de mayor intensidad al esperado en $m/z=1504.2$ (ESI) y $m/z=1502$ (FAB+), se descarta como una posible sustitución parcial, ya que no corresponde al valor esperado correspondiente de $m/z=1490$, pero se puede asociar con un fragmento que se forma al

ionizar la muestra, dado que de acuerdo a la literatura¹⁰⁰, cuando hay aminas terciarias en la estructura del dendrímico, los espectros de masas (ESI) pueden mostrar señales correspondientes al rompimiento de la molécula por la formación de ciclos. La estructura propuesta del ciclo formado se muestra sobre el espectro de ESI en la figura 5.9.

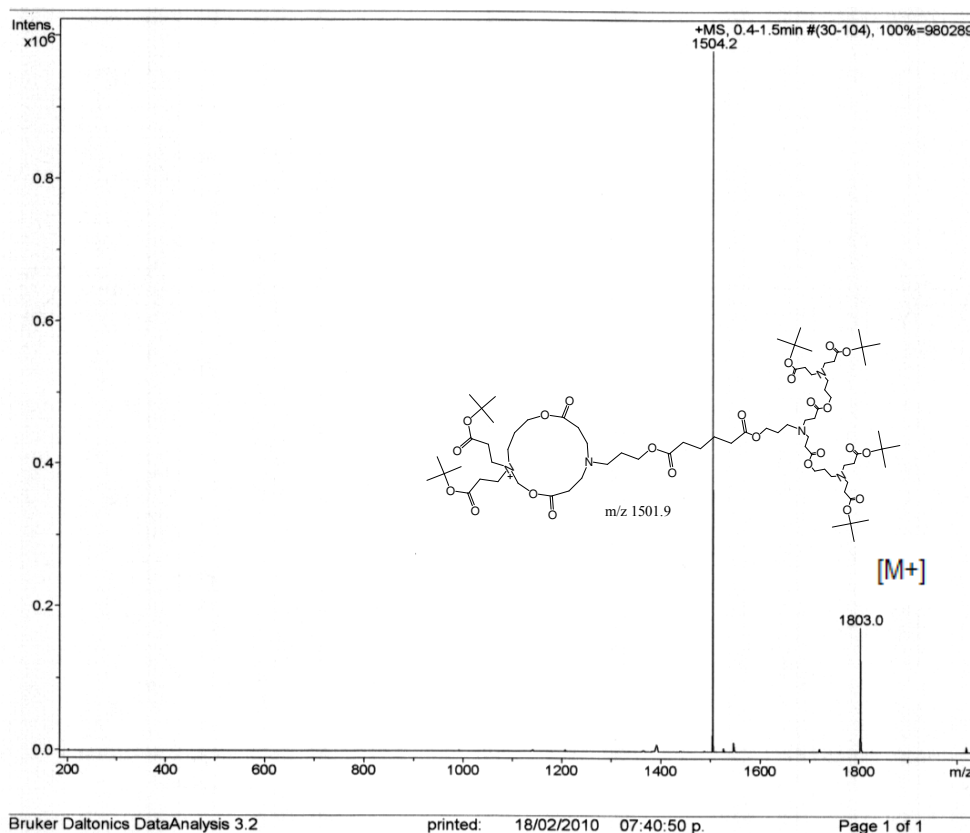


Figura 5.9. Espectro de ESI (+MS) del DA G2 (7)

Finalmente, para obtener el dendrímico **9**, se hidrolizo con TFA el compuesto **8**, que de manera análoga al **6**, presenta un espectro de IR muy característico donde existen varios grupos carboxílicos factibles de intercambiar protones o formar puentes de hidrógeno que generan una banda muy prolongada y de baja intensidad desde 3600 a 2200 cm^{-1} y una banda ensanchada para los grupos carbonilo alrededor de 1730 cm^{-1} , como se puede apreciar en la figura 5.10. Mediante resonancia de ^1H , se puede ver la proporción correcta entre las señales de los diferentes protones y la ausencia de la señal de los protones terbutílicos en 1.44 ppm (figura 5.11) y por ^{13}C se nota la ausencia del carbono cuaternario del ter-butilo (figura 5.12). Por FAB+ se corroboró el valor esperado de $m/z=1354.4$, además se observan un conjunto de picos en $m/z=1193$, 1181 y 1167 que se pueden asociar a la formación de un ciclo y la posterior pérdida de metilos, por la

diferencia de 14 unidades entre esos picos. Este compuesto es altamente higroscópico y completamente soluble en agua, características deseables para materiales con potencial aplicación como acarreador de fármacos.

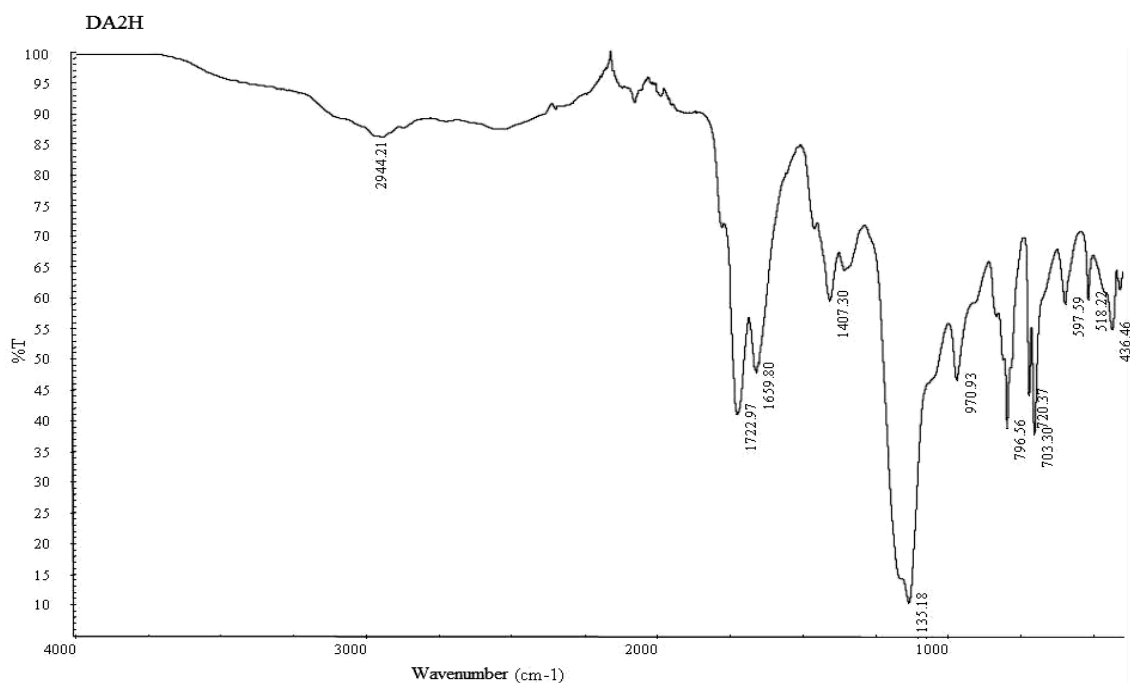


Figura 5.10. Espectro de infrarrojo del dendrímero **9** con COOH.

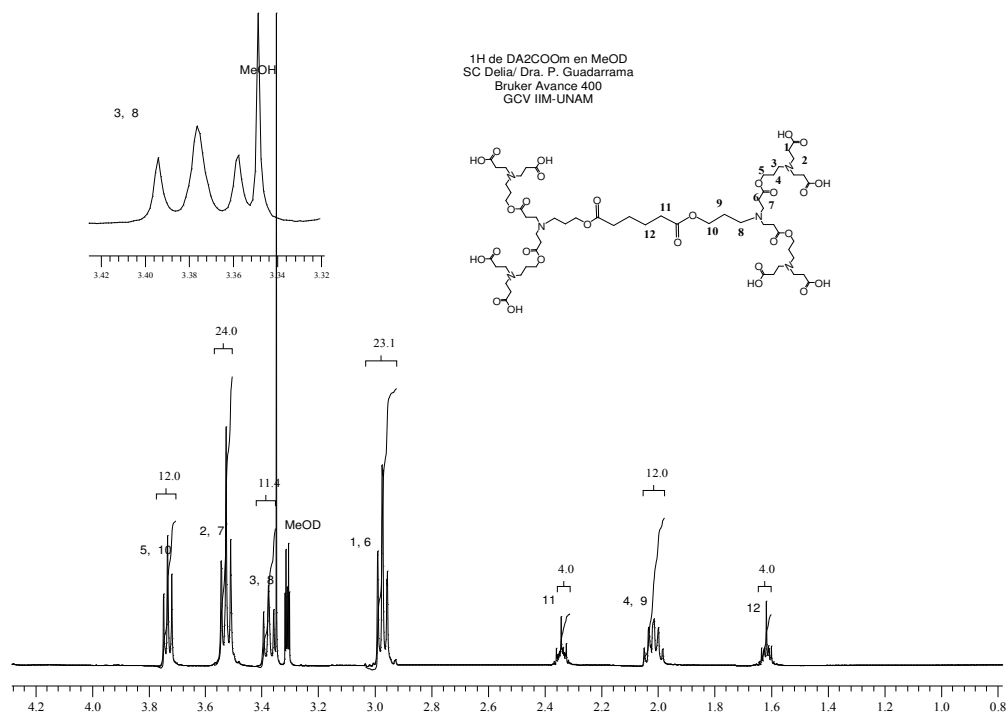


Figura 5.11 Espectro de ^1H RMN del dendrímero **9** con terminales COOH

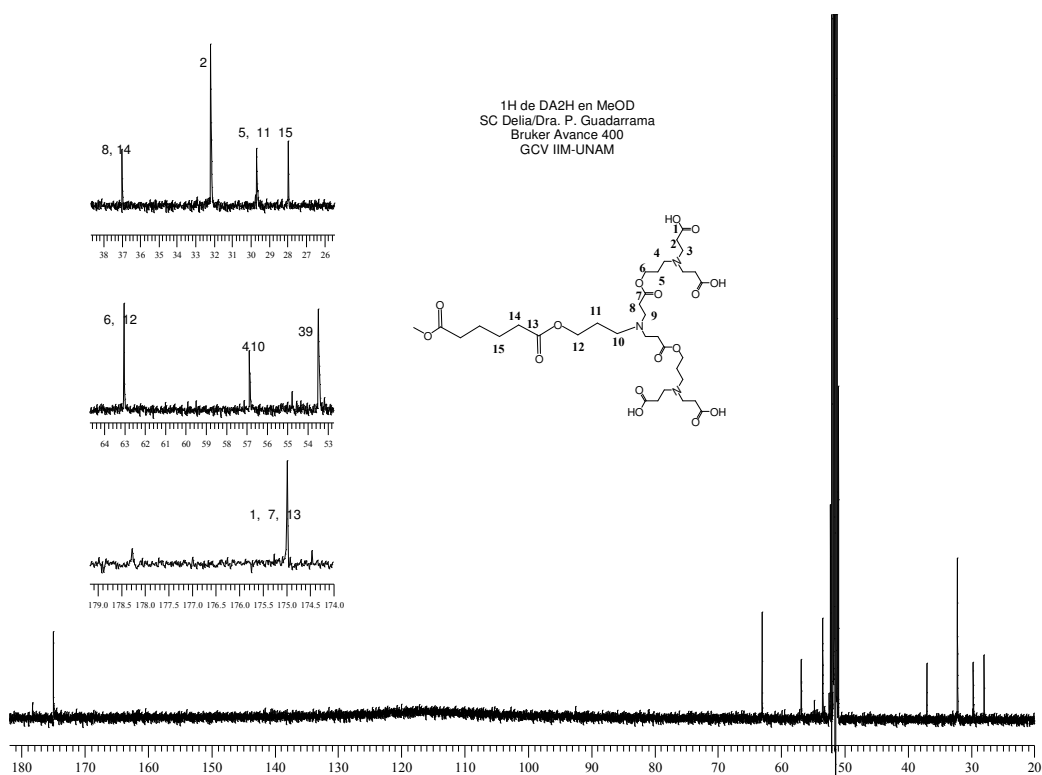


Figura 5.12. Espectro de ^{13}C RMN del dendrímoro **9** con terminales COOH.

5.3.2. Dendrímoros con núcleo de etiléndiamina

Para sintetizar el dendrímoro **13** (esquema 5.5), se obtiene en un primer paso el hiper-núcleo, compuesto **10**, mediante una adición de Michael del ter-butilacrilato con etiléndiamina en metanol, tras 48 h de reacción se concentra dando un rendimiento cuantitativo. La formación del compuesto tetra-alquilado se verificó por resonancia, donde las señales simples en 1.47 ppm y 2.43 ppm corresponden a los protones terbutílicos y a los protones del núcleo simétrico de etiléndiamina, respectivamente. El compuesto **10**, se hidroliza (**11**) y posteriormente se le acopla el dendrón (**5**) con el sistema EDC/DMAP en DMF, con estas condiciones se obtiene el dendrímoro **12** completamente sustituido de acuerdo con la caracterización espectroscópica, mediante ESI es posible confirmar que el dendrímoro está puro, dado que sólo aparece el pico de $m/z = 1603$ y uno con diferencia de 23 unidades, asociable al dendrímoro con ión de Na^+ en lugar de un H^+ , el espectro se muestra en la figura 5.13. Siguiendo la misma metodología que para el dendrímoro **9**, el compuesto **12** se hidroliza con TFA y tras varios lavados con diclorometano:hexano se obtiene el producto con aspecto de espuma,

por resonancia de ^1H se corrobora que los radios entre señales de protones específicos cuadre (figura 5.14) y por masas se verifica el ión molecular esperado.

A diferencia del PAMAM, la síntesis de estos nuevos dendrímeros es mucho más rápida, y los rendimientos son bastante buenos a excepción del segundo acople donde el rendimiento cae a menos de un 50%. Si bien éste es susceptible a mejorar implicaría probar nuevas condiciones de reacción y por cuestiones de tiempo quedó fuera del alcance del presente trabajo.

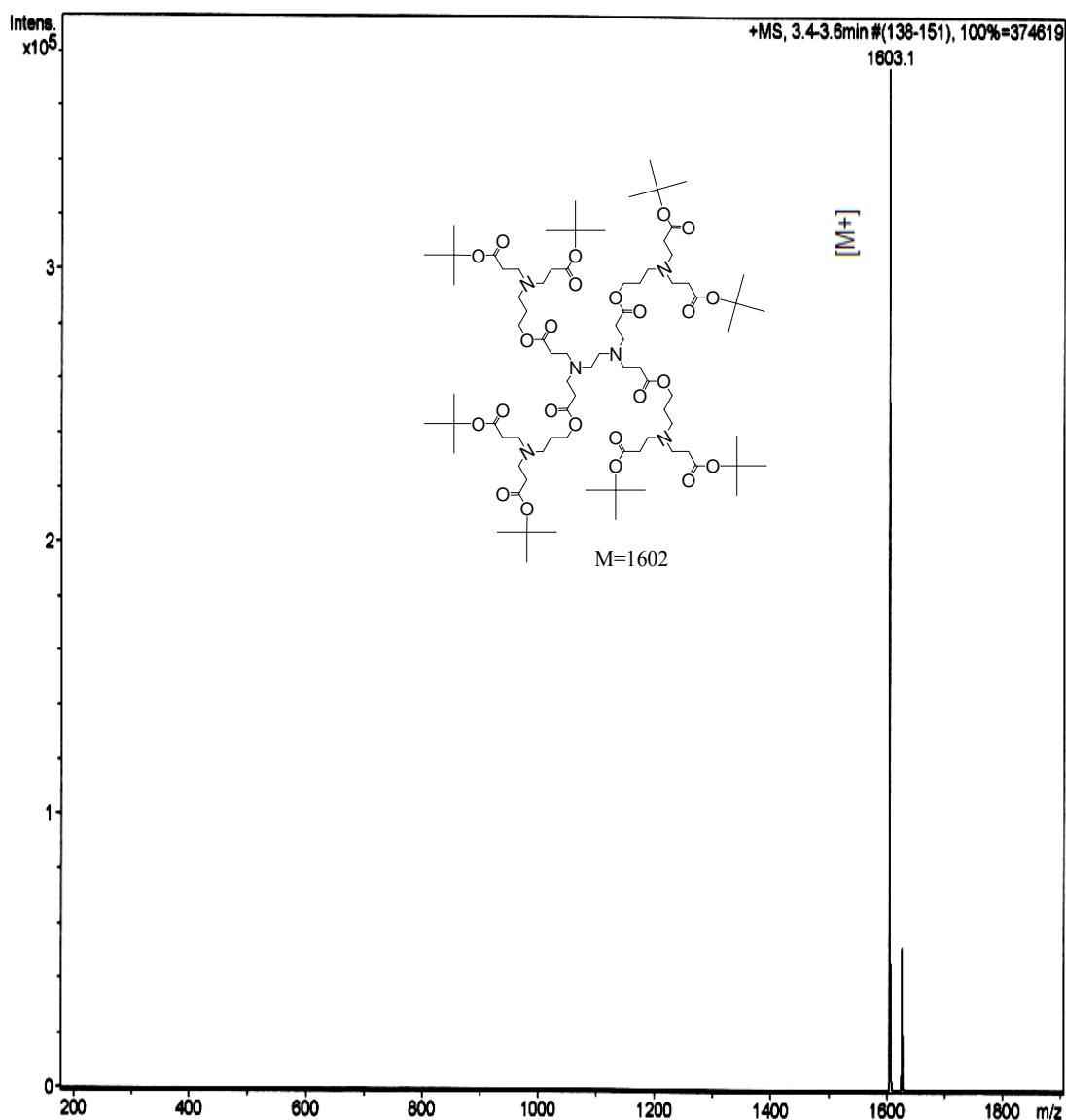


Figura 5.13. Espectro de ESI (+MS) del DE G1.5 (11)

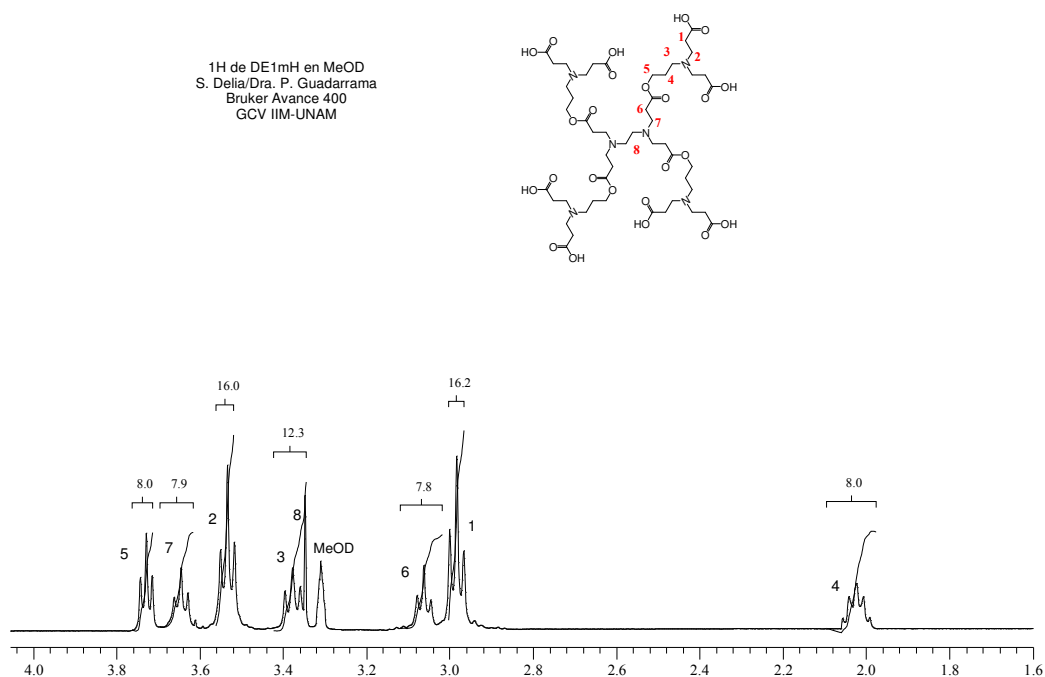


Figura 5.14. Espectro de ^1H RMN del DE G1.5 terminales COOH (**12**)

Con los resultados aquí expuestos, se demuestra la obtención de tres dendrímeros altamente solubles en agua con potencial aplicación en el acarreo y liberación de fármacos, uno con 48 terminales OH (**4**) y los otros dos con 8 terminales COOH (**9** y **13**). Los dendrímeros **9** y **13** se espera tengan capacidad de enriquecer la solubilidad de fármacos hidrofóbicos (MTX y Taxol) al formar estructuras supramoleculares unidas por interacciones no covalentes, iónicas, puentes de hidrógeno y de van der Waals. Y el dendrímero **13** se probará como acarreador de fármacos mediante la formación de conjugados dendriméricos, en un primer caso se unirá en la periferia moléculas del fármaco MTX y de AF que puede fungir como anzuelo; en un segundo caso se formará un conjugado con el fármaco Taxol.

CAPÍTULO VI. EVALUACIÓN DE DENDRÍMEROS COMO POTENCIALES ACARREDORES DE FÁRMACOS

6.1 Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular de los dendrímeros y sus posibles metabolitos

Debido a que uno de los parámetros necesarios para que cualquier material funcione como acarreador de fármacos es su inocuidad en células sanas, se realizaron pruebas *in vitro* del porcentaje de inhibición de crecimiento en linfocitos humanos (MT2) de los dendrímeros sintetizados, así como de los posibles productos de degradación, como prueba biológica preliminar a estos nuevos materiales.

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* se llevaron a cabo en el Instituto de Química (U.N.A.M.), siguiendo el protocolo de Monks y colaboradores⁹⁰, que consiste en poner en contacto el material a una concentración dada con las diferentes líneas celulares y monitorear la inhibición ó proliferación de las células, por tinción con sulforodamida B. Los resultados de los ensayos realizados por triplicado, así como el error estándar, se muestran en la tabla 6.1, la muestra de poliglicidol (sintetizada en nuestro laboratorio) se incluyó como referencia de inocuidad¹⁰¹.

Tabla 6.1. Porcentaje de inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas cancerígenas y linfocitos humanos (MT2) a 50 μ M \pm el error estándar							
Compuesto	MT2	U251	PC-3	K-563	HCT-15	MCF7	SKLU-1
4-hidrolizado*	+3.4\pm2.0	10.6 \pm 1.2	+6.6\pm5.0	6.5 \pm 1.2	7.8 \pm 1.4	24.0 \pm 1.2	17.9 \pm 1.3
Ac. Adípico	+3.2\pm1.5	+13.7\pm2.9	+3.7\pm0.8	+12.0\pm1.3	+6.5\pm1.0	+11.1\pm6.0	+5.1\pm0.5
6	+3.0\pm1.5	1.6 \pm 1.0	+5.2\pm0.2	15.3 \pm 5.8	+3.5\pm3.3	+21.4\pm5.4	+2.3\pm0.8
8	+6.1\pm1.0	9.8 \pm 0.4	12.6 \pm 3.6	7.7 \pm 0.0	+5.9\pm2.0	+10.2\pm2.2	2.4 \pm 0.4
10	6.7 \pm 2.2	19.7 \pm 5.0	+1.7\pm1.0	11.8 \pm 2.4	9.9 \pm 3.3	+9.8\pm4.2	+5.4\pm1.3
12	1.3 \pm 0.6	11.2 \pm 0.5	+9.6\pm2.1	1.3 \pm 0.3	+4.4\pm4.0	+6.6\pm1.2	2.1 \pm 0.1
4	+8.7\pm2.7	+14.7\pm2.1	+3.89\pm1.2	+17.1\pm5.1	+6.7\pm5.9	4.6 \pm 3.7	12.7 \pm 1.6
Poliglicidol	+5.8\pm0.6	1.6 \pm 0.1	+5.4\pm1.8	6.4 \pm 0.08	4.8 \pm 1.5	5.3 \pm 0.2	5.5 \pm 1.5

*hidrolizado con TFA (Anexo 3). MT2= Línea celular de linfocitos humanos normales; Líneas celulares de cáncer humano: U251= glioblastoma (cáncer cerebral), PC-3=adenocarcinoma prostático, K562= Leucemia mielógena crónica, HCT-15=adenocarcinoma colorectal, MCF-7= adenocarcinoma mamario, SKLU-1= adenocarcinoma pulmonar.

Los valores con signo + en la tabla 6.1 indican el % de crecimiento celular comparado con el blanco, lo que implica que no son citotóxicos, mientras que los valores sin signo indican el porcentaje de inhibición en el crecimiento celular. De la tabla 6.1 se puede observar que tanto los dendrímeros como sus posible metabolitos, muestran cierta selectividad hacia las líneas celulares cancerígenas, sin embargo, resultan ser inocuos hacia las células sanas MT2, salvo los compuestos **10** y **12** que presentan una ligera citotoxicidad pero que cae dentro del rango de error ($\pm 10\%$) en que se considera despreciable¹.

Aunque no es de interés que los dendrímeros o sus metabolitos sean citotóxicos hacia células cancerígenas, si se puede ver que las líneas celulares de cáncer de próstata y de mama (PC-3 y MCF-7 respectivamente) tienen mayor resistencia que el resto a la exposición de sustancias ajenas, por lo que se puede esperar que también presenten mayor resistencia a los fármacos, lo que pone de manifiesto la necesidad de trabajar en encontrar una vía de administración más selectiva.

En resumen, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la inocuidad *in vitro* de los dendrímeros sintetizados y, aunado a la solubilidad en medios acuosos que presentan, se pueden proponer como candidatos potenciales a acarreadores de fármacos.

6.2 Conjugados Dendriméricos

6.2.1 Estudio con MTX y AF

La estrategia de formar conjugados para el acarreamiento de fármacos presenta muchas ventajas ya que, además de aumentar la solubilidad y disminuir la toxicidad sistémica de los fármacos, se logra hacer más selectiva la acumulación en el tratamiento de tumores debido al EPR, y se aumenta el tiempo de circulación para tener una liberación prolongada, dado que generalmente la liberación implica el rompimiento de enlaces covalentes en condiciones ácidas (propias del lisosoma). Bajo estos antecedentes, aún cuando los alcances del presente trabajo no implican pruebas de liberación, se realizó la formación de conjugados dendriméricos uniendo el MTX a la superficie del PAMAM G2.5 con la superficie modificada con el grupo TRIS, es decir al dendrímero **4**, que de acuerdo a las pruebas de % de inhibición (tabla 6.1), demostró ser inocuo hacia líneas celulares sanas, es altamente soluble en agua y posee las terminales adecuadas para formar un enlace éster con los grupos ácido del MTX. También se sabe de la literatura que la inclusión de moléculas anzuelo (metabolitos involucrados en el crecimiento

celular), mejoran grandemente el desempeño de estos acarreadores ya que al existir receptores para esas moléculas, se facilita su entrada y acumulación en las células cancerígenas y sobre todo en los tumores que generalmente sobreexpresan algún receptor. Teniendo esto en mente, se decidió unir covalentemente al mismo dendrímero moléculas de Ácido Fólico (AF) como molécula anzuelo.

Como se menciona en los antecedentes, uno de los peligros que se corre al unir en la periferia moléculas hidrofóbicas es que la superficie se sature y se tenga un acarreador insoluble en medios acuosos. Con la finalidad de evitar este inconveniente, y dado que no se sabe el límite de carga de este dendrímero con el MTX y el AF, se decidió probar una sola estequiometria de carga baja, pensando idealmente en obtener una estructura con 2 moléculas de MTX y 2 de AF por cada dendrímero (figura 6.1).

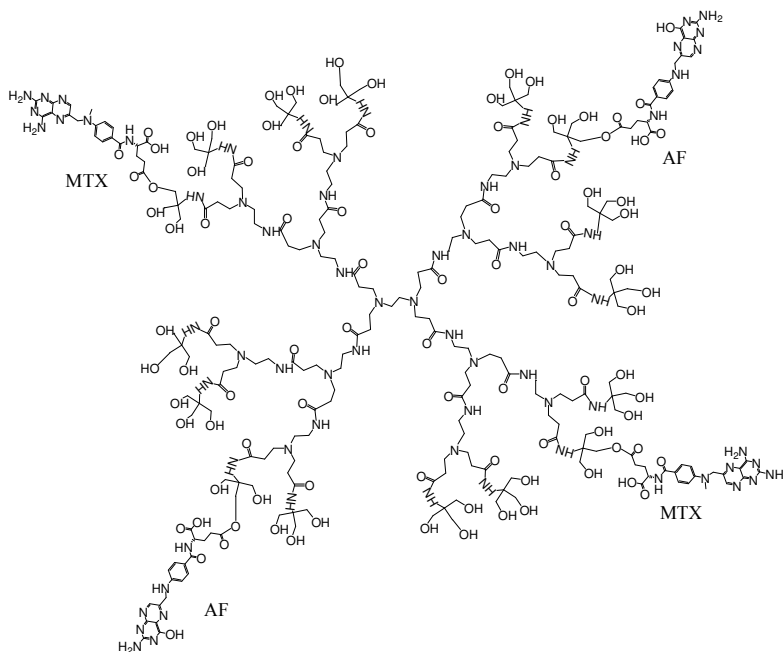


Figura 6.1. Conjugado dendrimérico. Dendrímtero 4 idealmente con una carga de 2 moléculas de AF y 2 de MTX unidas en la superficie mediante enlaces éster.

La unión covalente del AF y del MTX se realizó de acuerdo al protocolo establecido en la sección experimental, usando el sistema acoplante DCC/DMAP y condiciones anhidras. La mezcla de reacción se concentra y se remueve la DCU, una vez eliminada, se concentra hasta llegar a un aceite muy viscoso (0.82 g) que se redisuelve en 1 mL de metanol y 3 gotas de agua, se separa en dos fracciones que se pasan por una columna de Sephadex-LH-20, eluyendo con MeOH. La separación por tamaños permite tener fracciones de baja polidispersidad y eliminar la DCU, AF y MTX remanentes. Al ir

eluyendo la mezcla se aprecia claramente la separación de la muestra en cuatro fracciones coloridas completamente solubles en agua (este comportamiento fue idéntico en ambas porciones de la mezcla). Una vez concentradas cada una de las fracciones, se realizó la caracterización mediante FT-IR, RMN y UV-Vis. En la figura 6.2 se muestran las cantidades obtenidas de cada una de las fracciones y las concentraciones del AF y del MTX en mol/mg de conjugado.

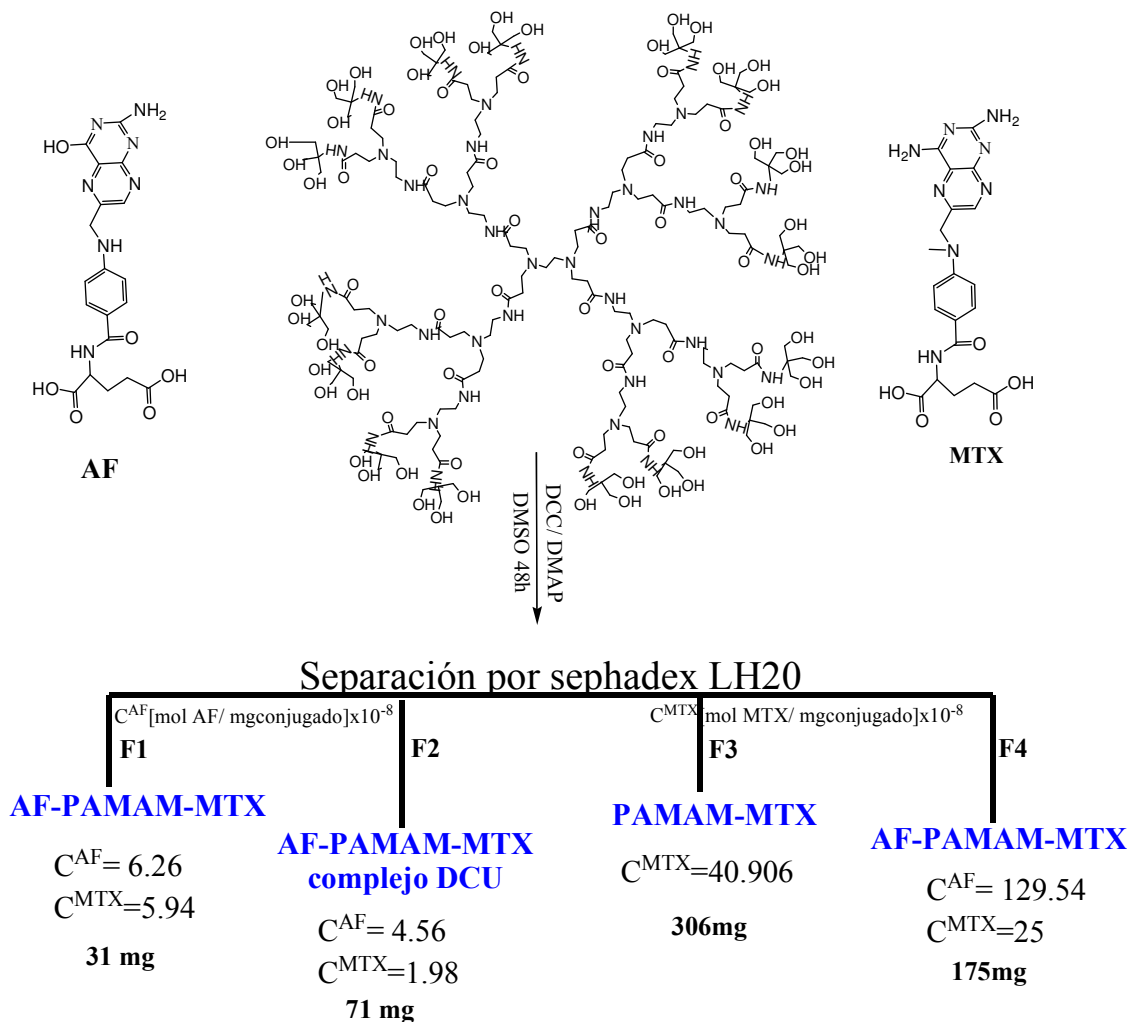


Figura 6.2. Resumen de las concentraciones y cantidades de las 4 fracciones obtenidas.

FTIR

La espectroscopia de infrarrojo (FTIR), si bien no es cuantitativa, es una técnica muy rápida que nos brinda un primer indicio de la formación de los conjugados por la aparición de las bandas de los diferentes grupos funcionales presentes en ambas entidades, junto con un ligero corrimiento debido a las nuevas interacciones. Para poder

hacer uso de la técnica es preciso contar con los espectros de cada una de las moléculas presentes, en este caso el del AF, el MTX, el dendrímero **4** y el de la DCU (subproducto de la reacción, que por experiencias previas puede formar complejos resistentes incluso a la separación por tamaños). Los espectros correspondientes se muestran en las figuras 6.3 a 6.6.

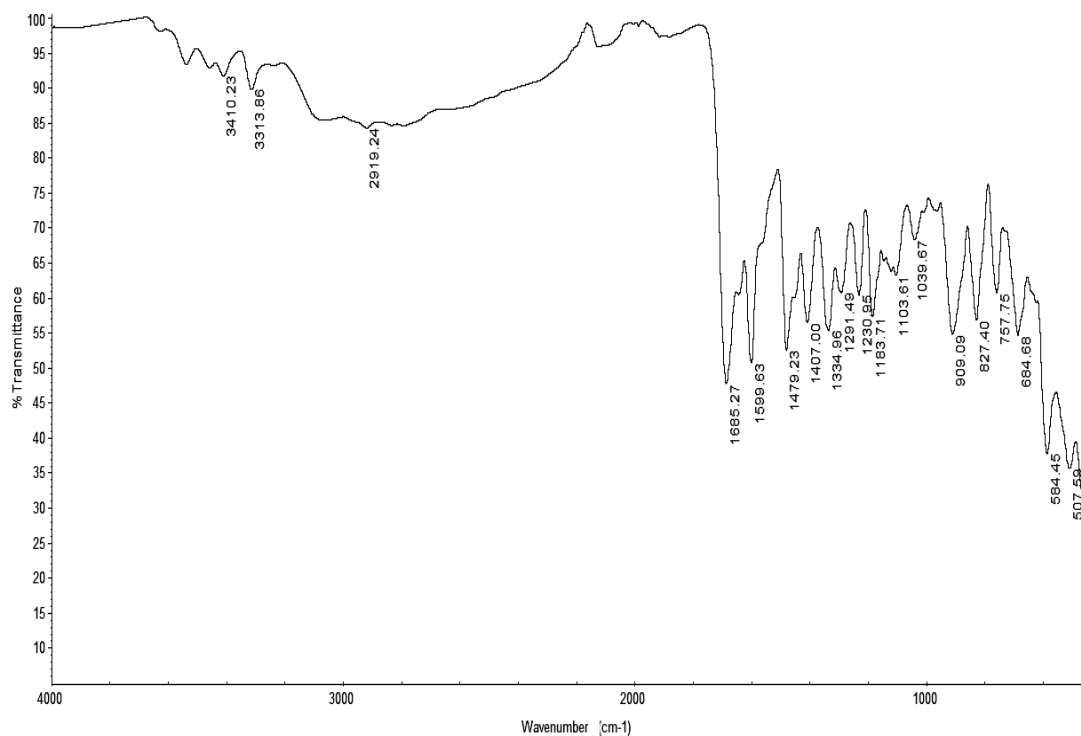


Figura 6.3. Espectro FT-IR del AF. Sobresalen varias bandas correspondientes a la vibración NH arriba de 3300 cm^{-1} , las bandas vibracionales de CH_x en 2919 cm^{-1} , la banda del C=O en 1685 cm^{-1} y una banda ancha de baja intensidad desde aproximadamente 3500 hasta 2100 cm^{-1} , debida a los puentes de hidrógeno.

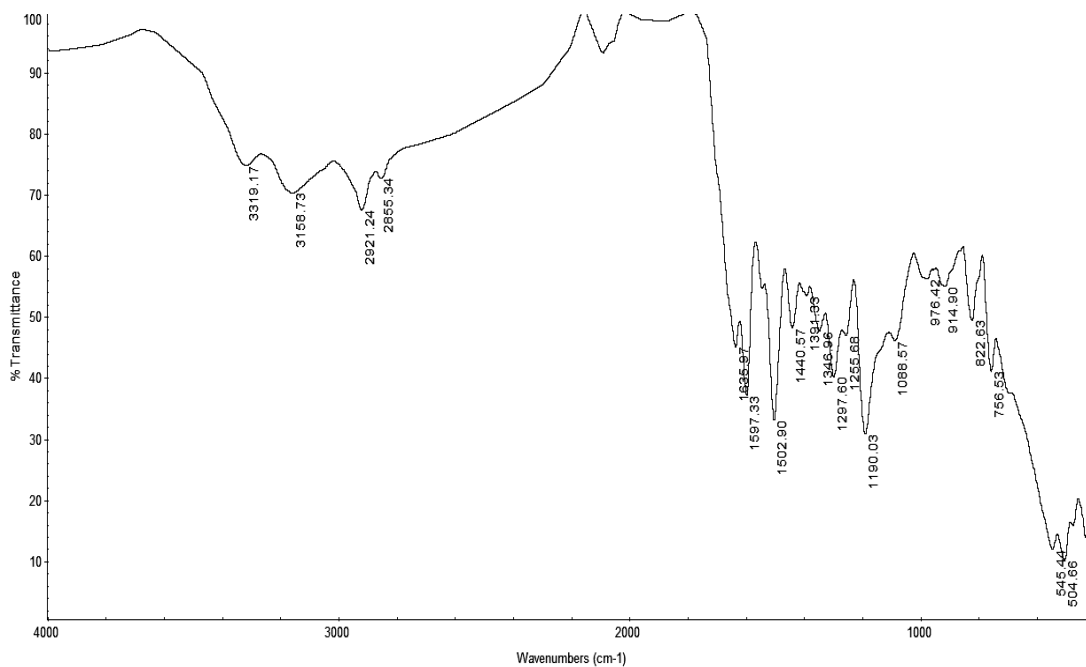


Figura 6.4. Espectro FT-IR del **MTX**. Sobresalen varias bandas correspondientes a la vibración NH_x arriba de 3300 cm^{-1} , las bandas vibracionales de CH_x en 2921 cm^{-1} y 2855 cm^{-1} y la banda del $\text{C}=\text{O}$ en 1635 cm^{-1} . También muestra una banda ancha de baja intensidad desde aproximadamente 3500 hasta 2100 cm^{-1} .

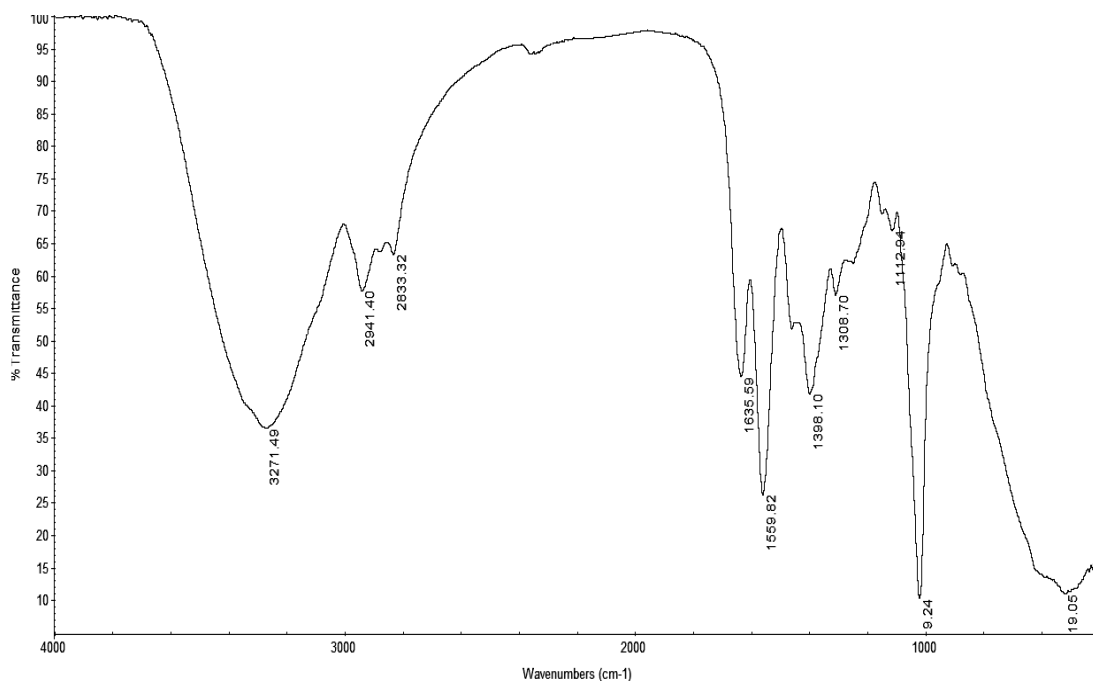


Figura 6.5. Espectro FT-IR del dendrímico **4**. Sobresalen las bandas correspondientes a la vibración NH y OH en 3371 cm^{-1} , las bandas vibracionales de CH_x en 2941 cm^{-1} y 2833 cm^{-1} y la del $\text{C}=\text{O}$ en 1635 cm^{-1} .

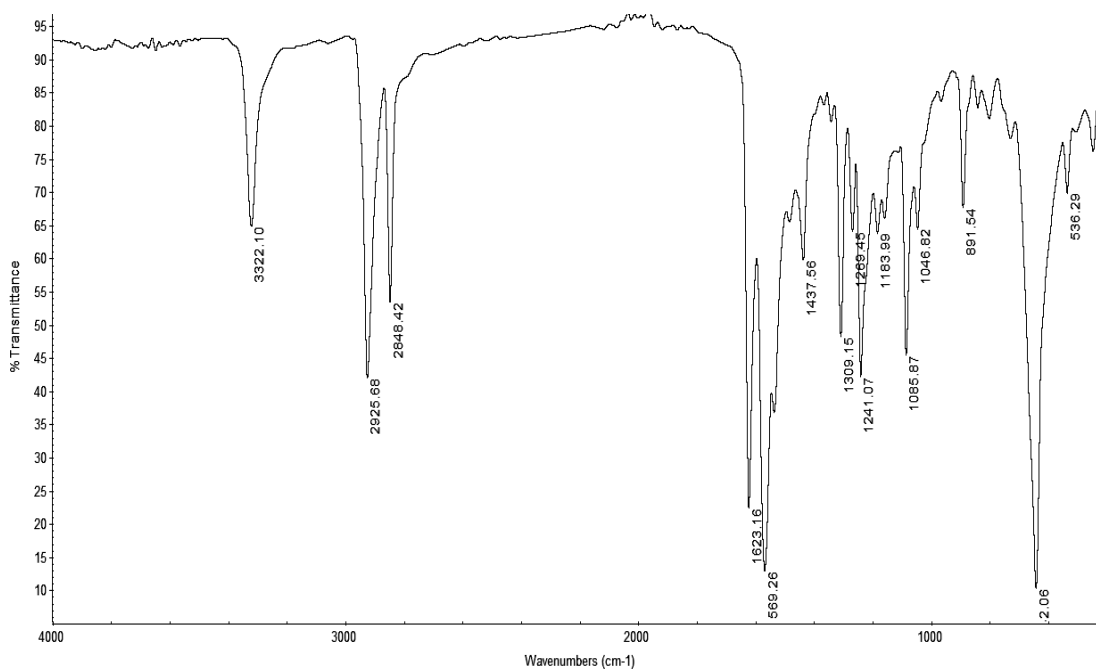


Figura 6.6. Espectro FT-IR de la **DCU**. Sobresalen las bandas correspondientes a la vibración NH en 3322 cm^{-1} , las bandas vibracionales de CH_x en 2925 cm^{-1} y 2848 cm^{-1} y la banda del C=O en 1623 cm^{-1} .

Los espectros correspondientes a las 4 fracciones se muestran en las figuras de 6.7 a la 6.10. Como puede apreciarse, el espectro correspondiente a **F1** muestra una banda de muy baja intensidad en 1729 cm^{-1} , que puede asociarse con la formación de los enlaces éster entre los grupos OH del dendrímero y las terminales COOH del MTX y/o AF. Además, se ve más fina la banda en 3268 cm^{-1} , presumiblemente por la presencia de las aminas y finalmente, otra característica que nos lleva a sugerir la formación de los conjugados es la banda ancha que inicia arriba de 2100 cm^{-1} propia tanto del MTX como del AF.

En el espectro de **F2** sobresale el incremento en la intensidad de las bandas en 2926.6 cm^{-1} y una banda fina en 3324.2 cm^{-1} , ambas asociables a la DCU, como puede verse por simple comparación, y también presenta la banda ancha características del MTX y AF.

En cuanto a **F3** y **F4**, presentan espectros muy similares, donde además de la banda ancha característica del MTX y AF, se observa un corrimiento de las bandas de los carbonilos a menores números de onda, para terminar en una sola banda ancha entre 1565 cm^{-1} y 1555 cm^{-1} .

En resumen, por los espectros de FT-IR, todas las fracciones son conjugados dendiméricos con al menos una entidad unida. Sin embargo, **F2** se descarta para un estudio más profundo y pruebas biológicas *in vitro* por la presencia de DCU.

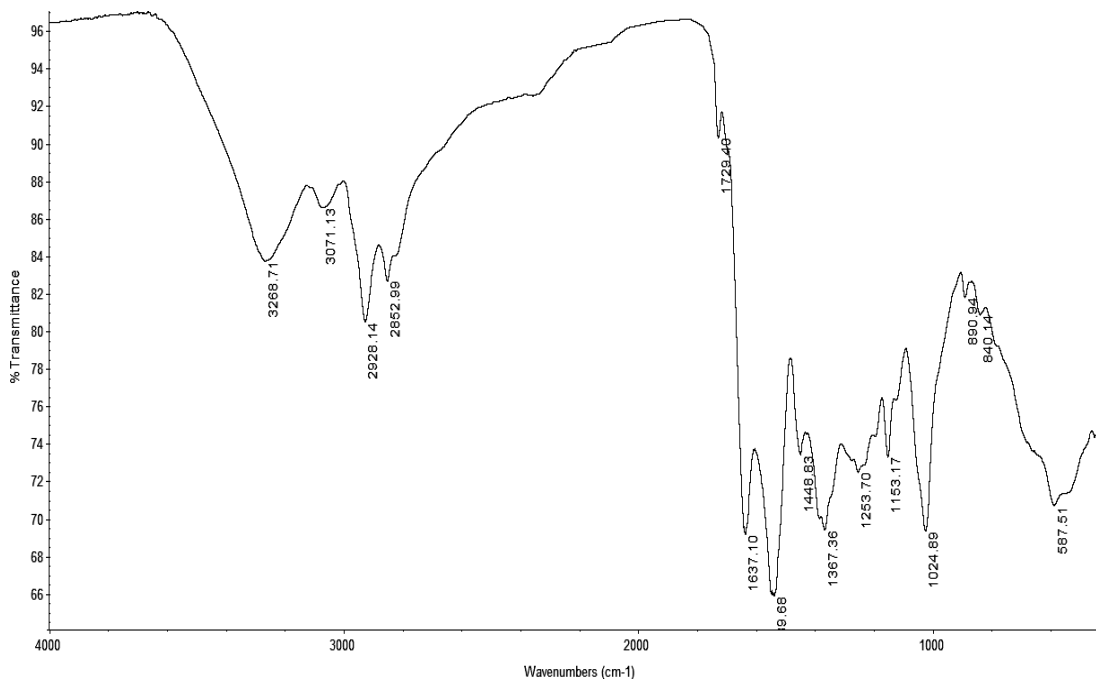


Figura 6.7. Espectro FT-IR de **F1**. Sobresale la pequeña señal en 1729 cm^{-1} asociable a un enlace éster y la banda ancha que va de 3500 hasta 2100 cm^{-1} como en el MTX y el AF.

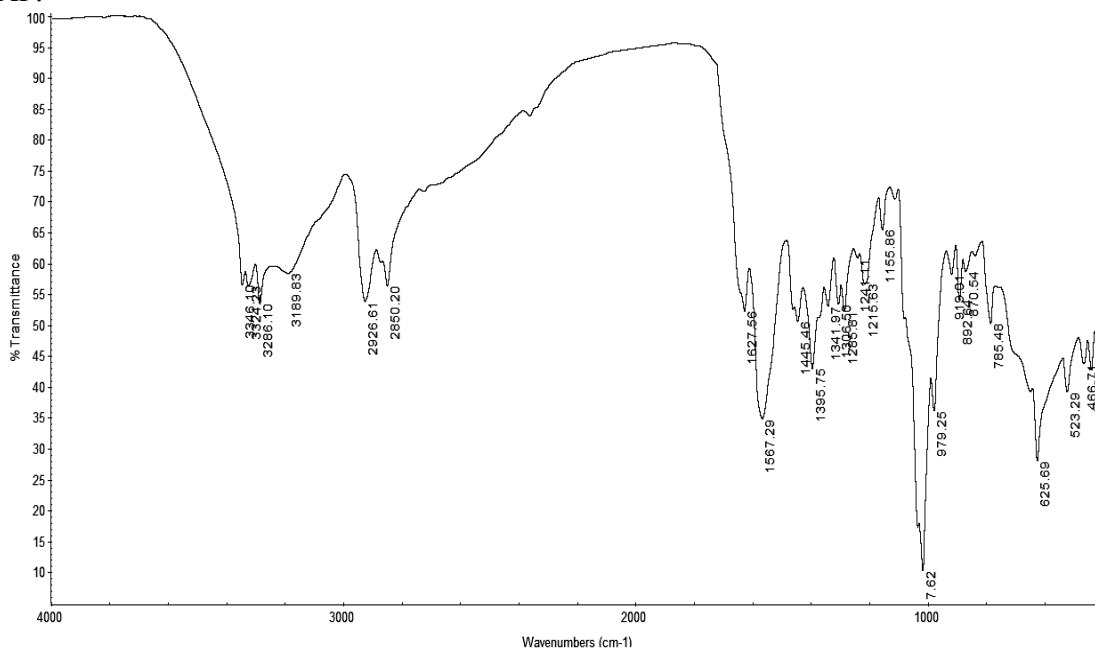


Figura 6.8. Espectro FT-IR de **F2**. Sobresale el incremento en la intensidad de las bandas en 2926 cm^{-1} y una banda fina en 3324 cm^{-1} ambas asociables a la DCU, aunque también presenta características del MTX y AF.

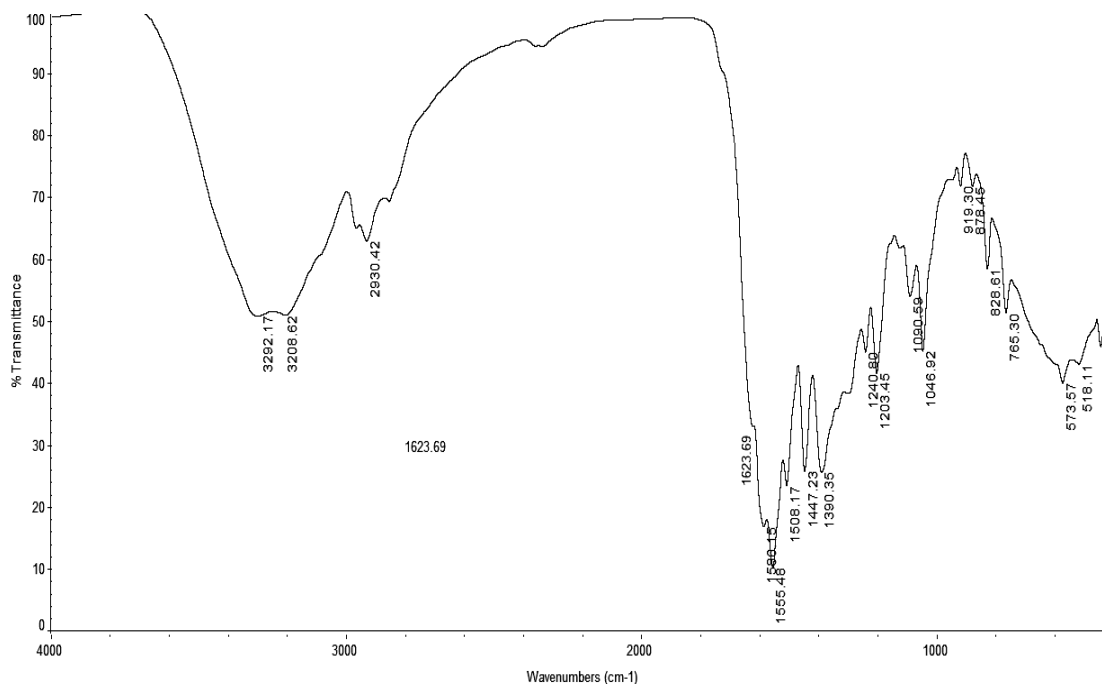


Figura 6.9. Espectro FT-IR de **F3**. Sobresale el parecido con el espectro del dendrímoro, sin embargo, las señales de carbonilos originalmente en 1635 cm^{-1} se desplazan a menores número de onda dando lugar a y un solapamiento de bandas en 1555 cm^{-1} .

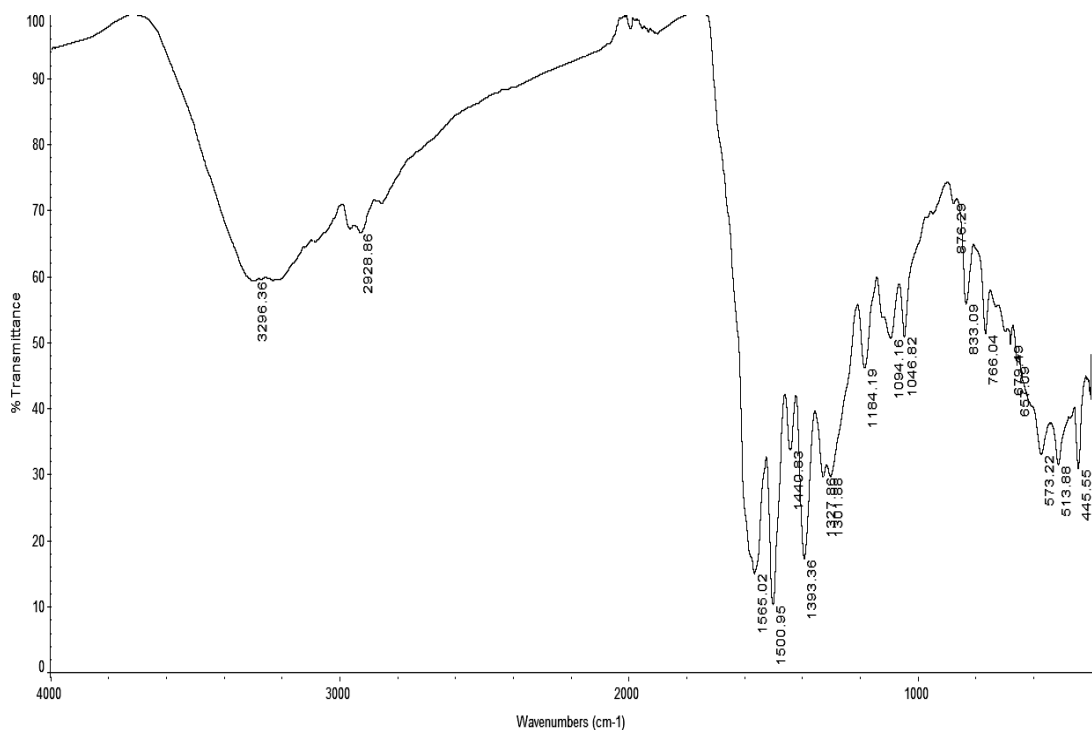


Figura 6.10. Espectro FT-IR de **F4**. Sobresale el parecido con el espectro del dendrímoro, sin embargo, las señales de carbonilos originalmente en 1635 cm^{-1} se desplazan a menores número de onda dando lugar a y una sola banda ancha en 1565 cm^{-1} .

RMN

Por lo antes mencionado, sólo las fracciones 1, 3 y 4 fueron estudiadas por RMN. Los espectros de RMN obtenidos muestran que existe la unión covalente del MTX y del AF al PAMAM.

Del espectro de **F1** (figura 6.11), puede verse que aún cuando por IR no fue posible detectar la DCU, aquí se logra ver con claridad por las señales múltiples entre 1 y 2 ppm. Además por la baja intensidad de las señales en la región de los aromáticos, se puede decir que la concentración del MTX y AF es muy baja, sin embargo, ésta se determinará más adelante por UV-Vis.

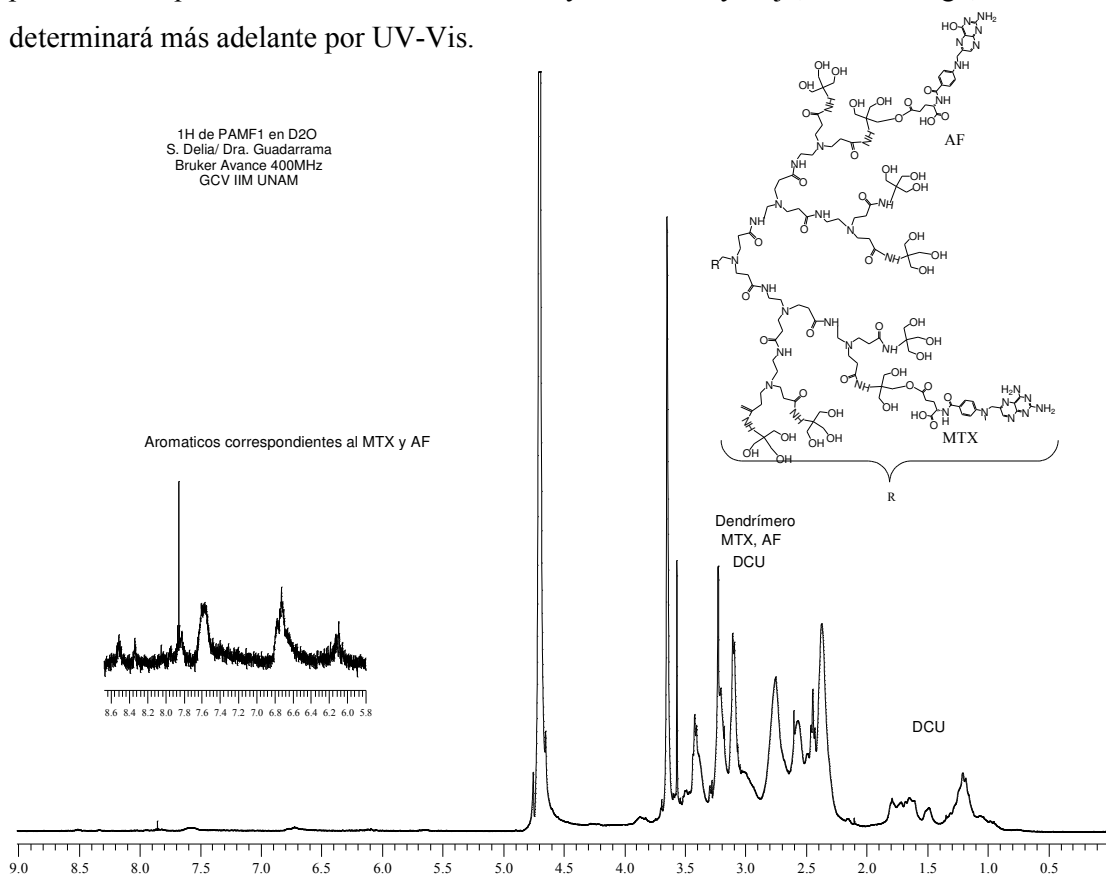


Figura 6.11. Espectro RMN ^1H de **F1** en D_2O

El espectro de ^1H RMN de **F3** (figura 6.12), muestra que esa fracción solo contiene moléculas de MTX por la señales entre 6.5 y 8.5 ppm, y a nivel de ruido puede apreciarse la presencia de AF, en una proporción despreciable. Esto se corroborará por el espectro de UV-Vis mostrado más adelante.

En el espectro correspondiente a **F4** (figura 6.13) se puede ver que esta fracción contiene tanto moléculas de AF como de MTX, diferenciadas por las señales

correspondientes a los aromáticos, siendo la señal doble en 6.64 ppm asignado a dos de los hidrógenos del anillo fenílico, mientras que la señal doble en 6.75 ppm se asigna a los equivalentes en el MTX. De acuerdo a estas señales perfectamente separadas, se puede ver que la relación entre moléculas AF:MTX es prácticamente de 5:1.

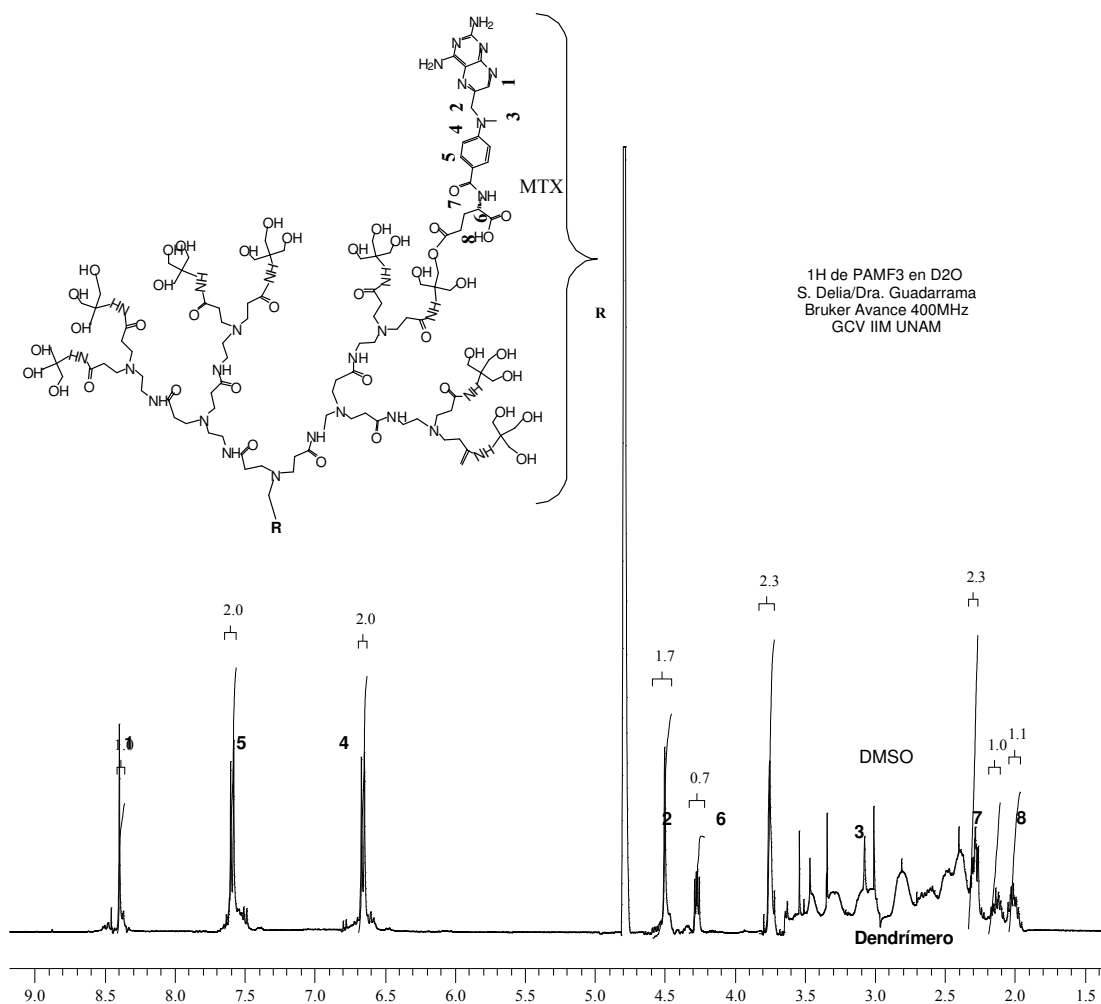


Figura 6.12. Espectro RMN ^1H de F3 en D_2O

En resumen, la resonancia magnética nuclear de hidrógeno nos permitió determinar que las tres fracciones analizadas son conjugados dendriméricos, pero existen diferencias entre ellas. En el caso de **F1**, con baja concentración de MTX y/o AF, se pudo determinar que también contiene DCU; debido a ello, y a la poca cantidad de muestra, se decidió no evaluar esta fracción en pruebas biológicas *in vitro*. Por otro lado, las fracciones mayoritarias **F3** y **F4** tienen una gran diferencia que será de interés en el comportamiento en los ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento celular, ya que **F3**

contiene únicamente MTX y la **F4** tanto al MTX como al AF en una proporción 5:1 (AF:MTX).

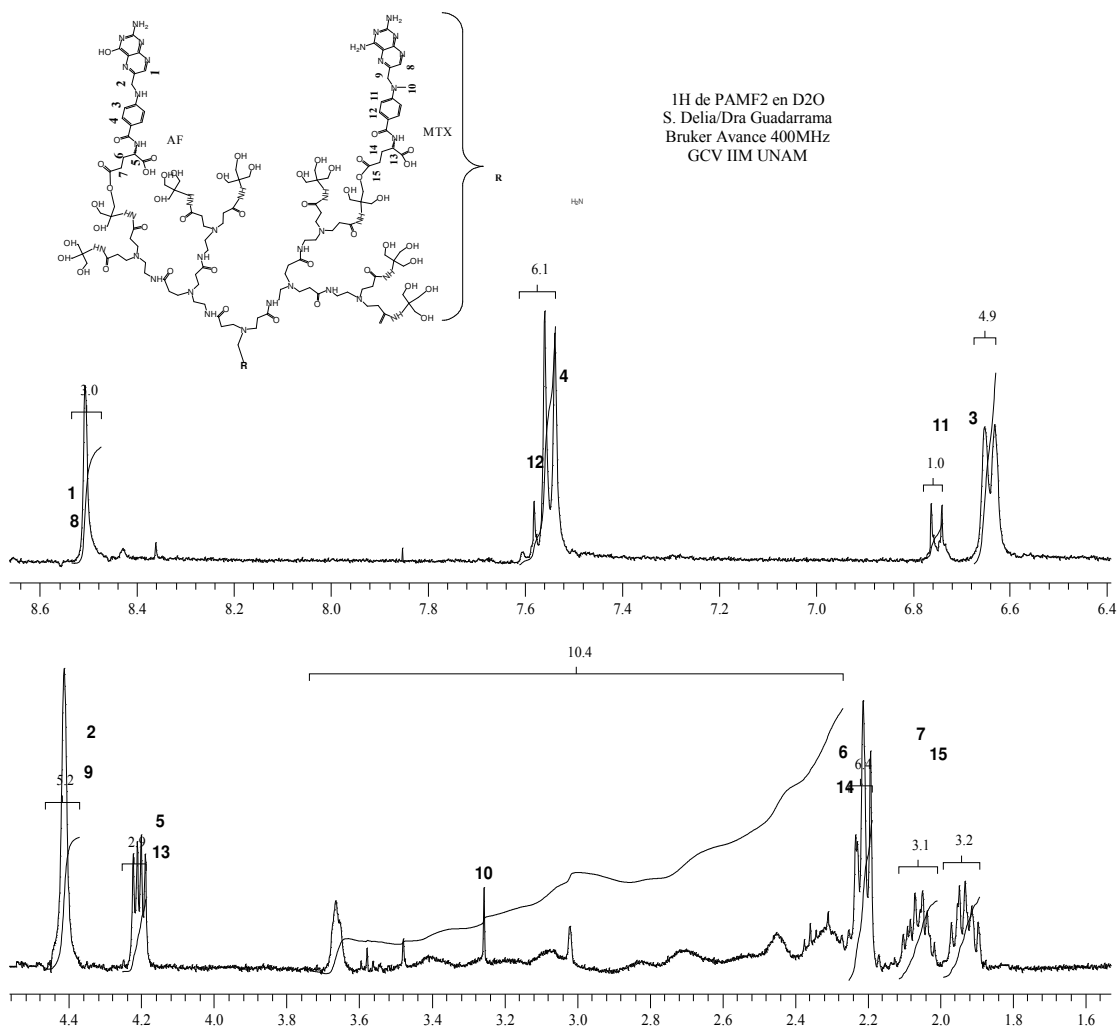


Figura 6.13. Espectro de RMN ^1H de F4 en D_2O

UV-Vis.

Para cuantificar las concentraciones de AF y MTX en cada una de las fracciones, se hizo uso de la espectroscopia UV-Vis. Las cantidades, diluciones y absorbancias medidas a $\lambda_1=282$ nm y $\lambda_1=300$ nm se encuentran en la sección experimental (tabla 4.1). De los espectros de UV-Vis para cada fracción (figura 6.14), se puede ver que todas corresponden a conjugados dendriméricos y el AF predomina sobre el MTX en todas las fracciones, salvo en la fracción 3 donde se ve que solo contiene MTX, corroborando lo

determinado previamente con la resonancia de ^1H . Para una mejor claridad, se muestra en la figura 6.15 los espectros de **F3** y del MTX, ambos en PBS..

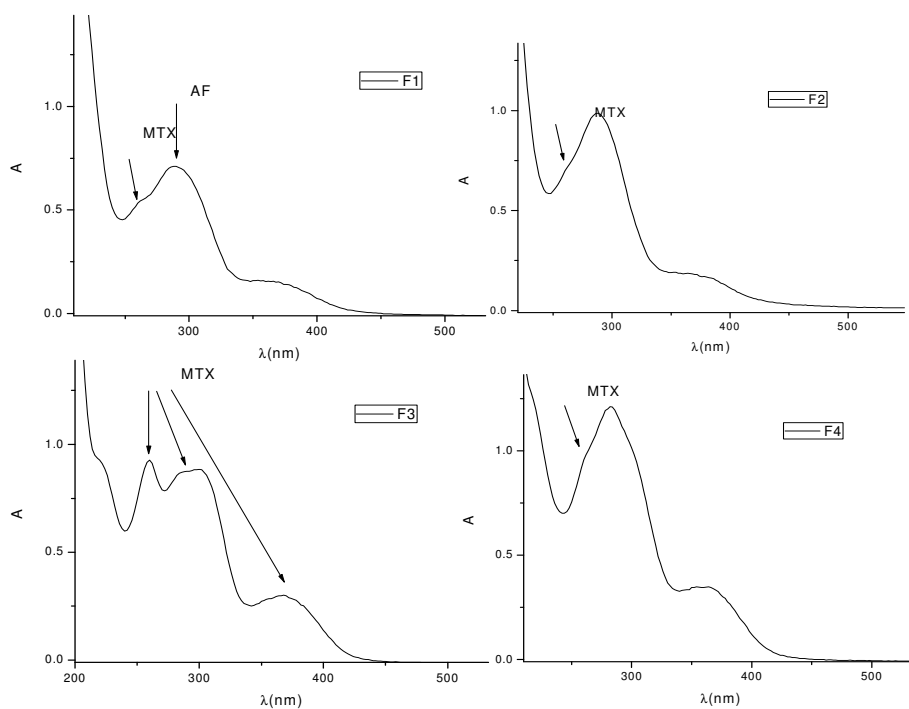


Figura 6.14. Espectros UV-Vis de las fracciones 1 a 4 disueltas en PBS

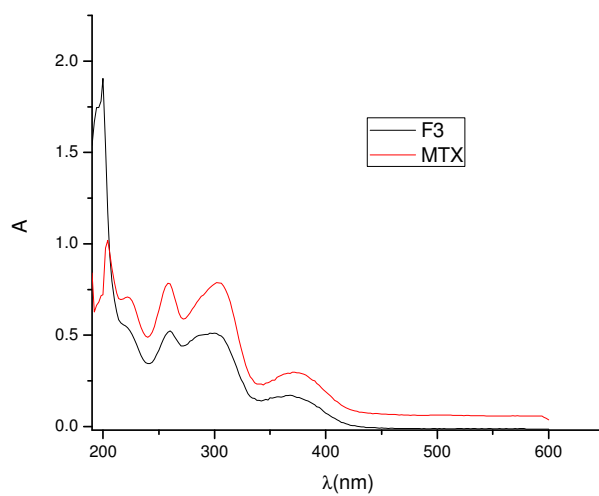


Figura 6.15. Espectros UV-Vis comparativos de **F3** y MTX en PBS

Para aplicar la ley de Lambert-Beer, que es aditiva para mezclas, es necesario en primer lugar corroborar que a las longitudes de onda seleccionadas ambos analitos cumplan la ley, lo cual se demuestra con la linealidad, al graficar A vs C (absorbancia vs concentración) a una longitud particular, como se aprecia en las figuras 6.16 y 6.17 para el AF y el MTX respectivamente, a dos longitudes de onda ($\lambda=282$ nm y $\lambda=300$ nm). Además, las pendientes de esas curvas corresponden a los ϵ (coeficiente de absortividad molar) para cada componente a la λ específica.

La definición de la ley de Lambert-Beer a una λ (longitud de onda) dada se escribe de acuerdo a la ecuación 1 y para una mezcla binaria se escribe de acuerdo a la ecuación 2. Sustituyendo 1 en 2 y escribiendo las ecuaciones a dos longitudes de onda diferentes, se tiene un sistema de dos ecuaciones (3 y 4) con dos incógnitas que puede ser fácilmente resuelto para determinar las concentraciones de AF y MTX en cada una de las fracciones, excepto para **F3**, para la cual se usó directamente la curva de calibración del MTX, figura 6.18 y usando la ley de las diluciones (ecuación 5) se determina la concentración en la solución original.

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} l C$$

Ec. 1 Ley de Lambert-Beer en términos de ϵ , l y C

$$A_{\lambda}^M = A_{\lambda}^{MTX} + A_{\lambda}^{AF}$$

Ec. 2 Ley de Lambert-Beer para la mezcla binaria, donde A_{λ}^M = Absorbancia medida para la mezcla a λ .

$$A_{282}^M = \epsilon_{282}^{MTX} l C^{MTX} + \epsilon_{282}^{AF} l C^{AF}$$

Ec. 3 Ley de Lambert-Beer para una mezcla a $\lambda=282$ nm, donde ϵ_{282}^{MTX} es coeficiente de absortividad molar para el MTX a 282nm y ϵ_{282}^{AF} para el AF.

$$A_{300}^M = \epsilon_{300}^{MTX} l C^{MTX} + \epsilon_{300}^{AF} l C^{AF}$$

Ec. 4 Ley de Lambert-Beer para una mezcla a $\lambda=300$ nm

$$C^0 \cdot V^0 = C^1 \cdot V^1$$

Eq. 5 Ley de las diluciones

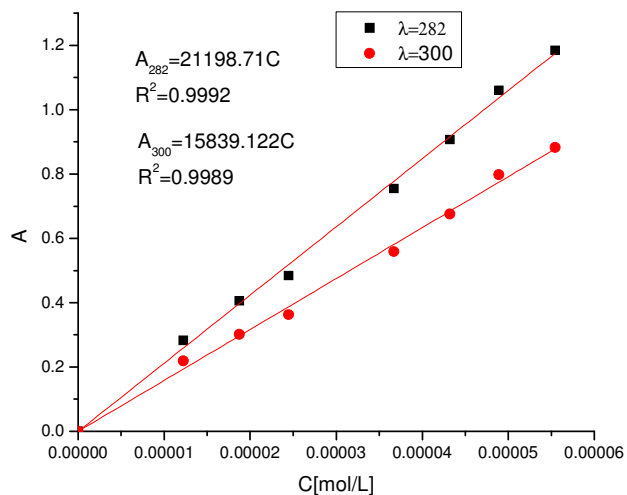


Figura 6.16. Curvas de calibración del AF a diferentes longitudes de onda, donde se observa que la ley de Lambert-Beer se cumple. $\epsilon_{282}^{AF} = 21198.70 \text{ Mcm}^{-1}$ y

$$\epsilon_{300}^{AF} = 15839.12 \text{ Mcm}^{-1}$$

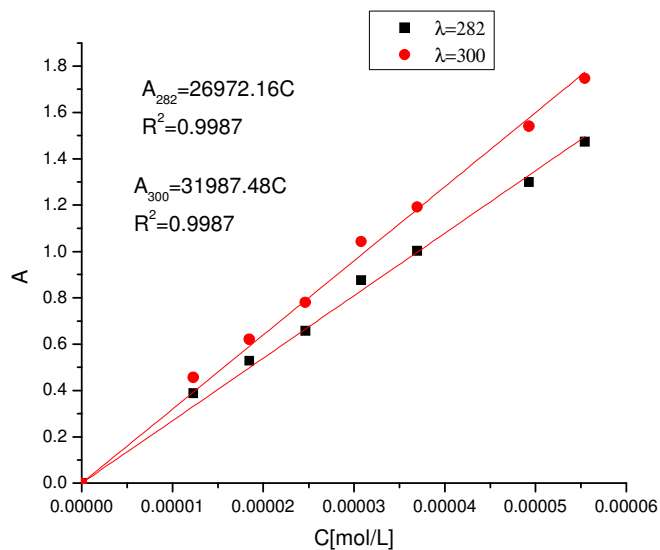


Figura 6.17. Curvas de calibración del MTX a dos longitudes de onda, donde se observa que la ley de Lambert-Beer se cumple. $\epsilon_{282}^{MTX} = 26972.16 \text{ Mcm}^{-1}$ y $\epsilon_{300}^{MTX} = 31987.48$

$$\text{Mcm}^{-1}$$

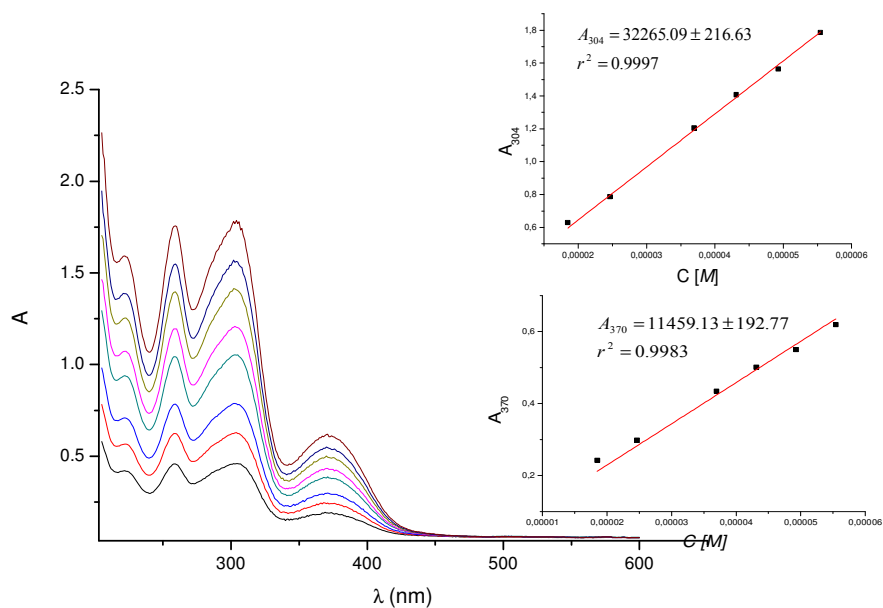


Figura 6.18. Espectros de absorción del MTX en PBS pH 7.4 y curva de calibración a 304 y 370 nm en un rango de concentraciones de 1.8×10^{-5} a 5.5×10^{-5} M

Con los valores de absorbancia correspondientes de la tabla 4.1 (ver sección experimental), y los valores de ϵ adecuados, se determinan las concentraciones de AF y MTX para cada fracción. Los resultados se muestran en la tabla 6.2, donde se puede ver que las fracciones **F1** y **F2** contienen una baja concentración de analitos, mientras que en las fracciones **F3** y **F4** la concentración es un orden de magnitud mayor. Además, existe una gran diferencia entre **F3** y **F4**, puesto que **F3** solo contiene MTX y **F4** contiene AF y MTX en una proporción 5:1, corroborando lo observado por RMN.

Recapitulando, los espectros de UV-Vis son una vía rápida para determinar qué especies están presentes en el conjugado y al ser una técnica cuantitativa nos permitió calcular las concentraciones de MTX y AF presentes en cada fracción.

Tabla 6.2. Concentraciones de AF y MTX en cada fracción					
	Alicuota (mL) aforada a 5 mL	$C^{AF} \times 10^4 M$	$C^{MTX} \times 10^4 M$	$C^{AF} \times 10^8 M/mg$ de conjugado	$C^{MTX} \times 10^8 M/mg$ de conjugado
F1 (2.9 mg)	1.6	0.5098	0.3953	8.790	6.816
	3	0.3518	0.3161	6.066	5.450
	original	0.3549	0.3727	6.119	6.426
	promedio	0.3633	0.3444	6.264	5.938
F2 (3.2 mg)	original	0.2919	0.1265	4.561	1.977
F3 (1.8 mg)	0.5	---	1.5744	---	43.735
	0.7	---	1.4766	---	41.017
	1	---	1.3668	---	37.967
	promedio	---	1.1473	---	40.906
F4 (0.9 mg)	0.7	2.4485	0.4802	136.028	26.678
	1	2.2641	0.4655	125.783	25.861
	2	2.2827	0.4555	126.817	25.306
	promedio	2.3317	0.4671	129.539	25.950

6.2.1.1 Evaluación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular de los conjugados dendriméricos con MTX

Una vez caracterizados los conjugados dendriméricos, y con el objetivo de determinar si la actividad citotóxica del MTX se mantiene, se hicieron pruebas biológicas para determinar el porcentaje de inhibición en el crecimiento celular en diferentes líneas celulares cancerígenas y en una línea de linfocitos humanos, bajo el protocolo descrito en la sección experimental. Los resultados, mostrados en la tabla 6.3, ponen de manifiesto que los conjugados dendriméricos no sólo mantienen, sino que aumentan la actividad del MTX, salvo en la línea celular de cáncer de próstata PC-3. Nuevamente, los resultados que llaman la atención son los obtenidos para los linfocitos humanos, hacia los cuales el porcentaje de inhibición decrece drásticamente; más del 80% con **F3** que contiene prácticamente solo MTX y **F4**, que es la que contiene mayor cantidad de AF, promueve el crecimiento de esta línea celular. Si bien los resultados no son

extrapolables a pruebas *in vivo*, con base en estos resultados se podría pensar que una vez formado el conjugado dendrimérico, con o sin AF, existirá una discriminación hacia las células sanas.

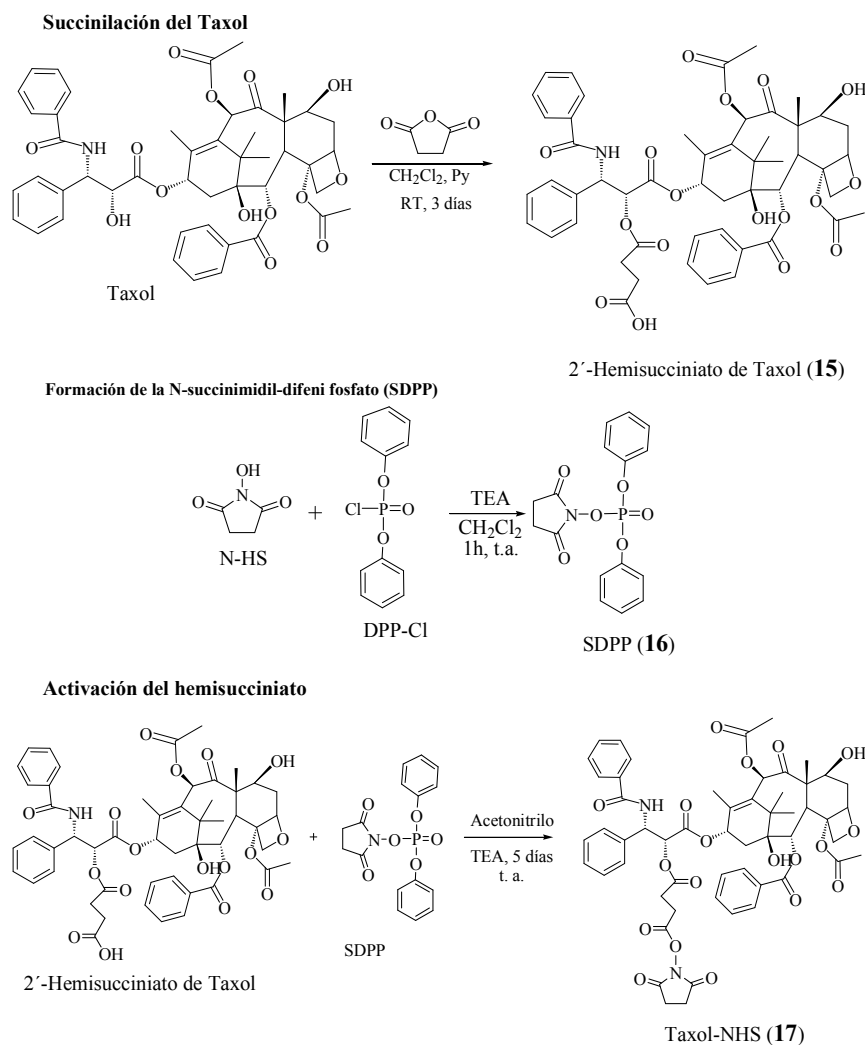
Tabla 6.3. % de inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas cancerígenas y linfocitos humanos (MT2) a 50 μ M \pm el error estándar							
Muestra	MT-2	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
4	+12.7\pm5.7	+6.7\pm7.7	+26.5\pm2.9	+3.1\pm0.8	26.9 \pm 7.2	+18.9\pm8.5	22.0 \pm 8.6
MTX	86.34	61.8 \pm 3.3	27.9 \pm 5.6	44.0 \pm 4.1	55.1 \pm 2.4	50.6 \pm 2.9	54.1 \pm 1.9
F3	16.47\pm5.1	87.7 \pm 6.0	18.4 \pm 1.1	47.0 \pm 4.2	94.4 \pm 6.5	89.5 \pm 10.6	67.2 \pm 7.6
F4	+3.5\pm3.8	88.8 \pm 1.7	7.1 \pm 0.1	41.7 \pm 5.4	96.1 \pm 1.8	87.9 \pm 5.5	64.7 \pm 3.8

Concentración de MTX en todas las pruebas 50 μ M en agua excepto el MTX que se solubilizo en DMSO. U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K562= leucemia, HCT-15= colon, MCF-7= mama, SKLU= pulmón. SA=sin actividad. *Este resultado es preliminar y se esta repitiendo debió ala sospecha de contaminación de la línea celular.

6.2.2 Estudio con Taxol

Como se menciona anteriormente, el taxol al igual que el MTX es un fármaco de gran actividad anticancerígena, sin embargo, su aplicación se ve mermada por la insolubilidad en medios acuosos y se recurre a poner aditivos en su fórmula, los cuales resultan ser altamente tóxicos como el aceite de castor. En este apartado se presentan los resultados de la formación del conjugado dendrímero 4-taxol, con base en los trabajos de Luo y colaboradores¹⁰² y Majoros y col.¹⁰³, quienes publicaron la funcionalización del taxol de forma que nos permite unirlo covalentemente a la superficie de algún dendrímero. La funcionalización del taxol consta de dos pasos: 1) formación del 2'-hemisuccinato de taxol (**15**) y 2) formación del taxol N-hidroxisuccinimidil éster (taxol-NHS, **17**), para el cual es necesaria la formación previa del N-succinimidil difenil fosfato (SDPP, **16**). Las condiciones de reacción fueron las reportadas por los autores antes mencionados y se encuentran en la sección experimental.

La funcionalización del taxol se llevó acabo siguiendo la ruta de síntesis mostrada en el esquema 6.1.



Esquema 6.1. Ruta de síntesis para la obtención del taxol activado vía NHS.

La formación del 2'-hemisuccinato de taxol se corrobora mediante RMN ^1H , por el desplazamiento que sufren las señales de diferentes protones. Los portones 10 y 11 del taxol, ambas se mueven a menores campos, la señal del H_{10} se mueve de 5.65 ppm a 5.85 ppm y la del H_{11} se mueve de 4.75 ppm a 5.49 ppm debido al nuevo ambiente químico, y obviamente a la aparición de las señales triples correspondientes al succínico en 2.65 ppm y 2.75 ppm, como se aprecia por comparación de los espectros entre el del taxol (fig. 6.19) y del hemisuccinato (figura 6.20). Sin embargo, para tener la seguridad que solo un alcohol se había esterificado, se hizo un espectro de masas por FAB+, donde se corrobora por el pico más alto con un valor de $m/z=954$ (valor teórico) que sólo una molécula de anhídrido succínico se esterificó con el taxol (figura 6.21)

Instituto de Química UNAM RG
 SEC. TEC. - Dra. P. Guadarrama
 Clave: R-tax
 No registro STA-862
 Experimento: 1H
 CD3OD
 Bruker-Avance (F) 300 MHz
 20-08-2010

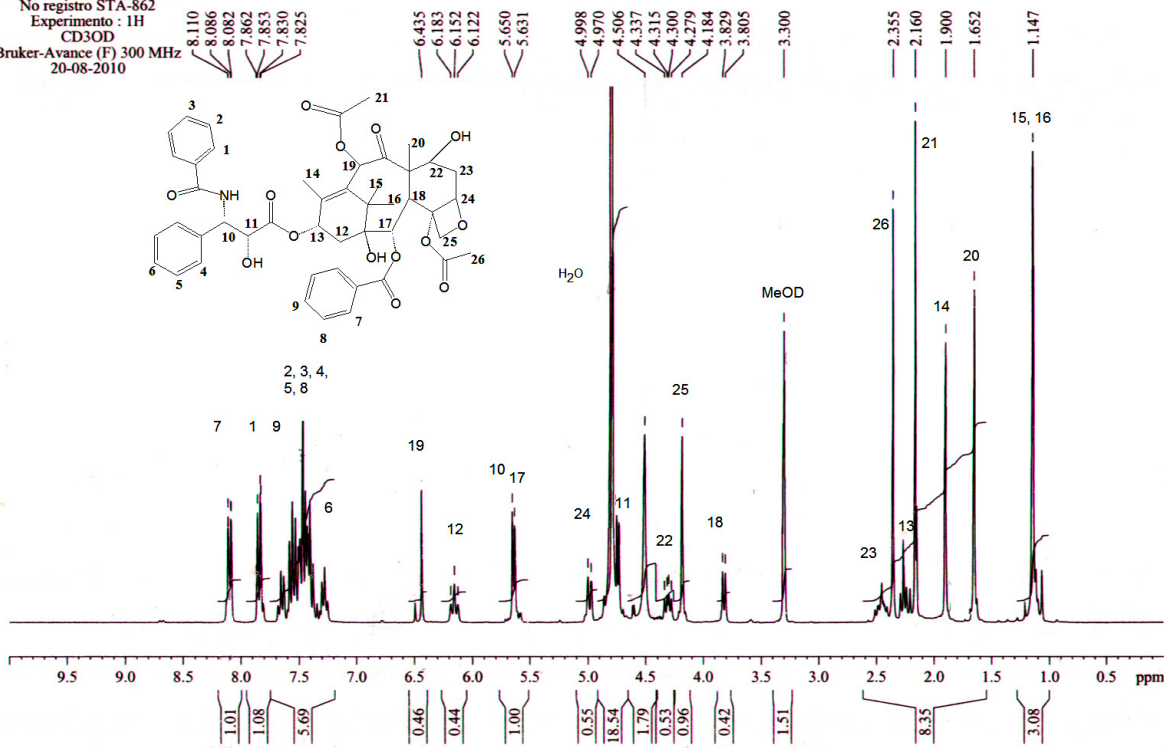


Figura 6.19. Espectro RMN ¹H del taxol, adquirido con Aldrich

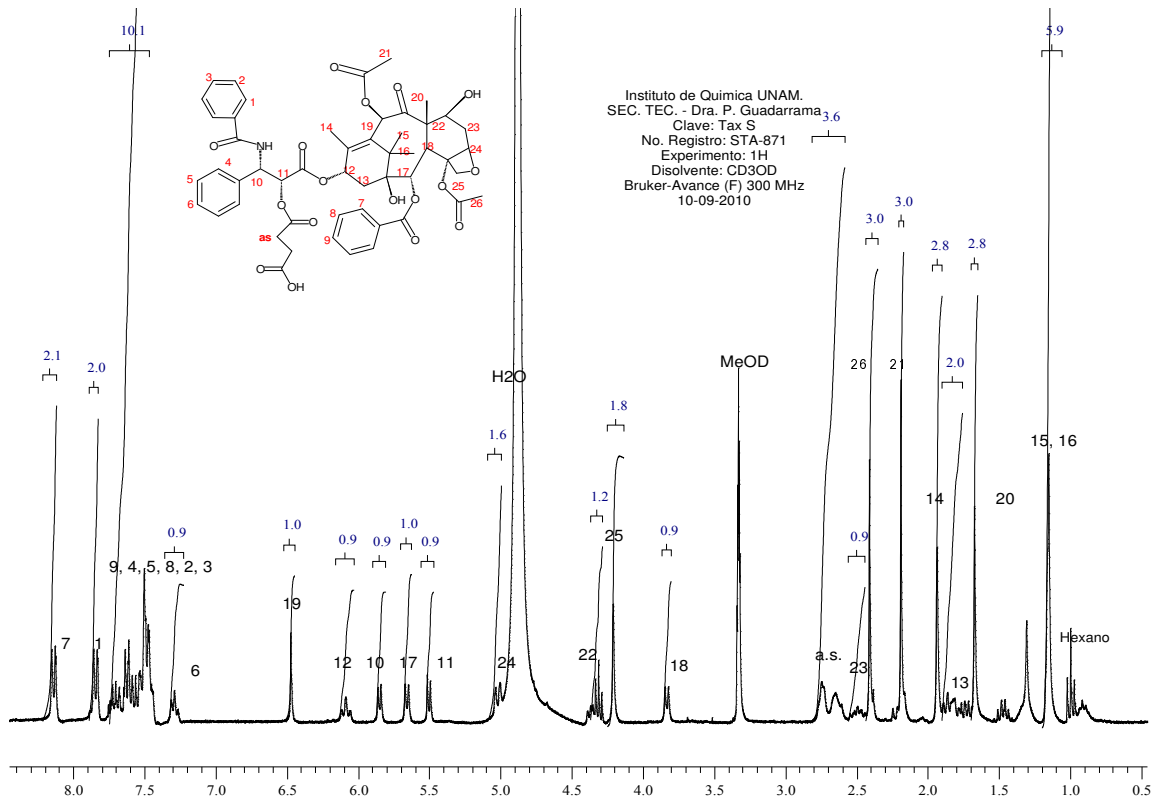


Figura 6.20. Espectro RMN ¹H del 2'-hemisuccinato de taxol

[Mass Spectrum]
 Date : 03-Dec-2010 12:45
 Sample: 90-STA-926 TaxS2 Jeol-SX-102A
 Note : Luis-Velasco
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 1.24 min Scan# : (3,7)
 BP : m/z 154.0000 Int. : 735.65
 Output m/z range : 0.0000 to 999.8516 Cut Level : 0.00 %

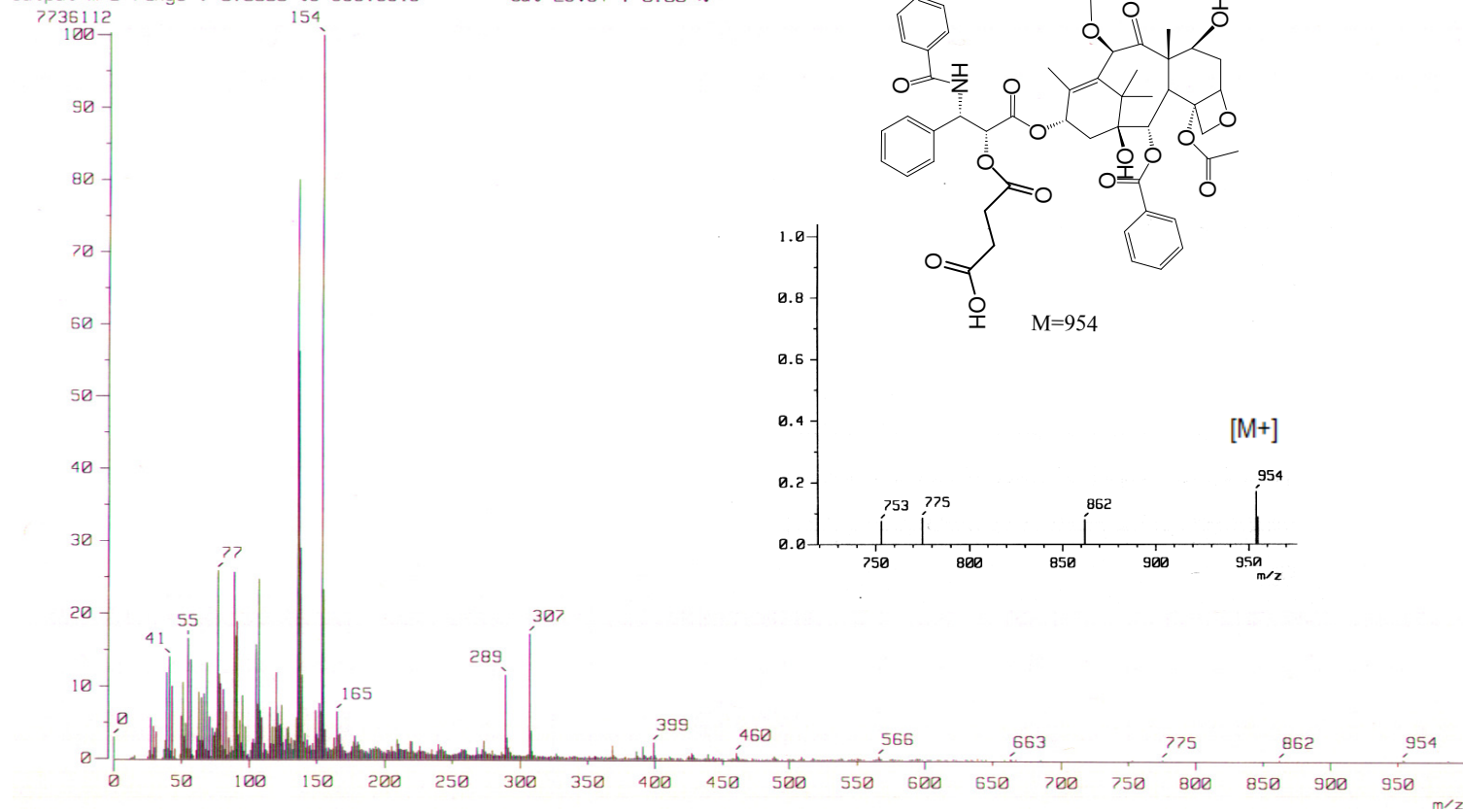


Figura 6.21. Espectro de FAB+ del 2'-hemisuccinato de taxol

Para realizar la activación de la terminal ácida del succínico, se formó el N-Succinimidil Difenil Fosfato (SDPP),⁸⁹ bajo las condiciones establecidas, cabe mencionar que este compuesto es altamente sensible a la humedad y en solo cuestión de horas puede tomar una coloración rosa, que es indicativo de su descomposición, por lo que no se garantiza su eficiencia días después de haberse sintetizado. Una vez obtenido el SDPP, se hace reaccionar con el 2'-hemisuccinato de taxol en acetonitrilo y trietilamina por 5 días, el producto (compuesto **17**) se caracterizó por RMN de ¹H, donde se ve la formación del taxol-N-hidroxisuccinimidil éster por que nuevamente la señal del H₁₁ se desplaza, esta vez a campos altos (de 5.49 ppm a 4.31 ppm), y los tripletes asociados al succínico también se desplazan, formando una señal múltiple en 2.88 ppm y finalmente por la señal simple en 2.73 ppm correspondiente al anillo de la NHS. El espectro se muestra en la figura 6.22.

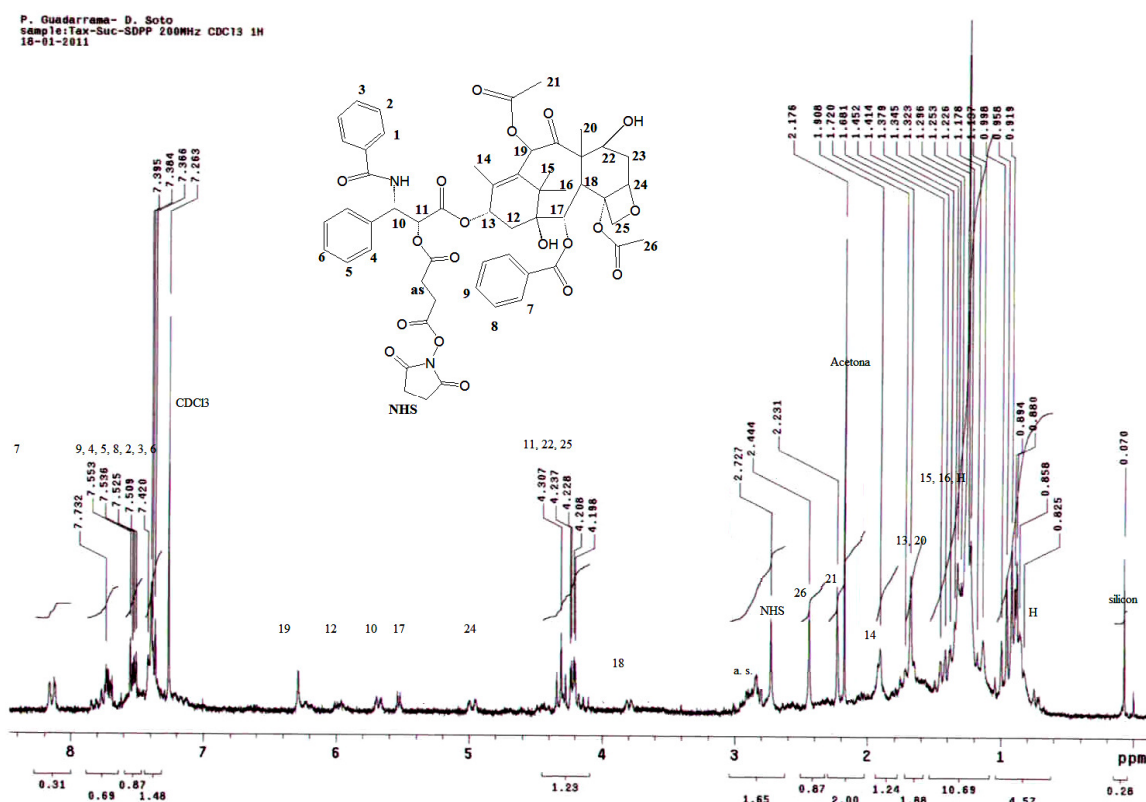
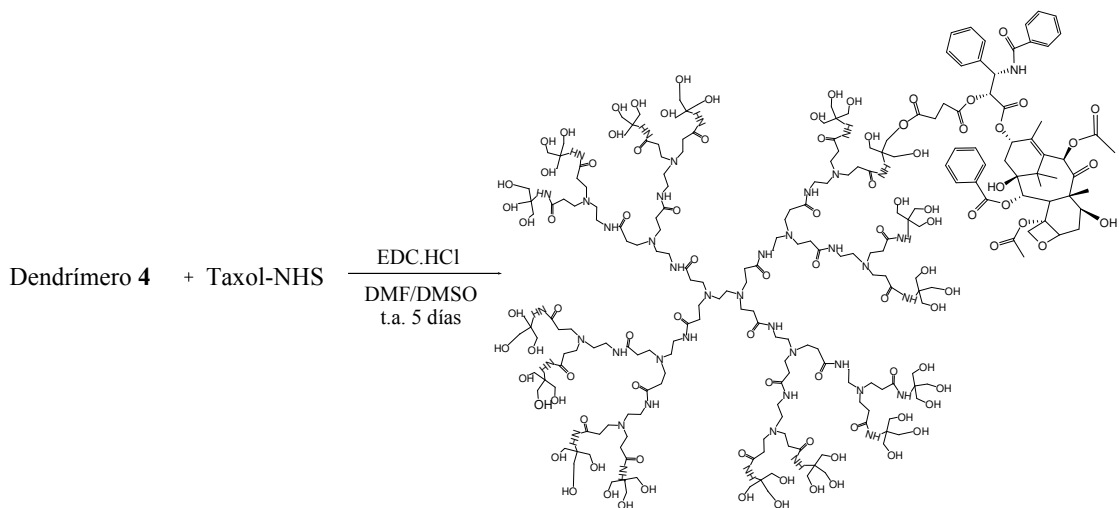


Figura 6.22. Espectro ¹H RMN del taxol N-hidroxisuccinimidil éster

Finalmente, una vez obtenido el taxol-N-hidroxisuccinimidil éster (**17**), la reacción de acoplamiento al dendrímero se realizó bajo las condiciones descritas por Majoros y

col.¹⁰³, para el anclaje de MTX con algunas modificaciones. En el esquema 6.2 se muestra la ruta de síntesis.



Esquema 6.2. Acoplamiento del taxol al dendrímero 4 vía enlace éster

Esta reacción se lleva a cabo en una mezcla de disolventes anhidros (DMF:DMSO) por la casi nula solubilidad del taxol en casi cualquier disolvente. La formación del enlace éster es mediada por el agente acoplante EDC-HCl y procede durante 5 días a temperatura ambiente, posteriormente el disolvente se evapora a presión reducida y el material viscoso obtenido se redisuelve en 1 mL de metanol y 5 gotas de agua, se filtra con filtro de jeringa de 200 nm (NALGENE) y se inyecta a una columna de Sephadex-LH20 que se eluye con MeOH. De la columna se separan dos fracciones etiquetadas como D4-Tax1 y D4-Tax2, de la primera se obtuvieron 12 mg y 32mg de la segunda. Ambas fracciones se caracterizaron por RMN ¹H en agua, primer indicio de la conjugación del taxol con el dendrímero 4, los espectros se muestran en las figuras 6.23 y 6.24. En la región de los protones aromáticos y alrededor de 1.15 ppm se observan las señales correspondientes al taxol, para ambas fracciones, por lo que se puede decir que la formación del conjugado se llevó a cabo. Sin embargo, la baja intensidad de estas señales no es posible cuantificarlo, además de que existe un traslape total con las señales del dendrímero. La diferencia entre ambas fracciones es la concentración de taxol; se observa (por un estimado de proporciones) que la segunda fracción contiene taxol en mucho menor proporción que la fracción 1. Si bien se logró formar el conjugado dendrimérico con el taxol, no fue posible cuantificar su concentración, lo que nos impidió realizar pruebas de citotoxicidad *in vitro* y en bajo estas condiciones solo es

posible decir que el dendrímero de PAMAM G2.5 con TRIS como grupo terminal tiene la capacidad de formar conjugados dendriméricos con el taxol, tomando como prueba la solubilidad de éste en el agua deuterada en que fue preparada la muestra de resonancia.

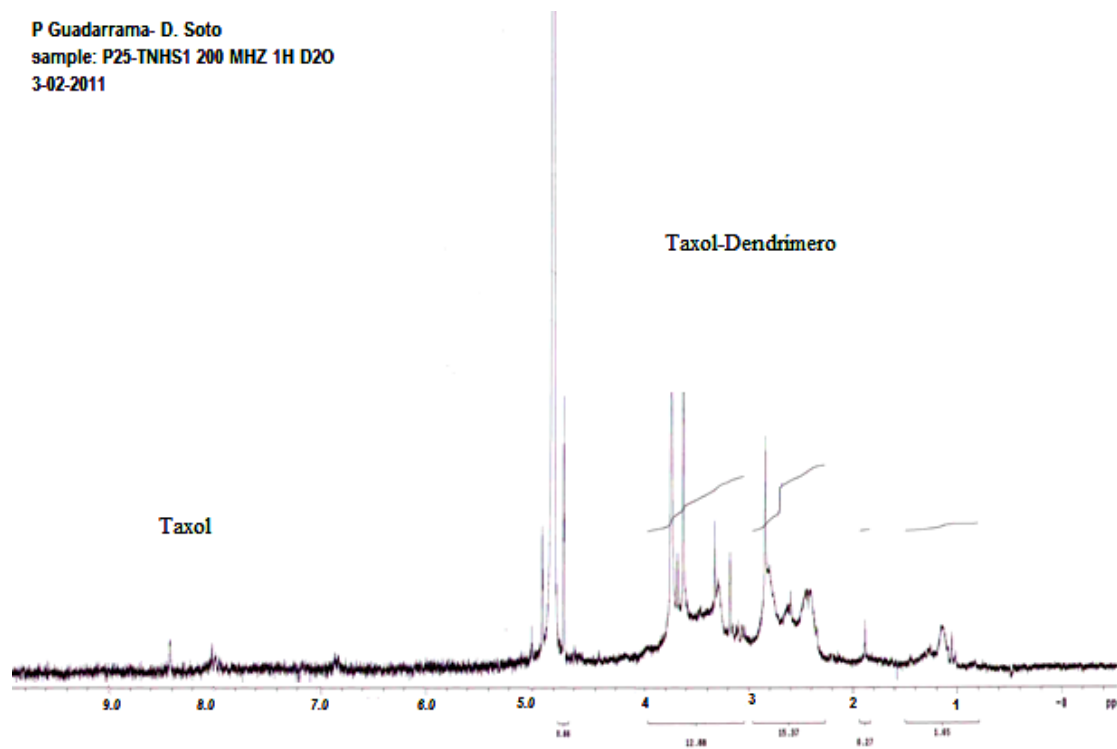


Figura 6.23. Espectro RMN ^1H de D4-Tax1

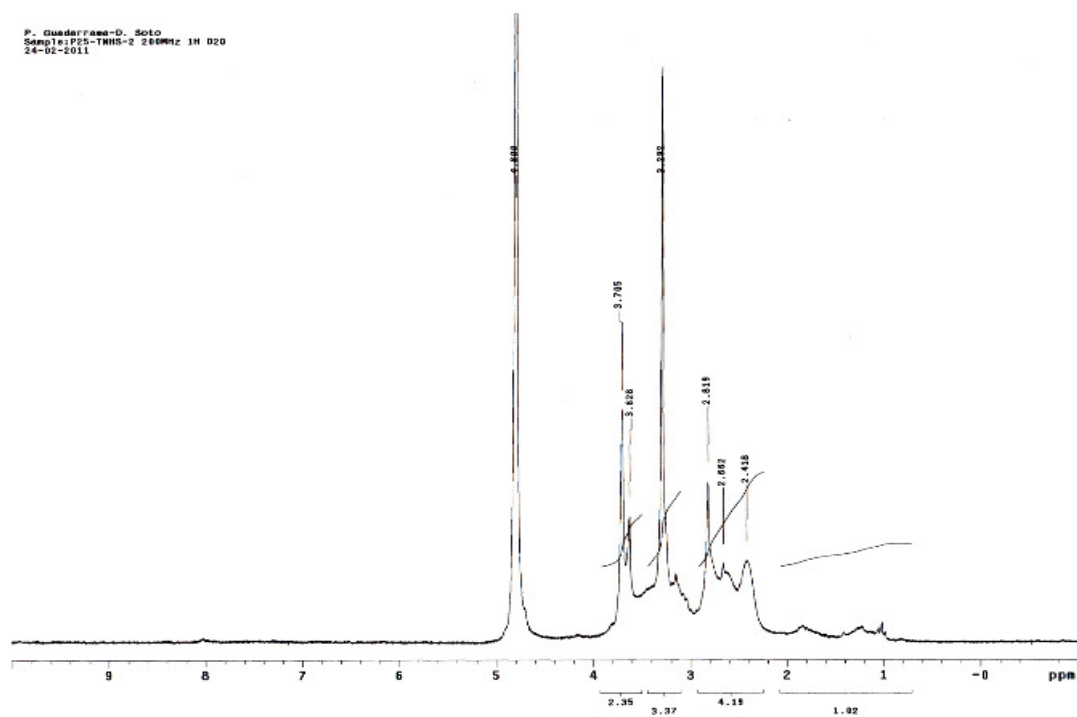


Figura 6.24. Espectro RMN ^1H de D4-Tax2.

6.3 Dendrímeros como potenciadores de la solubilidad

6.3.1. Estudio con MTX

El MTX como se describe en los antecedentes, es un fármaco ampliamente usado en terapia contra el cáncer, aunque es prácticamente insoluble en agua a pH neutro, su solubilidad cambia en función del pH, a pH ácido decrece mientras que a pH básico aumenta¹⁰⁴. Por los grupos funcionales presentes en su estructura, el MTX puede interaccionar adecuadamente con las estructuras dendriméricas a base de amino-éster sintetizadas, como se observa en las figuras 6.25 y 6.26 obtenidas mediante una búsqueda conformacional en medio acuoso con el programa Macromodel. En las figuras 6.25 a) y 6.26 a) se puede ver que efectivamente pueden existir interacciones intermoleculares tipo puente de hidrógeno e interacciones electrostáticas que favorecen la interacción Dendrímero-MTX y las b) muestran el balance hidrofóbico-hidrofílico con lo que se puede presuponer que los complejos formados seguirán siendo solubles en medios acuosos, dada la superficie mayoritariamente hidrofílica (superficie mostrada en azul).

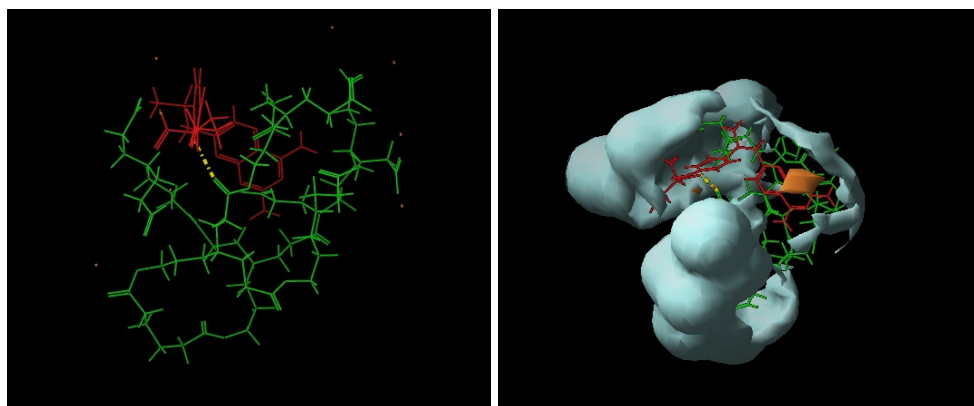


Figura 6.25. a) Dendrímero9- MTX;

b) Superficie hidrofóbica-hidrofílica

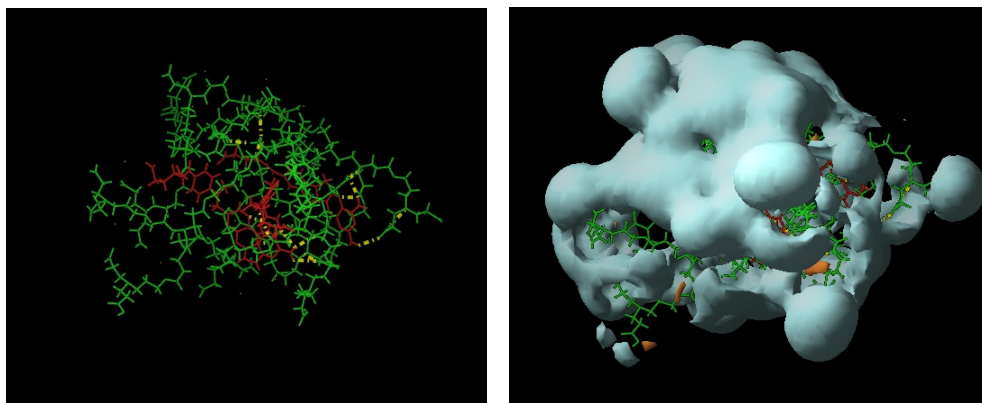


Figura 6.26. a) 5Dendrímero13-3MTX;

b) Superficie hidrofóbica-hidrofílica

La formación de los complejos dendrímero-MTX fue realizada en dos medios: agua desionizada y solución buffer salina de fosfatos (PBS) a pH 7.4, de acuerdo al protocolo descrito en la sección experimental. Con la finalidad de determinar las concentraciones del MTX en los diferentes medios y determinar el incremento en la solubilidad, también se determinó la solubilidad máxima del MTX por sí sólo en ambos medios. La técnica empleada para estas determinaciones fue espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

6.3.1.1 Formación de complejos en agua

Con el objetivo de evitar posibles interacciones repulsivas por la disociación de los ácidos carboxílicos presentes en ambas entidades, dendrímero y fármaco, la formación de los complejos se realizó en ausencia de agua, inicialmente se molió en mortero de ágata el dendrímero y una cantidad equimolar de NaOH para formar la sal, acto seguido se adicionó en MTX y se molió hasta formar una pasta, ésta fue disuelta en agua desionizada en un matraz volumétrico de 5 mL (ver sección experimental). Los complejos solubles en agua se obtuvieron después de sonicar, centrifugar y filtrar el MTX precipitado. Los complejos formados permaneces estables por varios días si se almacenan en la obscuridad y a bajas temperaturas.

Debido a que la solubilidad del MTX resultó ser muy pobre en agua desionizada, no fue posible construir una curva de calibración confiable por UV-Vis; en consecuencia, los valores de concentración de MTX en los complejos no fueron obtenidos, sin embargo, a partir de los valores de absorbancia medidos de las soluciones de complejos a una dilución conocida, y teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer, fue posible establecer una relación de concentraciones para mostrar claramente que, tanto el dendrímero 9

como el **13** mejoran notablemente la solubilidad del MTX en agua a pH neutro. Previa determinación de la absorbancia del MTX en agua.

Una vez formados los complejos en agua y para el MTX libre en agua, se realizaron las diluciones pertinentes para medir las absorbancias, los resultados así como las relaciones de volúmenes (V_0/V_1), donde V_0 es el volumen de la alícuota y V_1 es el volumen final de aforo (en este caso 5mL), se muestran en la tabla 6.4.

Entidad	A_{302}	V_0/V_f	$C^0[mol/L]$	$C^0_{MTX-den}/C^0_{MTX}$
MTX	0.457	0.3/5	$7.61/k$	1
Dendrímero 9 -MTX	1.261	0.2/5	$31.52/k$	4.14
Dendrímero 13 -MTX	0.827	0.2/5	$20.67/k$	2.71

Usando los valores de la tabla 6.4, y aplicando la ley de Lambert-Beer, se determinan las concentraciones de MTX (C^0) en las soluciones iniciales (solución madre) en función de una constante k , valor con el cual es posible determinar un radio de concentraciones entre el complejo y el fármaco libre ($C^0_{MTX-den}/C^0_{MTX}$). Este último valor nos refleja el incremento en la solubilidad del MTX por la presencia del dendrímero a una concentración de 1.7 mM.

Por lo tanto, la presencia de dendrímero **9** aumenta 4.14 veces la concentración de MTX en el agua, mientras que el dendrímero **13** la aumenta 2.71 veces. El mayor incremento por el dendrímero **9** puede tener su origen en la mayor flexibilidad que éste presenta al tener un núcleo más largo, lo que incrementa la posibilidad de interaccionar con el MTX o acortar las distancias de interacción. La figura 6.27 muestra los espectros UV-Vis del MTX en agua y de los complejos dendrímero-MTX. Los espectros muestran un ligero cambio y mejor definición del máximo de MTX a $\lambda=372nm$ en presencia de los dendrímeros, presumiblemente debido a que las interacciones del MTX con el dendrímero favorecen las transiciones $\pi-\pi^*$.

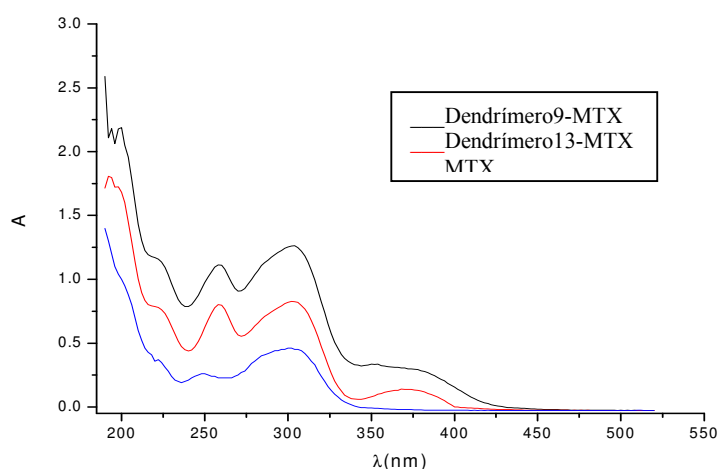


Figura 6.27. Espectros de UV-Vis de los complejos dendrímtero9-MTX y dendrímtero13-MTX y del MTX en agua desionizada. Las concentraciones relativas al MTX son 4.14, 2.71 y 1 respectivamente.

6.3.1.2. Formación de complejos en PBS

Como se mencionó, la solubilidad del MTX es directamente proporcional al cambio de pH, por ello al usar como disolvente una solución buffer a pH 7.4, la solubilidad del MTX se incrementa, haciendo factible la realización de una curva de calibración, para ello se prepararon 8 soluciones de diferentes concentraciones y se determinó su absorbancia. Los valores de los máximos fueron leídos por triplicado y las curvas de calibración con los valores promedio se realizaron a $\lambda=302$ y $\lambda=370$ nm, ambas se muestran en la figura 6.18 (en la sección 6.2.1).

Siguiendo los protocolos establecidos se determinó la solubilidad máxima del MTX en PBS y se formaron los complejos, que se disolvieron en solución buffer. Las absorbancias medidas para los complejos y para el MTX libre en PBS se muestran en la tabla 6.5, aunadas a las relaciones de volúmenes (V_0/V_1) donde V_0 es el volumen de la alícuota y V_1 es el volumen final de aforo (en este caso 5mL).

Entidad	A_{304}	V_0/V_f	C^0 [mmol/L]	$C^0_{MTX-den}/C^0_{MTX}$
MTX	0.716	0.06/5	1.85	1
Dendrímtero9-MTX	1.265	0.06/5	3.29	1.8
Dendrímtero13-MTX	1.138	0.06/5	2.94	1.6

Nuevamente usando los valores de la tabla 6.5 y la curva de calibración a 304nm, las concentraciones de MTX (C^0) en las soluciones iniciales (solución madre) fueron determinadas, así como la relación de concentraciones $C^0_{MTX-den}/C^0_{MTX}$. Este último valor nos refleja el incremento en la solubilidad del MTX por la presencia del dendrímero a una concentración de 2.5 mM.

Si bien la solubilidad del MTX en agua no fue cuantificada, un considerable aumento de solubilidad en PBS respecto al agua se aprecia por la intensidad del color en la solución. Este hecho se debe al aumento del pH, de 7 a 7.4, con lo cual es posible ionizar algunos de los grupos presentes en la molécula y por lo tanto hacerlo más soluble. El cambio de disolvente, como era de esperarse, también produce un cambio en el espectro de absorbancia, generando un corrimiento batocrómico (de $\lambda=302$ nm a $\lambda=304$ nm).

Ambos dendrímeros, a una concentración de 2.5 mM, incrementan la solubilidad del MTX en solución buffer de fosfatos. Por un lado, la solubilidad del MTX se incrementó de 1.85 mM a 3.29 mM (~180%) por la presencia del dendrímero **9**, mientras que la presencia del dendrímero **13** permite un incremento de 1.85 mM a 2.94 mM (~160%). Nuevamente se ve una superioridad del dendrímero **9** sobre el **13**, lo que sustenta la hipótesis de que la mayor flexibilidad favorece mejores interacciones. La figura 6.28 muestra los espectros UV-Vis de los complejos dendrímero-MTX, donde es posible apreciar gráficamente la superioridad del dendrímero **9** sobre el **13** en el incremento de solubilidad.

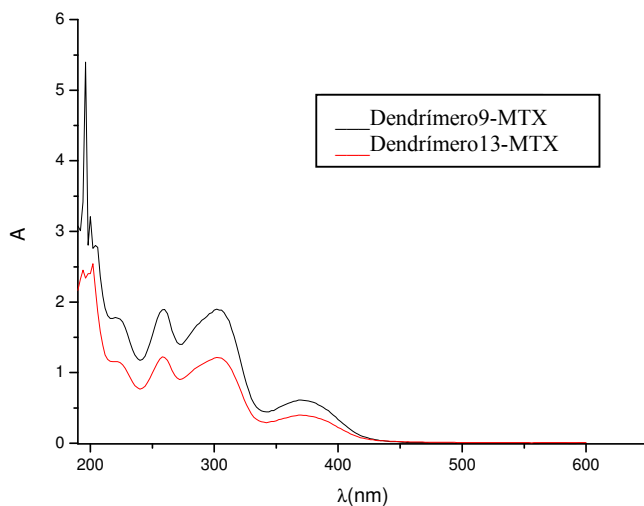


Figura 6.28. Espectros de UV-Vis de los complejos dendrímero **9**-MTX y dendrímero **13**-MTX y del MTX en PBS a una dilución de 6μM a 5mL

Por otro lado, al comparar los resultados en agua y PBS es notable el mayor incremento de solubilidad producido en agua por la presencia de los dendrímeros, probablemente debido a que las sales de fosfatos presentes interfirieren bloqueando las interacciones entre ambas sustancias y además, como se menciona anteriormente, al aumentar el pH los grupos ácido en la molécula de MTX se ionizan, lo que los limita para interactuar mediante interacciones iónicas con las aminas terciarias presentes en los dendrímeros.

Como ya se sabe (ver antecedentes), por los grupos funcionales presentes en los dendrímeros, un cambio en el pH generará un cambio en su conformación (estructura extendida debido a la protonación de las aminas presentes), por ello es posible plantear la hipótesis de una liberación del fármaco controlada por un descenso en el pH del medio, lo que resultaría en la protonación de todas las aminas en la estructura dendrímica, inhibiendo por lo tanto la posibilidad de las aminas de interactuar mediante interacciones iónicas (que son las de mayor fuerza) con el MTX, produciendo así su liberación.

Bajo esa hipótesis, se llevó a cabo el experimento adicionando a las soluciones de complejo en PBS HCl al 10% hasta pH 4, luego de sonicar, equilibrar, centrifugar y filtrar las soluciones se tomaron las alícuotas pertinentes y se midió la absorbancia. Los resultados para ambos complejos después del tratamiento mencionado se resumen en la tabla 6.6.

Entidad	A_{304}	V_0/V_f	$C^0 [mmol/L]$
Dendrímtero 9 -MTX	0.871	0.15/5	0.899
Dendrímtero 13 -MTX	1.056	0.15/5	1.090

Como puede verse en los resultados de la tabla 6.6, efectivamente la concentración de MTX decrece en más del 65% para ambos dendrímeros, lo que corrobora la hipótesis de que el cambio en el pH puede promover la liberación del fármaco.

6.3.1.3 Evaluación del porcentaje de inhibición de los complejos dendrímero-MTX

Debido a que el objetivo del presente trabajo es proponer un nuevo material que pueda fungir como acarreador de fármacos, este material debe cumplir con una serie de características como se menciona en los antecedentes. Entre estas propiedades, además de la solubilidad en medios acuosos y su inocuidad en sistemas biológicos, no deben inhibir la actividad del fármaco, al respecto, una vez formados los complejos entre dendrímero-MTX se realizaron pruebas de porcentaje de inhibición *in vitro* en diferentes líneas celulares cancerígenas y en la línea de linfocitos humanos MT2, tanto del MTX libre como de los complejos formados. Todos los experimentos fueron realizados a una concentración máxima de 50 μ M en agua para los complejos y en DMSO para el MTX, dados los problemas de solubilidad. Los resultados se muestran en la tabla 6.7.

Tabla 6.7. Porcentaje de inhibición del crecimiento en líneas celulares humanas cancerígenas y linfocitos humanos (MT2) a 50 μ M \pm el error estándar							
Compuesto	MT2*	U251	PC-3	K-563	HCT-15	MCF7	SKLU-1
9-MTX	1.22	93.8 \pm 4.7	10.0 \pm 6.0	47.1 \pm 7.3	93.9 \pm 3.0	91.6 \pm 7.2	78.8 \pm 10.6
13-MTX	11.63	87.0 \pm 2.0	+4.7 \pm 4.5	45.9 \pm 1.8	96.1 \pm 2.3	94.2 \pm 2.8	69.1 \pm 3.9
MTX	86.34	61.8 \pm 3.3	27.9 \pm 5.6	44.0 \pm 4.1	55.1 \pm 2.4	50.6 \pm 2.9	54.1 \pm 1.9

*Los valores no pudieron hacerse por triplicado debido a la muerte de toda la línea celular.

De la tabla 6.7 puede verse que los dendrímeros, no sólo no inhiben la actividad del fármaco sino que generan un efecto sinérgico, mejorando la actividad citotóxica contra las líneas celulares cancerígenas. Además, otro punto muy importante es que al comparar la actividad en los linfocitos se observa que la toxicidad hacia esta línea decrece drásticamente, lo que resulta muy satisfactorio.

Resumiendo, por los resultados anteriormente presentados, se puede decir que los dendrímeros **9**, con núcleo de ácido adípico, y **13** de etiléndiamina, son buenos candidatos para actuar como acarreadores de fármacos, ya que son solubles en agua, no presentan citotoxicidad hacia líneas celulares sanas (MT2), poseen la capacidad de mejorar hasta en un 180% la solubilidad del MTX en PBS y en más de un 400% en

agua y presentan un efecto sinérgico en la actividad del MTX hacia líneas celulares cancerígenas, respetando la línea de células sanas. Además, se puede contemplar una posible liberación controlada al bajar el pH, de acuerdo al estudio realizado.

6.3.2. Estudio con Taxol

Al igual que el MTX, el taxol es altamente hidrofóbico y en consecuencia presenta una casi nula solubilidad en agua. Con la finalidad de mejorarla, se llevó a cabo el mismo protocolo de formación de complejos que para el MTX, probando nuevamente los dendrímeros **9** y **13**. Sin embargo, en este caso los resultados mostraron la incapacidad de estos dendrímeros de interaccionar favorablemente con el taxol en medios acuosos. Se probaron diferentes estequiometrias dendrímero-taxol, 1:1, 2:1, 4:1, pero en todos los casos resultó infructuoso el esfuerzo; tras centrifugar y filtrar, el taxol se recuperaba en su totalidad. Se concluye entonces que estos dendrímeros no poseen el tamaño y grupos funcionales adecuados para mejorar la solubilidad del taxol ni en agua ni en PBS.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

El trabajo realizado se divide claramente en dos partes, una referente a la síntesis del PAMAM y la formación de conjugados dendriméricos y otra que consta de la síntesis de dos nuevos dendrímeros amino-éster y su evaluación como potenciadores de la solubilidad.

Respecto al PAMAM se derivan las siguientes conclusiones:

- La síntesis del dendrímero de PAMAM con núcleo de etilendiamina se llevó a cabo con altos rendimientos hasta la generación 2.5.
- La reacción de sustitución con el grupo TRIS sobre las terminales metiléster permite obtener grupos hidroxilo en la periferia y triplicar el número de grupos terminales.
- Debido a la alta solubilidad en agua y su inocuidad hacia la línea celular sana de linfocitos humanos se probó como plataforma para el acarreo y liberación del MTX y del Taxol mediante la formación de conjugados dendriméricos.
- De la formación de conjugados dendriméricos con el MTX y el AF se obtuvieron dos fracciones de interés. La primera conteniendo únicamente moléculas de MTX y la segunda con AF y MTX en una proporción 5:1 AF:MTX, ambas fracciones fueron completamente solubles en medios acuosos y mantienen el porcentaje de inhibición del MTX hacia líneas celulares cancerígenas en estudios *in vitro*.
- El conjugado al cual se incorporó tanto AF como MTX abate por completo el % de inhibición en el crecimiento en linfocitos humanos, es decir, favorece el crecimiento de ésta línea celular, lo que nos indica que estos nuevos conjugados presentan cierta selectividad hacia líneas cancerígenas.
- Del conjugado con el Taxol se corrobora que la formación de conjugados con el dendrímero **13** sí aumenta su solubilidad en medios acuosos.

En cuanto a los dendrímeros amino-éster, se concluye lo siguientes:

- La síntesis de los dos nuevos dendrímeros de amino-éster con terminales COOH, se obtuvieron de la esterificación entre el 3-amino-1-propanol, previamente N-alquilado con terbutil acrilato, y dos núcleos; uno de ácido adípico hasta G2 (8) y otro con núcleo de etiléndiamina de G1.5 (12).
- Estos dendrímeros son monodispersos, completamente solubles en agua y ambos, así como sus posibles metabolitos, demostraron ser inocuos en la línea celular sana de linfocitos humanos MT-2. Todas estas características deseables para un acarreador de fármacos.
- Ambos dendrímeros poseen la capacidad de mejorar la solubilidad del MTX en agua hasta en un 400% y en solución buffer de fosfatos (pH 7.4) hasta en un 180%, mediante interacciones no covalentes formando estructuras supramoleculares.
- La disminución en pH del medio sugieren una posible liberación mediada por el decremento en el pH.
- La formación de estas estructuras aumenta por efecto sinérgico la citotoxicidad del fármaco hacia líneas celulares cancerígenas y la abaten en la línea sana MT-2, lo cual los coloca como potenciales candidatos para el acarreamiento del MTX.
- Los resultados fallidos para la formación de estructuras supramoleculares con el taxol, ponen de manifiesto la incapacidad de estos nuevos dendrímeros de estas generaciones de interaccionar adecuadamente con fármacos de pesos moleculares similares a los de los dendrímeros.

En resumen, por las características mostradas, los nuevos dendrímeros sintetizados y el PAMAM modificado, pueden ser sugeridos como potenciales acarreadores de fármacos.

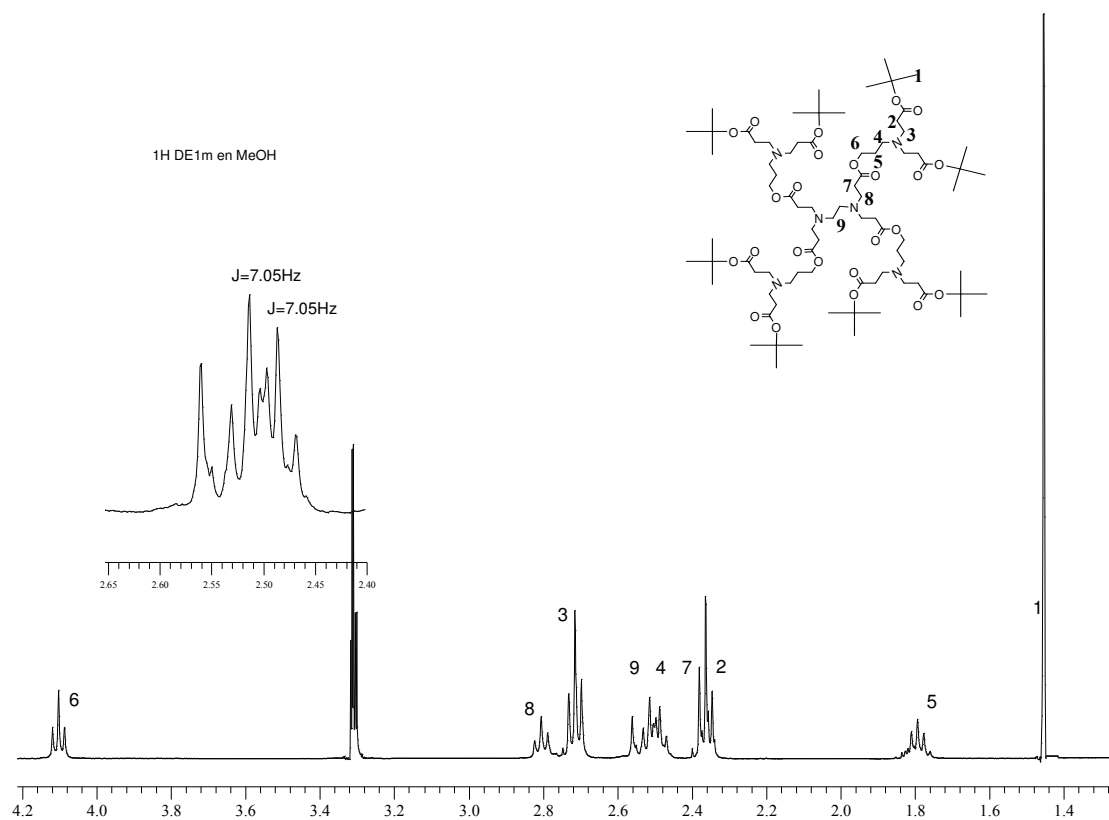
PERSPECTIVAS

Si bien los objetivos planteados en el presente trabajo se alcanzaron satisfactoriamente, existen una serie de pruebas biológicas que precisan un estudio más profundo para determinar los alcances y limitaciones que puedan llegar a tener los dendrímeros aquí descritos.

Planteando una potencial aplicación de los dendrímeros como acarreadores de fármacos por vía intravenosa, se deben realizar pruebas *in vitro* de hemólisis y agregación en sangre, son también necesarias pruebas de liberación a diferentes pH, marcaje de los dendrímeros para evaluar *in vivo* la biodistribución. Además otro factor de gran importancia en los acarreadores es el tiempo de circulación en el organismo, por lo que también sería pertinente evaluarlo. Todos esos parámetros determinarían la pertinencia de los dendrímeros propuestos o la necesidad de continuar creciendo generacionalmente o realizar alguna otra modificación superficial.

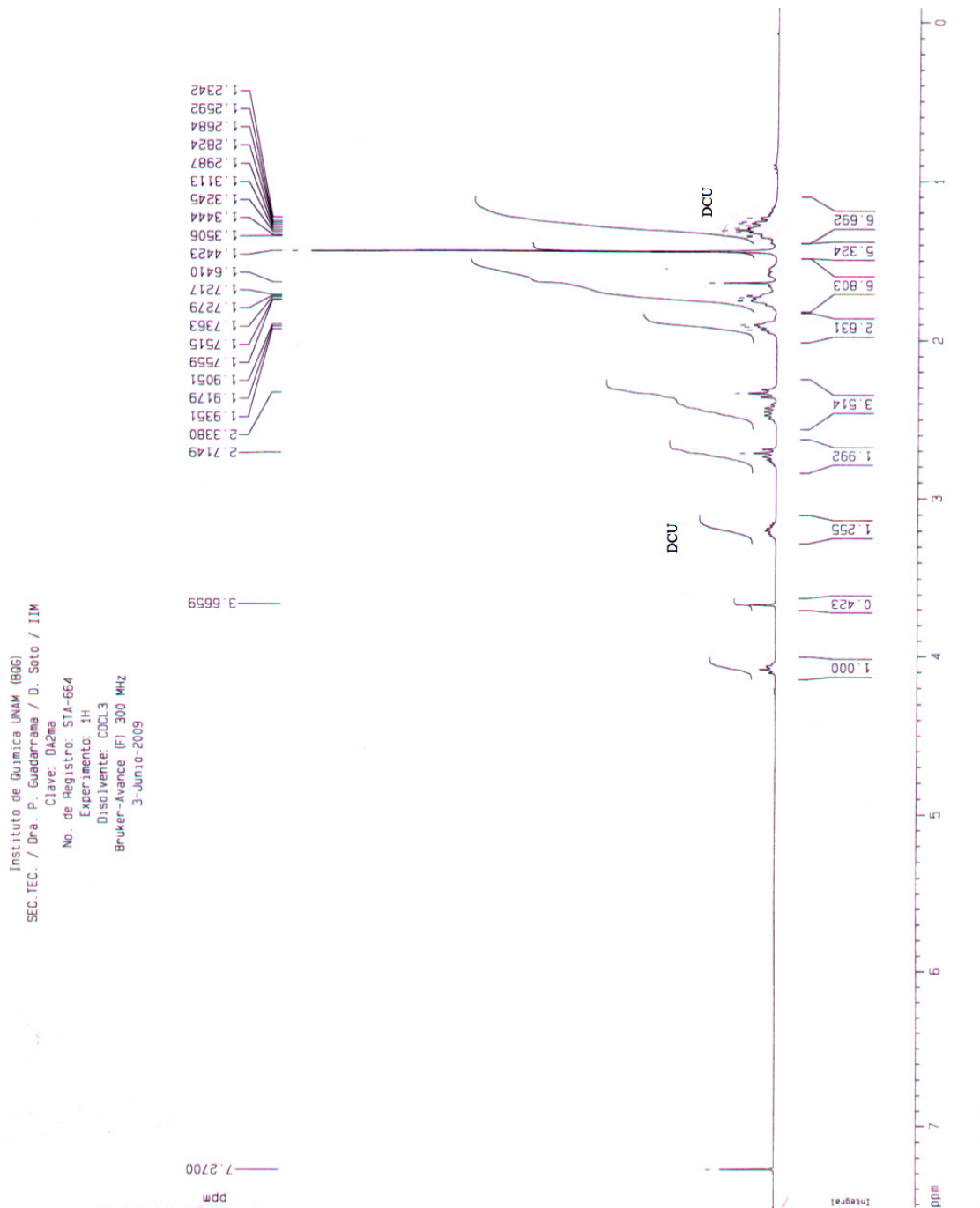
Específicamente en el área de síntesis queda aún mucho por hacer; por ejemplo, optimizar condiciones de reacción para aumentar los rendimientos en las reacciones de esterificación y encontrar alternativas de purificación más factibles, entre otras.

Anexo 1. Efecto del disolvente en experimento de RMN dendrímico 12



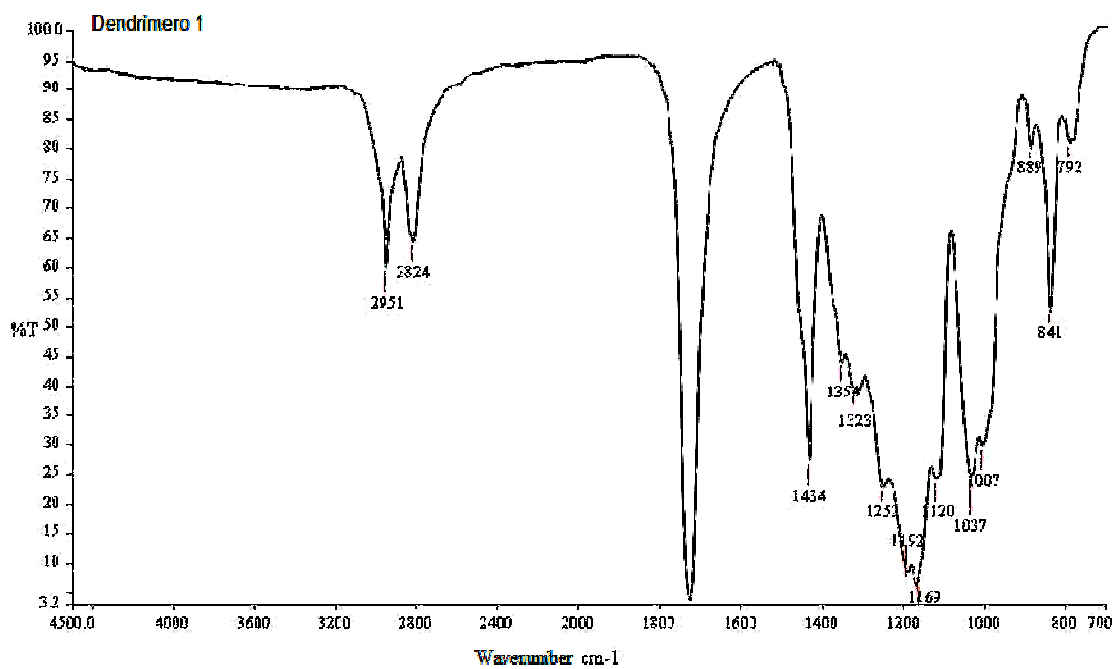
Como se mencionó, el cambio de disolvente para realizar la caracterización mediante RMN pueden cambiar el espectro, puede verse que cuando se realiza en MeOD, en lugar de CDCl₃, se aprecia mejor la separación en los dos conjuntos de señales triples asignadas a los protones anteriores a la amina exterior (protones 4) y los protones adyacentes al carbonilo del éster interno, ambas señales triples tienen una J de 7.05Hz.

Anexo 2. Presencia de DCU en el DA G2.

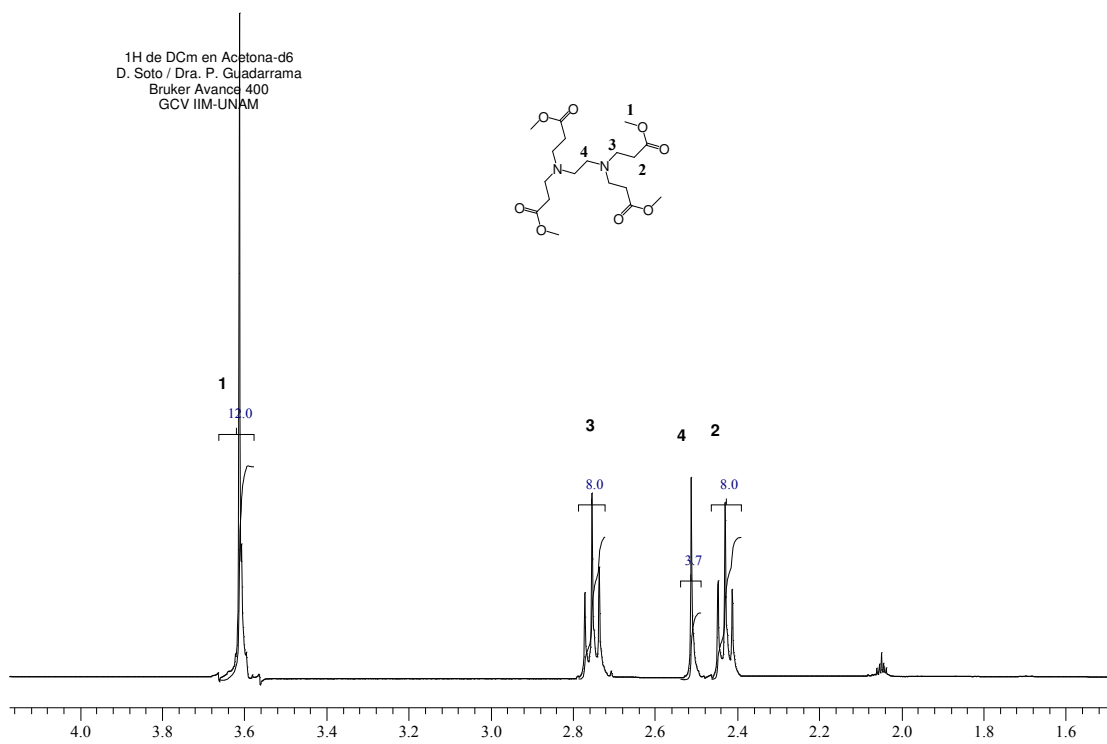


Anexo 3. Caracterización espectroscópica complementaria de los compuestos sintetizados.

Compuesto 1

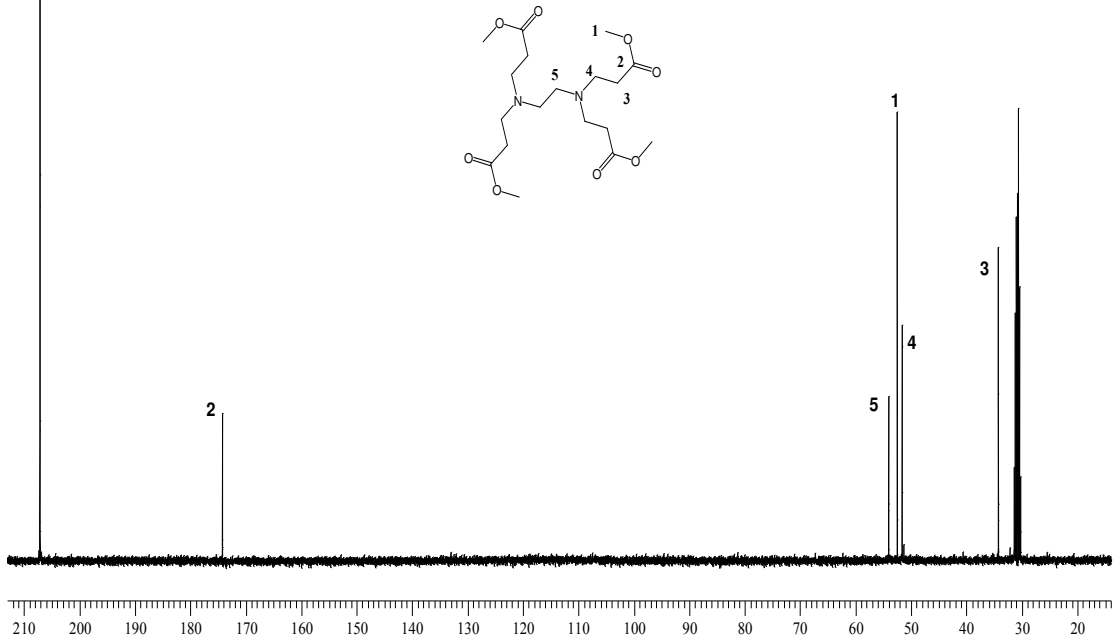


Espectro de infrarrojo del PAMAM G0.5 (dendrímero 1)



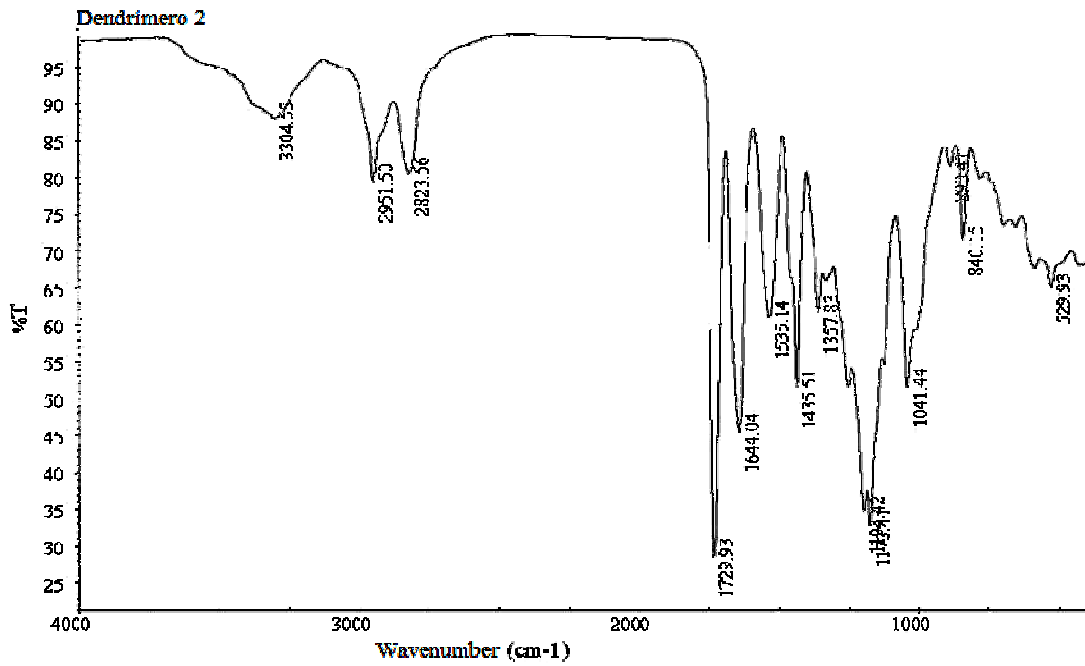
Espectro de ^1H RMN del PAMAM G0.5 (dendrímero 1)

^{13}C de DCM en Acetona- d_6
D. Soto / Dra. P. Guadarrama
Bruker Avance 400
GCV IIM-UNAM

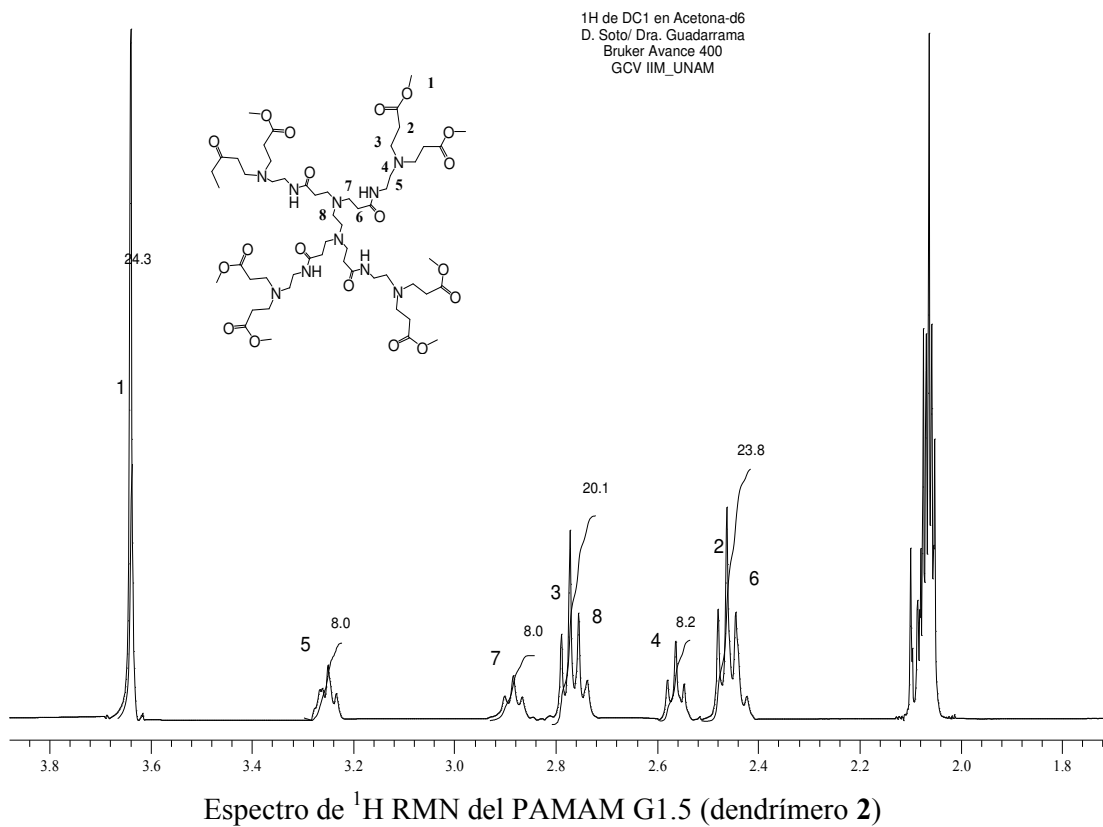


Espectro de ^{13}C RMN del PAMAM G0.5 (dendrímtero 1)

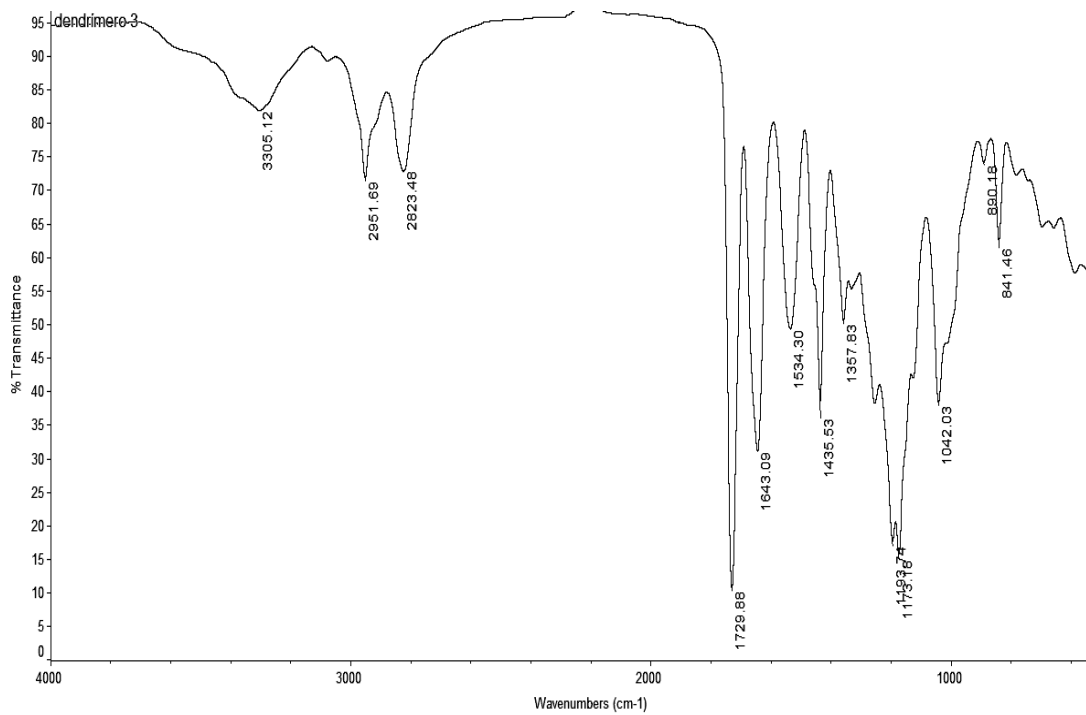
Compuesto 2

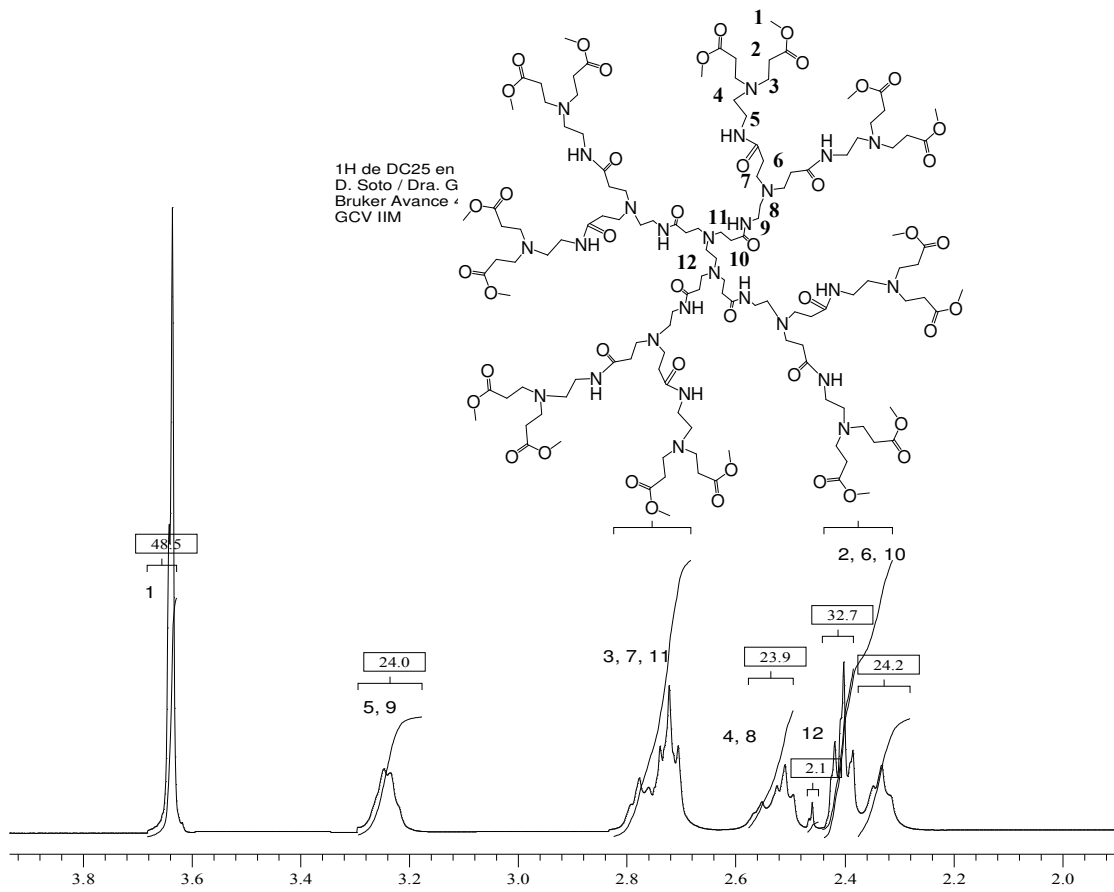


Espectro de infrarrojo del PAMAM G1.5 (2)

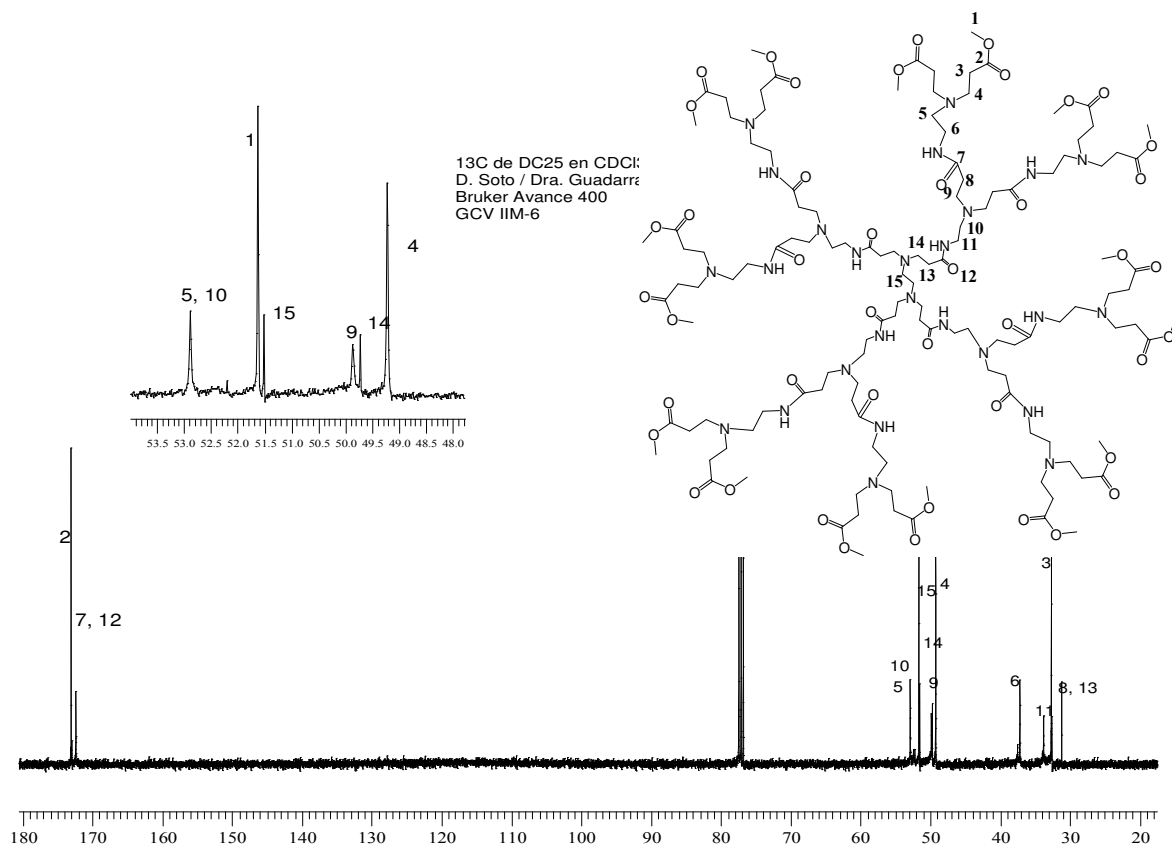


Compuesto 3





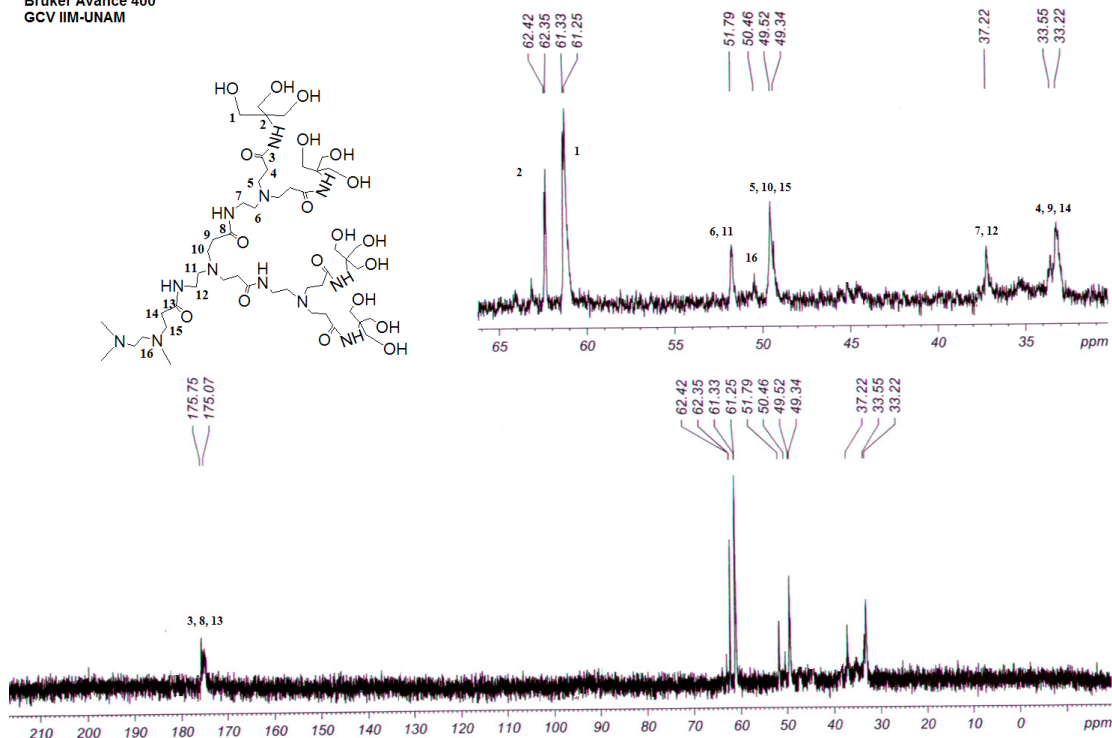
Espectro de ^1H RMN del PAMAM G2.5 (dendrímero **3**)



Espectro de ^{13}C RMN del PAMAM G2.5 (**3**)

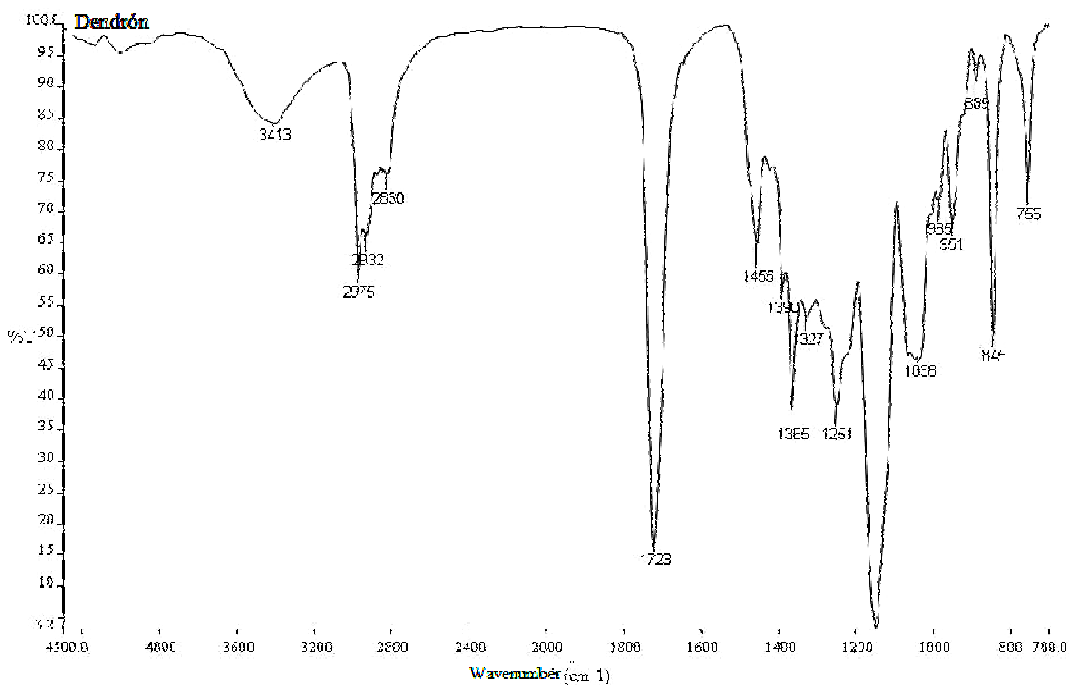
Compuesto 4

¹³C PAMAMG2500 en D₂O
D. Soto/Dra. Guadarrama
Bruker Avance 400
GCV IIM-UNAM

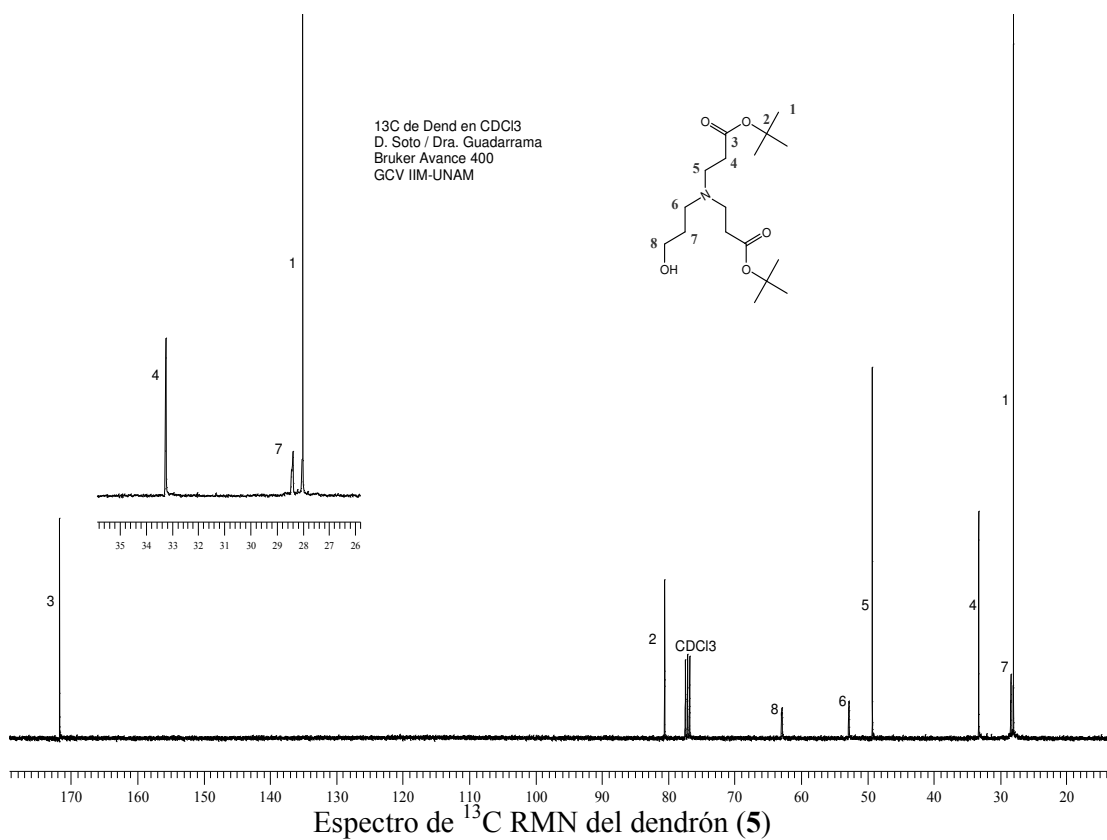


Espectro de ¹³C RMN del PAMAM G2.5 funcionalizado con TRIS (4)

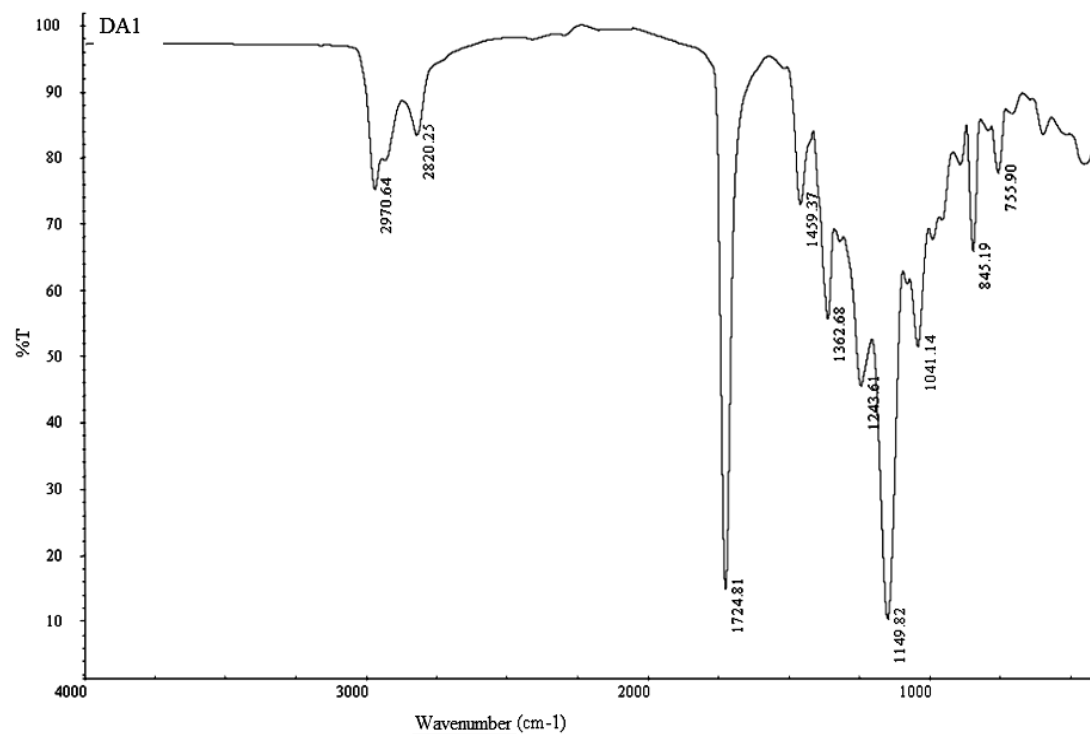
Compuesto 5

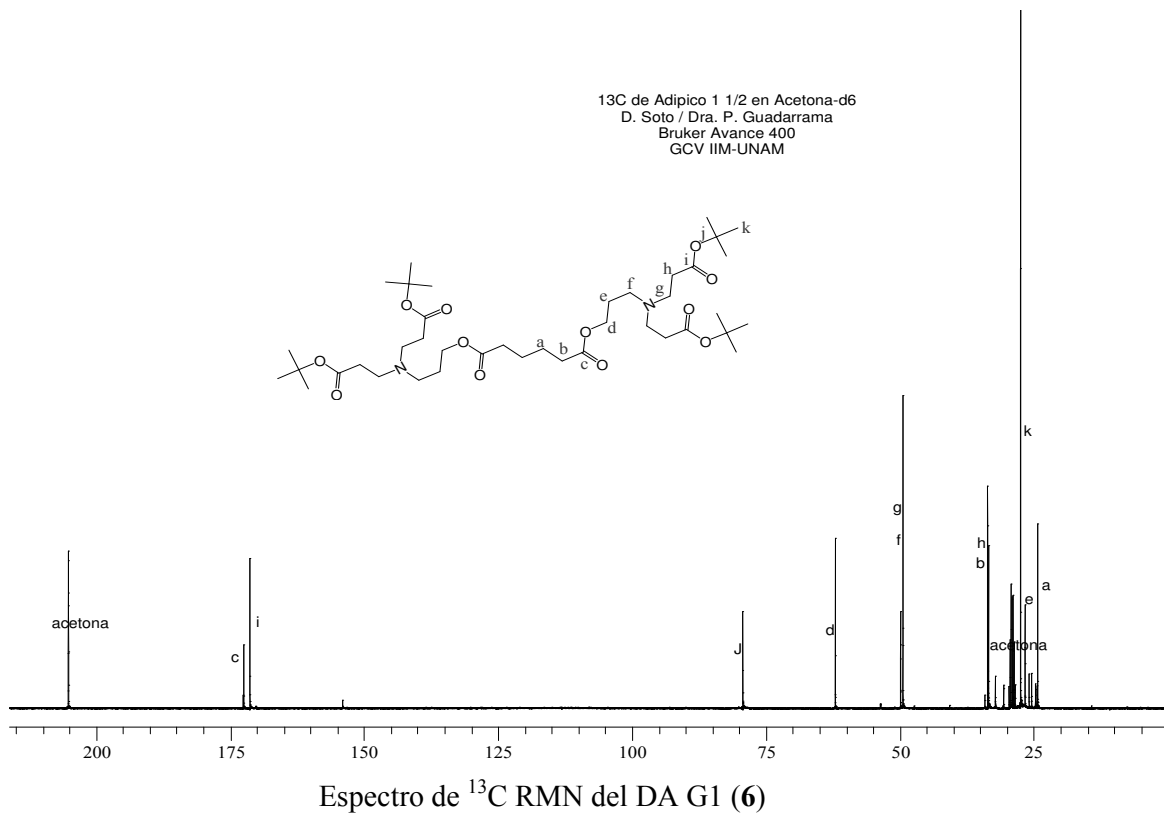
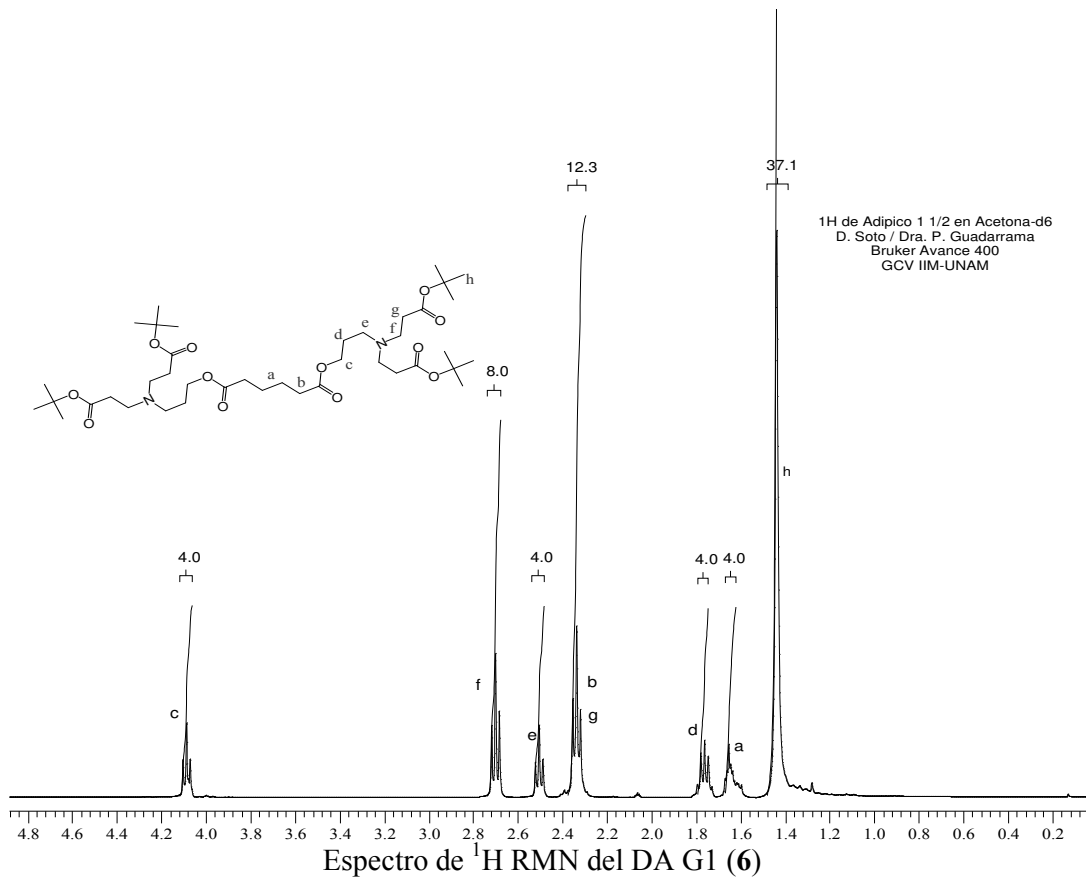


Espectro de infrarrojo del dendrón (5)



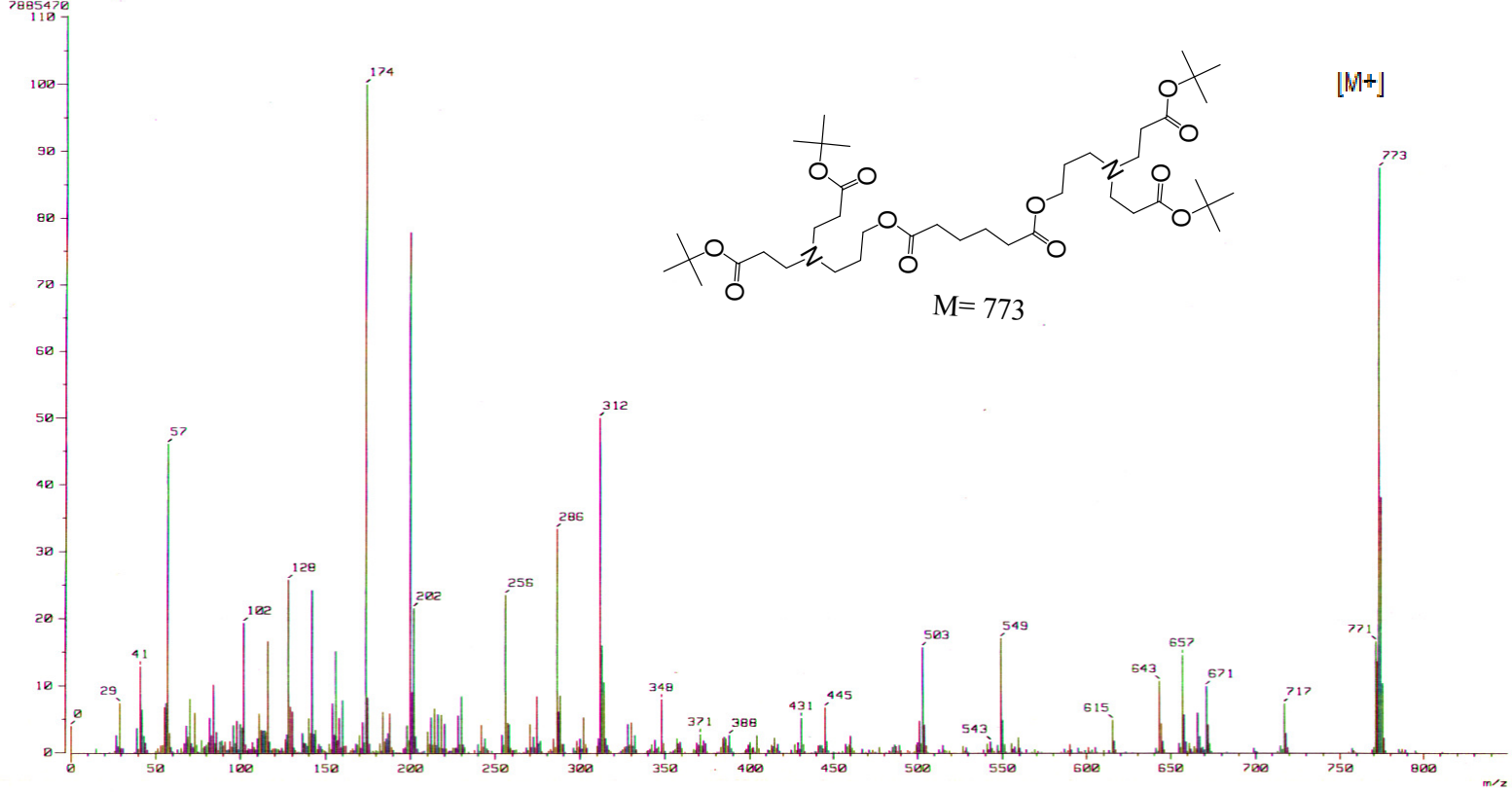
Compuesto 6





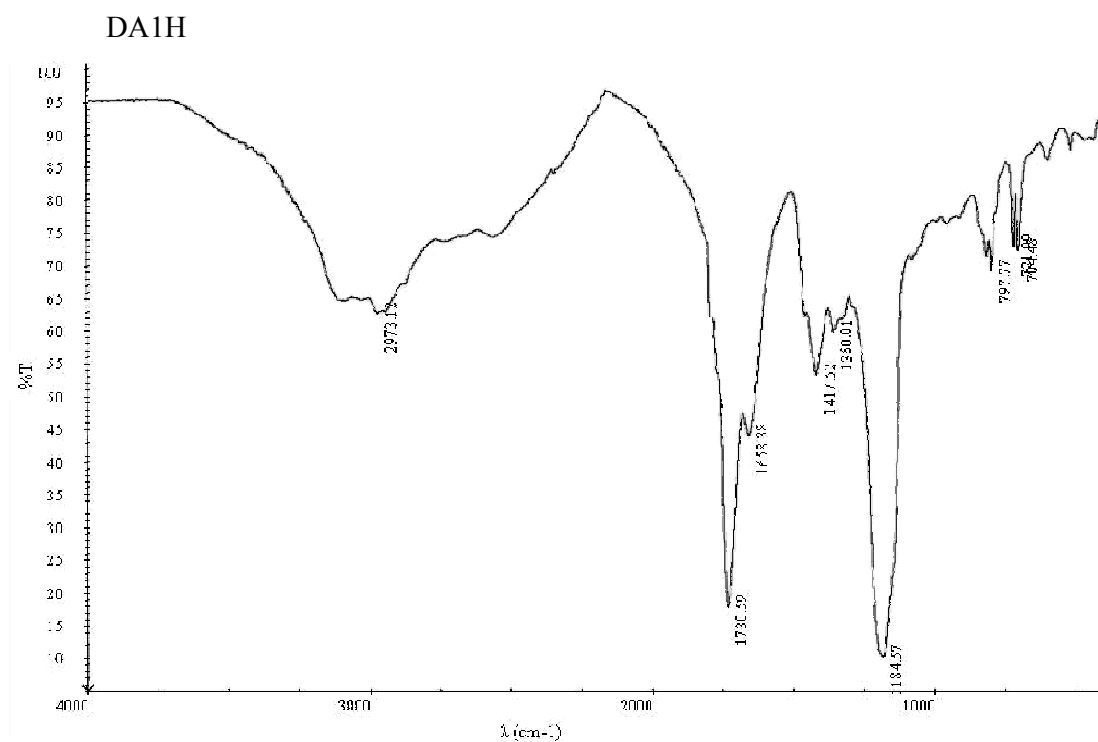
B

[Mass Spectrum]
Date : 09-Feb-2009 14:06
Data : Dr-Marcos-Mtz
Sample: 322 DA1m
Note :
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 2.16 min Scan# : (1,15)
BP : m/z 174.0000 Int. : 662.93
Output m/z range : 0.0000 to 849.7033 Cut Level : 0.00 %
7885470

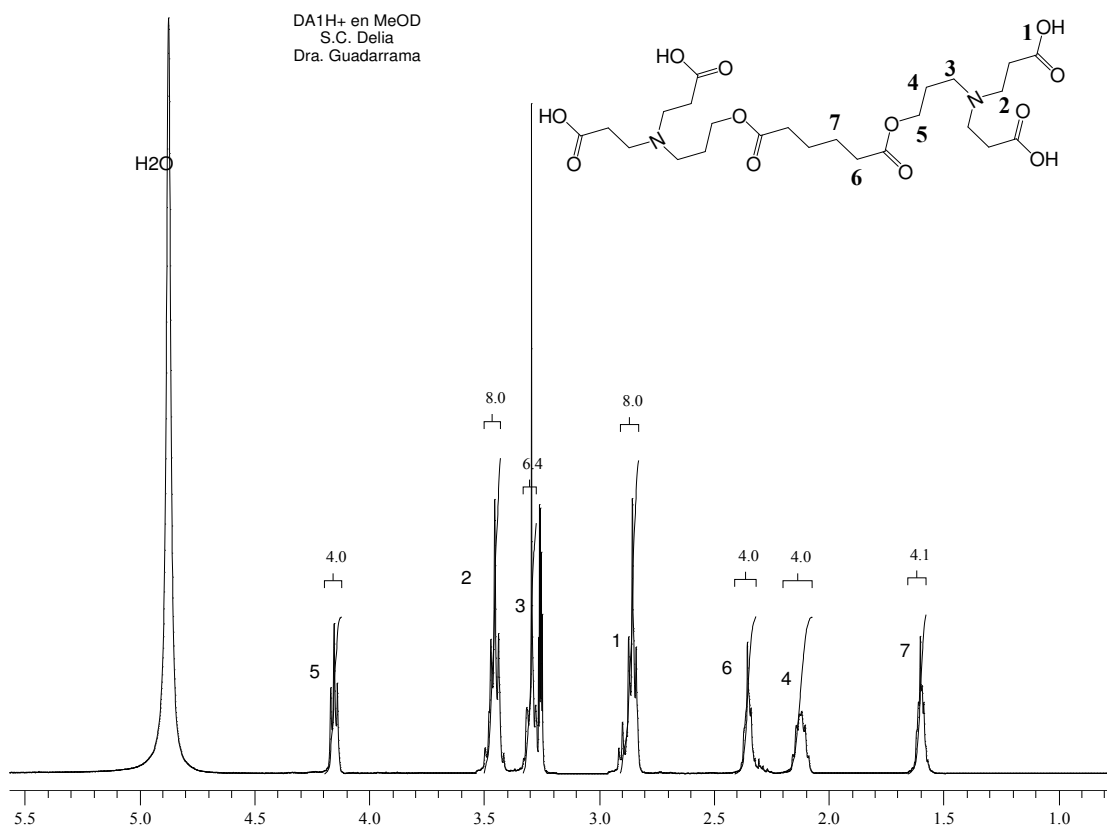


Espectro de masas FAB+ del DA G1 (6)

Compuesto 7

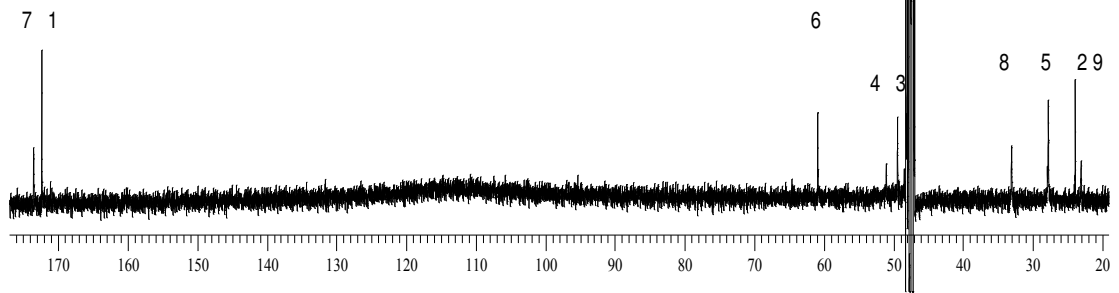
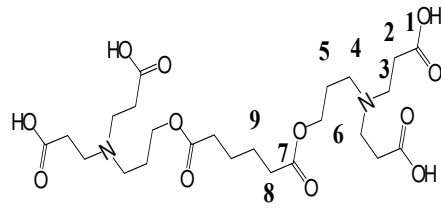


Espectro de infrarrojo del DA G1 terminales COOH (7)



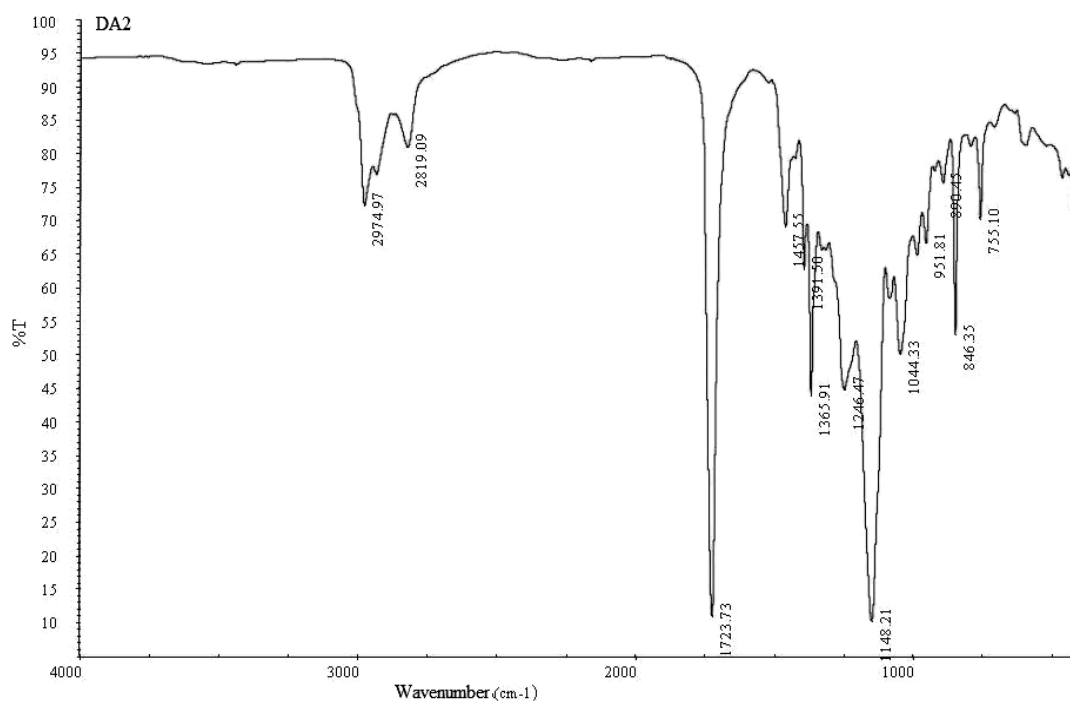
Espectro de ¹H RMN del DA G1 terminales COOH (7)

3C de DA1H+ en MeOD
S. Delia/Dra. Guadarram

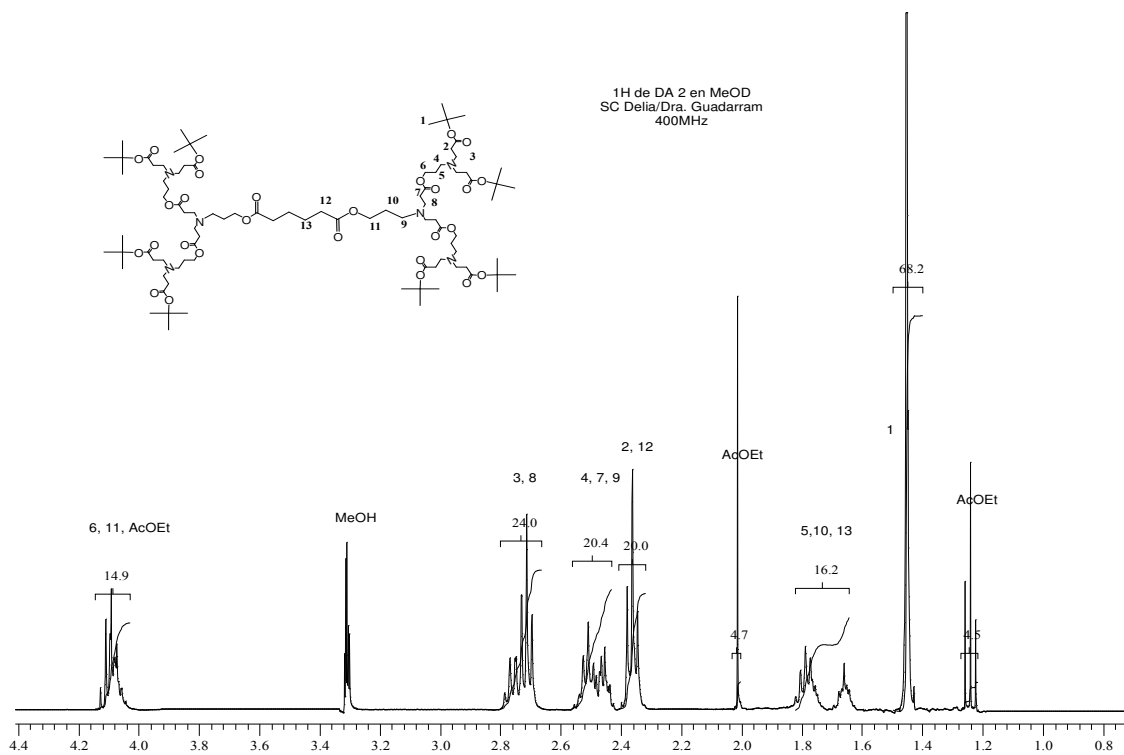


Espectro de ¹³C RMN del DA G1 terminales COOH (7)

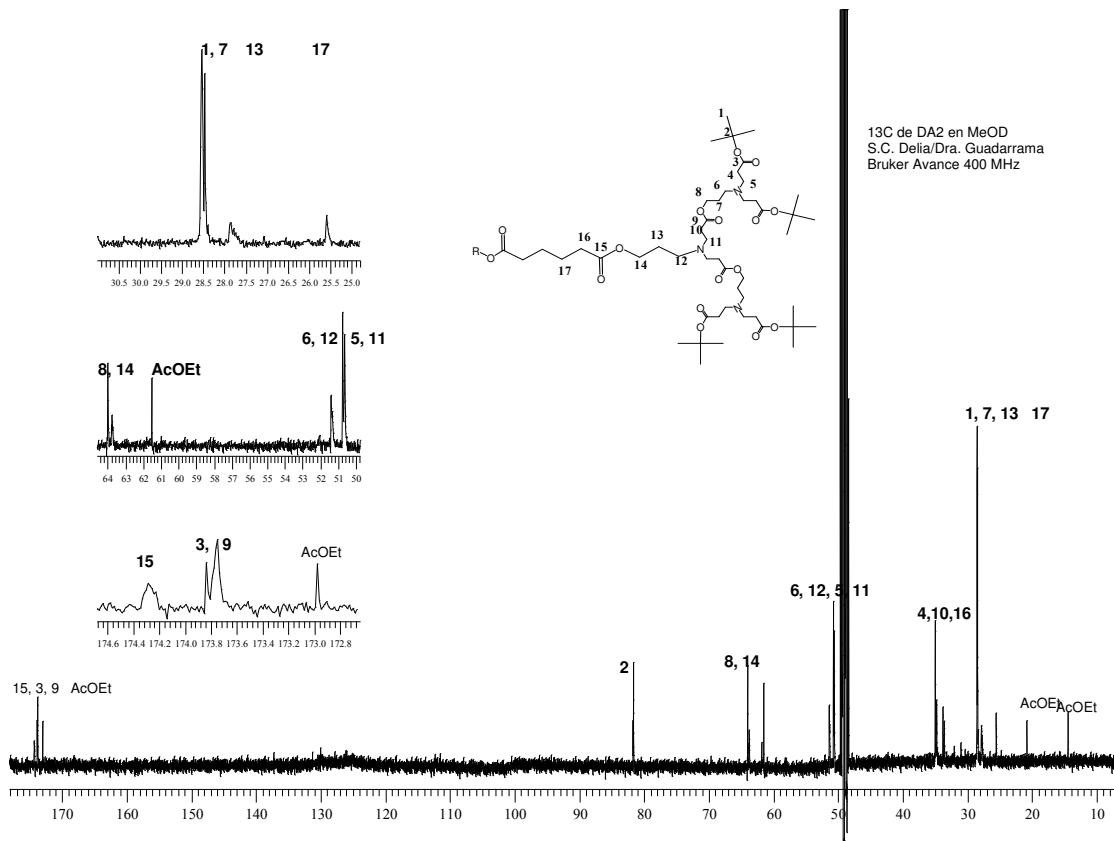
Compuesto 8



Espectro de infrarrojo del DA G2 (8)

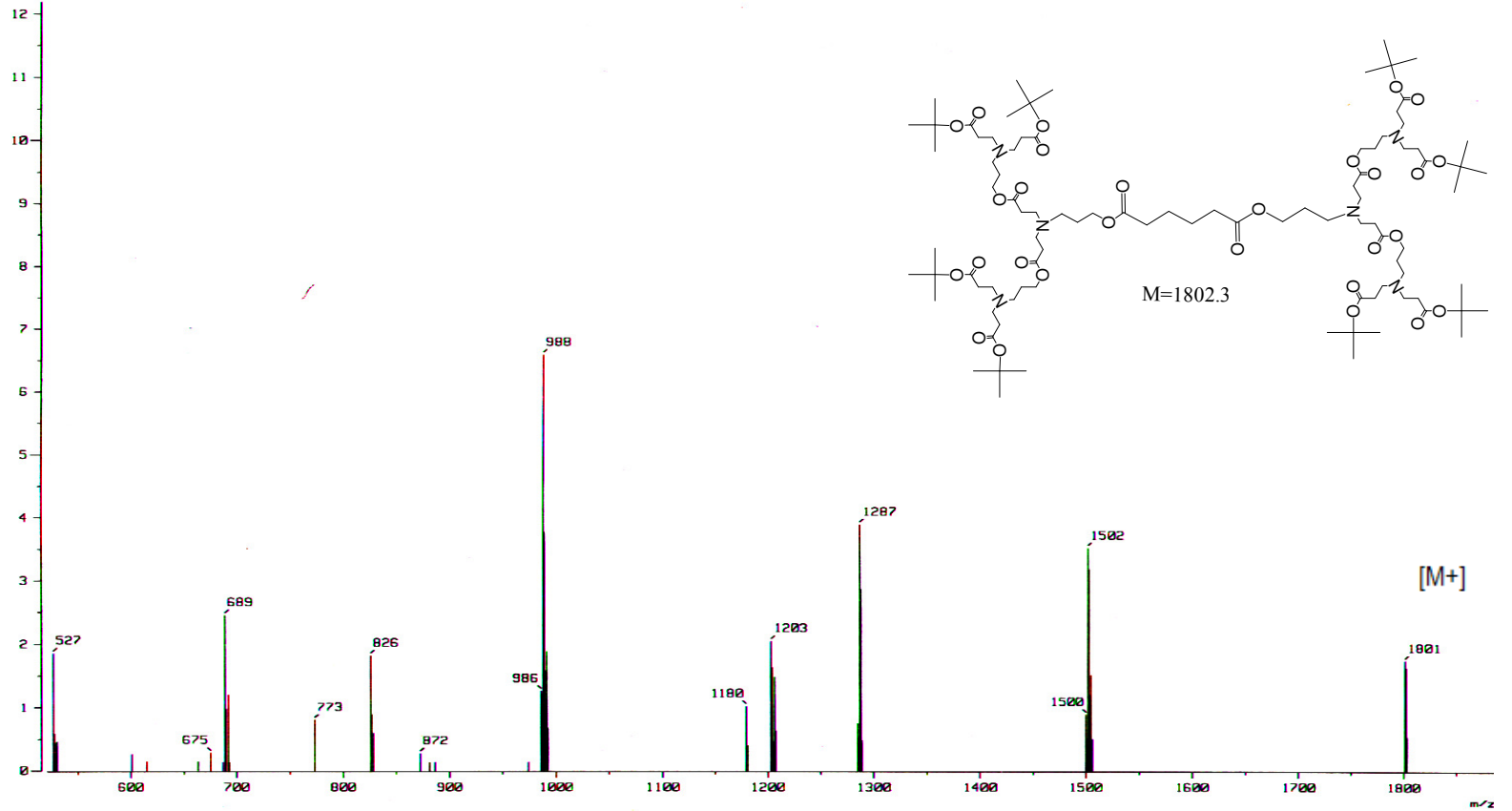


Espectro de ¹H RMN del DA G2 (8).



Espectro de ^{13}C RMN DA G2 (8)

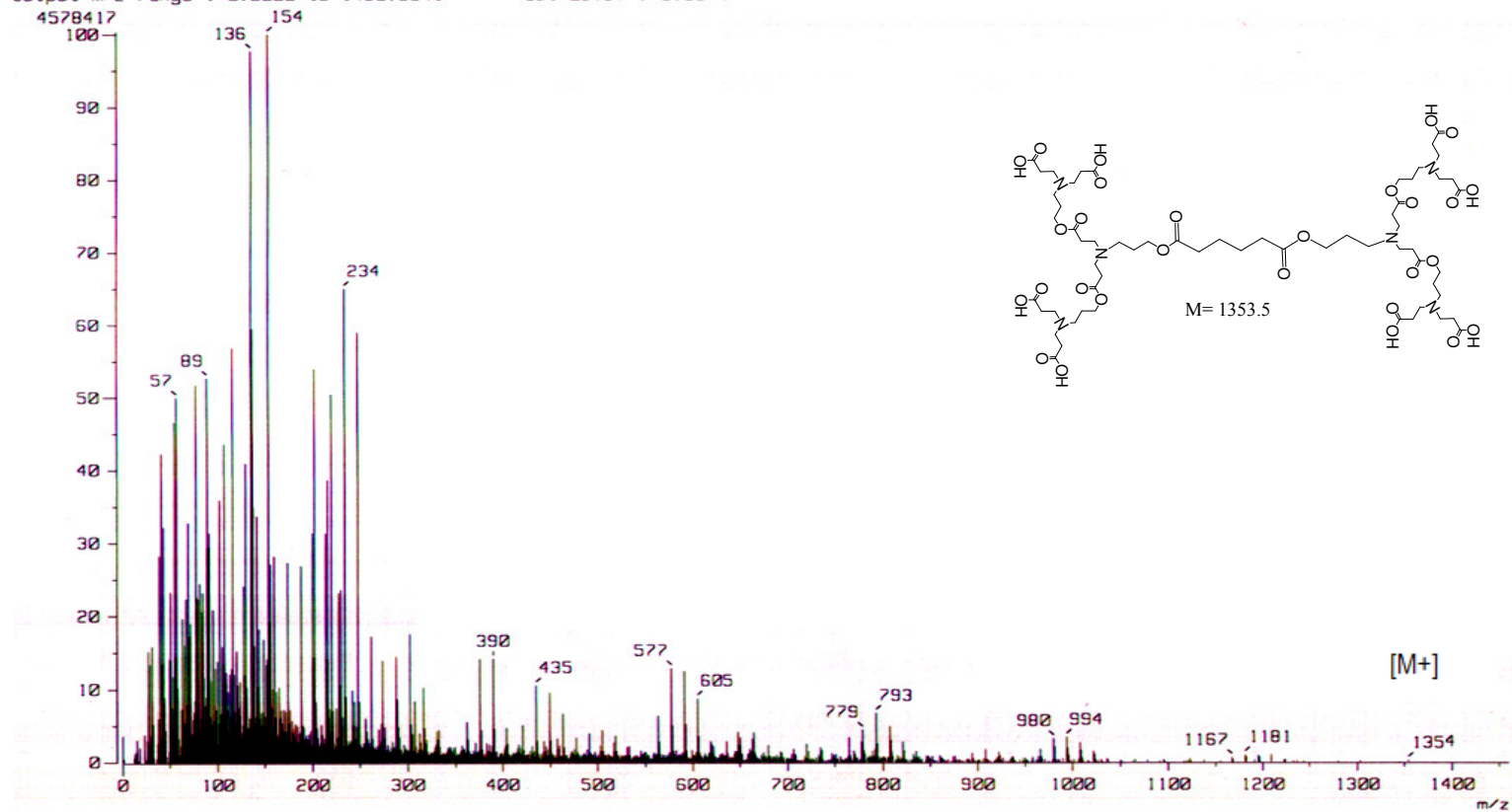
[Mass Spectrum]
Data : Dr-Marcos-Martinez095 Date : 25-Feb-2009 13:18
Sample: 325 DFM
Note :
Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 0.62 min Scan# : (1,6)
BP : m/z 207.0000 Int. : 240.48
Output m/z range : 521.3655 to 1886.1042 Cut Level : 0.00 %
307304

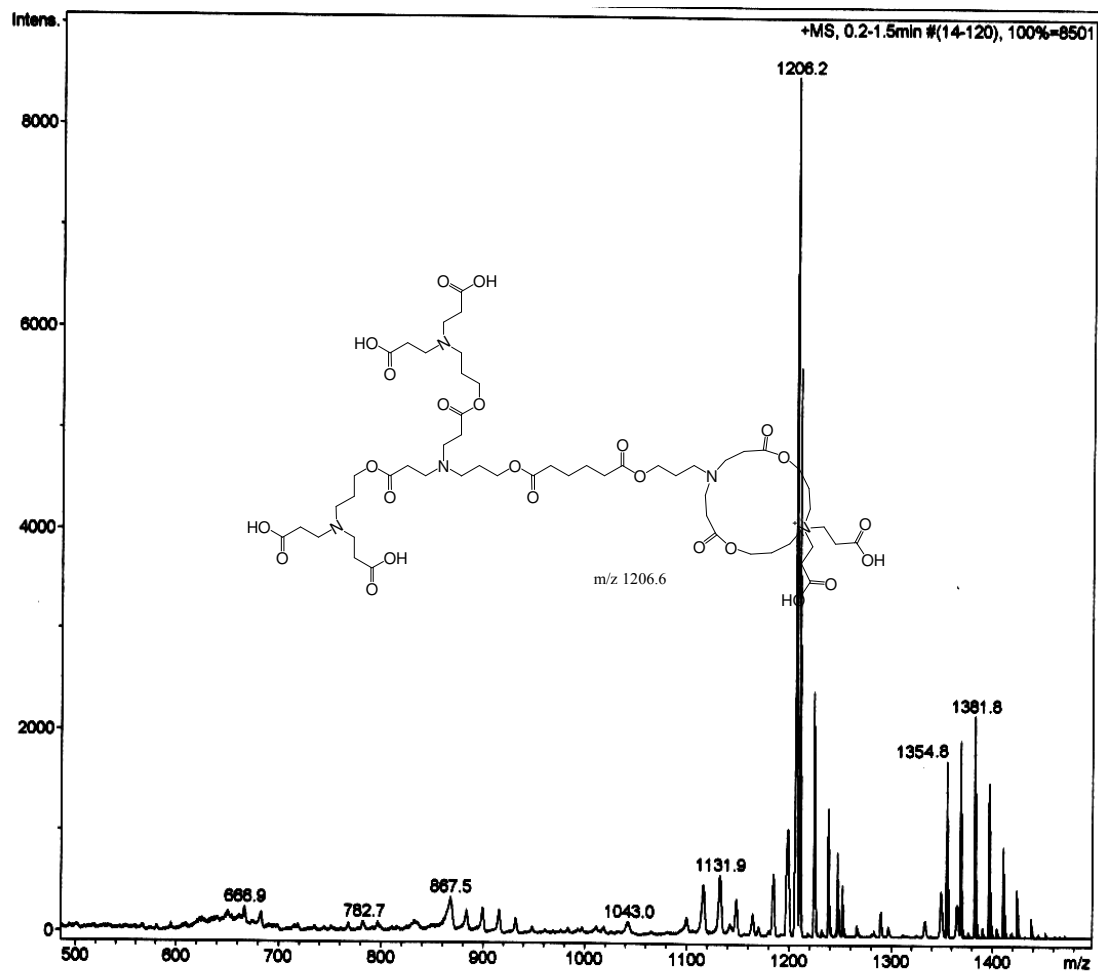


131

Espectro de masas FAB+ del DA G1 (8)

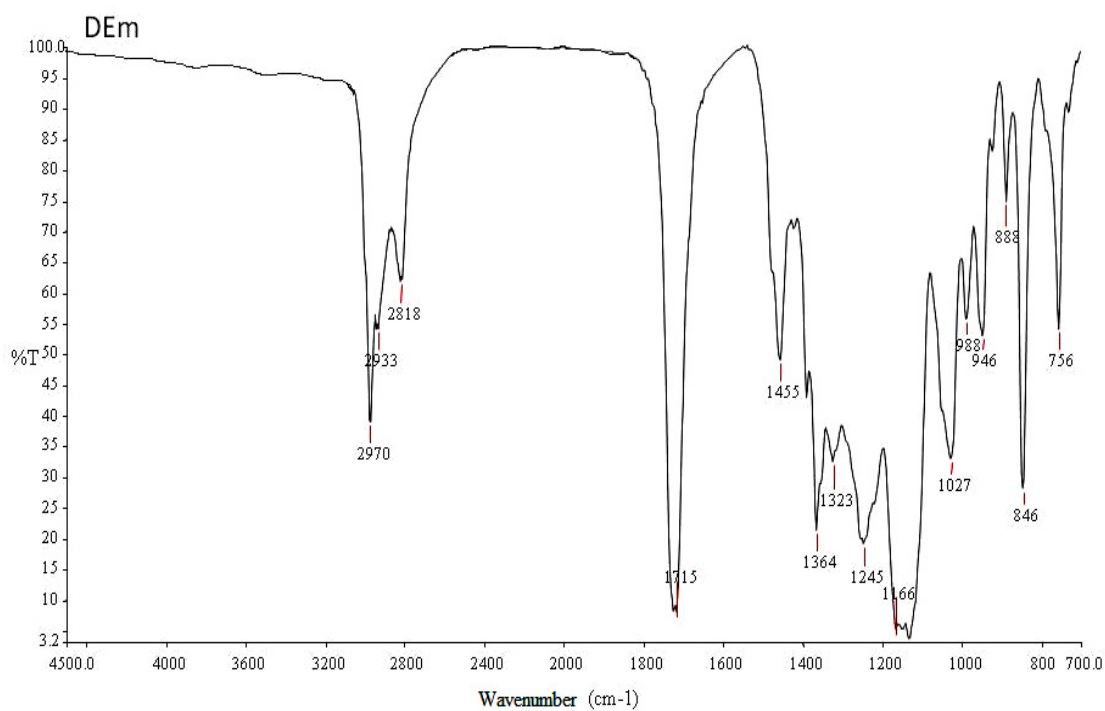
[Mass Spectrum]
 Date : 03-Dec-2010 12:35
 Sample: 89-STA-925 DR2H Jeol-SX-102A
 Note : Luis-Velasco
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 0.93 min Scan# : (2,6)
 BP : m/z 154.0000 Int. : 435.37
 Output m/z range : 0.0000 to 1460.5341 Cut Level : 0.00 %



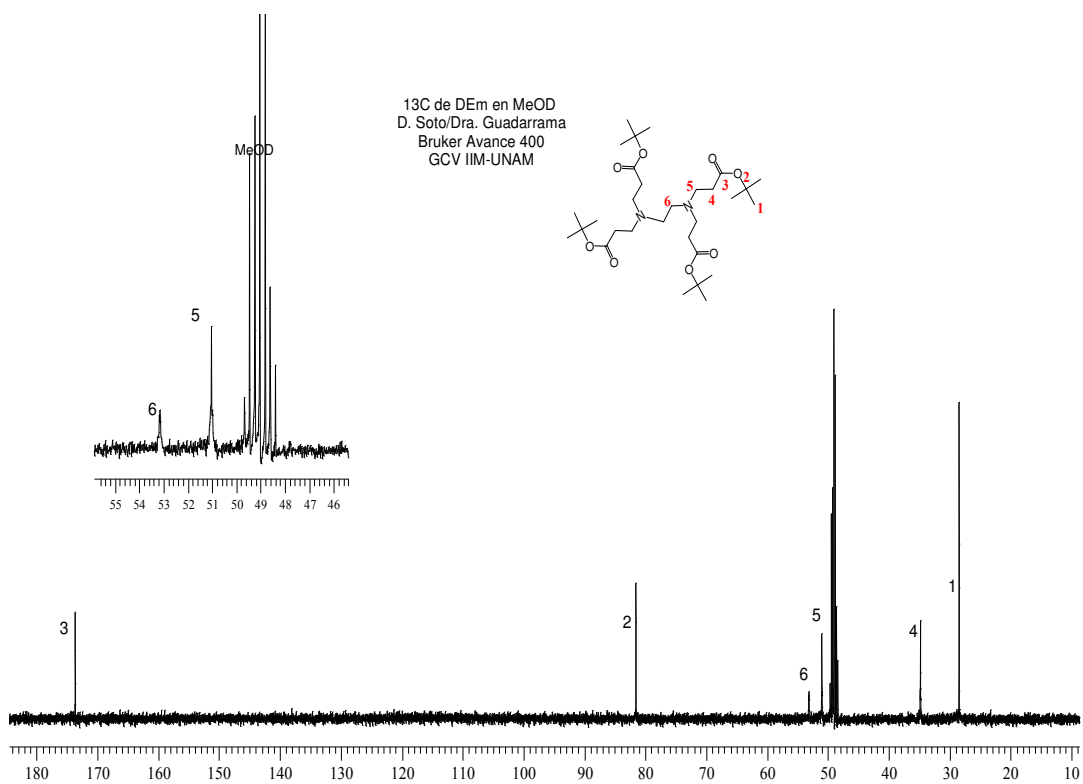


.Espectro de ESI (+MS) del DA G2 terminales COOH (9)

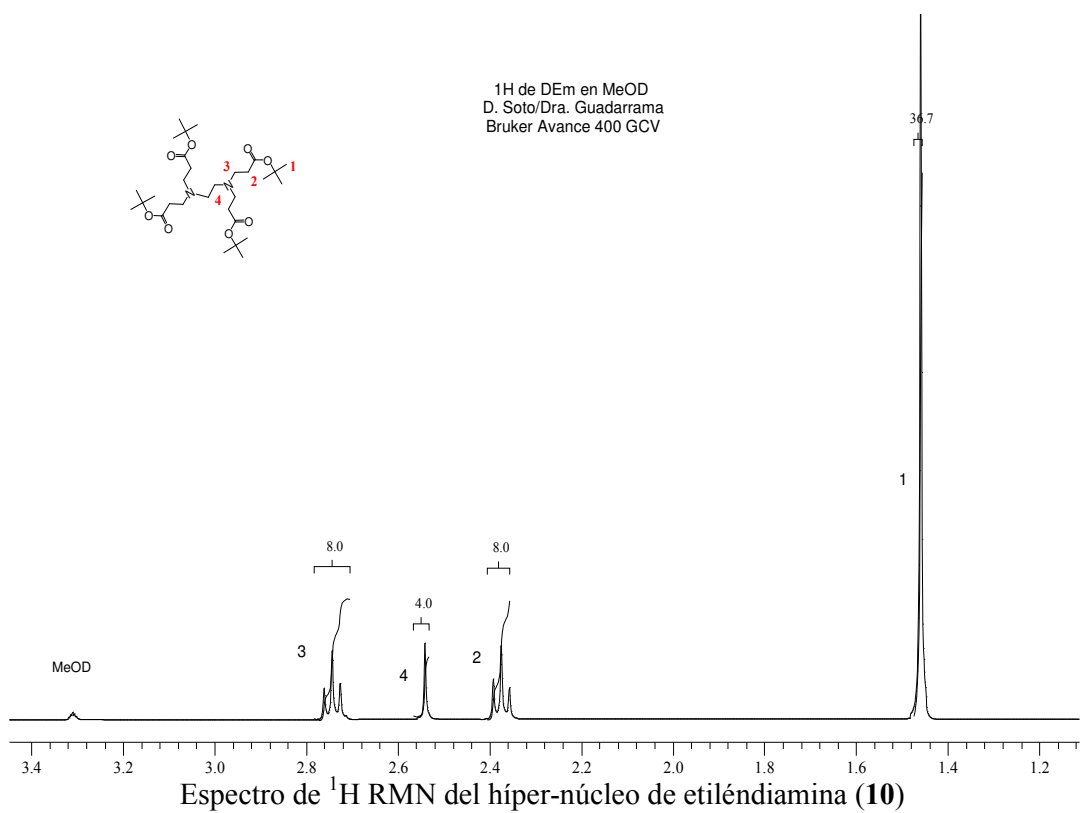
Compuesto 10



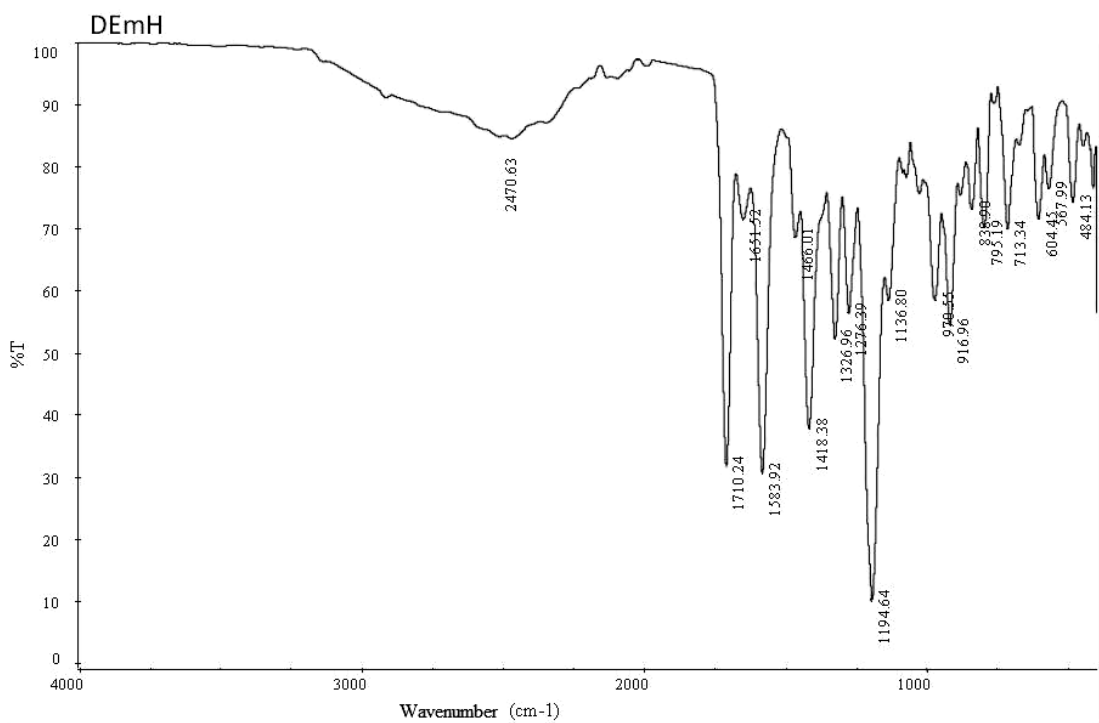
Espectro de infrarrojo del hiper-núcleo de etiléndiamina (10)



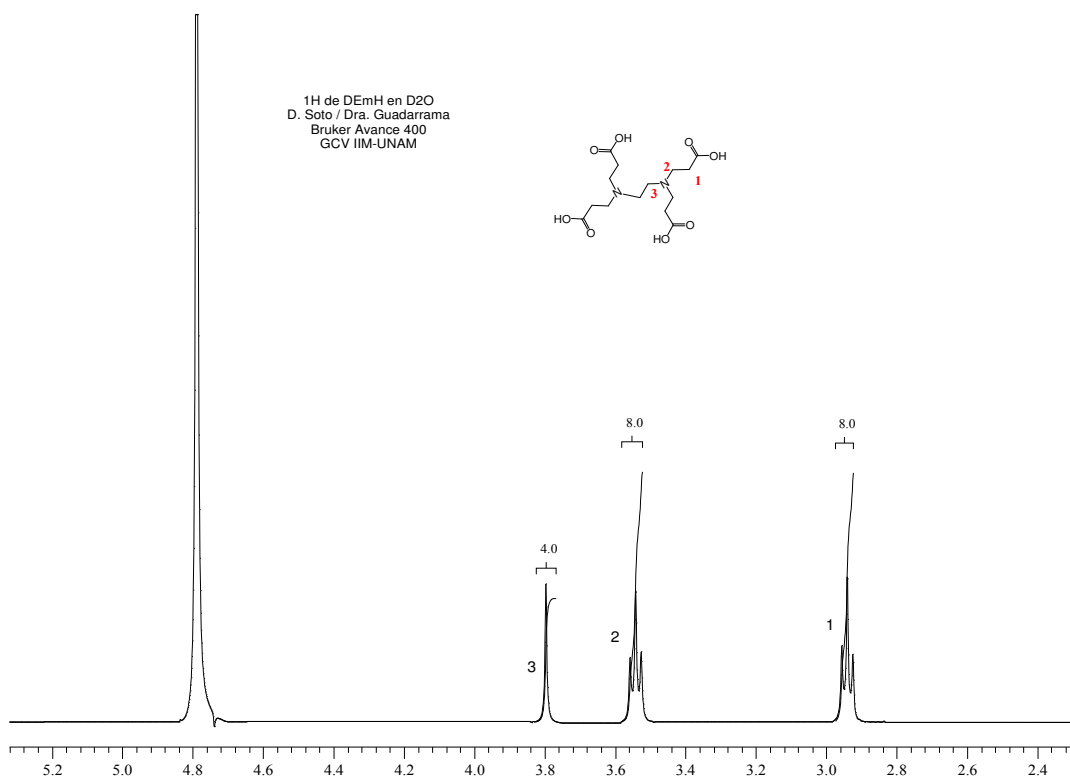
Espectro de ^{13}C RMN del hiper-núcleo de etiléndiamina (10)



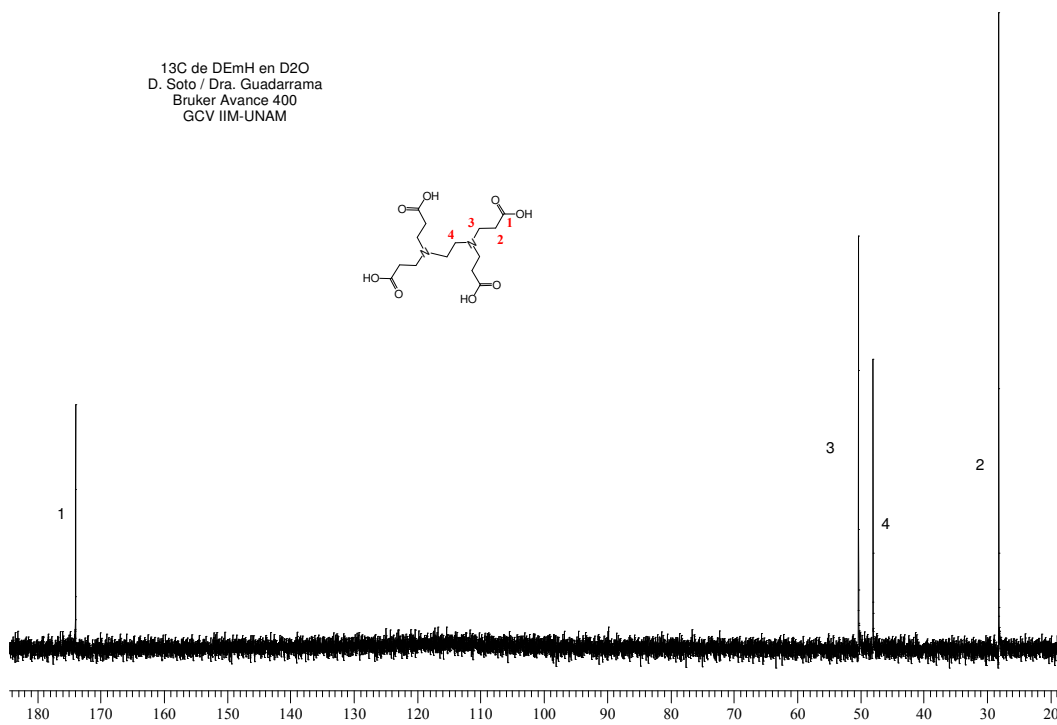
Compuesto 11



Espectro de infrarrojo del hiper-núcleo de etiléndiamina con terminales COOH (11)

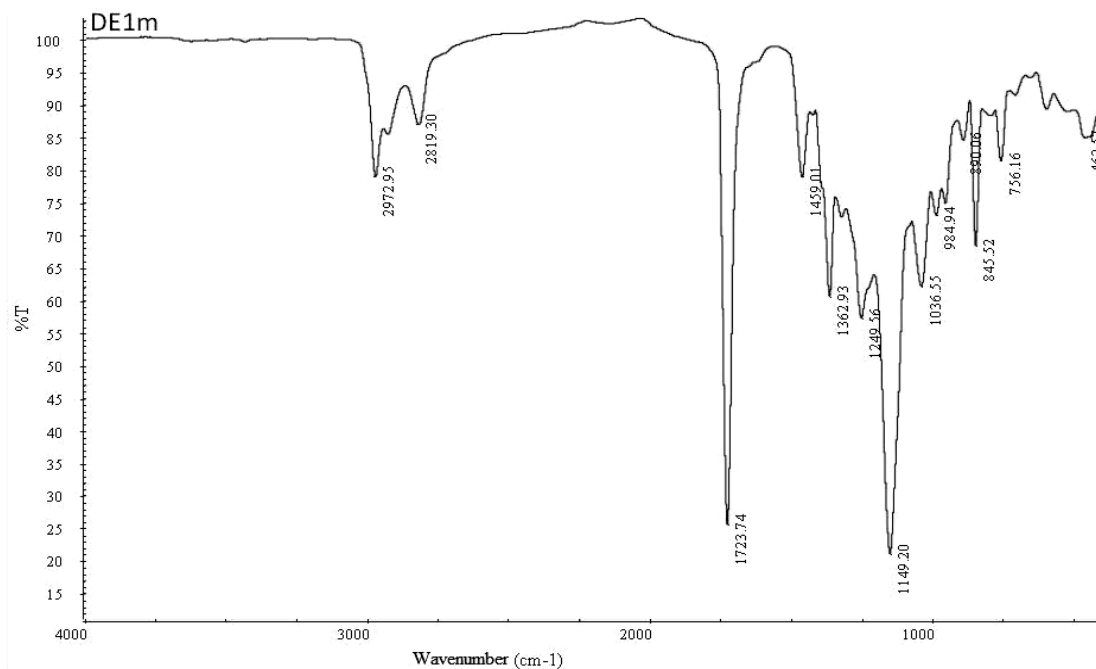


Espectro de ^1H RMN del híper-núcleo de etiléndiamina con terminales COOH (**11**)

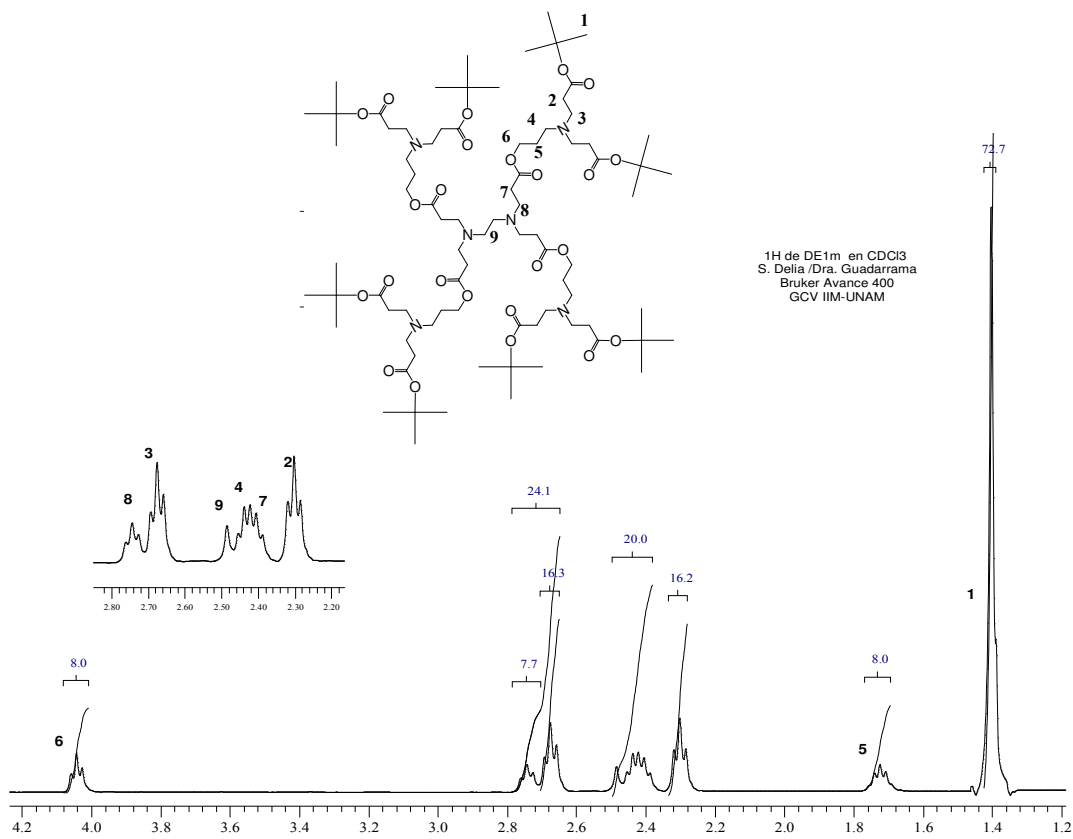


Espectro de ^{13}C RMN del híper-núcleo de etiléndiamina con terminales COOH (**11**)

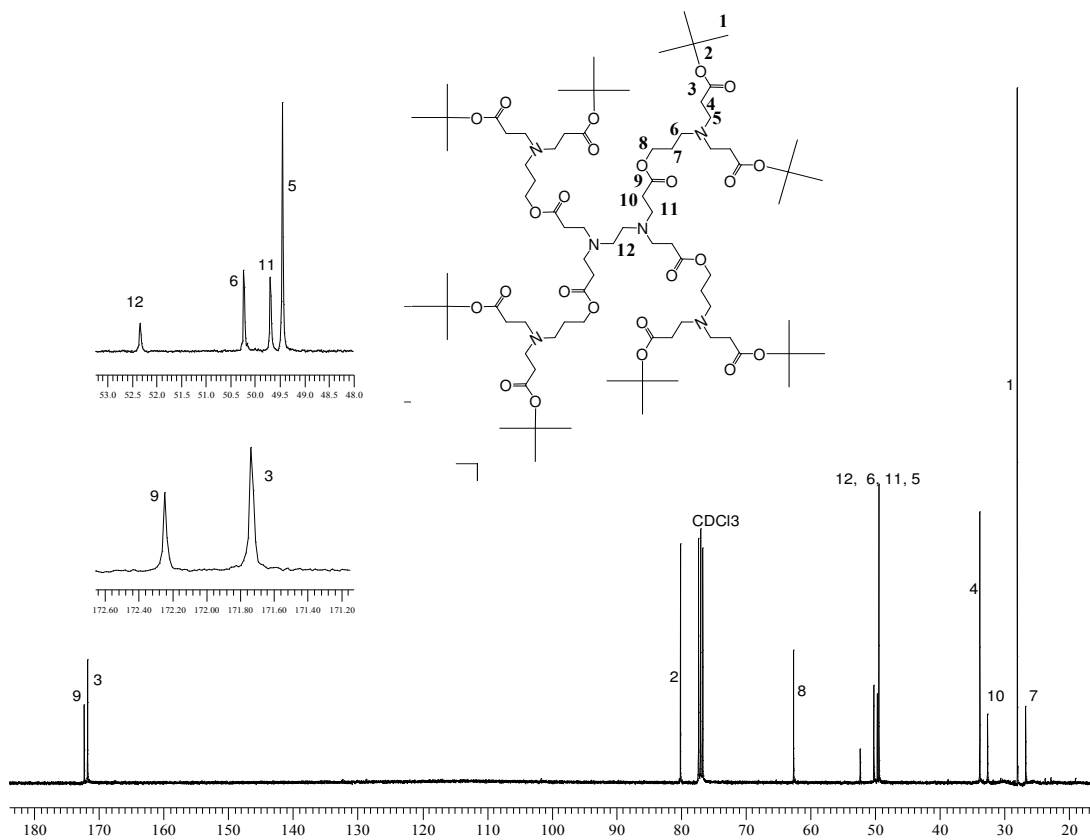
Compuesto 12



Espectro de infrarrojo del DE G1.5 (12)

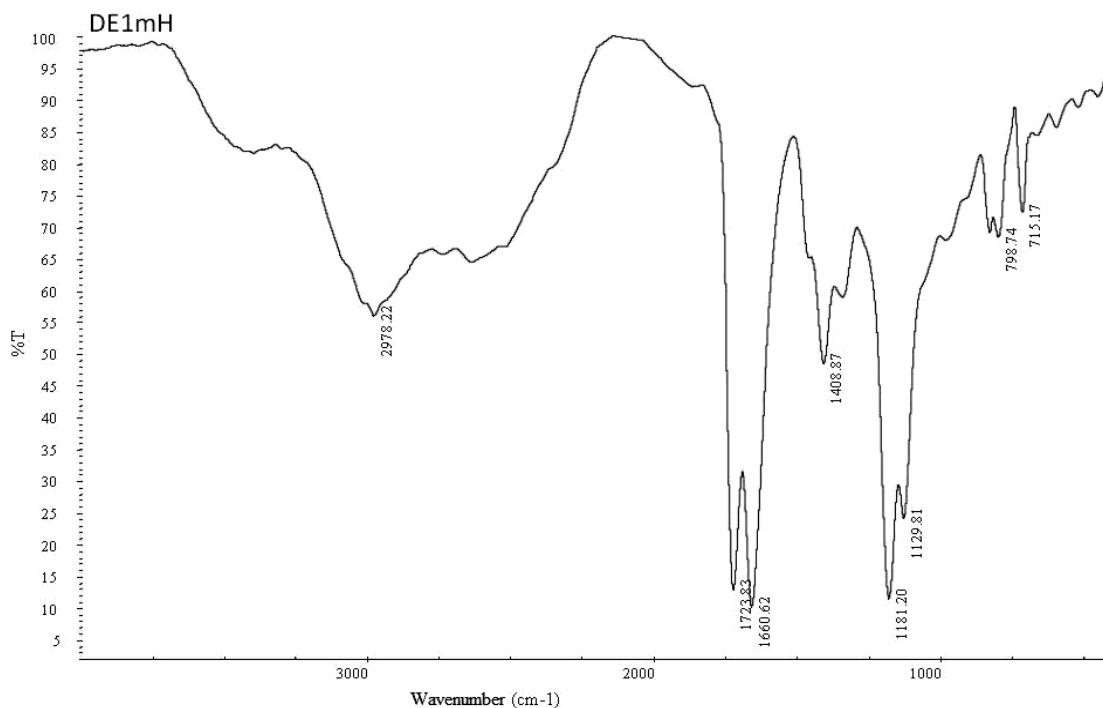


Espectro de ¹H RMN del DE G1.5 (12)

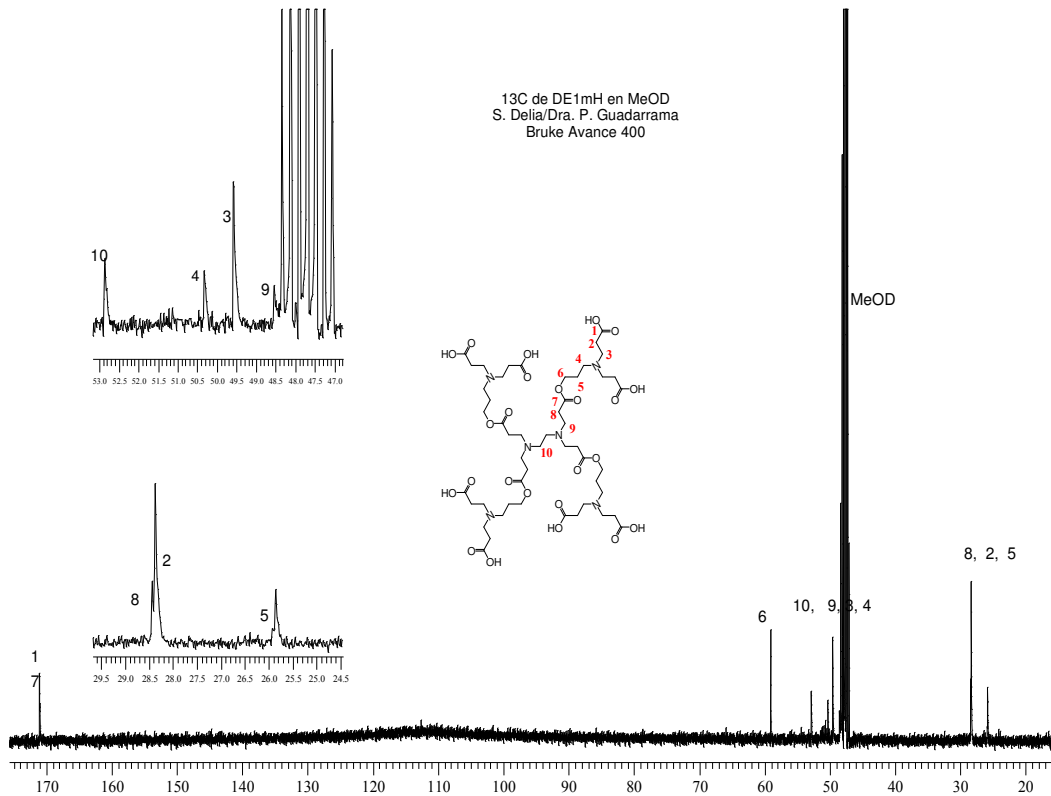


Espectro de ¹³C RMN del DE G1.5 (12)

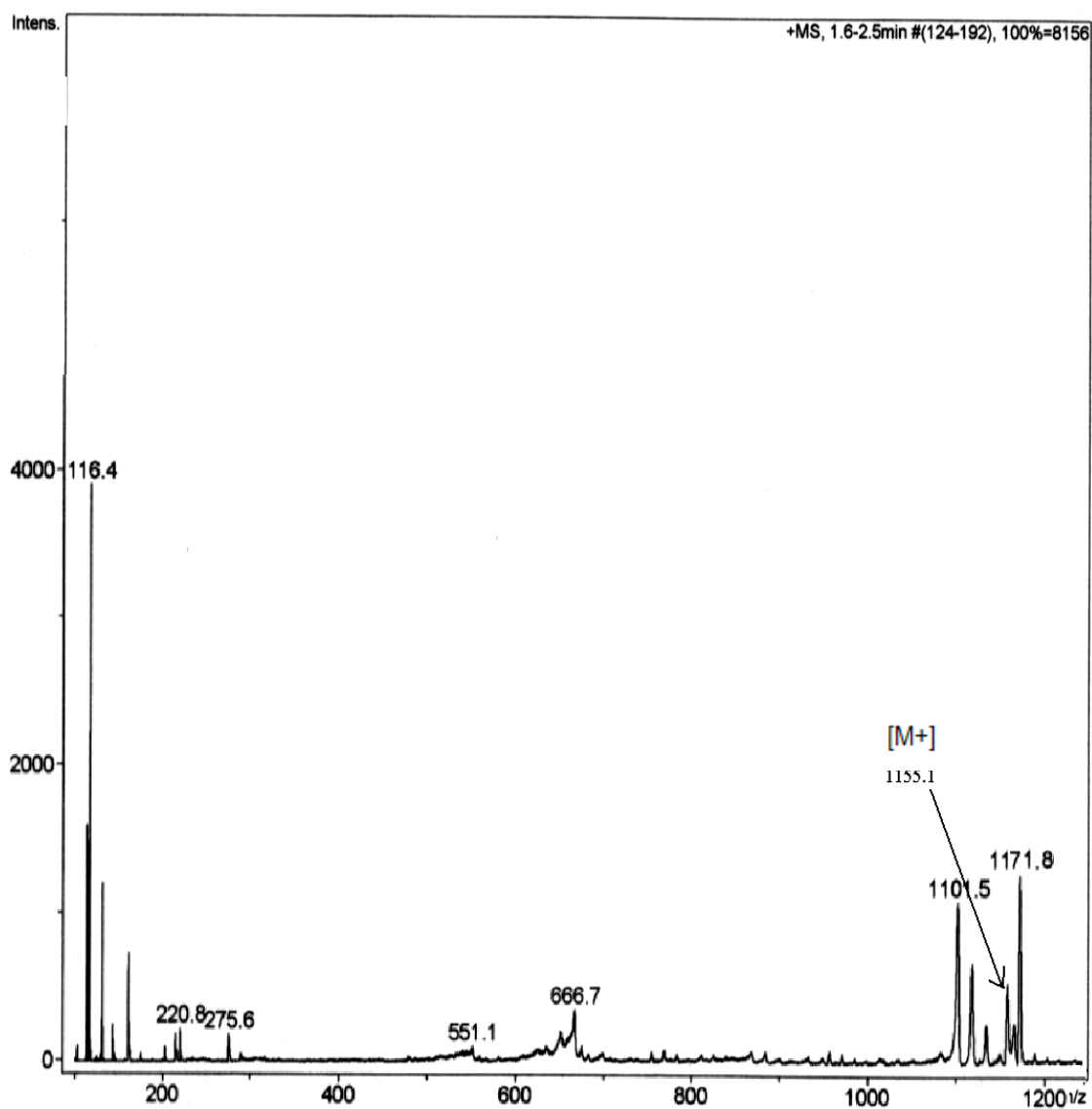
Compuesto 13



Espectro de infrarrojo del DE G1.5 terminales COOH (13)

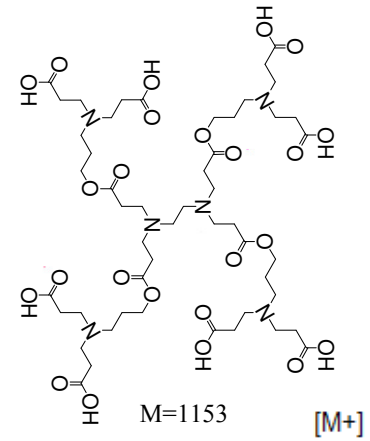
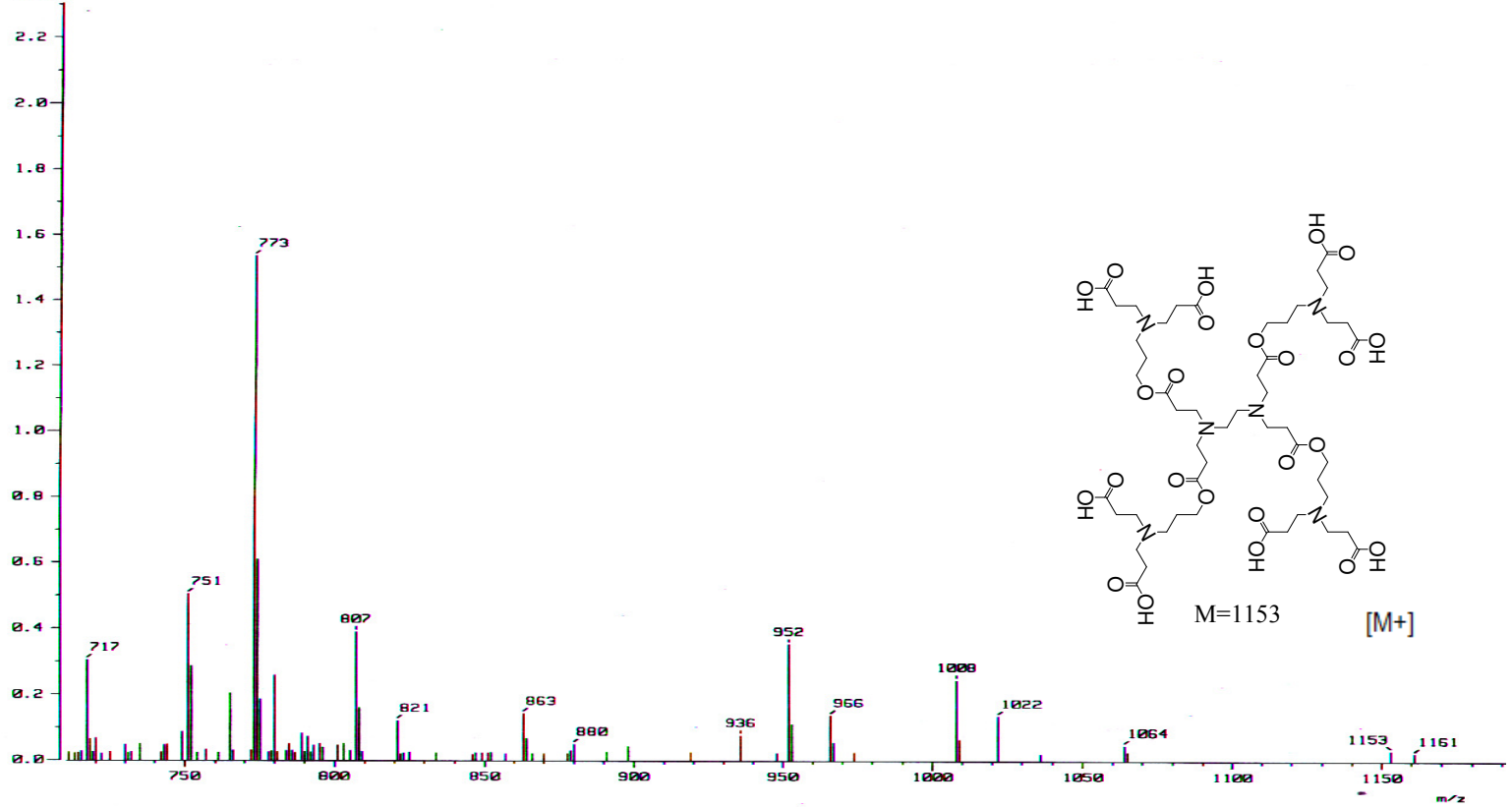


Espectro de ¹³C RMN del DE G1.5 terminales COOH (13)



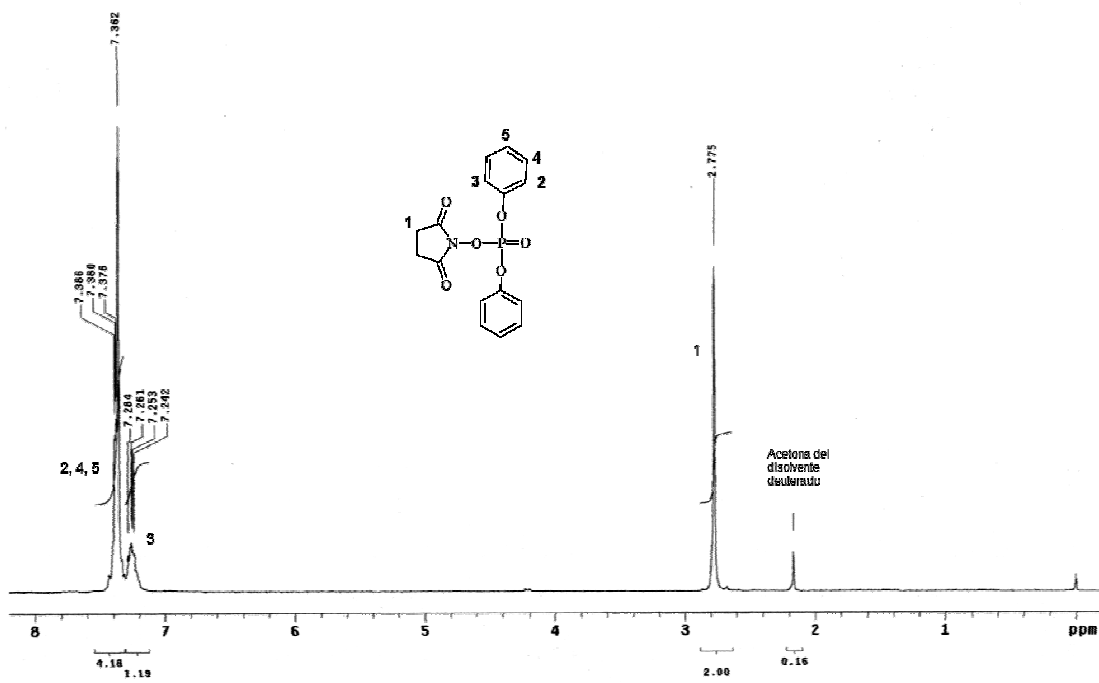
Espectro de ESI(+MS) del DE G1.5 terminales COOH (13)

[Mass Spectrum]
 Data : Dr-Marcos-Mtz116 Date : 25-May-2010 13:01
 Sample: 471 DE1m-H
 Note : Luis-Velasco
 Inlet : Direct Ion Mode : FAB+
 Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
 RT : 1.51 min Scan# : (2,11)
 BP : m/z 154.0000 Int. : 242.90
 Output m/z range : 710.3315 to 1294.0026 Cut Level : 0.00 %
 58690



Compuesto 16

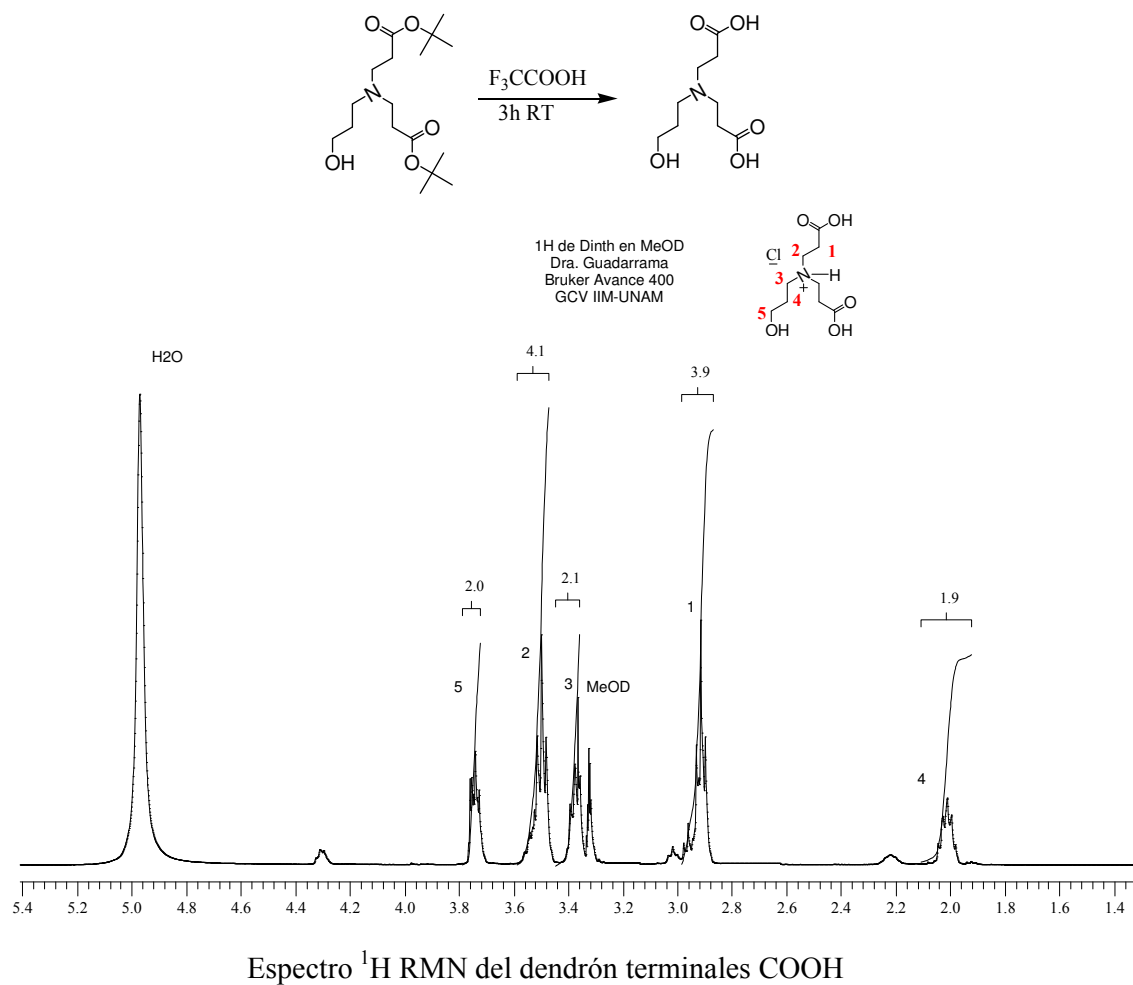
P. Guadarrama - D. Soto
sample: SDPP 200MHz CDCl3 1H
14-12-2010



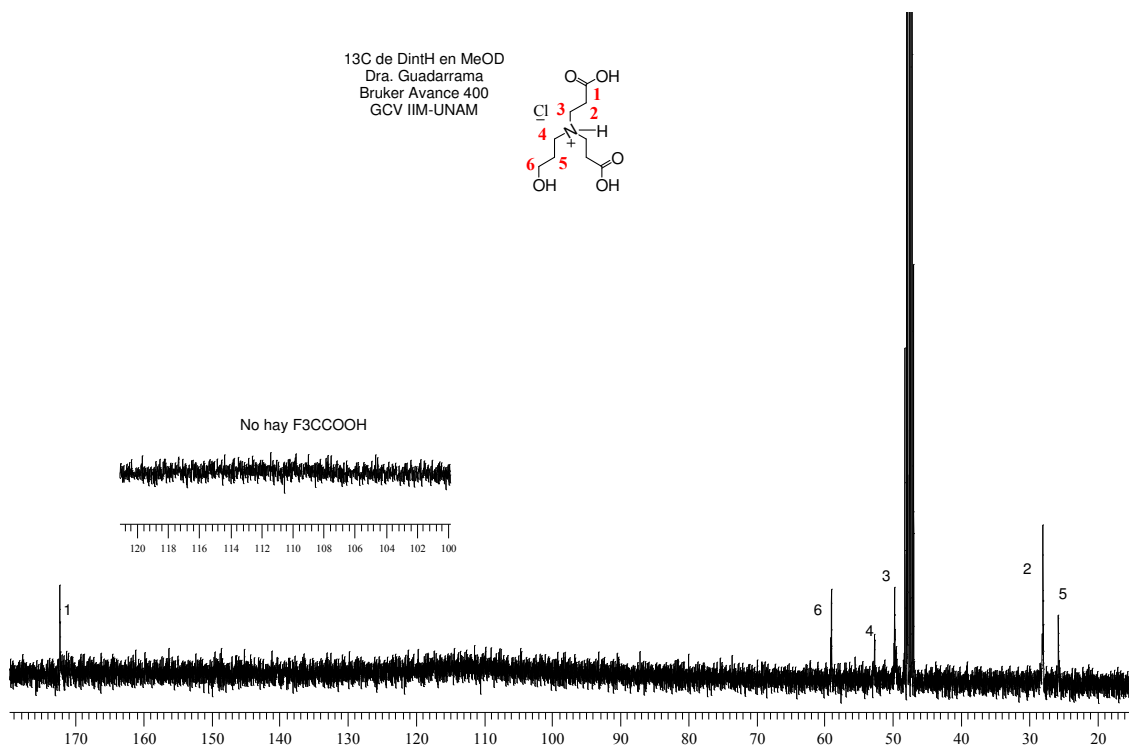
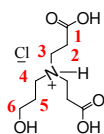
Espectro RMN ¹H del compuesto **16** N-Succinimidil Difenil Fosfato (SDPP)

Anexo 4. Hidrólisis del dendrón interno para pruebas *in vitro*.

Se plantea, que en condiciones ácidas los dendrímeros pueden llegar a hidrolizarse en las uniones éster, por ello, con la finalidad de evaluar la citotoxicidad de las posibles partes en que pueden descomponerse, se realizó la hidrólisis del dendrón **4** en TFA siguiendo la metodología descrita para las hidrólisis (sección 4.5.3)



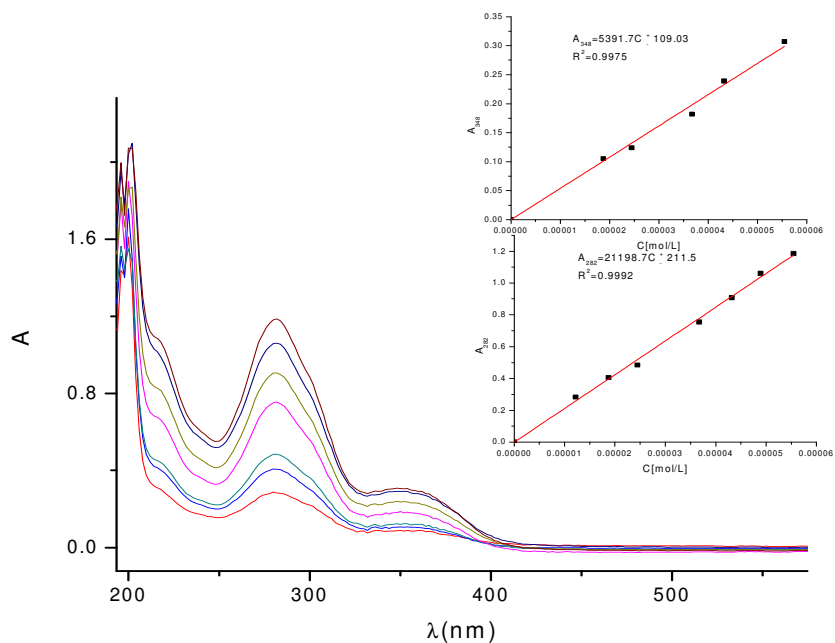
13C de DintH en MeOD
Dra. Guadarrama
Bruker Avance 400
GCV IIM-UNAM



Espectro ^{13}C RMN del dendrón terminales COOH

Anexo 5. Curva de calibración del ácido fólico

Con la finalidad de determinar las concentraciones de MTX y AF en las fracciones, se hizo una curva de calibración del AF disuelto en PBS. Si bien esta curva no se puede usar directamente, ya que la fracción 4 contiene tanto al MTX como al AF y los máximos se traspalan, nos muestra que para las concentraciones especificadas cumple con la ley de Lambert-Beer



Espectros de absorción del AF en PBS pH 7.4 y curva de calibración a 282 y 348nm en un rango de concentraciones de 1.2×10^{-5} a 5.5×10^{-5} M.

-
- ¹ Sociedad Americana de Cáncer, *Datos y estadísticas sobre el cáncer en los Hispanos/Latinos 2009-2011*. American Cancer Society **2009**,
(<http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFiguresforHispanicsLatinos/datos-y-estad%C3%ADsticas-sobre-el-c%C3%A1ncer-entre-los-hispanos-latinos-2009-2011>)
- ² Kumar, S. S. R. C., *Nanotechnologies for the Life Sciences Vol. 6. Nanomaterials for Cancer Therapy*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Alemania, **2006**.
- ³ Huennekens, F. M., “The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents,” *Adv. Enzyme Regul.*, **1994**, 34, 397-419
- ⁴ Methotrexate, <http://en.wikipedia.org/wiki/Methotrexate>, última consulta 20 de enero de 2011
- ⁵ Goldman, I. D. and Matherly, L. H., “The cellular pharmacology of methotrexate”, *Pharmacol. Ther.*, **1985**, 28, 77–102.
- ⁶ Methotrexate (Trexall®), <http://www.cancerquest.org/drugs/methotrexate>, última consulta 20 de enero de 2011.
- ⁷ Van Dooren-Greebe, R. J., Kuijpers, A. L. A., Mulder, J., De Boo, T. H. and Van de Kerkhof, P. C. M., “Methotrexate revisited: effects of long-term treatment in psoriasis”, *British Journal of Dermatology*, **1994**, 130, 204-210.
- ⁸ Shen, W. C., Ryser, H. J. and LaManna, L., “Disulfide spacer between methotrexate and poly(D-lysine): a probe for exploring the reductive process in endocytosis”, *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 10905-10908
- ⁹ Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P., “Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, 54, 631–651.
- ¹⁰ Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J. O., Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2004**, 56, 1649– 1659.
- ¹¹ Williams A. S., Topley N., Williams B.D., “Effect of liposomally encapsulated MTX-DMPE conjugates upon TNF alpha and PGE2 release by lipopolysaccharide stimulated rat peritoneal macrophages”, *Biochim Biophys Acta*. **1994**, 1225, 217–222.
- ¹² Majoros, I., Thomas, T., Mehta, C. and Baker Jr., J. R., “PAMAM dendrimer-based multi-functional engineered nanodevice for cancer therapy” *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 5892–5899.
- ¹³ Paclitaxel (Taxol®, Abraxane®, Onxol®), <http://www.cancerquest.org/drugs/paclitaxel>, **Emory University**, última consulta 19 de enero de 2011.
Paclitaxel, 16 January 2011, <http://en.wikipedia.org/wiki/Paclitaxel>, última consulta 19 de enero de 2011.
- ¹⁴ Heldman, A. W., Cheng, L., Jenkins, G. M., Heller, P.F., Kim, D. W., Ware, M. Jr, Nater, C., Hruban, R., H., Rezai, B., Abella, B. S., Bunge, K. E., Kinsella, J. L., Sollott, S. J., Lakatta, E. G., Brinker, J. A., Hunter, W. L., Froehlich, J. P., “Paclitaxel stent coating inhibits neointimal hyperplasia at 4 weeks in a porcine model of coronary restenosis”, *Circulation*, **2001**, 103, 2289-2295.
- ¹⁵ Rowinsky, K., Donehower, R.C., “Paclitaxel (Taxol)”, *New Engl. J. Med.*, **1995**, 332, 1004–1014.
- ¹⁶ Spencer, C. M., Faulds, D., “Paclitaxel: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer”, *Drugs*, **1994**, 48, 794–847.
- ¹⁷ Horwitz, S. B., “Mechanism of action of Taxol”, *Trends Pharmacol. Sci.*, **1992**, 13, 134–136.

-
- ¹⁸ Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M. S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D. M., Moore, P. S., "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma", *Science*, **1994**, 266, 1865-1869
- ¹⁹ Tustian, A. K., Schneider, B., Lalji, S., Wentzel, W. Ma. B., Kessler, D., Worah, D. and Steven C., "Formulation development and antitumor activity of a filter sterilizable emulsion of paclitaxel", *Pharmaceutical Research*, **2000**, 17, 175-182.
- ²⁰ Kim, S. C., Kim, D. W., Shim, Y. H., Bang, J. S., Oh, H. S., Kim, S. W., Seo, M. H., "In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy", *J. Con. Rel.*, **2001**, 72, 191-202.
- ²¹ Ceruti, M., Crosasso, P., Brusa, P., Arpicco, S., Dosio, F., Cattel, L., "Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing water-soluble prodrugs of paclitaxel", *J. Con. Rel.*, **2000**, 63, 141-153.
- ²² Feng, S. S., Huang, G., "Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers", *J. Con. Rel.*, **2001**, 71, 53-69.
- ²³ Mu, L., Feng, S. S., "A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS", *J. Con. Rel.*, **2003**, 86, 33-48
- ²⁴ Alcaro, S., Ventura, C. A., Paolino, D., Battaglia, D., Ortuso, F., Cattel, L., Puglisic, G., Fresta, M., "Preparation, characterization, molecular modeling and In Vitro activity of paclitaxel-cyclodextrin complexes", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, 12, 1637-1641
- ²⁵ Chen, S., Zhang, X. Z., Cheng, S. X., Zhuo, R. X. and Gu, Z. W., "Functionalized amphiphilic hyperbranched polymers for targeted drug delivery", *Biomacromolecules*, **2008**, 9, 2578-2585.
- ²⁶ Uchegbu, I. U., Schatzlein, A. G., *Polymers in Drug Delivery*, CRC Press, Taylor and Francis Group, **2006**, 280p.
- ²⁷ Matsumura, Y. and Maeda, H., "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS", *Cancer Res.*, **1986**, 46, 6387-6392.
- ²⁸ Endocytosis, <http://es.wikipedia.org/wiki/Endocytosis>, última consulta 20 enero de 2011.
- ²⁹ Boas, U., Christensen, D. J. B., Heegaard, P. M. H., *Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools*, RSC, **2006**, 182p.
- ³⁰ Gardikis, K., Micha-Screttas, M., Steele, B. R., Demetzos, C., "An overview of dendrimers and their biomedical applications", *Pharmakeftiki*, **2006**, 19, 89-92.
- ³¹ Newkome;G. R., Moorefield;C. N, Vögtle;F., *Dendritic Molecules: Concepts, Syntheses and Perspectives*, VCH, **1996**,
- ³² Bosman, A. W., Janssen, H. M., Meijer, E. W., "About dendrimers: Structure, physical properties, and applications", *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1665-1688.
- ³³ Esfand, R. and Tomalia, D. A., "Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications", *DDT*, **2001**, 6, 427-436.
- ³⁴ Tekade, R. K., Kumar, P. V., Jain, N. K., "Dendrimers in oncology: An expanding horizon", *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 49-87

-
- ³⁵ D'Emanuele, A. and Attwood, D., "Dendrimers: a Versatile Targeting Platform", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, 57, 2147–2162
- ³⁶ Tomalia, D. A., "The dendritic state", *Materials today*, **2005**, 8, 34-46
- ³⁷ Tomalia, D. A., Baker, E., Dewald, J., Hall, M., Kalla, G., Martin, S., Raeck, J., Ryder, J. and Smith, P., "Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers", *Macromolecules*, **1986**, 19, 2466-2468;
- ³⁸ Newkome, G. R., He, E., Moorefield, C. N., "Suprasuper molecules with novel properties: Metallodendrimers", *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1689-1746.
- ³⁹ Lothian-Tomalia, M. K., Hedstrand, D. M. and Tomalia, D. A., A Contemporary Survey of Covalent Connectivity and Complexity. The Divergent Synthesis of Poly(thioether) Dendrimers. Amplified, Genealogically Directed Synthesis Leading to the de Gennes Dense Packed State, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 15495-15513.
- ⁴⁰ Buyle, P. A. and Hall, Jr., H. K., "Starburst Polyether Dendrimers", *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 5305-5312
- ⁴¹ Hawker, C. J. and Frechet, J. M. J., Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 7638-7647
- ⁴² Wooley, K. L., Hawker, C. J. and Frechet, J. M. J., "Hyperbranched macromolecules via a novel double-stage convergent growth approach", *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 4252-4261
- ⁴³ Kawaguchi, T., Walker, K. L., Wilkins, C. L. and Moore, J. S.; "Double exponential dendrimer growth", *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 2159-2165.
- ⁴⁴ Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., Roeck, J., Ryder, J. and Smith, P., A new class of polymers-starburst-dendritic macromolecules, *Polym. J.*, **1985**, 17, 117-132.
- ⁴⁵ De Brabander-van den Berg, E. M. M., Meijer, E. W., "Poly (propylenimine) dendrimers: Large scale synthesis by heterogeneously catalyzed hydrogenation", *Angew Chem Int Ed Engl.*, **1993**, 32, 1308-1311
- ⁴⁶ Lee, C. C., Mackay, J. A., Fréchet, J. M. J. and Szoka; F. C., Designing dendrimers for biological applications, *Nat. Biotech.*, **2005**, 23, 1517-1526
- ⁴⁷ Evangelista, L. A. and Guadarrama, P., "Theoretical Evaluation of the nanocarrier properties of two families of functionalized dendrimers", *Int. J. of Quant Chem.*, **2005**, 103, 460-470.
- ⁴⁸ Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J. W., Meijer, E. W., Paulsd, W., Duncan, R., "Dendrimers: Relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo" *J. Con. Rel.*, **2000**, 65, 133–148.
- ⁴⁹ Cheng, Y., Xu, Z., Ma, M., Xu, T., Dendrimers as drug carriers: Applications in different routes of drug administration, *J. Pharm. Sci.*, **2008**, 97, 123-143.
- ⁵⁰ Soto-Castro, D., Evangelista-Lara, A. and Guadarrama, P., "Theoretical Design of dendrimeric fractal patterns for the encapsulation of a family of drugs: salicylanilides", *Tetrahedron*, **2006**, 62, 12116-12125.
- ⁵¹ Lee, I., Athey, B. D., Wetzel, A., W., Meixner, W., Baker Jr., J. R., "Structural molecular dynamics studies on polyamidoamine dendrimers for a therapeutic application: effects of pH and generation", *Macromolecules*, **2002**, 35, 4510-4520.

-
- ⁵² Welch, P. and Muthukumar, M., "Tuning the density profile of dendritic polyelectrolytes", *Macromolecules*, **1998**, 31, 5892-5897.
- ⁵³ Boas, U. and Heegaard, P. M. H., *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, 33, 43-63.
- ⁵⁴ Twaites, B., Alarcón, C. and Alexander, C., "Synthetic polymers as drugs and therapeutics", *J. Mater. Chem.*, **2005**, 15, 441-455
- ⁵⁵ Liu, M. and Fréchet, J. M. J., "Designing dendrimers for drug delivery" *Pharm. Sci.Tech. Today*, **1999**, 2, 393-401
- ⁵⁶ Jevprasesphant, R., Cowley, J., Day, N., Penny, J., Attwood, D., D' Emanuele, D., "Development of Dendrimer Carriers for Oral Drug Delivery", *Pharmakeftiki*, **2006**, 19, 93-100.
- ⁵⁷ Jevprasesphant, R., Penny, J., Attwood, D., McKeown, N. B. and D'Emmanuele, A., "Engineering of dendrimer surfaces to enhance transepithelial transport and reduce cytotoxicity", *Pharm. Res.*, **2003**, 20, 1543-1550.
- ⁵⁸ Kobayashi, H., Sato, N., Kawamoto, S., Saga, T., Hiraga, A., Haque, T. L., Ishimori, T., Konishi, J., Togashi, K. and Brechbiel, M.W., "Comparison of the macromolecular MR contrast agents with ethylenediamine-core versus ammonia-core generation-6 polyamidoamine dendrimer", *Bioconjugate Chem.*, **2001**, 12, 100-107
- ⁵⁹ Kobayashi, H., Kawamoto, S., Saga, T., Sato, N., Hiraga, A., Ishimori, T., Konishi, J., Togashi, K. and Brechbiel, M.W., "Positive effects of polyethylene glycol conjugation to generation-4 polyamidoamine dendrimers as macromolecular MR contrast agents", *Magn. Res. Med.*, **2001**, 46, 781-788
- ⁶⁰ Plank, C., Mechtler, K., Szoka, F. C. and Wagner, E., "Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: A potential barrier for intravenous gene delivery", *Human Gene Ther.*, **1996**, 7, 1437-1446.
- ⁶¹ Fréchet, J. M. J. and Tomalia, D. A., *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*, John Wiley & Sons, Ltd. USA **2001**, 668p.
- ⁶² Fischer, M. and Vögtle, F., "Dendrimers: From design to application-a progress report", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 884-905
- ⁶³ Witvrouw, M., Fikkert, V., Pluymers, W., Matthews, B., Mardel, K., Schols, D., Raff, J., Debyser, Z., De Clercq, E., Holan, G. and Pannecouque, C., "Polyanionic (i.e., polysulfonate) dendrimers can inhibit the replication of human immunodeficiency virus by interfering with both virus adsorption and later steps (reverse transcriptase/integrase) in the virus replicative cycle", *Mol. Pharm.*, **2000**, 58, 1100-1108
- ⁶⁴ McCarthy, T. D., Karellas, P., Henderson, S. A., Giannis, M., O'Keefe, D. F., Heery, G., Paull, G. R. A., Matthews, B. R. and Holan, G., "Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimer-based microbicides for HIV and STI prevention", *Mol. Pharm.*, **2005**, 2, 312-318.
- ⁶⁵ Bourne, N., Stanberry, L. R., Kern, E. R., Holan, G., Matthews, B. and Bernstein, D. I., "Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC)*, **2000**, 44, 2471-2474
- ⁶⁶ Zeng, F. and Zimmerman, S. C., "Dendrimers in supramolecular chemistry: from molecular recognition to self-assembly", *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 1681-1712

- ⁶⁷ Jansen, J. F. G. A., Meijer, E. W. and de Brabander-van den Berg, E. M. M., "The dendritic box: shape-selective liberation of encapsulated guests", *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 4417-4418,
- ⁶⁸ Jansen, J. F. G. A., de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W., "Encapsulation of guest molecules into a dendritic box", *Science*, **1994**, 266, 1226-1229
- ⁶⁹ Morgan, M. T.; Carnahan, M. A., Immoos, C. E., Ribeiro, A. A.; Finkelstein, S.; Le. Grinstaff, M. W., "Dendritic molecular capsules for hydrophobic compounds", *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 15485-15489.
- ⁷⁰ Morgan, M. T, Nakanishi, Y., Kroll, D. J., Griset, A. P., Carnahan, M. A., Wathier, M., Oberlies, N. H., Manikumar, G., Wani, M. C. and Grinstaff, M. W., "Dendrimer-encapsulated camptothecins: increased solubility, cellular uptake, and cellular retention affords enhanced anticancer activity in vitro", *Cancer Res.*, **2006**, 66, 11913-11921.
- ⁷¹ Twyman, L. J., Beezer, A. E., Esfand, R., Hardy, M. J., Mitchell, J. C., "The synthesis of water soluble dendrimers, and their application as possible drug delivery systems", *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 1743-1746
- ⁷² Kolhe, P., Misra, E., Kannana, R. M., Kannanb, S. and Lieh-Lai, M., "Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers", *Int. J Pharm.*, **2003**, 259, 143-160.
- ⁷³ Beezer, A. E., King, A. S. H., Martin, I. K., Mitchel, J. C., Twymanb, L. J. and Wain, C. F., "Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives", *Tetrahedron*, **2003**, 59, 3873-3880.
- ⁷⁴ Chauhan, A. S., Sridevi, S., Chalasani, K. B., Jain, A. K., Jainb, S. K., Jainb, N. K. and Diwana, P.V., "Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin", *J.Cont Rel.*, **2003**, 90, 335-343.
- ⁷⁵ Hu, J., Cheng, Y., Ma, Y., Wu, Q. and Xu, T., Host-guest chemistry and physicochemical properties of the dendrimer-mycophenolic acid complex, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, 64-74.
- ⁷⁶ Broeren, M. A. C., de Waal, B. F. M., van Genderen, M. H. P., Sanders, H. M. H. F., Fytas, G. and Meijer, E. W., Multicomponent host-guest chemistry of carboxylic acid and phosphonic acid based guests with dendritic hosts: an NMR study, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127 (29), 10334-10343,
- ⁷⁷ Ooya, T., Lee, J. and Park, K., Hydrotropic dendrimers of generations 4 and 5: synthesis, characterization, and hydrotropic solubilization of paclitaxel, *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15, 1221-1229
- ⁷⁸ Patri, A. K., Majoros, I. J. and Baker Jr, J. R., Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery, *Cur. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6:466-471
- ⁷⁹ Kojima, C., Kono, K., Maruyama, K. and Takagishi, T., Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs, *Bioconjugate Chem.*, **2000**, 11, 910-917
- ⁸⁰ Ihre, H. R., Padilla De Jesús, O. L., Szoka, F. C. and Frechet, J. M. J., "Polyester dendritic systems for drug delivery applications: Design, synthesis, and characterization", *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 443-452
- ⁸¹ Wiener, E. C., Konda, S., Shadron, A., Brechbiel, M., Gansow, O., "Targeting dendrimer-chelates to tumors and tumor cells expressing the high-affinity folate receptor", *Invest. Radiol.*, **1997**, 32, 748-754.

- ⁸² Gabius, H. J., Schroter, C., Gabius, S., Brinck, U. and Tietze, L. F., "Binding of t-antigen-bearing neoglycoprotein and peanut agglutinin to cultured tumor cells and breast carcinomas", *J. Histochem. Cytochem.*, **1990**, 38, 1625-1631.
- ⁸³ Rockendorf, N. and Lindhorst, T. K., "Glycodendrimers", *Topics in Current Chem.*, **2001**, 217, 201-238.
- ⁸⁴ Roy, R., "Syntheses and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1996**, 6, 692-702.
- ⁸⁵ Palmer, T. N., Caride, V. J., Caldecourt, M. A., Twickler, J. and Abdullah, V., "The mechanism of liposome accumulation in infarction", *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 797, 363-368.
- ⁸⁶ Gabizon, A.A., "Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy", *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1995**, 16, 285-294
- ⁸⁷ Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K., "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review", *J. Cont. Rel.*, 2000, 65, 271-284.
- ⁸⁸ Tsvetkov, D. E. and Nifantiev, N. E., "Dendritic polymers in glycobiology", *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.*, **2005**, 54, 1065-1083.
- ⁸⁹ Ogura, H.; Nagai, S.; Takeda, K., A Novel Reagent (NSuccinimidyl Diphenyl Phosphate) for Synthesis of Active Ester and Peptide, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21, 1467-1468.
- ⁹⁰ A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paul, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray-Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boyd. *JNCI*, **1991**, 38, 757-766
- ⁹¹ W.L. Jorgensen, D.S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 11225-11236.
- ⁹² I. Kolossvary, W.C. Guida, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 5011-5019.
- ⁹³ G. Chang, W.C. Guida, W. C. Still, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 4379-4386;
- ⁹⁴ M. Saunders, K. N. Houk, Y. D. Wu, W. C. Still, M. Lipton, G. Chang, W.C. Guida, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1419-1427.
- ⁹⁵ P. Goodford, *J. Med. Chem.*, **1985**, 28, 849-857.
- ⁹⁶ Maestro v 6.5.007; *Schrödinger Inc.*, New York, **2004**.
- ⁹⁷ Krishna, T. R., Jain, S., Tatu, U. S. and Jayaraman, N., Synthesis and biological evaluation of 3-amino-propan-1-ol based poly(ether imine) dendrimers, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 4281-4288.
- ⁹⁸ Fernandez, L.; Calderón, M.; Martinelli, M.; Strumia, M.; Cerecetto, H.; González, M.; Silber, J.J.; Santo, M.J. Evaluation of a new dendrimeric structure as prospective drugs carrier for intravenous administration of antichagasic active compounds. *Phys. Org. Chem.* **2008**, 21, 1079-1085.
- ⁹⁹ Fuchs, S.; Kapp, T.; Otto, H.; Schoneberg, T.; Franke, P.; Gust, R.; Schluter, A.D. A set of surface-modified dendrimers with potential application as drug delivery vehicles: Synthesis, *in vitro* cytotoxicity, and intracellular localization. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 1167-1192.
- ¹⁰⁰ Weener, J. W., van Dongen, J. L. J. and Meijer, E. W., Electrospray Mass Spectrometry Studies of Poly(Propylene Imine) Dendrimers: Probing Reactivity in the Gas Phase, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 10346-10355
- ¹⁰¹ Kainthan, R. K.; Hester, S. R.; Levin, E.; Devine, D. V.; Brooks, D. E. *Biomaterials*, **2007**, 28, 4581-4590; Kainthan, R. K.; Brooks, D. E. *Biomaterials*, **2007**, 28, 4779-4787

-
- ¹⁰² Luo, Y., Prestwich, G. D., Synthesis and Selective Cytotoxicity of a Hyaluronic Acid-Antitumor Bioconjugate, *Bioconjugate Chem.*, **1999**, 10, 755-763
- ¹⁰³ Majoros, I.J., Myc, A., Thomas, T., Mehta, C. B., Baker, J. R., PAMAM Dendrimer-Based Multifunctional Conjugate for Cancer Therapy: Synthesis, Characterization, and Functionality, *Biomacromolecules*, **2006**, 7, 572-579
- ¹⁰⁴ M.J. Alvarez-Figueroa, M.B. Delgado-Charro, J. Blanco-Méndez; *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, 212, 101-107