



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE NUEVOS SISTEMAS TIPO ESTRELLA Y DENDRÍTICOS PARA LA
LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. ISRAEL GONZÁLEZ MÉNDEZ

TUTOR

Dr. Ernesto Rivera García
Instituto de Investigaciones en Materiales

Ciudad de México, septiembre de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS DE NUEVOS SISTEMAS TIPO ESTRELLA Y
DENDRÍTICOS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
FÁRMACOS**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. ISRAEL GONZÁLEZ MÉNDEZ

TUTOR
Dr. Ernesto Rivera García
Instituto de Investigaciones en Materiales



Ciudad de México, Septiembre de 2019



PARTE DEL PRESENTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN LOS SIGUIENTES CONGRESOS:

- ✓ **Polymers and Organic Materials for Electronics and Photonics: Science for Applications, Praga, República Checa, del 10 al 14 de Septiembre de 2017.** Trabajo: "*Synthesis of novel supramolecular star-like and dendritic systems for controlled drug delivery*", Poster presentation.

- ✓ **International Conference on Polymers and Advanced Materials "Polymat", Huatulco, México, del 20 al 25 de octubre de 2017.** Trabajo: "*Synthesis of novel PAMAM dendritic system for controlled drug delivery*". Poster presentation.

- ✓ **XXVII International Materials Research Congress (IMRC-2017). Cancún, México, del 19 al 24 de agosto de 2018.** Trabajo: "*Synthesis of novel supramolecular dendritic system for controlled drug delivery*", Poster presentation.

Artículo publicado

- ✓ **González-Méndez I, Solano J. D., Porcu P., Ruiu A., Rojas-Aguirre Y. and Rivera E.** Optimized synthesis, characterization and *in vitro* systematic evaluation of adamantane-doxorubicin prodrugs sensitive to pH in breast cancer cells. *Journal of Molecular Structure* 1177 (2019) 143-151.



JURADO ASIGNADO

- Presidente** Dr. Francisco Hernández Luis
- Vocal** Dr. Francisco Javier Illescas Martínez
- Vocal** Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez
- Vocal** Dra. Patricia Guadarrama Acosta
- Secretario** Dra. Martha Verónica Escárcega Bobadilla

ASESOR

Dr. Ernesto Rivera García

SUSTENTANTE

M. en C. Israel González Méndez





Este trabajo se desarrolló en:

Laboratorio E-105 del Departamento de Reología del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Equipo: Anne-Marie Caminade, Dendrimères et Hétérochimie del Laboratoire de Chimie de Coordination UPR 8241, del Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Toulouse, Francia.



AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme el privilegio de formar parte de ella, y particularmente al Instituto de Investigaciones en Materiales por brindarme toda la infraestructura necesaria para realizar este proyecto de investigación.

Al Dr. Ernesto Rivera, por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación durante todos estos años, por manifestar su confianza en mi trabajo y por tomarse el tiempo necesario para aclarar mis dudas y hacer comentarios oportunos para mi desarrollo intelectual y personal, por brindarme su apoyo incondicional en todo momento.

Al apoyo financiero ofrecido por DGAPA a través del proyecto PAPIIT- IN101119 y por el Proyecto Bilateral México-Quebec CONACYT- FRQ 279380 para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, número de becario 288832), por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

Al M. en C. José D. Solano Becerra del departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, por siempre demostrar interés en el proyecto y realizar un extraordinario trabajo en la determinación de la actividad citotóxica.

Al M. en C. Gerardo Cedillo Valverde por su disposición, paciencia y gran entusiasmo al compartir toda su experiencia en la realización de espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

A la Dra. Josefa Bernad Bernad, por compartir todos sus conocimientos, por darme su apoyo y asesoría durante todos estos años, por su interés en mi formación y por preocuparse por mi progreso intelectual.

A la Dra. Anne-Marie Caminade por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación en el Laboratoire de Chimie de Coordination(LCC), por mostrar interés en mi desarrollo intelectual y por sus valiosos comentarios que sin duda enriquecieron el presente proyecto.

A la Dra. Kathleen Moineau Chane-Ching del LCC por su asesoría, apoyo y por todo el aprendizaje académico que me brindó durante la estancia doctoral.

Al Dr. Aurelien Hameau del LCC por fortalecer mis conocimientos sintéticos, por guiarme en cada paso para lograr este proyecto.

Al Dr. Regis Laurent del LCC por su amabilidad, apoyo y disposición en todo momento durante la realización del proyecto en el LCC.

Al Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz por su apoyo, asesoría, disposición y todo el conocimiento invertido en el proyecto.

A la Dra. Laura Domínguez Dueñas por su asesoría, disponibilidad e interés por apoyar la realización del presente trabajo.





A la Q.F.B. Karla Eriseth Reyes Morales por la asistencia en la realización de los termogramas de Calorimetría Diferencial de Barrido y de Análisis Termogravimétrico.

Al la M. en C. Lucero Mayra Rios Ruiz del área de Espectrometría de Masas del Instituto de Química por el apoyo en la realización de los espectros de masas.

A la Q. Eréndira García Ríos del área de Polarimetría del Instituto de Química por la adquisición de espectros de IR.

A todos los doctores integrantes del jurado, por su disposición y sus valiosos comentarios que enriquecieron en gran medida este trabajo.



DEDICATORIAS

Quiero dedicar este sueño a la M. en C. Kendra Ivón Sorroza Martínez, gracias por ser una persona maravillosa, gracias por brindarme todas esas virtudes que te caracterizan; todo tu amor, cariño, paciencia, bondad, inteligencia, gracias por dedicar tu tiempo a apoyarme incondicionalmente. Gracias por estar en los buenos, pero sobre todo en los momentos complicados. Gracias por ser mi energía para seguir adelante en cada etapa de nuestras vidas. Gracias por los hermosos momentos compartidos, todas las sonrisas, por ser mi columna aún a cientos de kilómetros de distancia. Gracias por ser mi compañera ideal en esta vida y en toda la eternidad, porque gracias a ti todo esto fue posible AMOR DE MI VIDA.

A la Dra. Elena Guadalupe Ramírez López, por brindarme su apoyo, comprensión, paciencia y por creer en mí en los momentos difíciles, por invertir su tiempo en cada etapa de mi formación profesional y preocuparse por mi bienestar personal, estaré eternamente agradecido.

A mi familia que siempre estuvo conmigo en los momentos más complicados y por ayudarme a afrontar los retos de cada día.

A mis hermanas Astrid y Paola, por todos estos años de amistad y apoyo, por aquellos momentos de risas y experiencias compartidas, ustedes siempre serán parte fundamental en mi vida y aunque los caminos nos fueron separando, siempre serán mis mejores amigas.

A mis compañeros de laboratorio, que me apoyaron y ayudaron con este proyecto.



Eres tú mi bendición, eres mi luz, eres mi sol.....Con todo mi AMOR y cariño....Esto es por ti AMOR DE MI VIDA....Kendra I. S.M.....





ÍNDICE.

ÍNDICE DE TABLAS.....	<i>i</i>
ÍNDICE DE FIGURAS.....	<i>ii,iii</i>
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	<i>iii</i>
1. RESÚMEN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. CÁNCER.....	3
2.2. CÁNCER DE MAMA.....	4
2.2.1 Clasificación molecular del cáncer de mama	4
2.3. TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	5
2.3.1 Quimioterapia convencional	6
2.4. TRATAMIENTO DEL CANCER DE MAMA.....	6
2.4.1 Tumores con receptores hormonales para estrógenos y progesterona positivos	6
2.4.2 Tumores con receptores hormonales para estrógenos y progesterona negativos	6
2.4.3 Subtipo triple negativo.....	7
2.5. DOXORRUBICINA.....	7
2.6. EFECTO DE PERMEABILIDAD Y RETENCIÓN AUMENTADA (EPR).	8
2.7 TERAPIA MACROMOLECULAR	8
2.8 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR	10
2.9 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA.....	11
2.10 SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ESTIMULO–RESPUESTA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER.....	13
2.11 PROFÁRMACOS EN EL DISEÑO DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ESTÍMULO–RESPUESTA.....	14
2.12 DENDRÍMEROS.....	14
2.12.1 Propiedades de los dendrímeros	15
2.12.2 Monodispersidad	16
2.12.3 Tamaño y forma nanométricos.....	16
2.12.4 Solubilidad y reactividad	16



2.12.5 Biocompatibilidad.....	17
2.13 DENDRÍMEROS PAMAM	17
2.13.1 Toxicidad de los dendrímeros PAMAM.....	18
2.13.2 Ingeniería de superficie en los dendrímeros PAMAM.....	19
2.14 CICLODEXTRINAS	20
2.14.1 Complejos de inclusión (CI) con CDs	21
2.14.2 Adamantano.....	22
2.15 QUÍMICA CLICK.....	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo general.....	28
5.2 Objetivos particulares	28
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	30
6.1. SÍNTESIS.....	30
6.1.1. Intermediarios	31
6.1.1.1 Síntesis de la hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico (Ad-NH-NH ₂).	31
6.2 SÍNTESIS DEL PROFÁRMACO DOXORRUBICINA-ADAMANTANO CON UN ENLACE HIDRAZONA (Ad-h-Dox).	33
6.3 SÍNTESIS DEL PROFÁRMACO DOXORRUBICINA-ADAMANTANO CON UN ENLACE AMIDA (Ad-a-Dox).	33
6.4 SÍNTESIS DEL PROFÁRMACO DOXORRUBICINA-ADAMANTANO CON UN ENLACE ÉSTER (Ad-e-Dox).	34
6.4.1. Análisis espectroscópico de los profármacos Ad-Dox.....	35
6.4.2. Asignación de los espectros de RMN ¹ H y ¹³ C para los profármacos Ad-Dox	35
6.4.3. Análisis espectroscópico por RMN para el profármaco Ad-a-Dox	41
6.4.4. Análisis espectroscópico por RMN para el profármaco Ad-h-Dox.....	42
6.4.5 Análisis espectroscópico por RMN para el profármaco Ad-e-Dox.....	42
6.4.6 Asignación de los espectros de IR para los profármacos Ad-Dox	44
6.4.7 Espectrometría de masas de los profármacos Ad-Dox	45



6.5 SÍNTESIS DE MONO-TOSIL-βCD (<i>mOTs</i>-βCD).....	46
6.5.1 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de la mono-tosil-βCD (<i>mOTs</i>-βCD).....	46
6.6 SÍNTESIS DE MONO-AZIDO-βCD (<i>mN₃</i>-βCD).....	49
6.6.1 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de la mono-azido-βCD (<i>mN₃</i>-βCD).....	49
6.7 SÍNTESIS DE LOS INTERMEDIARIOS CON GRUPOS ALQUINO.....	52
6.7.1 Síntesis del 4-(propargiloxi)fenol (I) y 1,4-<i>bis</i>(propargiloxi)benceno (II)	52
6.7.2 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de los intermediarios 4-(propargiloxi)fenol (I) y 1,4-<i>bis</i>(propargiloxi)benceno (II)	52
6.7.3 Síntesis del acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico (III).....	55
6.7.4 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del intermediario acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico (III).	55
6.7.5 Síntesis del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (IV).....	56
6.7.6 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (IV)	57
6.7.7 Síntesis del 1,3,5-tris(propargiloxi)benceno (V)	59
6.7.8 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del 1,3,5-tris(propargiloxi)benceno(V)	59
6.7.9 Síntesis del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI)	60
6.7.10 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI).....	60
6.8 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS A y B	63
6.8.1 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de los compuestos A y B.....	65
6.8.2 Síntesis del compuesto C.....	68
6.8.3 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del compuesto C.....	68
6.8.4 Síntesis del compuesto D.....	69



6.8.5	Caracterización espectroscópica y espectrométrica del compuesto D	70
6.8.6	Síntesis del compuesto E	71
6.8.7	Caracterización espectroscópica y espectrométrica del compuesto E	71
6.9	DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS PLATAFORMAS A-E	73
6.10	DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRIA POR EL MÉTODO DE JOB PARA LAS PLATAFORMAS D y E.	75
6.11	DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE HIDRÓLISIS DE LOS PROFÁRMACOS Ad-Dox	76
6.12	PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN (CI)	77
6.13	CARACTERIZACIÓN DEL CI β CD/AdCOOH POR RMN 2D ROESY, DSC y TGA.	78
6.14	CARACTERIZACIÓN DE LOS CI A-E/AdCOOH Y D-E/Ad-h-Dox POR RMN 2D ROESY, DSC y TGA.	81
6.15	ANÁLISIS DEL CI A/AdCOOH POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS ESI.	84
6.16	DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS) DE LAS PLATAFORMAS D-E Y SUS RESPECTIVOS CI CON Ad-h-Dox.	85
6.17	DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE LOS CI β CD/Ad-h-Dox, D/Ad-h-Dox y E/Ad-h-Dox.....	87
6.18	ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	90
6.18.1	Captación celular y actividad citotóxica de los profármacos Ad-Dox	90
7.	CONCLUSIONES	95
8.	PARTE EXPERIMENTAL	97
8.1	REACTIVOS Y EQUIPO.....	97
8.2	SÍNTESIS Y DESCRIPCIÓN.....	98



8.2.1 Síntesis del profármaco doxorubicina-adamantano con un enlace hidrazona(Ad-h-Dox)	98
8.2.1.1 Síntesis de la hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico (Ad-NH-NH ₂).	98
8.2.1.2 Síntesis del profármaco Ad-h-Dox.	99
8.2.1.3 Síntesis del profármaco doxorubicina-adamantano con un enlace amida(Ad-a-Dox).....	100
8.2.1.4 Síntesis del profármaco doxorubicina-adamantano con un enlace éster(Ad-e-Dox).	101
8.2.1.5 Síntesis de la <i>N</i> -Boc Doxorubicina (Dox-Boc)	101
8.2.1.6 Síntesis del profármaco Ad-e-Dox	101
8.2.2. Síntesis de mono-tosil-βCD (<i>m</i> OTs-βCD)	102
8.2.3. Síntesis de mono-azido-βCD (<i>m</i> N ₃ -βCD)	103
8.2.4. Síntesis de los intermediarios con grupos alquino	104
8.2.4.1 4-(propargiloxi)fenol (I) y 1,4- <i>bis</i> (propargiloxi)benceno (II)	104
8.2.4.2 Síntesis del acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico (III)	105
8.2.4.3 Síntesis del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (IV)	105
8.2.4.4 Síntesis del 1,3,5-tris(propargiloxi)benceno (V).....	106
8.2.4.5 Síntesis del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI)	106
8.2.5. Método general para la conjugación por química "Click" de los alquinos (I-VI) con la <i>m</i> N ₃ -βCD.....	107
8.2.5.1 Síntesis del compuesto A	107
8.2.5.2 Síntesis del compuesto B	108
8.2.5.3 Síntesis del compuesto C	109



8.2.5.4 Síntesis del compuesto D	109
8.2.5.5 Síntesis del compuesto E	109
8.3 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS PLATAFORMAS A-E	110
8.4 DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRIA POR EL MÉTODO DE JOB PARA LAS PLATAFORMAS D y E.	110
8.5 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE HIDRÓLISIS DE LOS PROFÁRMACOS Ad-Dox.....	111
8.6 PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN (CI)	111
8.6.1. Método general para la preparación de CI	111
8.6.1.1 Preparación de CI β CD/AdCOOH (1:1)	111
8.6.1.2 Preparación de CI A/AdCOOH (1:1)	112
8.6.1.3 Preparación de CI B/AdCOOH (1:1)	112
8.6.1.4 Preparación de CI C/AdCOOH (1:2).....	113
8.6.1.5 Preparación de CI D/AdCOOH (1:3).....	113
8.6.1.6 Preparación de CI E/AdCOOH (1:4)	114
8.6.1.7 Preparación de CI β CD/Ad-h-Dox (1:1)	114
8.6.1.8 Preparación de CI D/Ad-h-Dox (1:3).....	115
8.6.1.9 Preparación de CI E/Ad-h-Dox (1:4)	115
8.7 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)	116
8.8 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE LOS CI β CD/Ad-h-Dox, D/Ad-h-Dox y E/Ad-h-Dox.....	116
8.9 ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	116
8.9.1 Actividad citotóxica.	116



8.9.2 Captación celular..	116
9. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	118
10. <i>ANEXOS</i>	123

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación del cáncer de mama en función de su perfil molecular	5
Tabla 2: Impacto del tamaño de partícula en sistemas biológicos	9
Tabla 3: Espectroscopía IR para la Dox	44
Tabla 4: Solubilidad cuantitativa de las plataformas A-E	73
Tabla 5: Valores de CI_{50} (μ M) de los profármacos Ad-Dox.....	90
Tabla 6: Valores de CI_{50} (μ M) en línea celular MCF-10A de los profármacos Ad-Dox.....	90
Tabla 7: Valores de CI_{50} (μ M) a 48h de tratamiento de las plataformas A-E , de los profármacos Ad-Dox y de los correspondientes CI.....	91
Tabla 8: Comparación de CI_{50} (μ M) a 48h de tratamiento de las plataformas cargadas en líneas no carcinogénicas	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Etapas de la carcinogénesis	4
Figura 2: Estructura química de la Dox	7
Figura 3: Ejemplos de estructuras macromoleculares.....	9
Figura 4: Modelo supramolecular de la estructura del ADN.....	11
Figura 5: Nanosistemas utilizados en nanomedicina.....	13
Figura 6: Estructura general de un dendrímero	15
Figura 7: Estructura química de dendrímeros PAMAM (A) PAMAM G3 con núcleo de amoniaco, (B) PAMAM G1 con núcleo de etilendiamina.....	18
Figura 8: Interacción del PAMAM con la membrana celular.....	18
Figura 9: Ingeniería de superficie del dendrímero PAMAM.....	19
Figura 10: α , β y γ ciclodextrinas, estructura química, tridimensional y tamaño de la cavidad	21
Figura 11: Formación de los CI con β -ciclodextrina y una molécula huésped.....	22
Figura 12: Reacción y mecanismo de la Química Click.....	24
Figura 13: Estructura química del agente acoplante COMU	34
Figura 14: Asignación de las señales de la Dox libre.	36

Figura 15: Perfil térmico DSC del CI β CD/AdCOOH	79
Figura 16: Perfil térmico TGA del CI β CD/AdCOOH.....	80
Figura 17: Perfil térmico DSC del CI β CD/Ad-h-Dox.....	82
Figura 18: Perfil térmico TGA del CI β CD/Ad-h-Dox.....	83
Figura 19: Tamaño de partícula para el compuesto D obtenido por DLS	85
Figura 20: Tamaño de partícula para el compuesto E obtenido por DLS	85
Figura 21: Tamaño de partícula para el CI D /Ad-h-Dox obtenido por DLS.....	86
Figura 22: Tamaño de partícula para el CI E /Ad-h-Dox obtenido por DLS.	86

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Ruta de síntesis para la obtención de los profármacos Ad-Dox con diferentes enlaces sensibles a pH: a) Hidrazona, b) amida y c) ester.....	30
Esquema 2: Ruta sintética para la obtención de la hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico.....	31
Esquema 3: Ruta sintética para la obtención del profármaco Ad-h-Dox.....	33
Esquema 4: Ruta sintética para la obtención del profármaco Ad-a-Dox.....	33
Esquema 5: Ruta sintética para la obtención del profármaco Ad-e-Dox.....	33
Esquema 6: Ruta sintética para la obtención de m OTs- β CD.....	46
Esquema 7: Ruta sintética para la obtención de m N ₃ - β CD.....	46
Esquema 8: Ruta sintética para la obtención de 4-(propargiloxi)fenol (I) y 1,4-bis(propargiloxi)benceno (II).....	52
Esquema 9: Ruta sintética para la obtención del acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico (III).....	55
Esquema 10: Ruta sintética para la obtención del Ruta sintética para la obtención del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético(IV).....	56
Esquema 11: Ruta sintética para la obtención del 1,3,5-tris(propargiloxi)benceno (V).....	60
Esquema 12: Ruta sintética para la obtención del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI).....	61
Esquema 13: Ruta sintética para la obtención de los compuestos A y B	64
Esquema 14: Ruta sintética para la obtención del compuesto C	68
Esquema 15: Ruta sintética para la obtención del compuesto D	69
Esquema 16: Ruta sintética para la obtención del compuesto E	70



Esquema 17: Preparación de CI β CD/AdCOOH (1:1).....	109
Esquema 18: Preparación de CI A/AdCOOH (1:1).....	110
Esquema 19: Preparación de CI B/AdCOOH (1:1).....	110
Esquema 20: Preparación de CI C/AdCOOH (1:2).....	111
Esquema 21: Preparación de CI D/AdCOOH (1:3).....	111
Esquema 22: Preparación de CI E/AdCOOH (1:4).....	112
Esquema 23: Preparación de CI β CD/Ad-h-Dox (1:1).....	112
Esquema 24: Preparación de CI D/Ad-h-Dox (1:3).....	113
Esquema 25: Preparación de CI E/Ad-h-Dox (1:4).....	113

ÍNDICE DE ESPÉCTROS

Espectro 1: RMN ^1H en CDCl_3 de a) AdCOOH, b) AdCOOCH ₃ y c) AdCONHNH ₂	32
Espectro 2: RMN 2D ^1H - ^1H COSY para la Dox en DMSO- d_6	37
Espectro 3: RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC para la Dox en DMSO- d_6	39
Espectro 4: RMN 2D ^1H - ^1H NOESY para la Dox en DMSO- d_6	40
Espectro 5: RMN ^1H del profármaco Ad-a-Dox en DMSO- d_6	41
Espectro 6: RMN ^1H del intermediario Dox-Boc en DMSO- d_6	43
Espectro 7: ESI del profármaco Ad-a-Dox	45
Espectro 8: RMN ^1H del intermediario <i>m</i> OTs- β CD en DMSO- d_6	47
Espectro 9: RMN ^{13}C del intermediario <i>m</i> OTs- β CD en DMSO- d_6	48
Espectro 10: RMN ^1H del intermediario <i>m</i> N ₃ - β CD en DMSO- d_6	50
Espectro 11: RMN ^{13}C del intermediario <i>m</i> N ₃ - β CD en DMSO- d_6	51
Espectro 12: RMN ^1H del intermediario (<i>I</i>) en DMSO- d_6	53
Espectro 13: RMN ^{13}C del intermediario (<i>I</i>) en DMSO- d_6	54
Espectro 14: RMN ^1H del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (IV) en DMSO- d_6	58
Espectro 15: RMN ^{13}C del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (IV) en DMSO- d_6	59
Espectro 16: RMN ^1H del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI)	62
Espectro 17: RMN ^{13}C del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI) en DMSO- d_6	63
Espectro 18: RMN ^1H del compuesto A en DMSO- d_6	67



Espectro 19: RMN 2D HMQC del compuesto A en DMSO- d_6	67
Espectro 20: RMN ^1H del compuesto E en DMSO- d_6	72
Espectro 21: RMN 2D HMQC del compuesto E en DMSO- d_6	72
Espectro 22: RMN 2D ROESY del CI $\beta\text{CD}/\text{AdCOOH}$ en D_2O	78
Espectro 23: RMN 2D ROESY del CI $\beta\text{CD}/\text{Ad-h-Dox}$ en D_2O	81
Espectro 24: ESI-TOF del CI A/AdCOOH , en un intervalo m/z : 1240-1560..	84

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Método de Job para el compuesto E	75
Gráfica 2: Cinética de hidrólisis del profármaco Ad-h-Dox	76
Gráfica 3: Cinética de liberación de los CIs $\beta\text{CD}/\text{Ad-h-Dox}$, D / Ad-h-Dox y E / Ad-h-Dox	87
Gráfica 4: Captación celular de Dox en línea celular MDA-MB 231	89

1. RESUMEN

El cáncer es una enfermedad multifactorial resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos y químicos), caracterizada por el crecimiento anormal de células. Su tratamiento consiste en cirugía y radioterapia, recayendo siempre en el uso de quimioterapéuticos, sin embargo, estos carecen de selectividad. Así, el tratamiento se vuelve agresivo dando como resultado daño a nivel celular que se traduce en deterioros en tejidos sanos. Uno de los anticancerígenos más utilizados es la Doxorubicina (Dox), que se emplea prácticamente en el tratamiento de todos los tipos de cáncer como leucemia, cáncer de mama, estómago, pulmón, ovario, tiroides, entre otros. Una de las mayores desventajas del uso de Dox es su cardiotoxicidad dosis-dependiente que provoca cardiomiopatías meses o años después de terminado el tratamiento.

En comparación con las terapias convencionales, los sistemas de liberación controlada de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés) permiten liberar selectivamente la carga terapéutica en el blanco deseado. Dada la complejidad del microambiente que se genera en un tejido o célula tumoral. Estas condiciones anormales se pueden explotar para desencadenar reacciones que liberen el fármaco desde un sistema sensible a las mismas. Dentro de los DDS basados en fenómenos de difusión, hinchazón, erosión etc. destacan los DDS basados en afinidad (DDS-A). Estos utilizan interacciones supramoleculares para controlar la carga y liberación de una o más cargas terapéuticas. Este tipo de DDS-A ofrecen propiedades únicas para adaptar la tasa de liberación del fármaco a través de mecanismos que dependen menos de las propiedades de la matriz polimérica *i.e.*, tamaño de poro, tasa de degradación, temperatura y concentración del polímero. Actualmente, se construyen DDS en donde la palabra "drug" no sólo abarca fármacos, sino también otros agentes terapéuticos tales como factores de crecimiento, proteínas y ácidos nucleicos, generando sistemas cada vez más complejos que al parecer carecen de reproducibilidad, ya que resulta prácticamente imposible diseñar un DDS-A capaz de entregarlo todo.

Bajo este contexto, el presente proyecto consiste en el diseño racional de cinco sistemas poliméricos ensamblados con un profármaco pH-sensible para la liberación intracelular de Dox, como parte de estos nuevos sistemas se seleccionó a la β -ciclodextrina

(β CD), ya que está aprobada por la FDA para su uso como excipiente. Químicamente es un oligosacárido cíclico compuesto de siete unidades de glucosa, al no tener una forma cilíndrica perfecta su estructura tridimensional se presenta como un cono truncado con una cavidad interna hidrofóbica capaz de formar complejos de inclusión (CI) con moléculas de diversa naturaleza.

Con base en esto, se sintetizaron y caracterizaron dos mono modificaciones de la β CD, un dímero y un trímero de la misma. Por otra parte se realizó la modificación química de la superficie del dendrímero PAMAM-G0 con cuatro unidades de β CD. Estas mono y multi modificaciones se realizaron mediante química "Click", una poderosa herramienta en la fabricación de nuevos materiales. Utilizando esta estrategia sintética se lograron obtener sistemas neutros que no interactúan con el entorno biológico y por lo tanto biocompatibles. Una de las moléculas huésped más utilizadas en sistemas de ensamblaje supramolecular es el anillo de adamantano (Ad), ya que tiene gran afinidad por la cavidad de la β CD. Aprovechando la alta afinidad del Ad, como carga terapéutica de los sistemas, se sintetizaron tres profármacos Ad-Dox mediante enlaces sensibles a pH ácido (hidrazona, amida y éster). El profármaco con enlace hidrazona (Ad-h-Dox) mostró el mejor comportamiento *in vitro*, ya que permitió controlar la liberación de la Dox sólo de manera intracelular en células tumorales, por lo que se seleccionó como carga terapéutica para el dendrímero PAMAM G0- β CD y para el trímero de β CD.

Los CI PAMAM G0- β CD y el trímero de β CD cargados con Ad-h-Dox se caracterizaron en solución por RMN 2D y dispersión dinámica de la luz (DLS), además en estado sólido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Todos los compuestos obtenidos y los CI se probaron en líneas celulares carcinogénicas de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y no carcinogénicas (VERO, LLCPK y NRK). Estos sistemas construidos racionalmente, no sólo favorecen mayor carga de fármaco por una sola molécula de acarreador, también liberan la Dox de manera controlada en el sitio de acción, disminuyendo así los efectos tóxicos en células sanas. Estos sistemas de liberación controlada de Dox tienen potencial aplicación en el tratamiento del cáncer de mama.

2. ANTECEDENTES

2.1 CÁNCER.

Bajo la denominación de *cáncer* se engloban, en realidad, distintas enfermedades (aproximadamente 200) que varían en sus manifestaciones clínicas y en su respuesta a las medidas terapéuticas, pero que comparten mecanismos desencadenantes comunes.¹ En tanto que su nombre, *cáncer*, se inspiró en la observación de los tumores de mama, que, al crecer, toman la forma de un cangrejo, según explica Galeno (131-203 d.C.) en su tratado *Definitiones Medicae*.

El proceso por el cual se inicia la formación de tumores o tumorigénesis no está totalmente esclarecido. Sin embargo, se sabe que la iniciación del tumor es un proceso en el que células normales adquieren una primer mutación que las envía al indicio tumorigénico proporcionando crecimiento y supervivencia, ya que desde el punto de vista evolutivo, esta mutación favorece el crecimiento de las células mutantes sobre sus vecinas.² En la mayoría de los casos, una única mutación es insuficiente y muchos tipos de cáncer requieren por lo menos cuatro o cinco mutaciones.³

Es también imperativo que cada mutación se transmita a la progenie, y el cáncer surge en células epiteliales (cánceres intestinales y de la piel), mismas que se reproducen rápidamente, las mutaciones oncogénicas afectan tanto a las células de larga vida y a las células transitorias, como las células diferenciadas, que se eliminan rápidamente antes que la próxima mutación pueda atacar. Alternativamente, las mutaciones oncogénicas pueden ocurrir dentro de las células epiteliales diferenciadas, tales como hepatocitos, que son capaces de proliferar y éstas tienen suficiente duración para permitir mutaciones posteriores imparables.

Cuatro características describen el comportamiento de las células cancerosas, en comparación con sus contrapartes normales:

- 1) **Clonalidad:** *en la mayoría de los casos, el cáncer se origina de una sola célula que prolifera en copias de células malignas.*
- 2) **Autonomía:** *el crecimiento no es regulado correctamente por las influencias bioquímicas y físicas normales en el ambiente.*
- 3) **Anaplasia:** *desdiferenciación celular.*

4) **Metástasis:** las células cancerosas desarrollan la capacidad para el crecimiento y la difusión a otras partes del cuerpo (invasión a otros tejidos).

Hoy se sabe que el cáncer es un fenómeno que se lleva a cabo en dos tiempos, la conversión y el desarrollo neoplásico (**Figura 1**), mismos que a su vez abarcan tres etapas: iniciación, promoción y progresión.

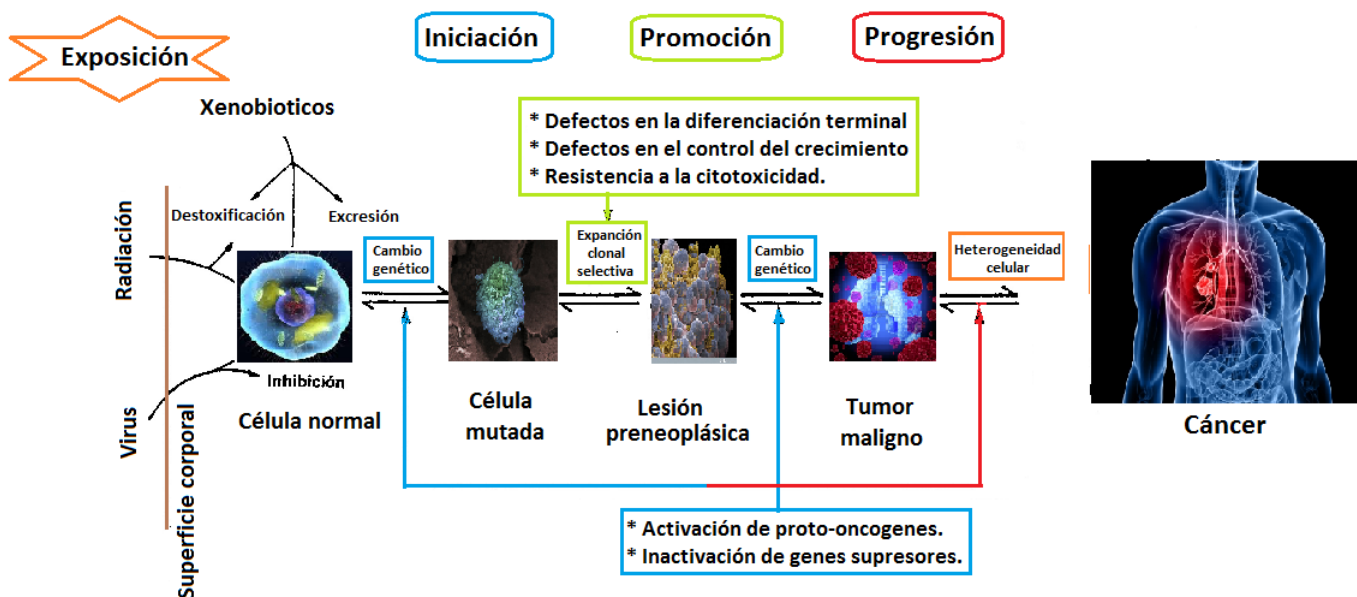


Figura 1. Etapas de la carcinogénesis

2.2 CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea clasificada en subgrupos moleculares con diferente pronóstico por su perfil de expresión genética.⁴ Existen dos tipos de cáncer de mamá; el que se produce en los conductos que están encargados de transportar la leche de la mama hacia el pezón, denominado cáncer ductal infiltrante. Este tipo de cáncer suele ser el más común y del que más casos se tienen registrados. En segundo lugar, está el cáncer que se produce en los lóbulos, los cuales llevan a cabo la producción de leche y se denomina cáncer lobulillar infiltrante.

2.2.1 Clasificación molecular del cáncer de mama

El cáncer de mama es una compleja enfermedad que incluye distintas entidades morfológicas, clínicas y moleculares. Dada la heterogeneidad del cáncer de mama, la cual no

puede ser explicada solo por parámetros clínicos, anatómicos y patológicos clásicos, como el tamaño tumoral, la invasión ganglionar o el subtipo histológico; se necesitan factores pronósticos más precisos para diferenciar a las pacientes según el grupo de riesgo.

Utilizando técnicas de biología molecular se han identificado series de carcinomas mamarios y perfiles moleculares de cada tumor, proporcionando un perfil más preciso de la enfermedad. Hoy en día se sabe que influye la presencia de receptores a estrógenos (ER), receptores a progesterona (PR) y receptores del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER-2). Esta clasificación molecular, se agrupa en la **Tabla 1** y es un factor poderoso para predecir los diferentes tratamientos.^{5,6}

Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama en función de su perfil molecular

Subtipo	Receptores hormonales para estrógenos y progesterona	HER-2	Índice de proliferación	Pronóstico
Luminal A	ER y PR positivos	Negativo	Bajo (<14%)	Bueno
Luminal B	ER positivos y PR negativos	Negativo / baja expresión	Alto (>14%)	Bueno
HER-2 positivo	ER y PR negativos	Alta expresión	Alto	Malo
Triple negativo	ER y PR negativos	Negativo	Alto	El de peor pronóstico

2.3 TRATAMIENTO DEL CÁNCER

A menudo el tratamiento para el cáncer abarca más de un camino, ya que la estrategia adoptada depende en gran medida de la naturaleza del cáncer y de qué tan avanzado se encuentre éste, así como también del estado físico del paciente. Todos los tratamientos existentes están abocados a matar o remover directamente a las células cancerosas, por medio de la supresión de señales necesarias para la división celular o bien para estimular sus defensas.

Partiendo de ese concepto, se sabe que los principales tratamientos siguen siendo la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia; por lo regular se ejecutan de manera añadida y/o combinada brindando así un mayor beneficio terapéutico.

2.3.1 Quimioterapia convencional

La quimioterapia se refiere al uso de moléculas pequeñas como agentes citotóxicos para destruir las células cancerosas. Como se ha mencionado, la principal característica de esta enfermedad, es la rápida proliferación de los tejidos afectados, esta característica juega un rol importante en el tratamiento, dado que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos no basan su acción en mecanismos farmacológicos precisos, sino en provocar un fallo general en el ciclo de división celular, implicando que no sólo se afecte a las células cancerosas sino de igual modo al resto de la población celular sana. Existen tejidos celulares normales, que poseen esta característica de gran proliferación. Así pues, casi todos los agentes quimioterapéuticos disponibles en la actualidad tienen serios efectos colaterales. Esto debido a que afectan directamente a las células normales de crecimiento rápido, por lo que los efectos adversos graves limitan su uso.^{7,8}

2.4 TRATAMIENTO DEL CANCER DE MAMA

2.4.1 Tumores con receptores hormonales para estrógenos y progesterona positivos

Este grupo de tumores comprende los tumores luminales; los cuales poseen un patrón inmunofenotípico similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria. Expresan citoqueratinas luminales, receptores de estrógeno y los genes asociados a su activación (LIV1 y CCND1).⁶ Habitualmente son de bajo grado histológico y tienen mutación de p53 en menos del 20%. Existen varios subtipos, sin embargo los más considerados por su frecuencia son el Luminal A y B.

Subtipos luminales A y B: El luminal A tiene alta expresión de genes relacionados con el receptor de estrógenos y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular comparado con el luminal B. Los dos subtipos son de buen pronóstico, aunque el B tiene peor pronóstico que el A. El luminal A se trata solo con hormonas, y el luminal B se trata con quimioterapia y hormonas.⁶

2.4.2 Tumores con receptores hormonales para estrógenos y progesterona negativos

Subtipo HER-2: Se refiere a un gran grupo de tumores que son negativos a receptores hormonales para estrógenos y progesterona. Estos se caracterizan por la sobreexpresión de otros genes y tienen alta proporción de mutaciones en p53. El tratamiento para este subtipo

es quimioterapia basada en antraciclinas y taxanos, también se trata con terapia monoclonal de trastuzumab. Este subtipo representa un pronóstico malo, pues su alto riesgo se origina en una recaída temprana.^{5,6}

2.4.3 Subtipo triple negativo

También es llamado subtipo basal por su patrón de expresión parecido al de las células epiteliales basales y a las células mioepiteliales normales del tejido mamario, las cuales no expresan receptores a estrógenos, progesterona, ni a HER-2; y por eso es nombrado triple negativo. Este tipo de tumores tienen la tendencia a ser muy agresivos, demuestran la mayor frecuencia de respuesta patológica completa, pero presentan un peor pronóstico. El tratamiento para este subtipo de cáncer de mama es la quimioterapia; particularmente se utiliza la terapia con antraciclinas dentro de las cuales la de primera elección es la Doxorubicina.⁴

2.5 DOXORRUBICINA

La doxorubicina (Dox, **Figura 2**) es un metabolito secundario de la bacteria *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*, que pertenece a la familia de las antraciclinas.⁹ Estas son agentes antineoplásicos que se utilizan ampliamente en clínica a través de inyección intravenosa contra una amplia gama de tipos de cáncer tales como tumores sólidos, leucemia, linfomas y cáncer de mama.¹⁰ El uso exitoso de la Dox se ha visto obstaculizado por la alta toxicidad causada por el rápido aumento de la concentración plasmática inicial del fármaco. Esta toxicidad incluye la supresión hematopoyética, náuseas, vómitos, extravasación y alopecia, aunque el efecto secundario más temido es la cardiotoxicidad.⁹

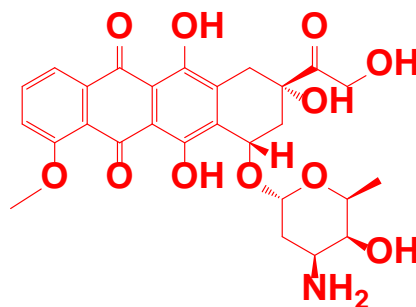


Figura 2. Estructura química de la Dox

El inicio de esta cardiotoxicidad puede retrasarse hasta 10 a 15 años después de la interrupción del tratamiento quimioterapéutico.¹¹ Si bien la probabilidad de desarrollar cardiomiopatía depende en gran medida de la dosis, la cardiotoxicidad puede ocurrir en dosis bajas debido al aumento de la susceptibilidad individual.¹²

Se sabe que la Dox se intercala entre los pares de bases, además se dirige a múltiples dianas moleculares para producir un rango de efectos citotóxicos generando lesiones mediadas por Topo II en el ADN nuclear que conducen a la apoptosis.¹³ Sin embargo, la Dox también induce apoptosis y necrosis en tejidos sanos que causan toxicidad en el cerebro, hígado, riñón y corazón. A lo largo de los años, se han realizado muchos estudios para diseñar sistemas de liberación de fármacos que eliminen estos efectos adversos.

2.6 EFECTO DE PERMEABILIDAD Y RETENCIÓN AUMENTADA (EPR)

El efecto EPR fue reportado por primera vez por Matsumura y Maeda en 1986¹⁴ y fue validado por Maeda y col.¹⁵⁻¹⁷ Sus investigaciones demostraron que en la mayoría de los tumores sólidos para que las células crezcan rápida y descontroladamente, debe haber una estimulación de la angiogénesis, lo cual da lugar a una arquitectura defectuosa con fenestraciones que van de los 10 a los 800 nm. Esta patofisiología única, combinada con un pobre drenaje linfático se conoce como efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR por sus siglas en inglés, *enhanced permeability and retention effect*). El efecto EPR considera esta naturaleza anatómica-fisiopatológica única de los vasos sanguíneos tumorales para facilitar el transporte de macromoléculas a los tejidos tumorales. Las macromoléculas de más de 40kDa se filtran selectivamente a los vasos y se acumulan en los tejidos tumorales. Por el contrario, el suministro de este tipo de moléculas impulsado por el efecto EPR no se produce en tejidos normales.^{18,19} Este fenómeno único en los tumores sólidos se ha convertido ahora en el "estándar de oro" en el diseño de terapias anticancerosas que utilizan agentes macromoleculares y hoy en día es un paradigma cada vez más prometedor para el desarrollo de terapias más eficaces para el tratamiento del cáncer.

2.7 TERAPIA MACROMOLECULAR

Como se describe en la sección 2.3.1, los agentes quimioterapéuticos convencionales siempre exhiben limitaciones inherentes, como la distribución no específica, la

biodisponibilidad deficiente, la eliminación rápida de la sangre y la solubilidad deficiente en entornos fisiológicos. El enfoque para abordar estos problemas se relaciona con la terapia macromolecular, la cual se puede definir como un grupo de compuestos que se caracterizan por su alto peso molecular. En primer lugar, están las macromoléculas que cuentan con actividad biológica *per se*, como proteínas o péptidos, en segundo lugar, se encuentran las macromoléculas basadas en ADN y que pertenecen a la terapia génica; finalmente, ubicamos a las macromoléculas compuestas de polímeros sintéticos o naturales que portan múltiples moléculas pequeñas de fármacos. Dado su alto peso molecular estos sistemas superan la excreción renal y en consecuencia pueden alcanzar vidas medias en plasma o locales prolongadas que les permite utilizar las anomalías vasculares de los tejidos tumorales sólidos (efecto EPR), facilitando así la extravasación de este tipo de moléculas de forma más selectiva en los tejidos tumorales. Esta orientación a los tejidos tumorales sólidos puede conducir a beneficios terapéuticos superiores con menos efectos adversos sistémicos.

En los últimos años, se realizaron muchos esfuerzos para diseñar fármacos macromoleculares a partir de fármacos anticancerosos de bajo peso molecular y polímeros solubles en agua, ya sea por conjugación química o por química supramolecular (**Figura 3**). Dichos fármacos poliméricos biocompatibles adquieren nuevas características fisicoquímicas, bioquímicas y farmacológicas. Una característica común de todas estas macromoléculas es su tamaño ubicado en la región nanométrica²² que facilita la explotación del efecto EPR.²⁰

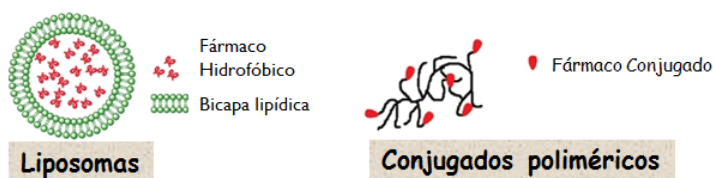


Figura 3. Ejemplos de estructuras macromoleculares

Por otra parte Matsumura y Maeda¹⁴ demostraron que las macromoléculas en el rango de peso molecular de 15,000 a 70,000 g/mol, con ciertas propiedades adicionales, pueden acumularse efectivamente en un tumor sólido. Se sabe que el tamaño de partícula está intrínsecamente relacionado con la velocidad de eliminación de la circulación sanguínea, y en general las partículas más pequeñas (en el rango de 50 a 300 nm) tienen una eliminación más lenta de la circulación en comparación con las que tienen un tamaño mayor. Debido a la heterogeneidad de los tumores y al estado dinámico de cada tumor, sería muy difícil asumir un valor único máximo para que las partículas aprovechen el efecto EPR. Sin embargo, se

puede sugerir que sea alrededor de 400 nm. En la **Tabla 2** se resumen los diferentes tamaños de partícula y sus efectos en sistemas biológicos.²¹

Tabla 2. Impacto del tamaño de partícula en sistemas biológicos

Tamaño	Sistemas biológicos y observaciones
4.5 nm	Abundantes pequeños poros presentes en tejido endotelial normal
25 nm	Relativamente pocos poros grandes presentes en el tejido endotelial normal
20 – 50 nm	Tamaño medio de micelas poliméricas sin fármacos cargados
100 nm	Tamaño frecuentemente probado de micelas poliméricas cargadas con fármaco
150 nm	Tamaño para la extravasación de partículas en el hígado. El hígado tiene vasos sanguíneos con fenestraciones de 100 a 175 nm
200 nm	Las nanopartículas de menos de 200 nm tienen un tiempo de circulación significativamente más largo debido a la baja captación del sistema reticuloendotelial
380 nm	El tamaño de los poros de un tumor varía de 200 nm a 1.2 μm , pero se sabe que el tamaño de los poros de los vasos sanguíneos porosos en la mayoría de los tumores es de 380–780 nm. Por lo tanto, el rango para el efecto EPR debería ser similar.
400 nm	Los liposomas estabilizados de 400 nm de diámetro pudieron penetrar en el intersticio tumoral. Acumulación de nanopartículas recubiertas con ácido hialurónico (400 nm) en el tejido tumoral.
500 nm	Se sabe que el tamaño máximo de las nanopartículas para que puedan penetrar las membranas celulares es de 500 nm
1 μm	Las partículas de menos de 1 μm fueron absorbidas por las placas de Peyer y luego migraron a los ganglios linfáticos mesentéricos
5 μm	El límite superior para partículas rígidas que circulan dentro de los capilares más pequeños

2.8 QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

Se describe a la química supramolecular como "la química del enlace no covalente", la cual implica al diseño y construcción de bloques formados por dos o más moléculas unidas mediante autoensamblaje a través de interacciones no covalentes. Estas interacciones

incluyen fuerzas de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno, interacciones π - π , entre otras. En esta área, se describe al autoensamblaje como el proceso mediante el cual, unidades más pequeñas con funcionalidades complementarias interactúan espontáneamente entre sí para organizarse en estructuras más complejas. Uno de los ejemplos más comunes es la estructura de doble hélice del ADN (**Figura 4**), en la cual se encuentran entrelazadas dos hebras poliméricas que se mantienen juntas a través de apilamientos π - π y de enlaces de hidrógeno entre sus pares de bases complementarias.²³

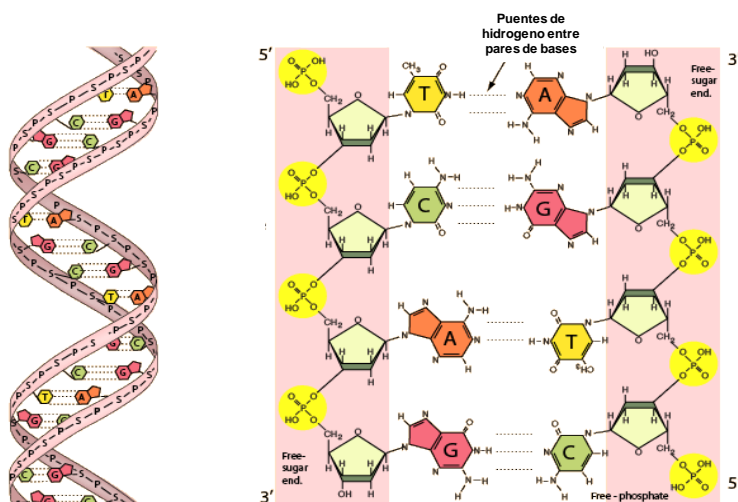


Figura 4. Modelo supramolecular de la estructura del ADN

Imagen tomada y adaptada de: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Organic/gencode.html>

La gran variedad de interacciones supramoleculares ofrece infinitas posibilidades para la construcción de estructuras supramoleculares, principalmente las de tipo macrociclo, que incluyen éteres corona, ciclodextrinas, calixarenos, porfirinas, etc. con propiedades y funcionalidades específicas, como son el reconocimiento, la catálisis y el transporte.²⁴ La química supramolecular ha evolucionado durante las últimas tres décadas en un campo muy dinámico y multidisciplinario de investigación, lo que impulsó las investigaciones en áreas como la química, la biología, la física, ciencia e ingeniería de materiales. Los sistemas supramoleculares han encontrado aplicaciones en sensores, materiales luminiscentes, geles, sondas biológicas, entre otros campos y principalmente en la nanomedicina.²⁵

2.9 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

El término nanotecnología hace referencia a un campo multidisciplinario que se encarga del estudio, el diseño, la síntesis y la aplicación de materiales y sistemas funcionales a través del control de la materia a escala nanométrica (10^{-9} m). Más que el gusto por

manipular la materia a escalas de tamaño reducidas, lo interesante de la nanotecnología es el estudio de las propiedades físicas y químicas únicas de las nanoestructuras (por ejemplo propiedades de superficie, reología, conductividad eléctrica y magnetismo, entre otras).²⁶

La nanomedicina se refiere a la aplicación de la nanotecnología al diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades y en consecuencia, al entendimiento de los procesos fisiopatológicos que intervienen en el origen y curso de una enfermedad determinada. Hoy en día, se busca la integración de los nanosistemas con la biología para desarrollar nuevos dispositivos de diagnóstico, agentes de contraste, herramientas analíticas, y sistemas de liberación de fármacos (DDS por sus siglas en inglés, *drug delivery systems*).

Los DDS están cambiando el paradigma de la industria farmacéutica tradicional, a través de la administración dirigida y la liberación de agentes terapéuticos en células específicas, con el fin de minimizar los efectos adversos no deseados. Además, algunos fármacos muy potentes con una baja biodisponibilidad, debido a sus propiedades físicas o químicas desfavorables, se pueden formular en DDS, revelando así su eficacia terapéutica real.²⁷ Bajo este enfoque, cuando un fármaco insoluble se carga dentro de un DDS, éste aumenta su solubilidad y/o estabilidad, se prolonga su tiempo en circulación, y aumenta la acumulación del fármaco en las células blanco. Con la ayuda de los DDS, se espera que los fármacos no interactúen con los entornos biológicos antes de su liberación en sus dianas moleculares. Por lo tanto, la manipulación del tamaño, la forma y la superficie de los nanosistemas puede permitir el aumento del índice terapéutico del fármaco.

El uso médico de los DDS está ganando terreno rápidamente en diversas áreas de la medicina, con diversos ejemplos ya en el mercado y muchos progresando a través de las diferentes etapas del desarrollo de nuevos medicamentos.²⁸ Los DDS que se han diseñado para la terapia son muy diversos, tales como micelas, liposomas, dendrímeros, nanopartículas inorgánicas, nanopartículas y nanotubos de carbono, nanoemulsiones, nanopartículas poliméricas o de péptidos, y nanopartículas lipídicas sólidas (**Figura 5**).²⁹

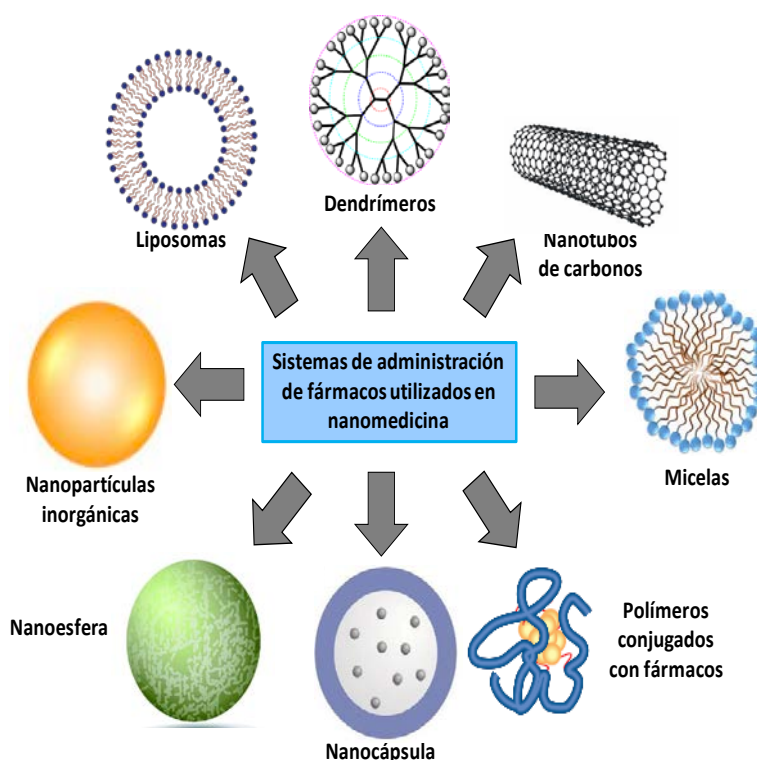


Figura 5. Nanosistemas utilizados en nanomedicina

2.10 SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ESTIMULO-RESPUESTA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

Como se mencionó en la sección 2.9, los DDS buscan reducir los efectos adversos que causan los agentes quimioterapéuticos, liberando la carga en un sitio específico y/o en un tiempo más apropiado para evitar toxicidad. Así la nanomedicina propone que los sistemas de liberación se deben desarrollar para identificar el sitio blanco, el cual puede ser un órgano, una célula, un compartimento celular (núcleo, citoplasma) o incluso, un organelo, dirigirse a él y entregar selectivamente su carga terapéutica.³⁰ Además, que la entrega del fármaco deberá ser de manera controlada en respuesta a un estímulo interno (pH, presencia de enzimas o un cambio del potencial redox) o externo (luz, temperatura, campo magnético)³¹ y que se podrán transportar simultáneamente más de un fármaco y/o biomacromoléculas (péptidos, proteínas y ácidos nucleicos)³² como agentes de direccionamiento, aprovechando la sobreexpresión de receptores en las membrana de las células cancerígenas.

Cabe mencionar que con ayuda de estos sistemas se puede lograr la entrega de agentes quimioterapéuticos y, en algunos casos, controlar la duración y el grado de liberación del fármaco en células tumorales.

2.11 PROFÁRMACOS EN EL DISEÑO DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS ESTÍMULO-RESPUESTA

Los profármacos son entidades químicas farmacológicamente inactivas que, después de su administración, se biotransforman en especies farmacológicamente activas.³³ Una estrategia importante para lograr la activación local de profármacos implica el uso de conjugados sensibles al pH.³⁴ Por lo tanto, la preparación de profármacos antineoplásicos emerge como una de las estrategias para aumentar selectividad, mejorar los índices terapéuticos y reducir la toxicidad en tejidos normales. La integración de estos profármacos en los DDS estímulo-respuesta ha dado lugar a nanosistemas que mejoran la estabilidad del profármaco y por consiguiente aumentan la disponibilidad de fármacos.

En estas plataformas el profármaco puede ser unido al nanotransportador covalentemente o por interacciones supramoleculares. Actualmente, el diseño de profármacos de Dox es un enfoque que ha sido explorado continuamente para superar los efectos secundarios de la Dox libre. Además, un número considerable de nanotransportadores que contienen profármacos de Dox han sido reportados.³⁵ Estos nanosistemas de entrega incluyen desde simples liposomas y micelas hasta plataformas multicomponente altamente sofisticadas, sin embargo, ninguno de ellos ha sido aprobado.

En las últimas décadas, la investigación se ha centrado particularmente en el desarrollo de dendrímeros, ya que tienen propiedades únicas que los convierten en portadores ideales para el suministro dirigido (con o sin ligando) de agentes terapéuticos y de diagnóstico.³⁶

2.12 DENDRÍMEROS

El nombre “dendrúmero” proviene de la palabra griega “*dendron*” que significa “árbol”, y “*meros*” que significa “parte”; esto se observa en su estructura, la cual contiene varias unidades de ramificación. Los primeros dendrímeros fueron descritos por Vögtle en 1978.³⁷ Los dendrímeros son macromoléculas monodispersas con una estructura tridimensional altamente ramificada, éstos contienen tres componentes distintivos: **(a)** un núcleo; **(b)** una

capa interior (dendrones), compuesta de unidades repetitivas (generaciones), unidas radialmente al núcleo; y **(c)** una periferia (con grupos terminales) unida a la generación más externa (**Figura 6**). La capacidad de adaptar las propiedades del dendrímero a las necesidades terapéuticas los convierte en portadores de moléculas pequeñas y biomoléculas. Debido a su estructura globular, los dendrímeros presentan cavidades internas, por ello se ha reportado que éstos presentan interacciones supramoleculares de tipo anfitrión–huésped, por lo que se consideran portadores de fármacos prometedores.

En función de la estructura y las propiedades del dendrímero, el fármaco se encapsula en las cavidades o se conjuga químicamente con los grupos terminales de la periferia. La encapsulación de fármaco dentro de las cavidades hidrofóbicas o en la superficie de los dendrímeros a través de interacciones electrostáticas preserva la integridad química y las propiedades farmacológicas del fármaco, mientras que la unión covalente de las moléculas de fármaco a los grupos de la superficie de los dendrímeros a través de enlaces químicos proporciona un mejor control en la liberación y en la administración dirigida del fármaco¹⁰. Las características clave de los dendrímeros, que respaldan su uso como DDS, incluyen su excelente absorción por las células, su capacidad de adoptar múltiples funcionalidades y su capacidad para atrapar mayores cantidades de fármaco.³⁶

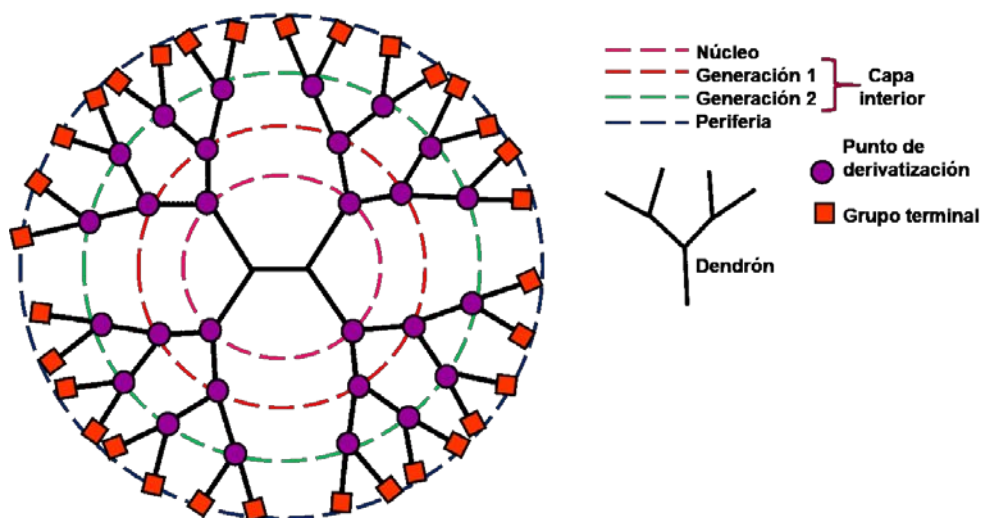


Figura 6. Estructura general de un dendrímero.

2.12.1 Propiedades de los dendrímeros

Al comparar los dendrímeros con otras estructuras a nanoescala, éstos cuentan con propiedades específicas únicas que les otorgan ventajas sobre ellas, las cuales son:

2.12.2 Monodispersidad

La monodispersidad se define como la mínima variación de la masa molecular de un polímero; es una herramienta que permite trabajar con moléculas de estructura y tamaño bien definidos. Los dendrímeros son la clase de polímeros que, debido a sus métodos de síntesis y purificación, generación por generación alrededor del núcleo, se puede tener un alto nivel de control sobre su tamaño, sus puntos de ramificación y funcionalidad, en comparación con los polímeros lineales, otorgándoles así la propiedad de monodispersidad.^{37, 38, 39.}

2.12.3 Tamaño y forma nanométricos

Los dendrímeros tienen dimensiones a nanoescala, debido a su estrategia de síntesis organizada y sus propiedades de control de tamaño, es por esto que con frecuencia son denominados “proteínas artificiales”, ya que tienen aproximadamente el mismo tamaño y forma que algunas proteínas.⁴⁰ La forma de los dendrímeros es constante, debido a que durante su síntesis es posible controlar las funcionalidades en el interior y en la periferia de los mismos. Está reportado que los dendrímeros de menor generación (0-3) adoptan formas lineales o elipsoides, mientras que los de mayor generación (4-10), poseen formas esféricas o globulares.⁴¹ Los dendrímeros con un tamaño y forma uniformes son de gran interés en nanomedicina, debido a su capacidad para atravesar las membranas celulares y reducir el riesgo de eliminación prematura del cuerpo. El control sobre la arquitectura dendrítica los convierte en un portador ideal de fármacos.⁴²

2.12.4 Solubilidad y reactividad

La solubilidad de los dendrímeros está determinada por los grupos funcionales de la periferia, las unidades repetitivas de cada generación e incluso del núcleo. Además, su alta solubilidad en agua garantiza la aplicación como potenciadores de la solubilidad para moléculas huéspedes hidrófobas. Por otro lado, la presencia de grupos funcionales de tipo -NH₂, -COOH, -OH permite que se acoplen con moléculas bioactivas, dando origen a nuevos dendrímeros con superficies modificadas, los cuales otorgan nuevas estrategias en el diseño de éstos. En general, la alta solubilidad y reactividad hacen que los dendrímeros sean adecuados como plataformas en campos biomédicos.⁴¹

2.12.5 Biocompatibilidad

Los dendrímeros pueden interactuar inespecíficamente con una variedad de células y componentes celulares, lo cual provoca consecuencias tóxicas. Esta toxicidad celular se asocia con la cantidad de grupos terminales y cargas superficiales, por ejemplo, los dendrímeros catiónicos muestran toxicidad dependiente de la dosis y de la generación, a mayor generación son más tóxicos.⁴⁰ En cambio, los dendrímeros aniónicos o neutros no muestran toxicidad. La citotoxicidad de dendrímeros con grupos superficiales catiónicos, es similar a la encontrada para los liposomas que se utilizan en el área clínica, por ejemplo, Doxil®, (la formulación liposómica de doxorubicina).³⁸

Para ser utilizables en aplicaciones de administración de fármacos, los dendrímeros deben cumplir ciertas demandas, además de ser no tóxicos, deben ser no inmunogénicos, atravesar membranas biológicas, circular en el cuerpo el tiempo necesario para ejercer un efecto clínico y dirigirse a estructuras específicas. La inmunogenicidad también tiene un rol relevante para esta aplicación; estudios realizados en dendrímeros que tienen grupos amino en la periferia mostraron inmunogenicidad.⁴⁰ Sin embargo, después de que estos grupos amino son modificados con polímeros como el polietilenglicol (PEG) muestran una reducción en la inmunogenicidad y además se observa la prolongación de permanencia en el torrente sanguíneo.³⁷ En general, los dendrímeros muestran una biocompatibilidad prometedora.

2.13 DENDRÍMEROS PAMAM

Los dendrímeros de poli amidoamina (PAMAM) fueron sintetizados por primera vez por Donald Tomalia en 1984.⁴³ Estos dendrímeros fueron sintetizados por el método divergente hasta la generación 10, con núcleos como el amoniaco y la etilendiamina, y monómeros que se repiten de amidoamina (**Figura 7**). Estos cuentan con un índice de polidispersidad menor a 1.08, lo que significa que tienen una distribución de tamaño uniforme.⁴⁴ Debido a su arquitectura funcional, los dendrímeros PAMAM presentan cavidades internas que tienen la capacidad de incluir moléculas huéspedes, aumentando el tamaño de la cavidad conforme aumenta la generación del mismo. Es por esto que son ampliamente estudiados como sistemas de administración de fármacos.

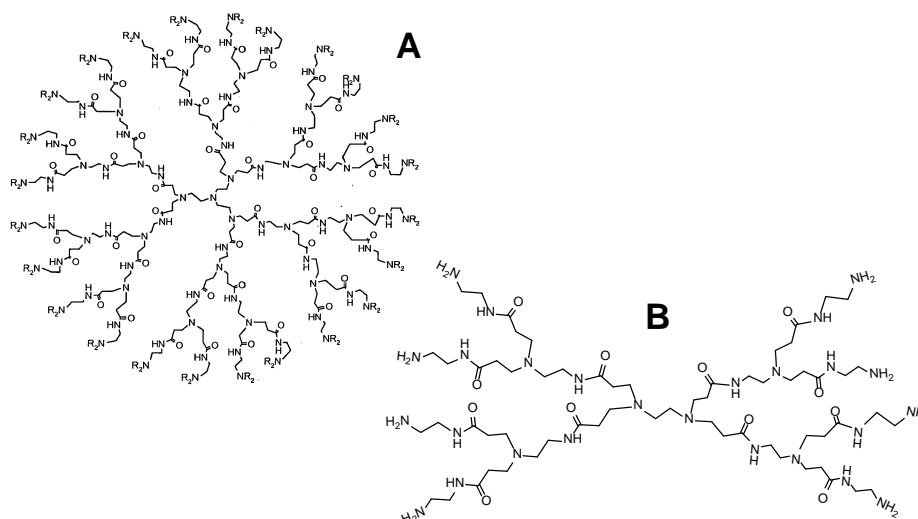


Figura 7. Estructura química de dendrímeros PAMAM (A) PAMAM G3 con núcleo de amoniaco, (B) PAMAM G1 con núcleo de etilendiamina

2.13.1 Toxicidad de los dendrímeros PAMAM

Debido a que a pH fisiológico (pH = 7.4) las aminas primarias de los dendrímeros PAMAM se encuentran cargadas positivamente, éstos presentan toxicidad, debido a que interactúan con la membrana celular, la cual se encuentra cargada negativamente, comprometiendo su integridad y filtrando componentes intracelulares, lo que finalmente conduce a una muerte celular (**Figura 8**). Esta toxicidad está asociada además al aumento de generación, debido al incremento en el número de grupos amino terminales.⁴⁵ Es por esta razón que la aplicación clínica de los dendrímeros PAMAM está limitada.

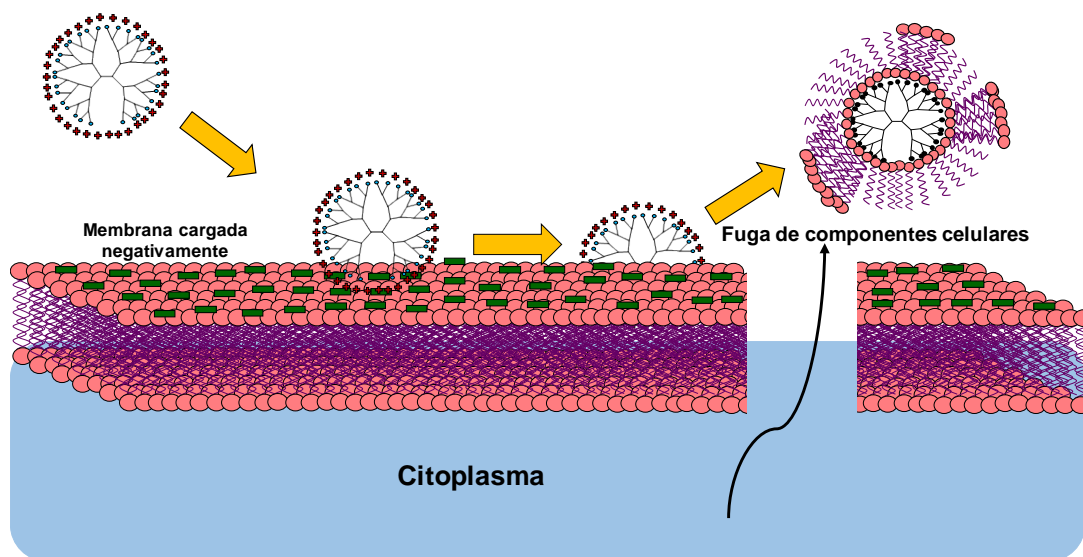


Figura 8. Interacción del PAMAM con la membrana celular

2.13.2 Ingeniería de superficie en los dendrímeros PAMAM

Las investigaciones más recientes para mejorar la biocompatibilidad de los dendrímeros PAMAM se centran en la ingeniería de superficie, es decir, en la modificación de la periferia, ya que es necesario neutralizar las aminas cargadas positivamente de la periferia conservando la capacidad de administrar fármacos. Existen varias estrategias, como el acoplamiento con carbohidratos, aminoácidos o péptidos, acetilaciones y PEGilaciones (**Figura 9**). Además, esta modificación en la periferia también mejorará las propiedades fisicoquímicas del dendrímero, la capacidad para encapsular fármacos y permitirá la conjugación con ligandos para la unión específica a células diana.⁴⁶

Una de las modificaciones que se utilizan en la periferia de PAMAM, es el acoplamiento con ciclodextrinas (CDs), debido a que provocan una mejora sinérgica en la administración de fármacos, con la suma de las propiedades de ambos y aumentando la carga de fármaco.⁴⁷ Investigaciones anteriores reportaron la conjugación del dendrímero PAMAM G2 con una, dos y tres moléculas de CDs y PAMAM G5 con una molécula de β -ciclodextrina para aplicaciones en la transfección de ADN.^{48,49}

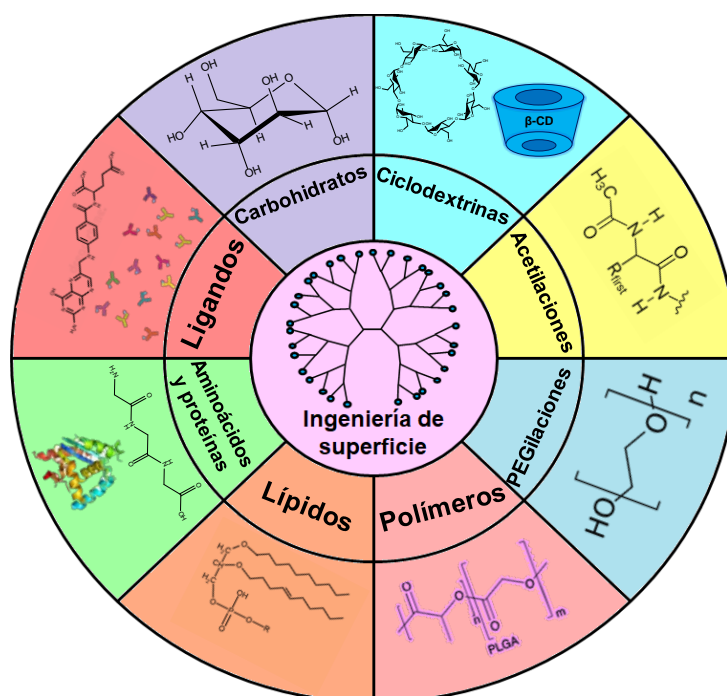


Figura 9. Ingeniería de superficie del dendrímero PAMAM

2.14 CICLODEXTRINAS

Químicamente, las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos unidos a través de enlaces glicosídicos α -1,4. La nomenclatura de las CDs se basa en las unidades de glucosa contenidas en su estructura, de forma que las CDs que contienen seis unidades se llaman alfa-CD (α -CD), siete unidades beta-CD (β -CD) y ocho unidades gamma-CD (γ -CD) (**Figura 10**).⁵⁰

Como resultado de la rotación restringida de los enlaces de las unidades de glucopiranososa, debido a la conformación de silla, las CDs son moléculas en forma de cono truncado con una cavidad de volumen determinado, en las que los grupos hidroxilos unidos a los carbonos 3 y 4 se encuentran en la cara secundaria o cara más amplia y los grupos hidroxilos unidos al carbono 6 están localizados en la cara primaria o cara más estrecha de la CD. Estos grupos hidroxilo tienen una reactividad diferente, debido a que están unidos a carbonos secundarios y primarios respectivamente. El exterior de la cavidad está revestido por estos grupos hidrófilos y la superficie interna está revestida por grupos éter, de átomos de oxígeno anoméricos.⁵¹ Por lo tanto, las CD tienen una cavidad interna hidrofóbica, que contiene moléculas de agua, y una superficie externa hidrófila. Esta conformación especial permite la inclusión de moléculas apolares o partes de moléculas dentro de la cavidad de CD, las cuales deben tener un tamaño compatible con la cavidad interna de la CD. Con esto se forma un complejo de inclusión estable, confiriéndoles nuevas características fisicoquímicas, entre las que se encuentran un incremento en la solubilidad en agua de la molécula huésped y a menudo, como consecuencia, su biodisponibilidad.

Las CDs pueden ser modificadas químicamente para mejorar sus propiedades fisicoquímicas y más específicamente su actividad farmacológica. La CD más utilizada en la construcción de DDS es la β -CD, la cual se modifica para funcionalizarla y así originar nuevos materiales para la liberación de fármacos.⁵²

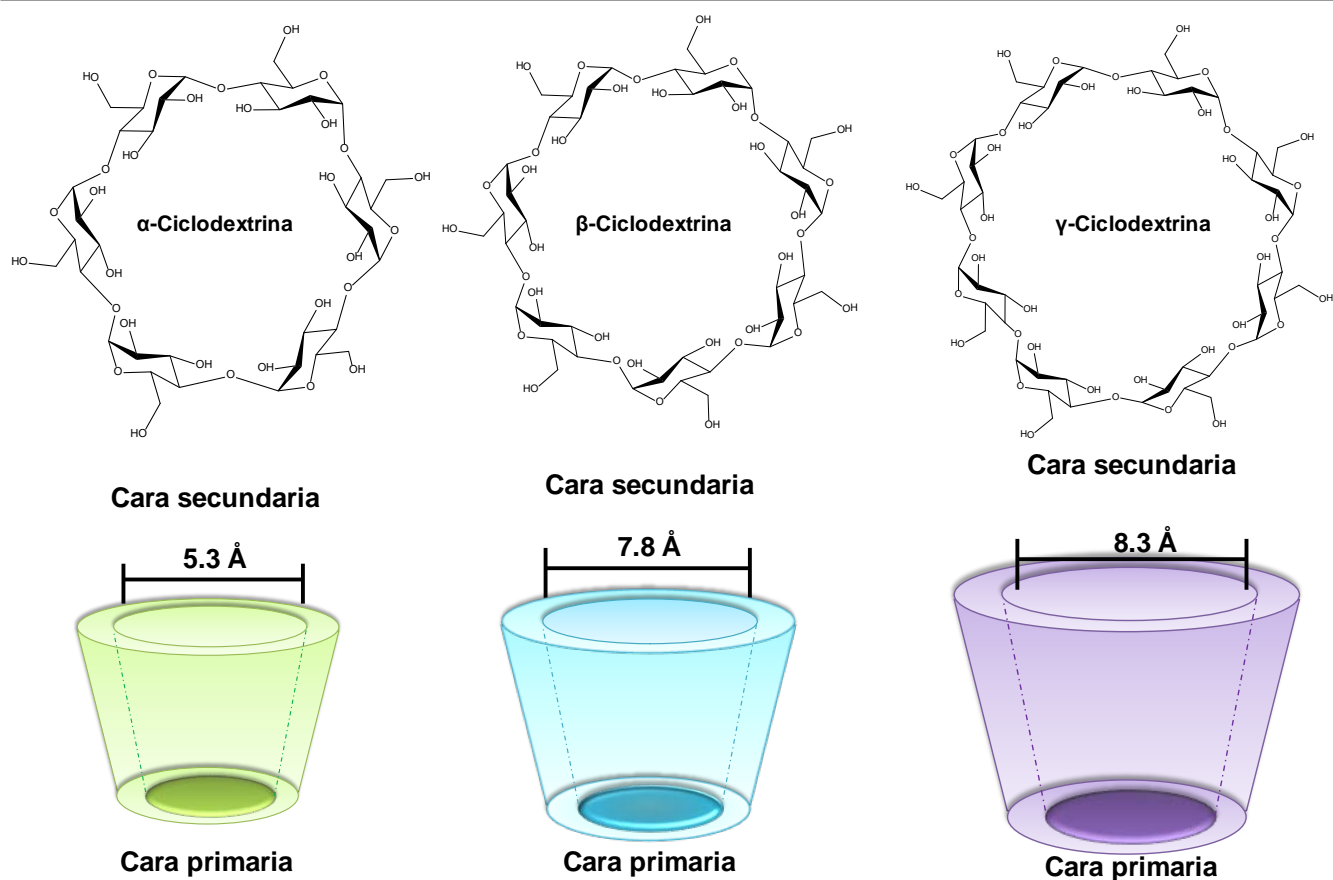


Figura 10. α , β y γ ciclodextrinas, estructura química, tridimensional y tamaño de la cavidad

2.14.1 Complejos de inclusión (CI) con CDs

En solución acuosa, la cavidad de las CDs está ocupada por moléculas de agua. Por lo tanto, la principal fuerza impulsora de la formación del complejo es la liberación de moléculas de agua de esta cavidad. Las moléculas de agua se desplazan por moléculas huésped más hidrofóbicas, presentes en la solución para favorecer una asociación apolar-apolar y una disminución de la tensión del anillo de las CDs, dando lugar a un estado de menor energía, más estable. La unión de moléculas huésped dentro de la CD anfitriona no es fija o permanente, sino más bien un equilibrio dinámico. Por lo tanto, la formación de un complejo de inclusión es el resultado de un equilibrio entre las moléculas huésped y las moléculas de CD y el complejo de inclusión (**Figura 11**). En general, existen cuatro interacciones energéticamente favorables, que ayudan a desplazar el equilibrio para formar el complejo de inclusión: (i) sustitución de las moléculas de agua de la cavidad de la CD, (ii) un aumento del número de interacciones hidrofobas y de enlaces de hidrógeno formados, (iii) la liberación de la tensión del anillo, y (iv) fuerzas de van der Waals. Por lo tanto, otros factores pueden influir en la formación de complejos de inclusión, tales como tipo de CD,

tamaño de la cavidad, el pH, el disolvente y el estado de ionización de la molécula huésped, la temperatura y el método de preparación.⁵³

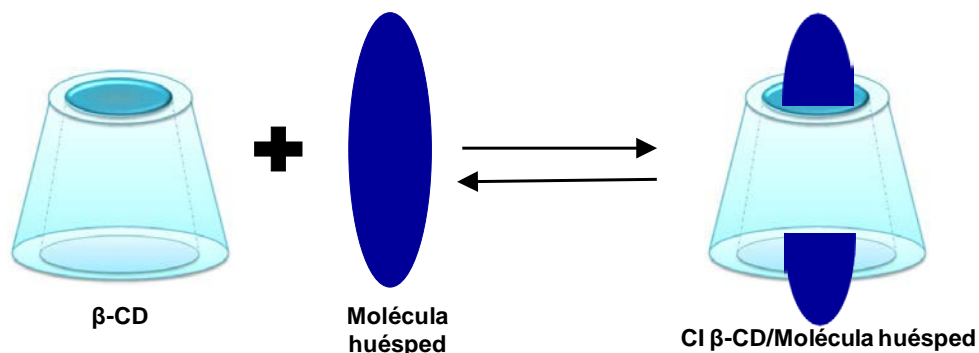


Figura 11. Formación de los CI con β -ciclodextrina y una molécula huésped.

2.14.2 Adamantano

El Adamantano(Ad), es un cicloalcano en forma de jaula con estructura simétrica y alta estabilidad. Su diámetro es de aproximadamente 7 Å y su volumen es de aproximadamente 180 Å³, propiedades que son muy parecidas a las de la cavidad hidrofóbica de la β -CD ($d = 7.8$ Å, $v = 270$ Å³), por lo tanto, puede formar un complejo de inclusión (1:1) entre el Ad y la β -CD con una constante de afinidad, en agua, de 5×10^4 M⁻¹. Debido a la formación de CI tan estables entre la β -CD y el Ad se han construido nuevos DDS altamente sofisticados utilizando estos componentes.⁵⁴

2.15 QUÍMICA CLICK

Una de las estrategias más exitosas para el acoplamiento entre moléculas se llama química "click". La química "click" abarca un grupo de reacciones que reúnen las siguientes características: reacciones simples de realizar en donde se obtienen altos rendimientos, tolerantes a una amplia variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción, altamente selectiva y regioespecífica, en donde el aislamiento del producto final sólo requiere de una purificación simple. De entre las muchas reacciones ensayadas, el proceso de cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos se ha establecido como la reacción prototipo dentro de las clasificadas como "Click". El primer 1,2,3-triazol fue sintetizado por primera vez por A. Michael en 1893; no fue hasta 1960 que R. Huisgen y colaboradores que investigaron con detalle la gran familia de reacciones de cicloadición 1,3-dipolares.⁵⁵ Bajo este proceso se sintetizan 1,2,3-triazoles, pero requiere de temperaturas muy elevadas y periodos de reacción

muy largos, comprendidos entre más de 60 horas para finalmente obtener los dos regioisómeros 1,4-triazol y 1,5-triazol en proporciones prácticamente equimolares.

La reacción de cicloadición 1,3-dipolar a partir de una azida y un alquino catalizada por cobre (I) (CuAAC, por sus siglas en inglés) fue reportada independientemente en 2001, por el grupo de M. Meldal y por el grupo de K.B. Sharpless, V.V. Fokin y colaboradores, la cual produce 1,2,3-triazoles 1,4-disustituídos (**Figura 12**). El grupo de Meldal empleó CuI y *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) para la síntesis de péptidos 1,2,3-triazoles en disolventes orgánicos a partir de aminoácidos alquilados unidos a soportes sólidos;⁵⁶ mientras que el grupo de Sharpless, Fokin y colaboradores, describieron el uso de sulfato de cobre pentahidratado y ascorbato de sodio en sistemas acuosos y diseñaron un procedimiento práctico para la unión covalente de prácticamente cualquier fragmento que contenga un grupo azida y un grupo alquino.^{57,58} La reacción de CuAAC es modular, específica y regioselectiva, se obtienen subproductos inertes y ofrece altos rendimientos.⁵⁹ Además, esta reacción se lleva a cabo en condiciones simples y con materias primas accesibles. A pesar del gran contenido energético que presentan los alquinos y las azidas, estos grupos funcionales son de los menos reactivos en química orgánica. Esta estabilidad cinética es la responsable de la buena tolerancia frente a biomoléculas, oxígeno molecular, agua y a la mayoría de las condiciones experimentales encontradas en medio orgánico o biológico.⁶⁰ La velocidad de reacción de CuAAC se incrementa en un factor de 10^7 en relación con el proceso térmico, por lo que es convenientemente rápido a temperatura ambiente. La reacción no se ve afectada por las propiedades estéricas y electrónicas de los grupos unidos a la azida y al alquino, y las azidas primarias, secundarias e incluso terciarias, deficientes o no de electrones, alifáticas, aromáticas y heteroaromáticas suelen reaccionar bien con alquinos terminales diversamente sustituidos. La reacción transcurre en muchos disolventes próticos y apróticos, incluida el agua, y no se ve afectada por la mayoría de los grupos funcionales orgánicos.⁶¹

Además, cabe resaltar que los triazoles son anillos heterocíclicos biocompatibles con excelente capacidad de formar enlaces de hidrógeno y con gran estabilidad química (ser inerte a condiciones ácidas y básicas, así como a oxidantes y reductoras). También se sabe que son muy parecidos en las propiedades electrónicas al enlace peptídico sin ser susceptibles a la escisión hidrolítica, de manera que se pueden utilizar como enlazantes “linkers” en el diseño de nanosistemas para la liberación de fármacos y química farmacéutica.⁶²

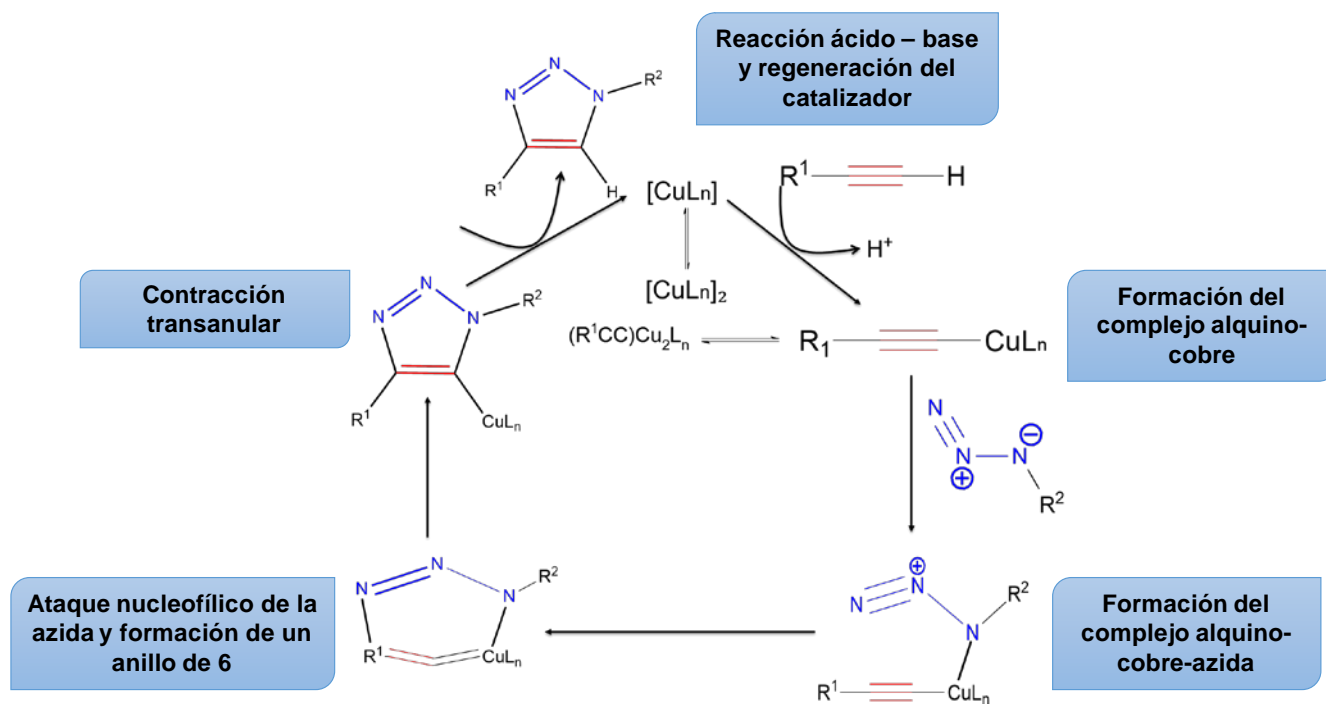
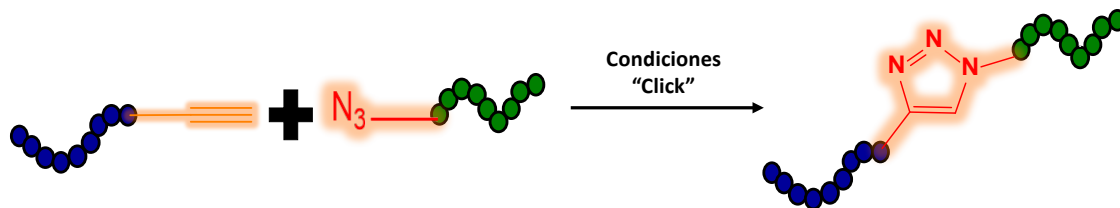


Figura 12. Reacción y mecanismo de la *Química Click*

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

a) Síntesis y caracterización de profármacos de doxorubicina con enlaces sensibles a pH ácido

La doxorubicina (Dox) es uno de los quimioterapéuticos más eficaces para el tratamiento de diversos tipos de tumores sólidos, sin embargo, sus efectos adversos, específicamente la cardiotoxicidad dosis-dependiente limitan su uso. Una de las estrategias para solucionar estos efectos adversos es la construcción de profármacos con el fin de lograr la activación local en el blanco adecuado y con esto minimizar la toxicidad en células normales. Por otra parte, la liberación de un fármaco es un proceso bastante complejo. Es poco realista simplificar los mecanismos de entrega para todos los nanotransportadores y hacer que cumplan con los requisitos de identificación, internalización y liberación del fármaco. Así para tener una mejor comprensión de los sistemas de liberación controlada de fármacos es crucial hacer una buena elección del enlazador pH sensible del profármaco, basándose en el mecanismo que generará el fármaco activo. El estudio de estos procesos es fundamental para desarrollar nanoformulaciones clínicamente alcanzables. Bajo este contexto este proyecto consiste primeramente en la síntesis de profármacos de Dox con un residuo de adamantano a través de enlaces sensibles a pH ácido: amida (Ad-a-Dox), hidrazona (Ad-h-Dox) y éster (Ad-e-Dox) y su estudio sistemático a nivel fisicoquímico y biológico, teniendo en cuenta una síntesis sencilla y accesible.

b) Síntesis y caracterización de plataformas de liberación de fármacos con beta-ciclodextrina

Actualmente se construyen DDS en donde la palabra "drug" no sólo abarca fármacos, sino también otros agentes terapéuticos tales como factores de crecimiento, proteínas y ácidos nucleicos, generando sistemas cada vez más complejos que al parecer carecen de reproducibilidad, ya que resulta prácticamente imposible diseñar un DDS capaz de entregarlo todo. Es por esto que, en este proyecto se propone el diseño racional de cinco sistemas poliméricos. Como parte de estos nuevos sistemas se seleccionó a la β -ciclodextrina (β CD), ya que está aprobada por la FDA para su uso como excipiente, al no tener una forma cilíndrica perfecta su estructura tridimensional se presenta como un cono truncado con una



cavidad interna hidrofóbica capaz de formar complejos de inclusión (CI) con moléculas de naturaleza hidrofóbica. Así, se propone la construcción de dos mono modificaciones de la β CD, un dímero y un trímero de la misma. Por otra parte, se propone la modificación química de la superficie del dendrímero PAMAM-G0 con cuatro unidades de β CD. Ya que el enfoque principal de estas moléculas es su uso *in vivo*, es importante utilizar condiciones de síntesis suaves, mediante el uso tanto de disolventes como de polímeros no tóxicos. Así, para lograr estas mono y multi modificaciones se propone el uso de la química "click", como una herramienta altamente eficiente para la construcción de estas novedosas plataformas biocompatibles.

Finalmente, una vez caracterizadas las plataformas a base de β CD, se seleccionará como carga terapéutica el profármaco con el enlazador que mejor comportamiento *in vitro* tenga para obtener sistemas que respondan a un estímulo específico (pH); idealmente, el estímulo sería capaz de modular la tasa de liberación de la Dox sólo de manera intracelular en las células tumorales, y evitar así los efectos secundarios causados por la Dox libre.

4. HIPÓTESIS

La preparación de 3 profármacos de doxorubicina con enlaces sensibles a pH ácido (hidrazona, amida y éster) y la determinación de su cinética de hidrólisis, permitirá seleccionar el mejor enlazador para la correcta selección del profármaco que permita una liberación controlada en células tumorales, reduciendo así la toxicidad en células sanas.

Además la construcción de plataformas a base de β CD modificada con patrones mono, di, tri y un dendrímero PAMAM permitirá obtener derivados con mayor solubilidad en agua comparados con la β CD nativa. Estas modificaciones no afectarán la formación de complejos de inclusión si se utiliza para el ensamblaje una molécula huésped con alta afinidad por la cavidad de la β CD, como el anillo de adamantano.

Una vez ensambladas las plataformas con el profármaco modelo, permitirán incrementar la carga terapéutica de manera controlada. Así, estos sistemas permitirán aumentar la concentración del fármaco sólo en las células blanco, promoviendo así una menor toxicidad en células sanas.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Diseñar y desarrollar de manera racional sistemas supramoleculares tipo estrella y dendríticos con unidades de β CD para la liberación intracelular de doxorubicina.

5.2 Objetivos particulares.

- ✓ Sintetizar tres profármacos con enlace sensible a pH ácido (hidrazona, amida y éster) entre la doxorubicina y el adamantano.
- ✓ Caracterizar los profármacos mediante sus datos espectroscópicos (IR, RMN ^1H , ^{13}C , EM).
- ✓ Determinar la cinética de hidrólisis de los tres profármacos a pH 7.4, 6.5, 4.5 y 3.5.
- ✓ Determinar la actividad citotóxica *in vitro* en un panel de tres líneas celulares tumorales: **MCF-7** (adenocarcinoma de mama humano, positivo a receptores de estrógeno), **MDA-MB 231** (adenocarcinoma de mama humano, triple negativo).
- ✓ Determinar la actividad citotóxica *in vitro* en una línea celular no carcinogénica: **MCF-10** (línea celular epitelial humana de mama no tumorigénica).
- ✓ Seleccionar el profármaco con mejor comportamiento *in vitro* (cinética de hidrólisis y actividad citotóxica) para cargarlo en un sistema supramolecular.
- ✓ Sintetizar y caracterizar 2 monoderivados de la β CD, incorporando residuos aromáticos en la cara primaria.
- ✓ Determinar cuantitativamente la solubilidad acuosa de los 2 monoderivados de la β CD.
- ✓ Determinar su comportamiento *in vitro* en dos líneas celulares tumorales: **MCF-7**, **MDA-MB 231** y una línea celular no carcinogénica: **MCF-10**.
- ✓ Sintetizar y caracterizar 1 dímero, 1 trímero de β CD y un dendrímero PAMAM G0 con β CD en la periferia.
- ✓ Determinar cuantitativamente la solubilidad acuosa del dímero, trímero y dendrímero PAMAM G0- β CD

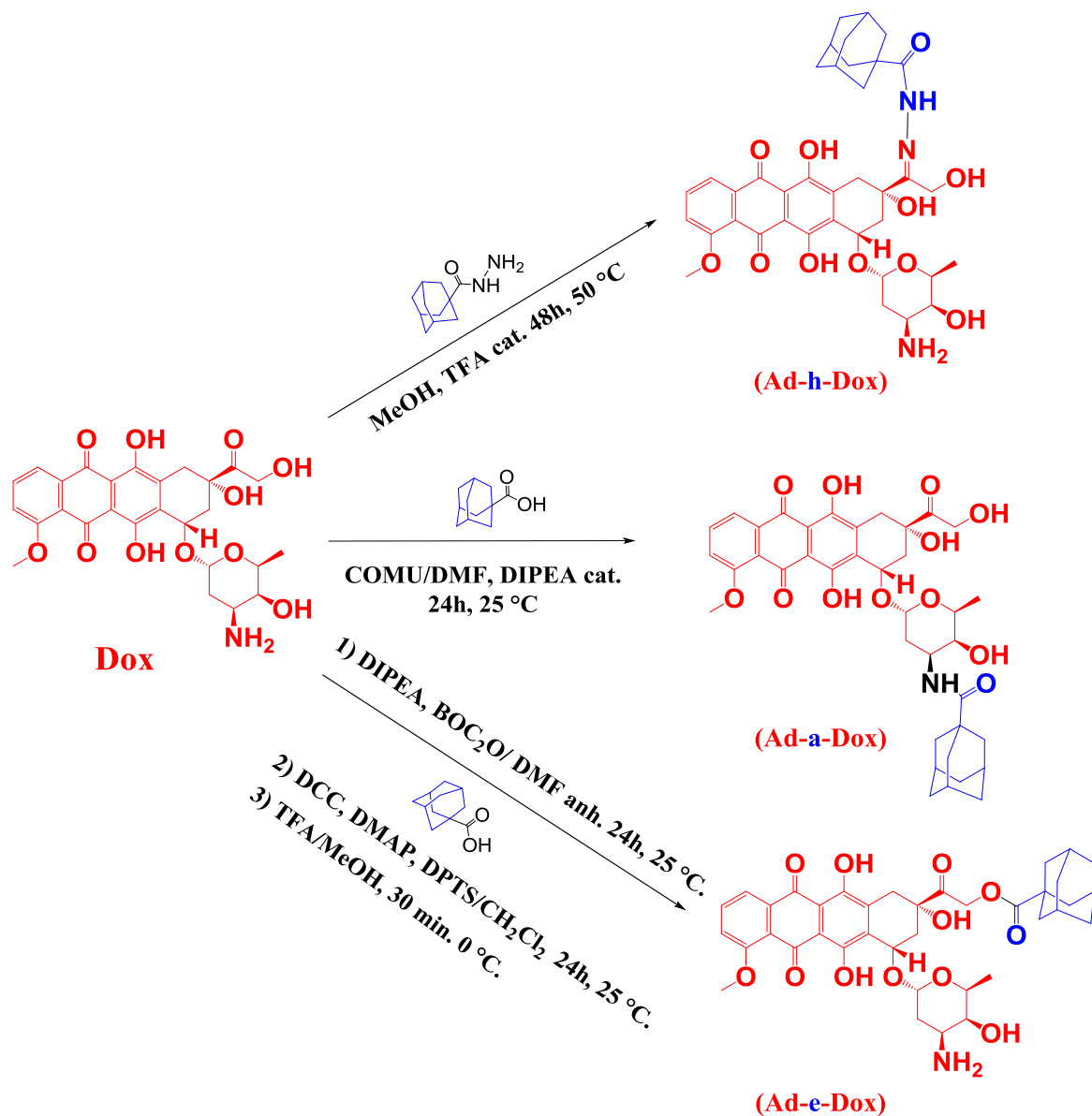


- ✓ Determinar su comportamiento *in vitro* en tres líneas celulares tumorales: **MCF-7**, **MDA-MB 231** y una línea celular no carcinogénica: **MCF-10**.
- ✓ Seleccionar 2 plataformas supramoleculares y formar los complejos de inclusión con el profármaco Ad-Dox con mejor comportamiento *in vitro*.
- ✓ Caracterizar los complejos de inclusión entre la β CD y el profármaco Ad-Dox modelo mediante RMN 2D ROESY y en estado sólido (DSC y TGA).
- ✓ Determinar la cinética de liberación de los complejos de inclusión β CD/Ad-Dox a pH 7.4, 6.5, 4.5 y 3.5.
- ✓ Determinar la eficacia de los ensamblados supramoleculares *in vitro* en dos líneas celulares tumorales: **MCF-7**, **MDA-MB 231** y una línea celular no carcinogénica : **MCF-10**.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 SÍNTESIS

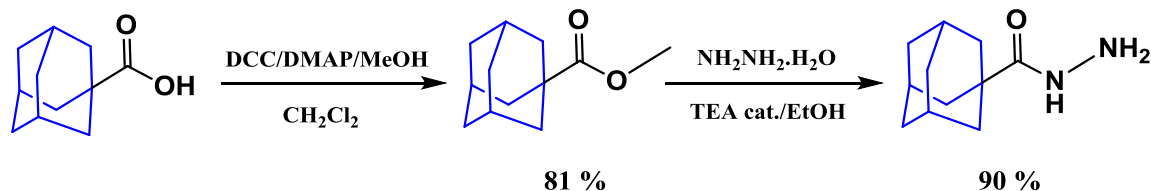
Los profármacos Ad-Dox fueron obtenidos mediante la siguiente ruta sintética:



Esquema 1. Ruta de síntesis para la obtención de los profármacos Ad-Dox con diferentes enlaces sensibles a pH: hidrazona (Ad-h-Dox), amida (Ad-a-Dox) y éster (Ad-e-Dox).

6.1.1 Intermediarios.

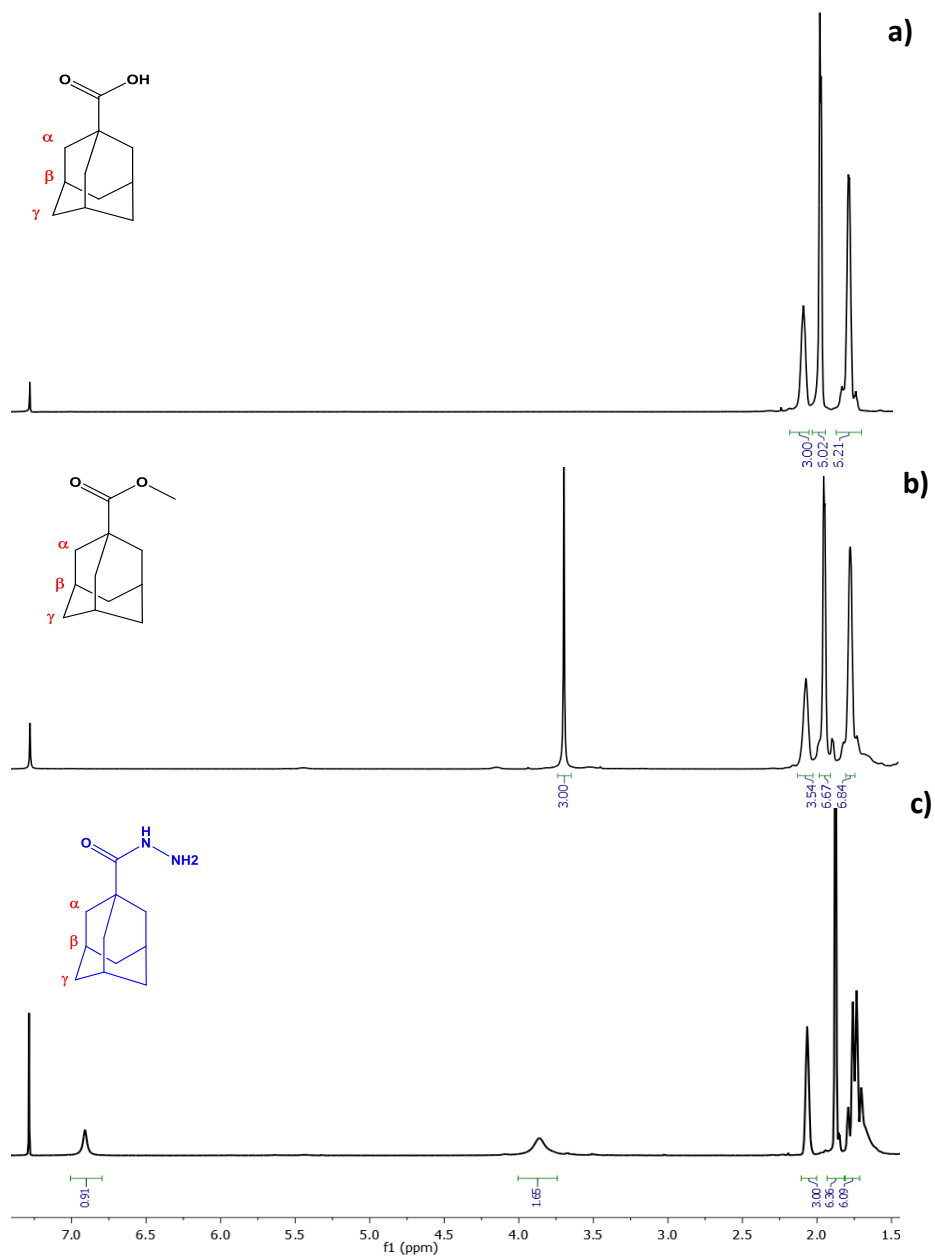
6.1.1.1 Síntesis de la hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico (Ad-NH-NH₂).



Esquema 2. Ruta sintética para la obtención de la hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico.

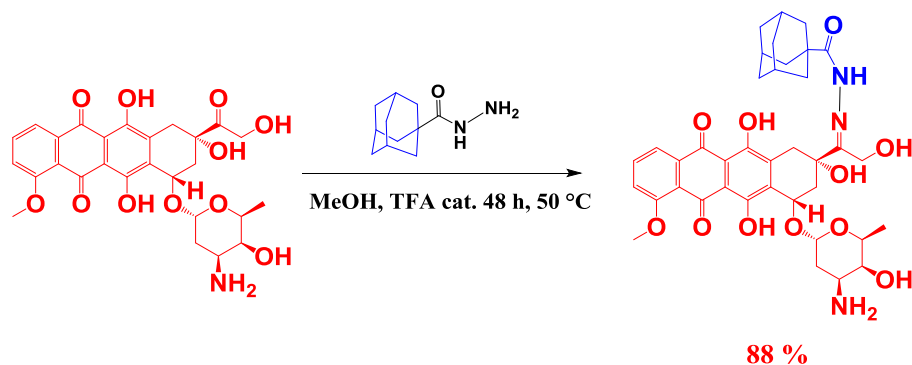
Para la obtención del fármaco **Ad-h-Dox** es necesaria la síntesis de 2 intermediarios. Primeramente, el 1-metoxicarbonil adamantano que se obtuvo partiendo del ácido 1-adamantan carboxílico (AdCOOH), modificando la técnica usualmente empleada por Guo *et al*,⁶³ que consiste en hacer reaccionar el AdCOOH con MeOH mediante catálisis con ácido *p*-toluen sulfónico. Sin embargo, bajo estas condiciones no se obtiene el producto esperado en buen rendimiento. Así, se realizó la adaptación de la metodología empleada por Steglich (DCC/DMAP) adicionando DPTS para favorecer la esterificación, con lo que se obtuvo el éster correspondiente con un rendimiento de 81%.

Para la preparación de Ad-NH-NH₂, se siguió la metodología original sin modificaciones. En el **Espectro 1**, se muestra la caracterización por RMN ¹H en CDCl₃ de los intermediarios 1-metoxicarbonil adamantano y Ad-NH-NH₂, comparados con la materia prima, donde resalta la aparición de las señales correspondientes a los protones unidos a los grupos funcionales correspondientes:



Espectro 1. RMN ^1H en CDCl_3 de **a)** AdCOOH , **b)** AdCOOCH_3 y **c)** AdCONHNH_2 a 400 MHz.

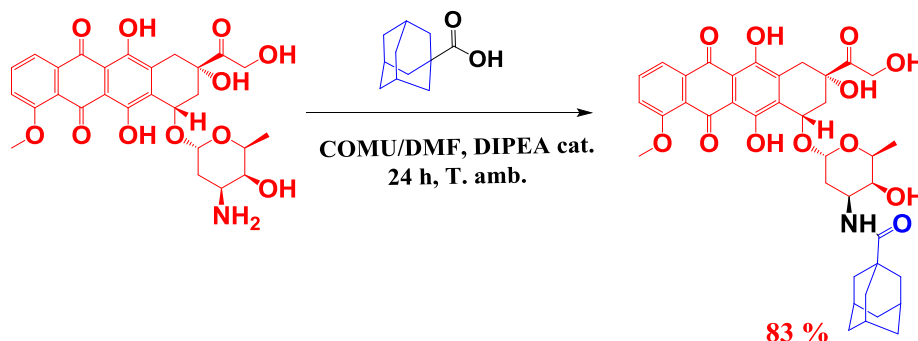
6.2 SÍNTESIS DEL PROFÁRMACO DOXORRUBICINA-ADAMANTANO CON UN ENLACE HIDRAZONA (Ad-h-Dox).



Esquema 3. Ruta sintética para la obtención del profármaco Ad-h-Dox.

Una vez obtenida la hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico, la preparación del profármaco **Ad-h-Dox** se realizó según el protocolo reportado en la literatura⁶³ sin modificaciones. La caracterización se realizó mediante RMN ¹H, ¹³C y punto de fusión.

6.3 SÍNTESIS DEL PROFÁRMACO DOXORRUBICINA-ADAMANTANO CON UN ENLACE AMIDA (Ad-a-Dox).



Esquema 4. Ruta sintética para la obtención del profármaco Ad-h-Dox.

La formación de amidas para la conjugación de dos moléculas es fundamentalmente importante en síntesis orgánica así como en el campo de administración de fármacos.^{64,65} El método convencional se basa en hacer reaccionar el ácido carboxílico con algún agente halogenante para obtener el cloruro del ácido correspondiente. Ésto implica un paso más de reacción.⁶⁴ Una vez obtenido el cloruro del ácido, se lleva a cabo la reacción con la amina y para recuperar el producto es necesario purificarlo por cromatografía en columna. Hoy en día

es importante desarrollar métodos sintéticos accesibles, reproducibles y cuantitativos, por lo cual utilizamos un método eficaz para lograr el acoplamiento C-N, y así obtener el profármaco **Ad-a-Dox**. Utilizamos el acoplante COMU, **Figura 14**,⁶⁵ el cual es uno de los agentes de acoplamiento C-N de la familia de las sales de uronio basado en el acetato de etil-2-ciano-2-(hidroxiimino) (Oxima) unido a un anillo de morfolina.

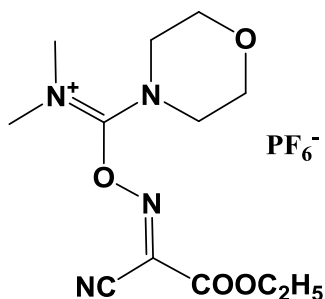
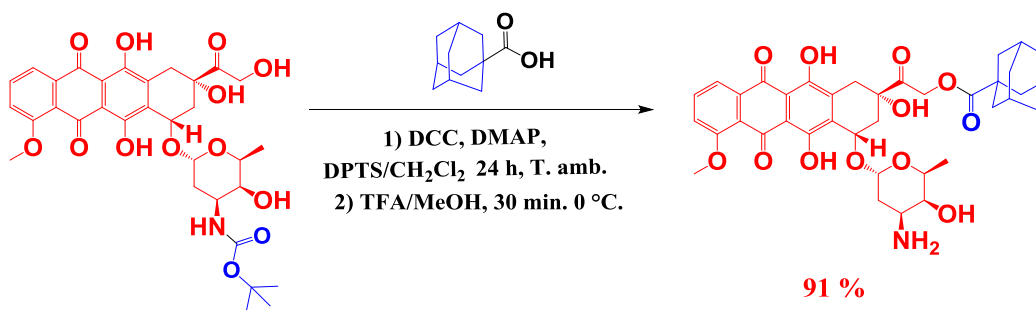


Figura 13. Estructura química del agente acoplante COMU

Al emplear este agente de acoplamiento la síntesis se realizó en un solo paso, se obtuvo un 82.6 % de rendimiento. Dado que esta reacción genera solo subproductos solubles en agua, el número de pasos de purificación se redujo sin la necesidad de un proceso de purificación cromatográfico.

6.4 SÍNTESIS DEL PROFÁRMACO DOXORRUBICINA-ADAMANTANO CON UN ENLACE ÉSTER (Ad-e-Dox).



Esquema 5. Ruta sintética para la obtención del profármaco Ad-e-Dox.

Para sintetizar el profármaco **Ad-e-Dox**, implementamos un método novedoso para la modificación del grupo hidroxilo primario de la Dox. El primer paso consistió en una protección clásica del grupo amino con diterbutil dicarbonato (Boc_2O) en medio básico, obteniendo un rendimiento del 95%. El segundo paso fue la esterificación del alcohol primario, nuevamente utilizando la reacción de Steglich con DPTS, esto con base en la

literatura,⁶⁶ ya que el empleo de cantidades catalíticas de DPTS incrementa el rendimiento de esta reacción.

Una vez obtenido el éster, el paso final para la obtención del profármaco consistió en la desprotección del grupo amino, dado que el alcohol terciario en C9 se puede eliminar mediante un mecanismo unimolecular (E_1), se probaron al menos 3 sistemas para lograr la desprotección sin generar el producto de eliminación; 1) mezcla HCl/MeOH a temperatura ambiente; 2) TFA/CH₂Cl₂ a 0°C y 3) ácido fórmico a temperatura ambiente, todos estos sistemas fueron muy eficientes para la desprotección cuantitativa del Boc, evitando la eliminación del alcohol terciario y la escisión del enlace éster en **Ad-e-Dox**.

Uno de los aspectos importantes para purificar el profármaco **Ad-e-Dox** fue la correcta selección del gel de sílice. Durante el trabajo de purificación notamos que el éxito en la obtención del producto puro dependía en gran medida del tamaño de partícula de la sílice. Al usar sílice común (silica gel 60-200 μm), el profármaco **Ad-e-Dox** y la Dox libre residual permanecen atrapados en la matriz y no se pueden extraer, inclusive con disolventes polares como MeOH. Como parte de la optimización de la purificación, encontramos que un tamaño de poro de 60 Å y un tamaño de partícula de 5-17 μm son óptimos para la purificación de este tipo de sistemas, logrando un 91% de rendimiento para el profármaco **Ad-e-Dox**.

6.4.1 Análisis espectroscópico de los profármacos Ad-Dox

La elucidación estructural de los 3 profármacos Ad-Dox se realizó mediante el análisis de sus espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H y ¹³C), de Infrarrojo (IR) y Espectrometría de Masas (EM).

6.4.2 Asignación de los espectros de RMN ¹H y ¹³C para los profármacos Ad-Dox

Durante la interpretación de las señales notamos que la asignación de los espectros de RMN ¹H de los profármacos previamente descritos Ad-Dox y de la Dox libre solo se habían asignado parcialmente.^{67,68} Particularmente, las señales presentes en la zona alifática y de los grupos OH (alcoholes primarios, secundarios y terciarios). Identificar estas señales es de valiosa importancia, ya que si el fármaco se modifica para generar una nueva entidad, deben rastrearse correctamente la aparición-desaparición de las señales correspondientes a los productos obtenidos, con el fin de obtener resultados reproducibles. Por esto realizamos experimentos bidimensionales de RMN ¹H (COSY y NOESY) y heteronuclear (HMQC, ¹H-¹³C) para correlacionar las señales de los protones con sus carbonos correspondientes.

La asignación a los protones de la estructura de la Dox se muestran a continuación (Figura 14):

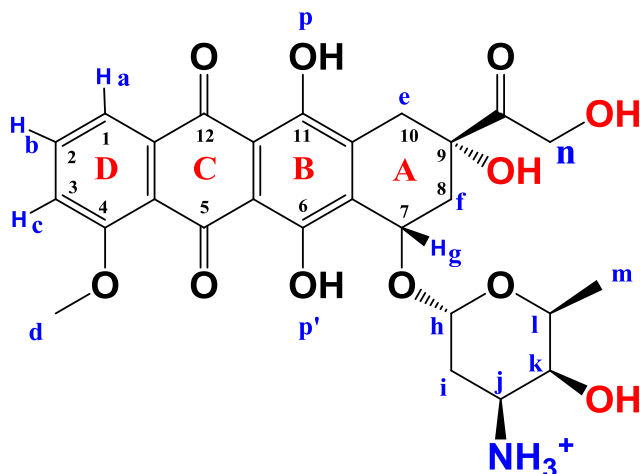
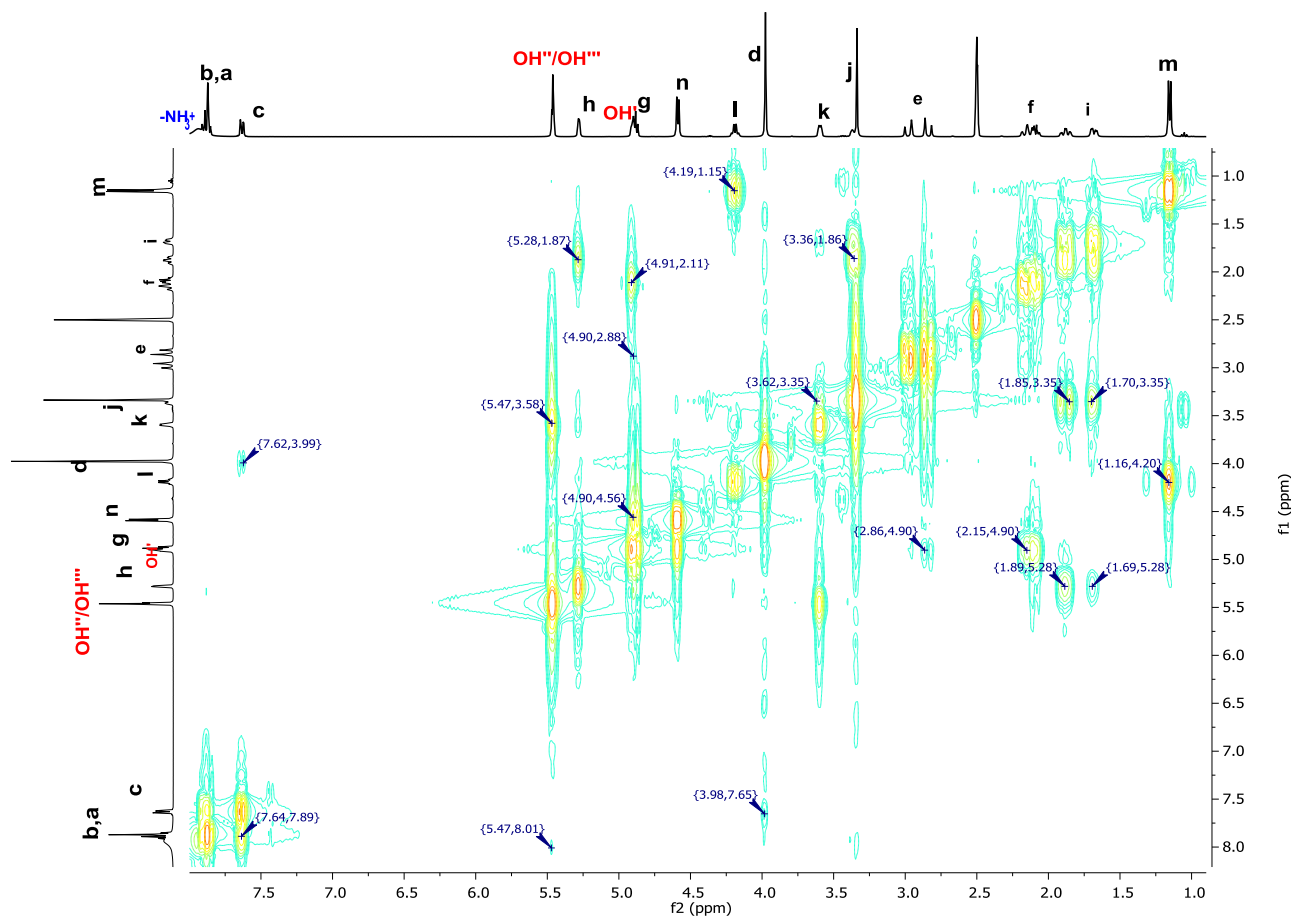


Figura 14. Asignación de las señales de la Dox libre.

Para la correcta asignación de las señales, además de tomar en cuenta el desplazamiento químico y las constantes de acoplamiento, se comparó con datos de reportes previos usando $\text{DMSO-}d_6$ como disolvente.⁶⁹ El orden de aparición de las señales en RMN ^1H de campo bajo a campo alto es: δ (ppm) 13.99, 13.22 **p**, **p'**, que aparecen como dos señales amplias que integran para un protón, seguido de una señal amplia que integra para 2H que se asignó al NH_3^+ del residuo de daunosamina.



Espectro 2. RMN 2D ^1H - ^1H COSY para la Dox en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.

Para el caso de los protones aromáticos del anillo **D** de la antraciclina se pudo establecer el siguiente patrón de señales:

- Las señales entre δ_{H} 7.89-7.85 corresponden a los protones **b** y **a** respectivamente y aparecen como dos señales traslapadas (dos señales doble de doble) que integran para 2 protones. Esto se puede corroborar por las interacciones entre ambos protones en el **Espectro 2**, COSY.
- En el **Espectro 3** HMQC, se observa que el protón **b** correlaciona con una señal de ^{13}C a $\delta = 136.76$ y el protón **a** con un carbono a $\delta = 119.54$.
- Por lo que la señal doble de doble a δ 7.64 sólo puede corresponder al protón **c** ($J = 5.87, 1.96$ Hz) que a su vez correlaciona con un carbono a $\delta = 120.33$.
- En el **Espectro 4**, se observa una interacción del protón **c** ($\delta = 7.64$) con otra señal sigulete a $\delta = 3.98$ que corresponde a los protones de metilo **d** ($\delta_{\text{C}} = 57.08$).

Siguiendo con el análisis de las señales de campo bajo a campo alto, a $\delta = 5.46$ se observa una señal triple que integra para 2 protones y que en el espectro HMQC no

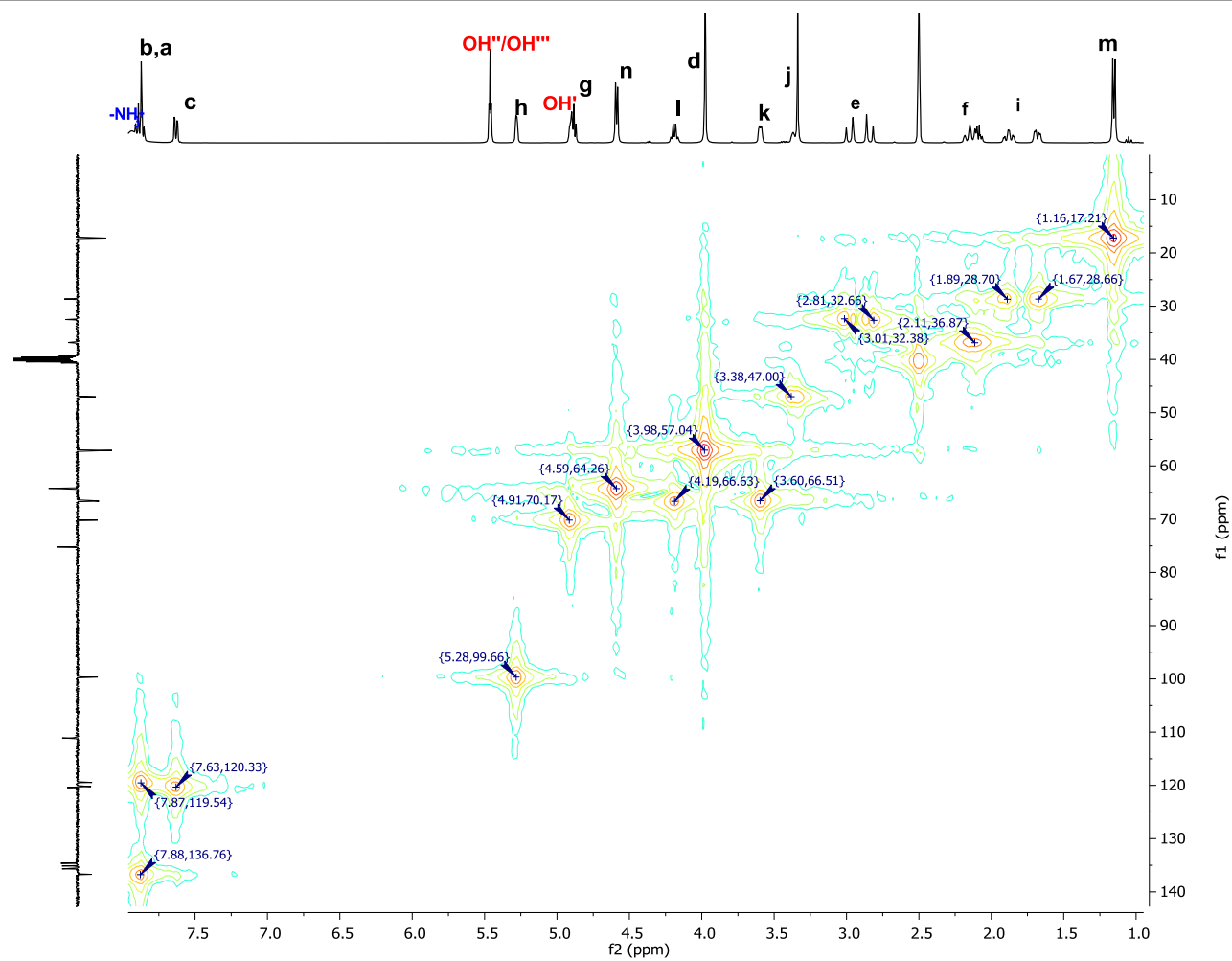
correlaciona con ningún carbono por lo que fueron asignados al **OH'''** del anillo **A** de la antraciclina y al **OH''** de la daunosamina. En el espectro COSY esta señal a $\delta = 5.46$ interactúa con una señal doble a $\delta = 3.6$ que corresponde al protón **k** ($\delta_c = 66.52$).

En el espectro COSY el protón **k** correlaciona con una señal doble con $J = 4.89$ Hz a $\delta = 3.36$ y que integra para 1H que corresponde al protón **j** ($\delta_c = 47$). Adicionalmente, se observa que el protón **k** también interactúa con otra señal cuarteto a $\delta = 4.16$ que integra para 1H con $J = 6.8, 6.36$ Hz que corresponde al protón **l** ($\delta_c = 66.63$). Dada la multiplicidad de **l**, y su interacción con una señal doble a $\delta = 1.15$, que integra para 3H, se asignó a los protones del grupo $-\text{CH}_3$ (**m**) ($\delta_c = 17.21$).

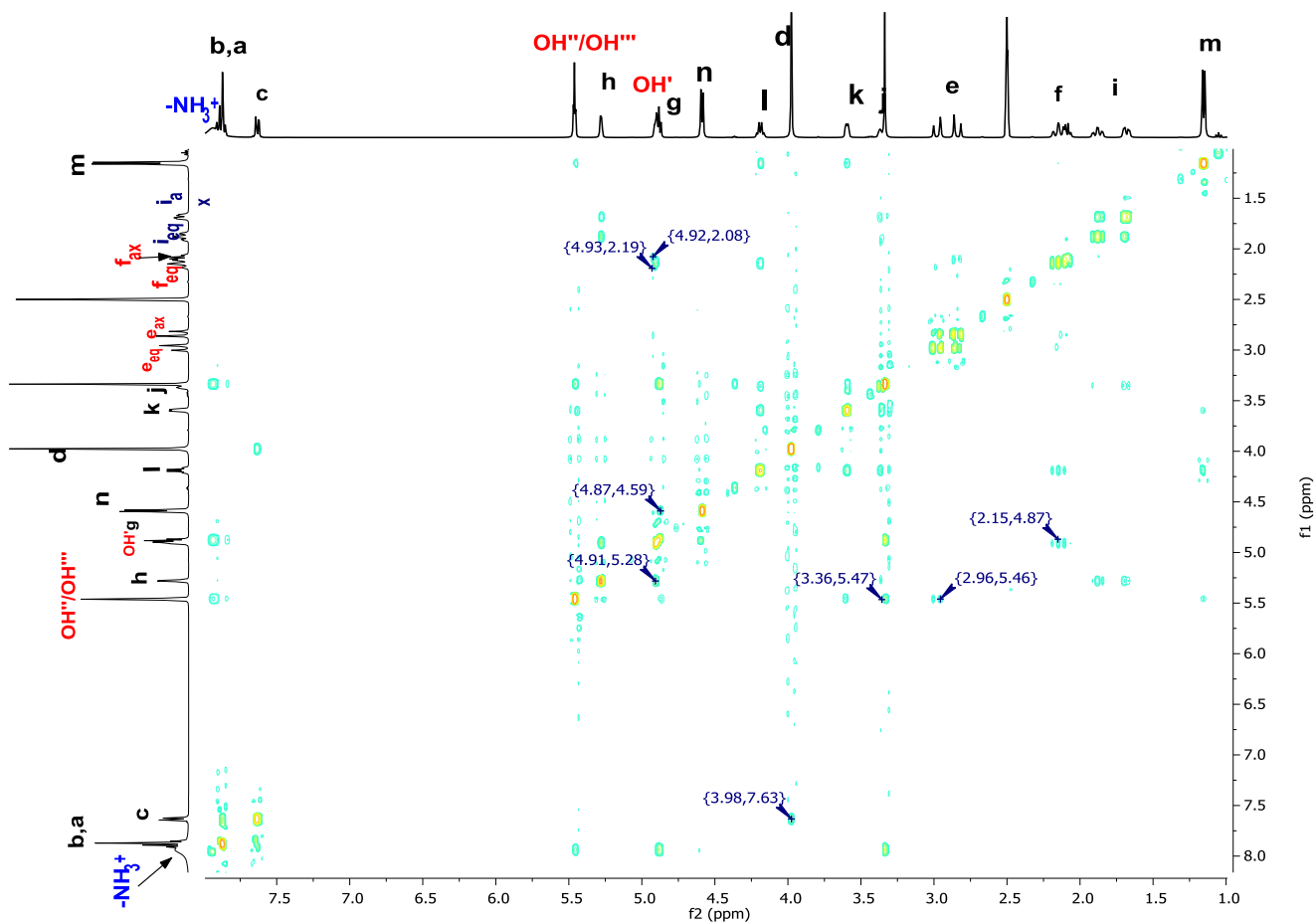
Una vez identificado **j**, en el espectro COSY se observa que interactúa con una señal múltiple centrada a $\delta = 1.77$ que integra para 2H y que corresponde a los protones **i** ($\delta_c = 28.7, 28.66$). Ésta última señal correlaciona con otra señal doble que integra para 1H con $J = 2.93$ Hz a $\delta = 5.28$ que corresponde al protón **h** ($\delta_c = 99.66$). Dada la estereoquímica del compuesto, el protón **h** en el **Espectro 4** (NOESY) interactúa fuertemente con el protón **g** que aparece como una señal múltiple a $\delta = 4.87$ ($\delta_c = 70.17$). Esta señal aparece traslapada con una señal amplia que integra para 1H a $\delta = 4.91$ y que no correlaciona con ninguna señal para carbono por lo que fue asignada al grupo **OH'**.

En el espectro COSY se observa que el protón **g** interactúa con una señal múltiple que integra para 2H a $\delta = 2.11$ y que corresponde a los protones **f** ($\delta_c = 36.87$). Por otra parte, en el espectro NOESY se puede observar que la señal asignada a **OH'** ($\delta = 4.9$) correlaciona con una señal doble con $J = 5.87$ Hz que integra para 2H y que corresponde a los protones **n** ($\delta_c = 64.26$).

Finalmente, dada la conformación del anillo **A**, las señales correspondientes a los protones **e** se identificaron por su interacción NOE con el protón del grupo **OH'''** (5.46-2.90 ppm), además de las interacciones con el protón **g** (4.90-2.90).



Espectro 3. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC para la Dox en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz

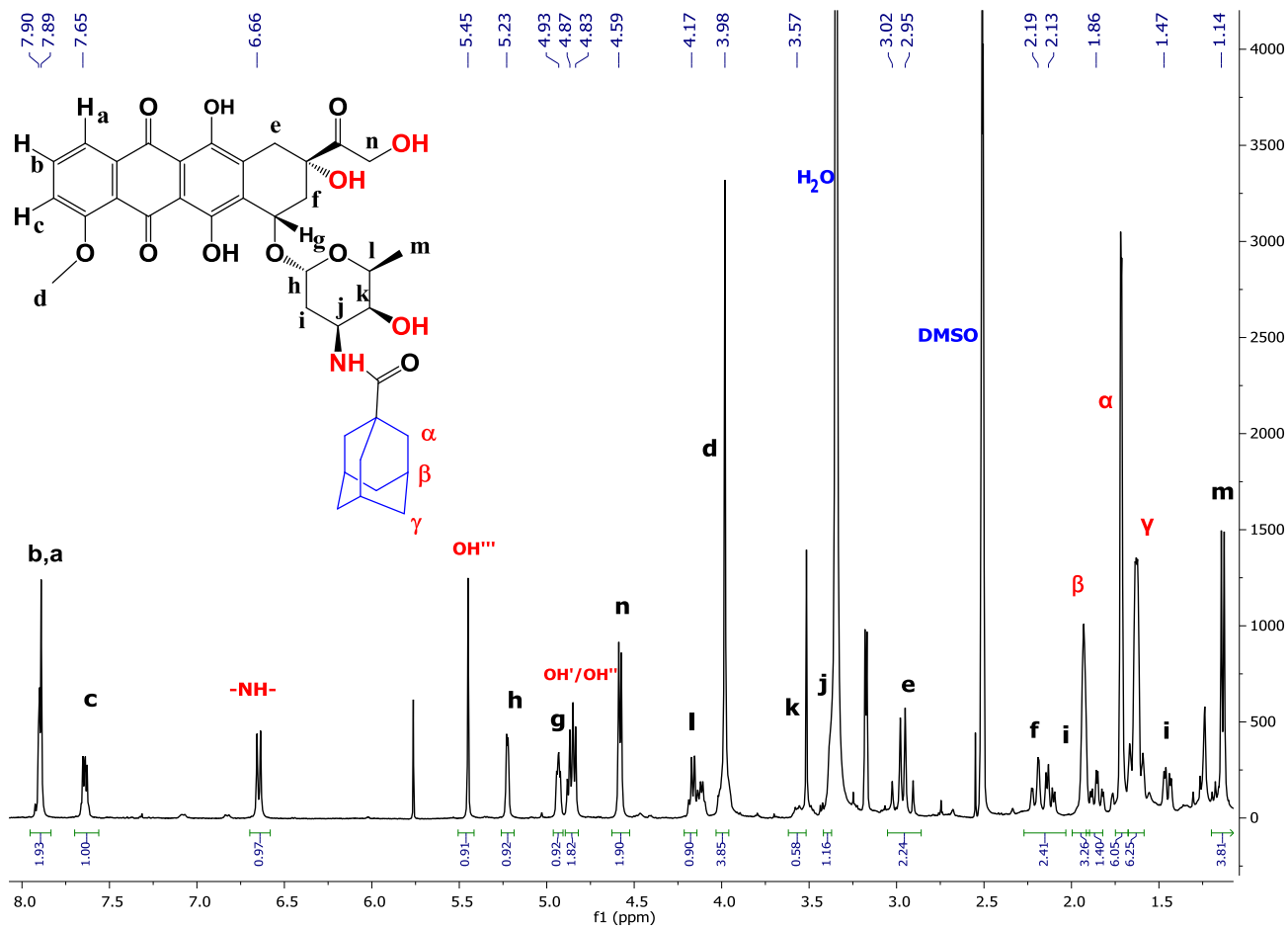


Espectro 4. RMN 2D ^1H - ^1H NOESY para la Dox en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.

La asignación inequívoca para las señales de los profármacos **Ad-Dox (Espectro 7-34, Anexo 1)** se realizó tomando como base el análisis arriba descrito para la Dox libre, a continuación se describe la asignación para todos los profármacos obtenidos:

6.4.3 Análisis espectroscópico por RMN para el profármaco Ad-a-Dox

En la **Figura 19**, se observa el espectro de RMN ^1H del profármaco **Ad-a-Dox**:



Espectro 5. RMN ^1H del profármaco Ad-a-Dox en DMSO- d_6 a 400 MHz.

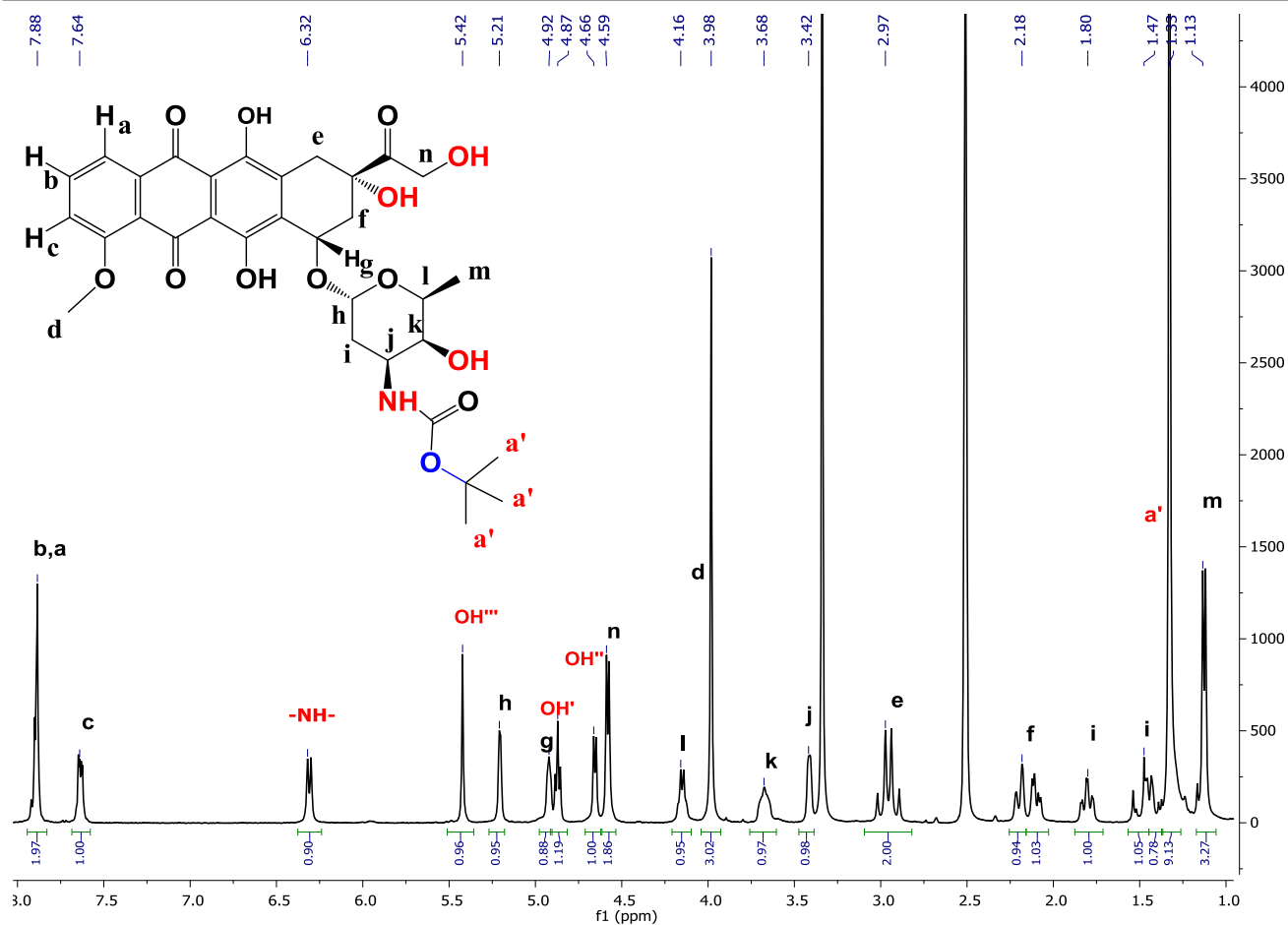
Como puede observarse en el **Espectro 5**, destaca la aparición de una señal doble a $\delta_{\text{H}} = 6.66$ que integra para 1H con $J = 8.1$ Hz y que corresponde al protón unido a heteroátomo de la amida. Además, es posible observar los protones pertenecientes al anillo de adamantano; β ($\delta_{\text{H}} = 1.93$), α ($\delta_{\text{H}} = 1.72$) y γ ($\delta_{\text{H}} = 1.62$). Uno de los cambios importantes que se observan en el espectro de ^1H y que corrobora la unión covalente del Ad con la Dox vía acoplamiento C-N es el δ_{H} del grupo **OH'''** de campo bajo ($\delta_{\text{H}} = 5.46$ en la Dox libre) a campo alto ($\delta_{\text{H}} = 4.84$), lo que corrobora que las propiedades electrónicas de los protones circundantes se ven afectados por la presencia del anillo de Ad.

6.4.4 Análisis espectroscópico por RMN para el profármaco Ad-h-Dox

En contraste, para el profármaco **Ad-h-Dox**, la señal N-H de la hidrazona aparece a $\delta_{\text{H}} = 6.38$ (**Espectro 7** en Anexo 1). De la misma manera, las señales del alcohol primario y secundario muestran un cambio a campo alto debido al cambio en el entorno electrónico causado por el anillo de Ad.

6.4.5 Análisis espectroscópico por RMN para el profármaco Ad-e-Dox

Respecto al profármaco **Ad-e-Dox** se comenzó por la caracterización del intermediario Dox-Boc (**Espectro 6**), en el espectro de RMN ^1H se observa una señal doble a $\delta_{\text{H}} = 6.32$ que corresponde a un protón unido a heteroátomo N-H de la amida formada con el grupo protector Boc. Además aparecen las señales de los metilos a $\delta_{\text{H}} = 1.33$ mientras que la señal del grupo hidroxilo **OH"** se desplaza hacia campo alto, ya que esta señal aparece como un doblete con $J = 5.61$ Hz a un $\delta_{\text{H}} = 4.66$, mientras que para la Dox libre **OH"** aparece a un $\delta_{\text{H}} = 5.46$, este mismo efecto de protección se observó para el compuesto **Ad-a-Dox**, donde también se modifica este residuo, ya que el volumen del sustituyente influye en la magnitud del cambio en el desplazamiento químico para **OH"**.



Espectro 6. RMN 1H del intermediario Dox-Boc en DMSO- d_6 a 400 MHz.

Finalmente cuando se obtiene el profármaco **Ad-e-Dox**, en los espectros de RMN (**Espectros 28-34** en Anexo 1) se observa la desaparición de la señal correspondiente al **OH'** y la aparición de las señales del anillo de adamantano; β ($\delta_H = 2.01$), α ($\delta_H = 1.91$) y γ ($\delta_H = 1.71$). Además se observa un fenómeno de desprotección, ya que el **OH'''** se desplaza a campo bajo ($\delta_H = 6.12$) debido a la esterificación con el Ad, ya que esta modificación cambia totalmente el entorno electrónico del **OH'''**, lo que confirma que la esterificación tiene lugar exclusivamente en el **OH'** primario. Durante la correcta asignación para el profármaco **Ad-e-Dox**, y para asegurarnos que no se obtenía el producto de eliminación del **OH'''** para dar el alqueno correspondiente (producto E_1), realizamos el correspondiente experimento HMQC (**Espectro 31** en Anexo 1). En este experimento, encontramos que la señal a $\delta_H = 6.12$ no correlaciona con ningún carbono, lo que confirma la correcta asignación a **OH'''** y que este desplazamiento es producto de una desprotección. Además, se confirma la efectiva eliminación del grupo protector y por consiguiente la generación del producto esperado.

También se observa que las señales de los protones **h** y **g** se desplazan a campo bajo, tal vez debido a un cambio conformacional causado por la presencia de Ad.

6.4.6 Asignación de los espectros de IR para los profármacos Ad-Dox

El análisis de los espectros de IR permitió la identificación de bandas características de los grupos funcionales, que fueron útiles para confirmar la formación de los enlaces proyectados en la construcción de los profármacos Ad-Dox. En la **Tabla 3** se resumen las bandas características de la Dox sin modificar:

Tabla 3. Espectroscopía IR para la Dox

Banda de absorción IR, cm^{-1}	Asignación
3560-3160	Estiramiento O-H
3160-2300	Estiramiento NH_3^+
1724	Cetona (C=O)
1613 y 1580	Estiramiento (C=O) (puente de hidrógeno intramolecular de la quinona)
1282	Estiramiento de eter C-O-C
1115	Vibración C-O de alcohol terciario
1071	Vibración C-O de alcohol secundario
1008	Vibración C-O de alcohol primario

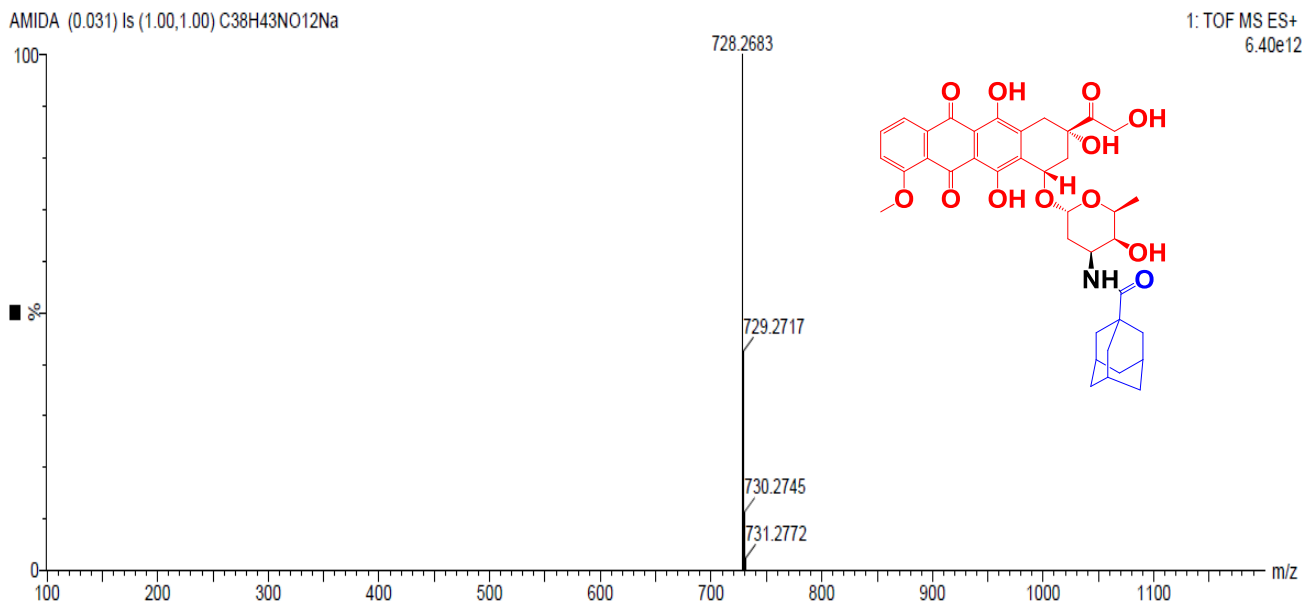
El espectro FTIR de **Ad-h-Dox** muestra la banda característica de estiramiento de O-H a 3435 cm^{-1} , además se observa la desaparición de la banda de estiramiento de la cetona a 1729 cm^{-1} por formación de la hidrazona, cuya banda de estiramiento de enlace N-H aparece a 3241 cm^{-1} .⁶⁹ También podemos observar las típicas bandas de estiramiento de C=O con puentes de hidrógeno intramoleculares de la quinona en la región de $1614\text{-}1579 \text{ cm}^{-1}$, C-O-C a 1281 cm^{-1} , C-O de alcohol terciario a 1110 cm^{-1} , C-O de alcohol secundario a 1069 cm^{-1} , C-O de alcohol primario a 1008 cm^{-1} y enlaces C=C de anillos aromáticos a 1407 cm^{-1} . Todas estas señales demuestran la obtención del enlace hidrazona para el profármaco **Ad-h-Dox**.

Respecto al profármaco **Ad-a-dox**, además de las bandas comunes descritas anteriormente, destaca la aparición de una banda de estiramiento a 3431 cm^{-1} que corresponde a un enlace N-H. Finalmente, para el derivado **Ad-e-Dox**, se observa que la banda de estiramiento C=O de la cetona aparece a mayor frecuencia (1727 cm^{-1}) debido al efecto inductivo que ejerce el grupo funcional éster.⁷¹

6.4.7 Espectrometría de masas de los profármacos Ad-Dox:

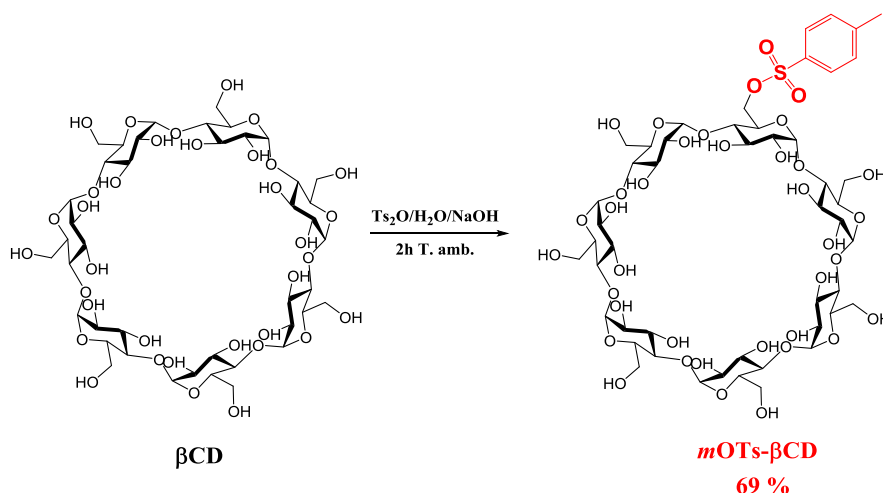
Todos los espectros fueron obtenidos por ionización por electroespray (ESI, por sus siglas en inglés) ya que por impacto electrónico y por bombardeo de átomos rápidos no se logró la ionización de las moléculas. En todos los casos por la técnica de ESI, se identificó el ión molecular M^+ ó $[M+Na^+]$ que para todos los casos estuvo en concordancia con el peso molecular de la estructura propuesta (**Espectros 13, 20, 27 y 34** en Anexo 1).

En la **Espectro 7** se observa el espectro ESI del profármaco **Ad-a-Dox** ($C_{38}H_{43}NO_{12}$, PM esperado 705.7 uma) en donde se observa el ión molecular más un átomo de sodio $[M + Na^+]$, 728.2 m/z y que corresponde a la fórmula molecular $C_{38}H_{43}NO_{12}Na$.



Espectro 7. ESI del profármaco Ad-a-Dox

6.5 SÍNTESIS DE MONO-TOSIL- β CD (*m*OTs- β CD)



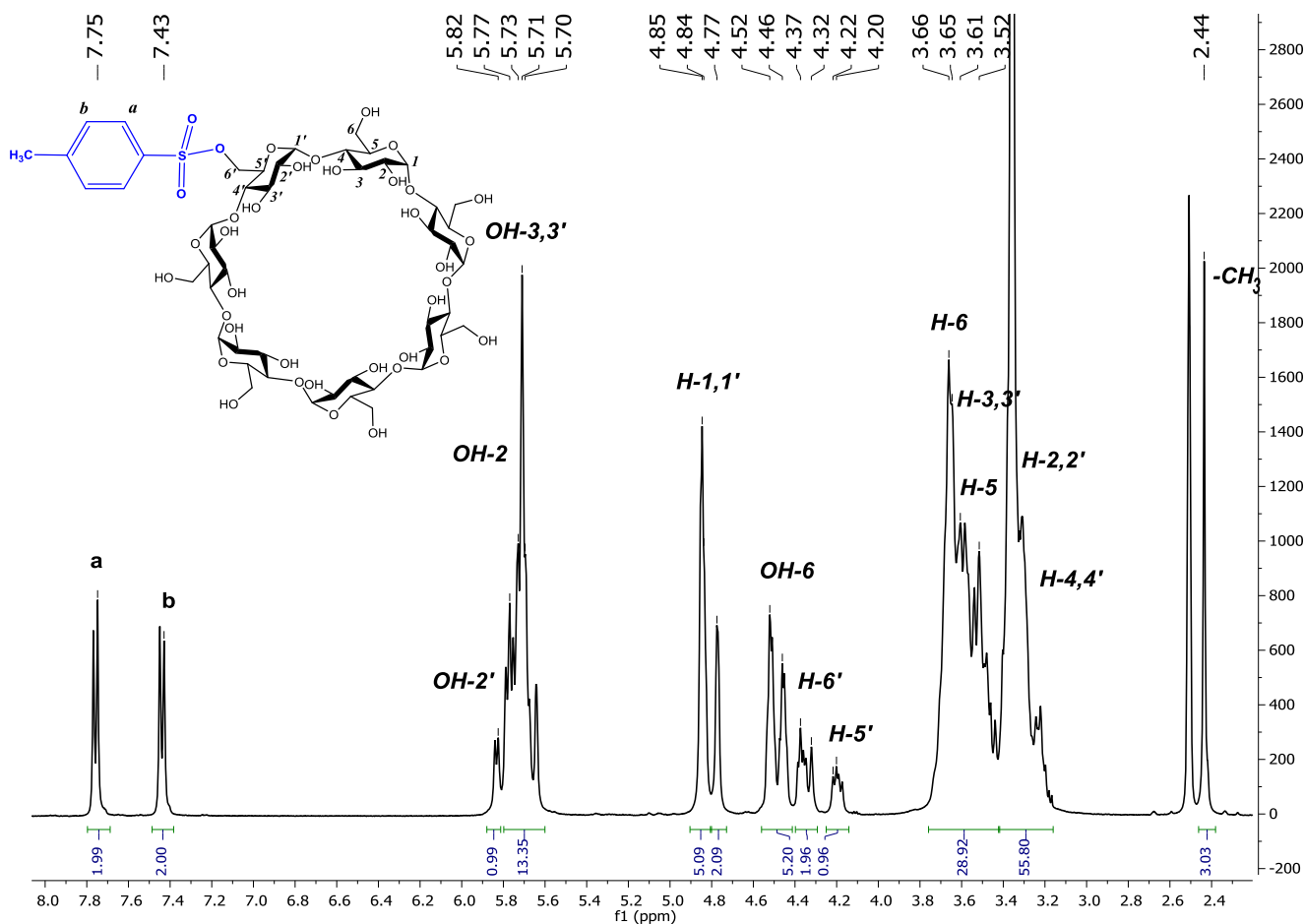
Esquema 6. Ruta sintética para la obtención de *m*OTs- β CD

Uno de los pasos clave para la construcción de las nuevas plataformas con β CD consiste en funcionalizar solo un grupo hidroxilo de la cara primaria de la β CD. Para lograr este objetivo partimos del intermediario por excelencia, el *m*OTs- β CD, el cual es sumamente versátil ya que a través de este intermediario se pueden introducir otras funcionalidades. Este compuesto se obtiene a través de la metodología propuesta por Zhong *et al.*⁷² que consiste en hacer reaccionar la β CD con el anhídrido del *p*-toluensulfonilo en medio acuoso seguida de la adición de base a un tiempo controlado, utilizando este procedimiento se consigue tosilar un solo grupo OH de la cara primaria de la β CD con un rendimiento de 69 %, sin la obtención de mezclas de polisustitución y con un trabajo de purificación sencillo.

6.5.1 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de la mono-tosil- β CD (*m*OTs- β CD)

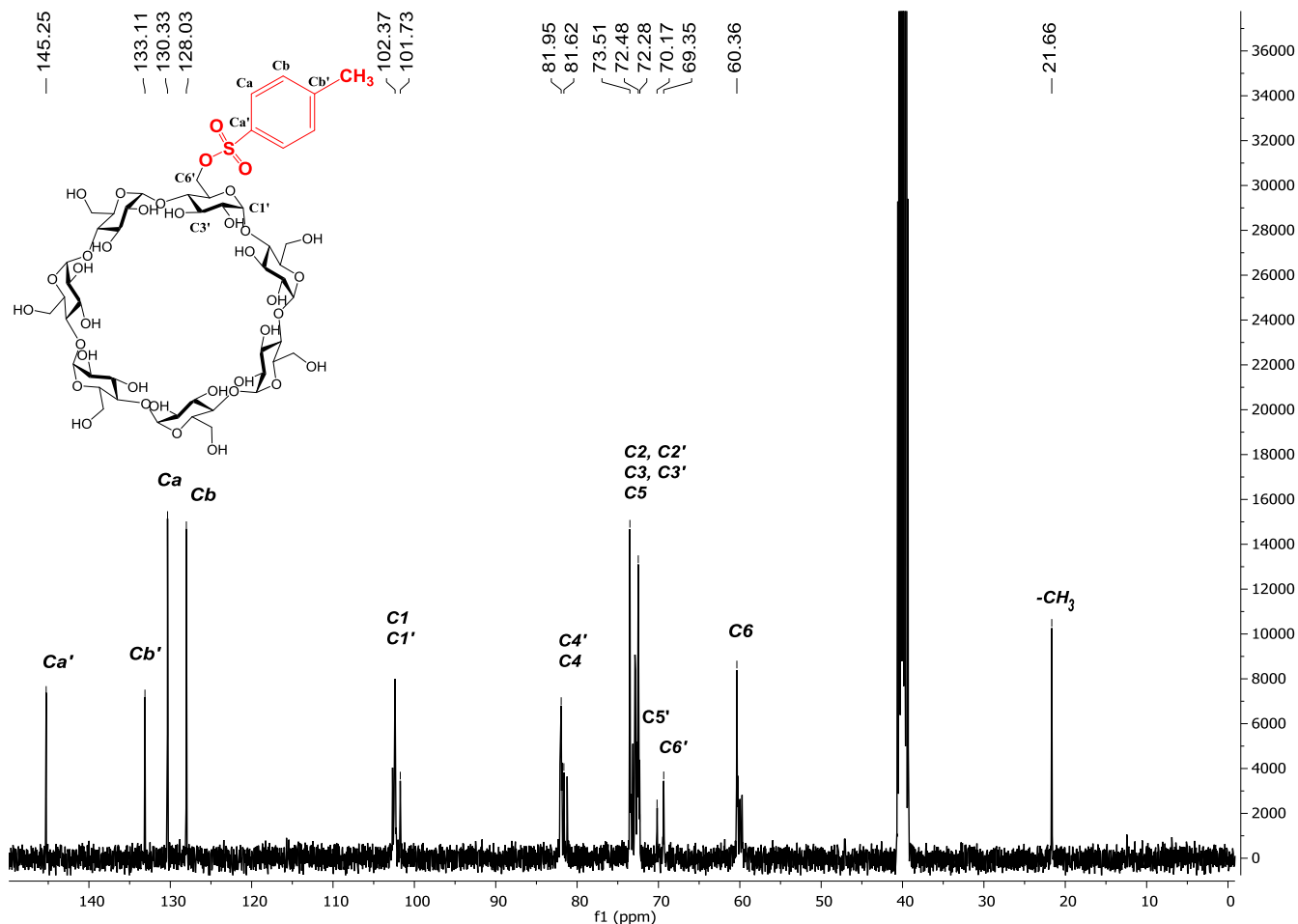
Una vez obtenido el *m*OTs- β CD se caracterizó por RMN ^1H en DMSO- d_6 . En el **Espectro 8** se observan a campo bajo dos señales dobles a $\delta_{\text{H}} = 7.77, 7.45$ con $J = 8.2$ Hz que corresponden a los protones **a** y **b** del anillo aromático con sustitución *para* del grupo tosilo, a 5.83 ppm aparecen las señales de los protones de los grupos OH de la cara secundaria de la β CD. Dada la modificación de un sólo anillo de glucopiranososa, es posible identificar el protón del hidroxilo 2 (OH2') como una señal doble a $\delta_{\text{H}} = 5.83$, después se observan un conjunto de señales que integran para 13H que corresponden a los hidroxilos 2 y 3 (OH2 y OH3) de la β CD. A continuación $\delta_{\text{H}} = 4.84$ aparece una señal múltiple que integra para 6H y que corresponde a los protones del carbono anomérico (H1) de las moléculas de

glucopiranososa sin modificar, así a $\delta_H = 4.77$ aparece la señal del protón H1' de la glucopiranososa modificada. Inmediatamente después, a $\delta_H = 4.52-4.43$ aparecen señales múltiples que integran para 6H y que corresponden a los protones de los hidroxilos unidos al carbono 6 (OH6). Después entre $\delta_H = 4.37-4.32$ aparece una señal múltiple que integra para 2H y que corresponde a los protones en C6 (H6') del anillo modificado, seguida de otra señal centrada a $\delta_H = 4.20$ del protón H5' en C5 también de la glucopiranososa modificada. Este cambio en el desplazamiento químico puede explicarse por el efecto desprotector del grupo tosilo. Finalmente, entre $\delta_H = 3.66-3.22$ se observa un conjunto de señales que se asignó a los protones de los carbonos 6 (H6), C5 (H5) de las moléculas de glucopiranososa de la β CD que no fueron modificadas. También se encuentran los protones de los carbonos 3, 2 y 4 (H3), (H2) y (H4) de la β CD, los cuales no sufren cambios en el desplazamiento químico, comparados con la β CD nativa. Finalmente, a $\delta_H = 2.43$ se encuentra una señal singulete que integra para 3H y que corresponde a los protones del metilo del grupo tosilo.



Espectro 8. RMN ^1H del intermediario *m*OTs- β CD en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

Para continuar con la caracterización del *m*OTs- β CD, se adquirió también el espectro de ^{13}C (**Espectro 9**), y como puede observarse a $\delta_{\text{C}} = 145.25$ y 133.11 aparecen los carbonos cuaternarios del anillo aromático del grupo *p*-toluensulfonylo, seguidos por los carbonos *orto* y *meta* al sulfonilo $\delta_{\text{C}} = 130.33$ y 128.03 respectivamente. Después a $\delta_{\text{C}} = 102.37$ y 101.73 aparecen los carbonos C1 y C1' del anillo modificado, entre $\delta_{\text{C}} = 81.95$ - 81.62 se encuentran los carbonos C4 y C4'. A $\delta_{\text{C}} = 73.51$ - 72.29 se observa un conjunto de señales que corresponden a los carbonos C2, C2', C3, C3' y C5, C5', seguidos de una señal a $\delta_{\text{C}} = 69.35$ que corresponde a C6' modificado. Finalmente, a $\delta_{\text{C}} = 60.36$ y 21.66 aparecen las señales de C6 y del grupo metilo del sustituyente *p*-toluen sulfonilo respectivamente.

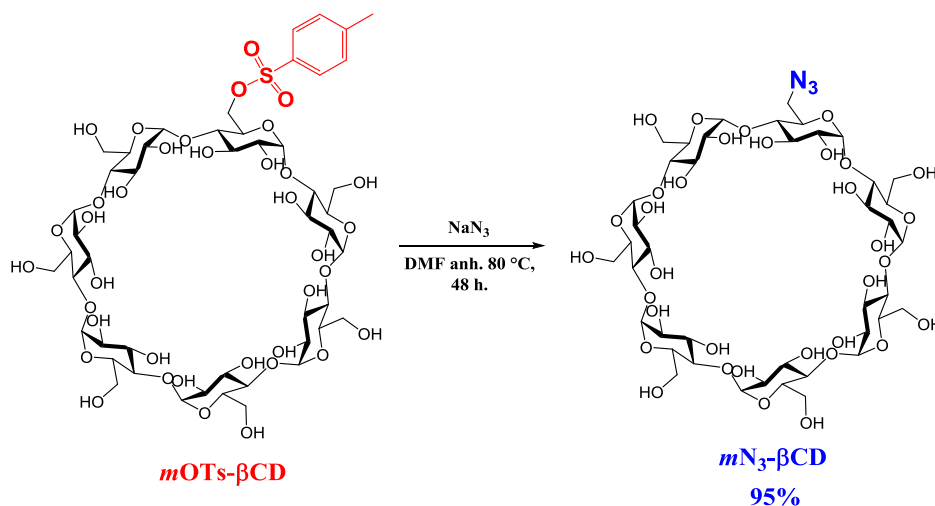


Espectro 9. RMN ^{13}C del intermediario *m*OTs- β CD en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

En el espectro de IR (**Espectro 37** del Anexo 1) se observan las bandas características del compuesto *m*OTs- β CD; en 3281 cm^{-1} la vibración O-H, a 2925 cm^{-1} el

estiramiento C-H y las bandas propias del sustituyente, a 1361 cm^{-1} el estiramiento S=O, 1155 cm^{-1} S-O. Finalmente, el intermediario *m*OTs- β CD se caracterizó por espectrometría de desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF), ya que es una técnica que permite detectar con precisión masas moleculares mayores a 1000 Da. Para este tipo de moléculas se utilizó ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB, por sus siglas en inglés) como matriz. En el **Espectro 38** del Anexo 1, se observa una señal a 1311.73 m/z que corresponde al ión molecular más un átomo de sodio $[M+\text{Na}]^+$, y confirma la masa del compuesto.

6.6 SÍNTESIS DE MONO-AZIDO- β CD (*mN*₃- β CD)



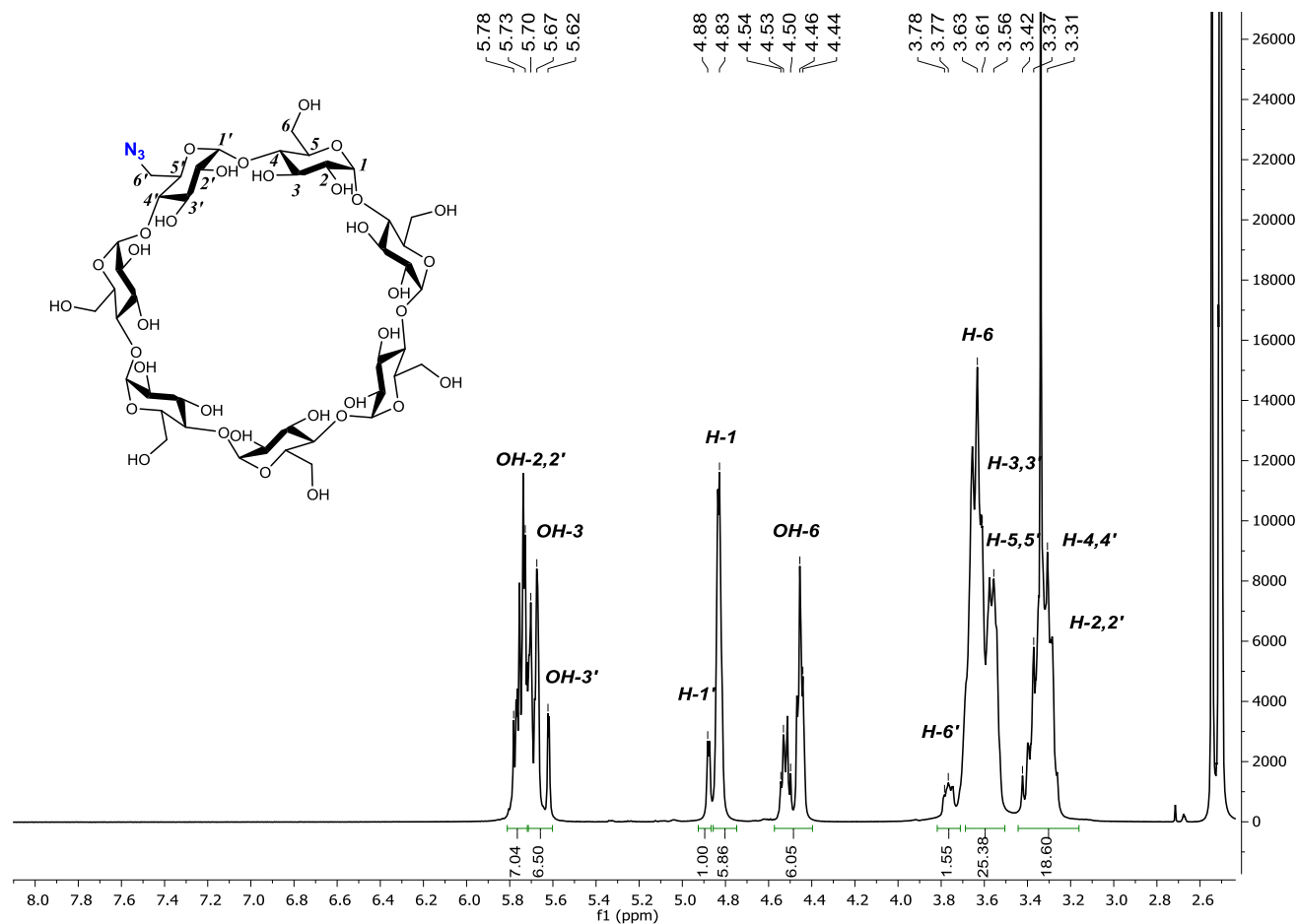
Esquema 7. Ruta sintética para la obtención de *mN*₃- β CD

Una vez obtenido el intermediario *m*OTs- β CD, el grupo tosilo se sustituyó por un grupo azida, mediante una reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ en DMF anhidra a $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48h, catalizada por KI. Utilizando esta metodología previamente descrita por Liu et al.⁷³ se obtuvo un rendimiento de 95 %, y el trabajo de purificación consistió en una recristalización en acetona.

6.6.1 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de la mono-azido- β CD (*mN*₃- β CD)

Una vez obtenida la *mN*₃- β CD se caracterizó por RMN ¹H en DMSO-*d*₆ (**Espectro 10**). Destaca la desaparición de las señales del anillo aromático del grupo *p*-toluensulfonylo y en concordancia con el intermediario anterior. Entre $\delta_{\text{H}} = 5.78\text{-}5.62$ aparece un conjunto de señales múltiple que integra para 14H y que corresponde a los protones de los hidroxilos OH₂, OH₃ y OH_{3'}, los cuales no sufren cambio en su desplazamiento químico en comparación con la β CD nativa. A continuación, a $\delta_{\text{H}} = 4.88$ aparecen otra señal múltiple que

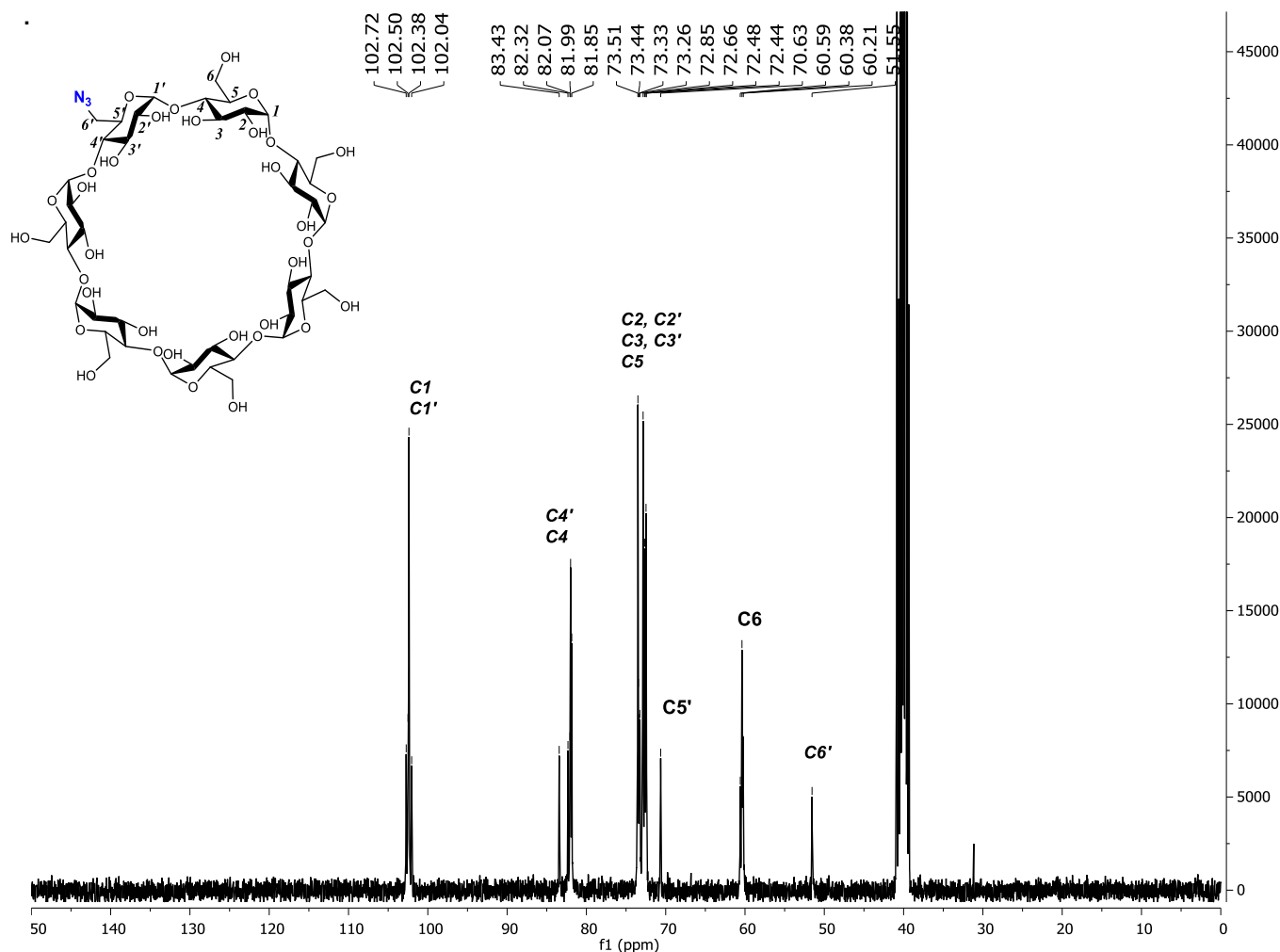
integra para 1H y que se asignó al protón H1' del anillo de glucopiranososa modificado. Así, este protón sufre un efecto desprotector causado por la adición del grupo azido. Inmediatamente, a $\delta_H = 4.83$ se encuentra una señal múltiple que integra para 6H correspondiente a los protones H1 de las moléculas restantes de glucopiranososa. Después, se observa una señal múltiple que integra para 6H entre $\delta_H = 4.53-4.46$ de los protones de los hidroxilos unidos a C6 (OH6) de la β CD y que corrobora la mono modificación. A $\delta_H = 3.77$ se observa una señal que integra para 2H y que corresponde a H6' de la molécula de glucopiranososa que fue modificada y que sufre un efecto protector por parte del grupo azido. Finalmente, entre $\delta_H = 3.66-3.26$ aparecen las señales correspondientes a los protones H6 de las moléculas de glucopiranososa sin modificar; H3, H5, H4 y H2 de la β CD.



Espectro 10. RMN ^1H del intermediario $m\text{N}_3$ - β CD en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

Para continuar con la correcta caracterización, se analizó el espectro de RMN de ^{13}C del intermediario $m\text{N}_3$ - β CD y como puede observarse en el **Espectro 11**, las señales de los

carbonos del anillo aromático del intermediario anterior desaparecen y sólo se observan los carbonos de la β CD modificada, de acuerdo al orden descrito en la sección 6.6.1.



Espectro 11. RMN ^{13}C del intermediario $m\text{N}_3\text{-}\beta\text{CD}$ en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

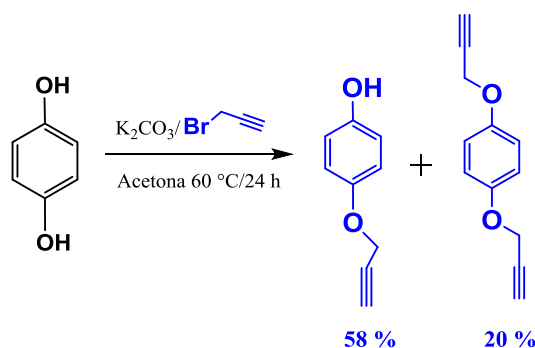
En el espectro de IR (**Espectro 41** del Anexo 1) se presentan las bandas características del compuesto $m\text{N}_3\text{-}\beta\text{CD}$; 3294 cm^{-1} la vibración O-H, a 2922 cm^{-1} el estiramiento C-H y a 2104 cm^{-1} la banda característica del grupo azida.

Así mismo el intermediario $m\text{N}_3\text{-}\beta\text{CD}$ se caracterizó por espectrometría MALDI-TOF. En el **Espectro 42** del Anexo 1 se observa una señal a 1182.36 m/z , la cual corresponde al ión molecular más un átomo de sodio $[\text{M}+\text{Na}]^+$, que confirma la masa del compuesto esperado.

6.7 SÍNTESIS DE LOS INTERMEDIARIOS CON GRUPOS ALQUINO.

Como fuente de alquino para la obtención de los compuestos programados seleccionamos al bromuro de propargilo el cual unimos covalentemente con los residuos aromáticos correspondientes mediante una eterificación de Williamson. Se partió de la reacción ácido base entre el fenol correspondiente y carbonato de potasio en un disolvente polar no prótico para obtener el fenóxido correspondiente, el cual por un ataque nucleofílico SN_2 sustituye al átomo de bromo del propargilo para obtener el éter correspondiente.

6.7.1 Síntesis del 4-(propargiloxi)fenol (I) y 1,4-bis(propargiloxi)benceno (II)



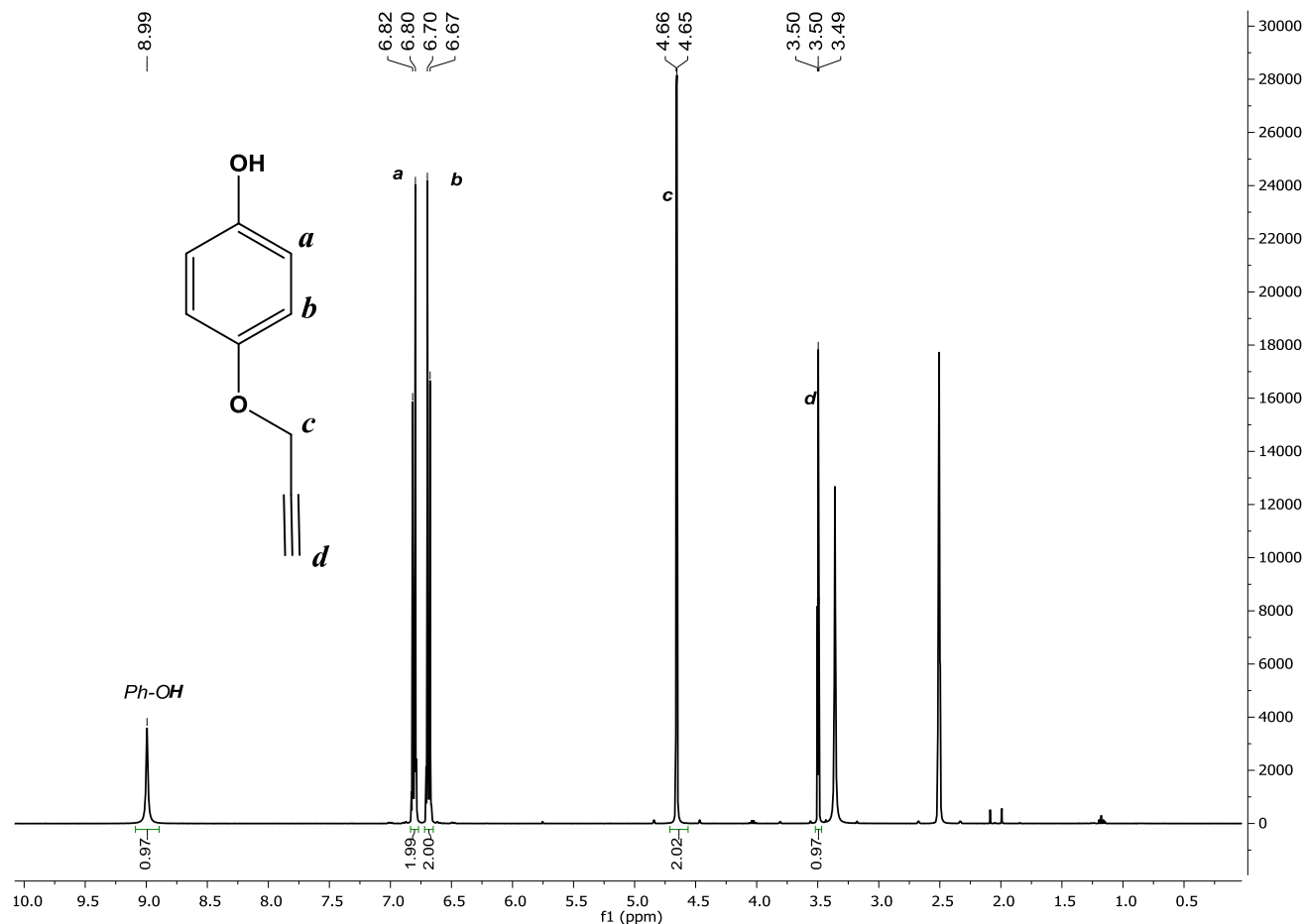
Esquema 8. Ruta sintética para la obtención de 4-(propargiloxi)fenol (I) y 1,4-bis(propargiloxi)benceno (II)

Estos intermediarios se sintetizaron siguiendo el procedimiento descrito por Folgado *et al.*⁷⁴ Dado que la hidroquinona presenta dos sitios reactivos, durante el transcurso de la reacción se genera la mezcla de la mono y la disustitución. Así encontramos que las mejores condiciones de separación de ambos productos por cromatografía en columna consiste en usar una mezcla Hex/AcOEt en una proporción 85:15 sobre gel de sílice, con lo que se obtienen ambos intermediarios.

6.7.2 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de los intermediarios 4-(propargiloxi)fenol (I) y 1,4-bis(propargiloxi)benceno (II)

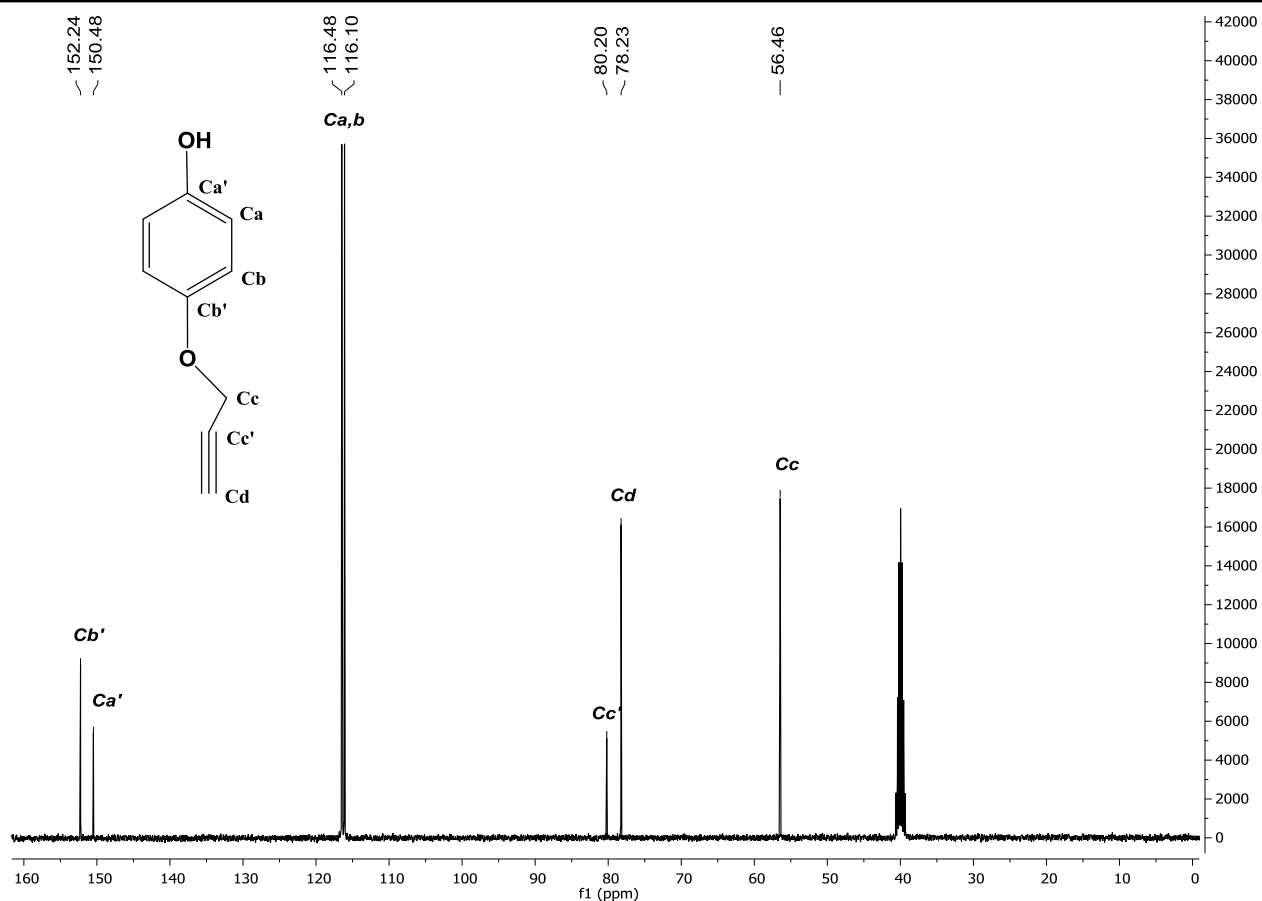
En el **Espectro 12** de RMN 1H en $DMSO-d_6$ para el intermediario (I) se observa a campo bajo $\delta_H = 8.99$ la señal amplia de un protón unido a heteroátomo que corresponde al fenol, después a $\delta_H = 6.82$ y 6.70 aparecen dos señales dobles con $J = 9$ Hz que integran para 2H y que corresponden a los protones **a** y **b** respectivamente. Consecutivamente, a $\delta_H = 4.66$ se observa un señal doble con $J = 2.4$ Hz que integra para 2H y que corresponde al

metileno **c**, finalmente a $\delta_{\text{H}} = 3.50$ se observa un triplete que integra para 1H con $J = 2.4$ Hz y que pertenece al protón **d** del alquino terminal.



Espectro 12. RMN ^1H del intermediario (**I**) en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

Así mismo el análisis del **Espectro 13** de ^{13}C muestra a $\delta_{\text{C}} = 152.24$ y 150.48 las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios, primero el que sostiene al éter seguido del que sostiene al OH. Después a $\delta_{\text{C}} = 116.48$ los carbonos **a** del anillo aromático y a $\delta_{\text{C}} = 116.10$ los carbono **b**. El carbono cuaternario del alquino aparece a $\delta_{\text{C}} = 80.20$ e inmediatamente después a $\delta_{\text{C}} = 78.23$ aparece el carbono **d** del alquino terminal. Finalmente, a $\delta_{\text{C}} = 56.46$ se presenta el carbono **c** de los metilenos.



Espectro 13. RMN ^{13}C del intermediario (I) en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

En el espectro IR de la **Espectro 45** del Anexo 1 se observan las bandas características del compuesto (I); 3361 cm^{-1} la vibración O-H a 3285 cm^{-1} el estiramiento $\text{C}\equiv\text{C}$ y a 2122 cm^{-1} la banda característica del grupo alquino terminal ($\text{C}\equiv\text{C-H}$).

Así mismo el intermediario (I) se caracterizó por espectrometría ESI, en el espectro 46 del Anexo 1 se observa un pico a 148.05 que corresponde a $[\text{M}^+]$ y un pico base a 149.06 que indica la presencia del ión $[\text{M}+\text{H}]^+$; estos resultados confirman la masa del compuesto esperado.

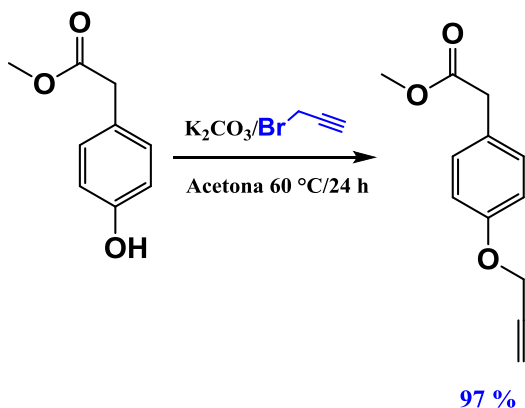
Un análisis similar se realizó para la caracterización del intermediario (II) 1,4-bis(propargiloxi)benzeno. Dada la simetría de la molécula, en el espectro de RMN ^1H de la **Espectro 47** en el Anexo 1 se observa a $\delta_{\text{H}}= 6.9$ una señal singulete que integra para 4H y que corresponde a los protones del anillo aromático. En contraste con (I) a $\delta_{\text{H}}= 4.73$ se observa un señal doble con $J = 2.4\text{ Hz}$ que integra para 4H y que corresponde a los metilenos **c**. Finalmente, a $\delta_{\text{H}}= 3.53$ se observa un triplete que integra para 2H con $J = 2.4\text{ Hz}$ y que pertenece a los protones **d** de ambos alquinos terminales.

En el espectro de RMN ^{13}C de la **Espectro 48** en el Anexo 1 aparece una señal a $\delta_{\text{C}}=152.17$ que corresponde a los carbonos cuaternarios que sostienen a los éteres, después a $\delta_{\text{C}}=116.27$ los carbonos **a** y **b** del anillo aromático. Así el carbono cuaternario del alquino aparece a $\delta_{\text{C}}=79.95$ e inmediatamente después a $\delta_{\text{C}}=78.47$ aparece el carbono **d** del alquino terminal. Finalmente, a $\delta_{\text{C}}=56.32$ se presenta los carbonos de los metilenos **c**.

En el espectro IR de la **Espectro 49** en el Anexo 1 se observa la desaparición de la vibración O-H y resalta el estiramiento $\text{C}\equiv\text{C}$ a 3272 cm^{-1} y a 2130 cm^{-1} la banda característica del grupo alquino terminal ($\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$).

Finalmente, (II) se caracterizó por espectrometría ESI, en el **Espectro 50** del Anexo 1 se observa un pico a 186.06 que corresponde a $[\text{M}^+]$ y un pico a 187.07 que indica la presencia del ión $[\text{M}+\text{H}]^+$, lo que confirma la masa esperada.

6.7.3 Síntesis del acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico (III).



Esquema 9. Ruta sintética para la obtención del acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico (III).

El intermediario (III) se preparó de acuerdo al principio descrito en la sección 6.7 y de acuerdo a la metodología propuesta por Rahmani & Mahani.⁷⁵ El compuesto (III) se obtiene con un rendimiento de 97% y su purificación consistió sólo en extracciones con mezcla agua-disolvente orgánico.

6.7.4 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del intermediario acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico (III).

Para el compuesto (III) el espectro de RMN ^1H en CDCl_3 (**Espectro 51** en el Anexo 1) se observa a campo bajo entre $\delta_{\text{H}}=7.24-7.22$ y $6.97-6.95$ dos señales dobles con $J=8.8\text{ Hz}$

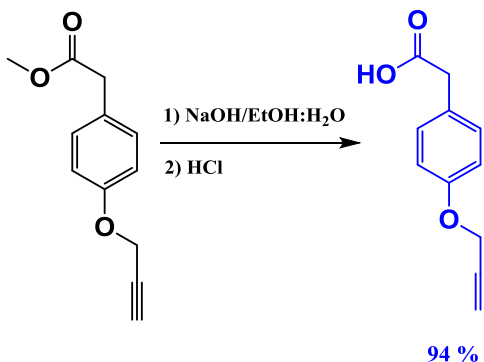
que integran para 2H y que corresponden a los protones **b** y **c** respectivamente. Después a $\delta_{\text{H}} = 4.70$ se observa un señal doble con $J = 2.3$ Hz y que integra para 2H correspondiente al metileno **d**, a $\delta_{\text{H}} = 3.71$ se observa una señal singulete que integra para 3H y que corresponde al metilo del ester. A $\delta_{\text{H}} = 3.59$ aparece otra señal singulete que integra para 2H y que se asignó al metileno **a**. Finalmente, entre $\delta_{\text{H}} = 2.54$ - 2.53 aparece un triplete que integra para 1H con $J = 2.4$ Hz y que pertenece al protón **e** del alquino terminal.

En el espectro de RMN ^{13}C de la **Espectro 52** en el Anexo 1 aparece una señal a $\delta_{\text{C}} = 172.21$ que corresponde al carbón del carbonilo. Después, a $\delta_{\text{C}} = 156.68$ aparece el carbono cuaternario que sostiene al éter, a $\delta_{\text{C}} = 130.31$ y 115 se encuentran los carbonos **b** y **c** del anillo aromático. Así el carbono cuaternario del acetato aparece a $\delta_{\text{C}} = 127.03$ mientras que el carbono cuaternario del alquino aparece a $\delta_{\text{C}} = 78.56$ e inmediatamente después a $\delta_{\text{C}} = 75.53$ aparece el carbono **e** del alquino terminal. A $\delta_{\text{C}} = 55.83$ se observa una señal que se asignó al carbono **d** y a $\delta_{\text{C}} = 52.01$ el carbono del grupo metilo. Finalmente, a $\delta_{\text{C}} = 40.28$ se presenta el carbón **a**.

En el espectro IR de la **Espectro 53** en el Anexo 1 se observa una banda de estiramiento $\text{C}\equiv\text{C}$ a 3283 cm^{-1} , a 2953 cm^{-1} una banda de estiramiento C-H y a 2140 cm^{-1} la banda característica del grupo alquino terminal ($\text{C}\equiv\text{C-H}$).

El compuesto (**III**) se caracterizó por ESI, en el **Espectro 54** del Anexo 1 se observa un pico a 204.08 que corresponde a $[\text{M}^+]$ y un pico a 205.09 que indica la presencia del ión $[\text{M}+\text{H}]^+$, lo que confirma la masa esperada.

6.7.5 Síntesis del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (**IV**)



Esquema 10. Ruta sintética para la obtención del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (**IV**).

De acuerdo a la estrategia sintética propuesta para la construcción de las nuevas plataformas, se partió de la derivatización del compuesto **III** con el alquino, el cual una vez obtenido, se sometió a una reacción de saponificación en donde se genera el carboxilato correspondiente y en un segundo tratamiento de la reacción el producto se recuperó con una solución ácida, obteniendo así el ácido carboxílico con un rendimiento de 94%.

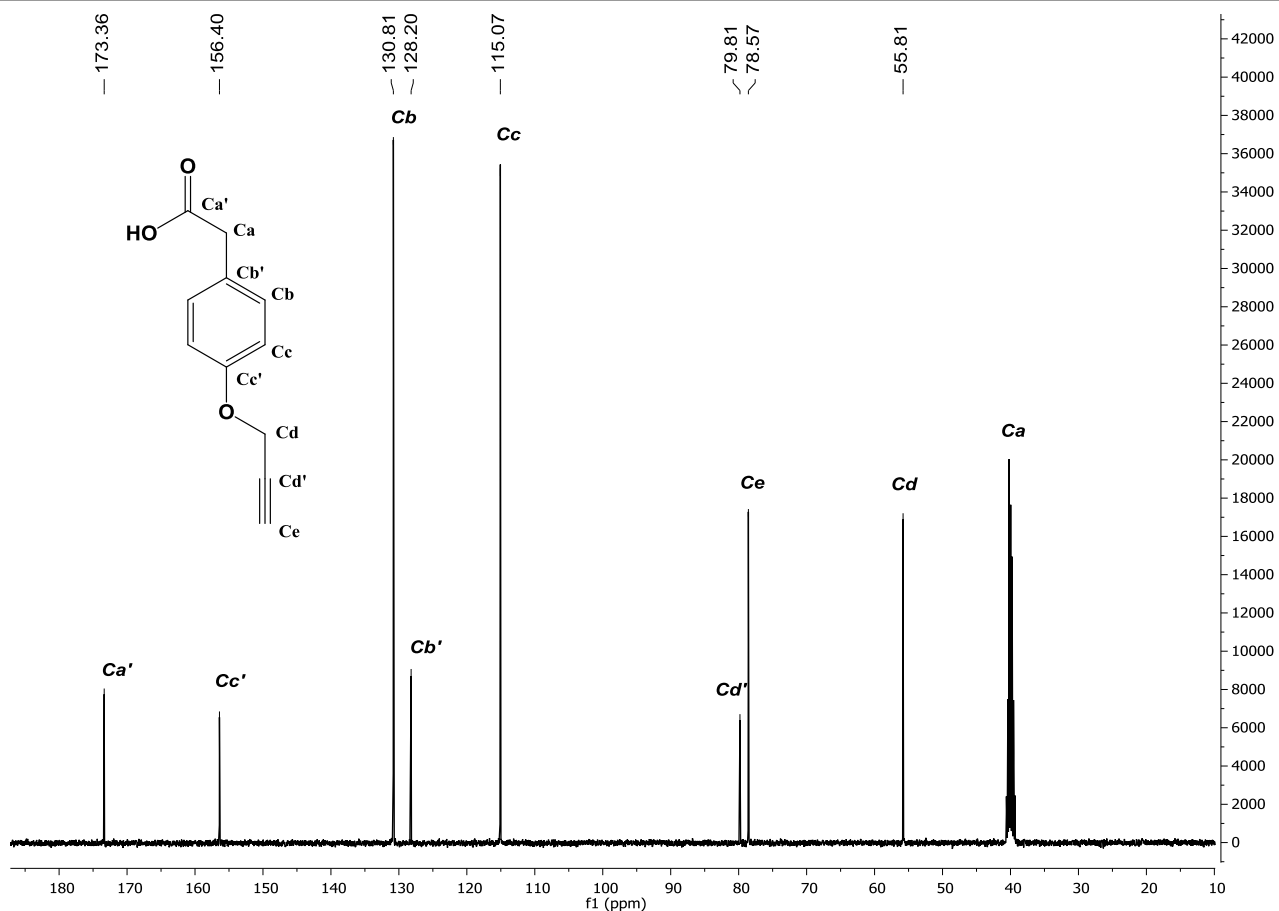
6.7.6 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (**IV**)

En contraste con el análisis realizado para el compuesto **III** en el **Espectro 14** de RMN ^1H en $\text{DMSO-}d_6$ destaca la aparición de una señal singulete a $\delta_{\text{H}} = 12.25$ que integra para 1H y que corresponde al protón del ácido carboxílico. Después a $\delta_{\text{H}} = 7.20-7.18$ y $6.94-6.92$ aparecen dos señales dobles con $J = 8.7$ Hz que integran para 2H y que corresponden a los protones **b** y **c** respectivamente. Posteriormente, a $\delta_{\text{H}} = 4.77$ se observa un señal doble con $J = 2.4$ Hz y que integra para 2H correspondiente al metileno **d**, a $\delta_{\text{H}} = 3.55$ se observa una señal triple con $J = 2.4$ Hz que integra para 1H y que pertenece al protón **e** del alquino terminal. Por último, a $\delta_{\text{H}} = 3.50$ aparece una señal singulete que integra para 2H y que se asignó al metileno **a**.



Espectro 14. RMN ¹H del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (IV) en DMSO-*d*₆ a 400 MHz.

El **Espectro 15** de RMN ¹³C coincide con el análisis arriba descrito para el compuesto (III) y destaca la desaparición de la señal del grupo metilo como resultado de la saponificación.

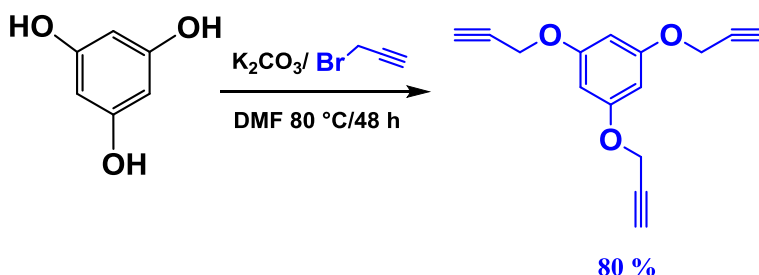


Espectro 15. RMN ¹³C del ácido 2-[4-(propargiloxy)fenil]acético (IV) en DMSO-*d*₆ a 400 MHz.

En el espectro IR de la **Espectro 57** del Anexo 1, se observa una banda de estiramiento C≡C a 3280 cm⁻¹, a 2950 cm⁻¹ una banda de estiramiento OH y a 2130 cm⁻¹ la banda característica del grupo alquino terminal (C≡C-H).

El compuesto (IV) se caracterizó por ESI, en el **Espectro 58** del Anexo 1, se observa un pico a 190.06 que corresponde a [M⁺] y un pico a 191.07 que indica la presencia del ión [M+H]⁺, lo que confirma la masa esperada.

6.7.7 Síntesis del 1,3,5-tris(propargiloxi)benceno (V)



Esquema 11. Ruta sintética para la obtención del 1,3,5-tris(propargiloxi)benceno (V)

El compuesto **V** se preparó en principio de acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.7, sin embargo, para obtener el producto deseado fue necesario cambiar el medio de reacción, reemplazando la acetona por DMF, con lo cual se puede incrementar la temperatura de la reacción, además de ser necesario un tiempo de 48h. Esta metodología fue propuesta por Mallard-Favier.⁷⁶ El compuesto **V** se obtiene con un 80% de rendimiento después de purificarlo por cromatografía en columna.

6.7.8 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del 1,3,5-tris(propargiloxi)benceno (V)

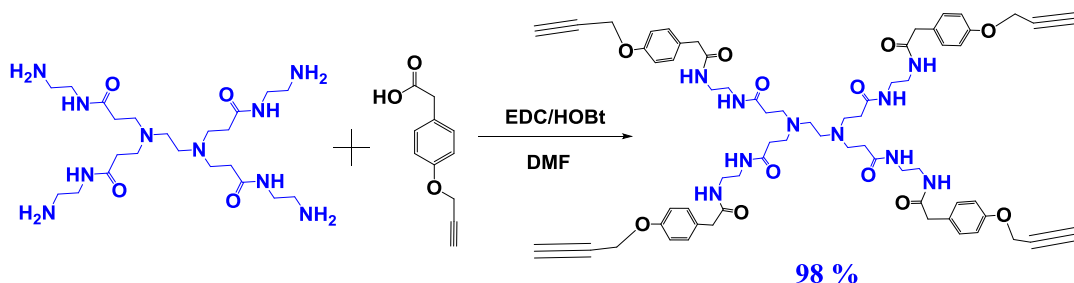
Dada la simetría del compuesto **V**, en el **Espectro 59** de RMN 1H en el anexo 1 se observa a $\delta_H = 6.26$ una señal singulete que integra para 3H y que corresponde a los protones del anillo aromático. A $\delta_H = 4.76$ se observa un señal doble con $J = 2.4$ Hz que integra para 6H y que corresponde a los metilenos **b**; por último, a $\delta_H = 3.56$ se observa un triplete que integra para 3H con $J = 2.4$ Hz y que pertenece a los protones **c** de los tres alquinos terminales.

En el espectro de RMN ^{13}C de la **Espectro 60** en el Anexo 1, aparece una señal a $\delta_C = 159.37$ que corresponde a los carbonos cuaternarios que sostienen a los éteres, después a $\delta_C = 95.62$ los carbonos **a** del anillo aromático. Así el carbono cuaternario del alquino aparece a $\delta_C = 79.51$ e inmediatamente después a $\delta_C = 78.77$ aparece el carbono **c** del alquino terminal. Finalmente, a $\delta_C = 56.07$ se presentan los carbonos de los metilenos **b**.

En el espectro IR de la **Espectro 61** en el Anexo 1, sobresale el estiramiento $C\equiv C$ a 3255 cm^{-1} y a 2133 cm^{-1} la banda característica del grupo alquino terminal ($C\equiv C-H$).

Por último, (V) se caracterizó por espectrometría ESI, en el **Espectro 62** del Anexo 1 se observa un pico a 241.1 que corresponde a $[M^+]$ y un pico a 242.1 que indica la presencia del ión $[M+H]^+$, lo que confirma la masa esperada.

6.7.9 Síntesis del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI)



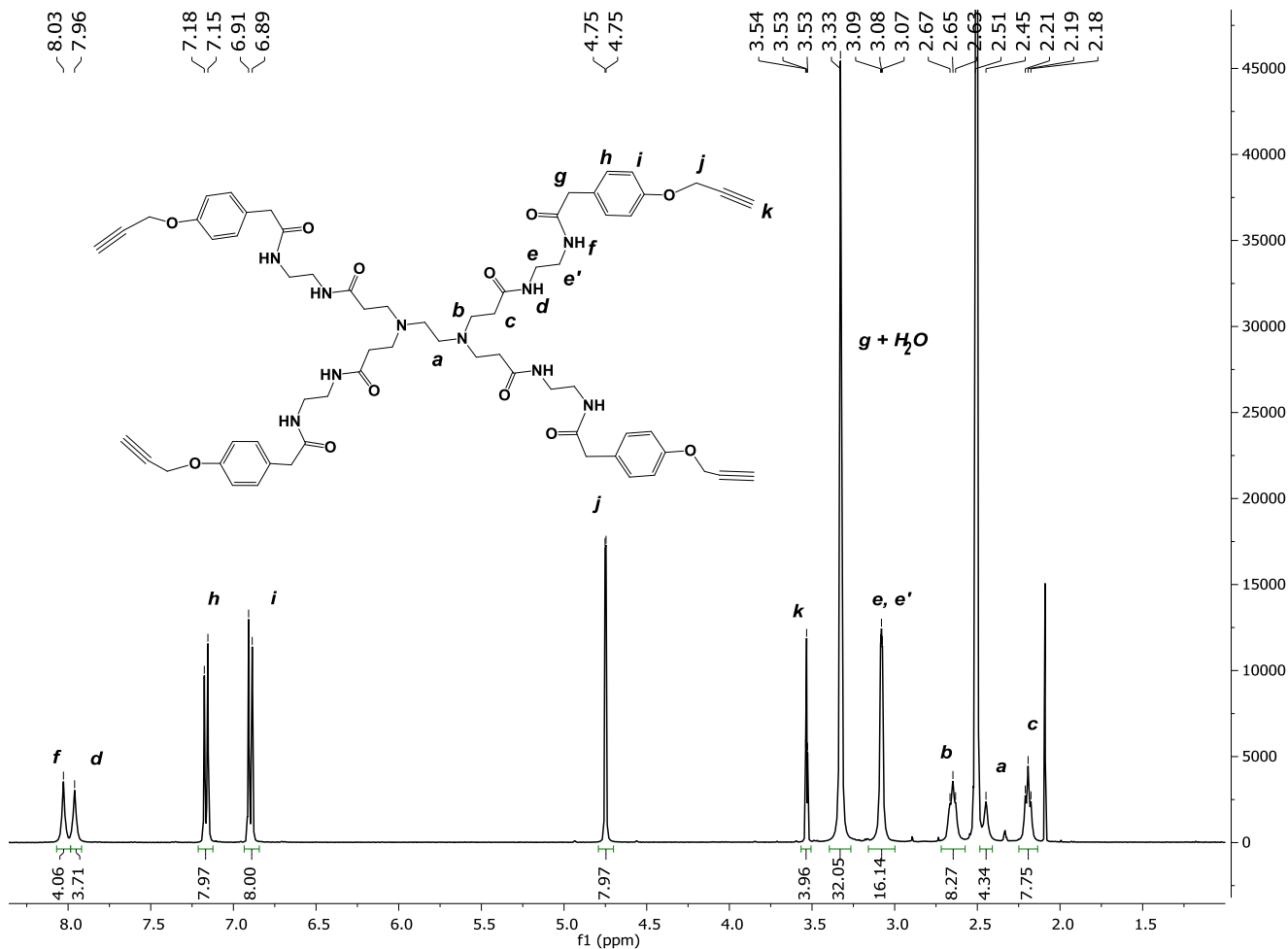
Esquema 12. Ruta sintética para la obtención del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI)

Otro de los pasos determinantes para la construcción de la plataforma dendrímica PAMAM modificada en su periferia con β CD, consistió en modificar las cuatro posiciones del dendrímero PAMAM G0 con grupos alquino, la cual se realizó a través una reacción de acoplamiento C-N con el ácido carboxílico del compuesto **IV**, para ésto se utilizó EDC y HOBt como agentes acoplantes en medio básico. El mecanismo de esta reacción se lleva a cabo en tres pasos: 1) la activación del ácido carboxílico, por medio de una reacción ácido – base; 2) el ataque nucleofílico del ión carboxilato a la EDC para formar la O-acilisourea que posteriormente es atacado por el HOBt para evitar la formación de la N-acil urea; 3) finalmente, el ataque nucleofílico de la amina al intermediario formado anteriormente, para obtener la amida. Con estas condiciones se obtuvo un rendimiento de 98% del dendrímero PAMAM con grupos alquino en las 4 posiciones.

6.7.10 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI)

El dendrímero **VI** se caracterizó por RMN ^1H en $\text{DMSO-}d_6$ (**Espectro 16**) a campo bajo se observan dos señales amplias $\delta_{\text{H}} = 8.03$ y 7.96 que integran para 4H y que corresponden a los cuatro protones de las amidas. A $\delta_{\text{H}} = 7.18-7.15$ y $6.91-6.89$ aparecen dos señales dobles con $J = 8.7$ Hz que integran para 8H y que corresponden a los protones *h* y *i* respectivamente. Después, a $\delta_{\text{H}} = 3.54$ se observa una señal triple con $J = 2.39$ Hz y que integra para 4H correspondiente a los 4 grupos alquino (protones *k*), traslapados con el agua aparecen los protones *g* a $\delta_{\text{H}} = 3.33$ y a $\delta_{\text{H}} = 3.08$ se observa una señal triple con $J = 2.18$ Hz

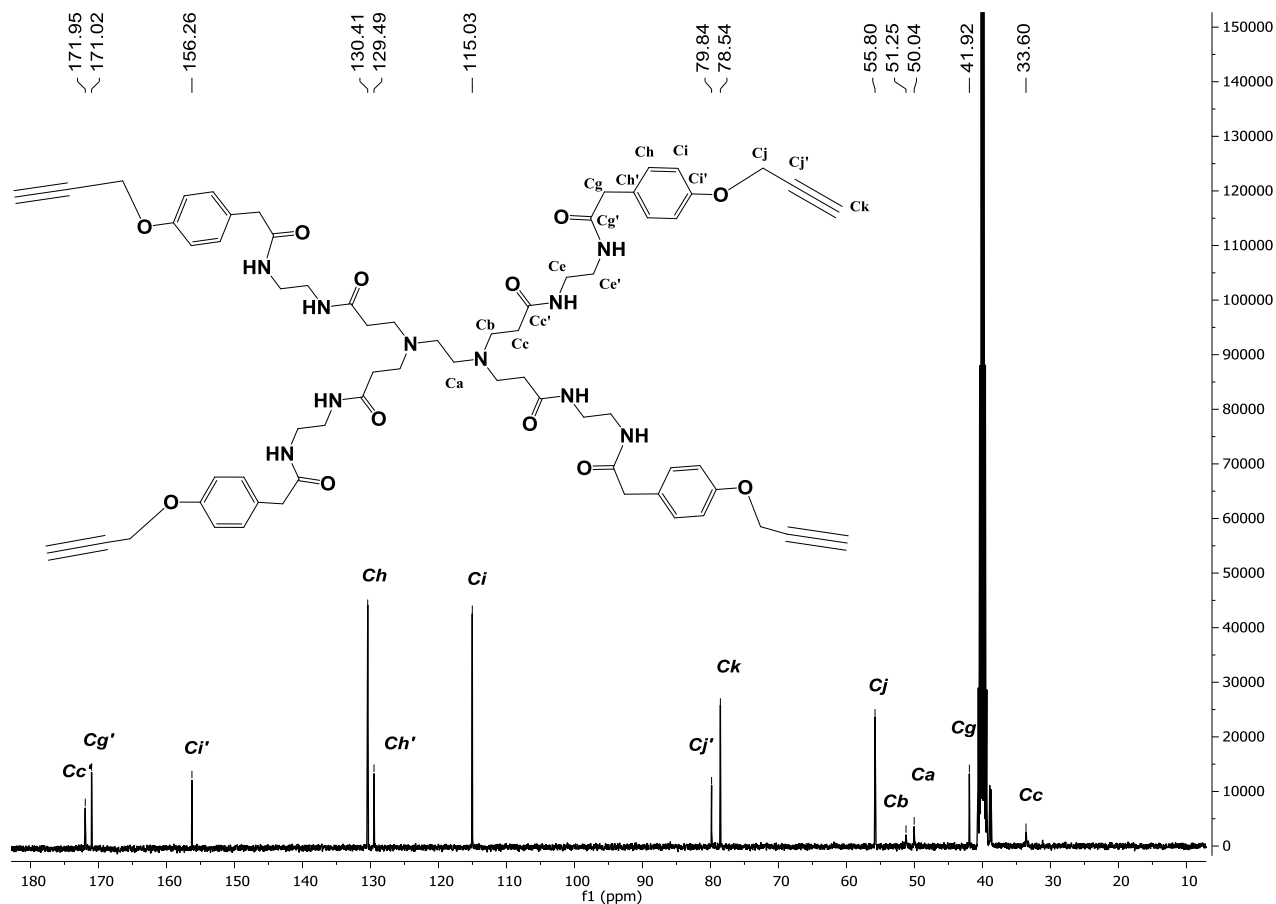
que integra para 16H y que pertenece al protón **e** y **e'**. A $\delta_H = 2.67$ se observa una señal triple con $J = 7.09$ Hz que integra para 8H correspondiente a los protones **b**, justo al lado de la señal del disolvente puede observarse un singulete a $\delta_H = 2.45$ que integra para 4H y que se asignó a los protones **a** del core de etilendiamino. Finalmente, a $\delta_H = 2.19$ aparece una señal triple con $J = 6.79, 6.87$ Hz que integra para 8H y que se asignó a los metilenos **c**.



Espectro 16. RMN ¹H del dendrímero PAMAM G0-alquino (**VI**) a 400 MHz.

En el **Espectro 17** de RMN ¹³C aparece una señal a $\delta_C = 171.95$ que corresponde al carbón del carbonilo del dendrímero PAMAM, después a $\delta_C = 171.02$ el carbón del carbonilo de la periferia, a $\delta_C = 156.26$ aparece el carbono cuaternario que sostiene al éter, así a $\delta_C = 130.41$ se encuentran los carbonos **h** y a $\delta_C = 129.49$ aparece el carbono cuaternario del anillo aromático vecino al acetato. A $\delta_C = 115.03$ se observan los carbonos **i** mientras que el carbono cuaternario del alquino aparece a $\delta_C = 79.84$ e inmediatamente después a $\delta_C = 78.54$ aparece el carbono **k** del alquino terminal. A $\delta_C = 55.80$ se observa una señal que se asignó al carbono **j** y a $\delta_C = 51.25$ los carbonos **b**, finalmente a $\delta_C = 50.04$ se presentan los carbonos **a**

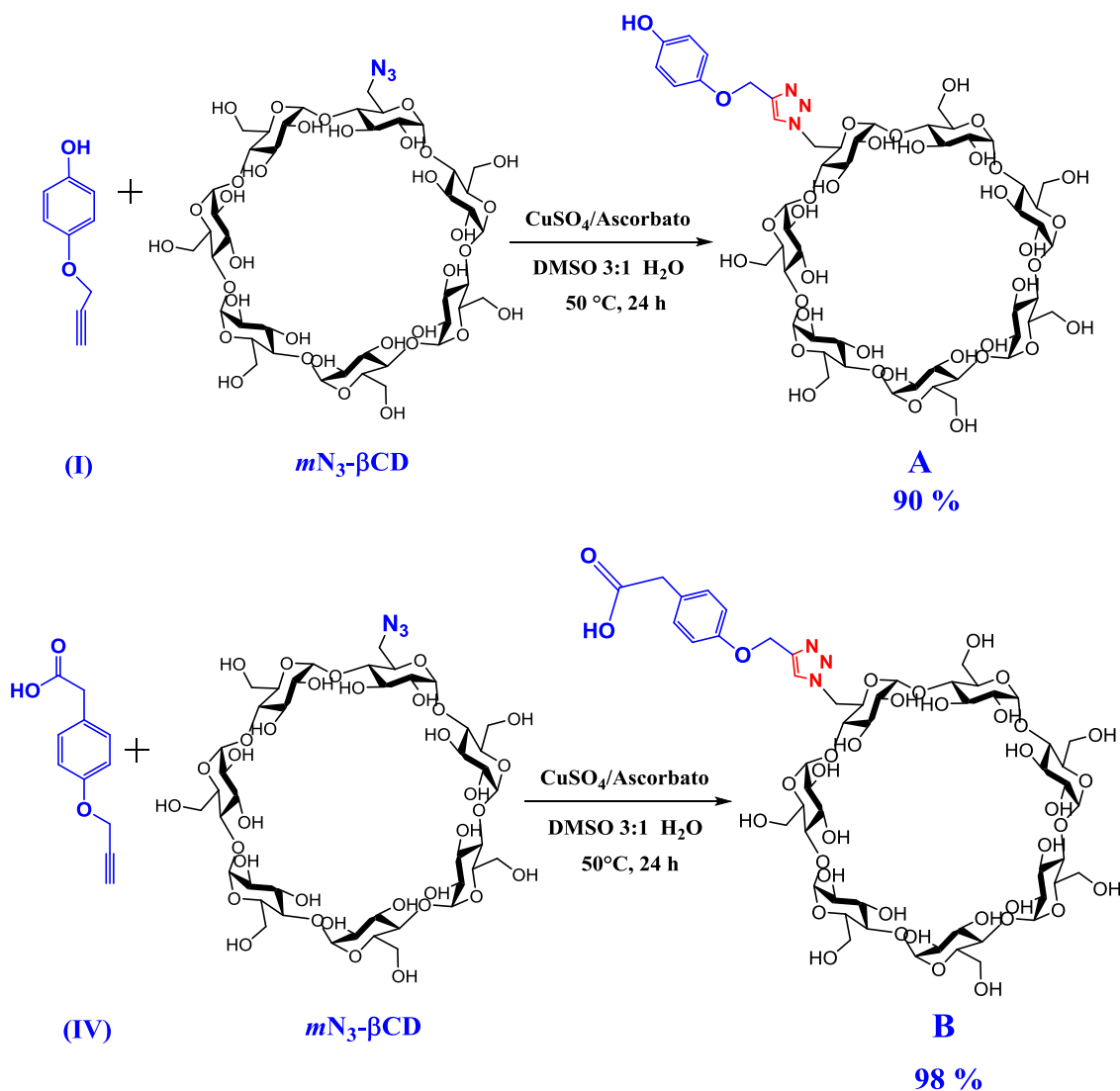
del núcleo seguidos por los carbonos **g** a $\delta_C = 41.92$, traslapados con la señal del disolvente se encuentran los carbonos **e** y a $\delta_C = 33.60$ se observan los carbonos **c**.



Espectro 17. RMN ^{13}C del dendrímero PAMAM G0-alquino (**VI**) en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

En el espectro IR de la **Espectro 65** en el Anexo 1 se observa una banda de estiramiento $\text{C}\equiv\text{C}$ a 3284 cm^{-1} , a 3082 cm^{-1} una banda de estiramiento N-H. El compuesto (**VI**) se caracterizó por ESI, en el espectro 66 del Anexo 1 se observa un pico a 1205.5 que corresponde a $[\text{M}^+]$ y un pico a 1206.5 que indica la presencia del ión $[\text{M}+\text{H}]^+$, lo que confirma la masa esperada.

6.8 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS A y B



Esquema 13. Ruta sintética para la obtención de los compuestos **A** y **B**.

Una de las áreas de investigación importantes en química de carbohidratos se centra en la modificación química controlada de la β CD, ya que da como resultado derivados más solubles en agua que también pueden mejorar las propiedades farmacéuticas de la β CD nativa. Actualmente, existen derivados comerciales más solubles de la β CD nativa como la hidroxipropil β CD (HP β CD) y la sulfobutil β CD (SBE β CD), sin embargo estos derivados se usan como mezclas de moléculas de β CD con diferentes grados de sustitución, es decir, con diferentes pesos moleculares.⁷⁷ Aunque son derivados que aumentan la solubilidad de la β CD, la sustitución aleatoria de los grupos OH transforma la β CD nativa en una mezcla de derivados isoméricos. Con base en esto diseñamos dos mono-derivados **A** y **B**, pero

mediante una modificación controlada y selectiva de un OH de la cara primaria de la β CD, modificando el grupo funcional terminal de los sustituyentes, así estos mono-derivados son extremadamente versátiles ya que permitirían una fácil funcionalización con ligandos de direccionamiento (*i.e* aminoácidos, péptidos, anticuerpos) y con esto se pueden obtener plataformas supramoleculares aún más selectivas.

Por otra parte, el concepto de química "*click*" se refiere a transformaciones químicas eficaces, selectivas, fáciles y versátiles que conducen a un único producto de reacción y subproductos inofensivos que se puedan separar por métodos simples. La reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre una azida y un alquino terminal catalizada por cobre (I) para dar origen a un 1,2,3-triazol 1,4-disustituido se considera, generalmente, el ejemplo modelo de química "*click*" debido a su síntesis sencilla y tolerancia a una variedad de grupos funcionales y condiciones de reacción. Como ya se mencionó, esta reacción se da en condiciones suaves, en medio orgánico, acuoso o en mezcla de ambos y a temperaturas menores a 80 °C, obteniendo altos rendimientos.

Esta cicloadición se da a través de un ciclo catalítico en donde el ascorbato reduce *in situ* el Cu (II) a Cu (I); el ciclo comienza con la inserción del Cu (I) en el alquino terminal. Posteriormente, un átomo de nitrógeno del grupo azida se coordina con el Cu (I) formando un complejo acetiluro cobre-azida, dejando el triple enlace disponible para un ataque nucleofílico intramolecular, esto da como resultado un metalociclo de 6 miembros, el cual sufre una contracción anular favorecida energéticamente al formar un anillo de cinco miembros, el cual sufre una reacción ácido-base para generar el 1,2,3-triazol 1,4-disustituido.

Para obtener las plataformas **A** y **B** utilizamos la reacción de *Química Click*, en nuestro caso la fuente de alquino fue el intermediario (I) o (II) y como fuente de azida la mN_3 - β CD; se utilizó $CuSO_4$ y ascorbato de sodio en una mezcla DMSO:H₂O que se mantuvo durante 24 h a 50 °C. Para purificar los compuestos **A** y **B** se utilizó una columna de exclusión molecular, utilizando agua como eluyente, con la cual fue posible remover tanto el cobre como el ácido ascórbico remanentes para obtener 90 % de rendimiento para el compuesto **A** y un 98 % de rendimiento para **B**.

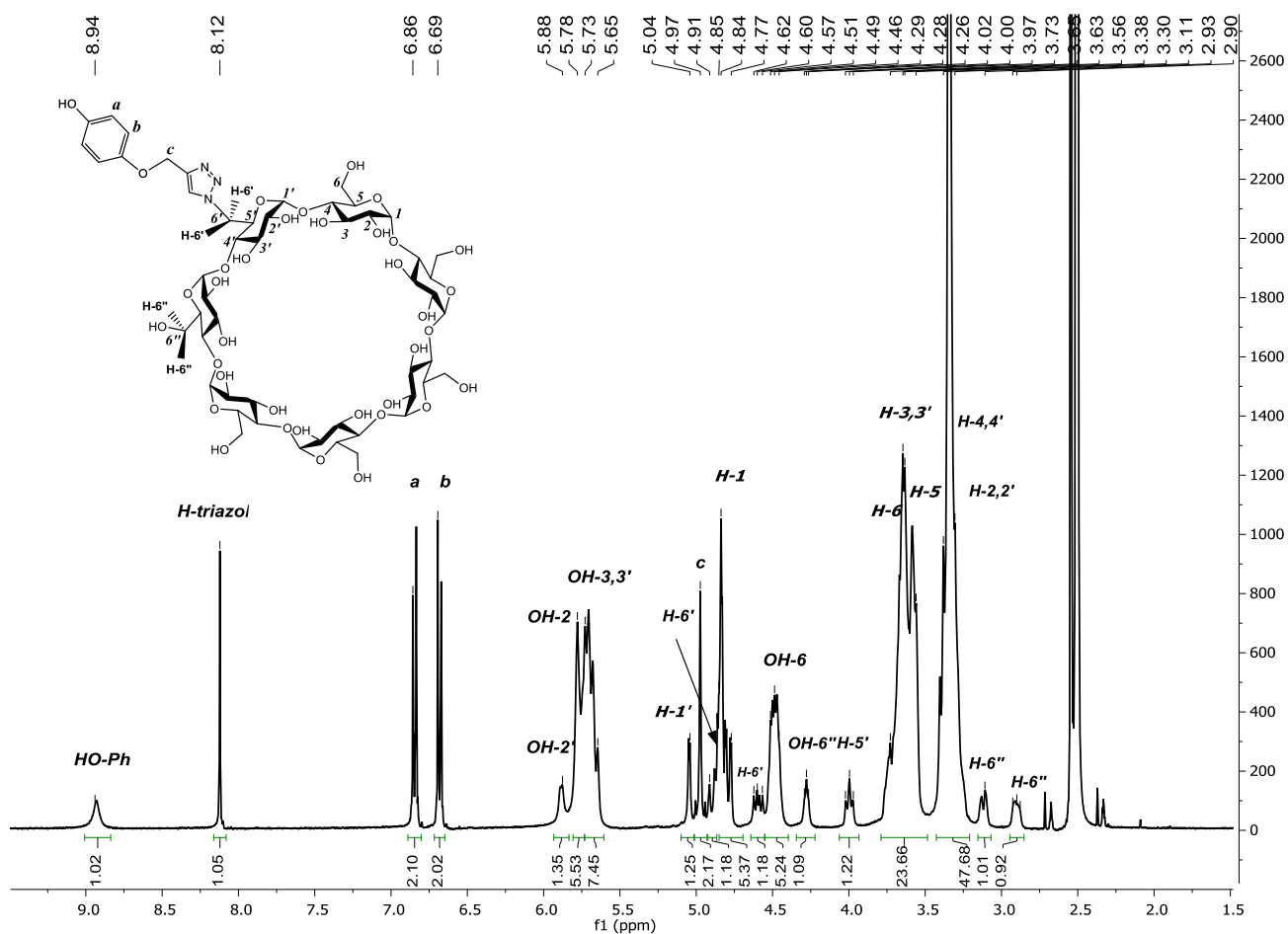
6.8.1 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de los compuestos A y

B

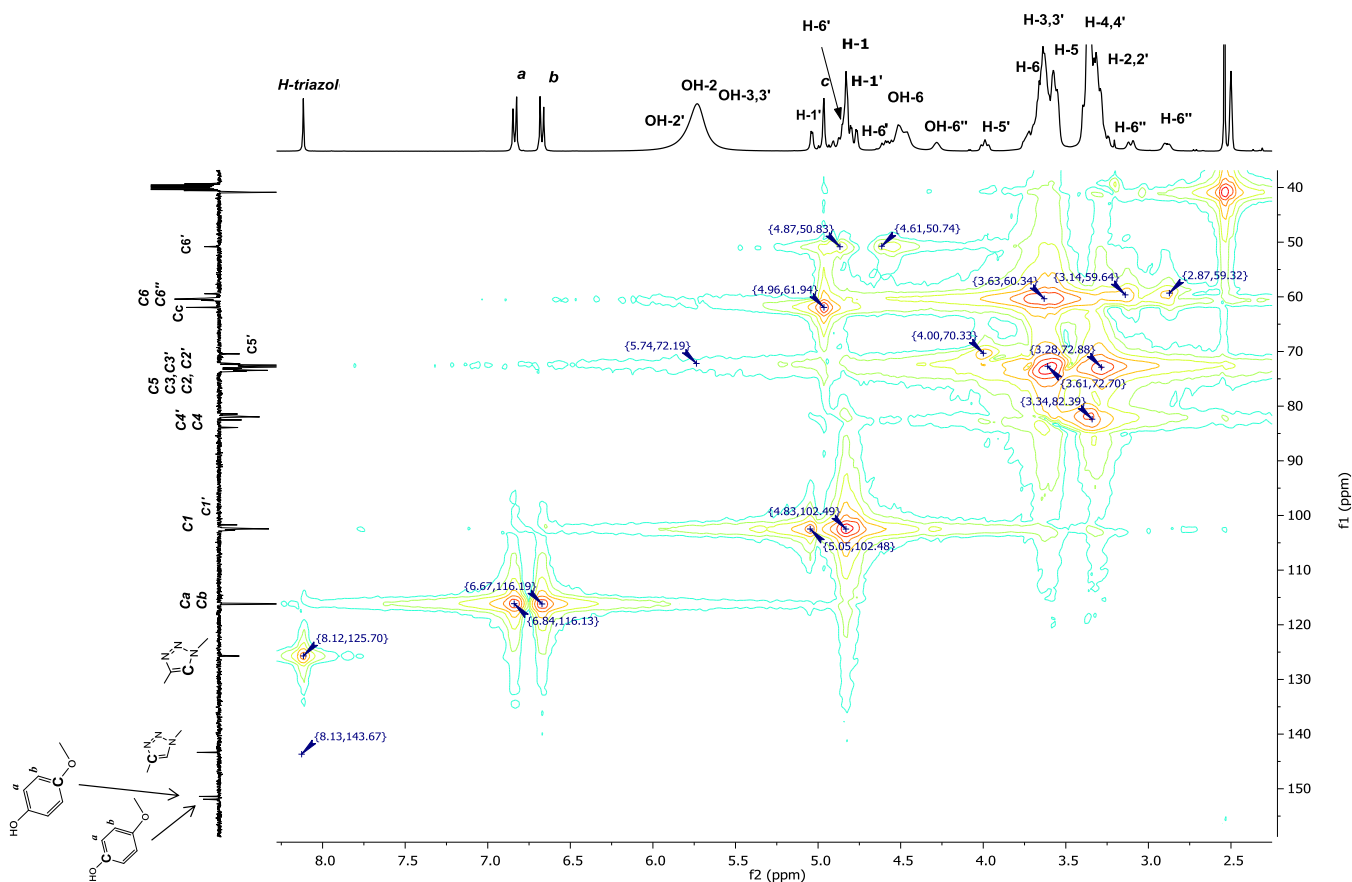
Los compuestos **A** y **B** se caracterizaron por RMN ^1H en DMSO- d_6 (**Espectro 18** y **74** en Anexo 1). A continuación se detalla el análisis espectroscópico para el compuesto **A**: a campo bajo $\delta_{\text{H}}= 8.94$ se observa una señal amplia que integra para 1H que corresponde al protón del fenol y a $\delta_{\text{H}}= 8.12$ una señal singulete que integran para 1H y que se asignó al protón del anillo de triazol. A $\delta_{\text{H}}= 6.86$ y 6.69 aparecen dos señales dobles con $J = 9$ Hz que integran para 2H y que corresponden a los protones **a** y **b** respectivamente. Como se describió en la sección 6.8. es posible identificar el protón del hidroxilo 2 (OH2') como una señal singulete a $\delta_{\text{H}}= 5.88$, después se observan un conjunto de señales que integran para 13H que corresponden a los hidroxilos 2 y 3 (OH2, OH3 y OH3') de la β CD. A continuación a $\delta_{\text{H}}= 5.04$ aparece una señal singulete que integra para 1H que pertenece al protón H1' de la glucopiranososa modificada, después a $\delta_{\text{H}}= 4.97$ se observa otra señal singulete que integra para 2H y que se asignó a Hc, esta diferenciación se llevó a cabo gracias a sus respectivas correlaciones con el pico de ^{13}C (**Espectro 19** HMQC), ya que Hc correlaciona con un pico a $\delta_{\text{C}}= 61.91$ y la señal de H1' correlaciona con el pico de carbono C1 anomérico a $\delta_{\text{C}}= 102.48$ del anillo de glucopiranososa modificado de la β CD.

Por otra parte se ha reportado⁷⁸ la posibilidad de diferenciar por desplazamiento químico los protones diasterotópicos H-6' correspondientes al carbono C6' del anillo de glucopiranososa modificado de la β CD. En nuestro caso, esta identificación fue realizada con el espectro HMQC (**Espectro 19**), ya que ambos protones diastereotópicos correlacionan con una señal de carbono C6 a $\delta_{\text{C}}= 50.74$. La primera señal aproximadamente a $\delta_{\text{H}}= 4.87$ se traslapa parcialmente con la señal de los protones H-1 ($\delta_{\text{H}}= 4.84$ - 4.77) de los anillos de glucopiranososa sin modificar, mientras que la segunda señal se puede identificar a aproximadamente $\delta_{\text{H}}= 4.61$ (sustentada por una constante de acoplamiento geminal 2J alrededor de 14 Hz). Esta asignación fue corroborada por las interacciones en el espectro COSY como se muestra en el **Espectro 69** en Anexo 1. Las dos señales H-6' descritas anteriormente correlacionan con una señal a $\delta_{\text{H}}= 3.99$ que corresponde a H-5' del mismo anillo de glucopiranososa modificado. Así las señales que aparecen entre $\delta_{\text{H}}= 4.51$ - 4.45 y que integran para 5H, coinciden con el desplazamiento químicos de los protones OH6 de las unidades de glucopiranososa sin modificar. Después se observa una señal centrada en $\delta_{\text{H}}= 4.29$ que integra para 1H y que no correlaciona con ningún carbono, en el espectro COSY

puede observarse que esta señal correlaciona con dos señales a $\delta_H = 2.86$ y 3.1 por lo que se asignó al protón OH6'' del anillo de glucopiranososa contiguo al azúcar modificado. El conjunto de señales entre $\delta_H = 3.73$ - 3.56 corresponde a los protones H-6 y los protones de la cavidad H-3,3' y H-5; de acuerdo al desplazamiento químico los protones externos H-4,4' y H-2,2' aparecen entre $\delta_H = 3.38$ - 3.30 (traslapados con la señal del agua). Finalmente, aparecen dos señales a $\delta_H = 3.11$ y 2.90 que correlacionan con las señales de los carbonos C6 de las unidades de glucopiranososa no modificadas alrededor de $\delta_C = 60$. Estas últimas señales se asignaron a los dos protones H-6'' de la misma unidad de glucopiranososa -CH₂OH contigua a la mono-funcionalizada.



Espectro 18. RMN ¹H del compuesto **A** en DMSO-*d*₆ a 400 MHz.



Espectro 19. RMN 2D HMQC del compuesto **A** en DMSO- d_6 a 400 MHz.

El resto de las señales de ^{13}C para el compuesto **A** se asignó a través del espectro HMQC y se pueden revisar en el **espectro 68** del Anexo 1.

Para el compuesto **A** en el espectro NOESY (**Espectro 71** en Anexo 1) se observan interacciones a larga distancia entre el protón del fenol y los protones H2 de la βCD así como con los hidroxilos de la cara secundaria. Estas interacciones sólo se pueden llevar a cabo entre dos moléculas, además se observa interacciones del protón del triazol con H-6'' del anillo de glucopiranososa contiguo a la mono-modificación, dichas interacciones demuestran que el residuo aromático no está incluido en la cavidad de la βCD .

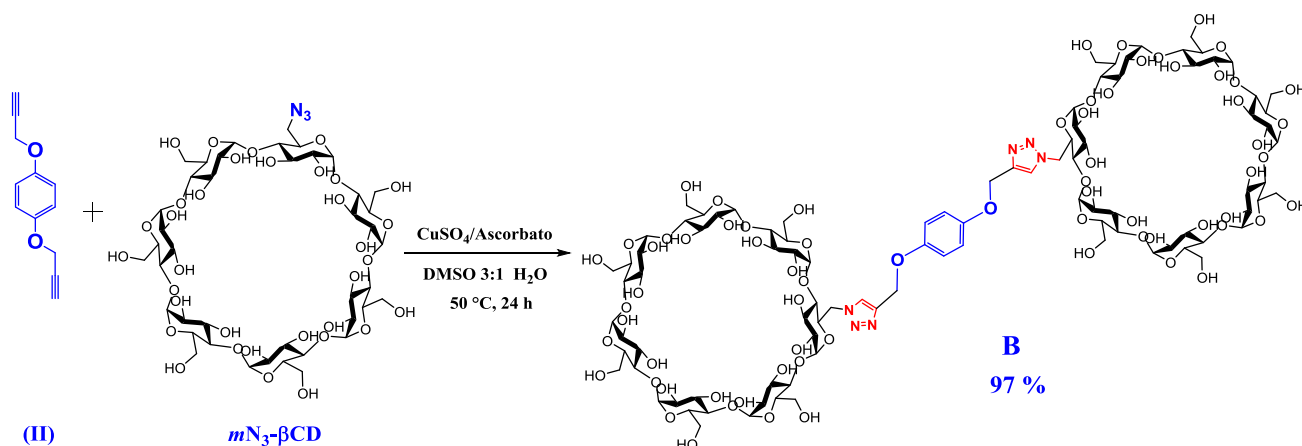
Para **A** en el espectro IR (**Espectro 72** del Anexo 1) se presentan las bandas características; a 3294 cm^{-1} la vibración O-H a 2918 cm^{-1} el estiramiento N=N y a 1509 cm^{-1} estiramiento C=C y por último a 1025 cm^{-1} la vibración de estiramiento $\text{CH}_2\text{-O-C- cm}^{-1}$.

El compuesto **A** se caracterizó por espectrometría ESI-TOF que permite la caracterización de compuestos con alto peso molecular, ya que se generan especies

multicargadas que pueden detectarse con un analizador de tiempo de vuelo. En el **Espectro 73** del Anexo 1, se observa una señal a 1308.44 m/z, el cual corresponde al ion molecular $[M]^+$ y un pico a 1330.42 m/z que corresponde al ión molecular más un átomo de sodio $[M+Na]^+$ lo que confirma la masa del compuesto esperado.

Así mismo se realizó la asignación para el compuesto **B**, sus espectros se encuentran en el Anexo 1 (**Espectros 74-80** en Anexo 1).

6.8.2 Síntesis del compuesto C



Esquema 14. Ruta sintética para la obtención del compuestos **C**.

El compuesto **C** se obtuvo de acuerdo a las condiciones *Click* descritas en la sección 6.8. De igual manera, la purificación se realizó por SEC con agua como eluyente, obteniendo un 97 % de rendimiento.

6.8.3 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del compuesto C

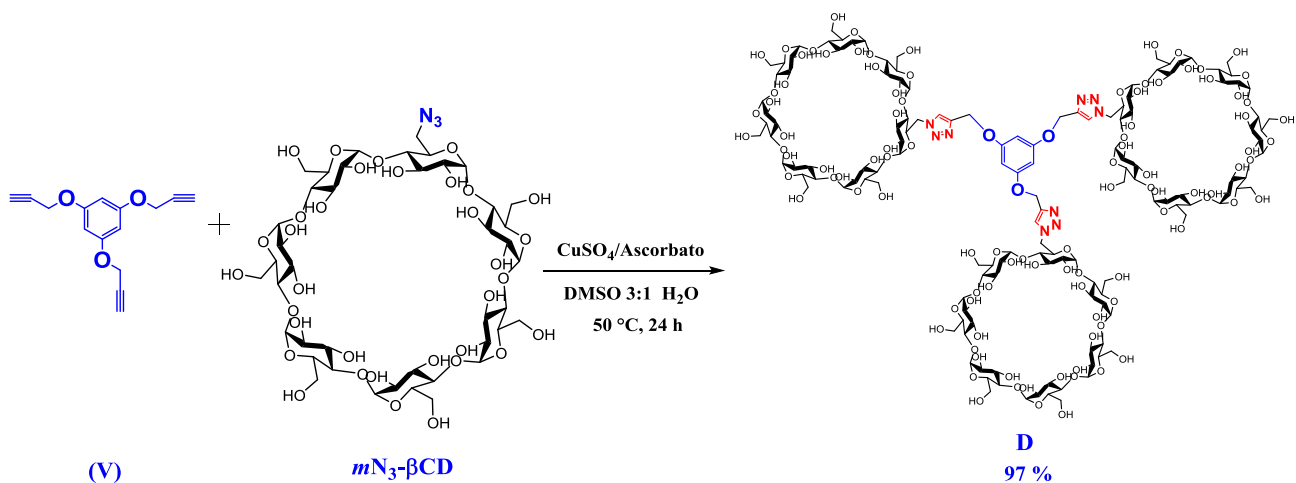
Para el compuesto **C** se realizó un análisis similar que para **A** y **B**, dada la simetría de la molécula en el espectro de RMN 1H del **Espectro 81** en el Anexo 1 a $\delta_H = 8.15$ se observa una señal singulete que integra para 2H y que pertenece al protón de los dos anillo de triazol. $\delta_H = 6.98$ aparece otro singulete que integra para 4H y que corresponde a los protones del anillo aromático **Ha** y **Hb**. Después, el orden de aparición de la señales coincide con la descripción realizada en la sección 6.9.1 (más detalles se describen en la parte experimental) para la β CD y se realizó con la ayuda del espectro HMQC y COSY (**Espectros 83 y 84** respectivamente en el Anexo 1). En el **Espectro 82** de RMN ^{13}C en el Anexo 1 aparece una señal a $\delta_C = 152.87$ que corresponde a los carbonos cuaternarios que sostienen a los éteres,

a $\delta_C = 143.15$ se encuentra el carbono cuaternario del triazol seguido de la señal que corresponde al carbono 5 del mismo anillo a $\delta_C = 125.87$. A $\delta_C = 115.99$ aparecen los carbonos **a** y **b** del anillo aromático. El resto de las señales correspondientes a la β CD coincide con la descripción de la sección 6.8.1.

En el espectro IR de la **Espectro 86** en el Anexo 1, se observan las bandas características; a 3288 cm^{-1} la vibración O-H, a 3921 cm^{-1} el estiramiento N=N y a 1509 cm^{-1} el estiramiento C=C; por último a 1026 cm^{-1} la vibración de estiramiento $\text{CH}_2\text{-O-C-}$ cm^{-1} .

La caracterización de **C** por espectrometría ESI-TOF (**Espectro 87** en Anexo 1) muestra un pico a 1253.91 m/z , el cual corresponde al ion molecular $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$, lo que confirma la masa del compuesto esperado.

6.8.4 Síntesis del compuesto D



Esquema 15. Ruta sintética para la obtención del compuestos **D**.

El compuesto **D** se obtuvo de acuerdo a las condiciones *Click* descritas en la sección 6.9. Para garantizar la sustitución en las tres posiciones disponibles se utilizó un exceso de $m\text{N}_3\text{-}\beta\text{CD}$. El crudo de la reacción se purificó por SEC usando agua como eluyente, obteniendo un 97 % de rendimiento.

6.8.5 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del compuesto **D**

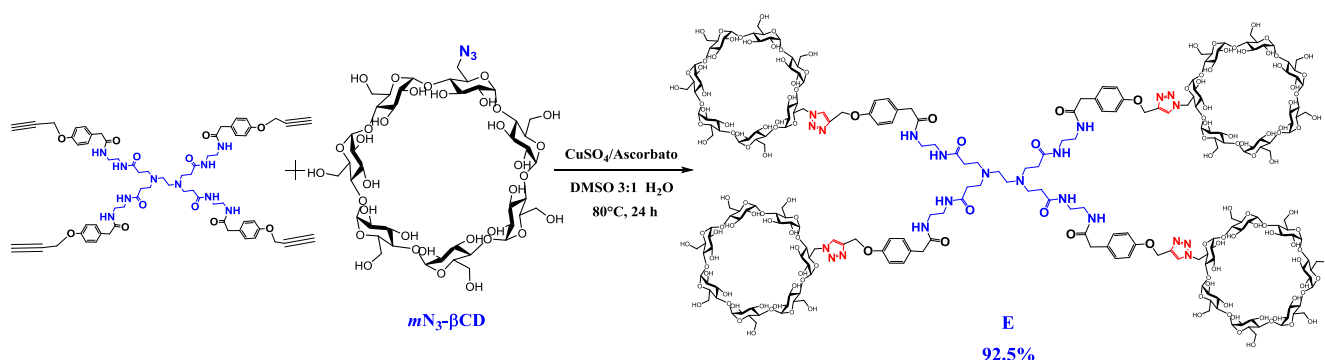
Dada la simetría del compuesto **D** en el **Espectro 88** de RMN ^1H en el Anexo 1, se observa a $\delta_{\text{H}} = 8.15$ una señal singulete que integra para 3H y que pertenece a los protones de los tres anillos de triazol, a $\delta_{\text{H}} = 6.35$ aparece otro singulete que también integra para 3H y que se asignó a los protones del anillo aromático. Después el orden de aparición de la señales coincide con la descripción realizada en la sección 6.9.1, la asignación completa se puede encontrar en la parte experimental y los **Espectros 88, 90 y 91** del anexo 1. En el **Espectro 89** de RMN ^{13}C en el Anexo 1 aparece una señal a $\delta_{\text{C}} = 160.44$ que corresponde a los carbonos cuaternarios que sostienen a los éteres, a $\delta_{\text{C}} = 142.69$ se encuentra el carbono cuaternario del triazol, seguido de la señal que corresponde al carbono 5 del mismo anillo a $\delta_{\text{C}} = 126.46$. A $\delta_{\text{C}} = 94.85$ aparecen los carbonos **a** del anillo aromático. El resto de las señales correspondientes a la βCD coincide con la descripción de la sección 6.8.

Para el compuesto **D** en el espectro NOESY (**Espectro 92** en Anexo 1) destaca la interacción a larga distancia entre el protón del triazol con su vecindario solamente, dada la conformación de este compuesto no se observa interacción de la parte aromática con la cavidad de la βCD .

Para **D** en el espectro IR (**Espectro 93** del Anexo 1) se presentan las bandas características; a 3272 cm^{-1} la vibración O-H, a 2921 cm^{-1} el estiramiento N=N, a 1600 cm^{-1} estiramiento C=C y por último a 1020 cm^{-1} la vibración de estiramiento $\text{CH}_2\text{-O-C- cm}^{-1}$.

El compuesto **D** se caracterizó por espectrometría ESI-TOF. En el **Espectro 94** del Anexo 1, se observa una señal a 1882.4 m/z que corresponde al ión $[\text{M}-2\text{H}+2\text{Na}]^{2+}$ y un pico a 1263.0 que corresponde a la especie $[\text{M}-3\text{H}+3\text{Na}]^{3+}$, estos iones corresponden al peso molecular esperado.

6.8.6 Síntesis del compuesto E

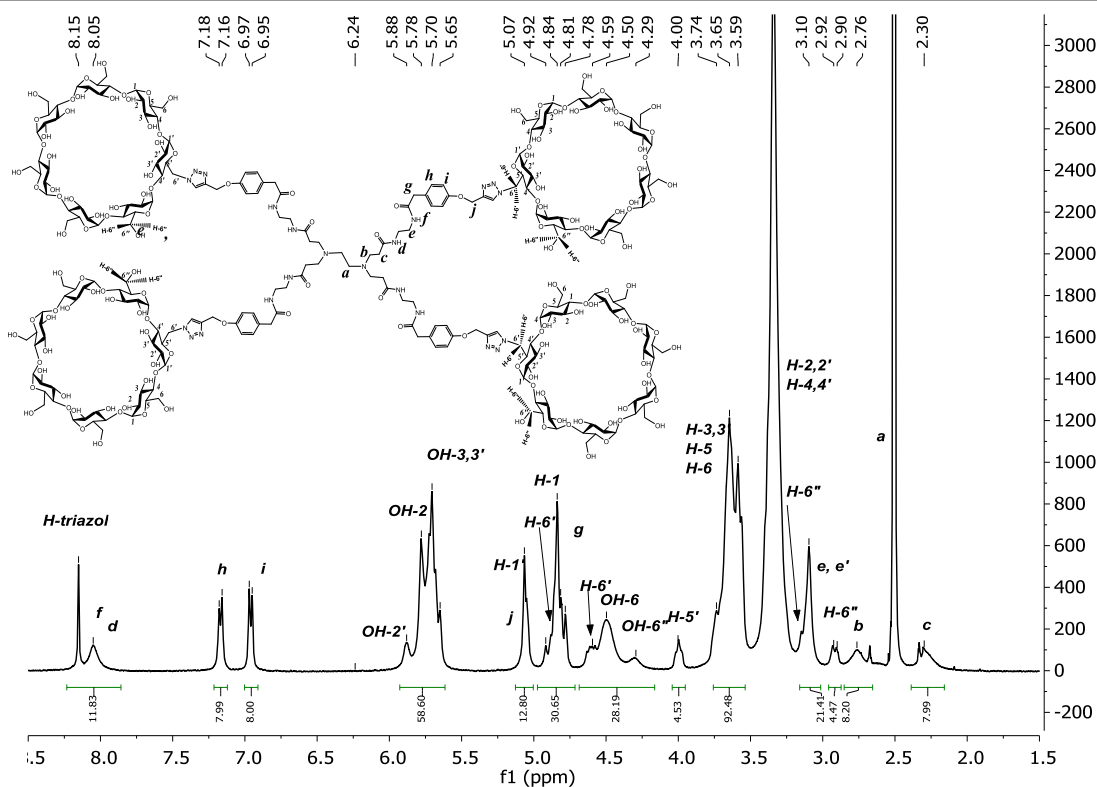
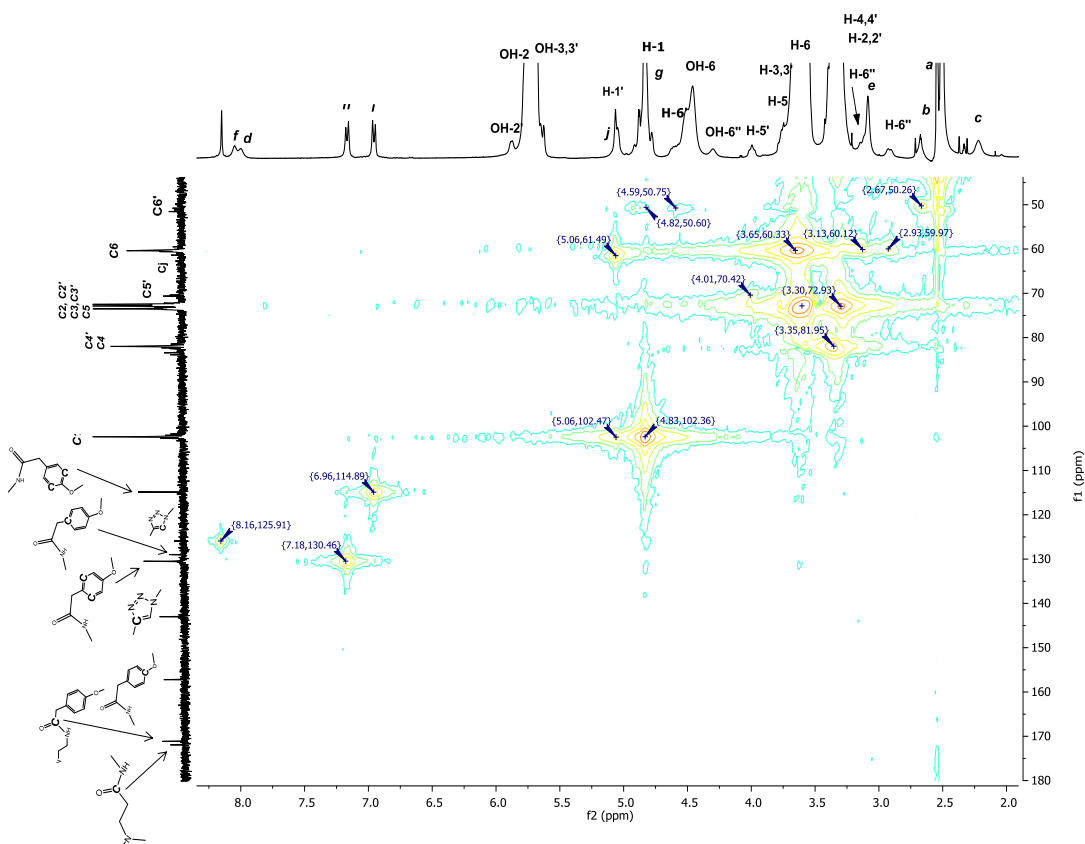


Esquema 16. Ruta sintética para la obtención del compuestos E.

El compuesto **E** se obtuvo de acuerdo a las condiciones *Click* descritas en la sección 6.8 con la diferencia de un incremento en la temperatura de reacción, ya que el intermediario **VI** es parcialmente soluble a 50°C mientras que a 80°C todo se encontraba en solución, a su vez para garantizar la sustitución en las cuatro posiciones disponibles se utilizó un exceso de *mN*₃-CD. El crudo de la reacción se purificó por SEC, usando agua como eluyente, obteniendo un 92.5 % de rendimiento.

6.8.7 Caracterización espectroscópica y espectrométrica del compuesto E

El dendrímero **E** se caracterizó por RMN ¹H en DMSO-*d*₆ (**Espectro 20**); a campo bajo $\delta_{\text{H}} = 8.15$ se observa una señal singulete que integra para 4H y que corresponde a los cuatro protones de los triazoles, después a $\delta_{\text{H}} = 8.05$ aparece una señal amplia que integra para 8H que corresponden a los cuatro protones de las amidas. A $\delta_{\text{H}} = 7.18-7.16$ y $6.97-6.95$ aparecen dos señales dobles con $J = 8.1$ Hz que integran para 8H y que corresponden a los protones **h** e **i** respectivamente. Las señales correspondientes a la β CD coinciden con la descripción realizada en la sección 6.8. Es posible diferenciar el protón **Hj**, y que se encuentra traslapada con las señales de los protones H1'. Esta asignación fue posible con el espectro HMQC (**Espectro 21**), ya que esta señal **Hj** correlaciona con un carbono a $\delta_{\text{C}} = 69.5$ y las señales de H1 correlacionan con los carbono a $\delta_{\text{C}} = 102.5$. Por otra parte, el protón **Hg** se encuentra traslapado con las señales de los protones H-1 de las glucopiranosas sin modificar. Esta señal correlaciona con un carbono a $\delta_{\text{C}} = 50.60$ por lo que se asignó a **Hg**. Finalmente, a campo alto se observan las señales correspondientes a los protones **He**, **Hb**, **Ha** y **Hc**.

Espectro 20. RMN ^1H del compuesto E en DMSO- d_6 a 400 MHz.Espectro 21. RMN 2D HMQC del compuesto E en DMSO- d_6 a 400 MHz.

El resto de las señales de ^{13}C para el compuesto **E** se asignó a través del espectro HMQC y se pueden revisar en la **Espectro 35 y 96** del Anexo 1.

En el espectro NOESY (**Espectro 99** en Anexo 1) sólo se observan interacciones a larga distancia entre el protón del triazol con su vecindario, dada la conformación de este compuesto en DMSO no se observa interacción de la parte aromática con la cavidad de la βCD .

En el espectro IR (**Espectro 100** del Anexo 1) se presentan las bandas características: a 3294 cm^{-1} la vibración O-H a 2917 cm^{-1} , el estiramiento N=N y a 1643 cm^{-1} , estiramiento C=C y por último a 1024 cm^{-1} la vibración de estiramiento $\text{CH}_2\text{-O-C- cm}^{-1}$.

El compuesto **E** se caracterizó por espectrometría ESI-TOF. En el **Espectro 101** del Anexo 1 se observa un pico a 1478.6 , el cual corresponde al ion molecular $[\text{M}-3\text{H}+3\text{Na}]^{4+}$ que confirma la masa del compuesto esperado.

6.9 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS PLATAFORMAS A-E

Aunque la βCD es de naturaleza hidrofílica y confiere esta propiedad a moléculas con alta hidrofobicidad mediante su encapsulamiento, se ha reportado que esta solubilidad en agua puede ser limitada por dos razones: en primer lugar, las moléculas de βCD exhiben una fuerte unión en el estado cristalino⁷⁹ y en segundo lugar, la aparición de puentes de hidrógeno intramoleculares entre grupos OH secundarios evita la interacción con las moléculas de agua.⁸⁰ La modificación química controlada de la βCD da como resultado derivados más solubles en agua que también pueden mejorar sus propiedades farmacéuticas.⁷⁷ Con base en esto determinamos la solubilidad acuosa de los compuestos **A-E** de manera cuantitativa; en la **Tabla 4** se muestran los resultados:

Tabla 4. Solubilidad cuantitativa de las plataformas **A-E** determinada por el método de Jozwiakowski y Connors.⁸⁶

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Solubilidad (mg/mL)
A	1308	37.5 ± 0.4
B	1350	97.4 ± 0.3
C	2506	861.4 ± 0.2
D	3720	581.3 ± 0.4
E	5845	> 2580
βCD	1135	18.3 ± 0.3

Como puede observarse, el compuesto **A** no incrementa la solubilidad de manera significativa mientras que **B** la aumenta al menos 5 veces. El dímero **C** y el trímero **D** muestran un aumento considerable en la solubilidad respecto a los derivados **A** y **B** monosustituídos. En particular, la plataforma **C** exhibe una solubilidad extremadamente alta, en el orden de 50 veces mayor que la βCD nativa. Esta propiedad puede transferirse a fármacos de escasa solubilidad en agua y además aumenta la capacidad de formación de complejos de inclusión, y por lo tanto la carga de fármaco. En principio esperábamos que **D** tuviera una mayor solubilidad en agua, sin embargo, la proximidad entre las unidades de βCD limita la interacción con las moléculas de agua y por ende disminuye su solubilidad acuosa.⁸¹

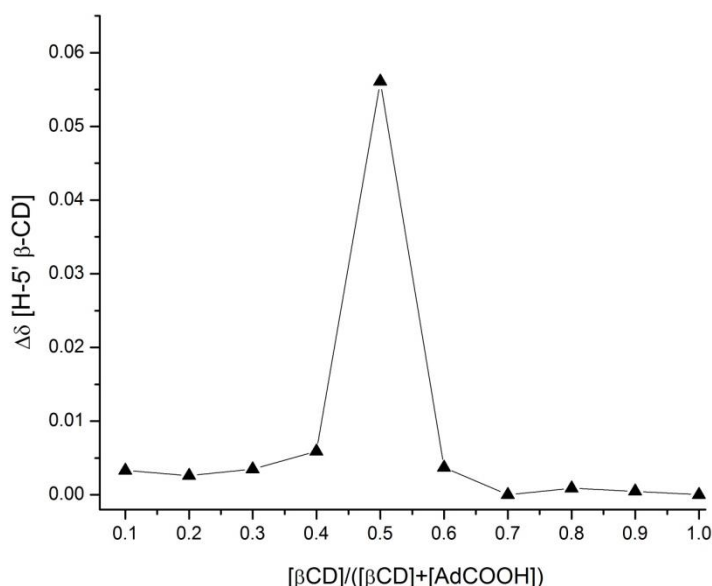
El compuesto **E** es un nuevo tipo de dendrímero PAMAM-βCD con alta solubilidad en agua (al menos > 140 veces comparado con la βCD). Esta plataforma combina las funciones múltiples en la superficie del dendrímero con las propiedades de inclusión de βCD para aumentar de forma racional la carga de fármaco. Esta estrategia es una alternativa novedosa para la modificación de los dendrímeros PAMAM con carbohidratos que además puede solucionar la toxicidad que presentan los PAMAM, dado el aumento en el número de cargas positivas en la superficie conforme aumenta la generación.⁸²

6.10 DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRIA POR EL MÉTODO DE JOB PARA LAS PLATAFORMAS D y E.

La estequiometría de formación de complejos de inclusión puede ser estudiada mediante el método de variaciones continuas o de Job, que permite determinar la relación estequiométrica exacta en la que se combinan los reactivos de una reacción. La base del método consiste en realizar reacciones sucesivas con soluciones equimolares de ambos reactivos en distintas proporciones, manteniendo constante el volumen final. Puede demostrarse así, que el punto máximo corresponde al punto estequiométrico para la formación del complejo de inclusión.

Una vez obtenidos y caracterizados los compuestos **D** y **E**, se determinó la estequiometria de inclusión en D₂O utilizando el Ad-COOH como molécula huésped, ya que estas plataformas contienen 3 y 4 unidades de β CD en su estructura y aprovechando que el Ad-COOH forma CI con estequiometria 1:1 dada su alta afinidad por la cavidad de la β CD. Así, para corroborar que todas las cavidades estuvieran disponibles se utilizó el método de Job de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental.

En la **Gráfica 1** se observan los resultados obtenidos para la plataforma **E**, donde el punto máximo se obtiene a una $r = 0.5$, lo que indica que para este dendrímero las 4 cavidades están disponibles para la formación de complejos de inclusión, es decir, para una carga controlada en la totalidad de las cavidades presentes en la periferia del dendrímero.



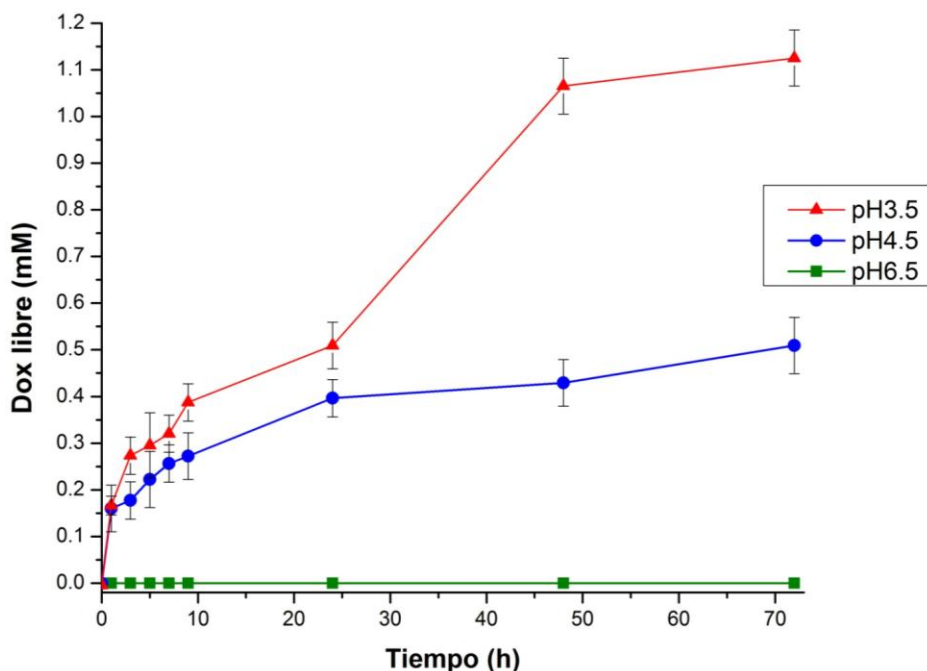
Gráfica 1. Método de Job para el compuesto **E**.

El mismo análisis se llevó a cabo para el compuesto **D**, los resultados se encuentran en la **Gráfica 1** del Anexo 1, en donde se observa un máximo a una $r = 0.5$, lo que también confirma que las 3 cavidades de la plataforma **D** están disponibles para la formación de complejos de inclusión.

6.11 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE HIDRÓLISIS DE LOS PROFÁRMACOS Ad-Dox

Una vez obtenidos los profármacos Ad-Dox, se determinó su cinética de hidrólisis *in vitro* a temperatura corporal (37 °C) y pH fisiológico (pH= 7.4), y a 3 valores de pH distintos, tomando en cuenta la naturaleza del microambiente tumoral que se sabe es ácido (pH= 6.5) y considerando el gradiente de pH al que se expondría el profármaco si es internalizado (pH 4.5 y 3.5). Así se observó que los profármacos Ad-a-Dox y Ad-e-Dox no se hidrolizan a ninguno de los pH analizados, inclusive aumentando la temperatura a 43 °C, lo que en principio afecta el comportamiento biológico de estos derivados, ya que si los profármacos se mantuvieron intactos, en el caso de Ad-e-Dox el anillo de Ad interfiriere con un sitio farmacofórico de la Dox, lo que provoca una pérdida de actividad biológica. El comportamiento de Ad-a-Dox podría explicarse por la estabilidad del enlace amida que bajo las condiciones ensayadas no es susceptible a hidrólisis.

Por otra parte, el profármaco Ad-h-Dox comienza a hidrolizarse a pH= 4.5 y se incrementa la tasa de liberación de Dox a pH= 3.5 (**Gráfica 2**), mientras que permanece intacto a pH fisiológico e inclusive a condiciones que simulan el microambiente tumoral (pH= 6.5). Este comportamiento es ideal, ya que pensando en un administración intravenosa, Ad-h-Dox sería estable durante su transporte en el cuerpo (pH= 7.4) y tampoco liberaría la Dox fuera del tumor por lo que no serían afectadas las células sanas circundantes. Por lo que Ad-h-Dox sólo libera la Dox con el cambio apropiado de pH (dentro de las células cancerosas).



Gráfica 2. Cinética de hidrólisis del profármaco Ad-h-Dox.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se seleccionó a Ad-h-Dox como carga ideal para las plataformas **D** y **E**, ya que el linker hidrazona resultó el más adecuado para la construcción de sistemas de liberación controlada de fármacos.

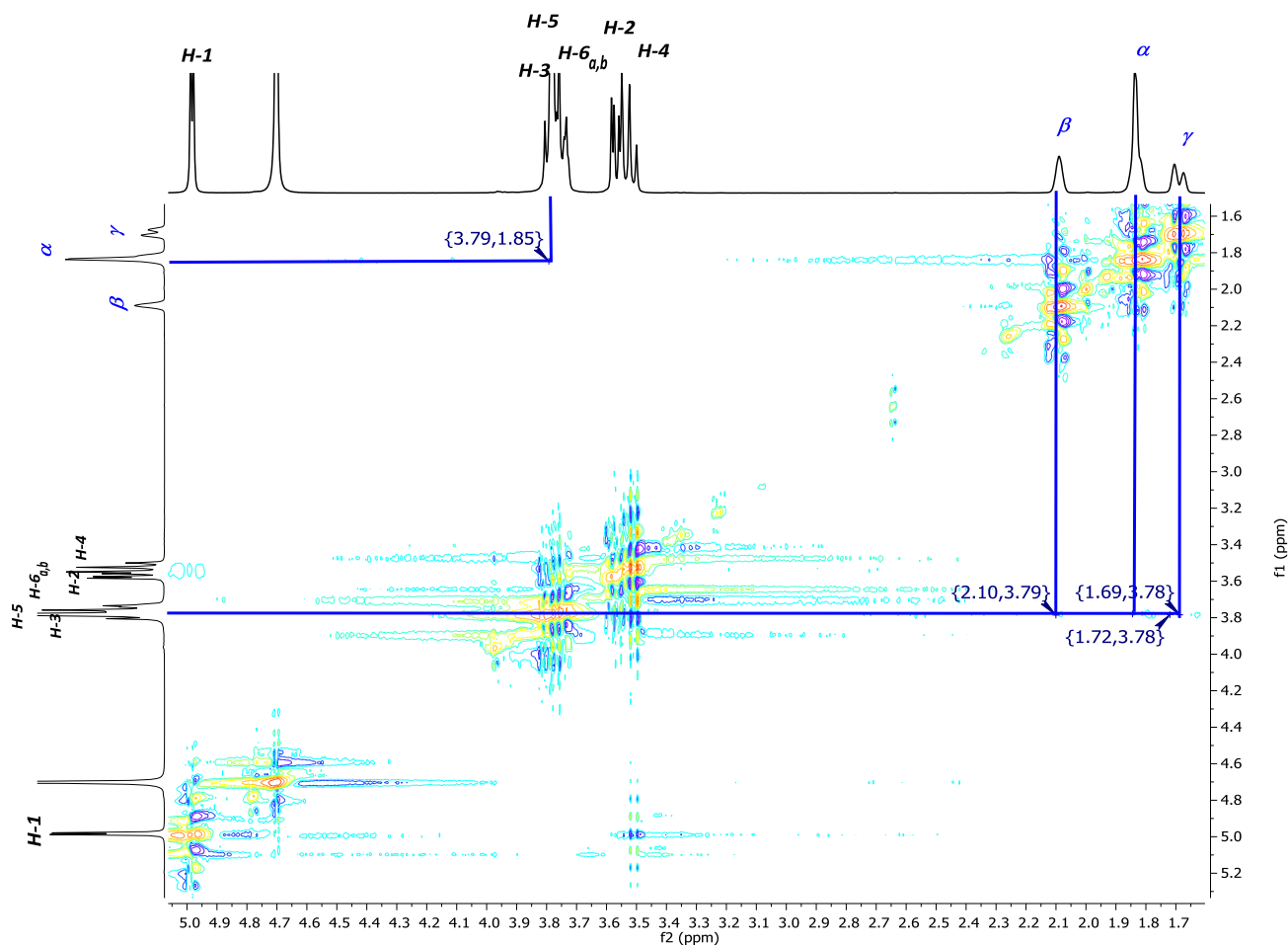
6.12 PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN (CI)

Si el método de preparación de los CI se lleva a cabo por cosolventación, la elección del disolvente orgánico juega un papel relevante, ya que puede afectar las interacciones entre la β CD y el huésped, provocando cambios en la estabilidad del complejo e inclusive si el disolvente compite por la cavidad evita la formación del CI. Se ha reportado que los alcoholes de cadena corta, particularmente el MeOH, a menudo se utiliza como cosolvente para el ensamblaje supramolecular, sin que éste interfiera con la formación del CI. Así, se seleccionó al AdCOOH como huésped, ya que es una molécula con alta afinidad por la cavidad de la β CD, con una constante de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ en medio acuoso, por lo que la formación del CI β CD/AdCOOH es un prototipo relevante como bloque de construcción de acarreadores de fármacos. En base a esto, se comenzó por la preparación del CI β CD/AdCOOH en una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ debido a la limitada solubilidad del huésped en H_2O . Se preparó utilizando estequiometría 1:1 para obtener el sistema estándar y comprobar el fenómeno de complejación con la β CD y una vez estandarizado el método continuar con en el ensamble con las plataformas **A-E**.

6.13 CARACTERIZACIÓN DEL CI β CD/AdCOOH POR RMN 2D ROESY, DSC y TGA.

Para este CI, se realizó la caracterización por RMN 2D, ya que la proximidad espacial entre la molécula anfitriona y la molécula huésped genera un efecto NOE, que puede ser evidenciado por un experimento ROESY y/o NOESY.⁸³ Dada la conformación tridimensional de la β CD, se sabe que los protones H3 y H5 se encuentran dentro de la cavidad y por ello, son los que se rastrean para evidenciar que se llevó a cabo el fenómeno de complejación con la molécula huésped.

En el **Espectro 22**, 2D ROESY se presenta el CI β CD/AdCOOH en D_2O , entre δ_H 3.4 y 5.2 se observan las señales de los protones correspondientes a los anillos de glucopiranososa, a campo alto aparecen las señales de los protones del anillo de AdCOOH; β , α y γ . Destaca la correlación de estas señales con los protones H3 y H5 de la cavidad de β CD, lo que comprueba que se llevó a cabo el fenómeno de complejación.



Espectro 22. RMN 2D ROESY del CI β CD/AdCOOH en D_2O .

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el análisis termogravimétrico (TGA) son técnicas analíticas usadas para la caracterización en estado sólido de sistemas de multicomponentes, incluidos los complejos de inclusión. DSC, es una herramienta analítica relevante, ya que proporciona información detallada acerca de las propiedades físicas y energéticas de los sistemas. TGA, se usa frecuentemente en combinación con DSC, para apoyar los resultados, ya que permite determinar los cambios de la muestra con respecto al cambio en la temperatura. La comparación de las curvas térmicas de los componentes individuales, su mezcla física (MF) y el presunto CI proporciona información de cambios en el perfil energético y de pérdida de peso, respectivamente, indicativo de interacciones entre los componentes y por lo tanto, la formación de un verdadero complejo de inclusión.⁸³

En las **Figuras 15** y **16** se muestra el perfil térmico de la β CD, del AdCOOH, de la MF de β CD/AdCOOH y del CI β CD/AdCOOH, se aprecia que en el perfil térmico de DSC el CI, muestra dos picos endotérmicos, el primero a 81.90 °C que corresponde a la deshidratación y el segundo a 302.95 °C que corresponde a la descomposición del sistema. Respecto al perfil térmico de TGA del CI, se aprecia una pérdida de peso del 10% $T_{10} = 288.80$ °C correspondiente a la deshidratación, y otra pérdida de peso del 95% $T_{95} = 348.29$ °C, la cual corresponde a la descomposición del sistema. Al comparar estos resultados con los perfiles térmicos de DSC y TGA de las entidades individuales y de la MF de β CD/AdCOOH, se observa que los picos endotérmicos de deshidratación y de descomposición de la β CD y de la MF β CD/AdCOOH no aparecen a las mismas temperaturas. También destaca que, en el perfil térmico DSC del CI β CD/AdCOOH desaparece el pico correspondiente al punto de fusión del AdCOOH, el cual sí se puede observar en el DSC de la MF. Esto se considera indicativo de la formación del CI, pues el AdCOOH ha perdido por completo su estructura cristalina debido a las interacciones con la cavidad de la β CD. Respecto a los perfiles térmicos de TGA de la β CD y de la MF β CD/AdCOOH, estos presentan una T_{10} a diferentes temperaturas, en comparación con la T_{10} correspondiente al CI.

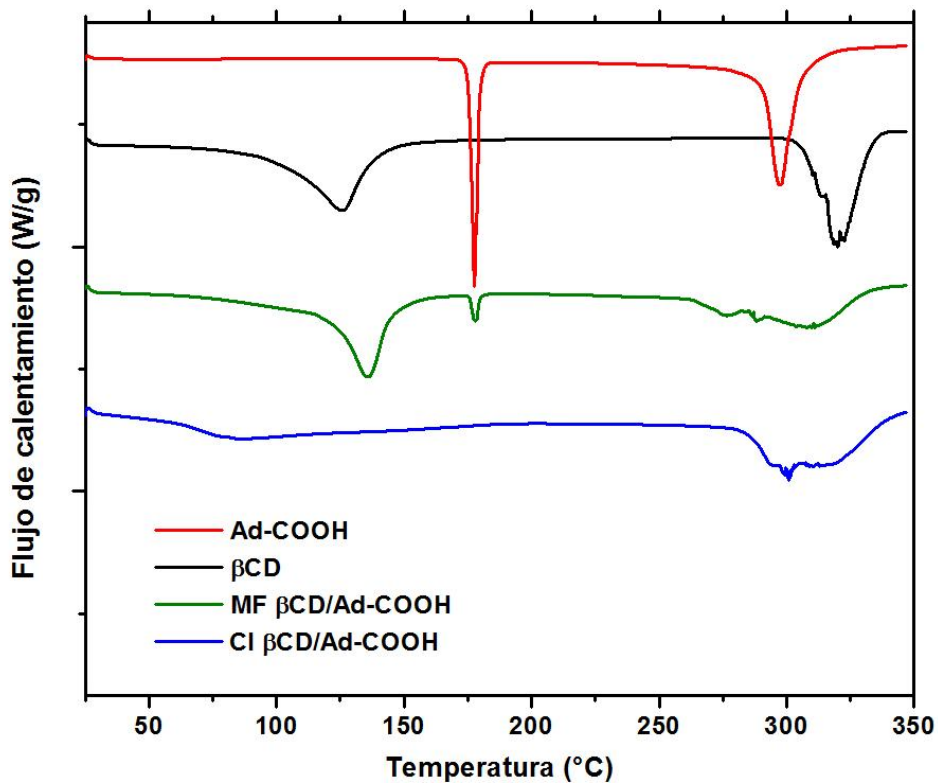


Figura 15. Perfil térmico DSC del CI β CD/AdCOOH

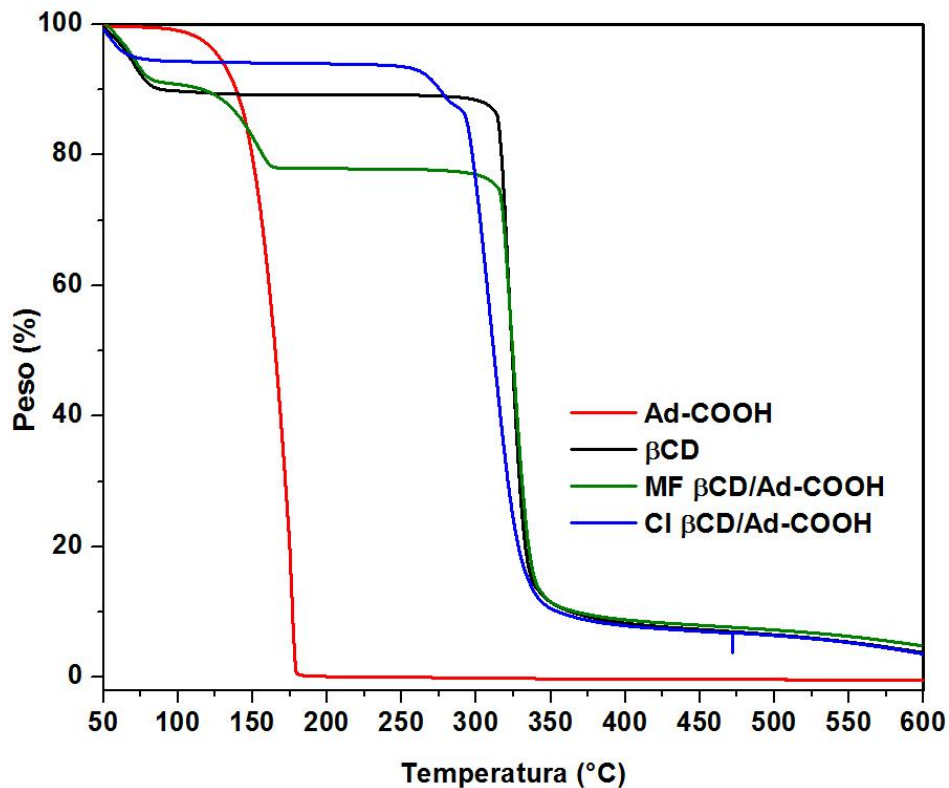


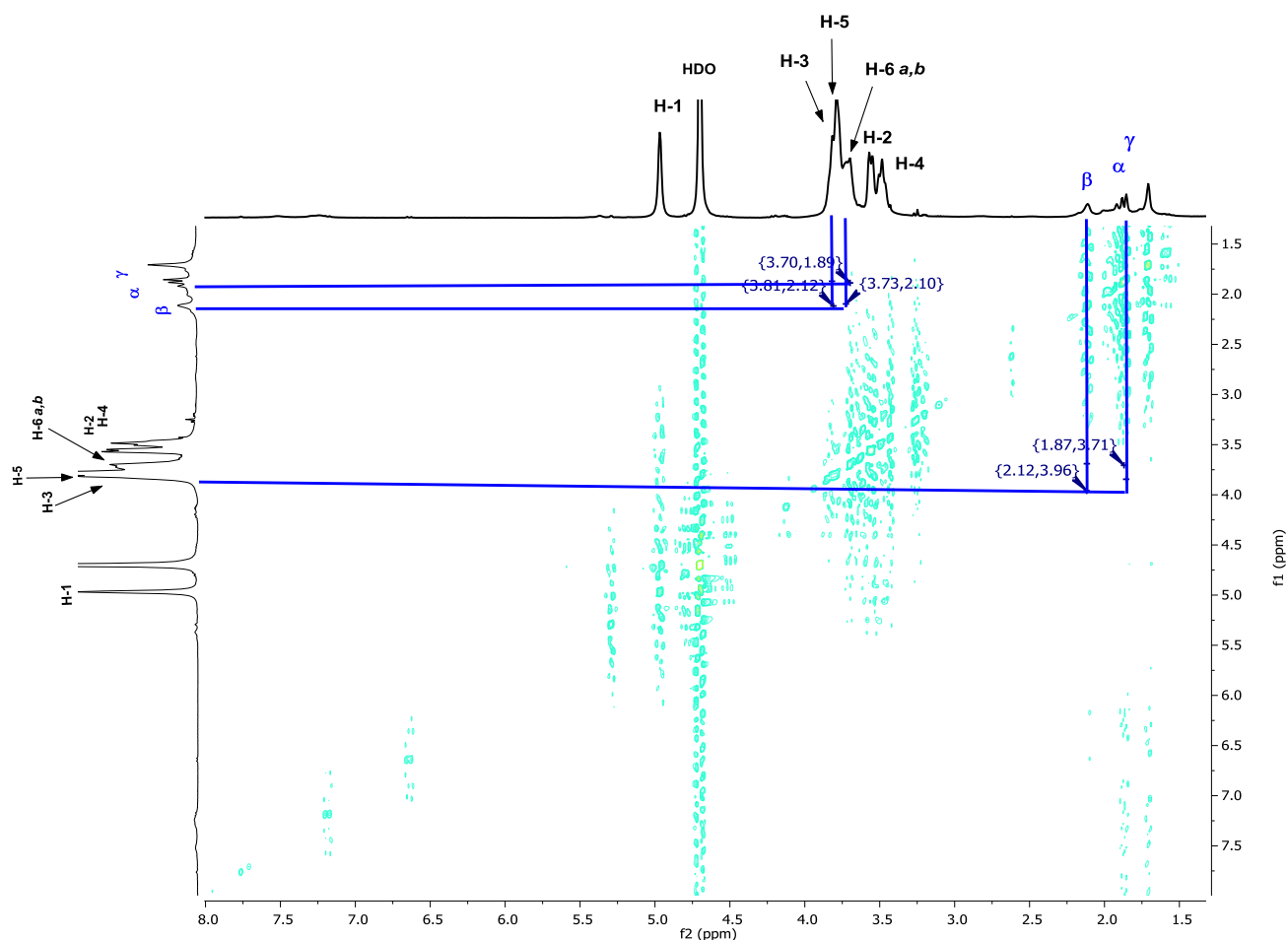
Figura 16. Perfil térmico TGA del CI β CD/AdCOOH

En el TGA de la MF se observa la pérdida de peso que coincide con el punto de fusión del AdCOOH y que en el TGA del CI no se presenta. Si realizamos un análisis comparativo de los perfiles DSC y TGA a la MF β CD/AdCOOH respecto a la entidades individuales, es posible detectar que las temperaturas de deshidratación, descomposición y de fusión no concuerdan puntualmente. Esto se debe a que en estado sólido la mezcla de estos componentes funciona como contaminante uno del otro. Este análisis comprueba que se llevó a cabo la formación del CI β CD/AdCOOH.

6.14 CARACTERIZACIÓN DE LOS CI A-E/AdCOOH Y D-E/Ad-h-Dox POR RMN 2D ROESY, DSC y TGA.

Una vez estudiado el CI β CD/AdCOOH como ensamblado modelo para la comprobación de la formación de los correspondientes CI, se procedió al análisis RMN 2D ROESY y perfiles térmicos DSC y TGA de los CI con las nuevas plataformas, a continuación se describe el CI β CD/Ad-h-Dox y la caracterización con el resto de las plataformas se encuentra en el Anexo 1.

En el **Espectro 23** ROESY se presenta el CI β CD/Ad-h-Dox en D₂O, entre δ H 1.5 y 2 aparecen las señales de los protones del anillo de Ad; β , α y γ . Se observan las interacciones con las señales de los protones H3 y H5 de la cavidad de la β CD, además se observa que los protones γ también correlacionan con los metilenos H6a,b de la cara primaria de la β CD. Estas interacciones explican la alta solubilidad de este sistema en medio acuoso, lo que también comprueba que se llevó a cabo el fenómeno de complejación



Espectro 23. RMN 2D ROESY del CI β CD/Ad-h-Dox en D_2O

En la **Figura 17** se muestra la curva DSC de la β CD, Ad-h-Dox, la MF y su CI β CD/Ad-h-Dox. La curva de la β CD muestra los picos endotérmicos a 125.5 °C y 319.8 °C, que corresponden a la pérdida de agua y al punto de fusión, respectivamente. En la curva DSC del profármaco Ad-h-Dox, la pérdida de agua ocurre a 88.6 °C y punto de fusión a 232.5 °C. La curva DSC de la MF β CD/Ad-h-Dox muestra un ligero cambio en la aparición de ambas señales correspondientes a Ad-h-Dox a 210 °C y β CD a 129.8 °C. En el CI β CD/Ad-h-Dox, la señal de la curva correspondiente a la deshidratación disminuye considerablemente, lo que demuestra que las moléculas de agua de la cavidad del β CD se reemplazaron completamente por la inclusión del Ad-h-Dox ($T = 77.6$ °C); la descomposición del CI ocurre a $T = 223$ °C y no coincide con ninguna temperatura de descomposición de las entidades individuales. Estos resultados respaldados por las interacciones encontradas en el espectro ROESY (**Espectro 23**) demuestran la formación del CI β CD/Ad-h-Dox.

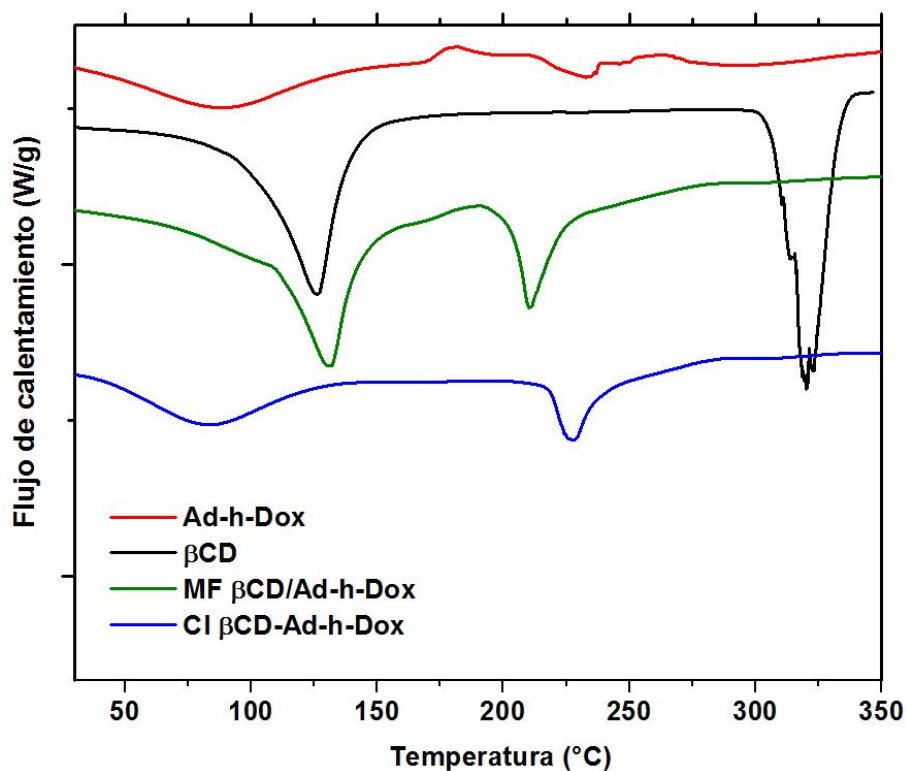


Figura 17. Perfil térmico DSC del CI β CD/Ad-h-Dox.

La descomposición molecular del CI β CD/Ad-h-Dox usando TGA se muestra en la **Figura 18**. En las curvas TGA para β CD, Ad-h-Dox, MF y CI β CD/Ad-h-Dox resalta el cambio de temperatura en el que el CI muestra una pérdida del 10% en peso (T_{10}), siendo ligeramente más alta que en las entidades individuales, lo que confirma la pérdida de las moléculas de agua presentes en la cavidad de la β CD. Si se compara la curva de la β CD con el CI β CD/Ad-h-Dox, el termograma muestra que a $T = 313.56$ °C, se observa que la β CD pierde solo el 15 % en peso, mientras que el CI β CD/Ad-h-Dox pierde el 47 %, lo que sugiere que es térmicamente menos estable. Este fenómeno se puede explicar por un cambio en las interacciones supramoleculares que posee la β CD, las cuales se modifican completamente cuando se forma el CI. Sin embargo, el rango de temperatura en el que el CI mantiene su estabilidad es adecuado para aplicaciones biológicas.

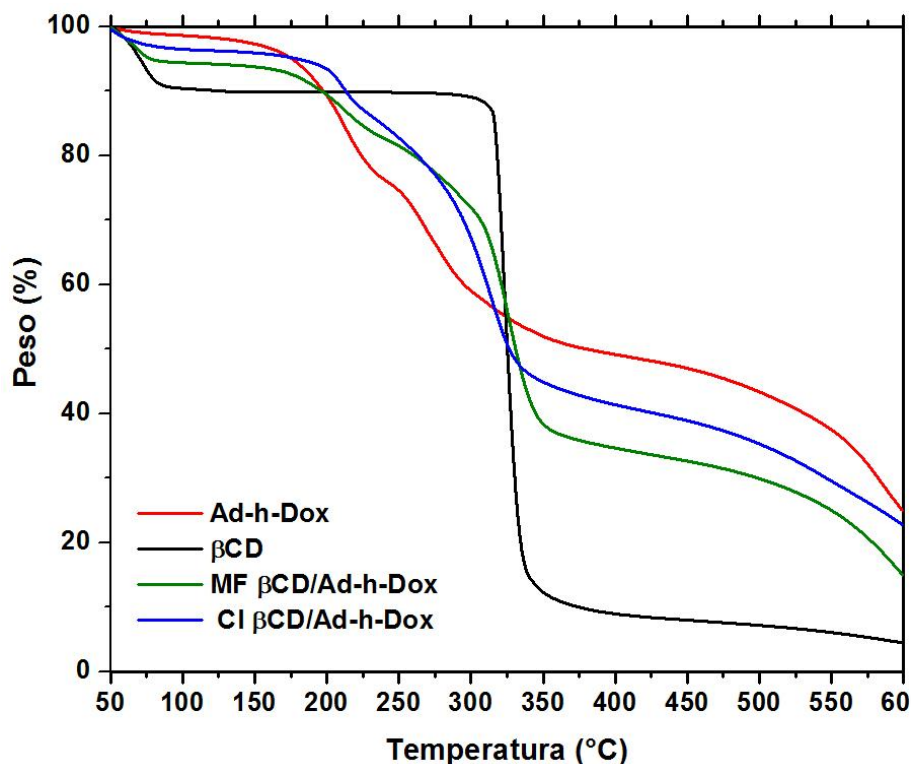


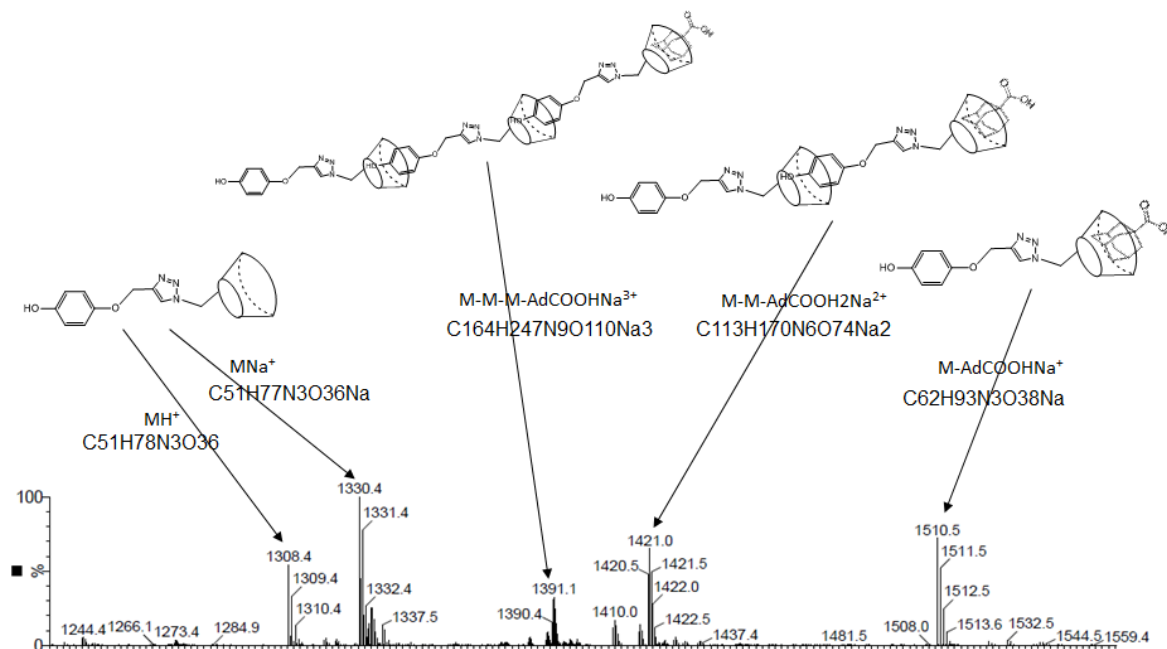
Figura 18. Perfil térmico TGA del CI βCD/Ad-h-Dox

6.15 ANÁLISIS DEL CI A/AdCOOH POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS ESI.

Una caracterización poco común para comprobar la formación de CI es la que se lleva a cabo por EM. Decidimos utilizar esta técnica para complementar la caracterización de los ensamblados, primeramente se probó la técnica de MALDI, sin embargo, sólo se detectó la plataforma. Estos resultados pueden explicarse por las severas condiciones a las que se somete la muestra que provocan que sólo se detecte el ión correspondiente a la plataforma sin su ensamblado supramolecular. Entonces, se cambió el MALDI por la técnica de ESI, que como se mencionó anteriormente, permite detectar masas moleculares elevadas, gracias a los valores de m/z de especies multicargadas.

A través de EM-ESI, se lograron obtener resultados favorables para los CI A/AdCOOH (**Espectro 24**) y B/AdCOOH (**Espectro 102** en Anexo 1) en mezcla MeOH/H₂O. Para el CI A/AdCOOH, el pico correspondiente a la plataforma aparece en $m/z = 1308.4$ (MH^+), junto con su aducto de sodio en $m/z = 1330.4$ ($M+Na^+$). El espectro de masas también muestra la señal del complejo de inclusión en $m/z = 1510.5$ ($M+AdCOOH+Na^+$), junto con dos señales correspondientes a especies múlticargadas que resultan de la formación de CIs con peso

molecular más alto y que corresponden a la formación de CI entre 2 y 3 moléculas de A en cascada. Para el CI B/AdCOOH, se observan los mismos tipos de especies (**Espectro 102** en Anexo 1). Así se comprobó que las plataformas **A** y **B** siempre hospedan una molécula de AdCOOH.



Espectro 24. ESI-TOF del CI A/AdCOOH, en un intervalo m/z: 1240-1560.

Respecto a los CI con las plataformas **D** y **E** no fue posible caracterizarlos mediante espectrometría de masas, debido a la falta de sensibilidad en los experimentos ESI.

6.16 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS) DE LAS PLATAFORMAS D-E Y SUS RESPECTIVOS CI CON Ad-h-Dox.

Con el objetivo de determinar el promedio del diámetro hidrodinámico del trímero **D** y del dendrímero **E** previo a la formación de los correspondientes CI, se realizó el análisis de los mismos por DLS en agua. Se encontró que el promedio del tamaño de partícula del compuesto **D** es 156.8 ± 66.75 nm (**Figura 19**). Este tamaño se puede explicar por la cercanía que tienen las 3 ciclodextrinas dada la trisustitución del núcleo o core, lo que pudiera propiciar la formación de aglomerados entre ciclodextrinas.

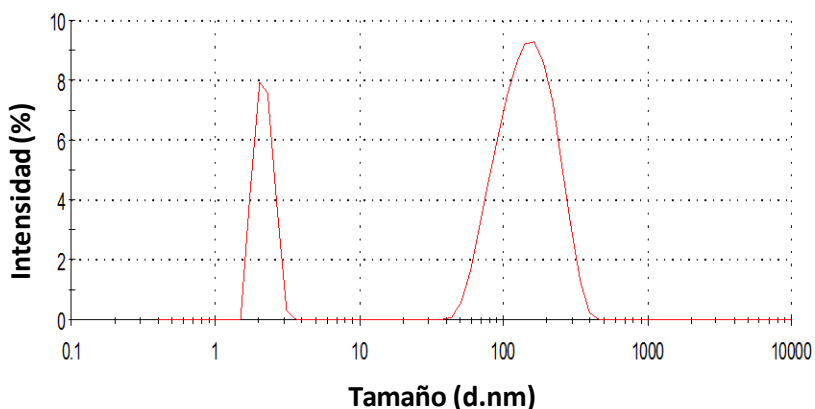


Figura 19. Tamaño de partícula para el compuesto **D** obtenido por DLS

Para el dendrímero **E** el promedio del tamaño de partícula es de 3.94 ± 1.14 nm (**Figura 20**). Este tamaño coincide con los reportes previos, ya que está descrito que las generaciones 1-3 de los dendrímeros PAMAM tiene un tamaño en un intervalo de 2-7 nm. Así una vez modificada la periferia del dendrímero con β CD, el tamaño nanométrico viene conferido por el core de PAMAM G0.

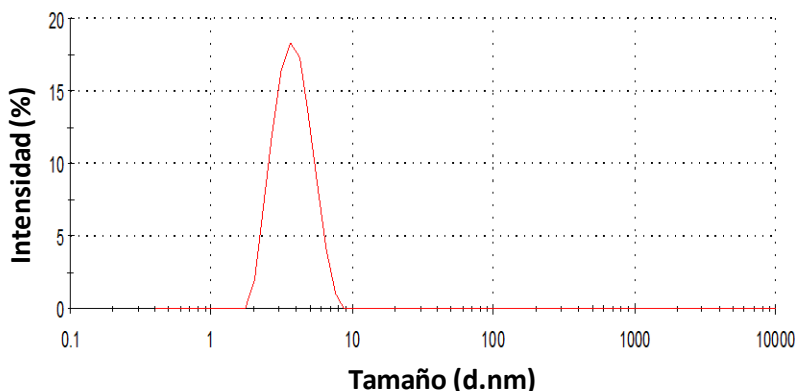


Figura 20. Tamaño de partícula para el compuesto **E** obtenido por DLS

También se determinó el tamaño de partícula para los correspondientes CIs, respecto al CI **D**/Ad-h-Dox, el promedio del diámetro encontrado es de 306.5 ± 96.5 nm (**Figura 21**) y para el CI **E**/Ad-h-Dox el tamaño de partícula es de 165.5 ± 97.94 nm (**Figura 22**). Este cambio en el tamaño de partícula se debe al ensamblaje con 3 y 4 moléculas del profármaco Ad-h-Dox respectivamente, ya que ambas plataformas tienen todas las cavidades de la β CD disponibles. Otro fenómeno que puede explicar este aumento en el tamaño de partícula para los CIs, es la posible formación de aglomerados favorecidos por interacciones débiles entre

los anillos de antraciclina de la Dox, que por la cercanía entre las ciclodextrinas favorecerían la interacción entre los anillos aromáticos.

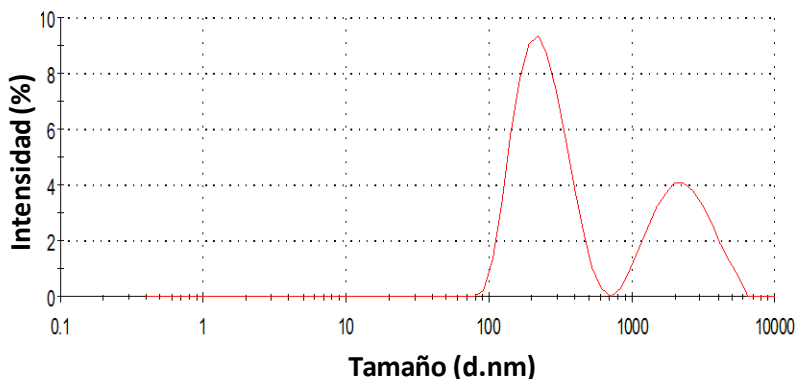


Figura 21. Tamaño de partícula para el CI D/Ad-h-Dox obtenido por DLS

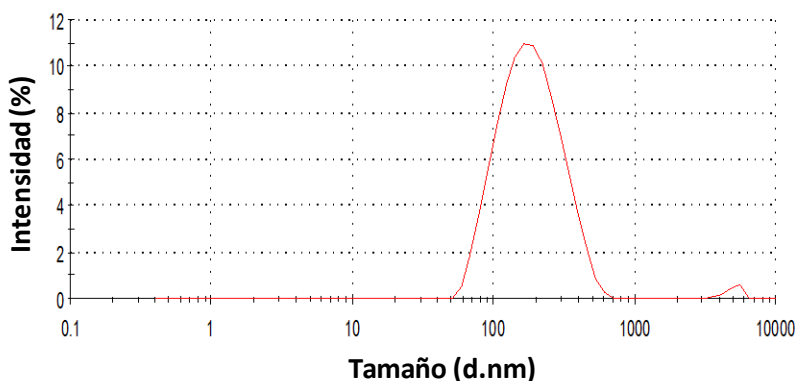
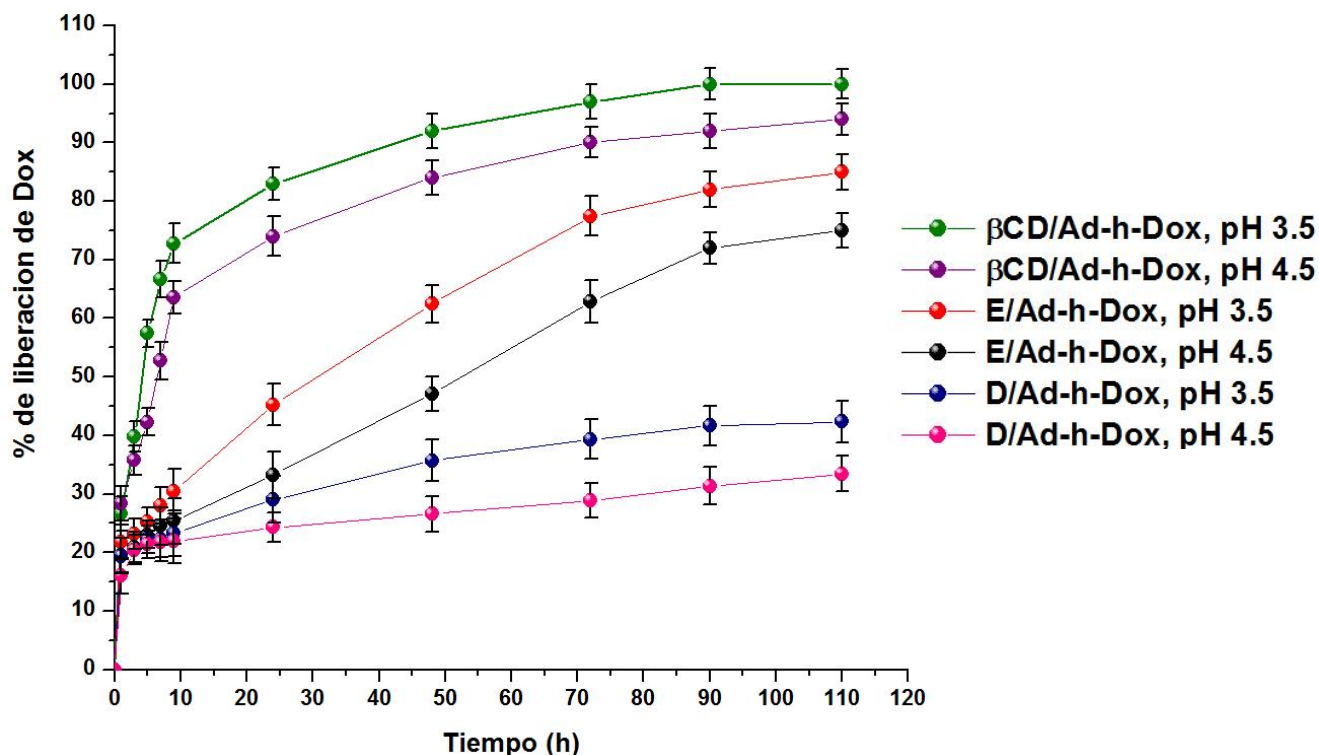


Figura 22. Tamaño de partícula para el CI E/Ad-h-Dox obtenido por DLS

6.17 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE LOS CI β CD/Ad-h-Dox, D/Ad-h-Dox y E/Ad-h-Dox.

Una vez conocida la cinética de hidrólisis del profármaco Ad-h-Dox, se comenzó por corroborar que el perfil que mostró el profármaco sólo no se modificara una vez formado el ensamblado supramolecular con la β CD, por lo que se probó nuevamente su liberación a 37 °C y valores de pH 7.4 y 6.5. Sin embargo, bajo estas condiciones el CI tampoco libera el fármaco, lo que corrobora que tanto el profármaco sólo como el CI sólo liberarán la carga terapéutica a valores de pH que sólo se presentan de manera intracelular en las células cancerígenas.

En la **Gráfica 3**, se muestra la cinética de liberación del CI β CD/Ad-h-Dox, a pH 3.5 y 4.5, se observa que el CI libera la mayor parte del fármaco durante las primeras 12h, alcanzando un 82 % y 73 % respectivamente de liberación de fármaco en un periodo de 24 h, después el 100% de liberación se alcanza a las 90h a pH 3.5, siendo más eficiente la liberación en estas condiciones ácidas.



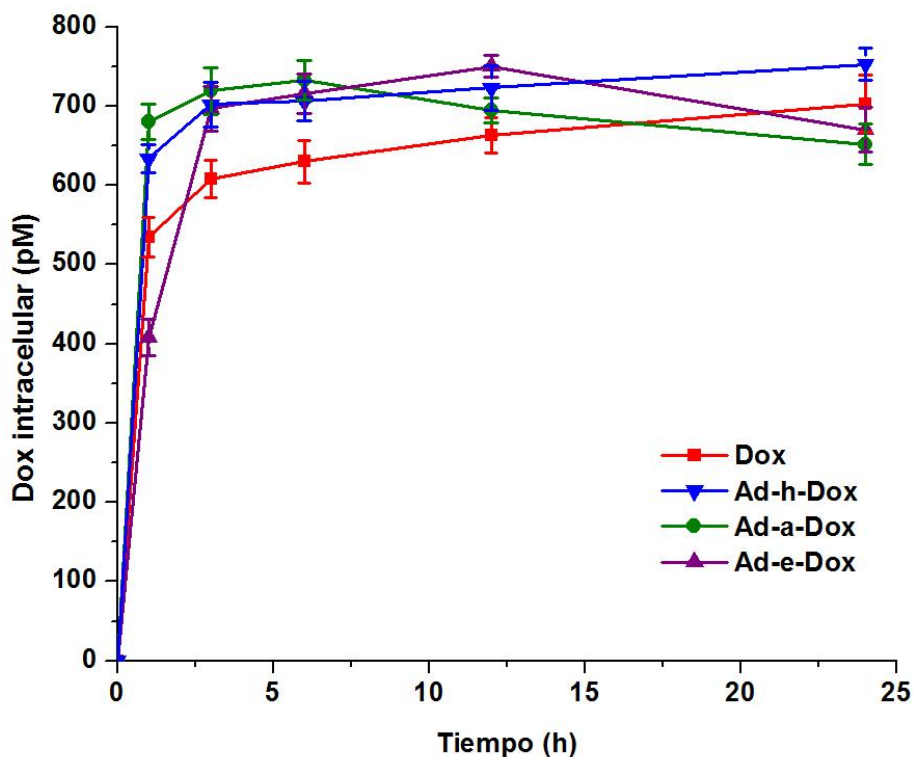
Gráfica 3. Cinética de liberación de los CIs β CD/Ad-h-Dox, D/Ad-h-Dox y E/Ad-h-Dox.

Respecto al CI E/Ad-h-Dox se observa un comportamiento interesante ya que durante las primeras 24 h a pH 3.5 este ensamblado ha liberado sólo un 45 % y un 33 % del total de la carga terapéutica a pH 4.5. Respecto al CI D/Ad-h-Dox se observa un 29 % de liberación a pH 3.5 y se observa un 25 % del fármaco libre a pH 4.5 a 24h. Este comportamiento brinda grandes ventajas pensando en futuras aplicaciones clínicas ya que no hay una liberación ráfaga que se sabe es responsable de la toxicidad de la Dox y además cabe destacar que la liberación llega a un 80 % para el dendrímero E a las 110 h, lo que también demuestra una liberación prolongada, otra gran ventaja, ya que sólo se necesitaría una sola dosis del CI E/Ad-h-Dox en al menos una semana.

6.18 ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

6.18.1 Captación celular y actividad citotóxica de los profármacos Ad-Dox

Cuando se modifica la estructura del fármaco original, un diseño racional debe corroborar si la actividad biológica se mantiene. Primeramente, se determinó cuantitativamente la captación celular a 24 h de exposición de los tres profármacos Ad-Dox comparados con la Dox libre en células MDA-MB-231(triple negativo). En la **Gráfica 4** se observa que durante las primeras 6 horas los compuestos Ad-Dox aumentan la concentración intracelular de Dox en al menos un 15 %, comparados con el fármaco sin modificar. Sin embargo, después de 12 horas, este comportamiento se revierte para las moléculas Ad-a-Dox y Ad-e-Dox, visto que muestran una concentración equivalente a la Dox libre. Por su parte, Ad-h-Dox mantiene el comportamiento inicial, ya que muestra una concentración intracelular comparable a la Dox libre al final del tiempo de estudio. Así, corroboramos que la adición del anillo de Ad con un enlace hidrazona no interfiere en la captación celular. Por otro lado, los profármacos Ad-a-Dox y Ad-e-Dox, muestran una concentración intracelular 17 % menor a la Dox al final del tiempo de estudio.



Gráfica 4. Captación celular de Dox en línea celular MDA-MB 231.

Una vez determinada la captación de los tres profármacos Ad-Dox y en el entendido de que la captación de una molécula no necesariamente incrementa su actividad biológica, decidimos evaluar la actividad citotóxica *in vitro* a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h) mediante el ensayo MTT. En la **Tabla 5** se observa que a las 24 h de exposición en la línea celular MCF-7 (positivo a receptores de estrógeno y progesterona) tanto Ad-a-Dox como Ad-h-Dox tienen la mitad de la potencia que el fármaco libre, mientras que en la línea celular MDA-MB-231 la CI_{50} es comparable con la Dox. A las 48 h de exposición, comienza a incrementarse la citotoxicidad tanto de Ad-a-Dox como de Ad-h-Dox, siendo esta última la que más se acerca a los valores de CI_{50} de la Dox en la línea celular más agresiva (MDA-MB-231). Finalmente, a las 72 h, Ad-h-Dox muestra el mejor comportamiento *in vitro* en ambas líneas celulares, ya que el linker hidrazona tiene una estabilidad lo suficientemente larga como para permitir un suministro constante de fármaco, lo que es ideal en un escenario de liberación controlada.

Tabla 5. Valores de CI_{50} (μM) de los profármacos Ad-Dox^a

Compuesto	Ad-a-Dox		Ad-h-Dox		Dox	
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
Tiempo (h)						
24	18.36 ± 0.46	10.76 ± 0.83	17.94 ± 0.60	14.21 ± 0.60	7.23 ± 0.63	9.23 ± 0.58
48	9.80 ± 0.45	7.07 ± 0.46	8.32 ± 0.32	4.61 ± 0.39	5.43 ± 0.68	3.38 ± 0.98
72	7.29 ± 0.56	3.78 ± 0.37	5.18 ± 0.52	2.66 ± 0.52	2.84 ± 0.54	1.87 ± 0.78

^a CI_{50} = Concentración necesaria para inhibir el 50% de crecimiento celular, Los datos representan el promedio ± SD (n = 3)

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que el profármaco Ad-a-Dox presenta menor potencia en ambas líneas celulares. Esto se puede explicar por la alta estabilidad del enlace amida que evita la liberación del fármaco. Es importante resaltar que el profármaco Ad-e-Dox fue prácticamente inactivo, ya que no mostró citotoxicidad a las concentraciones utilizadas a todos los tiempos analizados

Otro de los objetivos clave de este trabajo fue corroborar la toxicidad de los profármacos Ad-Dox en células no carcinógenas, por lo que determinamos la CI_{50} en la línea celular MCF-10A (línea celular no carcinogénica de mama, **Tabla 6**), conservando los mismos tiempos de evaluación que en las células cancerígenas.

Tabla 6. Valores de CI_{50} (μM) en línea celular MCF-10A de los profármacos Ad-Dox^a

Compuesto Tiempo (h)	Ad-e-Dox	Ad-a-Dox	Ad-h-Dox	Dox
24	SA	20.95 \pm 0.46	39.38 \pm 0.60	12.82 \pm 0.63
48	SA	14.85 \pm 0.95	31.25 \pm 0.69	8.19 \pm 0.68
72	65.69	5.93 \pm 0.47	14.18 \pm 0.52	4.12 \pm 0.54

^aLos datos representan el promedio \pm SD (n = 3), SA: Sin Actividad

Los valores muestran un comportamiento importante, ya que el profármaco Ad-h-Dox resulta ser al menos 3 veces menos citotóxico que la Dox libre a todos los tiempos analizados, seguido de Ad-a-Dox (1.5 veces menos tóxico). Estos resultados refuerzan la importancia de la correcta elección del enlazador pH sensible. Así, cuando el anillo de Ad se une a la Dox por medio de un linker hidrazona que controla la liberación del fármaco, también disminuyen los efectos tóxicos en células sanas. Respecto al compuesto Ad-e-Dox mantuvo el mismo comportamiento que en las células cancerígenas analizadas, sin presentar actividad biológica.

Continuando con el estudio de cada parte de los sistemas propuestos, se comenzó por corroborar que las plataformas no fueran tóxicas en las líneas celulares antes mencionadas y que la actividad biológica que presentaran sólo fuera atribuible a la carga terapéutica. Así, se analizaron los profármacos Ad-Dox, las plataformas **A-E** y los correspondientes $CI_{\beta CD}$ /Ad-h-Dox, **D**/Ad-h-Dox y **E**/Ad-h-Dox en un ensayo independiente a 48 h de exposición *in vitro*, los resultados de CI_{50} se presentan en la **Tabla 7**:

Tabla 7. Valores de CI_{50} (μM) a 48 h de tratamiento de las plataformas **A-E**, de los profármacos Ad-Dox y de los correspondientes CI^a

Compuestos	MCF-7	MDMA-MB-231
A	SA	SA
B	SA	SA
C	SA	SA
D	SA	SA
E	SA	SA
Ad-h-Dox	8.32 ± 0.32	4.61 ± 0.39
$\beta CD/Ad-h-Dox$	9.33 ± 0.28	8.17 ± 0.46
D/Ad-h-Dox	7.06 ± 0.48	11.03 ± 0.70
E/Ad-h-Dox	4.44 ± 0.54	5.59 ± 0.54
Dox	4.17 ± 0.68	1.87 ± 0.78

^aLos datos representan el promedio \pm SD (n = 3), SA: Sin Actividad

Los resultados de actividad citotóxica primeramente demuestran una parte clave en el diseño de las nuevas plataformas supramoleculares, que las mismas no presentan actividad biológica, por otra parte y bajo las mismas condiciones experimentales, el profármaco Ad-h-Dox presenta actividad citotóxica comparable con la Dox libre. Respecto al comportamiento de los ensamblados con carga terapéutica, el CI $\beta CD/Ad-h-Dox$ mantiene la actividad biológica respecto al profármaco solo, mientras que cuando se compara contra el trímero **D/Ad-h-Dox** puede observarse un cambio poco significativo al tiempo evaluado. Respecto al dendrímero **E/Ad-h-Dox** el valor de CI_{50} es similar al fármaco sólo, es importante correlacionar la actividad citotóxica con la tasa de liberación del fármaco, ya que la determinación de la CI_{50} en todas las líneas celulares probadas se realizó a 48h de exposición. A este tiempo el CI con el dendrímero **E** sólo ha liberado un 60% de la carga total al valor de pH más ácido y un 45 % a pH 4.5, lo que demuestra la eficacia del ensamblado, ya que alcanza una valor de CI_{50} igual que el fármaco libre. Estos resultados demuestran el éxito del diseño de las nuevas plataformas de liberación de fármacos.

Como parte del estudio racional de las plataformas **D** y **E** con carga terapéutica, se decidió probar su toxicidad en líneas celulares no carcinogénicas distintas (línea VERO: células epiteliales de riñón de mono, LLC-PK1: células epiteliales de riñón de cerdo y NRK: células epiteliales de riñón de rata) con el fin de comprobar la eficacia de los ensamblados supramoleculares. En la **Tabla 8** se muestran los valores CI_{50} comparados con las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231:

Tabla 8. Comparación de CI_{50} (μM) a 48 h de tratamiento de las plataformas cargadas en líneas no carcinogénicas^a

Compuesto	MCF-7	MDMA-MB-231	VERO	LLCPK	NRK
$\beta\text{CD}/\text{Ad-h-Dox}$	9.33 ± 0.28	8.17 ± 0.46	24.77 ± 0.76	10.91 ± 0.53	10.70 ± 0.63
D/Ad-h-Dox	8.06 ± 0.48	11.03 ± 0.70	24.65 ± 0.59	5.37 ± 0.99	8.02 ± 0.30
E/Ad-h-Dox	4.44 ± 0.54	5.59 ± 0.54	27.11 ± 0.42	5.48 ± 0.81	6.55 ± 0.42
Dox	4.17 ± 0.68	1.87 ± 0.78	18.57 ± 0.78	4.10 ± 0.98	3.41 ± 0.29

^aLos datos representan el promedio \pm SD (n = 3).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que el ensamblado **E/Ad-h-Dox** en las líneas VERO y NRK presenta un 60 % menos de toxicidad comparada con la Dox libre, siendo su actividad comparable en la línea LLCPK. Estos resultados sugieren que las plataformas **D** y **E** son menos tóxicas que el fármaco libre en un porcentaje adecuado para futuras aplicaciones clínicas.

7. CONCLUSIONES

Se optimizó la síntesis de dos profármacos entre la doxorubicina y el adamantano: Ad-a-Dox (con enlace amida) y Ad-h-Dox (con enlace hidrazona), así mismo se sintetizó el profármaco con enlace éster (Ad-e-Dox). Todos los profármacos se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. El profármaco Ad-h-Dox mostró la mejor cinética de hidrólisis *in vitro* a pH ácido, demostrando que su activación sólo pudiera suceder intracelularmente en células carcinogénicas. Se determinó la actividad citotóxica de los tres profármacos sobre dos líneas celulares tumorales y una no carcinogénica de mama, corroborando que el profármaco Ad-h-Dox muestra una actividad citotóxica similar a la Dox libre en células tumorales mientras que es 3 veces menos tóxico en la línea celular sana.

Se sintetizaron mediante química “click” 5 nuevas plataformas supramoleculares con β CD, incluyendo la modificación de la superficie del dendrimero PAMAM-G0 con 4 unidades de β CD, en la mayoría de los casos estas plataformas mostraron mejor solubilidad en agua que la β CD nativa. Mediante la caracterización por espectrometría de masas y el método de Job se demostró que todas las cavidades de las moléculas de β CD presentes en las plataformas están disponibles para formar CI. Estas novedosas plataformas no son tóxicas tanto en líneas celulares carcinogénicas como no carcinogénicas, lo que demuestra su gran potencial para aplicaciones en el acarreo de fármacos.

Se ensamblaron y caracterizaron los CI entre las plataformas **D** y **E** con el profármaco Ad-h-Dox. La cinética de liberación para ambas plataformas mostró que se comportan como sistemas de liberación prolongada, liberando el fármaco sólo a pH < 6.5, por lo que ésta liberación podría ocurrir sólo dentro de las células cancerígenas. El CI **E**/Ad-h-Dox tiene actividad citotóxica comparable con la Dox libre a 48 h de exposición en células de carcinogénicas de mama, sin embargo, la plataforma **E** a ese tiempo sólo ha liberado la mitad de la carga terapéutica, lo que demuestra la eficiencia en la liberación controlada de Dox. Además, la evaluación en células sanas VERO y NRK, mostró que esta plataforma es 60% menos tóxica que la Dox libre, lo que demuestra la eficacia del diseño de las nuevas plataformas de liberación controlada de fármacos.



Perspectivas:

Realizar estudios computacionales de las moléculas estudiadas, particularmente:

- Modelado molecular de la conformación de los profármacos Ad-Dox.
- Modelado molecular de las plataformas con β CD y del dendrímero E.
- Construcción del dendrímero PAMAM G-1 con 8 unidades de β CD.



8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 REACTIVOS Y EQUIPO.

Las materias primas utilizadas en la obtención de todos los intermediarios, así como de los compuestos finales, se adquirieron comercialmente en grado reactivo. Las reacciones se monitorearon mediante TLC analítica en placas de gel de sílice 60 F254 pre-recubiertas (Aldrich) y la detección se realizó bajo luz UV. Las purificaciones por cromatografía en columna se realizaron sobre sílica gel 60-200 μm VWR CHEMICALS. La cromatografía de exclusión molecular (SEC) se realizó empleando medio acuoso como eluyente en resinas: Bio-Gel P-6 medium del laboratorio BIO-RAD y Sephadex G-15 (Aldrich). Los puntos de fusión se determinaron mediante un aparato Fischer-Johns y no están corregidos.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de protón (^1H), carbono (^{13}C) y bidimensionales (2D); espectroscopia de efecto nuclear Overhauser (NOESY) y espectroscopia de efecto rotacional Overhauser (ROESY), de los intermediarios y los productos finales se obtuvieron en solución de dimetilsulfóxido ($\text{DMSO-}d_6$), cloroformo deuterado (CDCl_3) y óxido de deuterio (D_2O) en un equipo Bruker Avance 400 UltrashieldTM, en el laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM. Los desplazamientos químicos están reportados en ppm (δ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se expresa como: s = señal simple; sa = señal amplia; c = señal cuádruple; d = señal doble; dd = señal doble de doble; t = señal triple; m = señal múltiple.

Los espectros de infrarrojo (IR), fueron determinados en un equipo Nicolet FT5SX. Las unidades se reportan en cm^{-1} .

Así mismo, los espectros de masas de Electrospray (ESI) se adquirieron en un equipo Mass Spectrometry Core Facility; DCI- CH_4 , los experimentos de alta resolución (HR) se adquirieron con una GCT Premier spectrometer (Waters), los experimentos DCI- NH_3 se tomaron en un equipo DSQ II spectrometer (ThermoFisher Scientific). Los espectros de Ionización por desorción con láser asistida por una matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) fueron obtenidos en un equipo Bruker Daltonics flexAnalysis. Se utilizó como matriz ácido

2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y fueron procesados en el Laboratorio de Espectrometría de Masas del Instituto de Química, UNAM y en el Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse, Francia.

Los espectros de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y de Análisis Termogravimétrico (TGA) se registraron en un equipo universal V4.5A TA Instruments USA. Se colocaron 5 ± 0.05 mg de cada muestra en recipientes de aluminio prensados. La velocidad de calentamiento fue de $10^\circ\text{C} / \text{min}$, en el intervalo de 20°C a 400°C y de 20°C a 600°C , para DSC y TGA, respectivamente, bajo atmósfera inerte.

8.2 SÍNTESIS Y DESCRIPCIÓN.

La síntesis de los profármacos Ad-Dox se llevó a cabo de acuerdo al **Esquema 1**.

8.2.1 Síntesis del profármaco doxorubicina-adamantano con un enlace hidrazona(Ad-h-Dox)

8.2.1.1 Síntesis de la hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico (Ad-NH-NH₂).

La hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico se sintetizó de acuerdo al siguiente procedimiento; 0.2 g del ácido adamantan-1-carboxílico (1.109 mmol) y 0.228 g de DCC (1.109 mmol) se disolvieron en 5 mL de CH₂Cl₂ anhidro. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h en atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se suspendieron 0.0203 g de DMAP (0.166 mmol) y 89 μL de metanol anhidro (2.21 mmol) en 1 mL de CH₂Cl₂ anhidro, la mezcla DMAP/MeOH se añadió lentamente a la mezcla Ad-COOH/DCC y se agitó a temperatura ambiente durante 12 h en atmósfera de N₂. Transcurrido este tiempo, el subproducto *N,N'*-diciclohexilurea se eliminó por filtración. El crudo de la reacción se disolvió en 5 mL de CH₂Cl₂ y se lavó con una solución de HCl 3N. La fase orgánica se separó y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, posteriormente el producto se concentró a presión reducida y finalmente se secó al vacío durante 24 h para obtener 0.173 g del 1-metoxicarbonil adamantano (0.9 mmol) con un rendimiento de 81% y un punto de fusión de $35\text{-}36^\circ\text{C}$.

¹H RMN (400 MHz) (CDCl₃, δ): 3.58 (s, 3H)-OCH₃, 1.94 (s, 3H) β , 1.82 (s, 6H) α , 1.64 (s, 6H) γ . ¹³C RMN-DEPTQ (101 MHz, CDCl₃; δ , ppm): 177 COO, 51.5 CH₃, 40.43 CCOO, 38.86 C α , 36.5 C γ , 27.9 C β . FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3433, 3298, 3005, 2928, 2850, 2660(C-H), 1728, 1626 (C=O), 1322 (C-O-C). ESI (m/z): 195 [M]⁺

Posteriormente, 0.158 g del 1-metoxicarbonil adamantano previamente sintetizado (0.813 mmol) se disolvieron en 3 mL de etanol, se agregaron 15 mL de $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (50-60%) y 5 μL de TEA como catalizador. La mezcla de reacción se mantuvo a 85°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo el disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió en 5 mL de CH_2Cl_2 y luego se lavó tres veces con agua. Las fases orgánicas se recolectaron y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, finalmente se concentraron y se filtraron para obtener 0.140 g de la hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico (0.7 mmol) con un rendimiento de 90%. y un punto de fusión: $148\text{-}150^\circ\text{C}$.

^1H RMN (400 MHz) (CDCl_3 , δ): 6.9 (sa, 1H)-NH-, 3.86 (sa, 1H)- NH_2 , 2.07 (s, 3H) β , 1.87 (s, 6H) α , 1.74 (s, 6H) γ . ^{13}C RMN-DEPTQ (101 MHz, CDCl_3 ; δ , ppm): 178.54 CO, 38.9 C α , 36.46 C γ , 27.96 C β . FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3538, 3479, 3333, (NH_2 st), 2295, 2850, 2679(C-H), 1611 (C=O), 1523 (NH-C=O), 1451, 1307 (C-O-C). ESI (m/z): 194.8 [M] $^+$.

8.2.1.2 Síntesis del profármaco Ad-h-Dox

Este conjugado se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por Guo y col. Se disolvieron 0.02144 g de hidrazida del ácido adamantan-1-carboxílico (0.11 mmol) y 0.03g de Dox $\cdot\text{HCl}$ (0.055 mmol) en 15 mL de metanol seco. Posteriormente, se añadieron 15 μL de TFA como catalizador. La mezcla se sometió a reflujo a 50°C durante 48 h cubierto de la luz. Luego, la solución se concentró a presión reducida y se precipitó tres veces en acetato de etilo. El producto se recuperó por filtración y se secó al vacío para dar 0.035 g (0.048 mmol) de un sólido rojo púrpura que corresponde al profármaco Ad-h-Dox (88% de rendimiento). Punto de fusión: $> 200^\circ\text{C}$.

^1H RMN (400 MHz) ($\text{DMSO-}d_6$, δ): 14 (s, 1H) p, 13.5 (s, 1H) p', 7.93 (m, 2H)b,a, 7.66 (dd, $J=8.31$ Hz, 1H)c, 6.33 (sa, 1H)N-H, 5.43 (s, 1H)OH"', 5.30 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H)h, 4.96 (t, $J = 4.89$ Hz, 1H)g, 4.87 (m, 2H)OH''/OH', 4.59 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H)n, 4.18 (q, $J = 6.8$, 6.36 Hz, 1H)l, 4.01 (s, 3H)d, 3.55 (m, 1H)k, 3.40 (sa, 1H)j, 2.98 (q, $J = 18.01$, 2H)e, 2.15 (m, 2H)f, 1.99 (s, 3H) β , 1.88 (m, 1H)i, 1.79 (s, 6H) α , 1.67 (s, 6H) γ , 1.52 (m, 1H)h, 1.12 (d, $J = 6.85$ Hz, 3H)m. ^{13}C RMN-DEPTQ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ , ppm): 219.51 C13, 191.51 C12, 180.18 C5, 161.78 NC=O, 161.49 C1, 160.78 C11, 140.26 C6, 139.46 C3, 138.15 C6a, 136.23 C10a, 123.89 C4a, 123.01 C12a, 119.96 C2, 118.84 C4, 115.97 C11a, 105.77 C5a, 100.56 C1', 76.67 C8, 69.95 C10, 69.15 C4', 68.06 C3', 66.84 C5', 63.45 C14, 56.53 CH_3O , 38.39 α , 35.93 C9, 36.26 γ , 32.80 C7, 27.41 β , 27.50 C2', 16.39 $\text{CH}_3\text{-C5'}$. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3435 O-H (st),

3241 N-H (st), 1614, 1579 C=O (st), 1407 C=C (st), 1281 C-O-C (st), 1110, 1069, 1008 C-O.
ESI: m/z 720 [M]⁺.

8.2.1.3 Síntesis del profármaco doxorubicina-adamantano con un enlace amida(Ad-a-Dox)

Este conjugado se sintetizó de acuerdo con el siguiente método; 0.123 g de COMU (0.28 mmol), 0.043 g de Ad-COOH (0.23 mmol) y 66 μ L de TEA se disolvieron en 1 mL de DMF anhidra, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos cubierta de la luz bajo atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, 0.1 g de Dox • HCl (0.18 mmol) se disolvieron en 1 mL DMF y se añadió lentamente a la mezcla Ad-COOH/COMU, después la mezcla se agitó durante 12 h bajo una atmósfera inerte. Transcurrido este tiempo el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se resuspendió en 5 ml de CH₂Cl₂ y se realizaron dos extracciones con agua destilada para eliminar el exceso de COMU. La fase orgánica se concentró y el profármaco Ad-a-Dox se recolectó por filtración al vacío y se secó por succión. Se obtuvieron 0.105 g de un sólido rojo (0.148 mmol) que corresponde a Ad-a-Dox (82.6% de rendimiento) y un punto de fusión >200 °C.

¹H RMN (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 14.02 (s, 1H)p, 13.3 (s, 1H)p', 7.91 (m, 2H)b,a, 7.64 (dd, *J* = 8.31 Hz, 1H)c, 6.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H)N-H, 5.45 (s, 1H)OH", 5.22 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H)h, 4.93 (t, *J* = 4.89 Hz, 1H)g, 4.84 (m, 2H)OH"/OH, 4.58 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H)n, 4.16 (q, *J* = 6.8, 6.36 Hz, 1H)l, 3.97 (s, 3H)d, 3.54 (m, 1H)k, 3.39 (sa, 1H)j, 2.96 (q, *J* = 18.01, 2H)e, 2.16 (m, 2H)f, 1.92 (s, 3H) β , 1.85 (m, 1H)i, 1.71 (s, 6H) α , 1.62 (s, 6H) γ , 1.45 (m, 1H)i, 1.14 (d, *J* = 6.85 Hz, 3H)m. ¹³C RMN-DEPTQ (101 MHz, DMSO-*d*₆; δ , ppm): 218.52 C13, 191.25 C12, 180.72 C5, 165.48 NC=O, 160.80 C1, 159.20 C11, 140.92 C6, 139.37 C3, 136.17 C10a, 138.75 C6a, 124.71 C4a, 124.44 C12a, 118.90 C4, 119.74 C2, 115.35 C11a, 105.22 C5a, 100.41 C1', 74.76 C8, 69.95 C10, 69.78 C4', 68.06 C3', 66.96 C5', 63.63 C14, 56.55 CH₃O, 36.85 C9, 38.46 α , 36.24 γ , 32.03 C7, 27.60 β , 27.58 C2', 16.91 CH₃-C5'. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3431 N-H (st), 1723 C=O, 1617, 1578 C=O, 1410 C=C (st), 1283 C-O-C (st), 1115, 1078, 1013 C-O. ESI: m/z 728 [M+Na]⁺.

8.2.1.4 Síntesis del profármaco doxorubicina-adamantano con un enlace éster(Ad-e-Dox)

8.2.1.5 Síntesis de la *N*-Boc Doxorubicina (Dox-Boc)

Una solución de 0.06 g de Dox•HCl (0.11 mmol), 28 μ L de Boc₂O (0.12 mmol) y 31 μ L de TEA (0.21 mmol) en 5 mL de DMF anhidra se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La solución se concentró a presión reducida y la Dox-Boc resultante se precipitó lavándola tres veces con TFA frío para eliminar el exceso de Boc₂O. Se obtuvieron 0.062 g de un sólido rojo (0.096 mmol) de Dox-Boc (96% de rendimiento). Punto de fusión >200 °C,

¹H RMN (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 14.03 (s, 1H)_p, 13.26 (s, 1H)_{p'}, 7.90 (m, 2H)_{b,a}, 7.63 (dd, *J* = 1.96, 5.87 Hz, 1H)_c, 6.32 (d, *J* = 8.42 Hz, 1H)_{N-H}, 5.43 (s, 1H)_{OH''}, 5.20 (d, *J* = 2.81 Hz, 1H)_h, 4.93 (sa, 1H)_g, 4.88 (t, 1H)_{OH'}, 4.66 (d, *J* = 5.61 Hz, 1H)_{OH''}, 4.58 (d, *J* = 5.87 Hz, 1H)_n, 4.14 (q, *J* = 6.36, 6.85 Hz, 1H)_l, 3.98 (s, 3H)_d, 3.66 (d, *J* = 4.89 Hz 1H)_k, 3.41 (m, 1H)_j, 2.95 (m, 2H)_e, 2.15 (m, 2H)_f, 1.80 (m, 2H)_i, 1.33 (s, 9H) -C(CH₃)₃, 1.12 (d, *J* = 6.85 Hz, 3H)_m. ¹³C RMN-DEPTQ (101 MHz, DMSO-*d*₆; δ , ppm): 214.13 C₁₃, 186.98 C₁₂, 186.83 C₅, 161.57 C₁, 156.53 C₁₁, 155.11 NC=O 154.92 C₆, 136.66 C₃, 135.99 C_{10a}, 135.11 C_{6a}, 134.50 C_{4a}, 120.45 C_{12a}, 120.18 C₄, 119.44 C₂, 111.33 C_{11a}, 111.09 C_{5a}, 100.84 C_{1'}, 75.44 C₈, 70.25 C₁₀, 68.69 C_{4'}, 67.25 C_{5'}, 64.14 C₁₄, 57.04 CH₃O, 46.97 C_{3'}, 37.04 C₉, 32.55 C₇, 30.42 C_{2'}, 28.63 CH₃, 17.54CH₃-C_{5'}. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3455 O-H (st), 3338 N-H (st), 1686 C=O (st), 1615-1579 C=O, 1407 C=C (st), 1284 C-O-C (st), 1112, 1071, 1018 C-O. ESI: *m/z* 666.3 [M+Na]⁺.

8.2.1.6 Síntesis del profármaco Ad-e-Dox

Se disolvieron 0.042 g de Ad-COOH (0.23 mmol), 0.057 g de DCC (0.28 mmol), 0.034 g de DMAP (0.28 mmol) y 0.017 g de DPTS (0.058 mmol) en 5 ml de CH₂Cl₂ anhidro, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h en atmósfera de nitrógeno. Transcurrido este tiempo, se disolvieron 0.1 g de Dox-Boc (0.15 mmol) en CH₂Cl₂ (2.5 mL) y se añadió lentamente a la mezcla Ad-COOH/DCC/DMAP/DPTS. La mezcla resultante se agitó durante 12 h bajo atmósfera inerte. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo de la reacción se redisolvió en 5 mL de metanol y se añadieron 100 μ L de TFA, la reacción se mantuvo durante 20 minutos. El producto se purificó mediante cromatografía en

placa preparativa, $R_f = 0.6$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}/98:2$) para dar 0.062 g de un sólido rojo (0.0914 mmol) del profármaco Ad-e-Dox (91% de rendimiento). Punto de fusión > 200 °C.

^1H NMR (400 MHz) ($\text{DMSO}-d_6$, δ): 13.88 (s, 1H)p, 13.11 (s, 1H)p', 7.81 (m, 2H)b,a, 7.55 (dd, $J = 8.31$ 1H)c, 6.12 (s, 1H)OH", 5.58 (d, $J = 7.82$ Hz, 1H)h, 5.52(sa, 1H)OH", 5.22 (q, $J = 18.1, 17.61$ Hz, 2H)n, 5.02 (s, 1H)g, 4.13 (m, 1H)l, 3.94 (s, 3H)d, 3.77 (m, 1H)k, 3.37 (sa, 1H)j, 2.89 (q, $J = 18.58$, 2H)e, 2.26 (m, 1H)f, 2.01 (s, 3H) β , 1.91 (s, 6H) α , 1.69 (s, 6H) γ , 1.50 (m, 1H)i, 1.22 (m,3H)m. ^{13}C RMN-DEPTQ (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; δ , ppm): 219.04 C13, 191.31 C12, 180.72 C5, 165.48 -COO-, 160.79 C1, 159.20 C11, 140.91 C6, 140.25 C10a, 139.37 C3, 138.75 C6a, 124.70 C4a, 124.44 C12a, 123.69 C4, 115.50 C2, 115.35 C11a, 105.22 C5a, 79.69 C1', 74.76 C8, 74.49 C10, 72.83 C4', 71.53 C3', 68.38 C5', 61.29 C14, 53.31 CH_3O , 49.51 C9, 41.39 α , 40.79 γ , 36.78 C7, 34.53 β , 32.32 C2', 21.71 $\text{CH}_3\text{-C5'}$. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3453 O-H (st), 3326 N-H (st), 1727 C=O (st), 1615-1580 C=O,1409 C=C (st), 1282 C-O-C (st), 1122, 1081, 1013 C-O. ES: m/z 706 $[\text{M}]^+$.

8.2.2 Síntesis de mono-tosil- β CD ($m\text{OTs-}\beta\text{CD}$)

La síntesis de $m\text{OTs-}\beta\text{CD}$ se llevó a cabo conforme a la metodología descrita por Zhong y col.⁷¹ En un matraz de fondo redondo se disolvieron 1.28 g de ácido *p*-toluensulfónico (6.72 mmol) y 5 g cloruro de *p*-toluensulfonilo (26.2 mmol) en 50 mL de CH_2Cl_2 . La solución se agitó a temperatura ambiente durante 12 hrs. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró y las aguas madres se concentraron a presión reducida. El residuo se recrystalizó en hexano frío, el anhídrido del *p*-toluensulfonilo(Ts_2O) se filtró y se dejó secar al vacío. Una vez obtenido el Ts_2O , se disolvieron 5.75 g de βCD (5.1 mmol) y 2.48 g de Ts_2O (7.6 mmol) en 125 mL de H_2O . La mezcla de reacción agitó por 2 hrs a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se agregó una solución de NaOH(2.5 g en 25 mL, 2.5 M), la mezcla se agitó durante 10 minutos más. Posteriormente, la solución se filtró para retirar el Ts_2O que no reaccionó, el filtrado se ajustó a $\text{pH}=8$ por adición de NH_4Cl , después la suspensión se mantuvo a 4 °C durante 12 h y posteriormente el sólido formado se colectó por filtración. El crudo de reacción se recrystalizó en acetona para obtener un sólido color blanco, con un rendimiento del 69% (4.5 g, 3.5 mmol) y un punto de fusión de 170–172 °C.

^1H RMN (400 MHz) ($\text{DMSO}-d_6$, δ ppm): 7.75 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H) **Ha**, 7.43 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H) **Hb**, 5.83 (s, 1H) OH-2', 5.77-7.72 (m, 6H) OH-2, 5.71-5.69 (m, 7H) OH-3,3', 4.85-

4.83 (m, 6H) H-1, 4.77 (s, 1H) H-1', 4.53-4.43 (m, 6H) OH-6, 4.38-4.32 (m, 2H) H-6', 4.21-4.17 (m, 1H) H-5', 3.66-3.17 (m, 39H) H-6, H-3,3'; H-5, H-4,4'; H-2,2' traslapado con H₂O, 2.43 (s, 3H) -CH₃; ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ, ppm): 145.25, 133.11, 130.33, 128.03, 102.37, 101.73, 81.96, 81.62, 73.51, 72.48, 72.28, 70.17, 69.35, 60.36, 21.66. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3281 (νO-H) (st), 1644 (νPh-SO₂-) (st), 1244 (νPh-SO₂-R) (st), 815 (νPh-SO₂-O-R) (st). MALDI-TOF-MS m/z 1311.73 [M+Na]⁺, 1327.70 [M+K]⁺. Análisis elemental: calculado para C₄₉H₇₆O₃₇S + 4 H₂O: C: 43.24; H: 6.22; O: 48.19; S: 2.36; encontrado C: 43.14; H: 6.34; O: 48.12; S: 1.99.

8.2.3 Síntesis de mono-azido-βCD (*m*N₃-βCD)

En un matraz de fondo redondo, bajo condiciones anhidras se disolvieron 1.4 g de *m*-OTs-βCD (1.086 mmol), 0.211 g de NaN₃ (3.26 mmol) y 0.090 g de KI (0.543 mmol) en 8 mL de DMF anhidra. La mezcla de reacción se agitó a 80 °C por 24 hrs. Transcurrido este tiempo, la DMF se retiró a presión reducida, el residuo se precipitó en acetona y se recristalizó en una mezcla H₂O:acetona 1:1, el sólido se separó y secó por filtración al vacío. Se obtuvo un sólido color blanco, 1.19 g (1.03 mmol, 95% rend.) de *m*N₃-βCD y un punto de fusión >300 °C.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 5.78-5.70 (m, 7H) OH-2,2', 5.67-5.62 (m, 7H) OH-3,3', 4.88 (d, 1H, *J* = 3.29 Hz) H-1', 4.82-4.83 (m, 6H) H-1, 4.54-4.44 (m, 6H) OH-6, 3.78-3.56 (m, 28H) H-6,6', H-3,3'; H-5,5', 3.42-3.31 (m, 18H) H-4,4', H-2,2'; traslapado con H₂O; ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 102.72, 102.50, 102.38, 102.04, 83.43, 82.32, 82.07, 81.99, 81.85, 73.51, 73.44, 73.33, 73.26, 72.85, 72.66, 72.48, 72.44, 70.63, 60.59, 60.38, 60.21, 51.55. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3294 (νO-H) (st), 2922 (νN=N) (st), 2104 (ν-N₃) (st), 1027 (νCH₂-O-C-) (st). HR-MALDI-TOF-MS m/z 1182.3666 [M+Na]⁺. Análisis elemental: calculado para C₄₂H₆₉N₃O₃₄ + 2 H₂O: C: 42.18; H: 6.15; N: 3.51; O: 48.16; encontrado C: 41.95; H: 6.50; N: 3.44; O: 48.09.

8.2.4 Síntesis de los intermediarios con grupos alquino

8.2.4.1 4-(propargiloxi)fenol (I) y 1,4-bis(propargiloxi)benceno (II)

Estos compuestos se sintetizaron siguiendo el procedimiento previamente descrito por Folgado y col.⁷³ A una solución de 25 g de hidroquinona (227 mmol) en 125 mL de acetona anhidra se le añadieron 31.8 g de K_2CO_3 anhidro (227 mmol), la mezcla se calentó a 65 °C durante 45 min. Después de este tiempo, se añadieron 7.02 g (59 mmol) de bromuro de propargilo gota a gota durante un período de 5 h. La mezcla resultante se sometió a reflujo durante 24 h, transcurrido este tiempo la mezcla se enfrió, se filtró el sólido remanente y la fracción líquida se concentró a presión reducida. El residuo oleoso color marrón se disolvió en 125 mL CH_2Cl_2 y se lavó con 2 porciones de 50 mL de agua, seguido de 50 mL de una solución de salmuera. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo obtenido consistió en una mezcla de hidroquinona sin reaccionar, 4-(propargiloxi)fenol y 1,4-bis(propargiloxi)benceno. Para obtener ambos intermediarios, encontramos que las mejores condiciones de separación mediante cromatografía en columna de gel de sílice fue usar una mezcla Hex/AcOEt (85:15).

Se obtuvieron 4.75 g de 4-(propargiloxi)fenol (I) como un aceite amarillo (32 mmol, 58% de rendimiento).

1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$, δ ppm): 8.99 (sa, 1H) PhOH, 6.81 (d, $J = 9$ Hz, 2H) Ha, 6.69 (d, $J = 9$ Hz, 2H) Hb, 4.66 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H) Hc, 3.50 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H) Hd alquino; ^{13}C RMN (101 MHz, $DMSO-d_6$, δ ppm): 152.24, 150.48, 116.48, 116.10, 80.20, 78.23, 56.46. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3361(ν O-H) (st), 3285 (ν C \equiv C-H) (st), 2122 (ν C \equiv C). DCI-TOF-MS: m/z 148.05 $[M]^+$, 149.06 $[M+H]^+$.

Se obtuvieron 1.75 g de 1,4-bis(propargiloxi)benceno (II) como un sólido amarillo pálido (9.4 mmol, 17% de rendimiento).

1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$, δ ppm): 6.94 (s, 4H) a,b, 4.73 (d, $J = 2.4$ Hz, 4H) c, 3.53 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H) Hd alquino; ^{13}C RMN (101 MHz, $DMSO-d_6$, δ ppm): 152.17, 116.27, 79.95, 78.47, 56.32. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3272 (ν C \equiv C-H) (st), 2130 (ν C \equiv C). HR-DCI-TOF-MS: m/z 186.0686 $[M]^+$, 187.0739 $[M+H]^+$.

8.2.4.2 Síntesis del acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico (III)

El intermediario (III) se sintetizó de acuerdo al método previamente descrito por Rahmani & Mahani,⁷⁴ se mezclaron 5 g del acetato de 2-(4-hidroxifenil) metílico (30.1 mmol) y 5.5 g de K₂CO₃ anhidro (39.71 mmol) en 100 mL de acetona anhidra, una vez preparada la mezcla se agregaron 4 mL de bromuro de propargilo al 80% en tolueno (30.1 mmol), la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 24 hrs. Después de este tiempo, la mezcla se enfrió, el sólido resultante se filtró y la parte líquida se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en 50 mL de CH₂Cl₂ y se lavó con 50 mL de agua. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida obteniendo 6 g del acetato del 2-[4-(propargiloxi)fenil] acetato de metilo en forma de un aceite color marrón (29.4 mmol, 97% de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ ppm): 7.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H)H**b**, 6.96 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H)H**c**, 4.69 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H)H**d**, 3.71 (s, 3H)-CH₃, 3.59 (s, 2H)H**a**, 2.54 (t, *J* = 2.4, 1H)H**e** alquino. ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 172.2, 156.68, 130.31, 127.03, 115.01, 78.56, 75.53, 55.83, 52.01, 40.28. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3283 (νC≡C-H), 2120 (νC≡C), 1730 (C=O), 1216 (νC-O). DCI-TOF-MS m/z 204.08 [M]⁺, 205.09 [MH]⁺.

8.2.4.3 Síntesis del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (IV)

De acuerdo con el procedimiento reportado por Rahmani & Mahani,⁷⁴ en un matraz de fondo redondo de 200 mL se colocaron 2 g del 2-[4-(propargiloxi)fenil] acetato de metilo (9.8 mmol) en una mezcla EtOH:H₂O 1: 1 (50 mL), posteriormente se trató con una solución 5 M de NaOH (60 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 hrs., después se eliminó el EtOH a presión reducida. La fracción acuosa se extrajo con una porción adicional de 10 mL de H₂O (1 x 10 mL) y 20 mL de CH₂Cl₂. La fracción acuosa se acidificó con HCl 6 M y se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida para obtener 1.75 g del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético como sólido cristalino color blanco (9.2 mmol, 94% de rendimiento).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 12.25 (s, 1H)COOH, 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)H**b**, 6.93 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)H**c**, 4.77 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H)H**d**, 3.54 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H)H**e** alquino, 3.50 (s, 2H)H**a**. ¹³C RMN (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 173.36, 156.40, 130.81,

128.20, 115.07, 79.81, 78.57, 55.81. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3280 ($\nu\text{C}\equiv\text{C}$), 3200 (νOH), 2130 ($\nu\text{C}\equiv\text{C-H}$). DCI-TOF-MS m/z 190.06 $[\text{M}]^+$, 191.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

8.2.4.4 Síntesis del 1,3,5-tris(propargiloxi)benceno (V)

La síntesis de (V) se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Mallard-Favier⁷⁵ y col. con ligeras modificaciones: una solución de 1.5 g de fluoroglucinol (11.89 mmol) y 9.86 g de K_2CO_3 anhidro (71.34 mmol) en 75 mL de DMF anhidra se mantuvo a 80°C durante 45 min. A esta mezcla, se le agregaron 7.95 mL de bromuro de propargilo (80% en tolueno, 71.34 mmol) gota a gota durante un período de 5 h. La mezcla resultante se mantuvo a 80 °C durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo la mezcla se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo oleoso se disolvió en 120 mL de CH_2Cl_2 y se lavó con 50 mL de agua y luego con 100 mL de una solución de NaOH 1M. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice utilizando una mezcla hexano/acetato de etilo (7:3) como eluyente. Se obtuvieron 2.28 g (9.5 mmol) de un sólido color crema que corresponde al compuesto V (80 % de rendimiento).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 6.26 (s, 3H), 4.76 (d, $J = 2.4$ Hz, 6H), 3.56 (t, $J = 2.4$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 159.37, 95.62, 79.51, 78.77, 56.07. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3255 ($\nu\text{C}\equiv\text{C-H}$) (st), 2133 ($\nu\text{C}\equiv\text{C}$). DCI-MS m/z 241.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

8.2.4.5 Síntesis del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI)

De acuerdo con el protocolo reportado por Zeng,⁸⁴ y realizando algunas modificaciones, se mezclaron 0.515 g del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (IV, 2.7 mmol), 0.727 g de EDC.HCl (3.79 mmol) y 0.366 g de HOBt (2.7 mmol) en 14 mL de DMF durante 4 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después, se añadieron gota a gota una solución de 0.25 g del dendrímero PAMAM G0 (0.483 mmol) en 2 mL de DMF. La mezcla resultante se agitó durante 3 días a 35 °C. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente a presión reducida, el semisólido resultante se recristalizó en metanol, para obtener 0.571 g del dendrímero PAMAM G0-alquino en forma de un polvo blanco (0.473 mmol, 98 % de rendimiento).

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 8.03 (d, $J = 5$ Hz, 4H) *Hf*, 7.96 (d, $J = 5$ Hz, 4H) *Hd*, 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 8H) *Hh*, 6.89 (d, $J = 8.7$ Hz, 8H) *Hi*, 4.75 (d, $J = 2.35$ Hz, 8H) *Hj*, 3.53 (t, $J = 2.39$ Hz, 4H) *Hk*, 3.33 *Hg* traslapado con H_2O , 3.07 (t, $J = 2.18$ Hz, 16H) *He-He'*, 2.65

(t, $J = 7.09, 6.32$ Hz, 8H) **Hb**, 2.44 (s, 4H) **Ha**, 2.19 (t, $J = 6.79, 6.87$ Hz, 8H) **Hc**; ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 171.95, 171.02, 156.26, 130.41, 129.49, 115.03, 79.84, 78.54, 55.80, 51.25, 50.04, 41.92, 33.60. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3284 ($\nu\text{C}\equiv\text{C}$), 3082 ($\nu\text{N-H}$), 3090 ($\nu\text{C-H}$) (st). ESI-TOF-MS m/z 1205.5 $[\text{M}]^+$; 1206.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 1228.5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{66}\text{H}_{80}\text{N}_{10}\text{O}_{12} + 1 \text{H}_2\text{O}$: C: 64.80; H: 6.76; N: 11.45; O: 17.00; encontrado C: 64.63; H: 6.77; N: 11.72; O: 16.22.

8.2.5 Método general para la conjugación por química "Click" de los alquinos (I-VI) con la $m\text{N}_3\text{-}\beta\text{CD}$

8.2.5.1 Síntesis del compuesto A

Una mezcla de 0.0702 g de 4-(propargiloxi)fenol (0.47 mmol) y 0.5 g de $m\text{N}_3\text{-}\beta\text{CD}$ (0.43 mmol) y 0.015 g de CuSO_4 (0.094 mmol) se disolvieron en 5 mL de DMSO previamente desgasificado por burbujeo de argón durante 15 min. Por otra parte, se preparó una solución de 0.056 g (0.282 mmol) de ascorbato de sodio en 1 mL de H_2O y se agregó gota a gota a la solución anterior. La mezcla se calentó a 50 °C con agitación vigorosa durante 24 hrs en atmósfera de argón. Después de este tiempo la mezcla se precipitó en un exceso de acetona y el sólido se recuperó por filtración al vacío para obtener un polvo color verde, el cual se disolvió en agua y se purificó por SEC (Sephadex-G15) usando agua como eluyente. El producto se recuperó por liofilización para dar 0.507 g de un polvo amarillo pálido (0.39 mmol, rendimiento del 90%) que corresponde al compuesto A.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 8.94 (s, 1H) **H** fenol, 8.12 (s, 1H), **H triazol**, 6.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H) **Ha**, 6.69 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H) **Hb**, 5.88 (s, 1H) OH-2', 5.78 (s, 6H) OH-2, 5.73-5.65(m, 7H) OH-3,3', 5.04 (s, 1H) H-1', 4.97 (s, 2H) **Hc**, 4.91-4.85 (m, 1H) H-6', 4.84-4.77 (s, 6H) H-1, 4.62-4.56 (m, 1H) H-6', 4.51-4.45 (m, 5H) OH-6, 4.29-4.26 (m, 1H) OH-6'', 4.02-3.97 (m, 1H) H-5', 3.73-3.56 (m, 23H) H-6, H-3,3', H-5), 3.38-3.30 (m, 47H) H-4,4', H-2,2' traslapado con H_2O), 3.11 (d, $J = 11$ Hz, 1H) H-6'', 2.93-2.90 (m, 1H) H-6''; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 152.08, 151.33, 143.35, 125.68, 116.21, 116.14, 102.67, 102.49, 102.45, 102.36, 101.72, 83.90, 82.52, 81.97, 81.82, 81.45, 73.67, 73.45, 73.10, 72.95, 72.82, 72.50, 72.21, 70.42, 60.39, 60.30, 61.98, 60.61, 60.42, 59.44, 50.79. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3229 ($\nu\text{O-H}$), 2916 ($\nu\text{N=N}$, *triazol*), 1509 ($\nu\text{C=C}$), 1025 ($\nu\text{CH}_2\text{-O-C}$). HR-ESI-TOF-MS m/z 1308.4429 $[\text{M}]^+$, 1330.4265 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Análisis elemental: calculado para $\text{C}_{51}\text{H}_{77}\text{N}_3\text{O}_{36} + 9 \text{H}_2\text{O}$: C: 41.66; H: 6.51; N: 2.86; O: 48.97; encontrado C: 41.55; H: 6.50; N: 2.49; O: 43.21.

8.2.5.2. Síntesis del compuesto B

De acuerdo al procedimiento descrito en la sección 8.2.7 a partir de 0.09 g del ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético (0.47 mmol) y 0.5 g de mN_3 - β CD (0.43 mmol). Se recuperó un polvo color verde el cual se disolvió en agua y se purificó por SEC, utilizando agua como eluyente. El producto se recuperó por liofilización para dar 0.569 g de un polvo color amarillo pálido (42 mmol, con un rendimiento de 98%) que corresponde al compuesto B.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 12.03 (s, 1H) COOH, 8.16 (s, 1H) **H triazol**, 7.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H) **Hb**, 6.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H) **Hc**, 5.89-5.87 (m, 1H) OH-2', 5.78 (s, 6H) OH-2, 5.72-5.64 (m, 7H) OH-3,3', 5.08 (s, 2H) **Hd**, 5.05 (s, 1H) H-1', 4.93-4.89 (m, 1H) H-6', 4.84-4.78 (m, 6H) H-1, 4.62- 4.57 (m, 1H) H-6', 4.51-4.45 (m, 5H) OH-6, 4.29 (s, 1H) OH-6'', 4.00 (s, 1H) H-5', 3.72-3.50 (m, 23H) H-6, H-3,3', H-5, 3.37-3.30 (m, 26H) H-4,4', H-2,2' traslapado con H₂O, 3.14-3.11 (m, 1H) H-6'', 2.91 (s, 1H) H-6'', 2.55 (s, 2H) **Ha**; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 173.45, 157.35, 143.02, 130.85, 127.75, 125.92, 114.90, 102.66, 102.35, 101.73, 83.90, 82.51, 81.98, 81.82, 81.47, 73.66, 73.45, 73.29, 73.10, 72.87, 72.81, 72.50, 72.20, 70.44, 61.37, 60.29, 59.44, 50.82, ~40.00 (traslapado con DMSO). FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3272 (ν O-H), 2921 (ν N=N, *triazol*), 1511 (ν C=C), 1023 (ν CH₂-O-C-). HR-ESI-TOF-MS m/z 1350.4503 [M]⁺, 1372.4316 [$M+Na$]⁺. Análisis elemental calculado para C₅₃H₇₉N₃O₃₇ + 10 H₂O: C: 41.60; H: 6.52; N: 2.75; O: 43.14; encontrado C: 41.62; H: 5.90; N: 2.30; O: 43.85.

8.2.5.3 Síntesis del compuesto C

De acuerdo al procedimiento descrito en la sección 8.2.7 a partir de 0.05 g de 1,4-bis(propargiloxi)benceno (0.268 mmol) y 0.747 g de mN_3 - β CD (0.64 mmol). Se recuperó un polvo amarillo que se disolvió en agua y se purificó por SEC, utilizando agua como eluyente. El producto se recuperó por liofilización para dar 0.652 g (0.26 mmol) de un sólido amarillo pálido con un rendimiento del 97%.

1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 8.15 (s, 2H) **H triazol**, 6.98 (s, 4H) **Ha,b**, 5.89 (s, 2H, OH-2'), 5.79 (s, 12H, OH-2), 5.73-5.66 (m, 14H, OH-3,3'), 5.05 (s, 4H, Hc), 5.03 (s, 2H, H-1'), 4.92-4.86 (m, 2H, H-6'), 4.84-4.78 (m, 12H, H-1), 4.63-4.58 (m, 2H, H-6'), 4.49 (s, 10H, OH-6), 4.29 (s, 2H, OH-6''), 4.00 (t, $J = 9.05, 8.38$ Hz, 2H, H-5'), 3.74-3.56 (m, 46H, H-6, H-3,3', H-5), 3.40-3.33 (m, 28H, H-4,4', H-2,2', traslapado con H₂O), 3.15 (d, $J = 8.93$ Hz, 2H, H-6''), 2.93 (d, $J = 6.79$ Hz 2H, H-6''); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 152.87, 143.15,

125.87, 115.99, 102.66, 102.45, 102.36, 101.74, 83.86, 82.51, 81.87, 81.46, 73.66, 73.44, 73.12, 72.81, 72.50, 72.21, 70.42, 61.87, 60.62, 60.30, 59.44, 50.79. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3288 (vO-H) (st), 2921 (vN=N, triazol), 1505 (vC=C), 1026 (vCH₂-O-C-). HR-ESI-TOF-MS m/z 1253.9183 [M+2H]²⁺. Análisis elemental calculado para C₉₆H₁₄₈N₆O₇₀ + 10 H₂O: C: 42.92; H: 6.30; N: 3.13; O: 47.65; encontrado C: 42.87; H: 6.02; N: 2.83; O: 45.73.

8.2.5.4 Síntesis del compuesto D

De acuerdo al procedimiento descrito en la sección 8.2.7 a partir de 0.05 g de 1,3,5-tris (propargiloxi)benceno (0.208 mmol) y 0.870 g de *m*N₃-βCD (0.75 mmol) se recuperó un polvo amarillo que se purificó mediante SEC, utilizando agua como eluyente. El producto se recuperó por liofilización para dar un polvo amarillo pálido con un rendimiento del 95% (0.735 g, 0.197 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 8.15 (s, 3H) **H triazol**, 6.35 (s, 3H) **Ha**, 5.85 (d, *J* = 5.99 Hz, 3H) OH-2', 5.77-5.74 (m, 18H) OH-2, 5.72-5.65 (m, 21H) OH-3,3', 5.11 (s, 6H) **Hb**, 5.07 (s, 3H) H-1', 4.89 (s, 3H) H-6', 4.84 (m, 18H) H-1, 4.68-4.63 (m, 3H) H-6', 4.53-4.47 (m, 15H) OH-6, 4.34 (t, *J* = 4.58, 4.52 Hz, 3H) OH-6'', 3.99 (s, 3H) H-5', 3.74-3.57 (m, 69H) H-6, H-3,3', H-5, 3.37-3.31 (m, 42H) H-4,4', H-2,2' traslapado con H₂O, 3.20 (d, *J* = 6.97 Hz 3H) H-6'', 2.97 (s, 3H) H-6''; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 160.44, 142.69, 126.46, 102.63, 102.39, 101.87, 94.85, 83.68, 82.42, 81.98, 81.66, 73.62, 73.47, 73.23, 72.83, 72.50, 72.20, 70.19, 61.53, 60.43, 60.31, 59.60, 50.59. FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3272 (vO-H), 2921 (vN=N, triazol), 1600 (vC=C), 1020 (vCH₂-O-C-). ESI-TOF-MS m/z: 1882.4 [M-2H+2Na]²⁺; 1263.0 [M-3H+3Na]³⁺. Análisis elemental calculado para C₁₄₁H₂₁₉N₉O₁₀₅+19H₂O: C: 41.69; H: 6.38; N: 3.10; O: 48.83; encontrado C: 41.69; H: 6.23; N: 3.07; O: 47.87.

8.2.5.5 Síntesis del compuesto E

De acuerdo al procedimiento descrito en la sección 8.2.7 a partir de 0.13 g de PAMAM-G0 alquino (0.107 mmol) y 0.55 g de *m*N₃-βCD (0.474 mmol)) se recuperó un polvo amarillo que se purificó mediante SEC utilizando agua como eluyente. El producto se recuperó por liofilización para dar un polvo amarillo pálido con un rendimiento del 92.5% (0.579 g, 0.099 mmol).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 8.15 (s, 4H) **H triazol**, 8.05 (s, 4H) **NHd**, **NHf**, 7.18 (d, *J* = 8.1 Hz, 8H) **Hh**, 6.97 (d, *J* = 8.1 Hz, 8H) **Hi**, 5.87 (s, 4H) OH-2', 5.78 (s, 24H) OH-2), 5.72-5.65 (m, 28H) OH-3,3', 5.07 (s, 4H) H-1', 5.05 (s, 8H) **Hj**, 4.92-4.89 (m, 4H) H-6', 4.84

(s, 24H) H-1, 4.81-4.78 (m, 8H) H_g, 4.63- 4.58 (m, 4H) H-6', 4.50 (s, 20H) OH-6, 4.29 (s, 4H) OH-6'', 4.00 (t, $J = 7.78, 6.41$ Hz, 4H) H-5', 3.74-3.59 (m, 72H) H-6, H-3,3', H-5, 3.40-3.34 (m, 48 H) H_{4,4'}, H-2,2', traslapado con H₂O), 3.14 (s, 4H) H-6'', 3.10 (s, 16H) H_{e,e'}, 2.92 (d, $J = 10.53$ Hz, 4H) H-6'', 2.76 (s, 8H) H_b, 2.5 (s, 4H) H_a, traslapado con DMSO, 2.30 (s, 8H) H_c; ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 171.93, 171.14, 157.22, 143.00, 130.48, 128.98, 125.97, 114.86, 102.72, 102.65, 102.38, 102.04, 101.90, 101.77, 101.71, 83.88, 83.43, 82.51, 82.32, 81.99, 81.84, 81.46, 73.67, 73.50, 73.33, 72.86, 72.21, 61.36, 60.63, 60.39, 59.42, 51.52, 50.76, 41.93. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3274 (ν O-H), 2917 (ν N=N, *triazol*), 1643 (ν C=C), 1024 (ν CH₂-O-C-). ESI-TOF-MS m/z encontrado 1963.8 [M-2H+2Na]³⁺; 1478.6 [M-3H+3Na]⁴⁺. Análisis elemental calculado para C₂₃₄H₃₅₆N₂₂O₁₄₈+25H₂O C: 44.64; H: 6.50; N: 4.89; O: 43.96; encontrado C: 43.65; H: 6.31; N: 4.80; O: 43.30.

8.3 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS PLATAFORMAS A-E

La determinación de la solubilidad de las plataformas **A-E** se realizó de acuerdo a una adaptación del método propuesto por Jozwiakowski y Connors.⁸⁵ Se colocaron cantidades en exceso de cada compuesto en tres viales independientes ámbar con tapa de rosca y capacidad de 5 mL, los cuales fueron sellados con parafilm para evitar pérdida de agua. Se agitaron en un baño de aceite a temperatura constante de 25 ± 0.01 °C durante 48 hrs. El sólido en exceso se separó del sobrenadante mediante filtración a través de una membrana Milli-Q (tamaño de poro de 0.45 μ m) tras la inyección de cada solución a través de jeringas de plástico desechables de 3 ml a 25 °C. El sobrenadante de cada muestra se colocó en tres viales diferentes. Las muestras fueron liofilizadas durante 48 hrs y el sólido obtenido se pesó en una balanza con una incertidumbre de ± 0.0001 g para cuantificarlo.

8.4 DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRIA POR EL MÉTODO DE JOB PARA LAS PLATAFORMAS D y E.

Se preparó una solución stock 8 mM de AdCOOH (**Sol 1**) en MeOD y una solución stock 8 mM de plataforma **D-E** (**Sol 2**) en D₂O de acuerdo a las cavidades de β CD. Se preparó una serie de nueve muestras en tubos de RMN que contenían tanto AdCOOH como plataforma con una concentración total fija a 8 mM. Esto se logró mediante la introducción de cantidades crecientes de 50 μ L hasta 450 μ L de **Sol 1** en el 1^{er}; 2^{do}; 3^{er}, 4^o, 5^o, 6^o, 7^o, 8^o y 9^o tubo de RMN. Todos los tubos se colocaron al vacío durante 1 hora a 30 °C para evaporar el

MeOD y secar el contenido, luego se mantuvieron bajo atmósfera de argón. Después se agregaron 450; 400; 350; 300, 250, 200, 150, 100 y 50 μL de **Sol 2** en el correspondiente tubo de RMN y el volumen total de cada tubo se completó a 0.5 mL agregando D_2O . Así, se obtuvieron soluciones con un volumen constante en fracciones molares variables en un rango de $0.1 < r < 0.9$. Los tubos se colocaron en un baño de ultrasonido a 40°C durante 1 hora para ayudar a la disolución del AdCOOH y favorecer el proceso de inclusión, luego cada tubo se analizó por RMN ^1H en D_2O como patrón interno.

8.5 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE HIDRÓLISIS DE LOS PROFÁRMACOS Ad-Dox

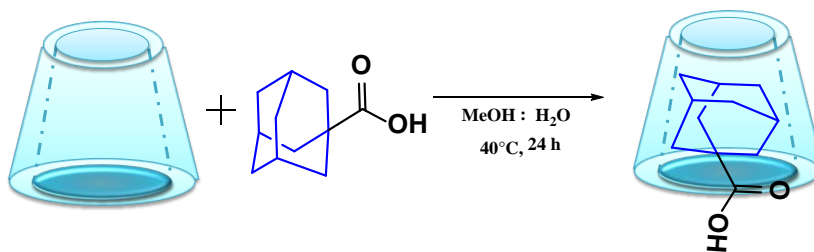
La cinética de hidrólisis de los profármacos Ad-Dox se realizó por triplicado en soluciones buffer de fosfatos a $\text{pH}=7.4$, 6.5 y buffer de citratos a $\text{pH}=4.5$ y 3.5 a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Se tomaron alícuotas de 3 mL a intervalos de tiempo de 1, 3, 5, 7, 9, 24, 48 y 72 hrs, recuperando con el mismo volumen de medio de cada muestra extraída. La determinación de Dox libre se realizó por UV a 480 nm.

8.6 PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN (CI)

La preparación de los CI: $\beta\text{CD}/\text{AdCOOH}$, A/AdCOOH, B/AdCOOH, C/AdCOOH, D/AdCOOH, E/AdCOOH, $\beta\text{CD}/\text{Ad-h-Dox}$, D/Ad-h-Dox y E/Ad-h-Dox se realizó por el método de cosolventia-evaporación.

8.6.1 Método general para la preparación de CI

8.6.1.1 Preparación de CI $\beta\text{CD}/\text{AdCOOH}$ (1:1)

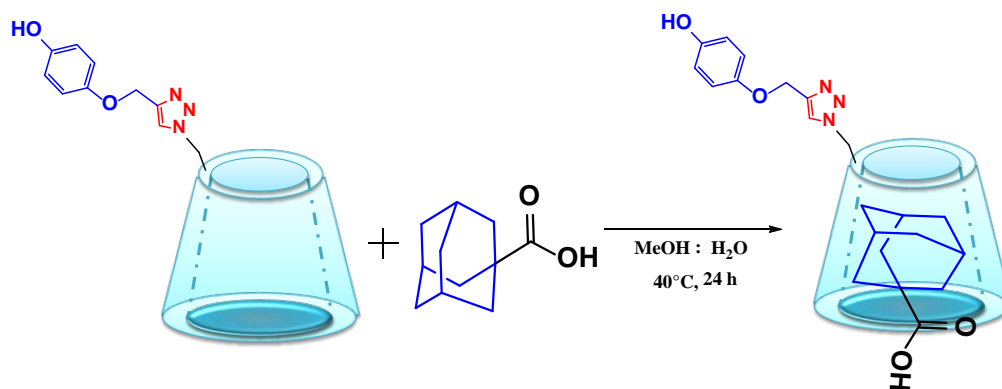


Esquema 17. Preparación de CI $\beta\text{CD}/\text{AdCOOH}$ (1:1).

En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 0.157 g de βCD (0.138 mmol) en 9 mL de agua destilada a temperatura ambiente con agitación vigorosa. A continuación, se agregó gota a gota una solución de 0.025 g (0.138 mmol) de AdCOOH en 0.7 mL de MeOH. La

solución se mantuvo en agitación durante 24 hrs a 40°C. Transcurrido este tiempo, el CI se recuperó por liofilización, obteniendo 0.1802 g (0.137 mmol) de un sólido color blanco con un rendimiento de 98% y un punto de fusión >300 °C.

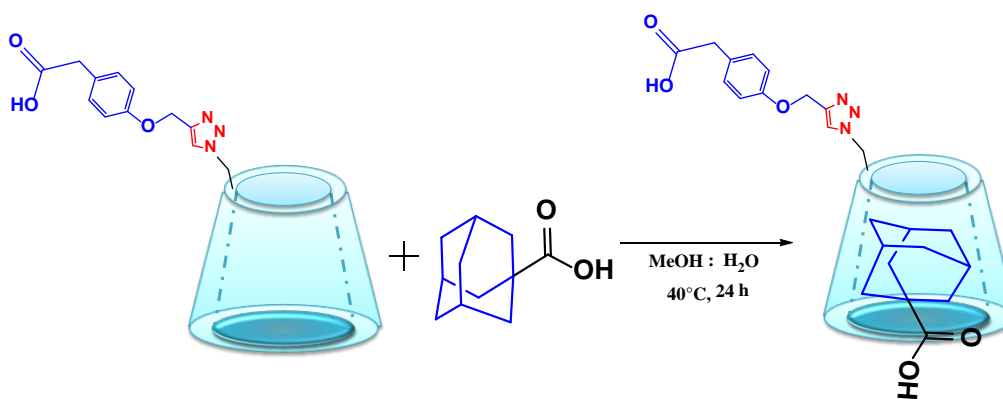
8.6.1.2 Preparación de CI A/AdCOOH (1:1)



Esquema 18. Preparación de CI A/AdCOOH (1:1).

Siguiendo el procedimiento de la sección 8.6.1, se utilizaron 0.073 g del compuesto **A** (0.055 mmol) y 10 mg del AdCOOH (0.055 mmol), se recuperaron 0.081 g (0.0544 mmol) de un sólido color blanco con un rendimiento de 99% y un punto de fusión >300 °C.

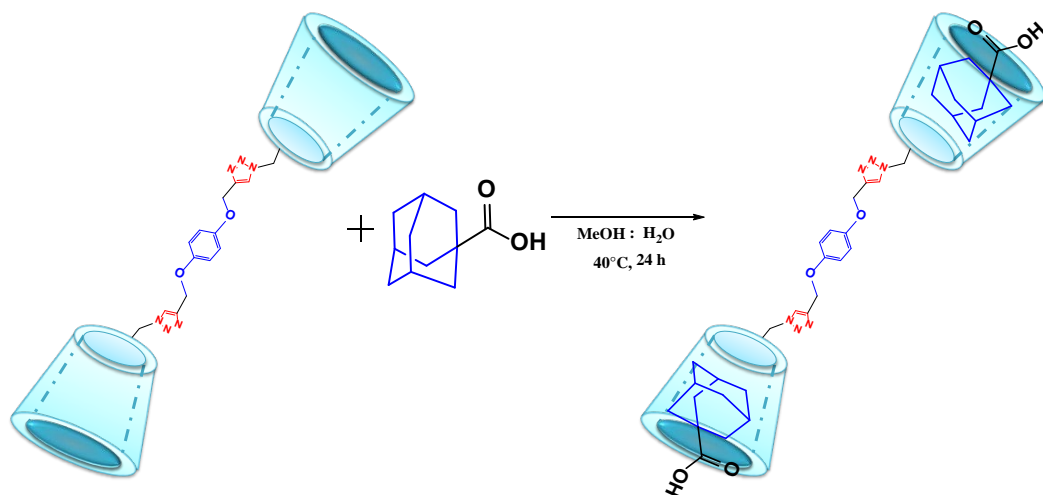
8.6.1.3 Preparación de CI B/AdCOOH (1:1)



Esquema 19. Preparación de CI B/AdCOOH (1:1).

Siguiendo el procedimiento de la sección 8.6.1, se utilizaron 0.075 g del compuesto **B** (0.055 mmol) y 0.01 g del AdCOOH (0.055 mmol), se recuperaron 0.084 g (0.0554 mmol) de un sólido color blanco con un rendimiento de 99% y un punto de fusión >300 °C.

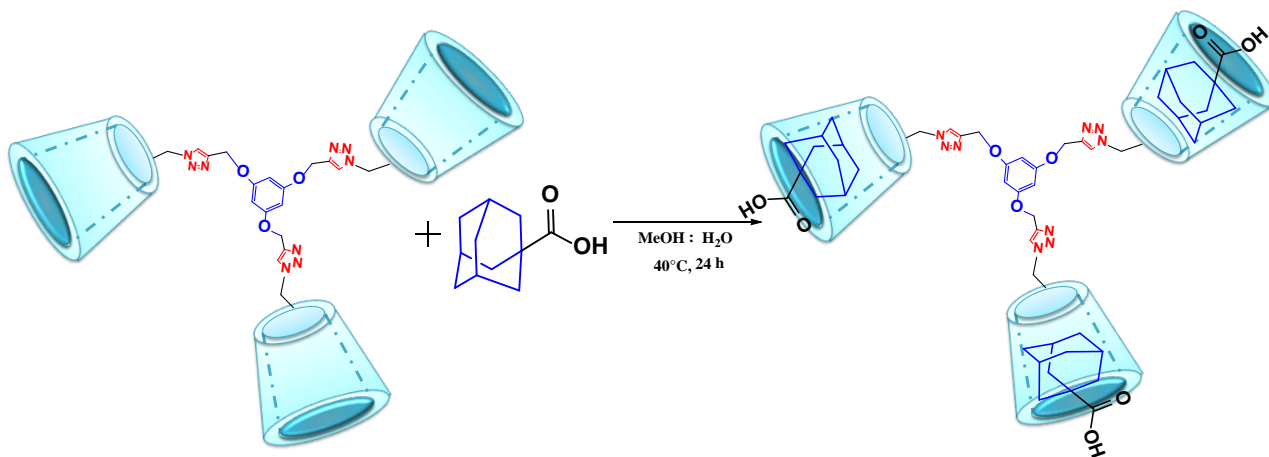
8.6.1.4 Preparación de CI C/AdCOOH (1:2)



Esquema 20. Preparación de CI C/AdCOOH (1:2).

Siguiendo el procedimiento de la sección 8.6.1, se utilizaron 0.1391 g del compuesto **C** (0.055 mmol) y 0.02 g del AdCOOH (0.111 mmol), se recuperaron 0.148 g (0.0516 mmol) de un sólido color amarillo con un rendimiento de 94% y un punto de fusión >300 °C.

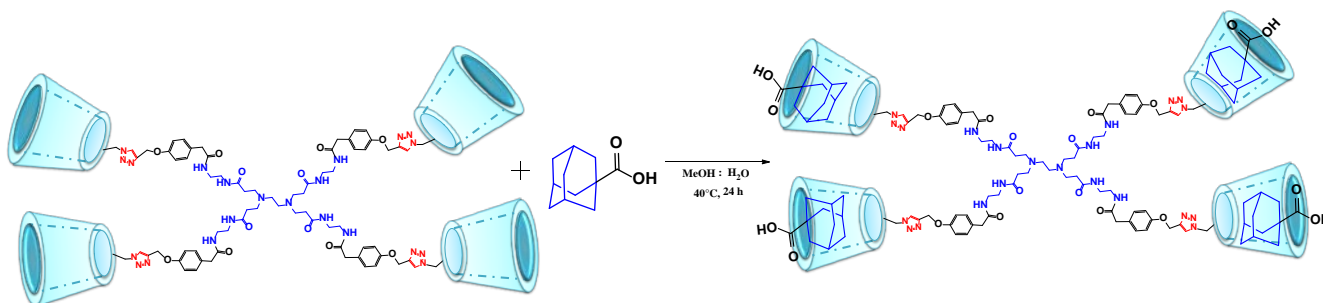
8.6.1.5 Preparación de CI D/AdCOOH (1:3)



Esquema 21. Preparación de CI D/AdCOOH (1:3).

Seguendo el procedimiento de la sección 8.6.1, se utilizaron 0.0688 g (0.0185 mmol) del compuesto **D** y 0.01 g del AdCOOH (0.055 mmol), se recuperaron 0.078 g (0.0183 mmol) de un sólido color amarillo con un rendimiento de 99% y un punto de fusión >300 °C.

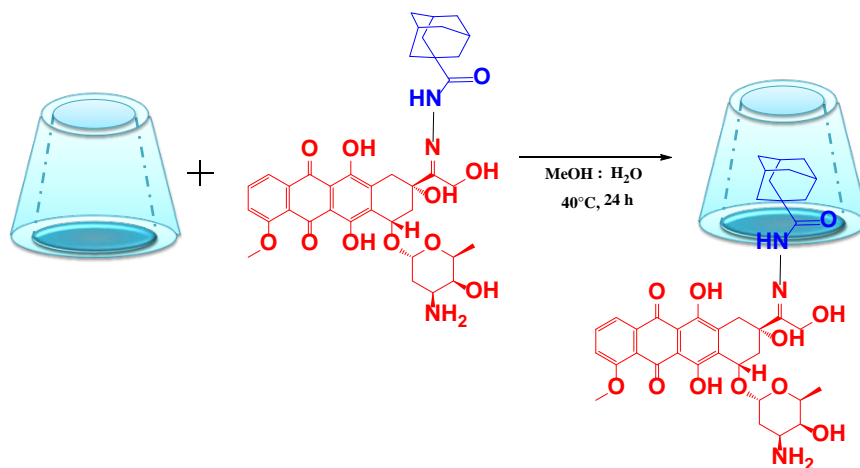
8.6.1.6 Preparación de CI E/AdCOOH (1:4)



Esquema 22. Preparación de CI E/AdCOOH (1:4).

Seguendo el procedimiento de la sección 8.6.1, se utilizaron 0.0811 g (0.0138 mmol) del compuesto **E** y 0.01 g del AdCOOH (0.055 mmol), se recuperaron 0.09 g (0.0137 mmol) de un sólido color amarillo con rendimiento de 99% y un punto de fusión >300 °C.

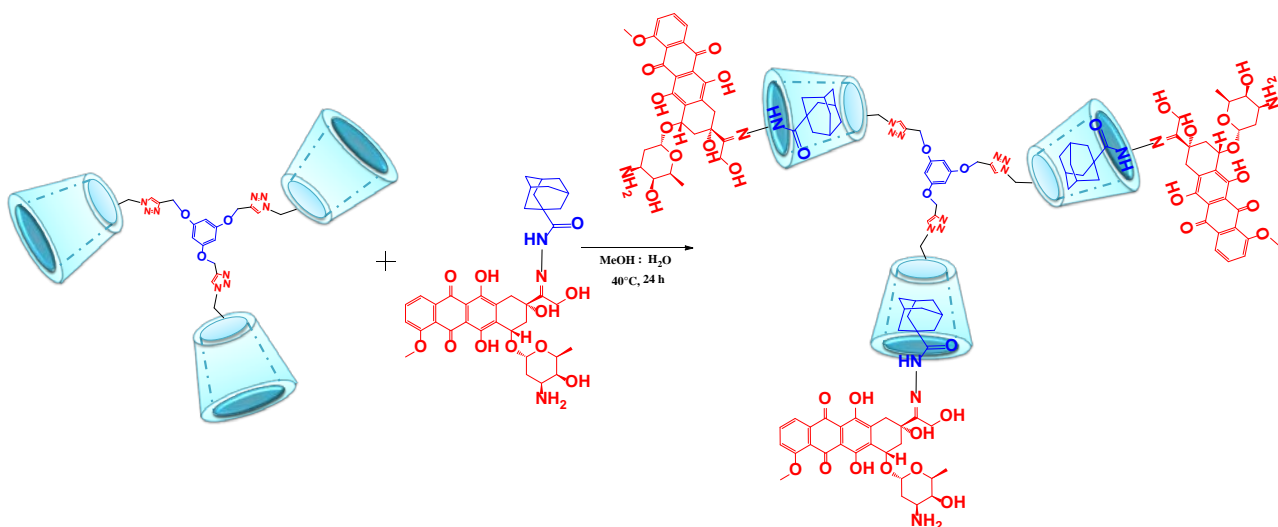
8.6.1.7 Preparación de CI β CD/Ad-h-Dox (1:1)



Esquema 23. Preparación de CI β CD/Ad-h-Dox (1:1).

Seguendo el procedimiento de la sección 8.6.1, se utilizaron 0.0788 g (0.0694 mmol) de β CD y 0.05 g del profármaco Ad-h-Dox (0.0694 mmol), se recuperaron 0.128 g (0.0690 mmol) de un sólido color amarillo con rendimiento de 99% y un punto de fusión >300 °C.

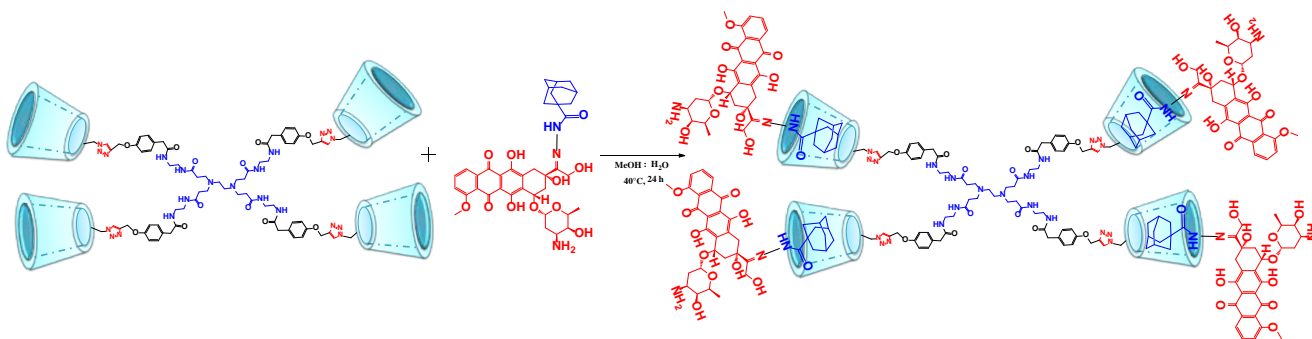
8.6.1.8 Preparación de CI D/Ad-h-Dox (1:3)



Esquema 24. Preparación de CI D/Ad-h-Dox (1:3).

Seguendo el procedimiento de la sección 8.6.1, se utilizaron 0.0861 g (0.0231 mmol) del compuesto **D** y 0.05 g del profármaco Ad-h-Dox (0.0694 mmol), se recuperaron 0.135 g (0.0229 mmol) de un sólido color amarillo con rendimiento de 99% y un punto de fusión >300 °C.

8.6.1.9 Preparación de CI E/Ad-h-Dox (1:4)



Esquema 25. Preparación de CI E/Ad-h-Dox (1:4).

Seguendo el procedimiento de la sección 8.6.1, se utilizaron 0.1258 g (0.0215 mmol) del compuesto **E** y 0.062 g del profármaco Ad-h-Dox (0.0861 mmol), se recuperaron 0.187 g (0.0214 mmol) de un sólido color amarillo con rendimiento de 99% y un punto de fusión >300 °C.

8.7 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

El tamaño de partícula de los compuestos **D** y **E** y sus correspondientes CI se determinó por triplicado en un equipo Zetasizer NanoS en medio acuoso, con un valor de viscosidad de 0.8872 cP a 25 °C, un índice de refracción de 1.33 y un ángulo de medida de 173°, todas las mediciones se llevaron a cabo en una celda de cuarzo.

8.8 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE LOS CI β CD/Ad-h-Dox, D/Ad-h-Dox y E/Ad-h-Dox.

La cinética de liberación de Dox de cada CI se realizó por triplicado en soluciones buffer de citratos a pH= 4.5 y 3.5 a 37 ± 1 °C, utilizando una membrana Spectra/Por 6 TRUMP-LABS. Se tomaron alícuotas de 3 mL a intervalos de tiempo de 1, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 48 y 72 hrs recuperando con el mismo volumen de medio de cada muestra extraída. La determinación de Dox libre se realizó por espectrofotometría de UV a 480 nm.

8.9 ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

8.9.1 Actividad citotóxica.

Los datos de actividad citotóxica fueron obtenidos mediante el método MTT con líneas celulares MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano, positivo a receptores de estrógeno), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano, triple negativo), MCF-10A (línea celular epitelial humana de mama no tumorigénica) y LLCPK (células epiteliales de riñon de rata). Los valores de CI_{50} (μ M) se determinaron a 48 horas de exposición *in vitro*. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm la desviación estándar, fueron obtenidos a las concentraciones analizadas (1, 10, 30, 60 y 100 μ M). El valor de CI_{50} se obtuvo mediante análisis de correlación no lineal utilizando el software GraphPad Prism 5. Estas determinaciones fueron realizadas por el M. en C. José Solano Becerra (Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM).

8.9.2 Captación celular.

La captación de los profármacos Ad-Dox se realizó por fluorimetría, previa extracción de los compuestos. Se sembraron 5×10^5 células MDA-MB 231 en placas de 60 mm durante 24 h, posteriormente se trataron con 8 μ M de Dox, Ad-h-Dox Ad-a-Dox y Ad-e-Dox en medio



fresco a 37 °C durante 1.5, 3, 6, 12 y 24 h. Después del tratamiento, el medio se retiró y las células se lavaron tres veces con PBS, luego las células se recogieron con 1.5 mL de tripsina-EDTA al 0.05% en solución de PBS y se transfirieron a microtubos y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos, luego se lavaron dos veces con PBS. Los sedimentos celulares se recolectaron y se resuspendieron en 2 mL de Triton X-100 al 5% en medio DMEM y se incubaron durante 5 min a 37 °C en un termobloque para microtubos, llevando a cabo la liberación de contenido celular. La intensidad de la fluorescencia de estas soluciones se midió a 25 °C en medio DMEM mediante un espectrofotómetro Fluorolog 3 Horiba con una lámpara de Xenón para los espectros de emisión. Para realizar mediciones comparables, decidimos realizar la curva de calibración en DMEM y confirmamos que el espectro de emisión se mantuvo de acuerdo con lo informado en agua. Las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas fueron 485 y 590 nm, respectivamente. La intensidad de la fluorescencia se convirtió a concentraciones de fármaco, se prepararon curvas de calibración en el rango de concentración de 0.01-0.5 μ M. Los resultados se expresan en promedio \pm desviación estándar de al menos tres repeticiones para cada experimento.



9. BIBLIOGRAFÍA

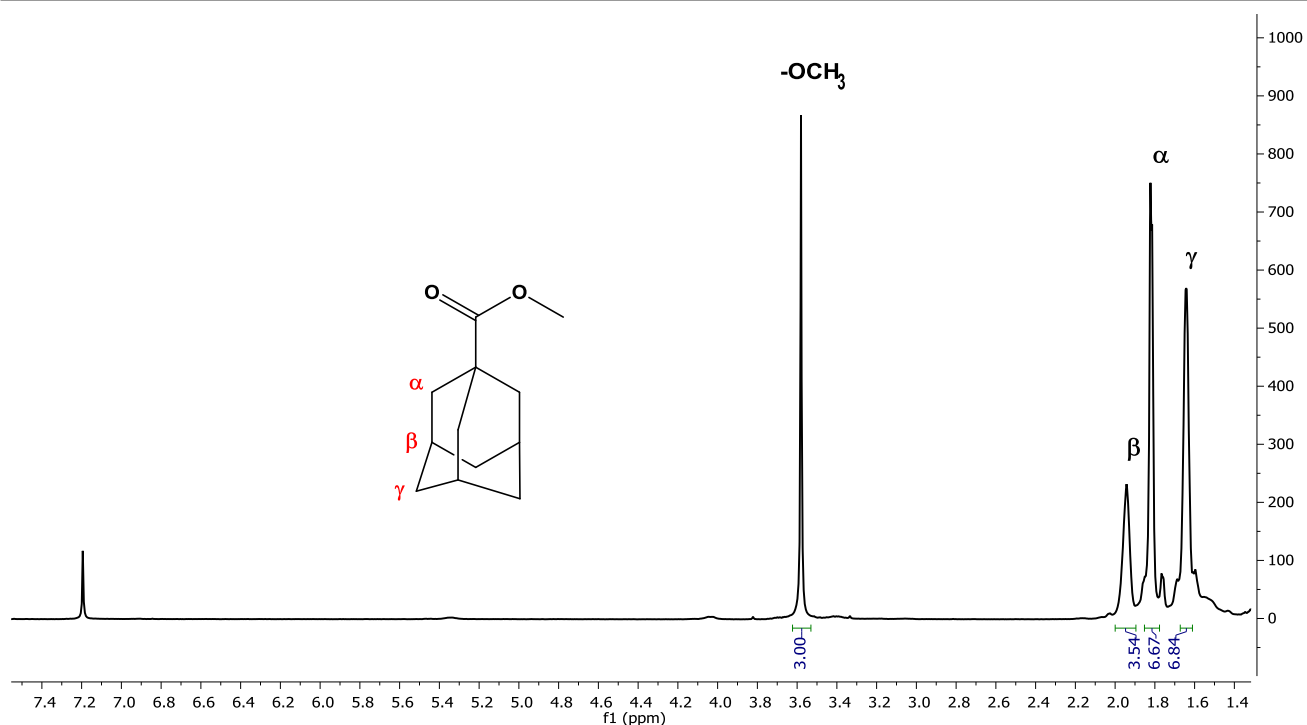
1. Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2018). *Cáncer. Nota descriptiva N° 297*. Recuperado el 15 de junio de 2019, de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. Stehelin D., Varmus H., Bishop J., Vogt P.K., *Nature*, **1976**, 260, 170.
3. Fearon E.R. and Vogelstein B. *Cell*, **1990**, 61, 759–767.
4. Tang Y., Wang Y., Kiani MF, Wang B. *Clin Breast Cancer*, **2016**, 5, 335-343.
5. Eliyatkin N., Yalçın E., Zengel B., Aktaş F., Vardar E. *J Breast Health*, **2015**, 11, 59-66.
6. Zepeda-Castilla, E. J.; Recinos-Money, E.; Cuéllar-Hubbe, M.; Robles-Vidal, C. D.; Maafs-Molina, E. *Cir. Ciruj.*, **2008**, 76, 87–93
7. Goodman and Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*, 10ª edición. **2003**. McGraw-Hill Interamericana. pp.1397–1475.
b) Kaye B. Br., *J. Cancer.*, (1998), 78 Suppl 3: 1-7.
8. Cummings, M. R. *Conceptos de Genética*, 5ª edición. (1999). Prentice-Hall. pp.626-641.
9. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. *J Mol Cell Cardiol.*, **2012**, 52, 1213–1225.
10. Jain D. *J Nucl. Cardiol.*, **2000**, 7, 53–62.
11. Silber JH, Jakacki RI, Larsen RL, Goldwein JW, Barber G. *Med Pediatr Oncol.*, **1993**, 21, 477–9.
12. Allen A. *Semin Oncol.*, **1992**, 19, 529–42.
13. Pommier Y., Leo E., Zhang H. and Marchand C. *Chem. Biol.*, **2010**, 17, 421–433.
14. Matsumura Y., Maeda H., *Cancer Res.*, **1986**, 46, 6387–6392.
15. Maeda H., Bharate G.Y., Daruwalla J., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2009**, 71, 409–419.
16. Maeda H., Greish K., Fang J., *Adv. Polym. Sci.*, **2006**, 193, 103–121.
17. A.K. Iyer, K. Greish, J. Fang, H. Maeda. *Drug Discov. Today*, **2006**, 11, 812–818.
18. Maeda H. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, 46, 169–185.
19. Fang J., Sawa T., Maeda H., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2003**, 519, 29–49.
20. Greish K., Fang J., Inutsuka T., Nagamitsu A., Maeda H. *Clin. Pharmacokinet.*, **2003**, 42, 1089–1105.
21. Bae Y. H., Park K. *J. Control. Release*, **2011**, 153, 198–205.
22. Torchilin V. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2011**, 63, 131–135.
23. Savyasachi A. J., Kotova O., Shanmugaraju S., Bradberry S. J., Ó'Máille G.M., Gunnlaugsson T. *Chem.*, **2017**, 3, 764–811.
24. Zhou, J.; Li, J.; Du, X.; Xu, B. *Biomaterials*, **2017**, 129, 1–27.
25. Pastor, A.; Martínez-Viviente, E. *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, 252, 2314–2345.
26. Rojas-Aguirre Y., Aguado-Castrejón K., González- Méndez I. *Educ. quím.*, **2016**, 27, 286-291.
27. Wang, Y.; Huang, L. *Adv. Genet.*, **2014**, 88, 111–137.
28. Singh S.K., Singh S., Lillard J.W. Jr., Singh R. *Int J Nanomedicine*, **2017**, 12, 6205- 6218.
29. Bregoli L., Movia D., Gavigan-Imedio J. D., Lysaght J., Reynolds J., Prina-Mello A. *Nanomedicine*, **2016**, 12, 81–103.
30. Maity, A. R. y Stepensky, D. *Int J Pharm.*, **2015**, 15, 842–850.
31. Mura, S., Nicolas, J. y Couvreur, P. *Nat Mater.*, **2013**, 12, 991–1003.
32. Torchilin, V. P. *Nat Rev Drug Discov.*, **2014**, 13, 813-827.
33. Clas S.D., Sanchez R.I., Nofsinger R., *Drug Discov. Today*, **2014**, 19, 79-87.

34. Rollas S., Küçükgülzel G. *Open Drug Deliv. J.*, **2008**, 2, 77–85.
35. Luo C., Sun J., Sun B., He Z. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2014**, 35, 556–566.
36. Sharma, A. K.; Gothwal, A.; Kesharwani, P.; Alsaab, H.; Iyer, A. K.; Gupta, U. *Drug Discov. Today*, **2017**, 22 (2), 314–326.
37. Nanjwade B. K., Bechra H. M., Derkar G. K., Manvi F. V., Nanjwade V. K. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2009**, 38 (3), 185–196.
38. Svenson S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2009**, 71 (3), 445–462.
39. Esfand R., Tomalia D. A. *Drug Discov. Today*, **2001**, 6 (8), 427–436.
40. Kesharwani P., Gothwal A., Iyer A. K., Jain K., Chourasia M. K., Gupta U. *Drug Discov. Today*, **2018**, 23 (2), 300–314.
41. Cheng Y., Xu Z., Ma M., Xu T. *J. Pharm. Sci.*, **2008**, 97 (1), 123–143.
42. Tomalia D. A. *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, 30 (3–4), 294–324.
43. Tomalia D. A., Baker H., Dewald J., Hall M., Kallos G., Martin S., Roeck J., Ryder J., Smith P. *Polym. J.*, **1986**, 19(9), 117–132.
44. Labieniec-Watala M., Watala C. *J. Pharm. Sci.*, **2015**, 104 (1), 2–14.
45. Maiti P. K., Çağın T., Lin S. T., Goddard W. A. *Macromol.*, **2005**, 38 (3), 979–991.
46. Luong D., Kesharwani P., Deshmukh R., Mohd Amin M. C. I., Gupta U., Greish K., Iyer A. K. *Acta Biomater*, **2016**, 43, 14–29.
47. Yang, J.; Zhang, Q.; Chang, H.; Cheng, Y. *Chem. Rev.*, **2015**, 115 (11), 5274–5300.
48. Roessler B. J., Bielinska A. U., Janczak K., Lee I., Baker J. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 283 (1), 124–129.
49. Arima H., Kihara F., Hirayama F., Uekama K. *Bioconjug. Chem.*, **2001**, 12 (4), 476–484.
50. Gómez-Galván F., Pérez-Álvarez L., Matas J., Álvarez-Bautista A., Poejo J., Duarte C. M., Ruiz-Rubio L., Vila-Vilela J. L., León L. M. *Carbohydr. Polym.*, **2016**, 142, 149–157.
51. Zafar N., Fessi H., Elaissari A. *Int. J. Pharm.*, **2014**, 461 (1–2), 351–366.
52. Varan G., Varan C., Erdoğar N., Hincal A. A., Bilensoy E. *Int. J. Pharm.*, **2017**, 531 (2), 457–469.
53. Abarca R. L., Rodríguez F. J., Guarda A., Galotto M. J., Bruna J. E. *Food Chem.*, **2016**, 196, 968–975.
54. Liu B., Zhou H., Zhou S., Yuan J. *Eur. Polym. J.*, **2015**, 65, 63–81.
55. Huisgen, R. *Angew. Chem.*, **1963**, 13 (1938), 604–637.
56. Tornøe C. W., Christensen C., Meldal M. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67 (9), 3057–3064.
57. Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B. *Angew. Chemie-Int. Ed.* **2001**, 40 (11), 2004–2021.
58. Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, 41 (14), 2596–2599.
59. Le H. T., Jeon H. M., Lim C. W., Kim T. W. *J. Pharm. Sci.*, **2014**, 103 (10), 3183–3189.
60. Díaz D. D., Finn M. G., Sharpless K. B., Fokin V., Hawker J. *An. Quím.*, **2008**, 104 (3), 173–180.
61. Meghani N. M., Amin H. H., Lee B. J. *Drug Discov. Today*, **2017**, 22 (11), 1604–1619.
62. Xu L., Li Y., Li Y. *Asian J. Org. Chem.*, **2014**, 3 (5), 582–602.
63. Luo G., Xu X., Zhang J., Yang J., Gong Y, Lei Q., Jia H., Li C., Zhuo R. and Zhang X., *Appl. Mater. Interfaces*, **2012**, 4, 5317–5324.
64. Valeur E., Bradley M. *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 2, 606–631.
65. El-faham A., Albericio F. *J. Peptide Sci.*, **2010**, 16, 6–9.
66. Landeros J.M., Belmont-Bernal F., Pérez-González A.T., Pérez-Padrón M.I., Guevara-Salazar P. González-Herrera I.G., Guadarrama P. *Mater. Sci. Eng. C*, **2017**, 71, 351-362
67. Ke X., Coady D.J., Yang C., Engler A.C., Hedrick J.L., Yang Y.Y. *Polym. Chem.*, **2014**, 5, 2621-2628.
68. Liu H., Qiao C., Yang J., Zhang X. *J. Mater. Chem. B*, **2014**, 2, 5910–5924.

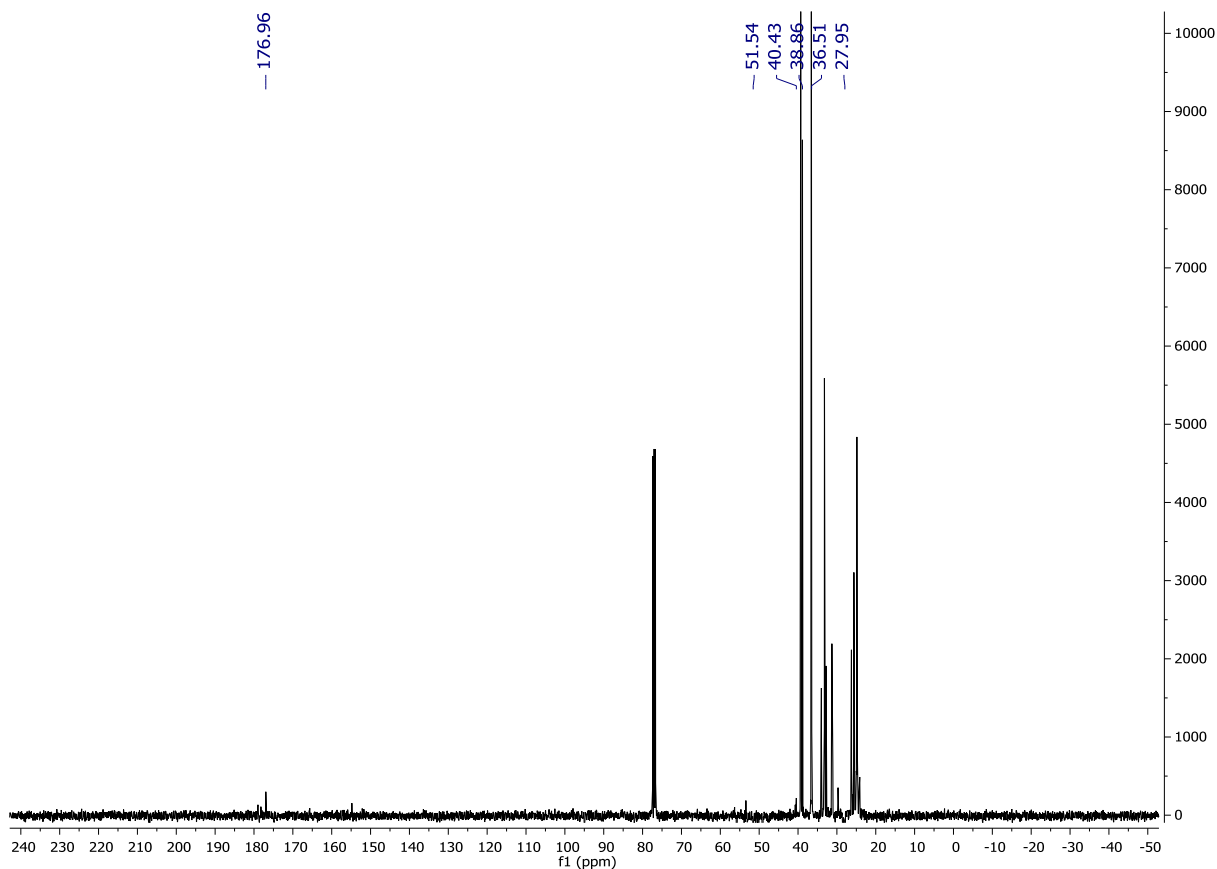
69. Barthwal R., Srivastava N., Sharma U., Govilb G. *J Mol Struct.*, **1994**, 327, 201–220.
70. Demir P., Akman F., *J. Mol. Struct.*, **2017**, 1134, 404-415.
71. Akman F. *Can. J. Phys.*, **2016**, 94, 853-864.
72. Zhong N., Byun H.S., Bittnan R. *Tetrahedron Let.*, **1998**, 39, 2919–2920.
73. Liu H., Zhang Y., Hu J., Li C., Liu S. *Macromol. Chem. Phys.*, **2009**, 210, 2125-2137.
74. Folgado E., Guerre M., Bijani C., Ladmiral V., Caminade A.-M., Ameduri B., Ouali A. *Polym. Chem.*, **2016**, 7, 5625-5629.
75. Rahmani S., Mahani A. S. Z. *Macromol. Res.*, **2015**, 23 (11), 1018–1025.
76. Mallard-Favier I., Blach P., Cazier F., Delattre F. *Carbohydr. Res.*, **2009**, 344, 161–166.
77. Messner M, Kurkov SV, Jansook P, Loftsson T. *J. of Pharm.*, **2010**, 387, 199–208.
78. Bock K. & Duus Ø J. *J. Carbohydr. Chem.*, **1994**, 13(4), 513-543
79. Loftsson, T., Brewster M. E. *J. Pharm. Sci.*, **1996**, 85(10), 1017–1025.
80. Coleman A.W., Nicolis I., Keller N., Dalbiez J.P. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.*, **1992**, 13, 139-143.
81. Szejtli, J. *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1743–1753.
82. Luong D., Kesharwani P., Deshmukh R., Mohd Amin M.C.I., Gupta U., Greish K., Iyer A.K. *Acta Biomater.*, **2016**, 43, 14–29.
83. Schneider H.J., Hacket F., Rudiger V. *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1755-1785
84. Mura, P. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2015**, 113, 226–238.
85. Zeng Y., Li P., Liu X., Yu T., Chen J., Yang G., Li Y. (2014). *Polym. Chem.*, **2014**, 5, 5978–5984.
86. Jozwiakowski M. J., Connors, K. A. *Carbohydr. Res.*, **1985**, 143, 51–59.

10. ANEXOS.

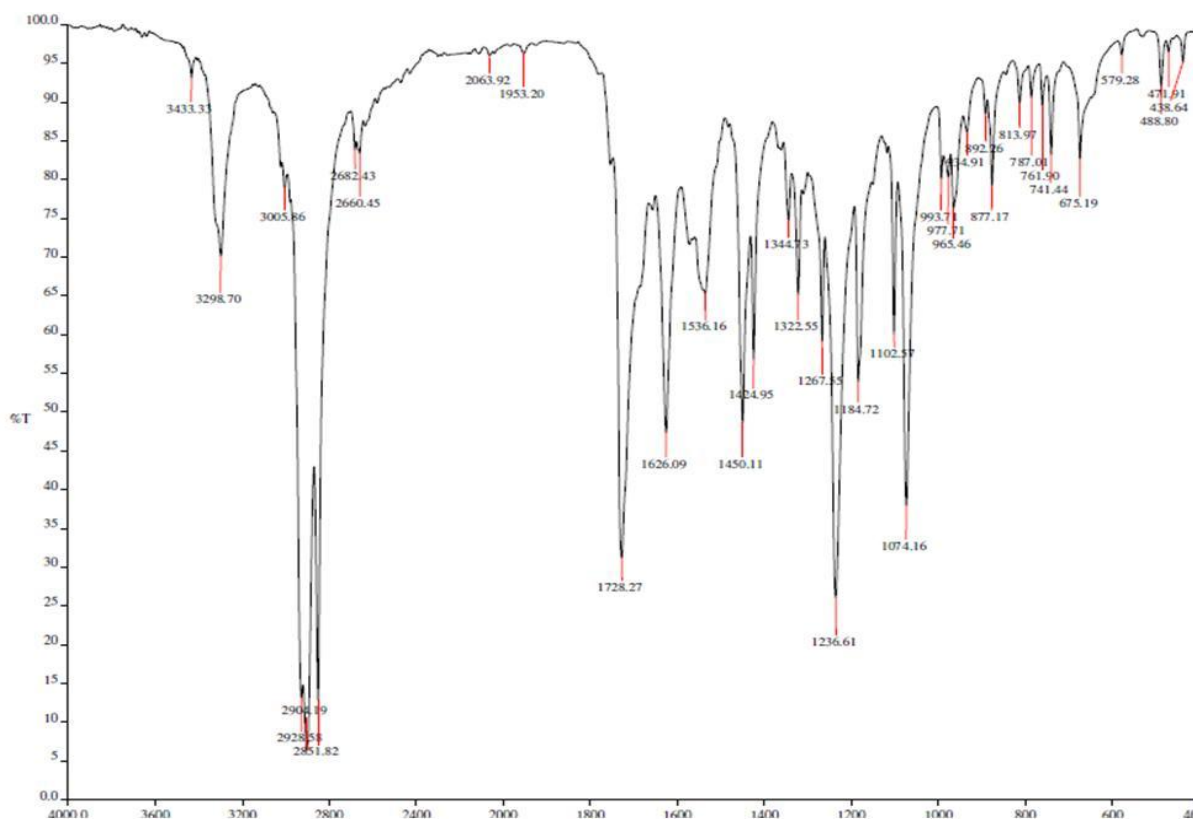
**(ESPECTROS RMN ^1H , ^{13}C , 2D; COSY,
NOESY, HMQC, IR, EM, DSC y TGA)**



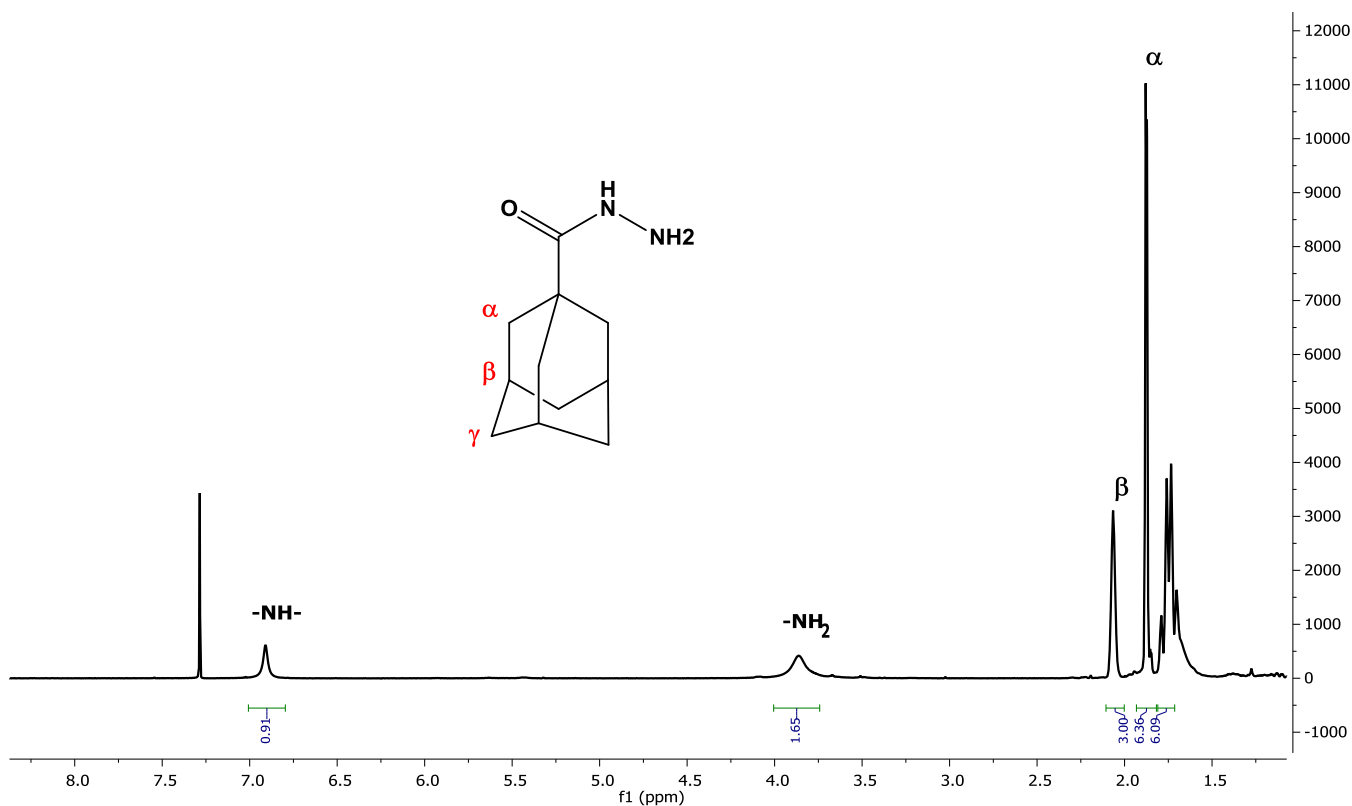
Espectro 1. RMN ¹H del 1-metoxycarbonil adamantano en CDCl₃ a 400 MHz.



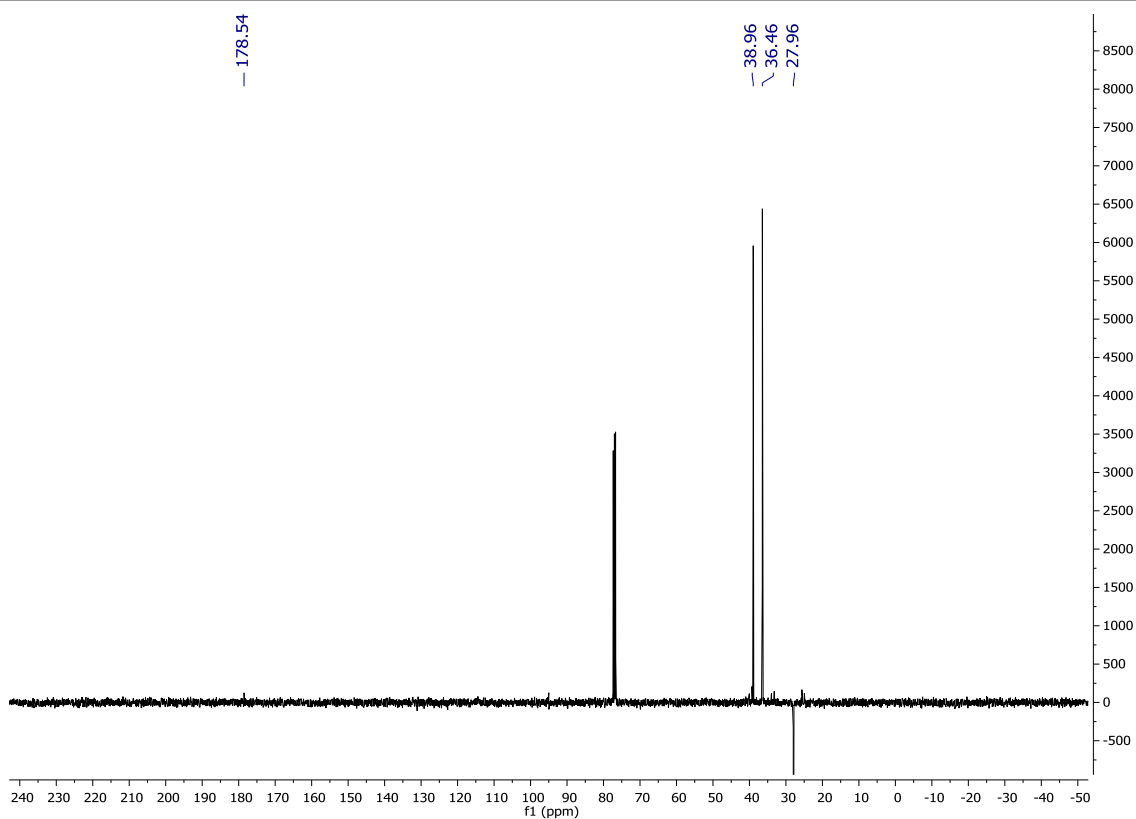
Espectro 2. RMN ¹³C del 1-metoxycarbonil adamantano en CDCl₃ a 400 MHz.



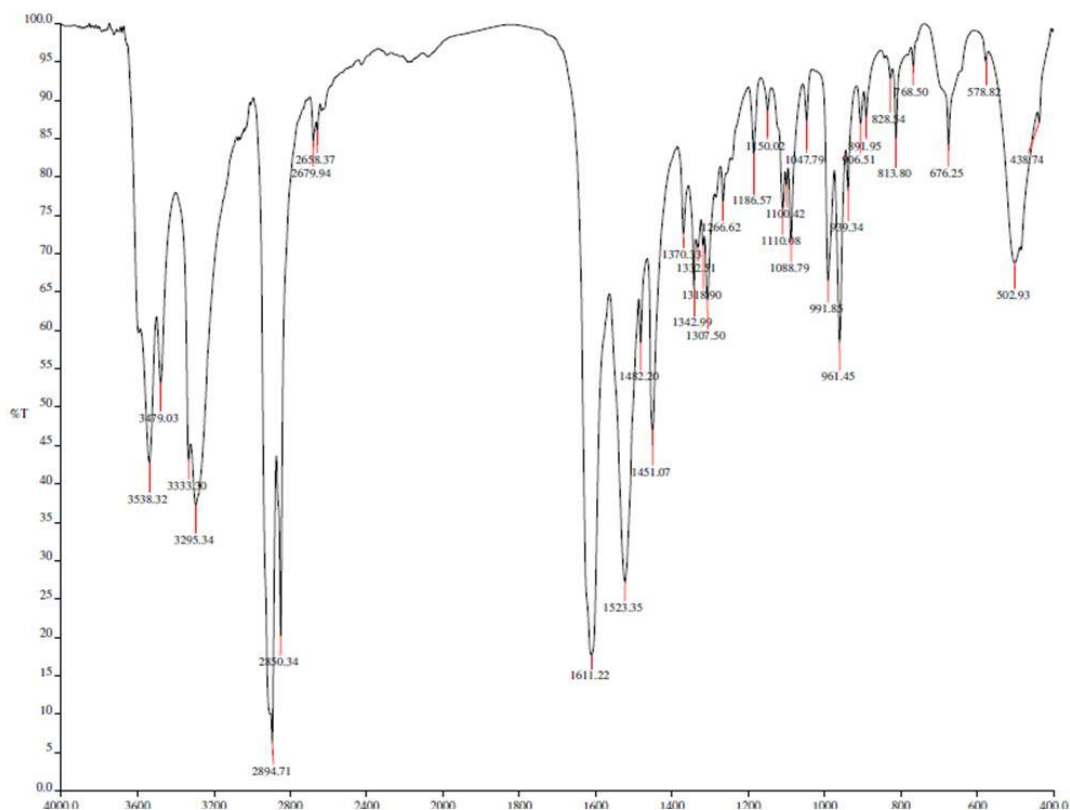
Espectro 3. FT-IR (ATR) del 1-metoxicarbonil adamantano.



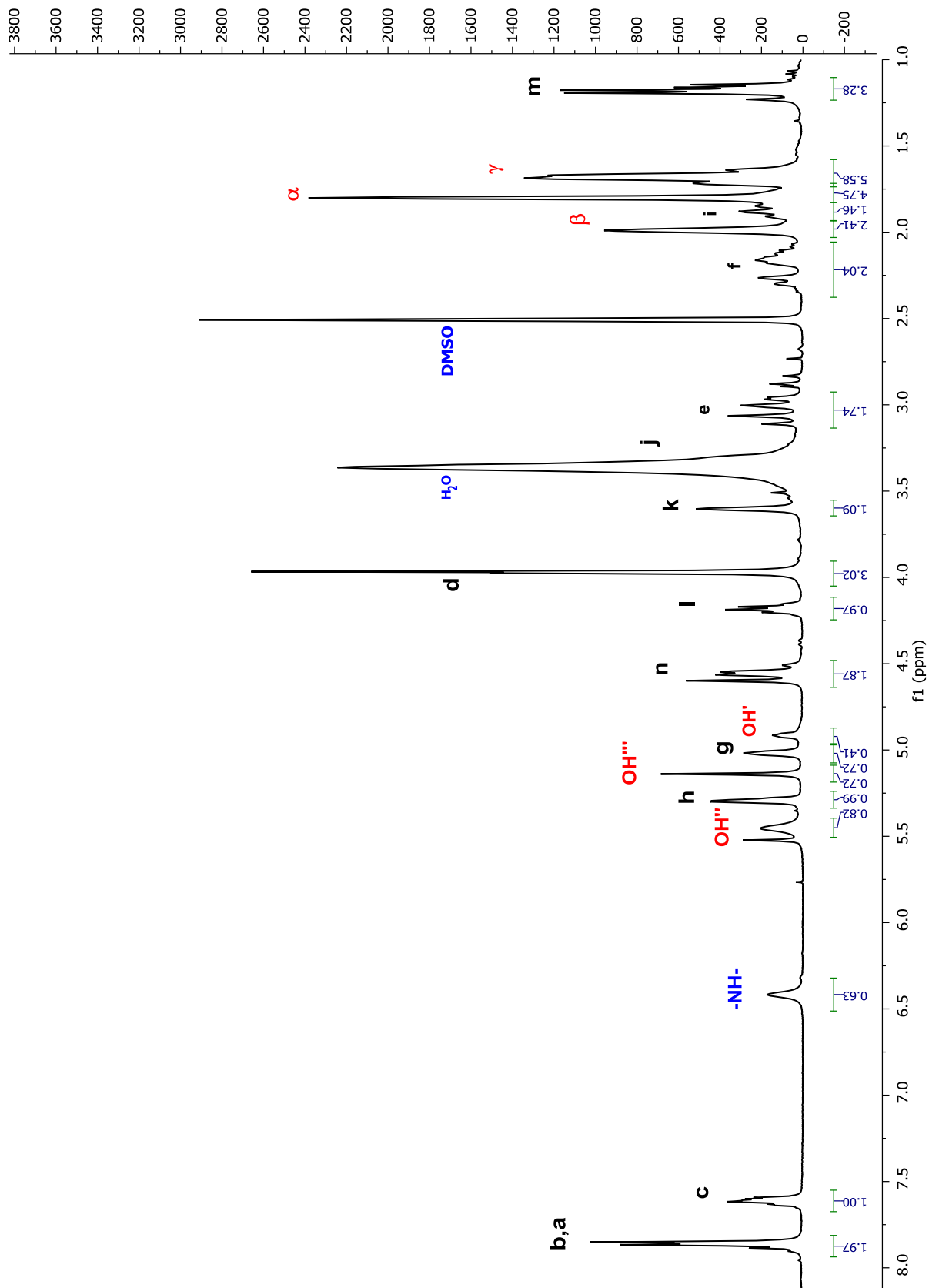
Espectro 4. RMN ^1H de la hidrazida del ácido adamantancarboxílico en CDCl_3 a 400 MHz.



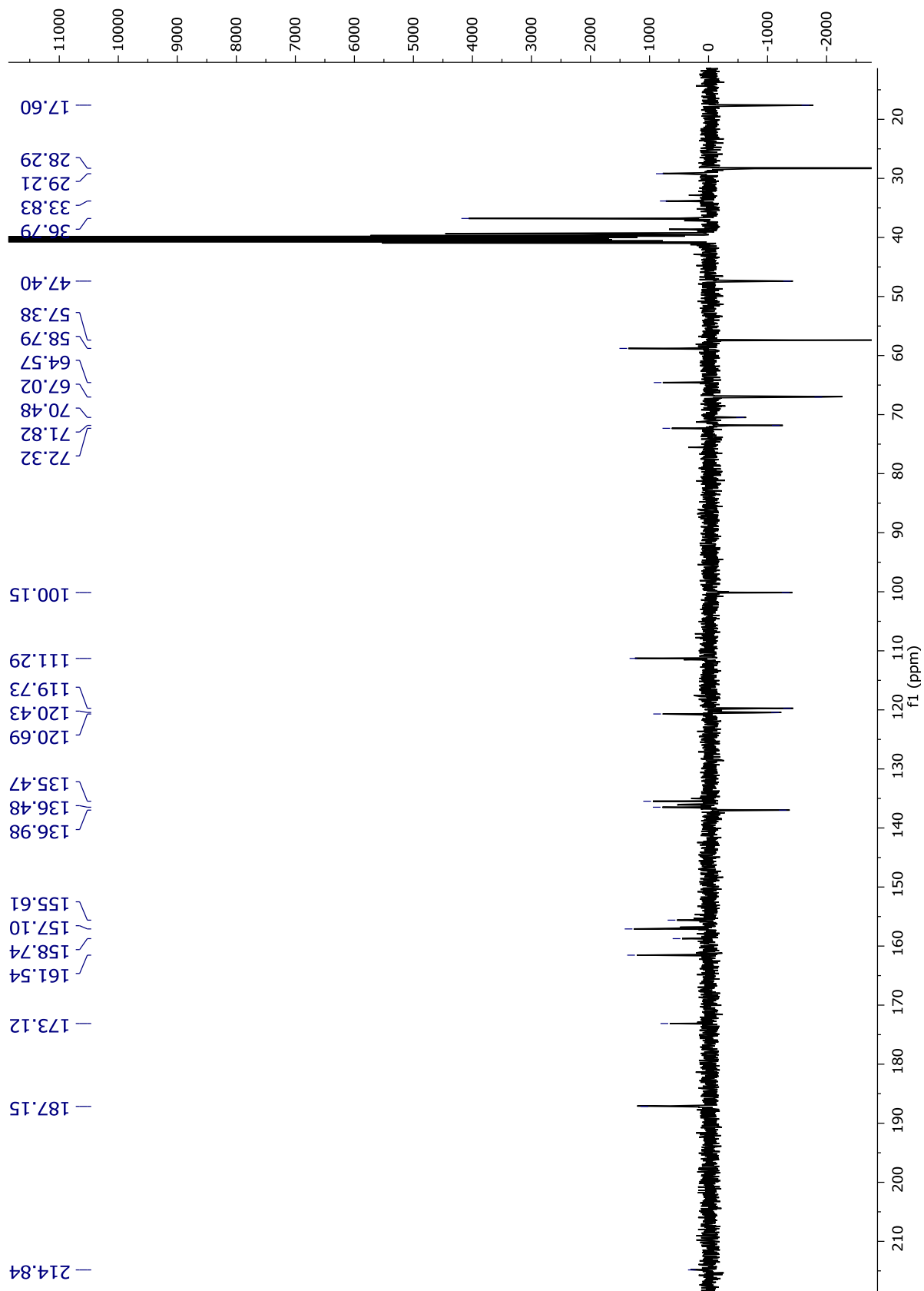
Espectro 5. RMN ^{13}C (DEPTQ) de la hidrazida del ácido adaman carboxílico a 400 MHz.



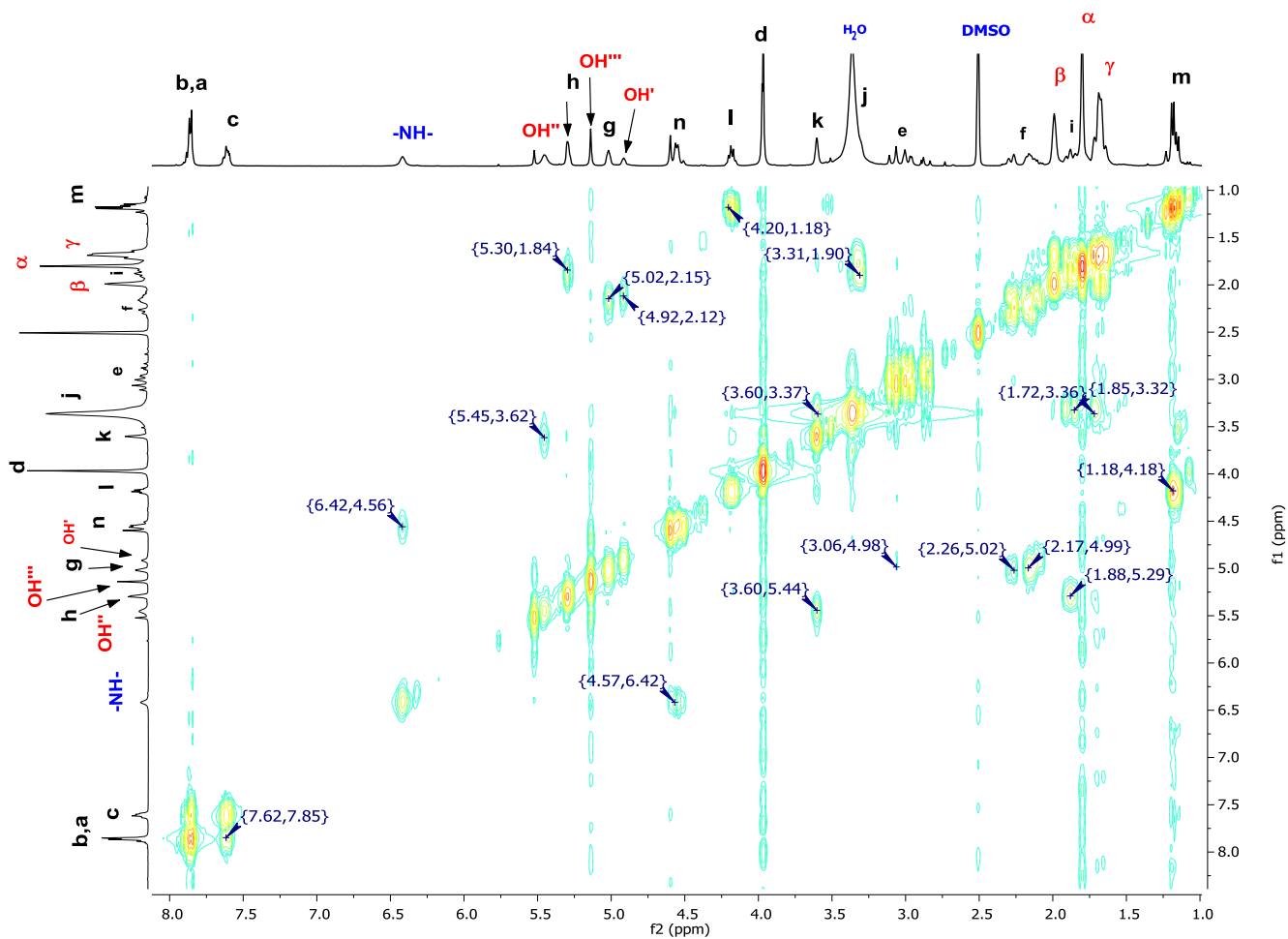
Espectro 6. FT-IR (ATR) de la hidrazida del ácido adaman carboxílico



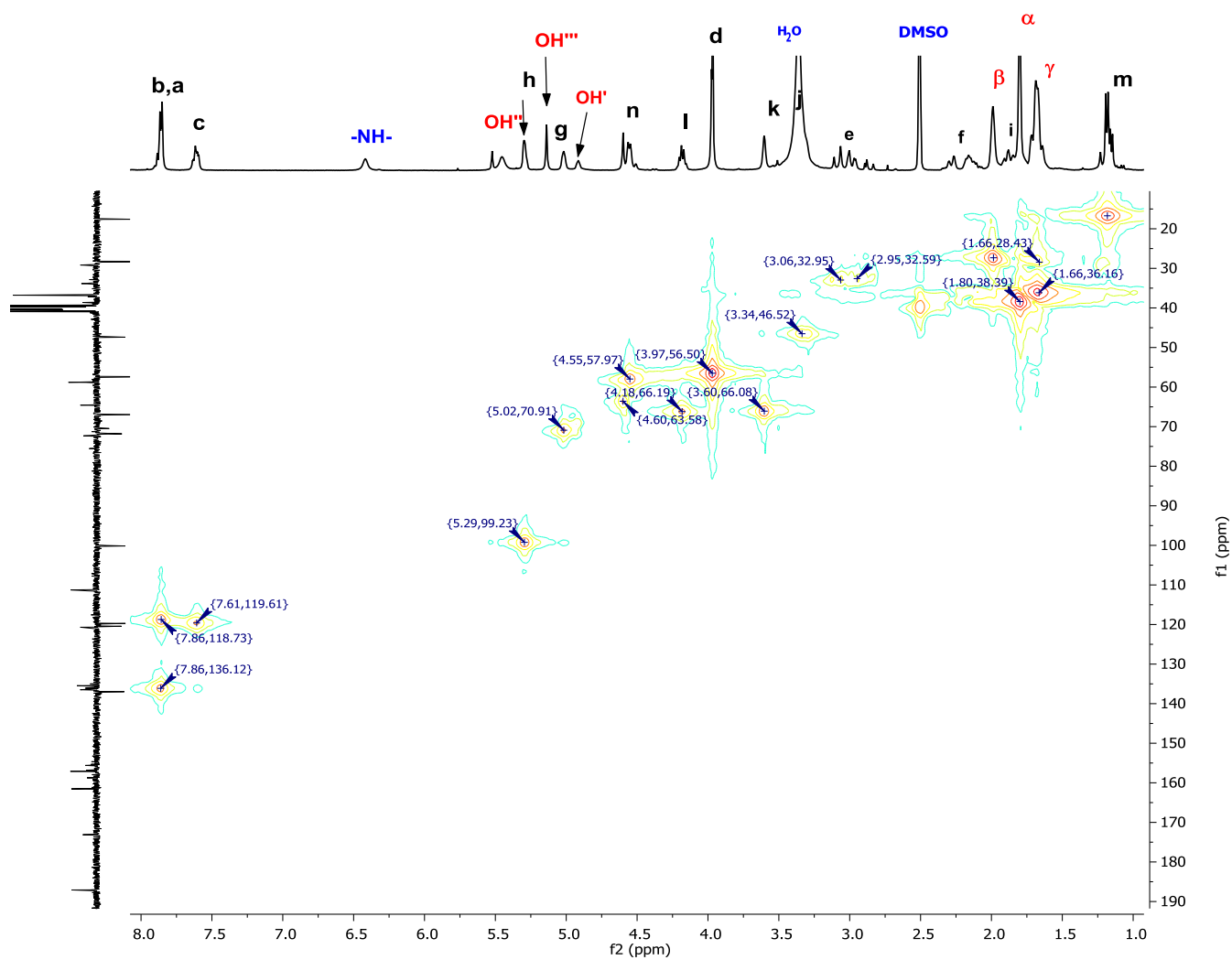
Espectro 7. RMN ¹H del profármaco Ad-h-Dox en DMSO-d₆ a 400 MHz.



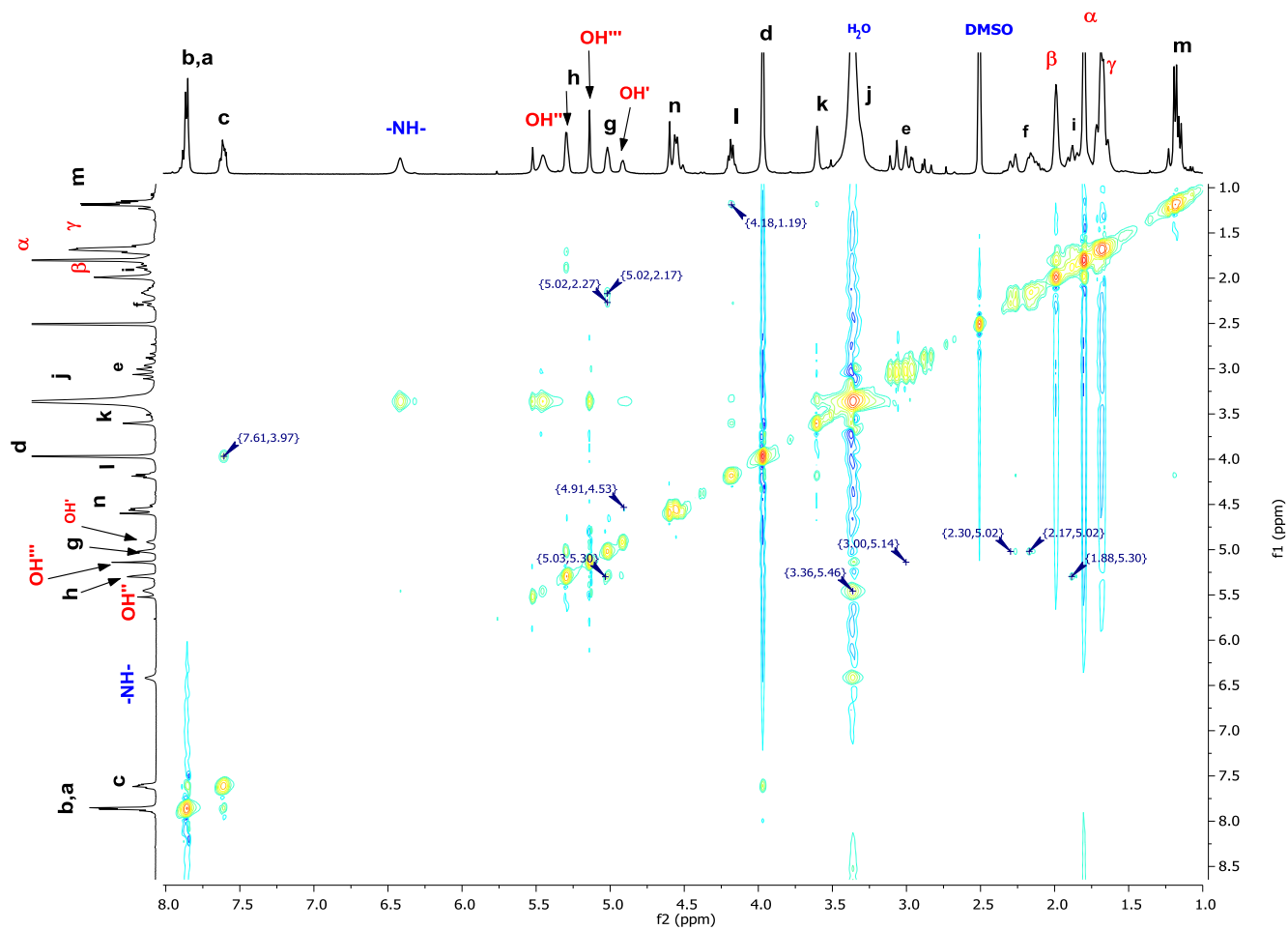
Espectro 8. RMN ^{13}C del profármaco Ad-h-Dox en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



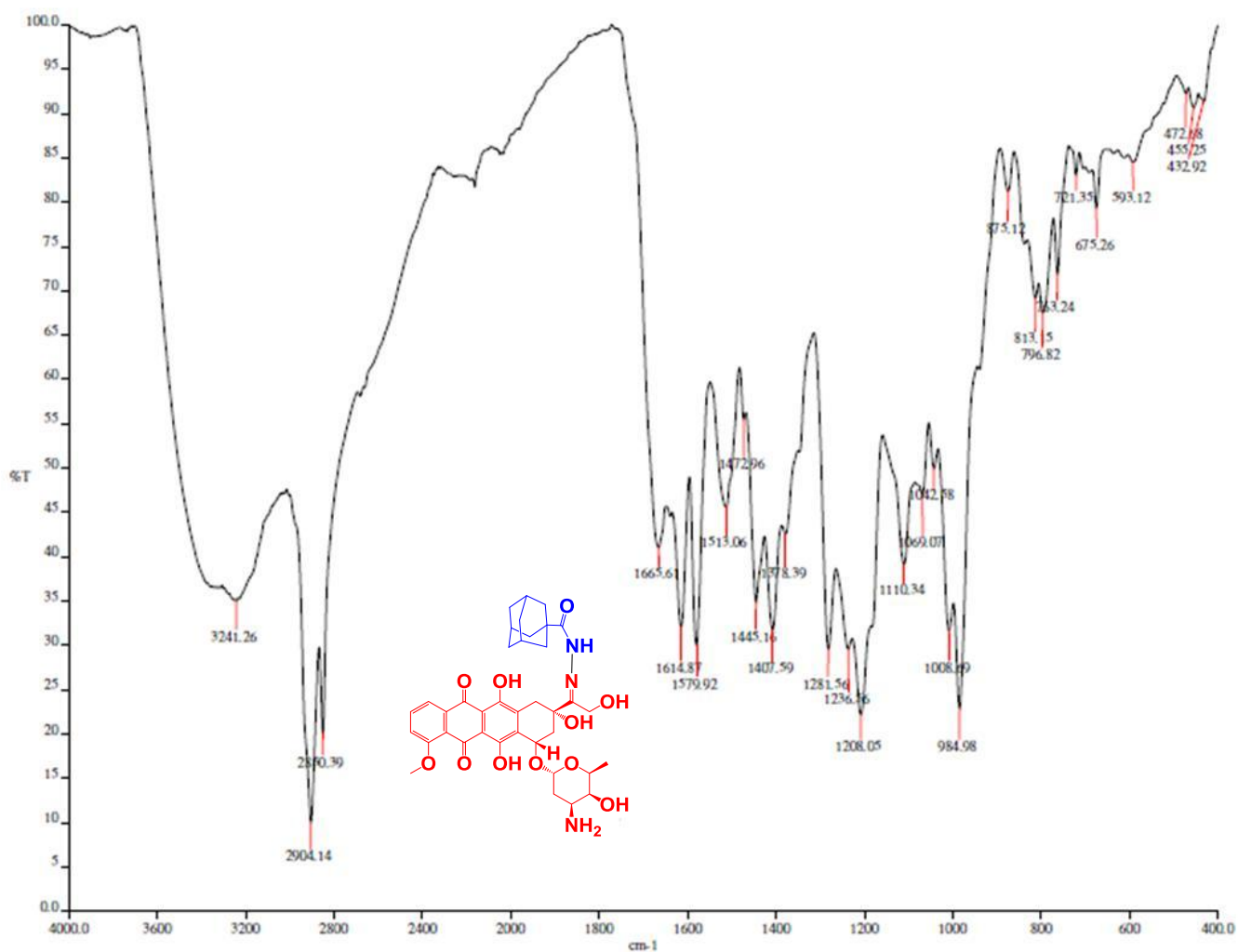
Espectro 9. RMN 2D ^1H - ^1H COSY del profármaco Ad-h-Dox en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



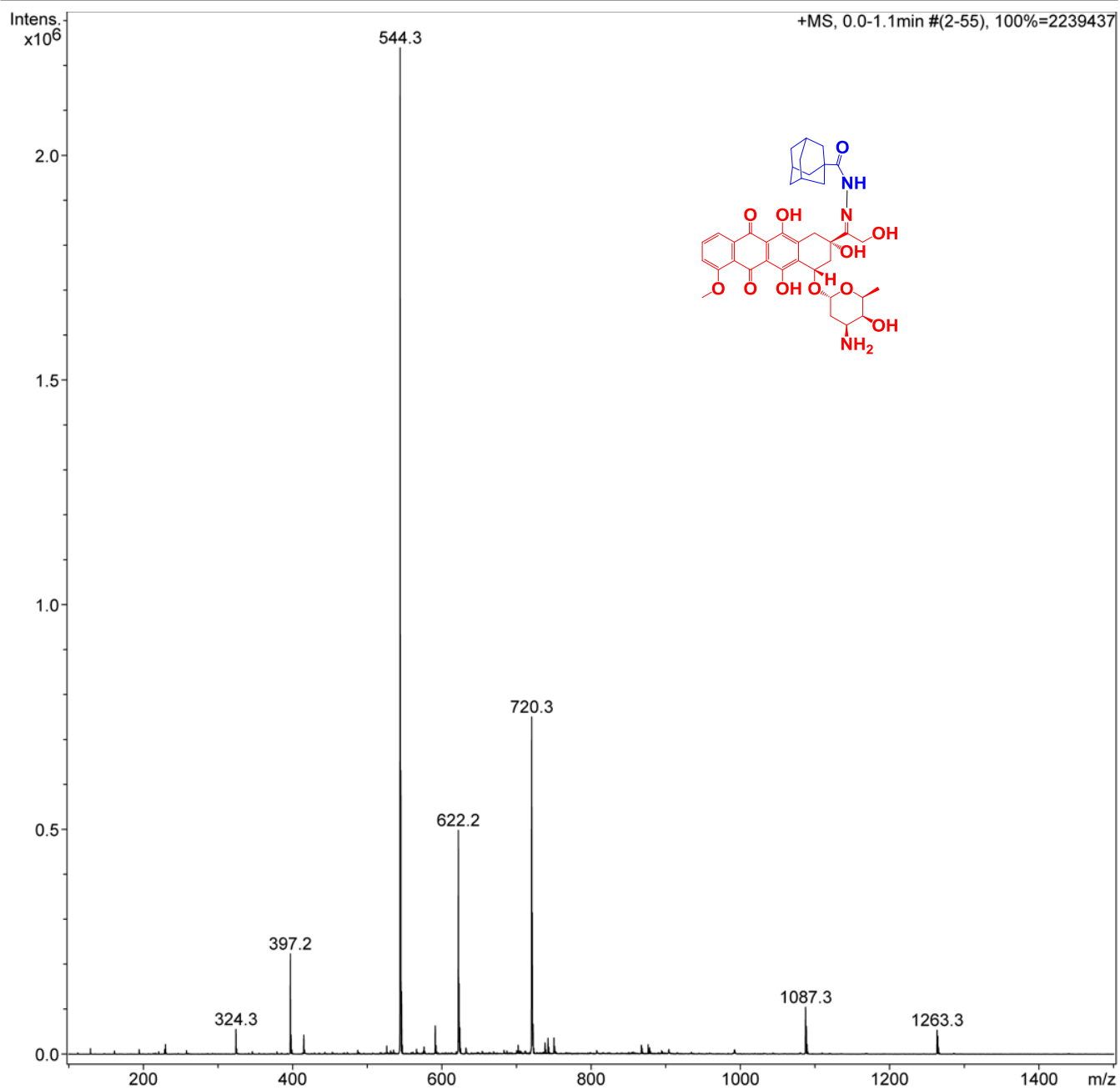
Espectro 10. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC del profármaco Ad-h-Dox en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



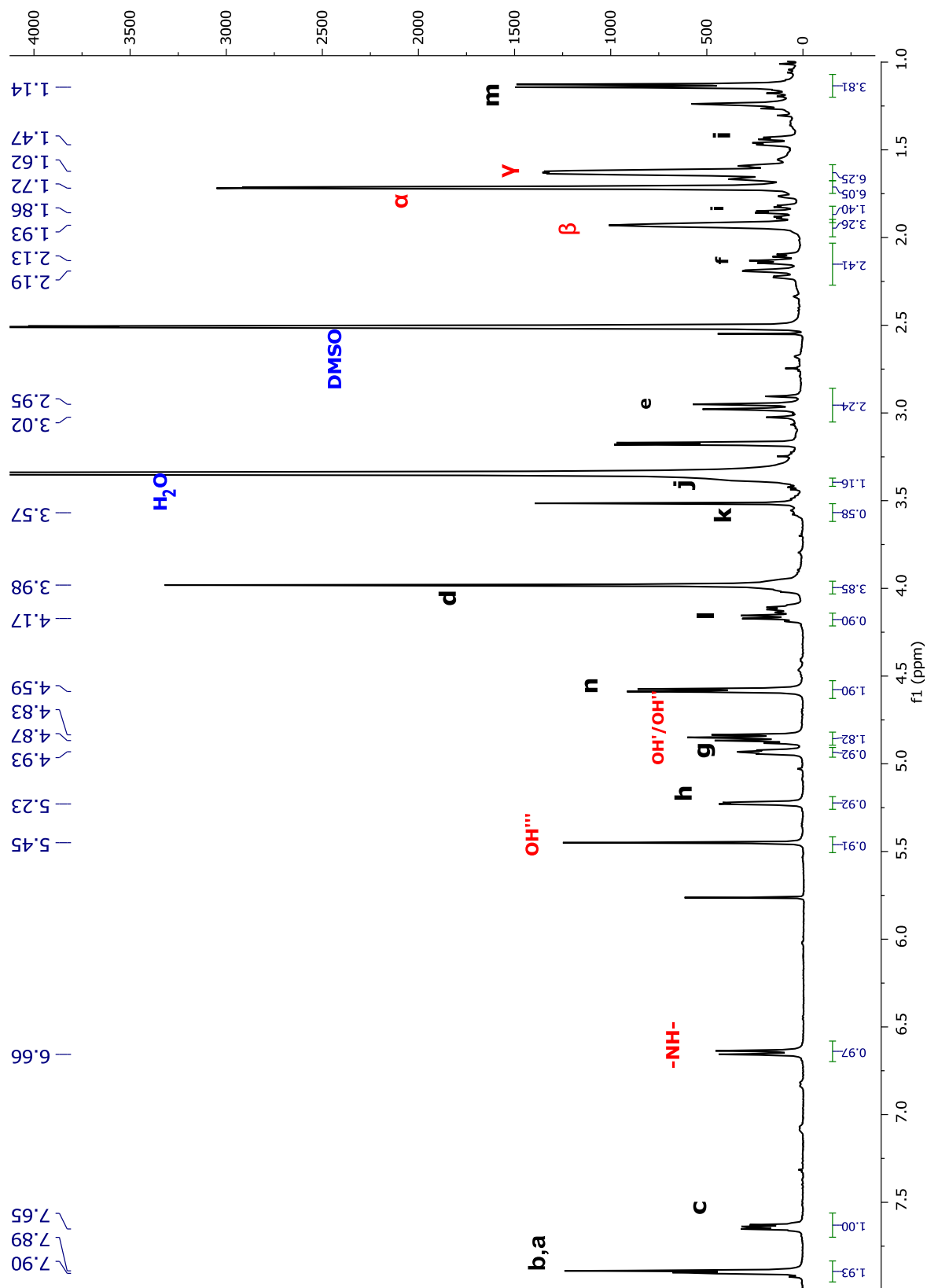
Espectro 11. RMN 2D ^1H - ^1H NOESY del profármaco Ad-h-Dox en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



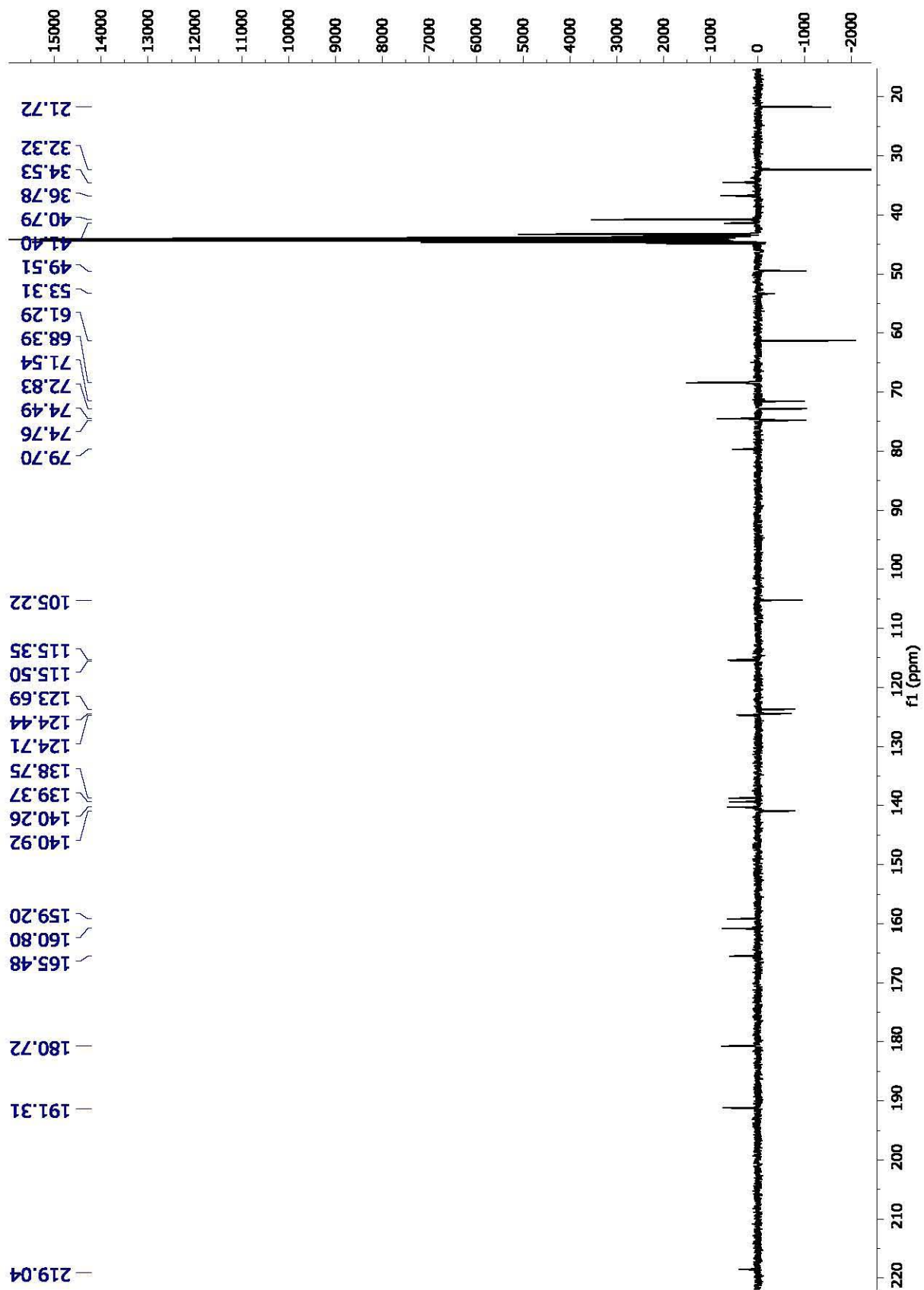
Espectro 12. FT-IR(ATR) de Ad-h-Dox



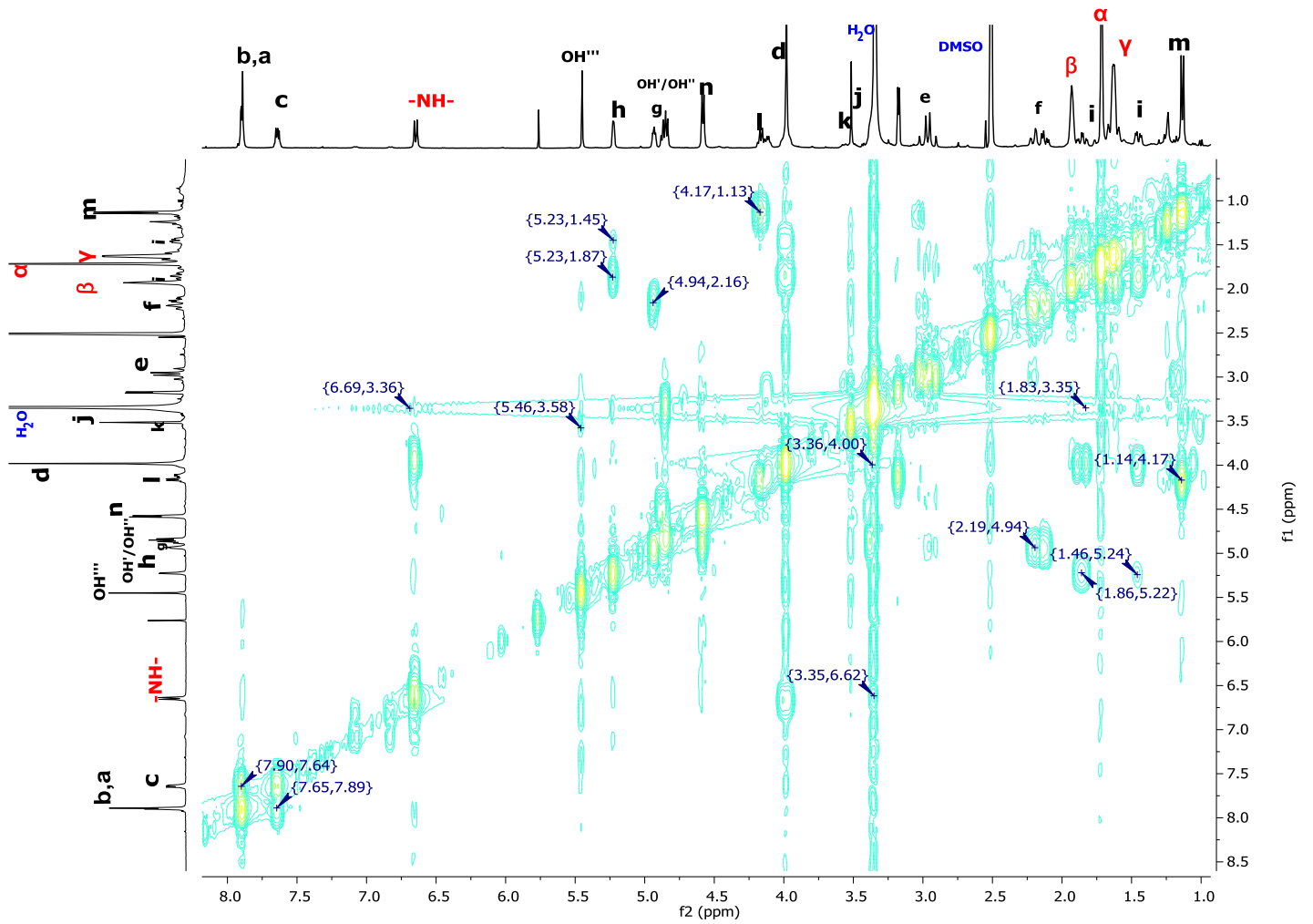
Espectro 13. EM (ESI) del profármaco Ad-h-Dox



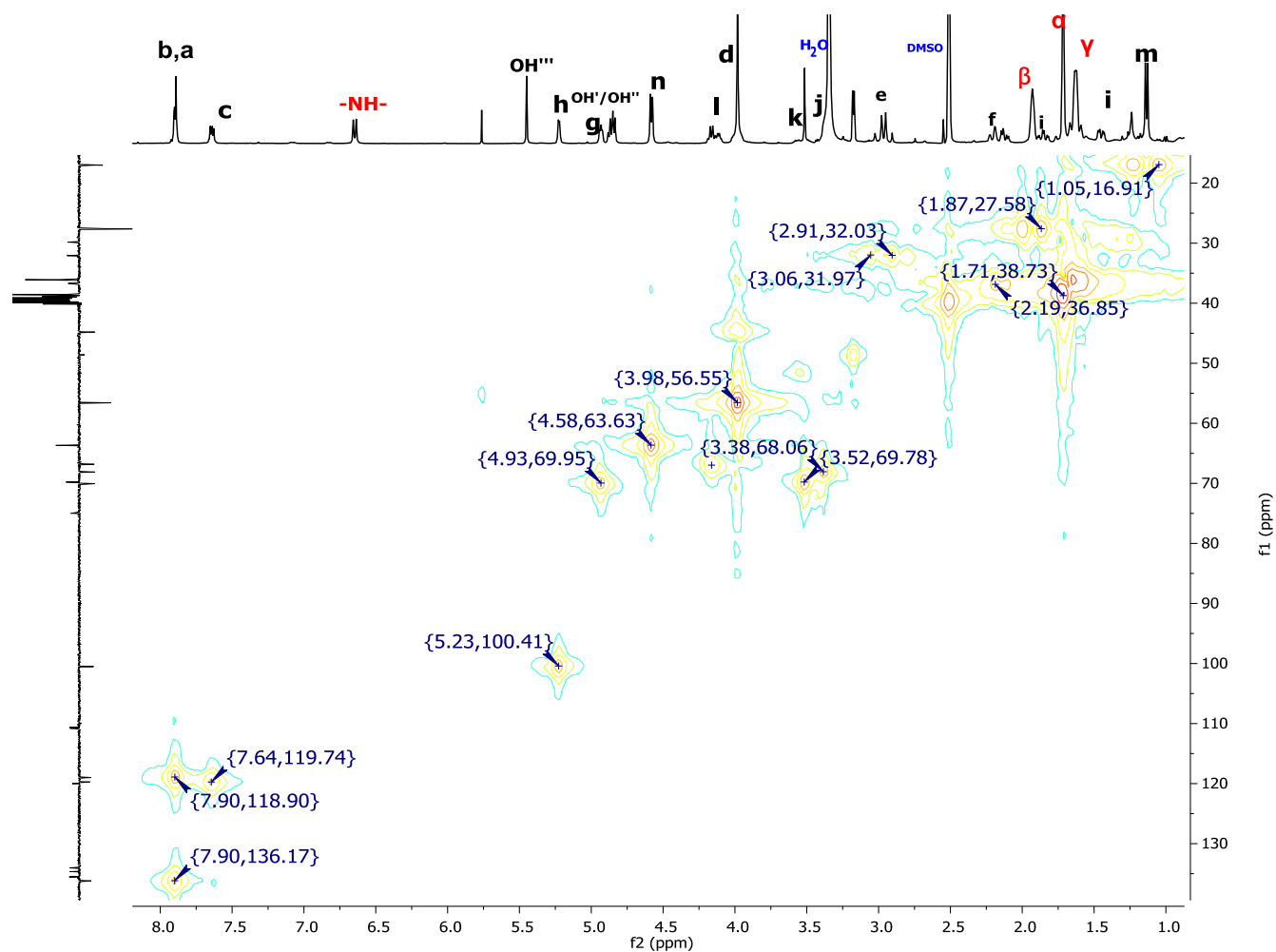
Espectro 14. RMN ¹H del profármaco Ad-a-Dox en DMSO-*d*₆ a 400 MHz.



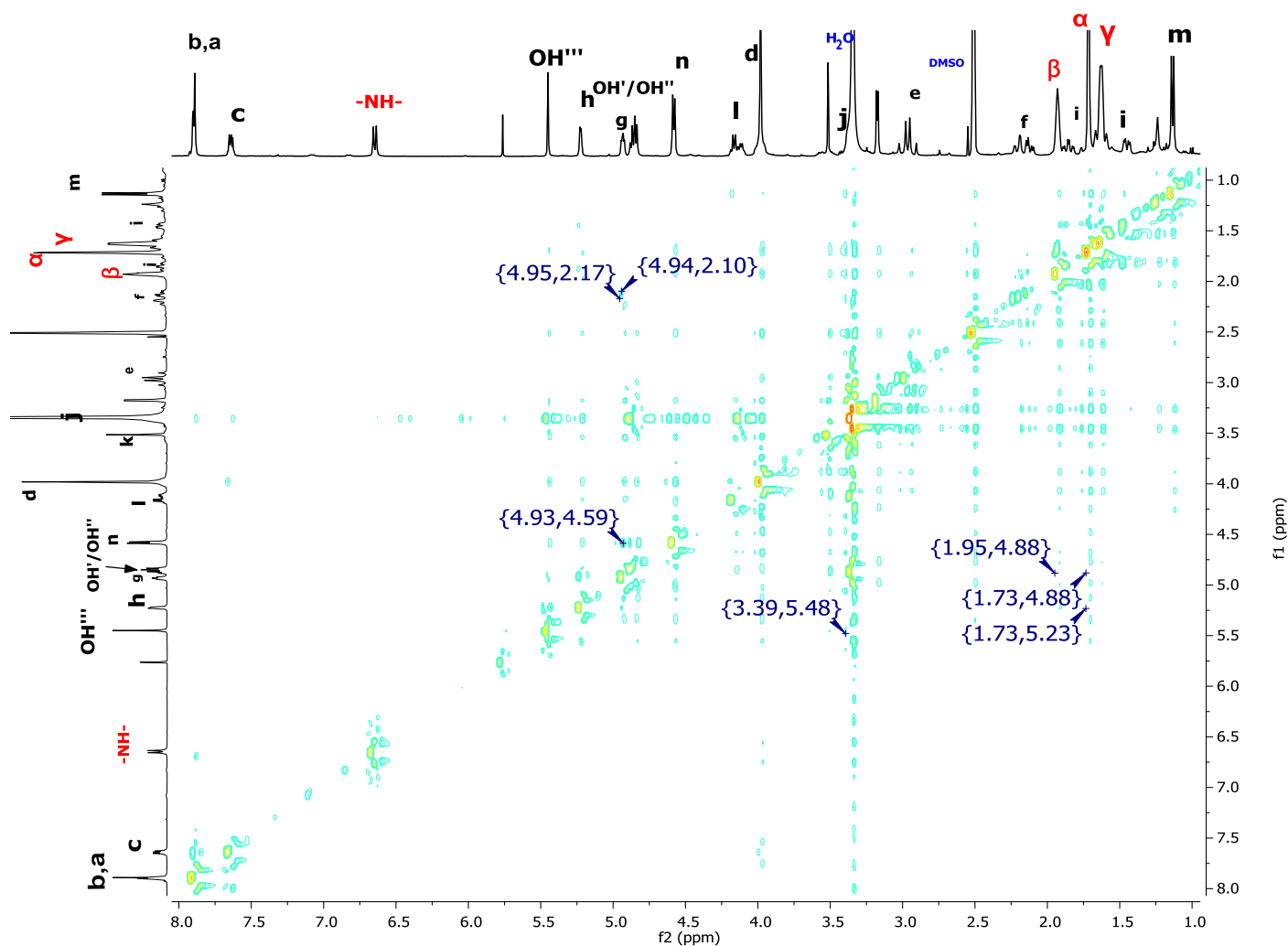
Espectro 15. RMN ^{13}C (DEPTQ) del profármaco Ad-a-Dox en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



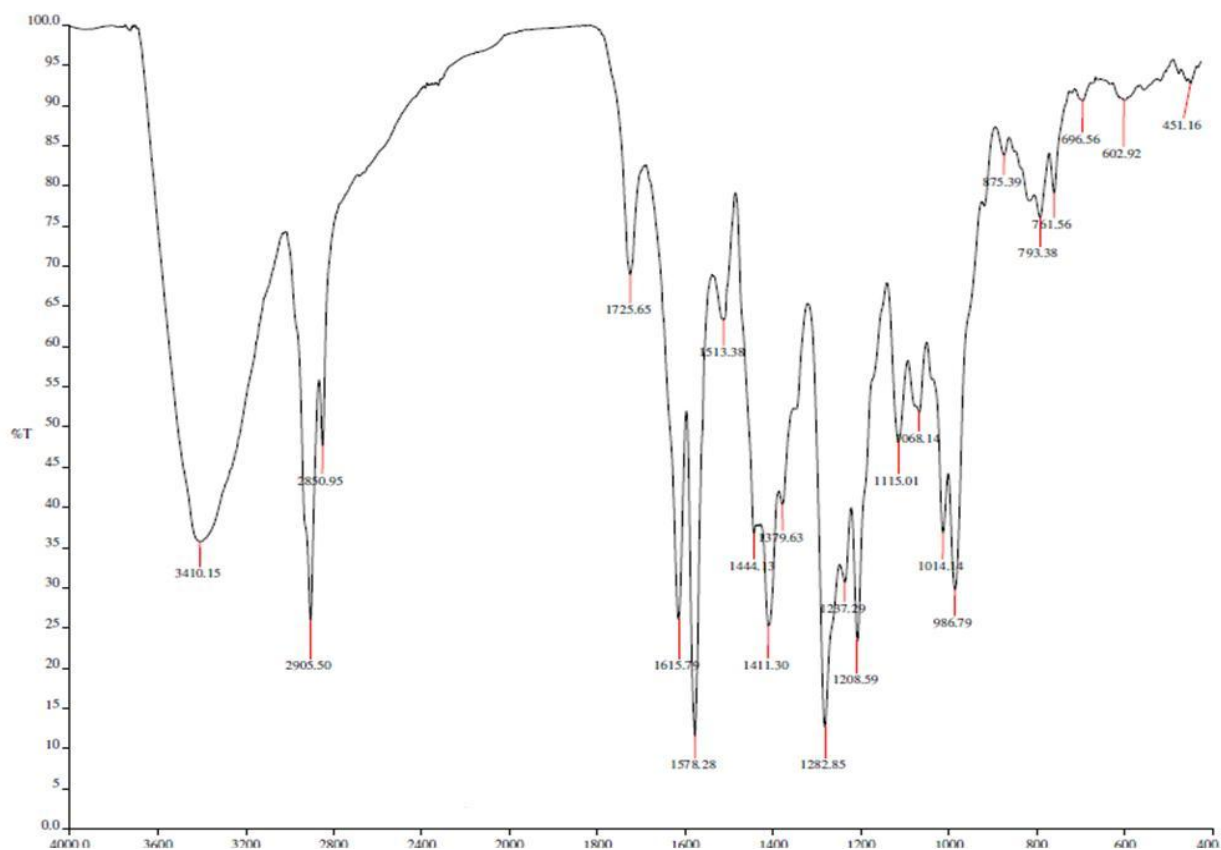
Espectro 16. RMN 2D ^1H - ^1H COSY del profármaco Ad-a-Dox en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



Espectro 17. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC del profármaco Ad-a-Dox en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



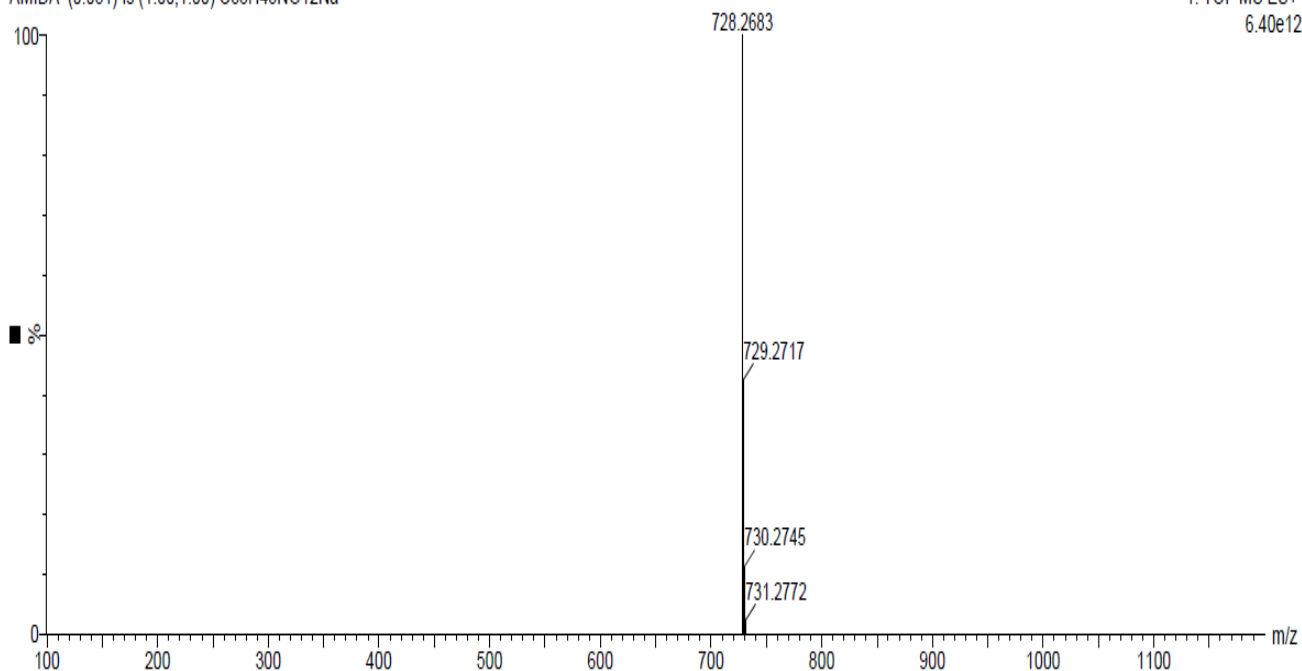
Espectro 18. RMN 2D ^1H - ^1H NOESY del profármaco Ad-a-Dox en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



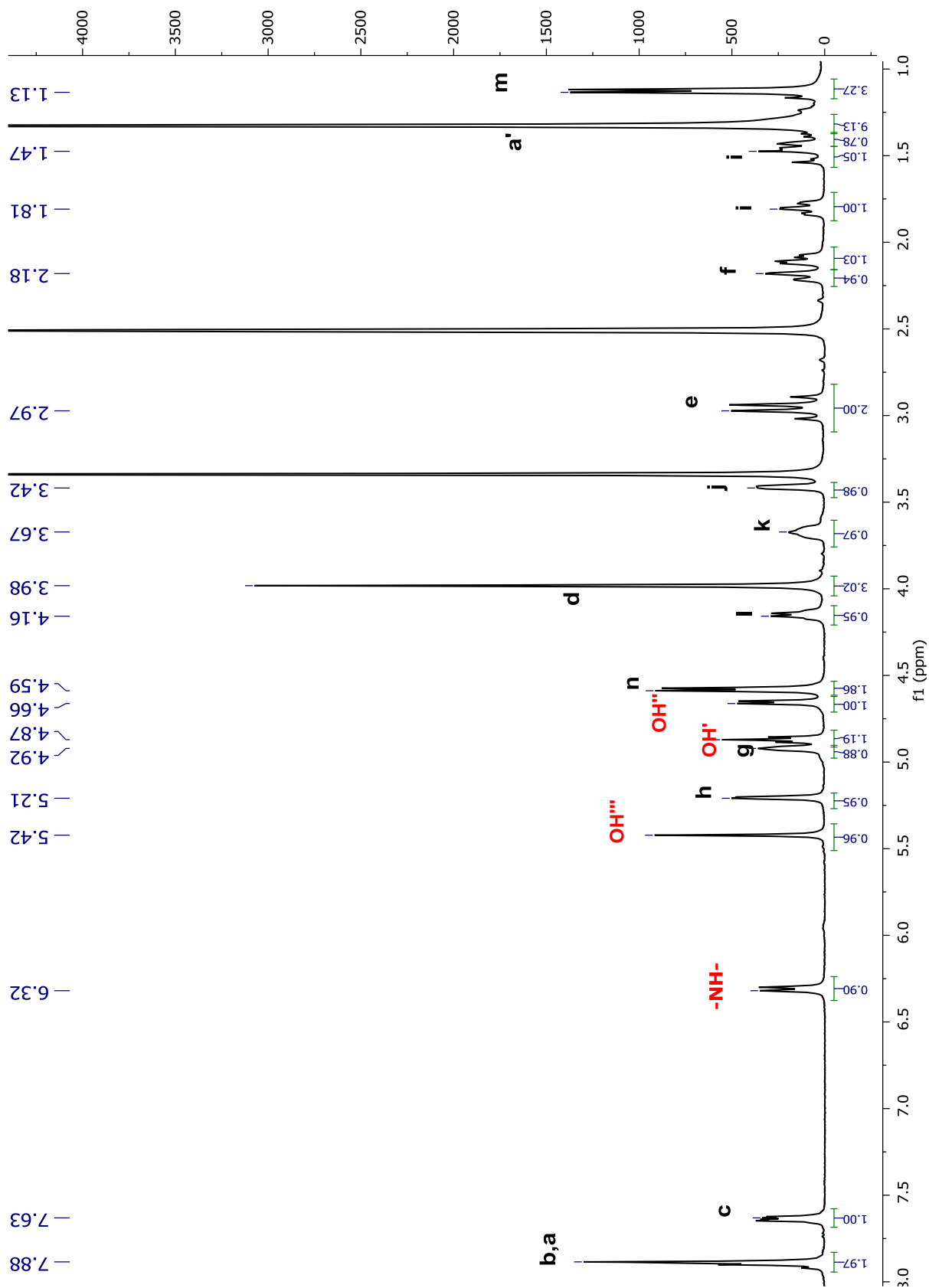
Espectro 19. FT-IR(ATR) de Ad-a-Dox

AMIDA (0.031) Is (1.00,1.00) C₃₈H₄₃NO₁₂Na

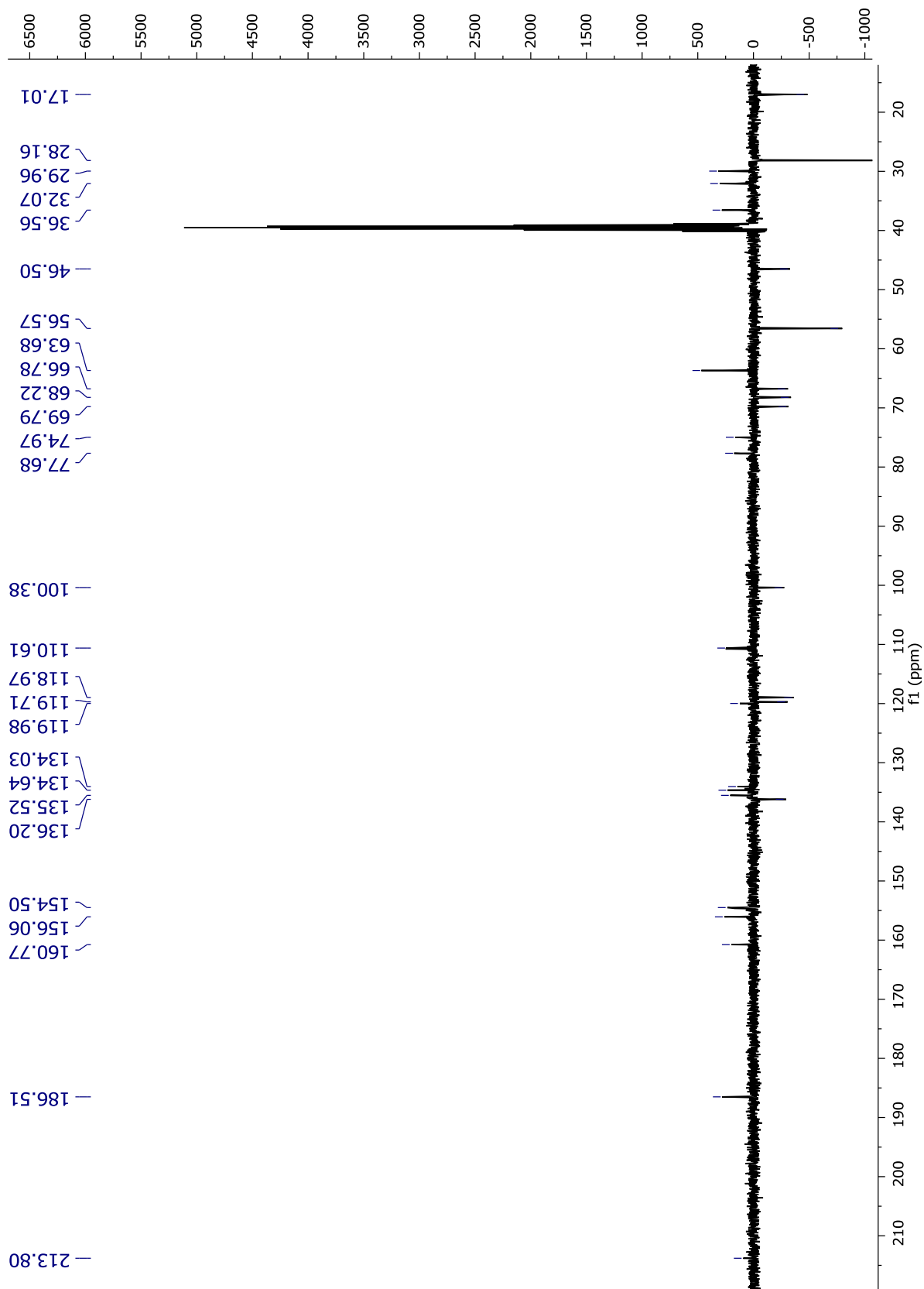
1: TOF MS ES+
6.40e12



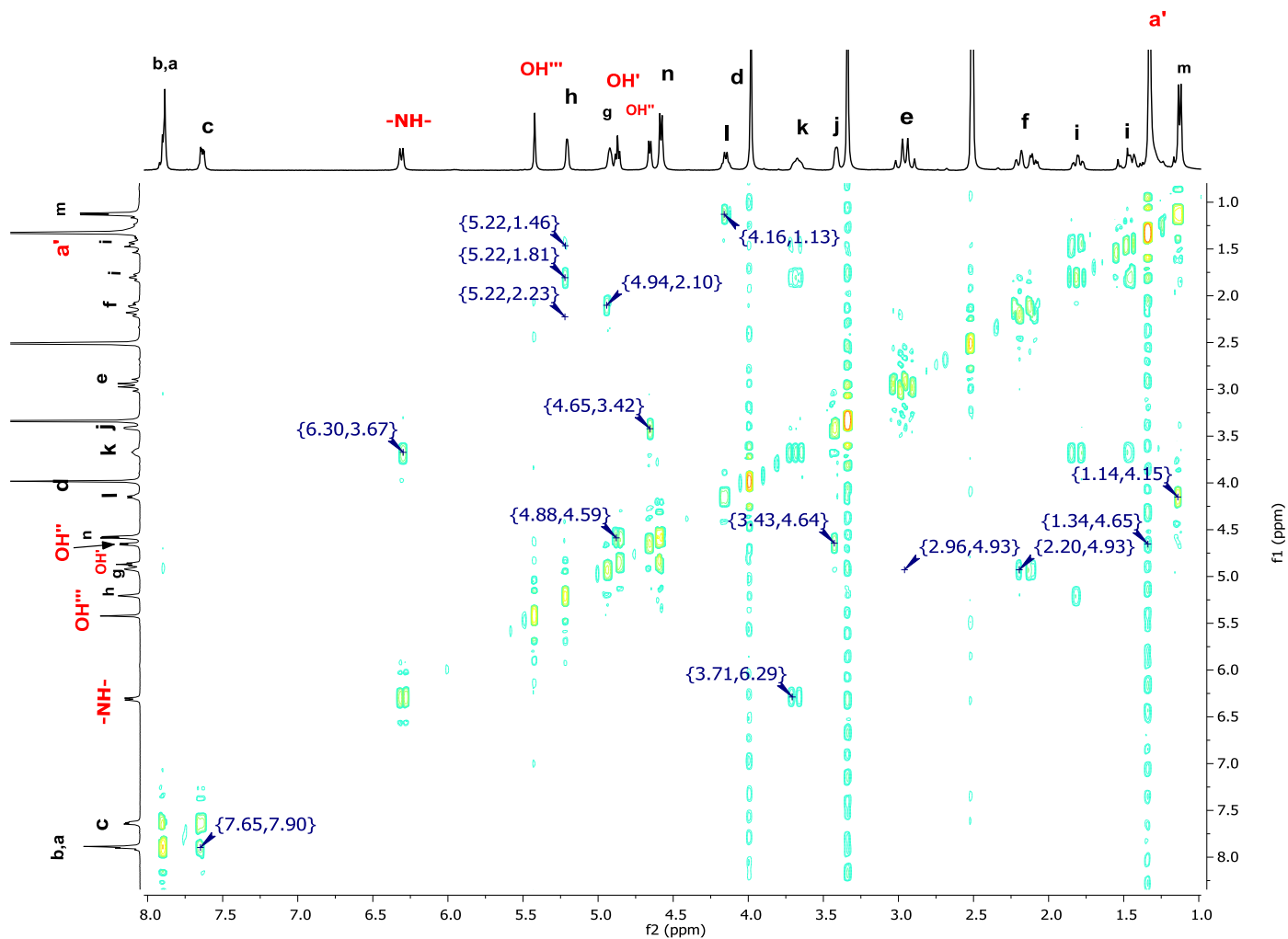
Espectro 20. EM (ESI) del profármaco Ad-a-Dox



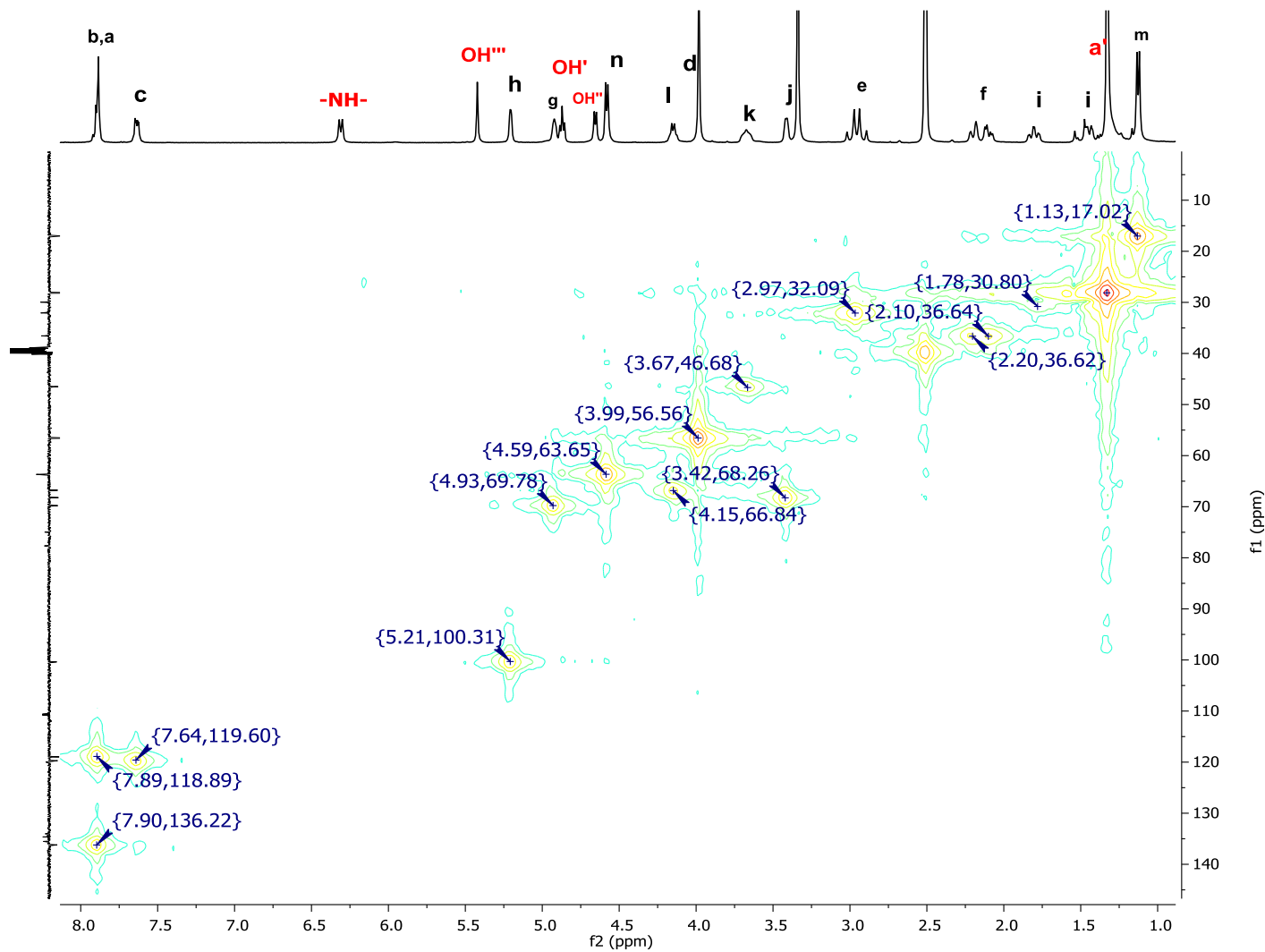
Espectro 21. RMN ¹H del intermediario Dox-Boc en DMSO-d₆ a 400 MHz.



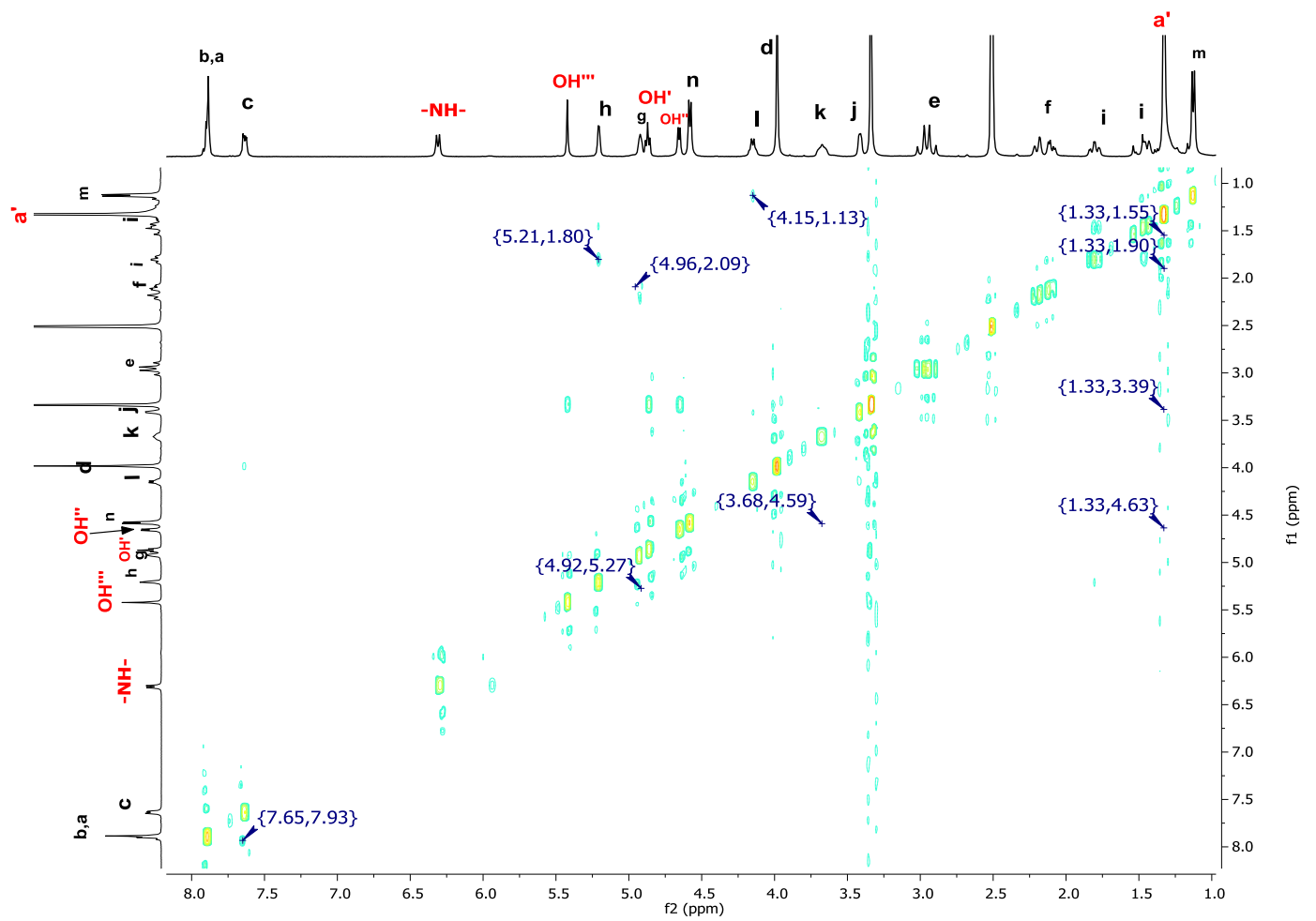
Espectro 22. RMN ^{13}C (DEPTQ) del intermediario Dox-Boc en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



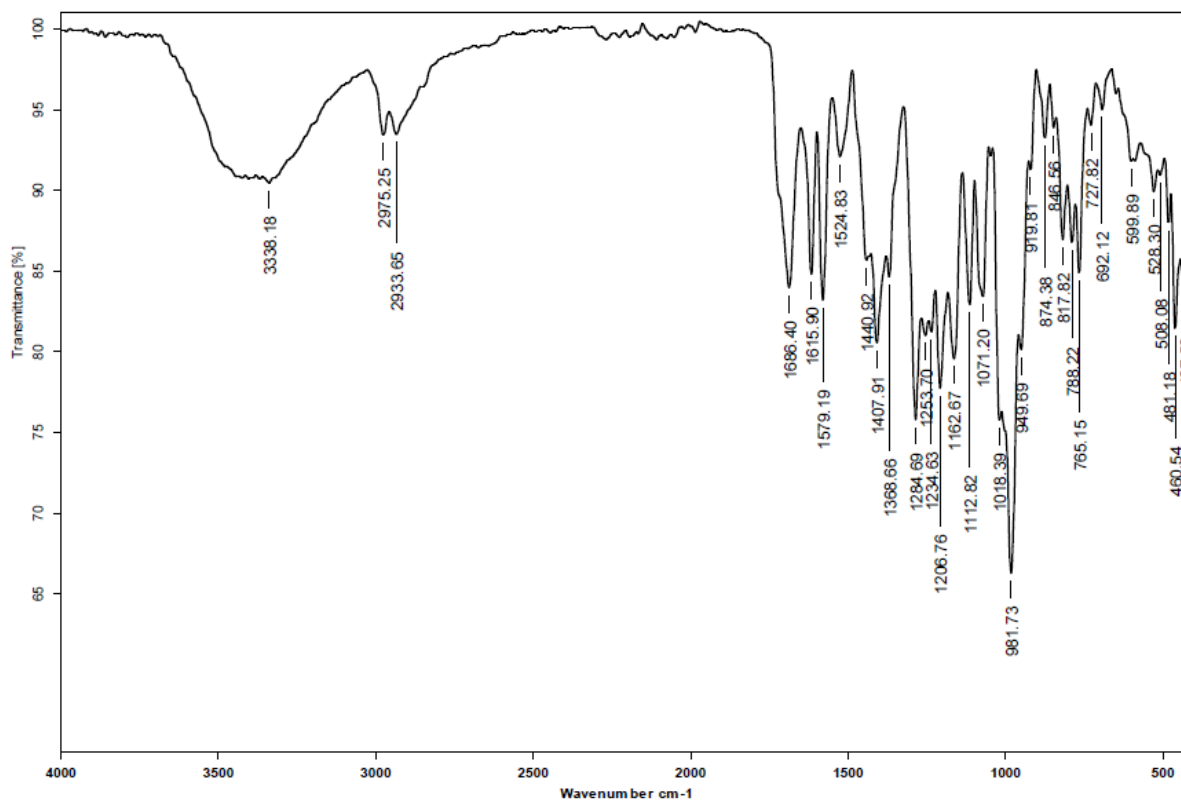
Espectro 23. RMN 2D ^1H - ^1H COSY del intermediario Dox-Boc en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



Espectro 24. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC del intermediario Dox-Boc en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



Espectro 25. RMN 2D ^1H - ^1H NOESY del intermediario Dox-Boc en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

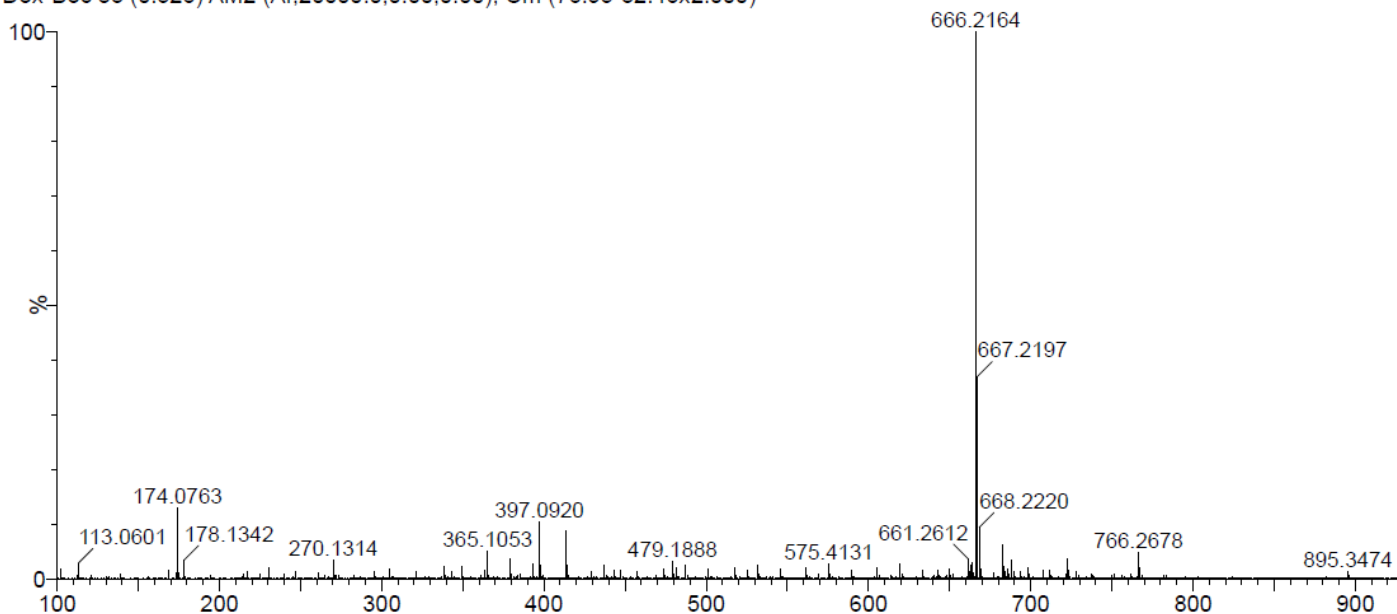


Espectro 26. FT-IR(ATR) del intermediario Dox-Boc

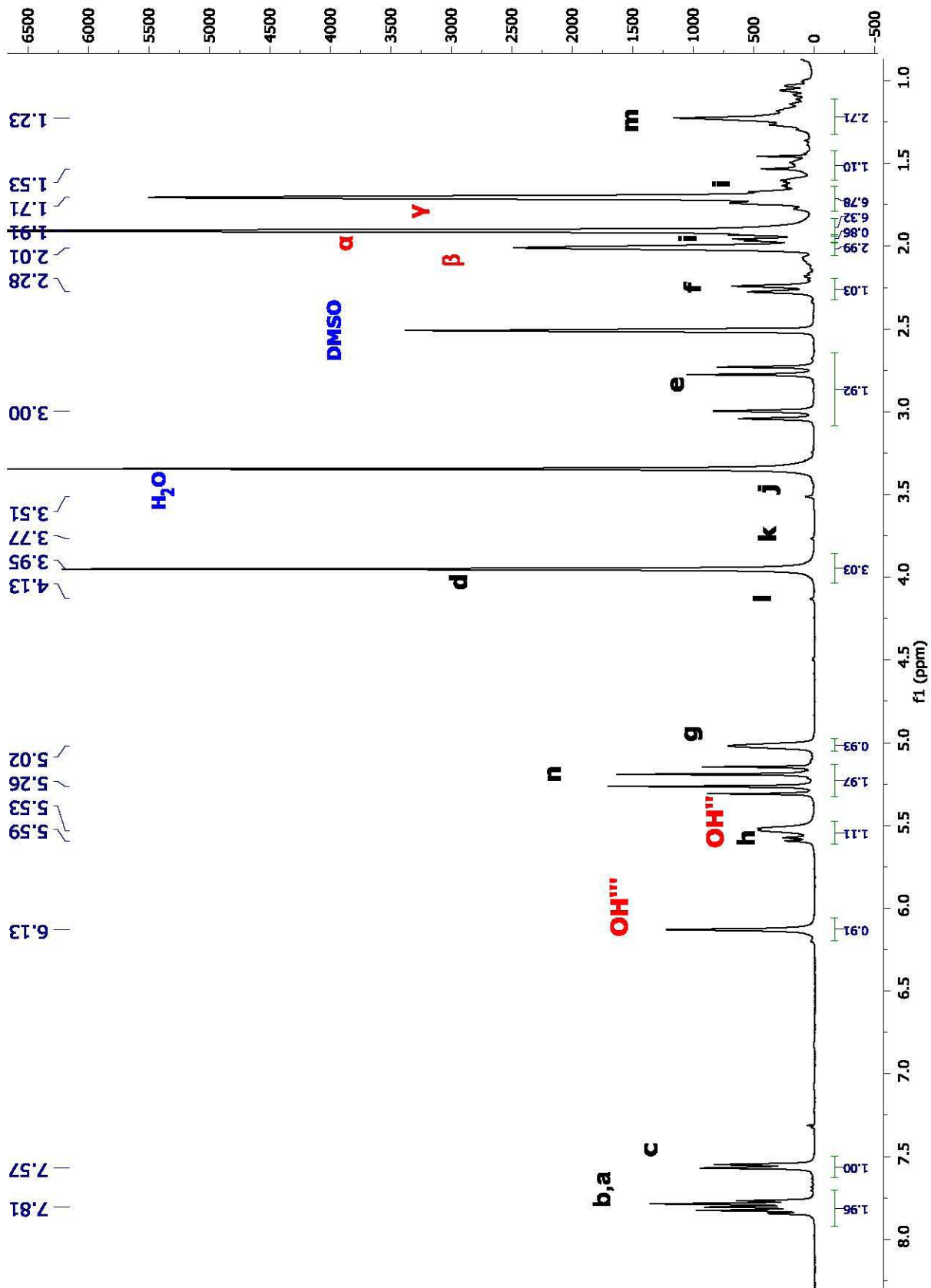
Cone voltage = 30 V

Dox-Boc 83 (0.526) AM2 (Ar,20000.0,0.00,0.00); Cm (76:95-32:46x2.000)

Xevo G2 QTof



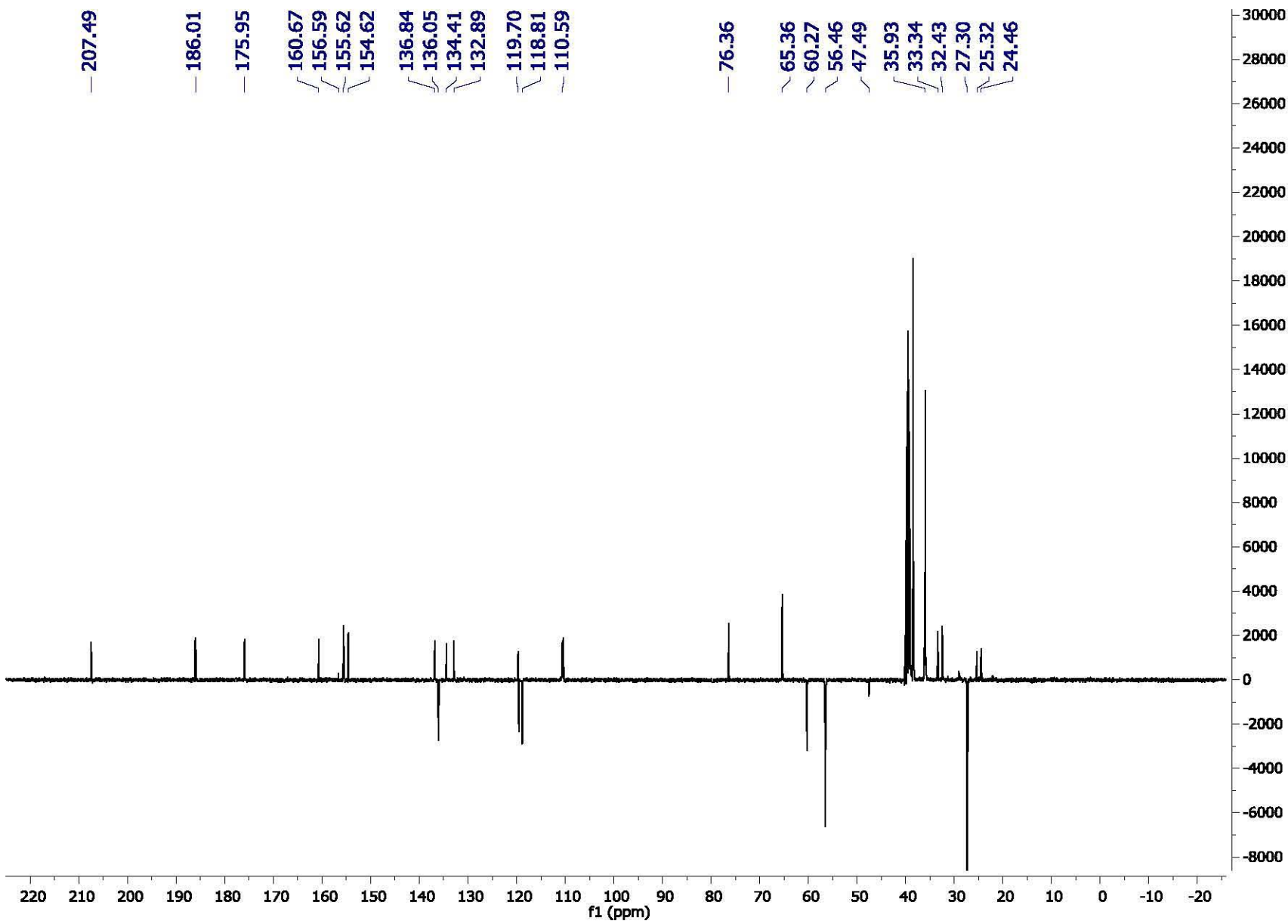
Espectro 27. EM (ESI) del intermediario Dox-Boc

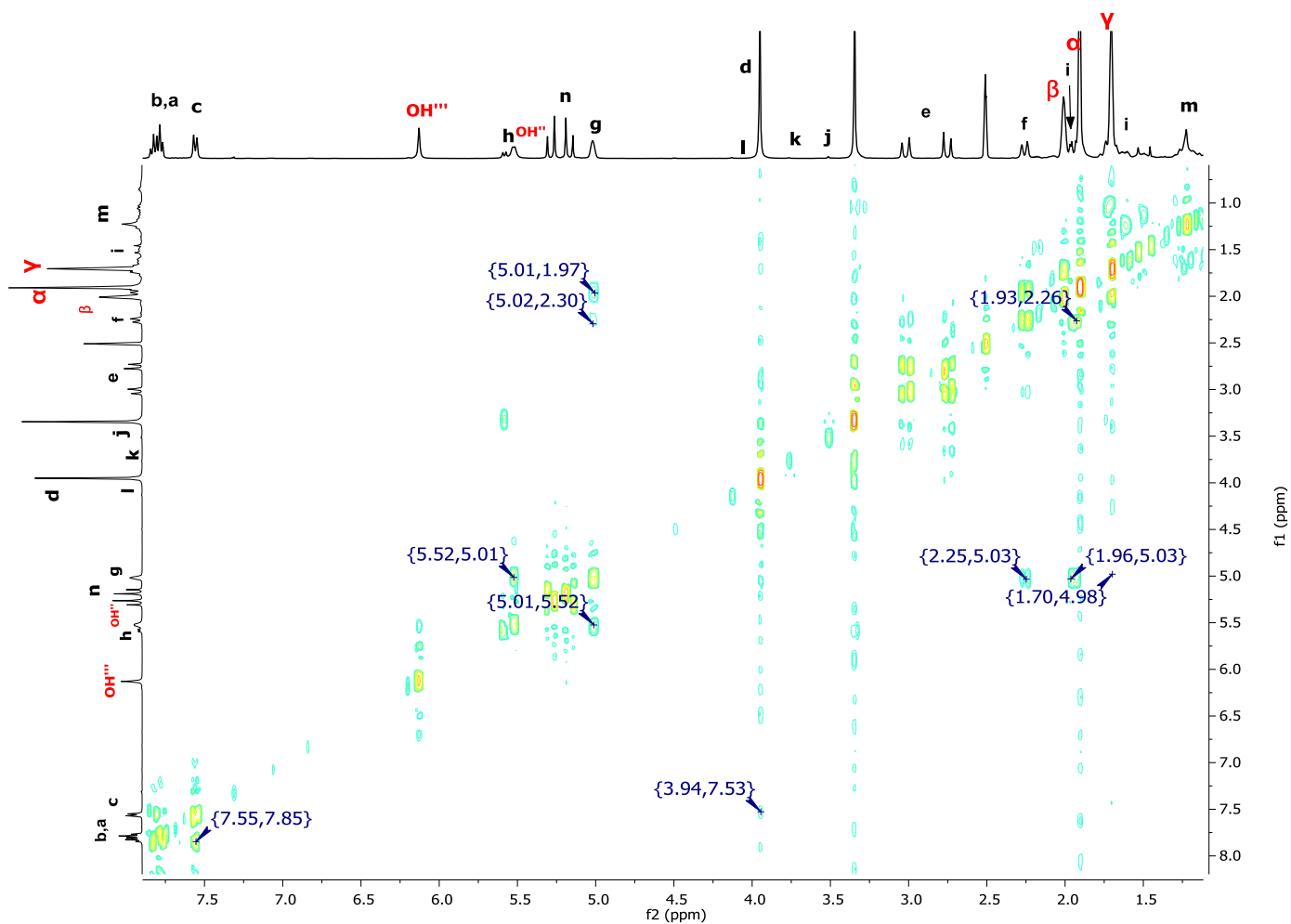


Espectro 28. RMN ¹H del profármaco Ad-e-Dox en DMSO-*d*₆ a 400 MHz.

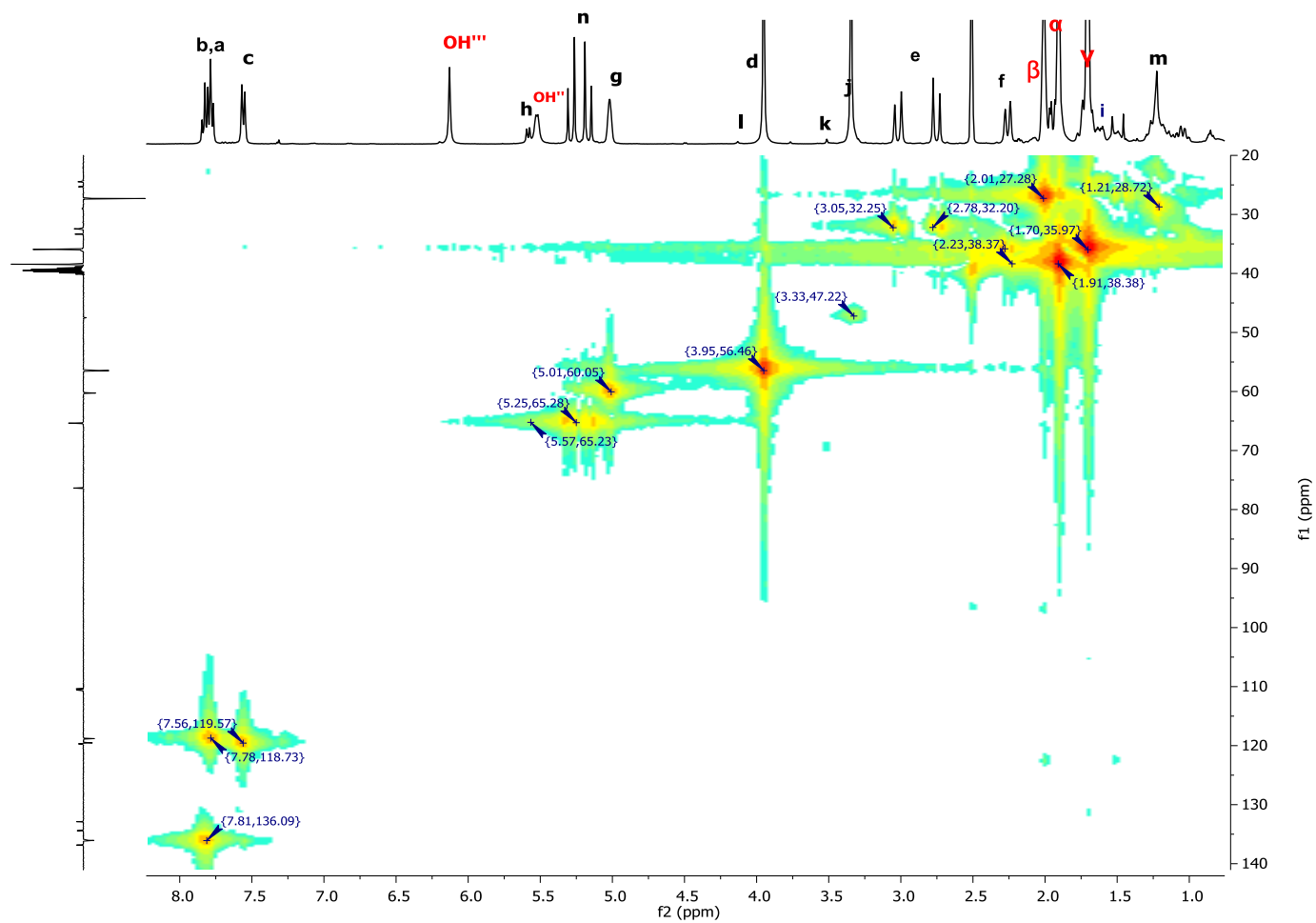


Espectro 29. RMN ¹³C(DEPTQ) del profármaco Ad-e-Dox en DMSO-d₆ a 400 MHz.

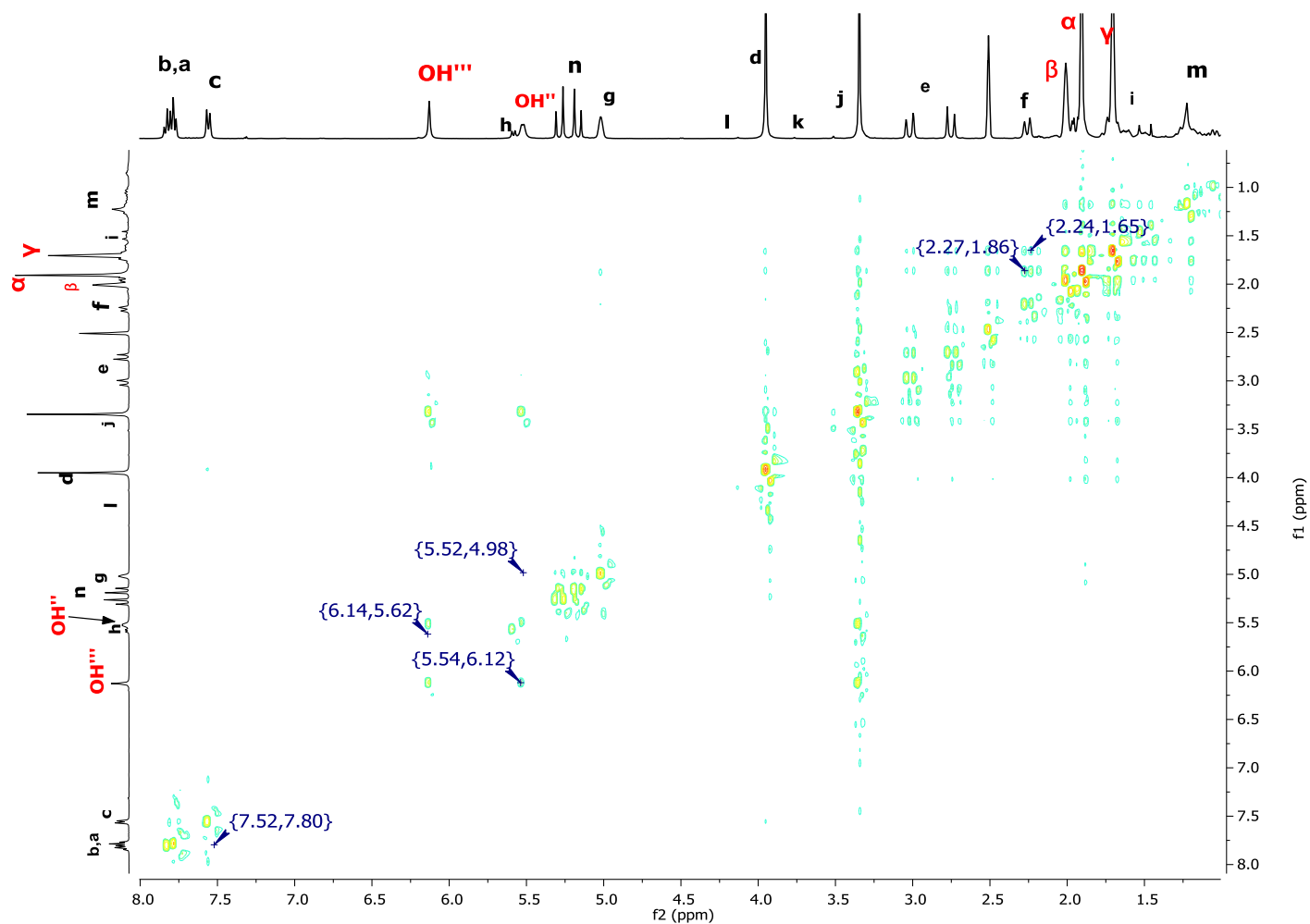




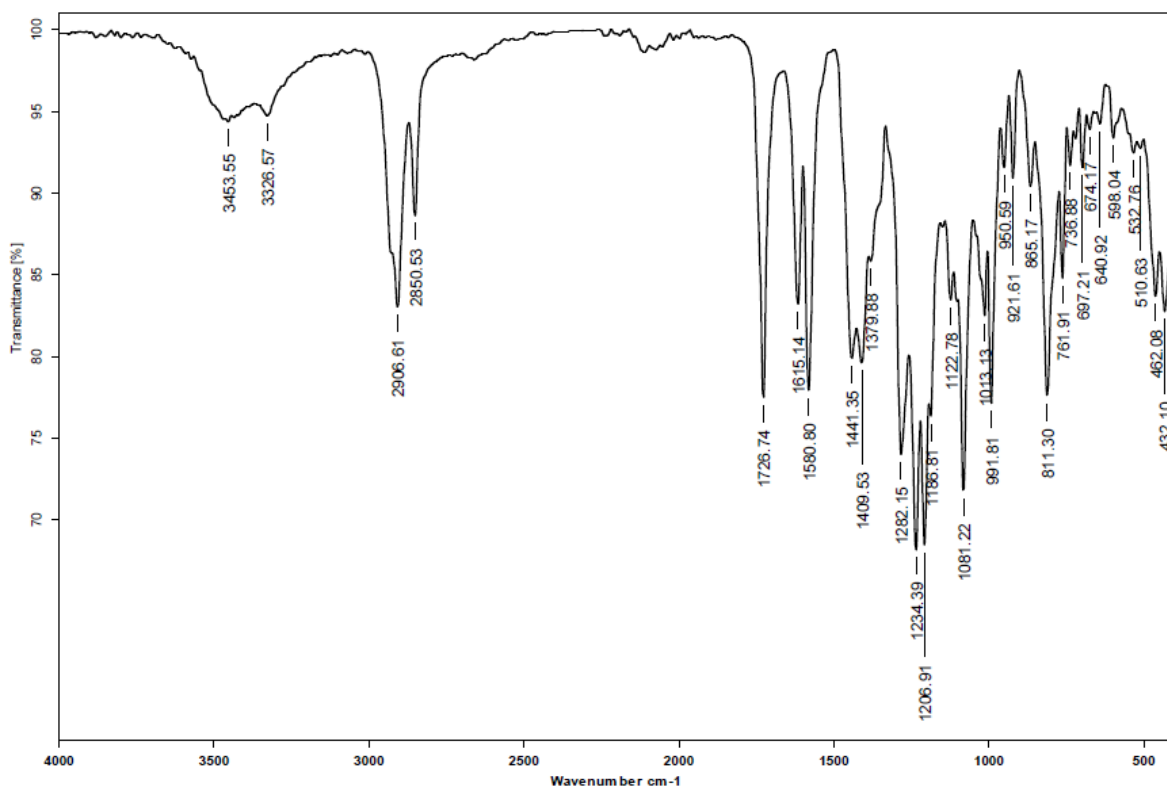
Espectro 30. RMN 2D ^1H - ^1H COSY del profármaco Ad-e-Dox en DMSO-d_6 a 400 MHz.



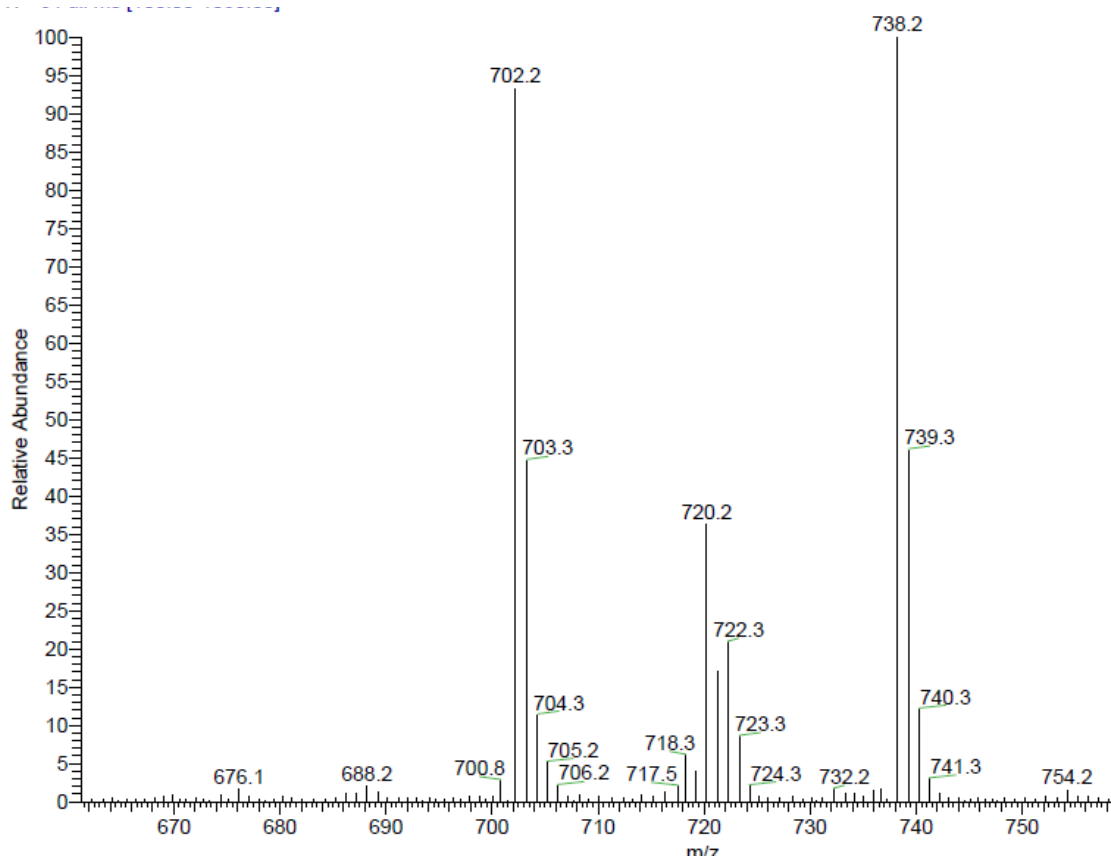
Espectro 31. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC del profármaco Ad-e-Dox en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



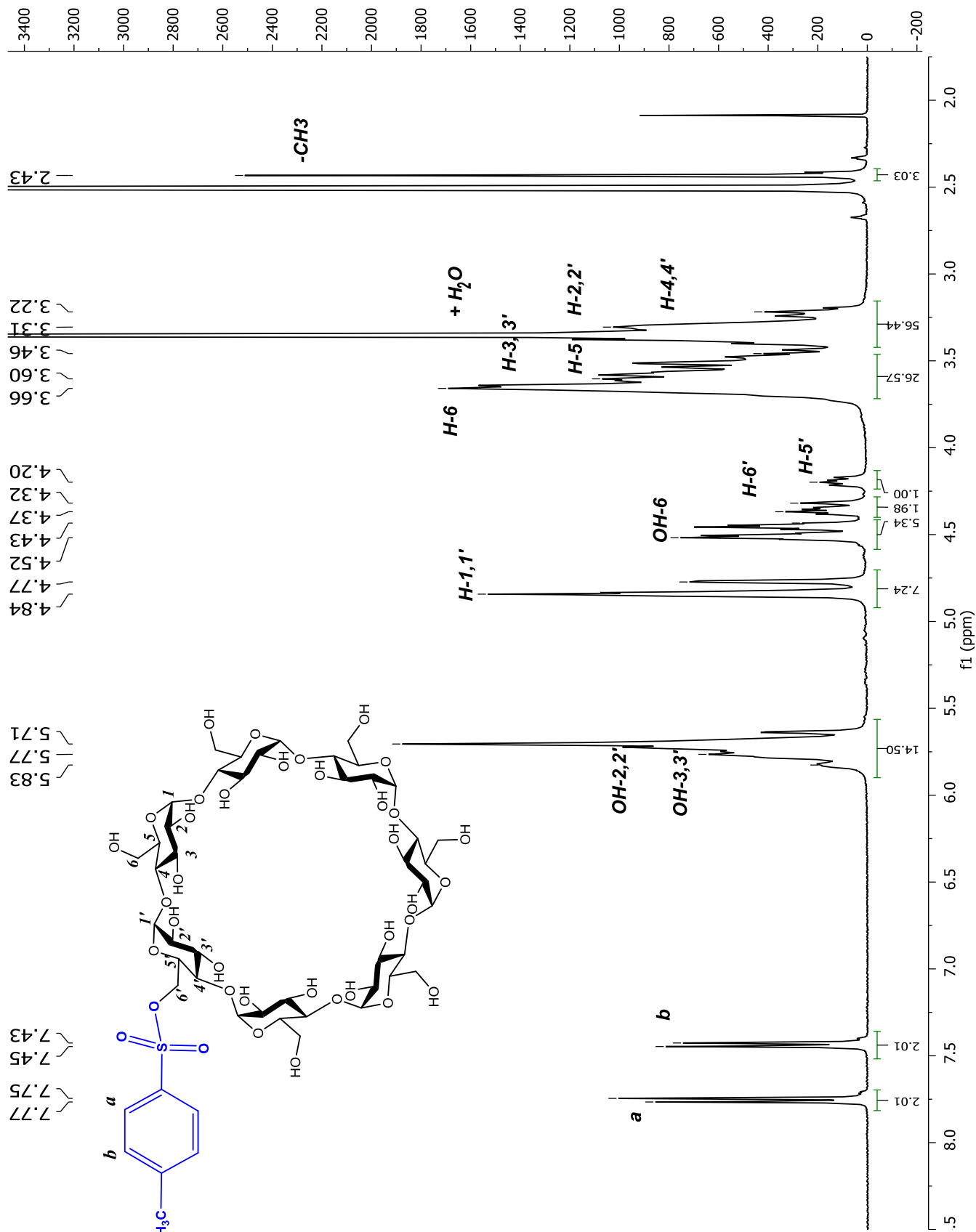
Espectro 32. RMN 2D ^1H - ^1H NOESY del profármaco Ad-e-Dox en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



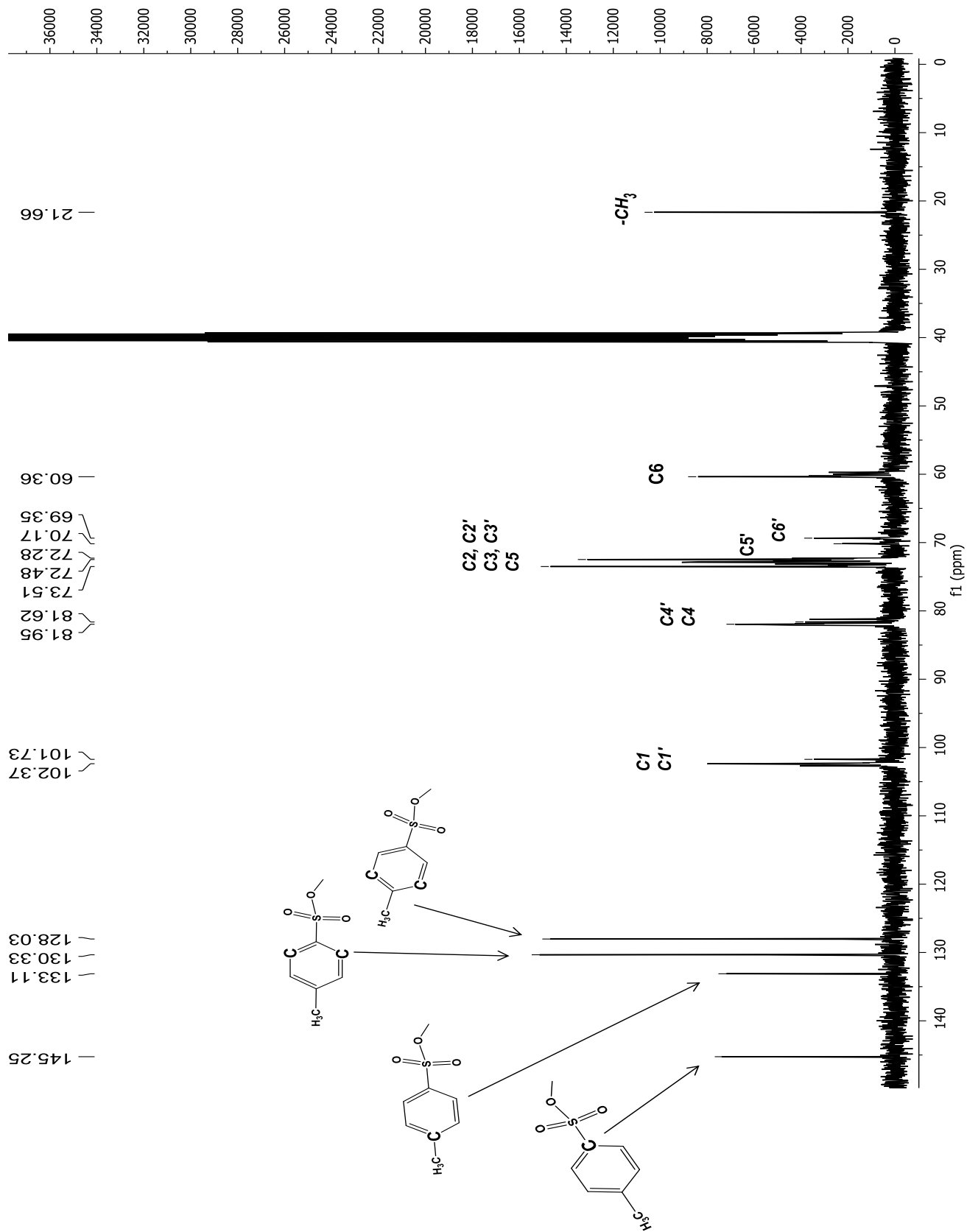
Espectro 33. FT-IR(ATR) de Ad-e-Dox



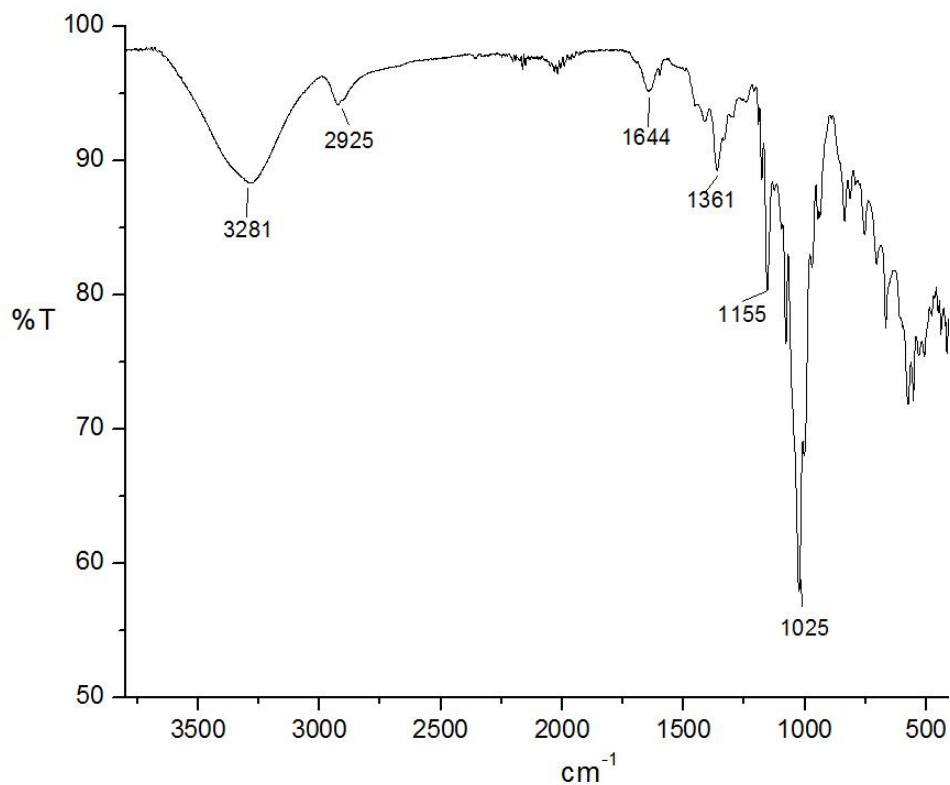
Espectro 34. EM (ESI) del profármaco Ad-e-Dox



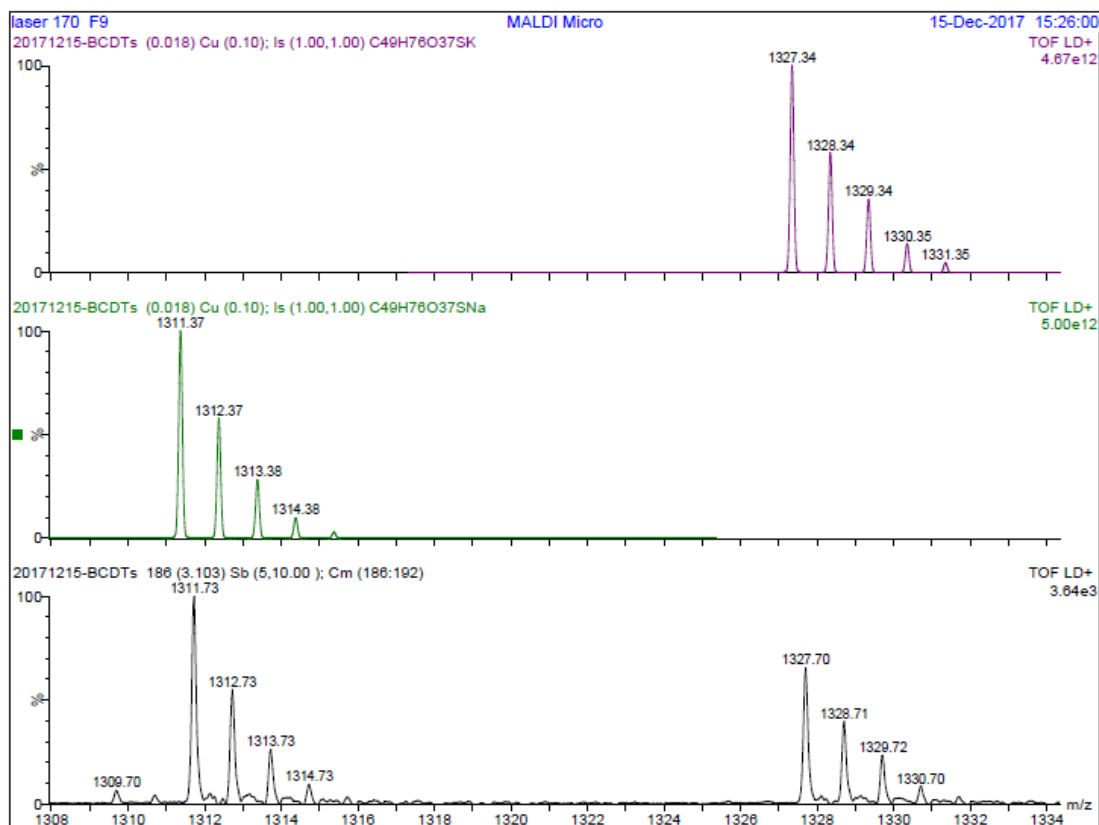
Spectro 35. RMN ¹H del intermediario *m*OTs-βCD en DMSO-*d*₆ a 400 MHz.



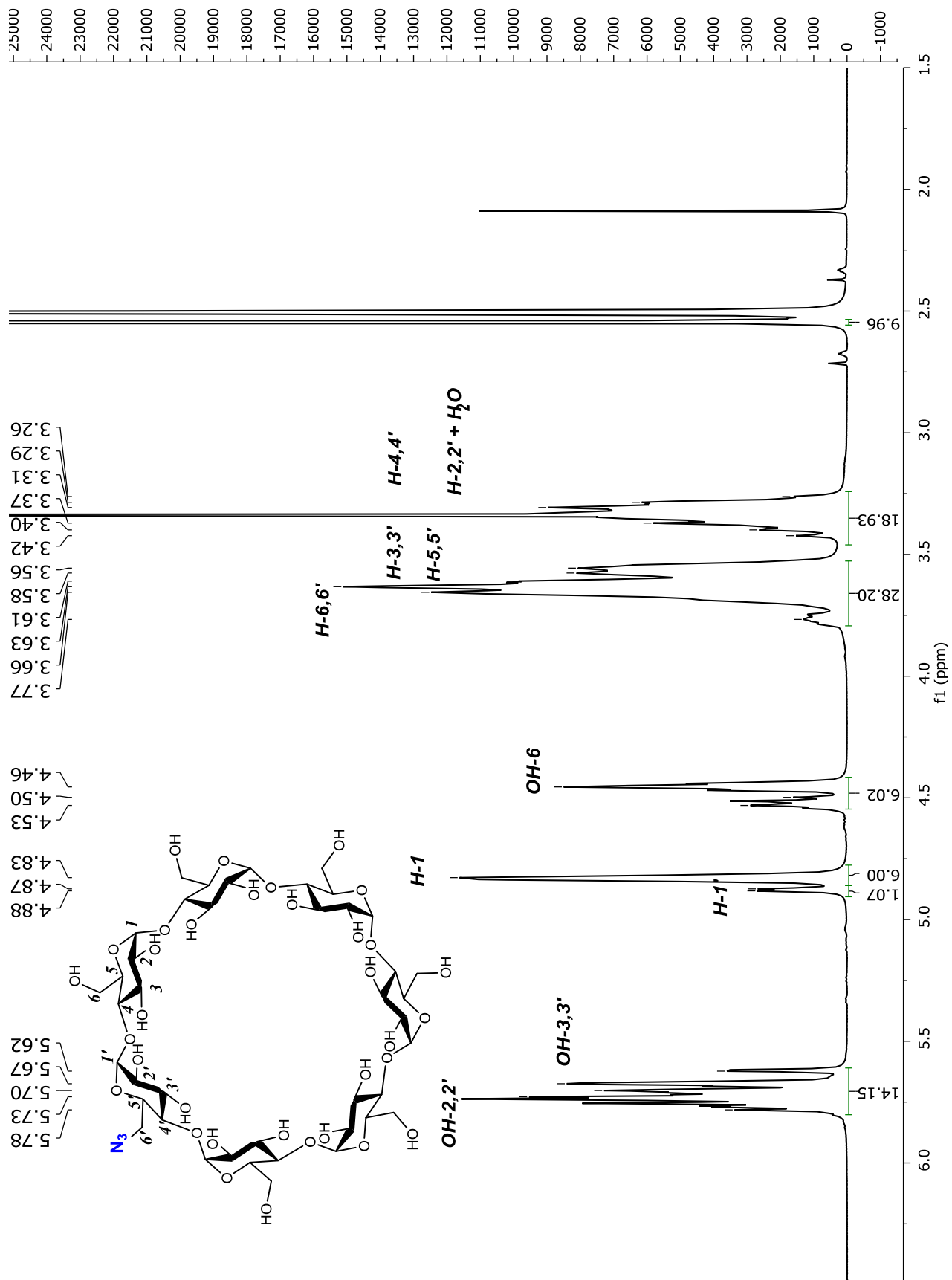
Espectro 36. RMN ^{13}C del intermediario *mOTs*- β CD en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



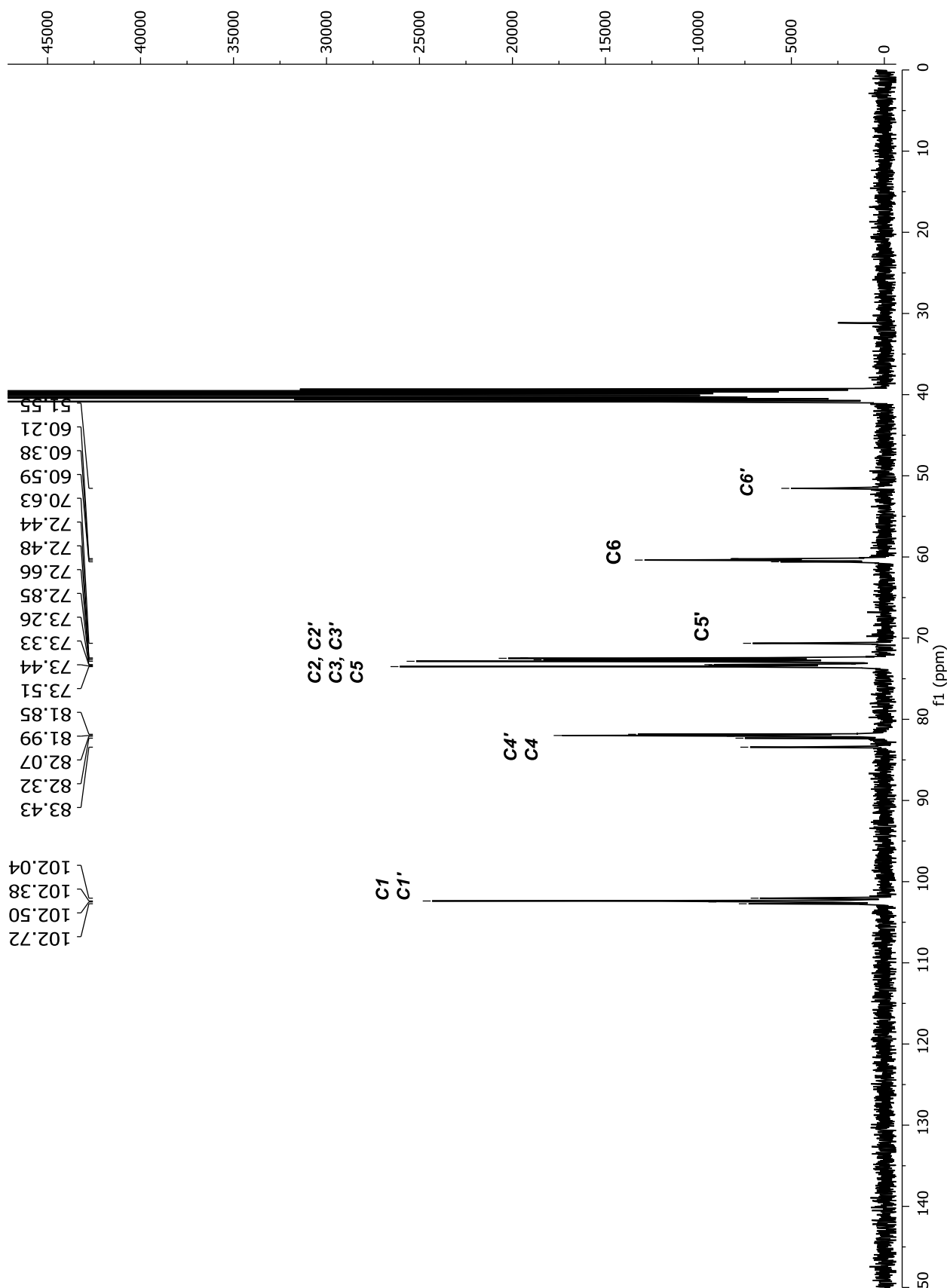
Espectro 37. Espectro IR (ATR) del intermediario *mOTs-βCD*



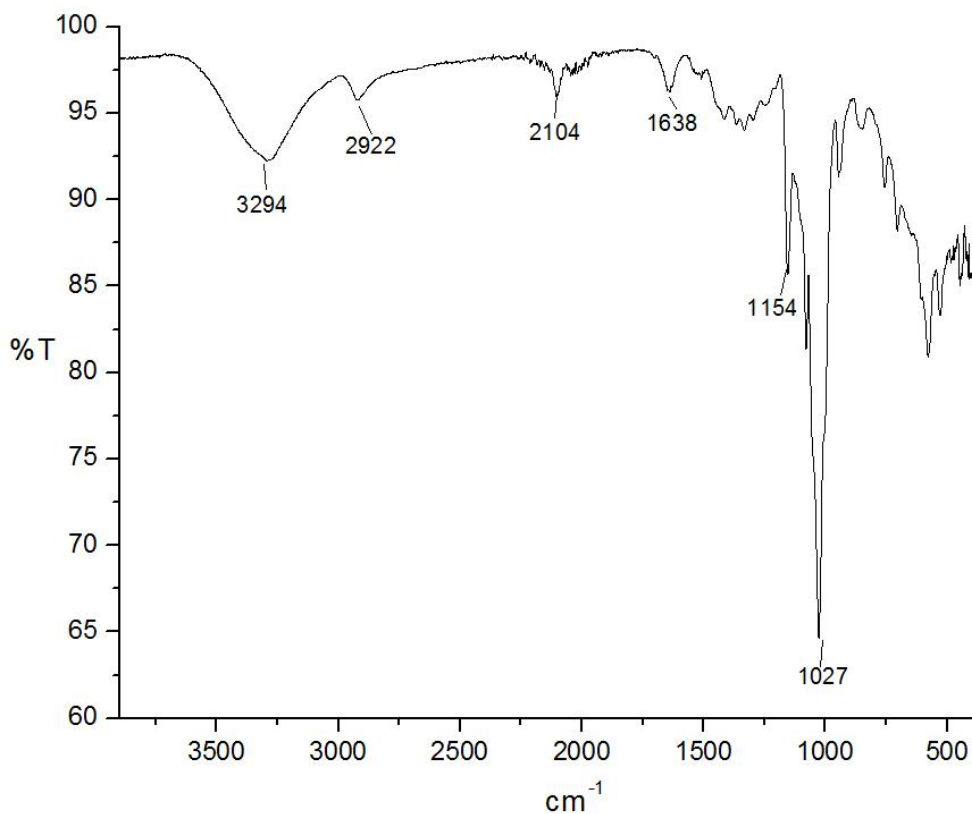
Espectro 38. Espectro MALDI del intermediario *mOTs-βCD*



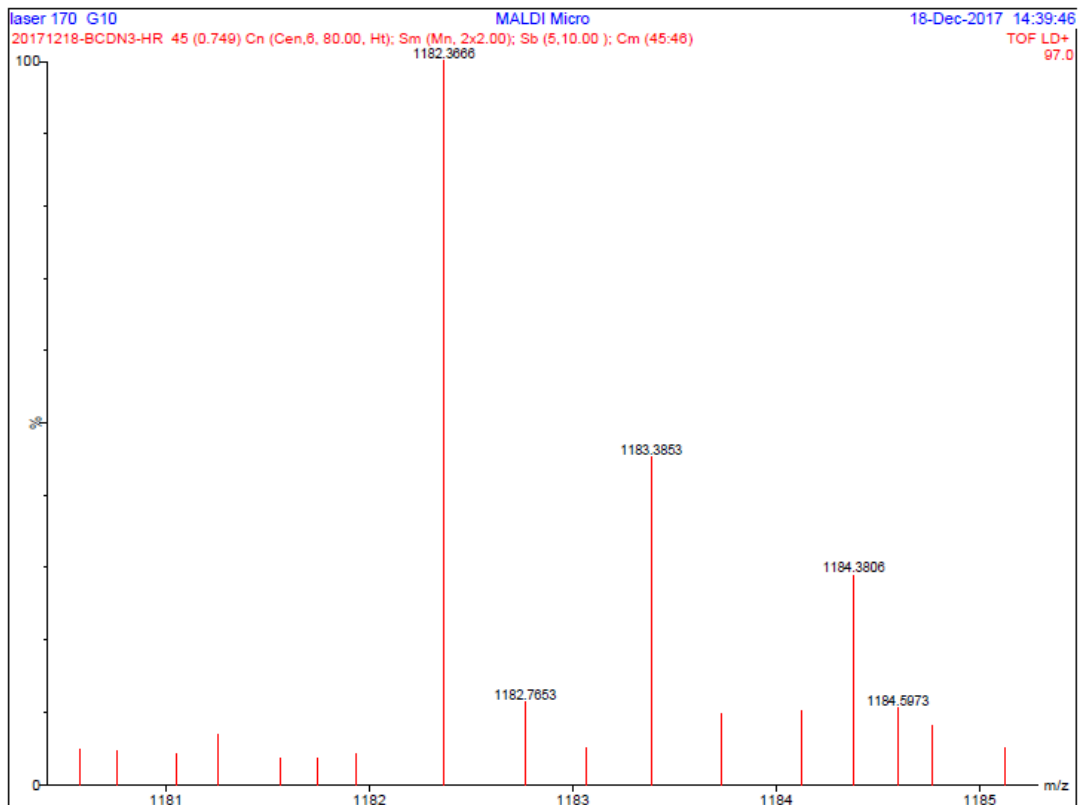
Espectro 39. RMN 1H del intermediario mN_3 - β CD en $DMSO-d_6$ a 400 MHz.



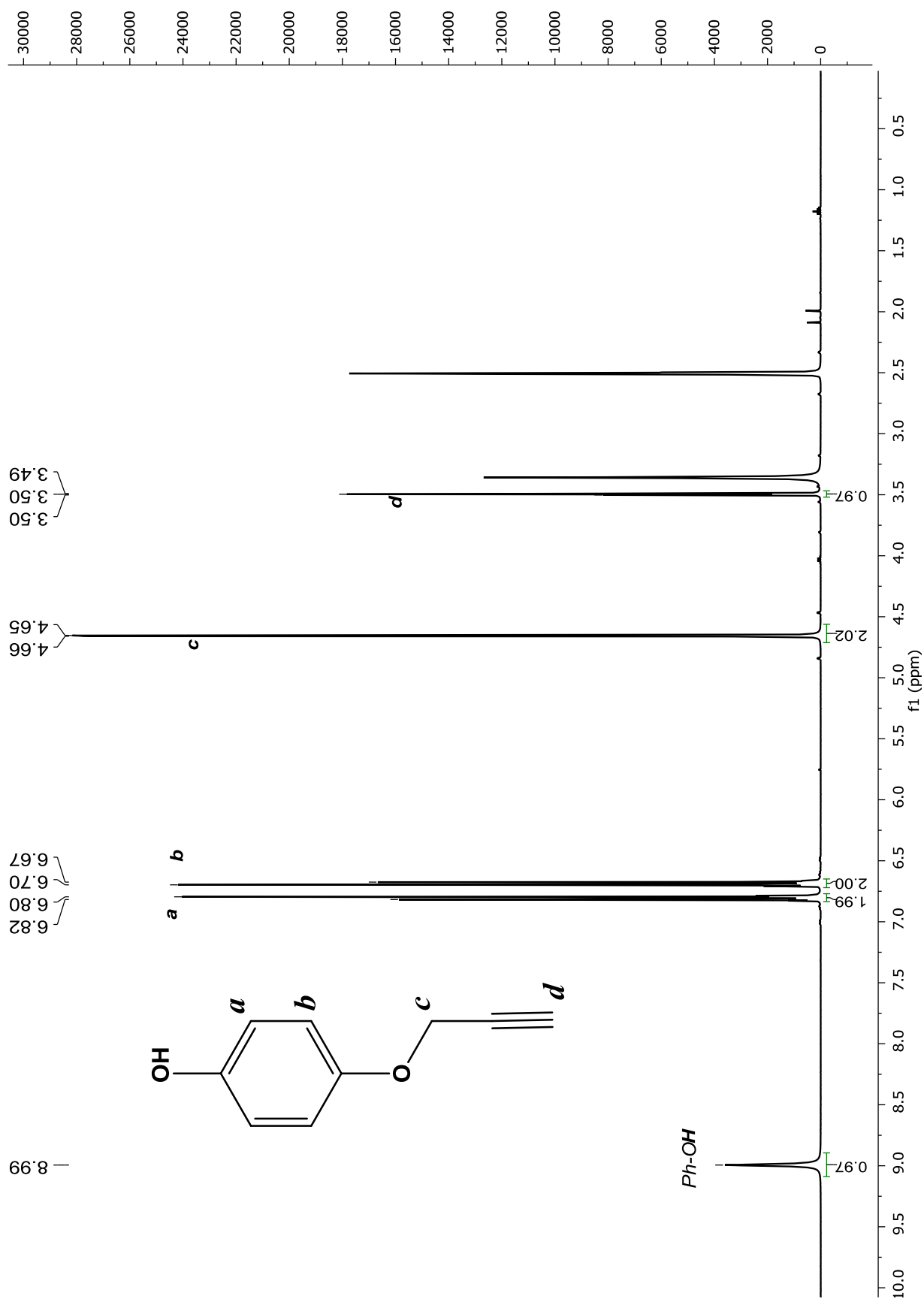
Espectro 40. RMN ^{13}C del intermediario $m\text{N}_3$ - βCD en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



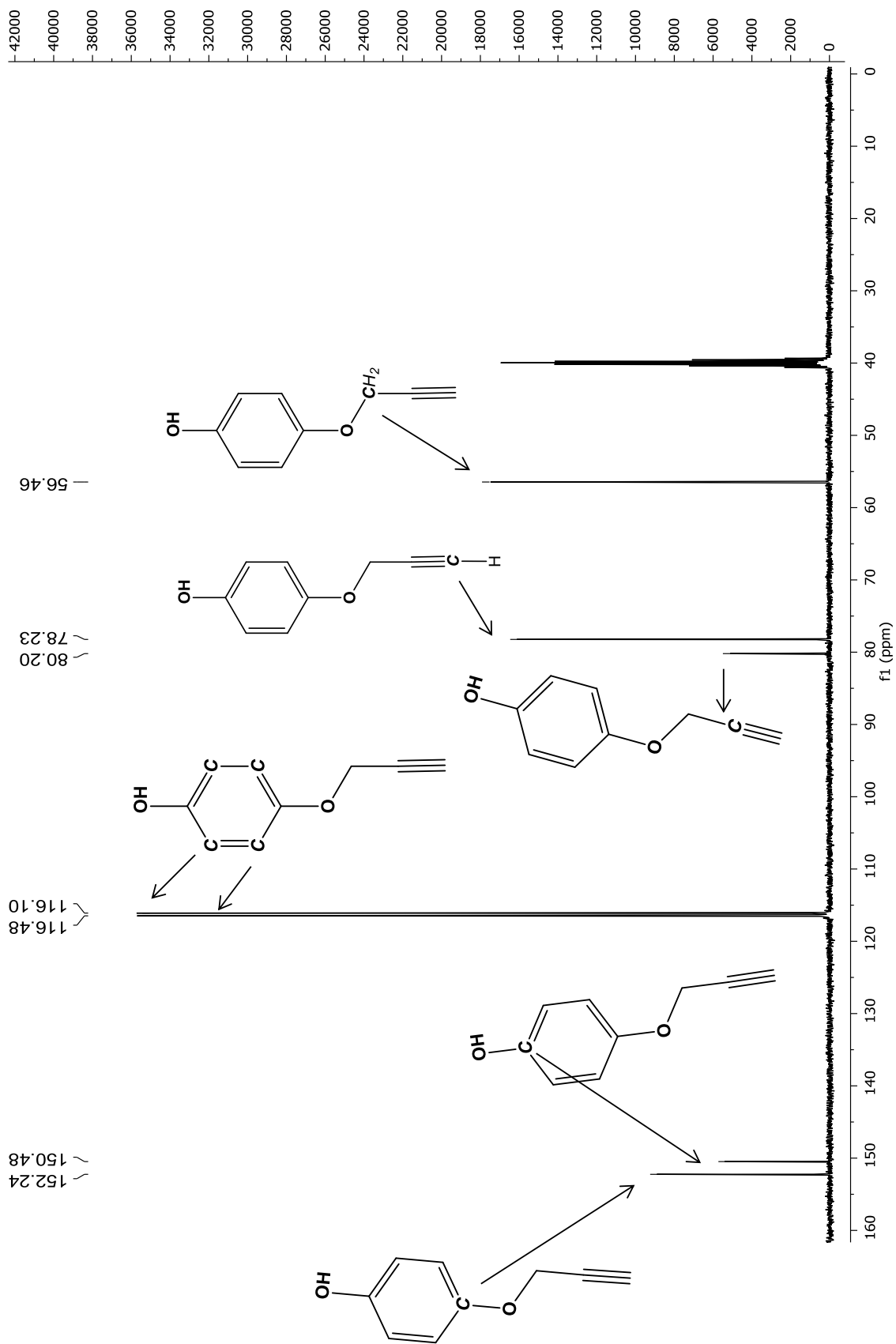
Espectro 41. Espectro IR (ATR) del intermediario $mN_3\text{-}\beta\text{CD}$



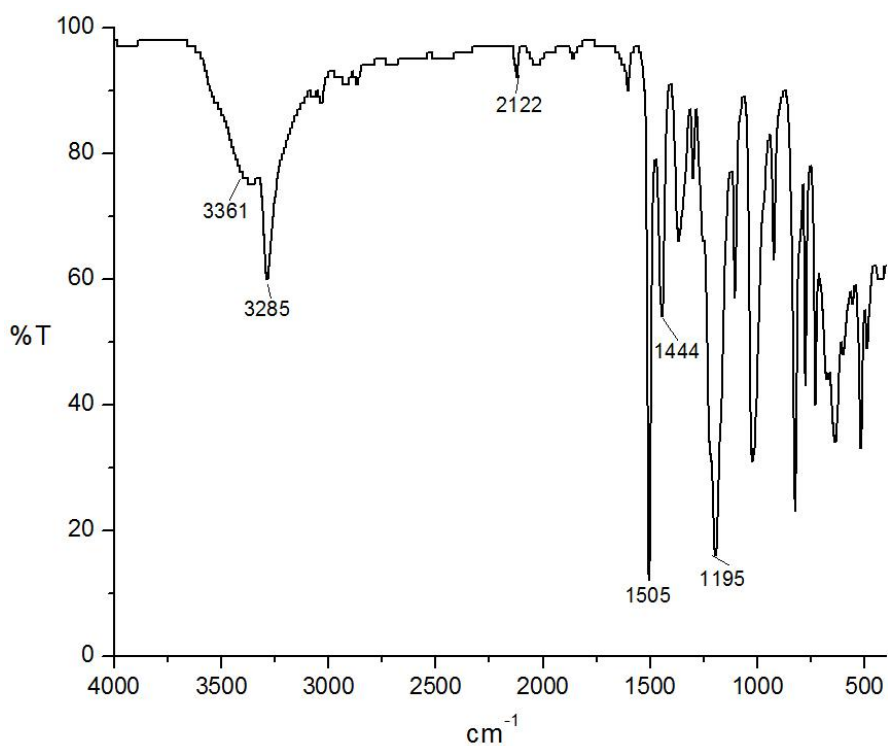
Espectro 42. Espectro MALDI del intermediario $mN_3\text{-}\beta\text{CD}$



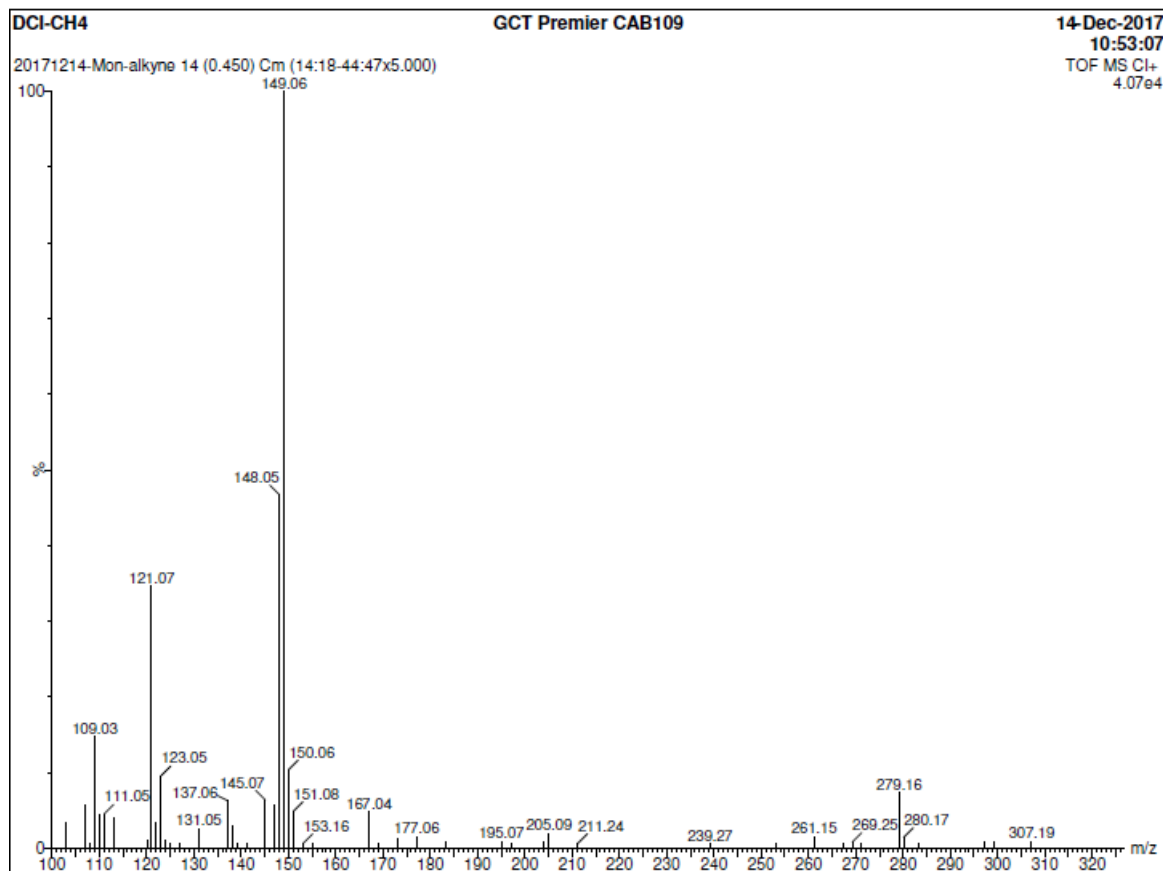
Espectro 43. RMN ^1H del intermediario (I) 4-propargiloxifenol en DMSO-d_6 a 400 MHz.



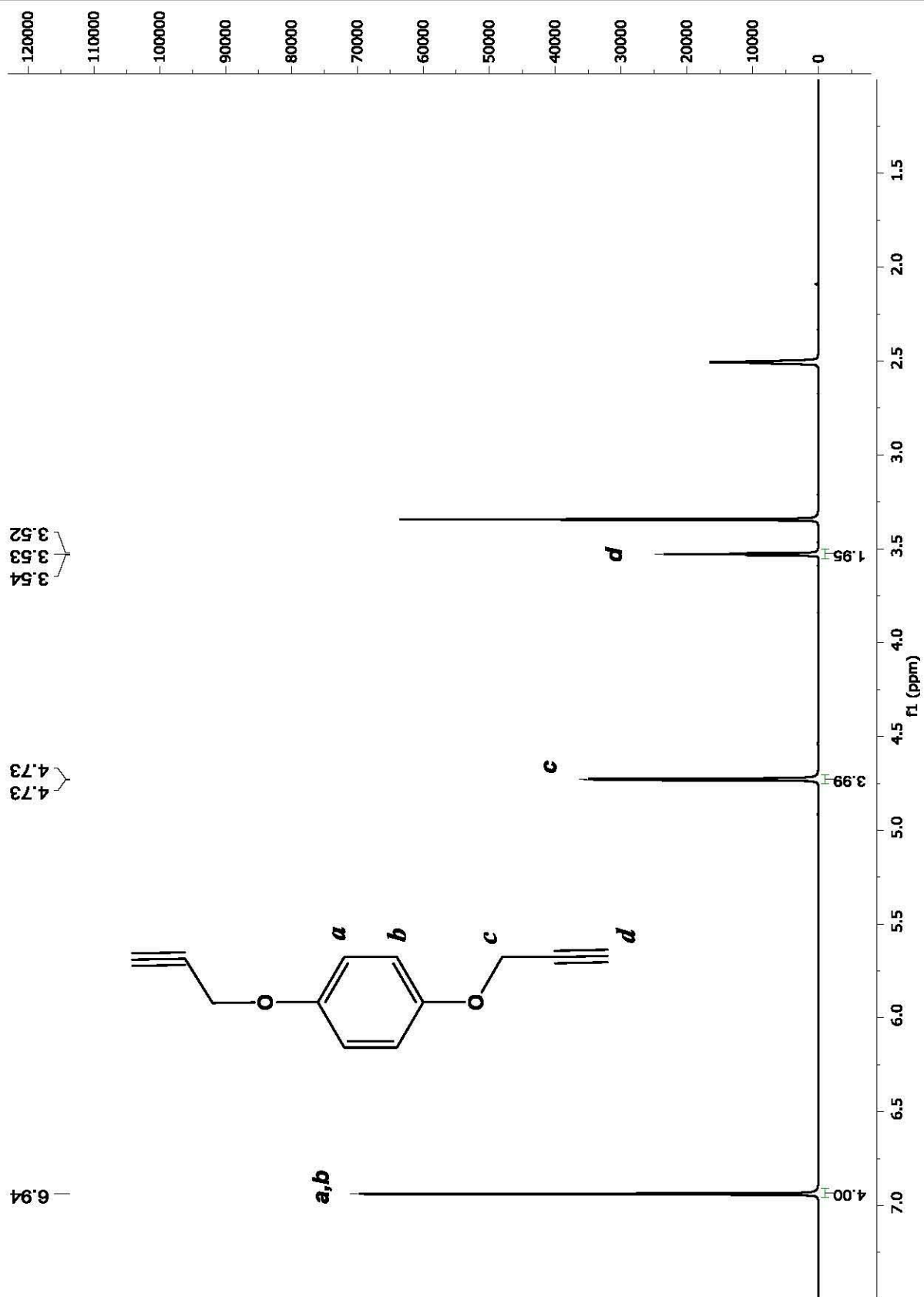
Espectro 44. RMN ^{13}C del intermediario (I) *4-propargiloxifenol* en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



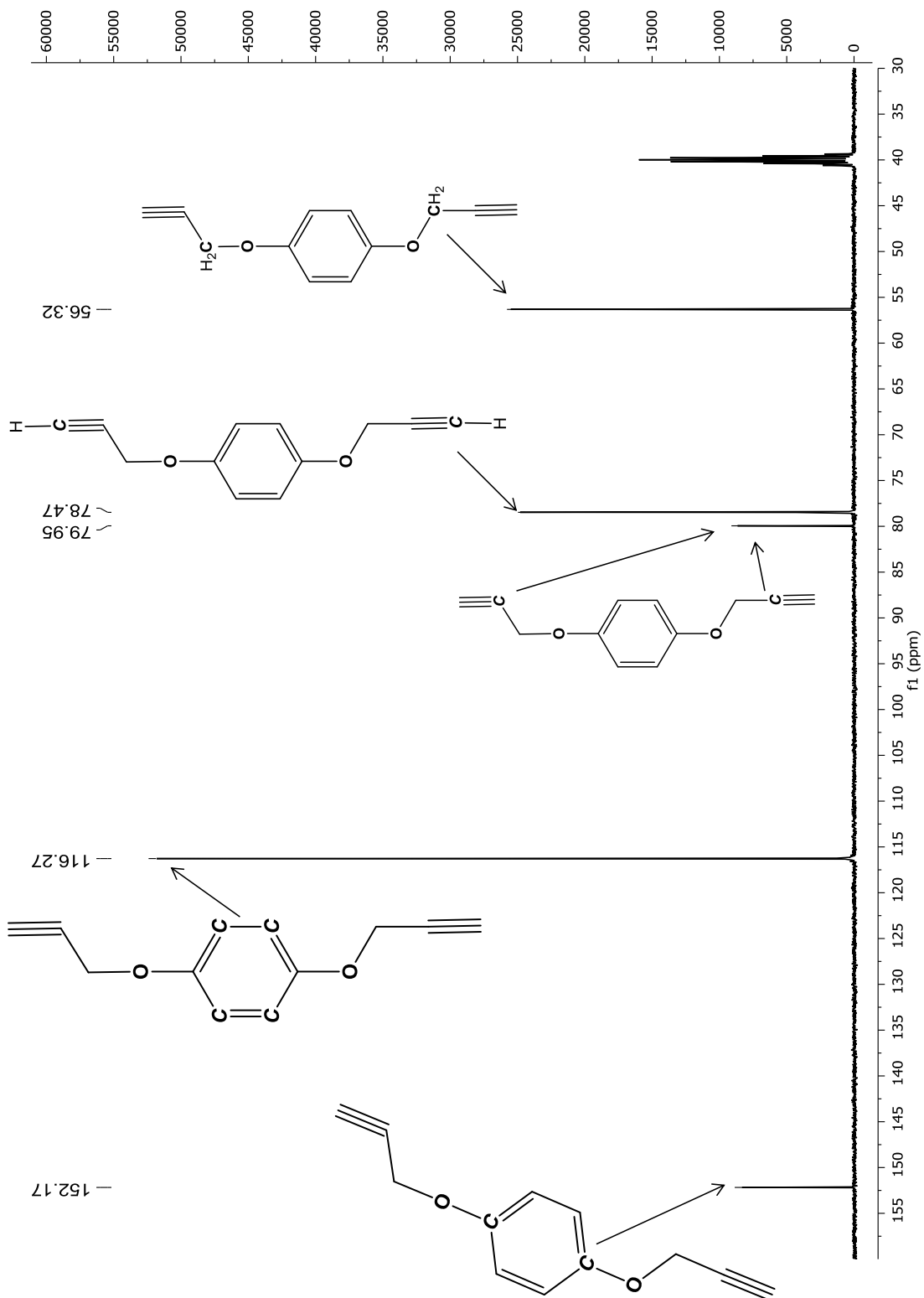
Espectro 45. Espectro IR (ATR) del intermediario (I) 4-propargiloxifenol



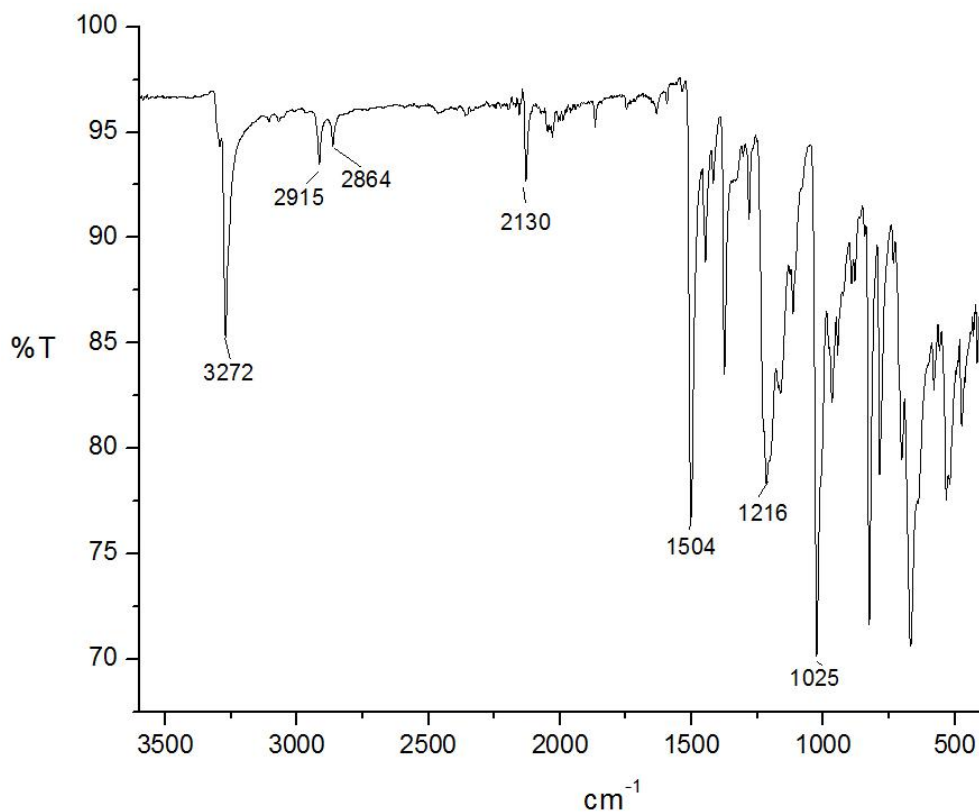
Espectro 46. Espectro ESI del intermediario (I) 4-propargiloxifenol



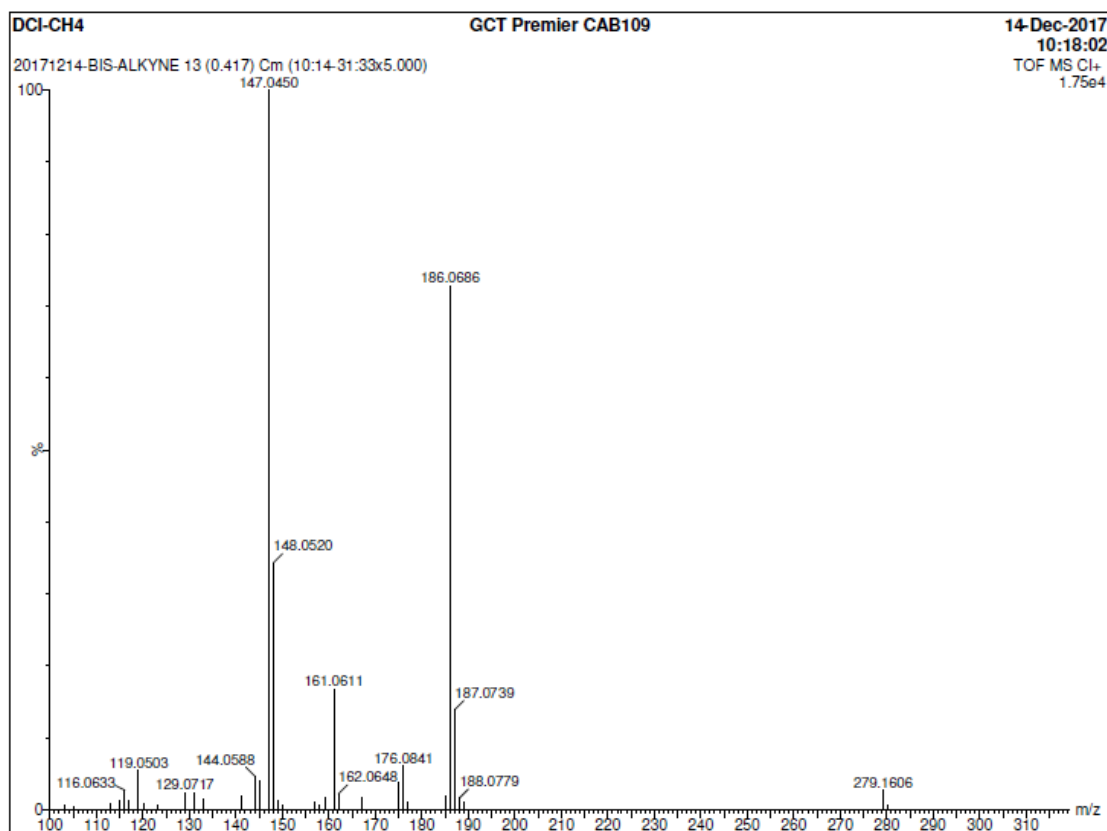
Espectro 47. RMN ^1H del intermediario (II) 1,4-bis(propargiloxi)benzeno en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



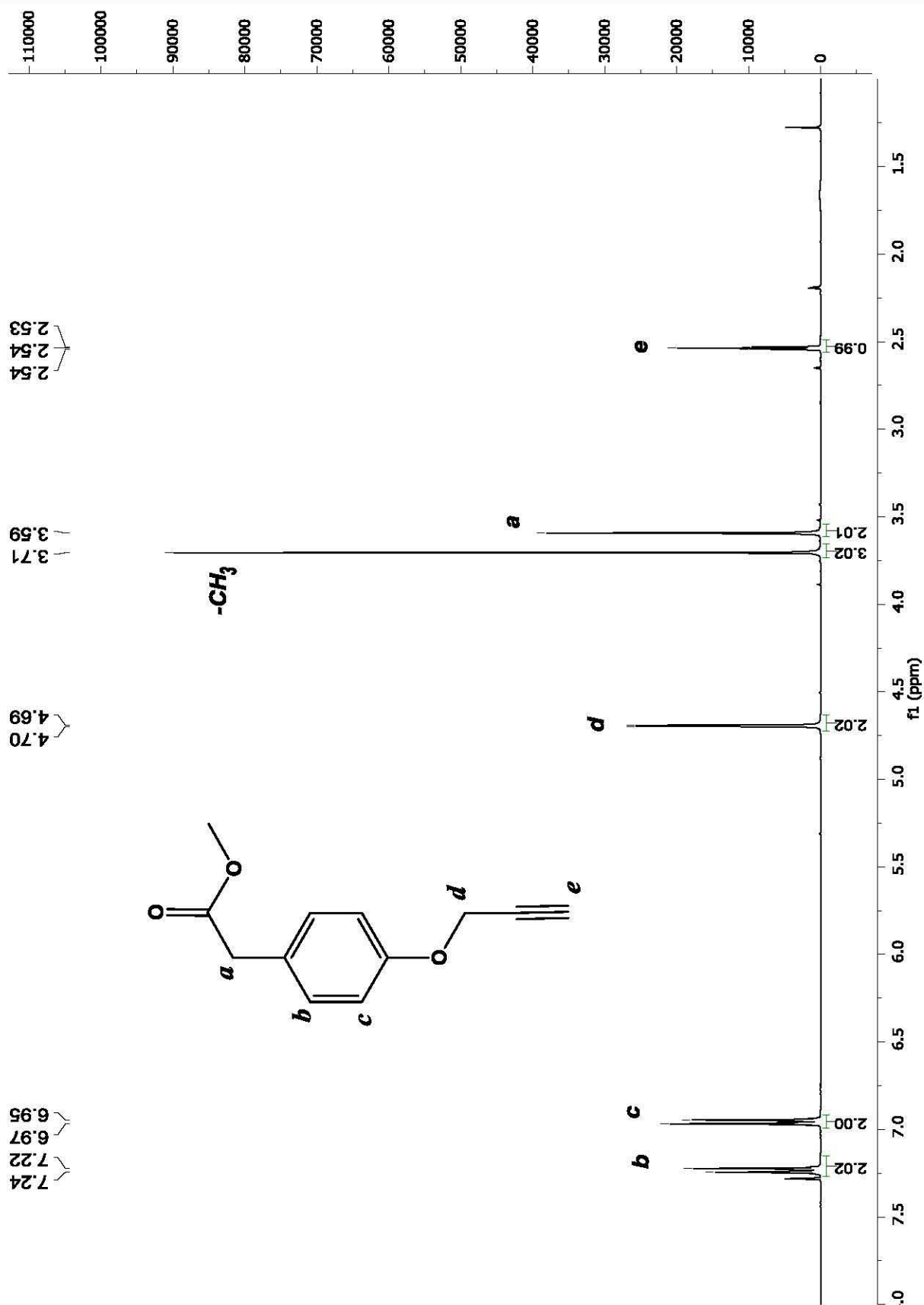
Espectro 48. RMN ^{13}C del intermediario (II) 1,4-*bis*(propargiloxy)benceno en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.

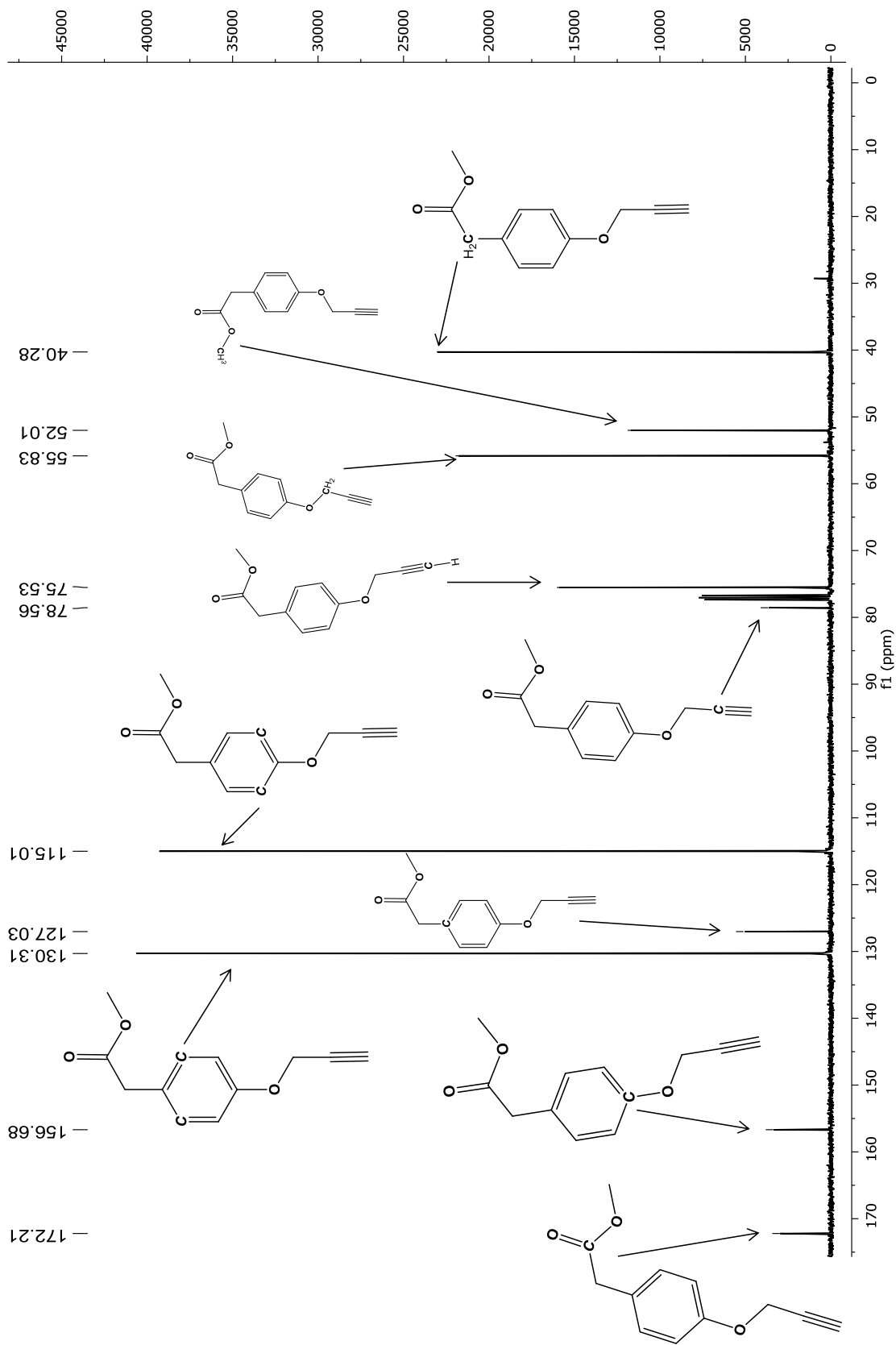


Espectro 49. Espectro IR (ATR) del intermediario (II) 1,4-bis(propargiloxi)benzene

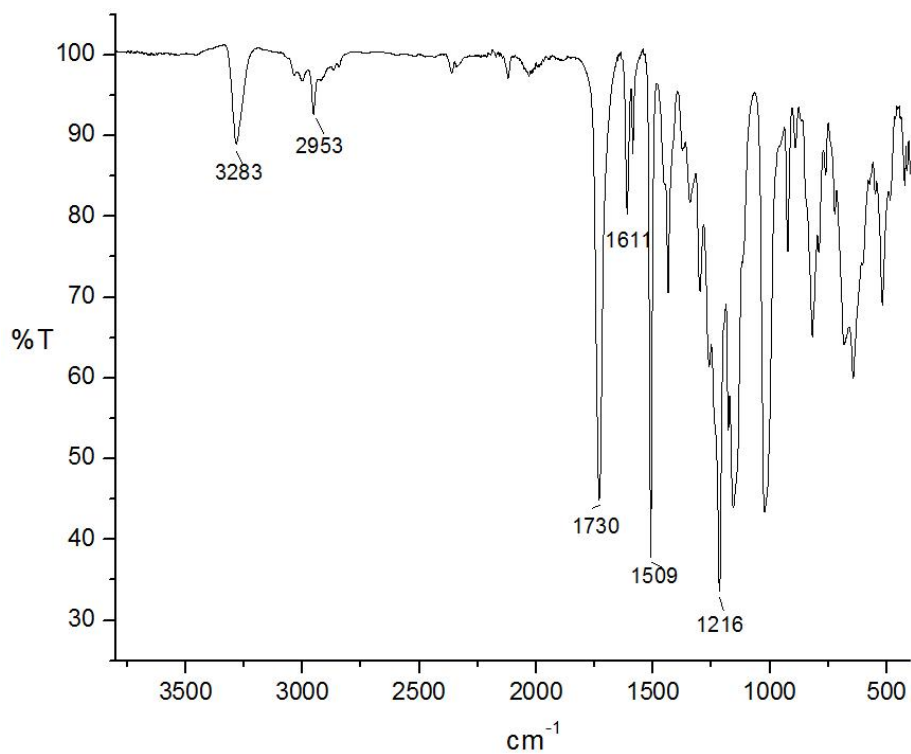


Espectro 50. Espectro ESI del intermediario (II) 1,4-bis(propargiloxi)benzene

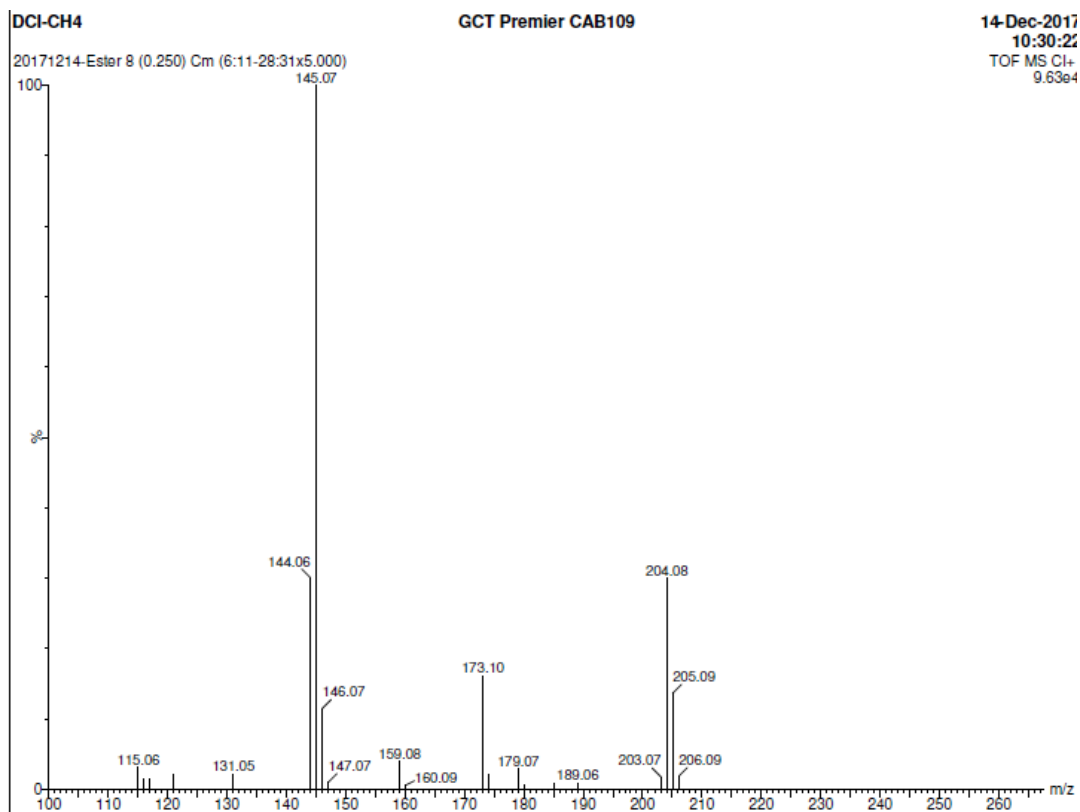
Espectro 51. RMN ^1H de (III) acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil]metílico en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



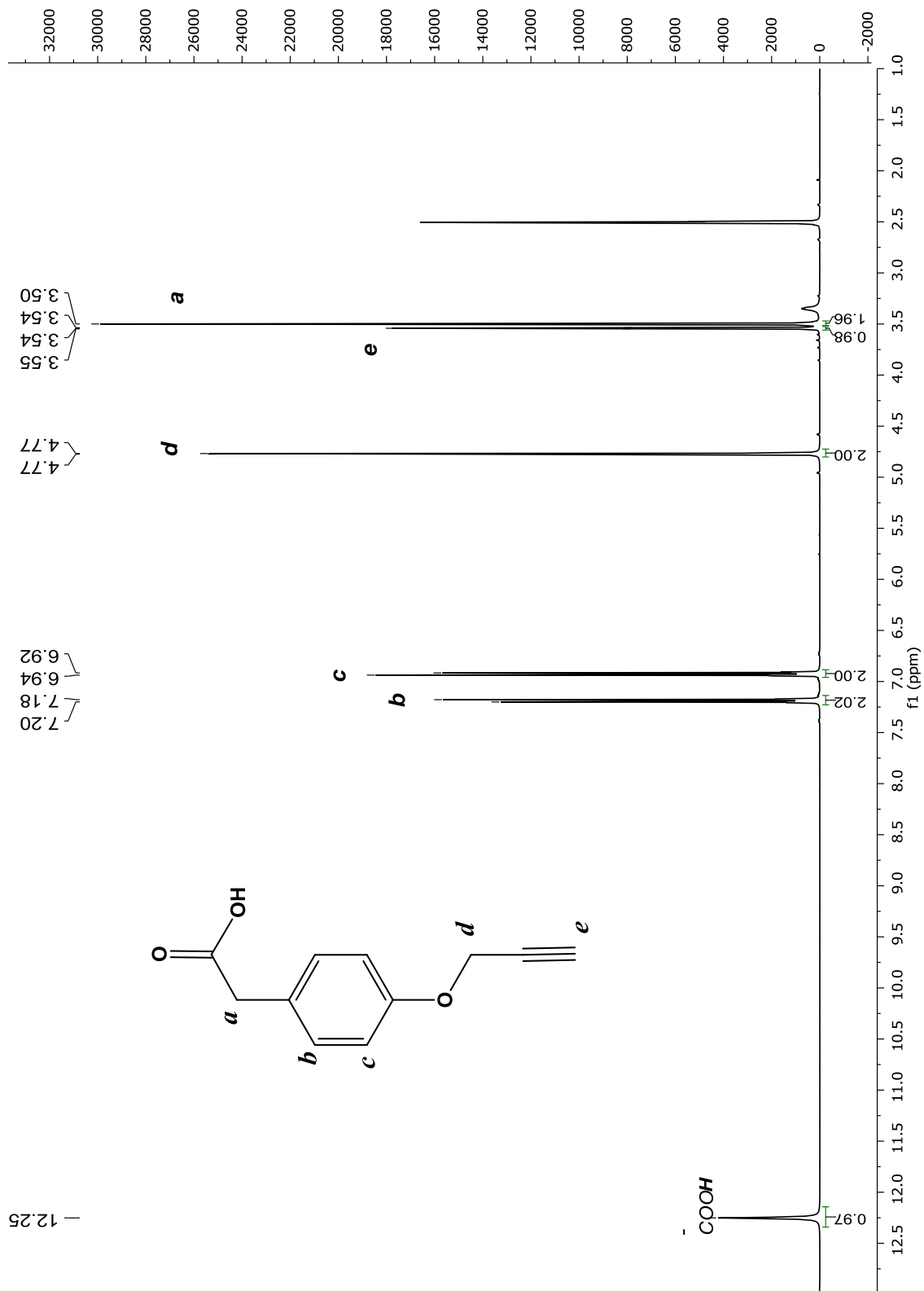
Espectro 52. RMN ^{13}C de (III) acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil]metílico en DMSO- d_6 a 400 MHz.



Espectro 53. Espectro IR (ATR) de (III) acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico

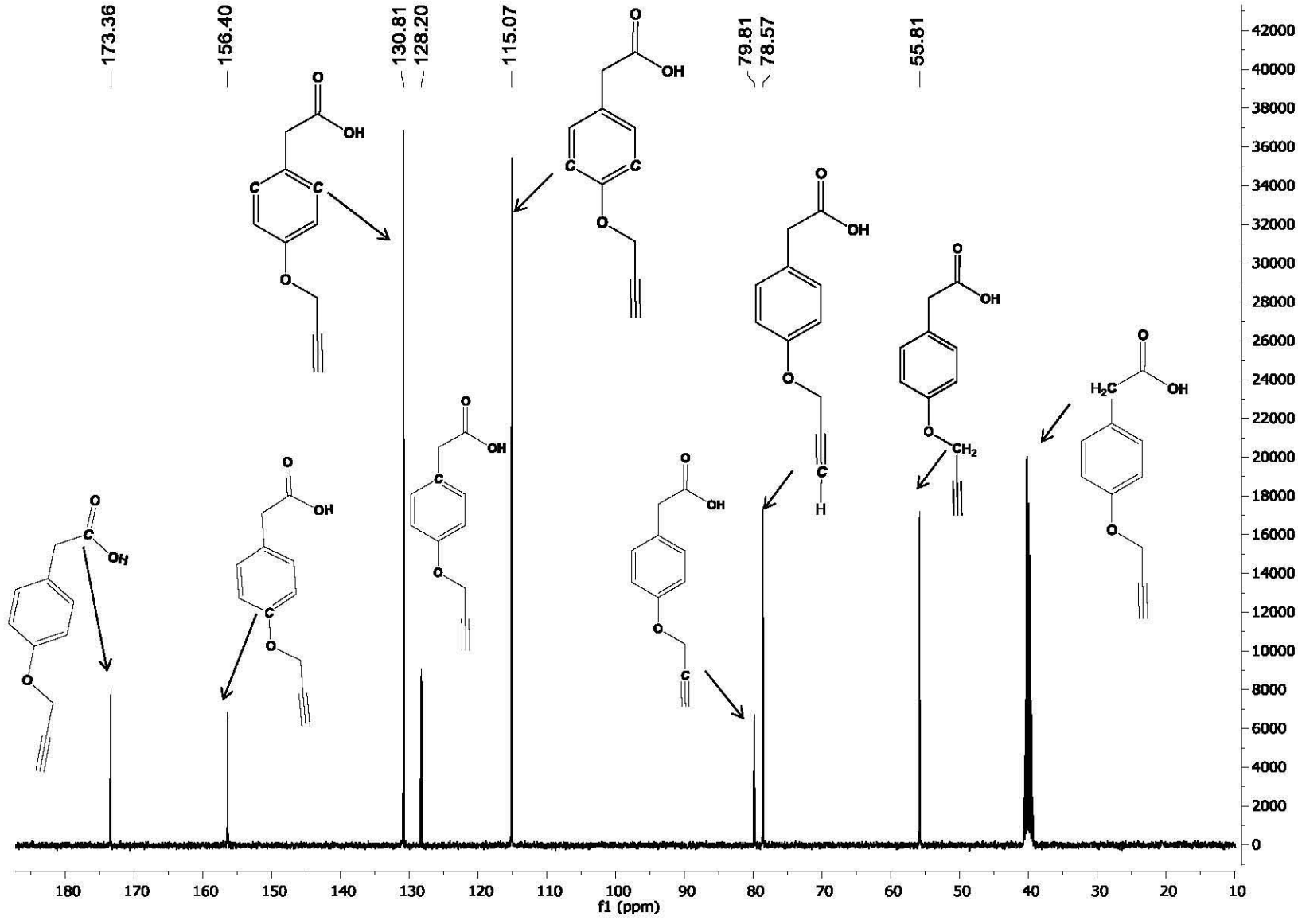


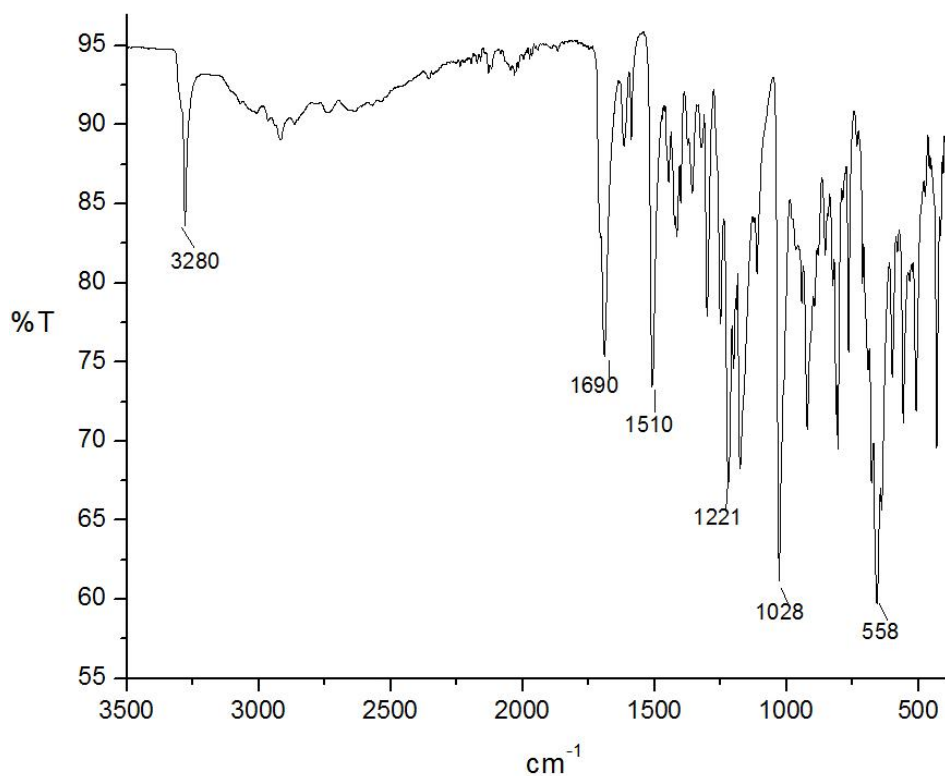
Espectro 54. Espectro ESI de (III) acetato de 2-[4-(propargiloxi)fenil] metílico



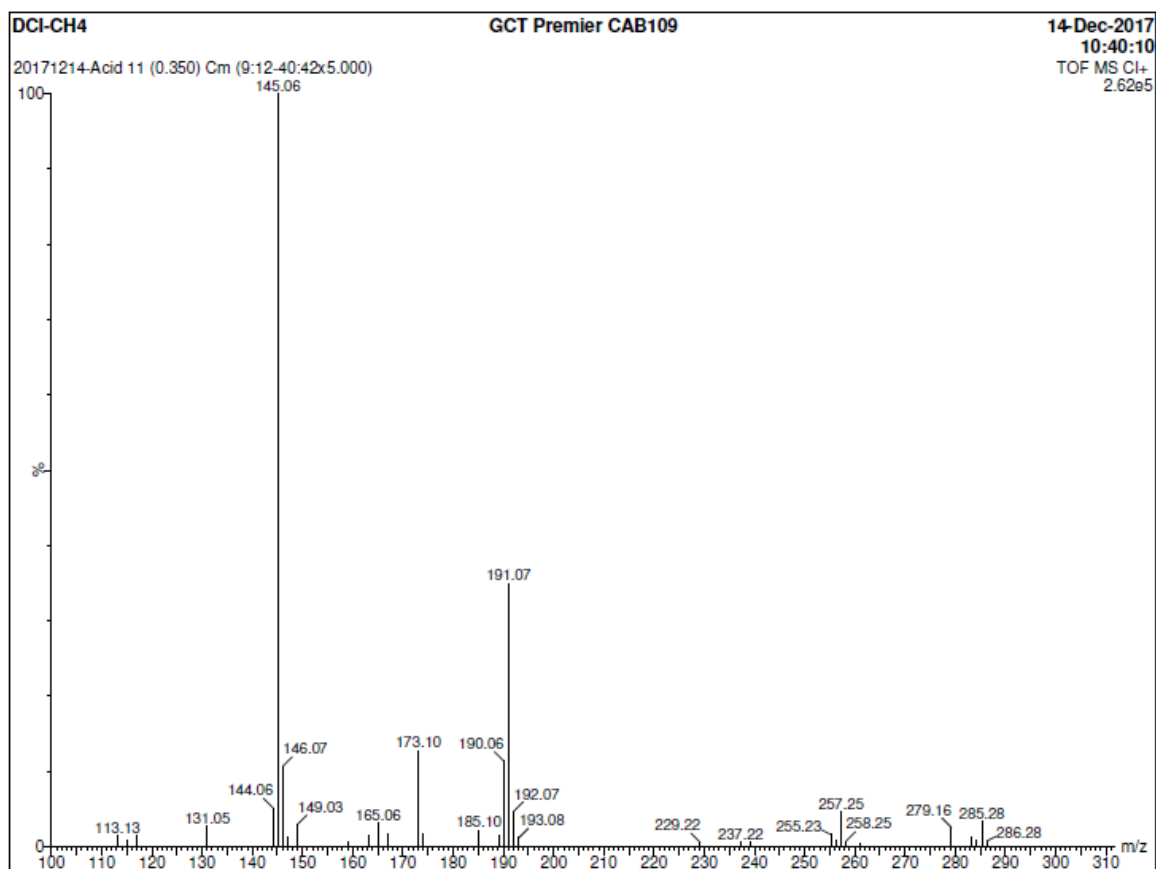
Espectro 55. RMN ^1H del intermediario (IV) ácido 2-[4-(propargiloxy)fenil]acético en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

Espectro 56. RMN ^{13}C de (IV) ácido 2-[4-(propargiloxi)fenil]acético en DMSO- d_6 a 400 MHz.

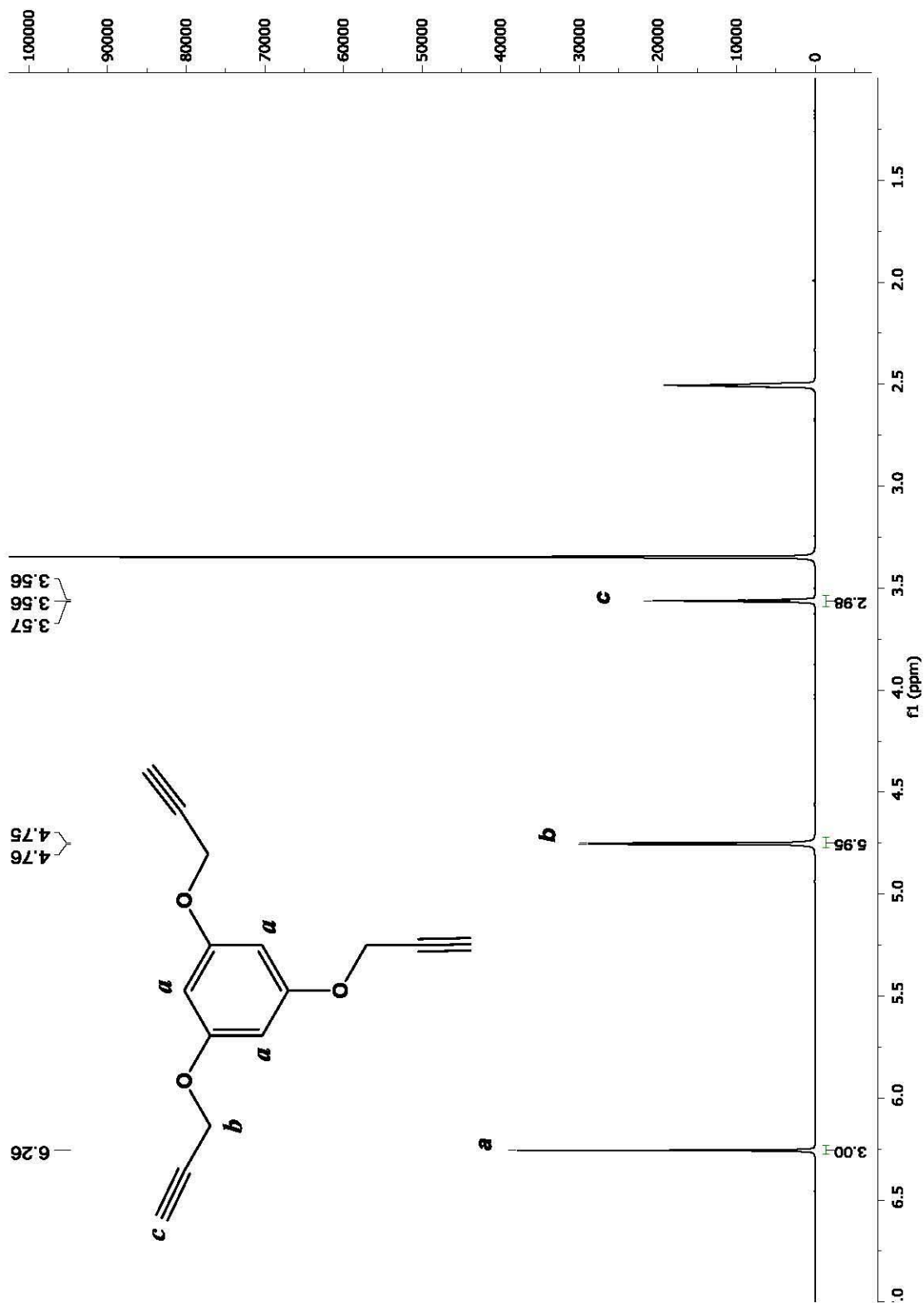




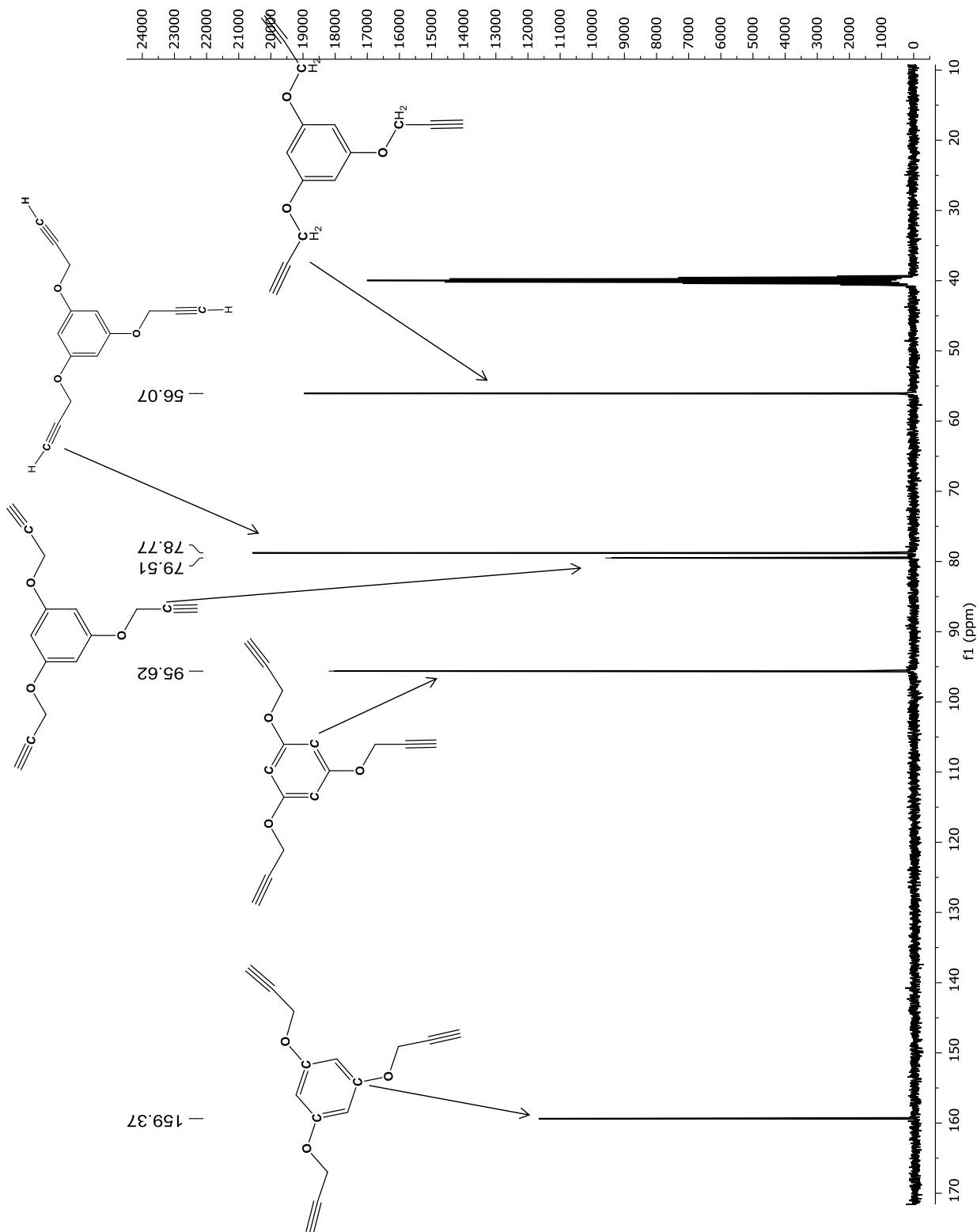
Espectro 57. Espectro IR (ATR) de (IV) ácido 2-[4-(propargiloxy)fenil]acético



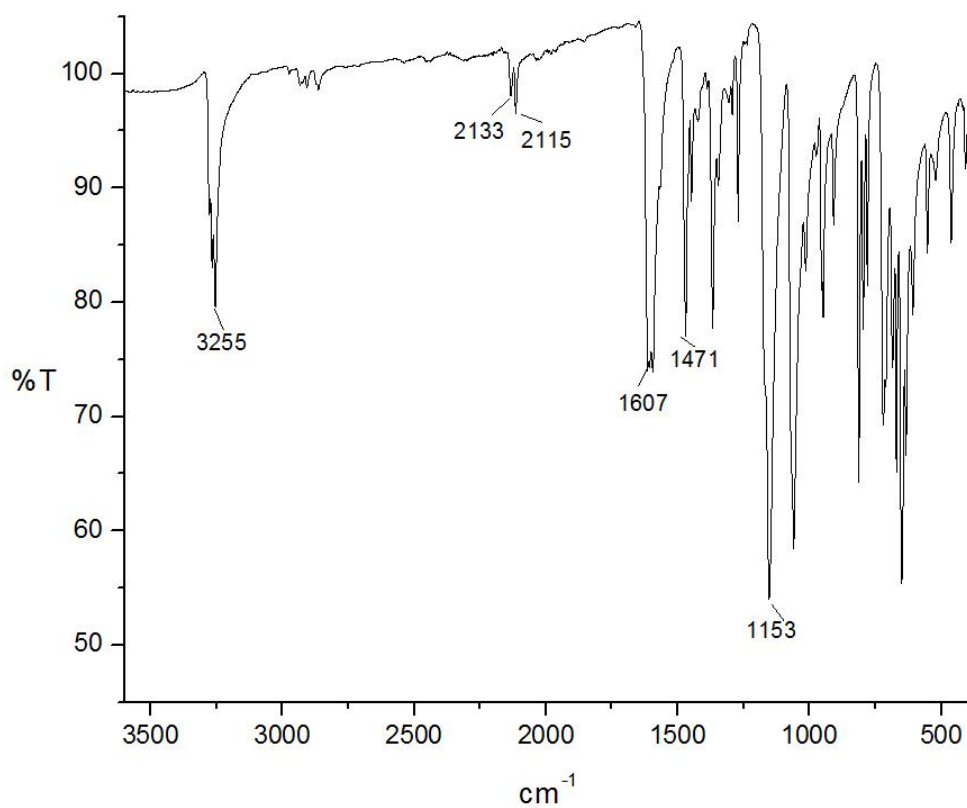
Espectro 58. Espectro ESI de (IV) ácido 2-[4-(propargiloxy)fenil]acético



Espectro 59. RMN ^1H del intermediario (V) 1,3,5-tris(propargiloxi)benzeno en $\text{DMSO-}d_6$
a 400 MHz.



Espectro 60. RMN ^{13}C del intermediario (V) 1,3,5-tris(propargiloxi)benzeno en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

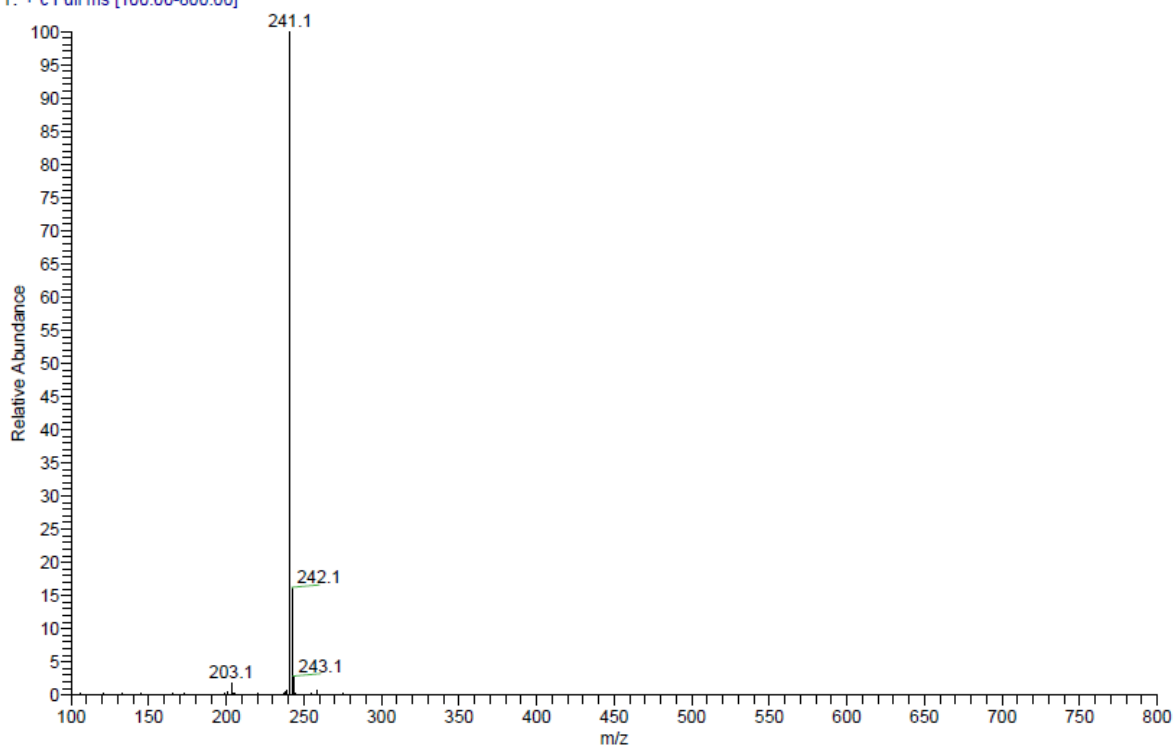


Espectro 61. Espectro IR (ATR) de (V) 1,3,5-tris(propargiloxi)benzeno

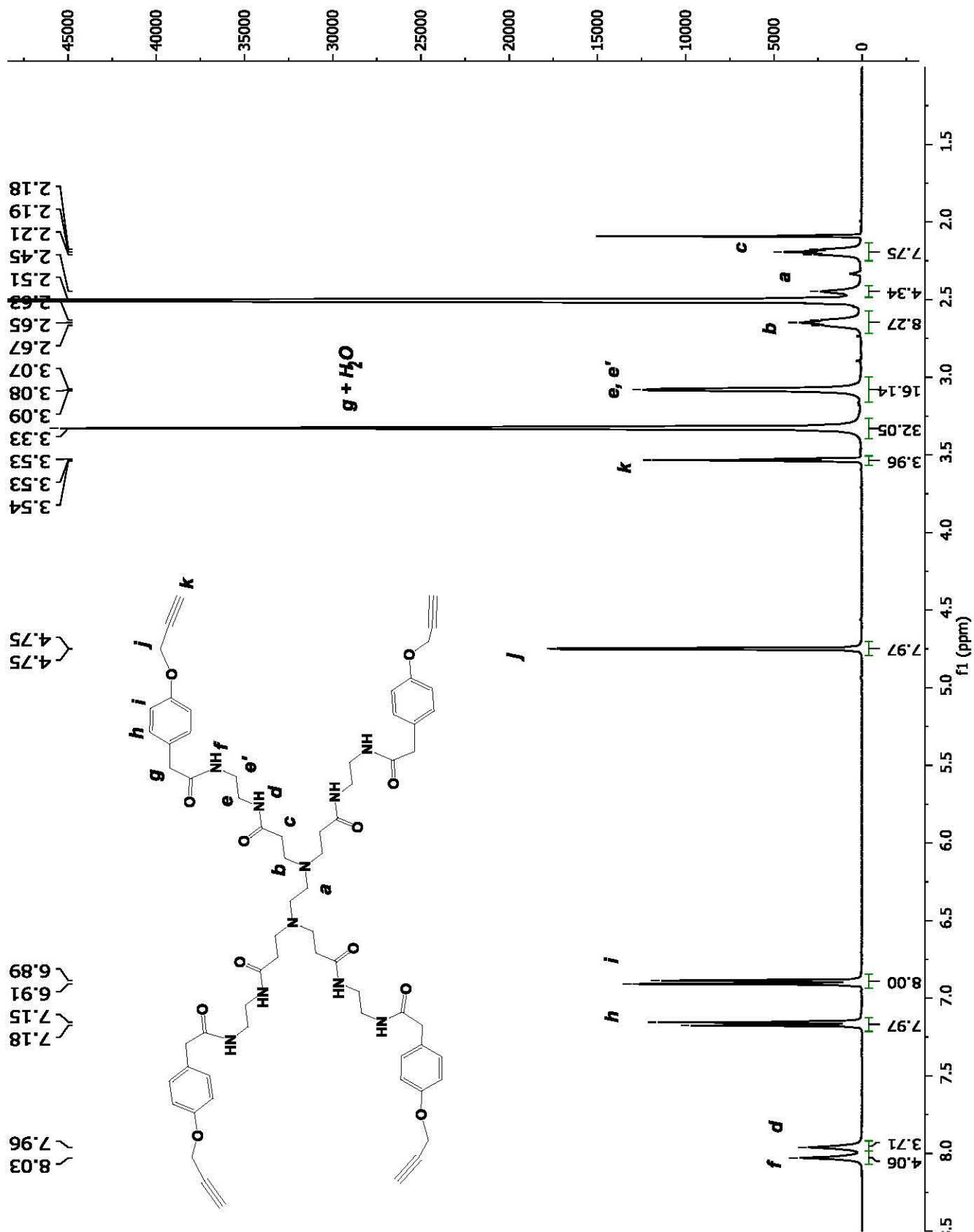
C:\Xcalibur\data\2018\Fevrier\TRIALKYNE
DCI-NH3

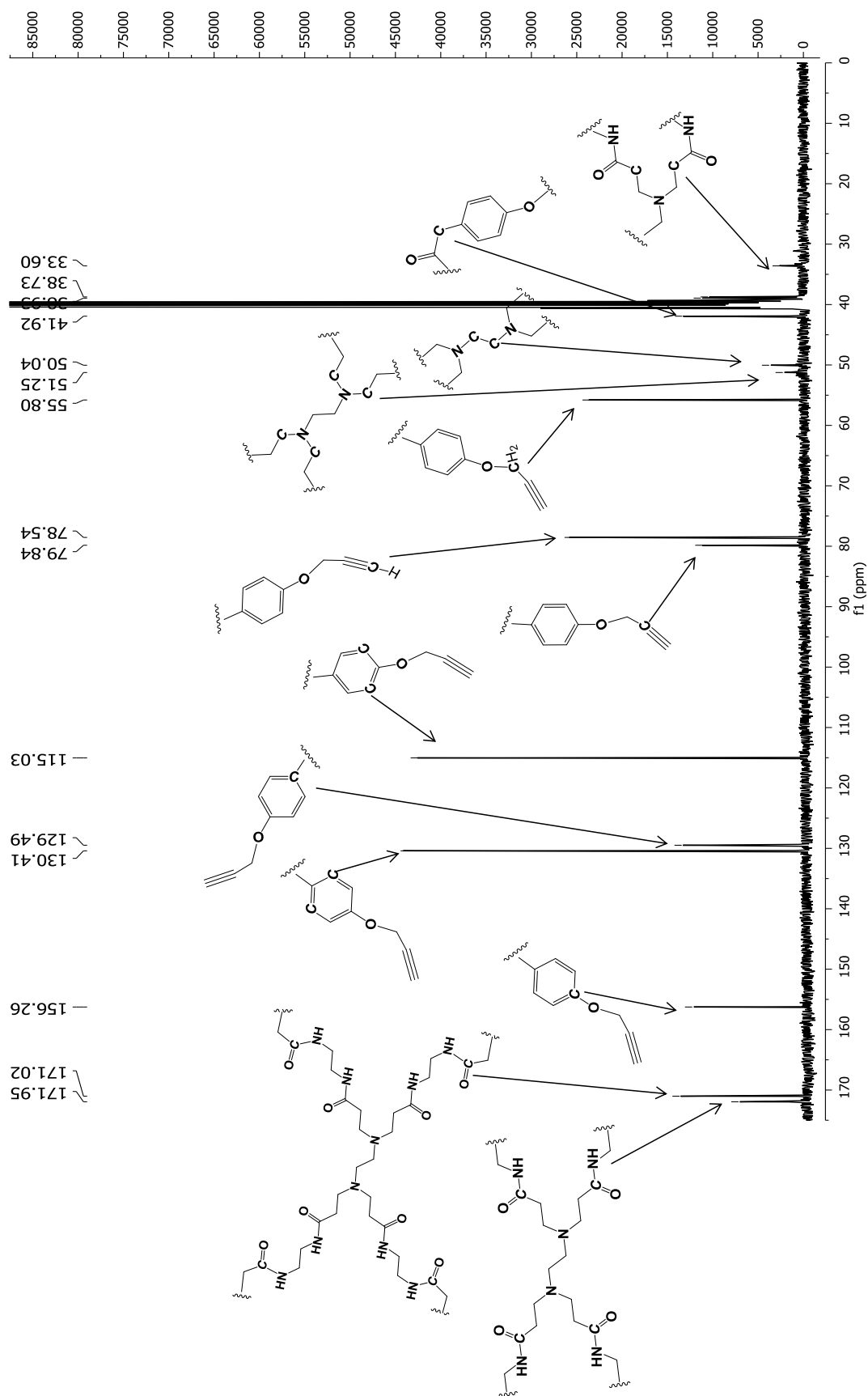
2/14/2018 11:48:56 AM

TRIALKYNE #4-6 RT: 0.11-0.15 AV: 3 NL: 3.92E7
T: + c Full ms [100.00-800.00]

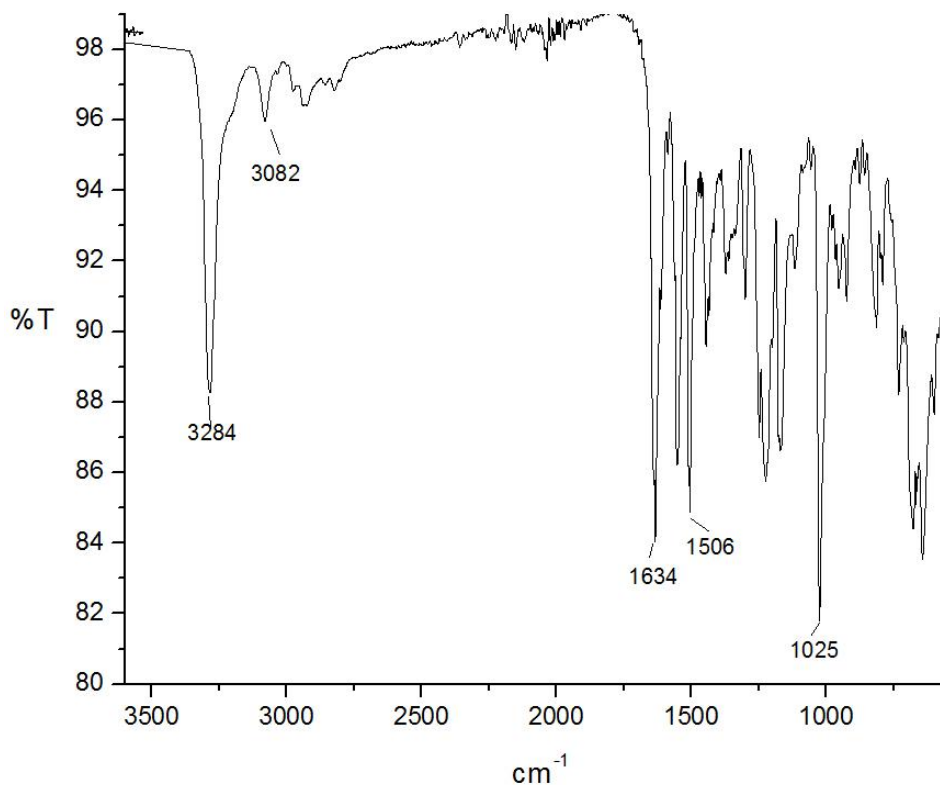


Espectro 62. Espectro ESI de (V) 1,3,5-tris(propargiloxi)benzeno

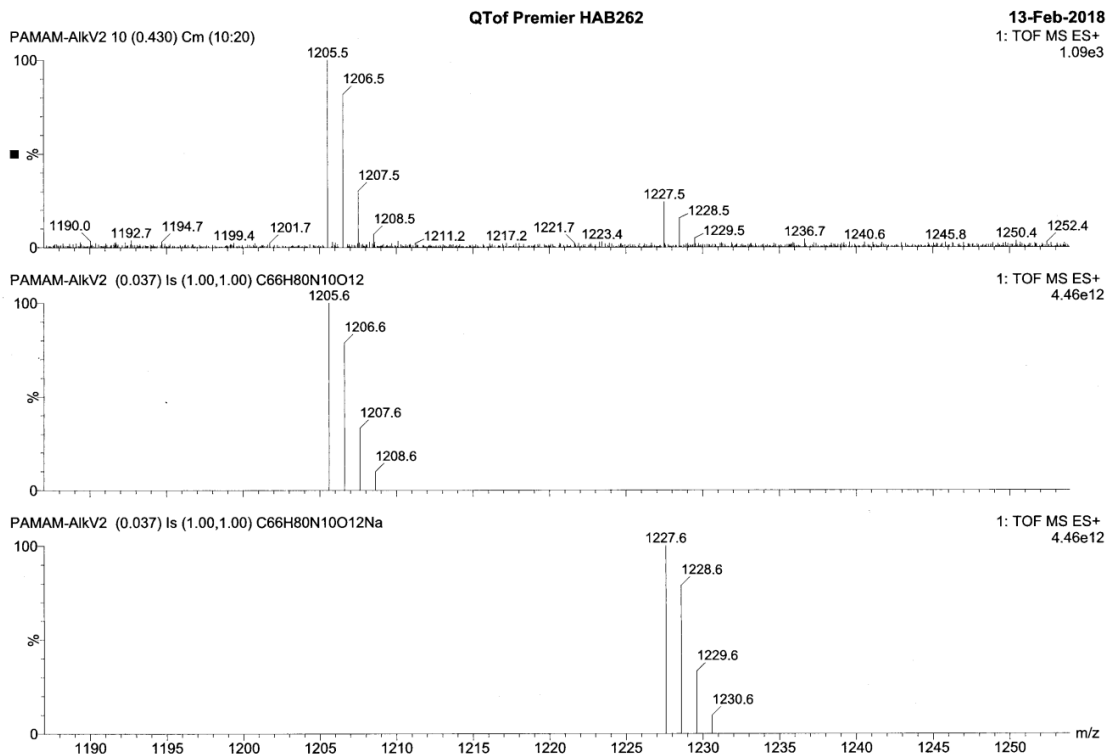
Espectro 63. RMN ¹H del dendrímero PAMAM G0-alcino (VI) en DMSO-*d*₆ a 400 MHz.



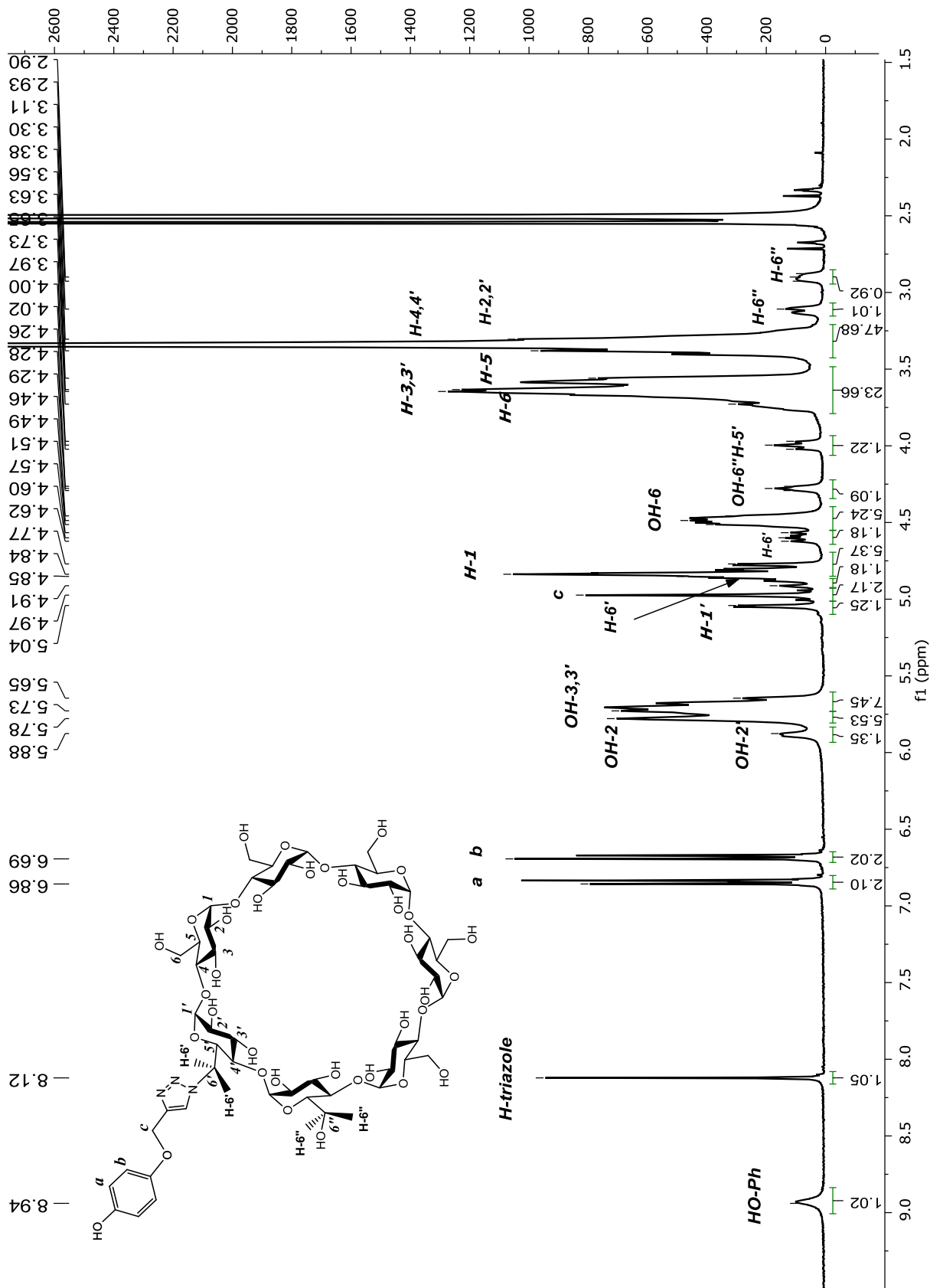
Espectro 64. RMN ^{13}C del dendrímtero PAMAM G0-alcino (VI) en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



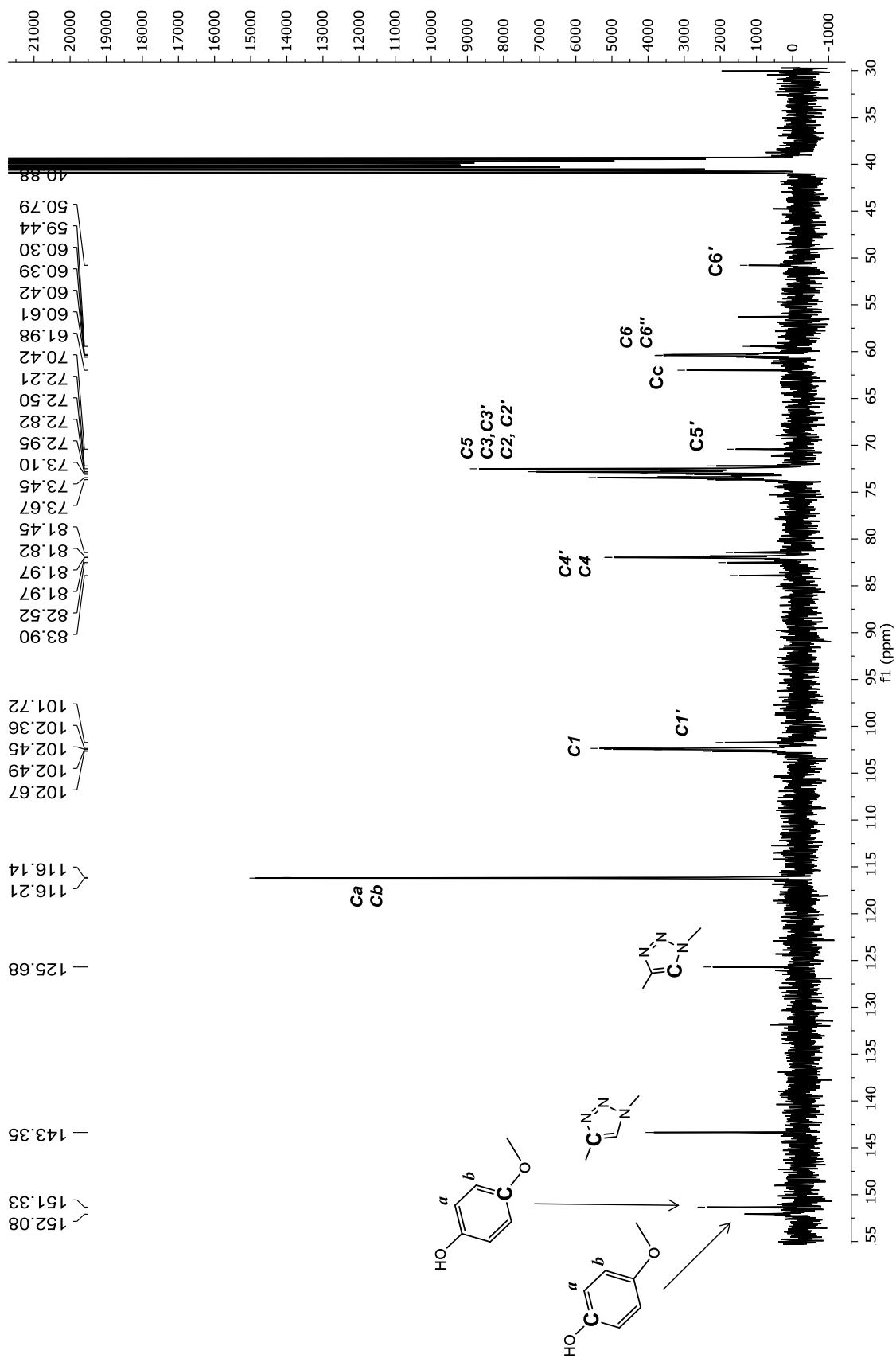
Espectro 65. Espectro IR (ATR) del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI)



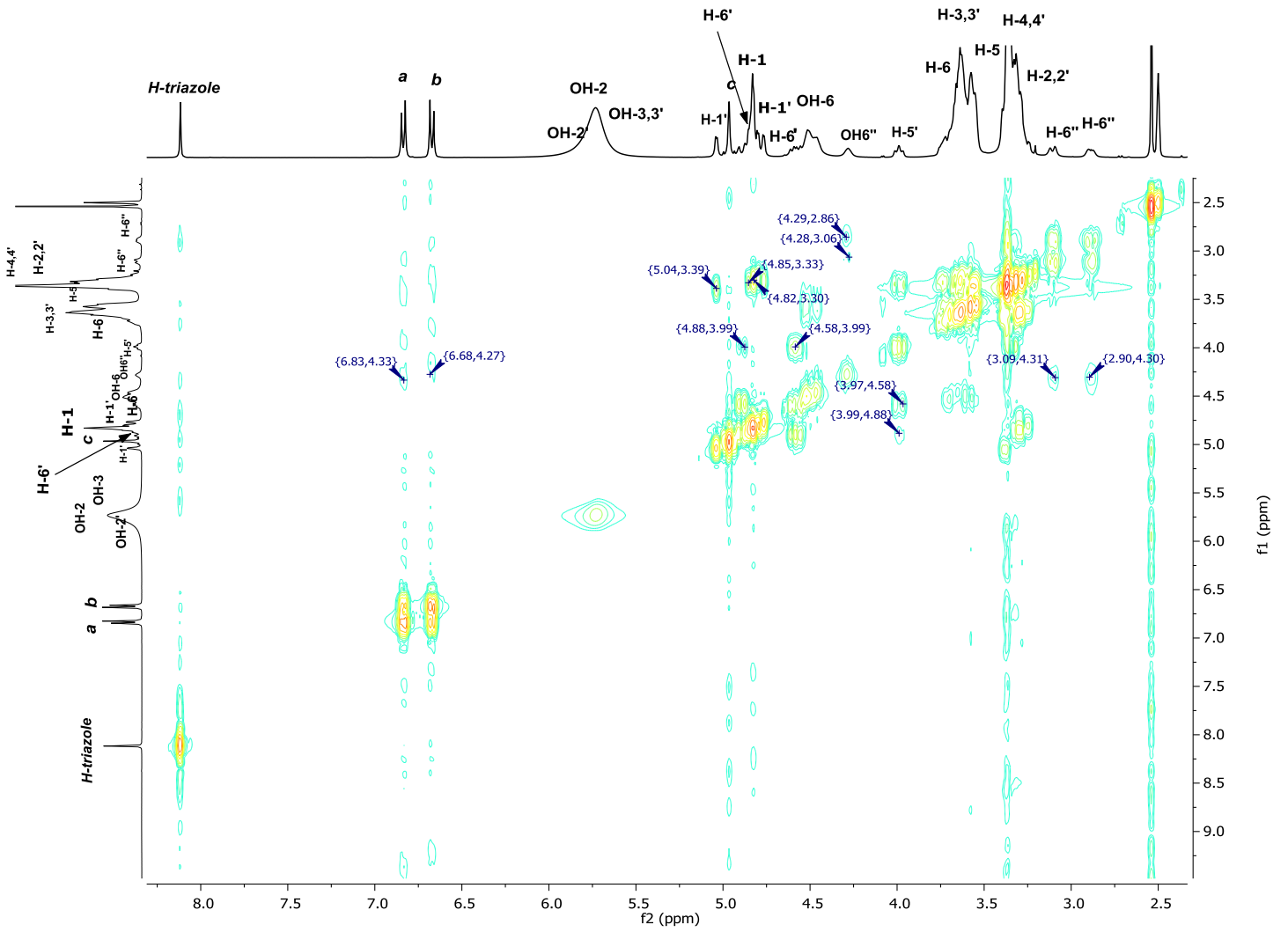
Espectro 66. Espectro ESI del dendrímero PAMAM G0-alquino (VI)



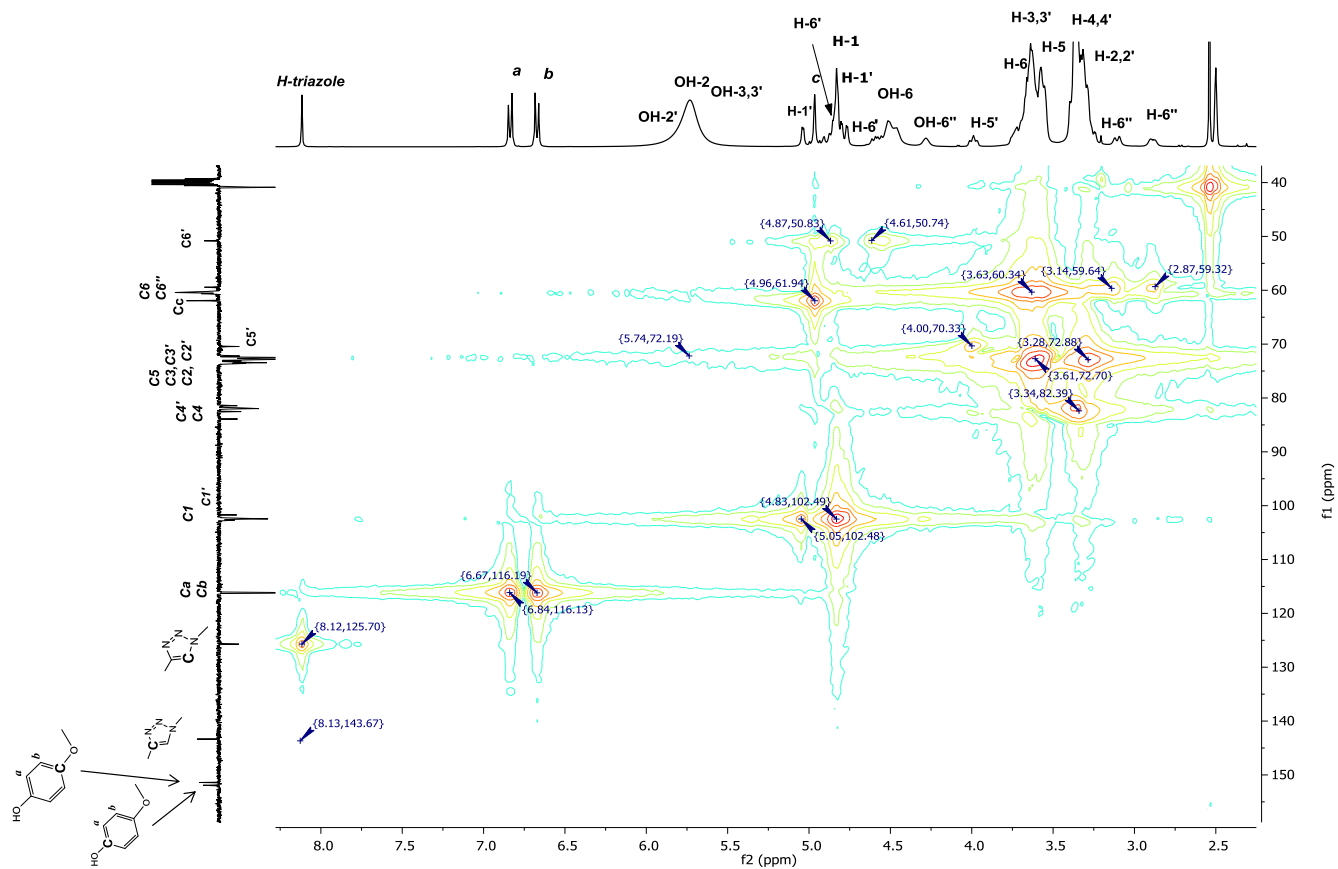
Espectro 67. RMN ^1H del compuesto A en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



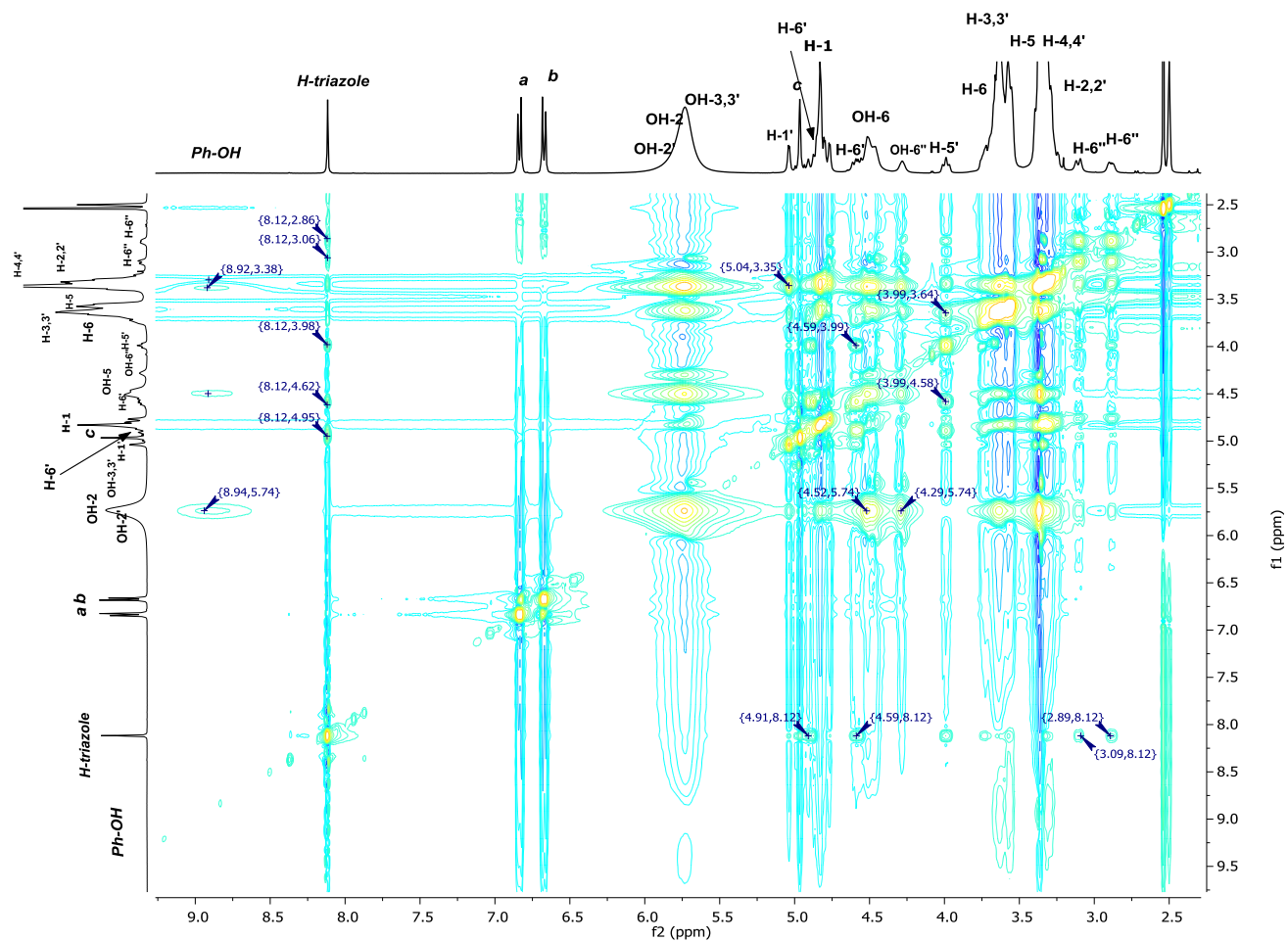
Espectro 68. RMN ^{13}C del compuesto A en DMSO-d_6 a 400 MHz.



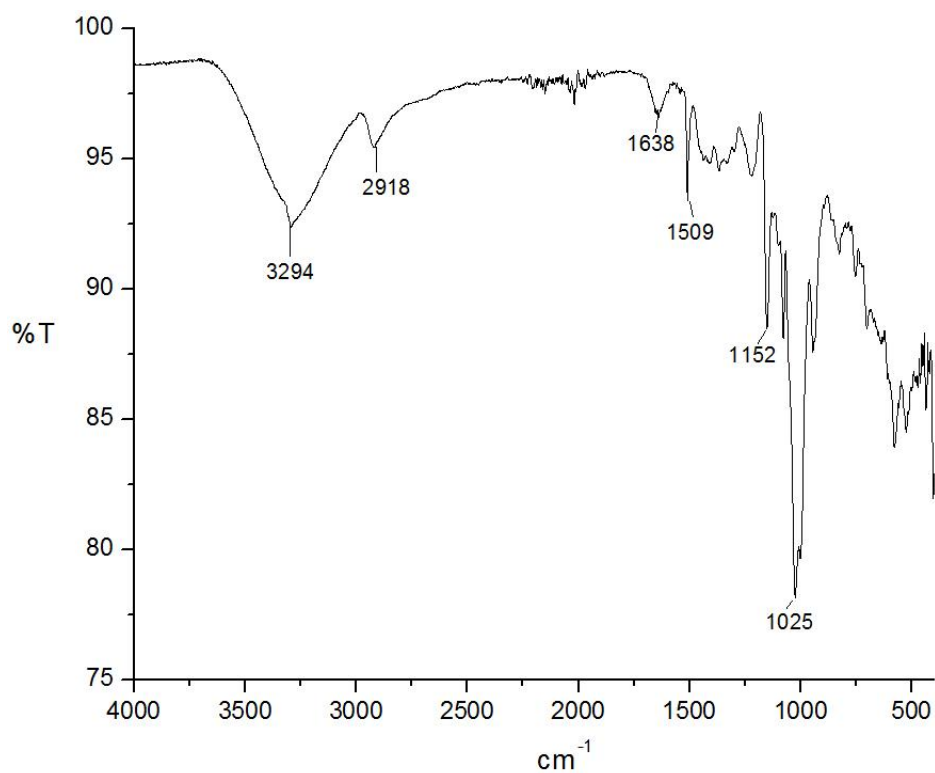
Espectro 69. RMN 2D ^1H - ^1H COSY del compuesto A en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



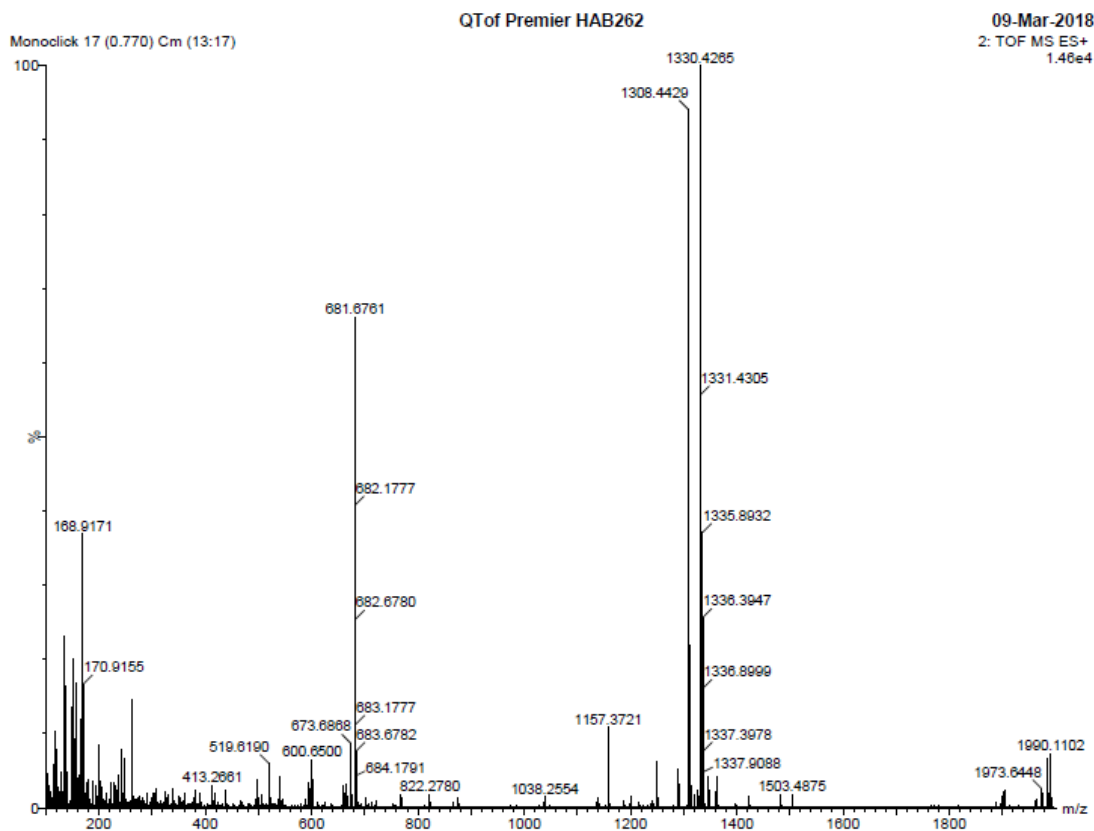
Espectro 70. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto A en DMSO-d_6 a 400 MHz.



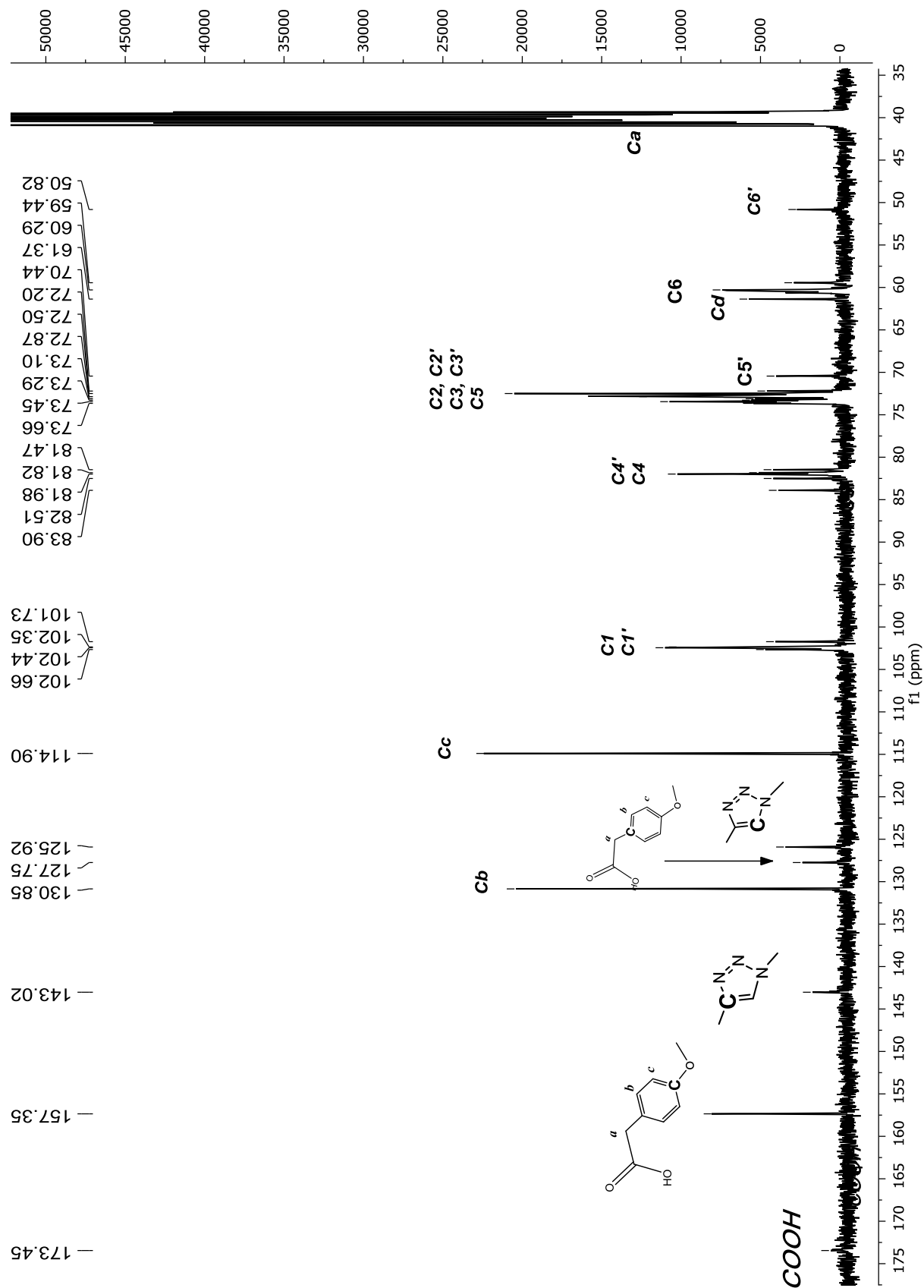
Espectro 71. RMN 2D ^1H - ^1H NOESY del compuesto A en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



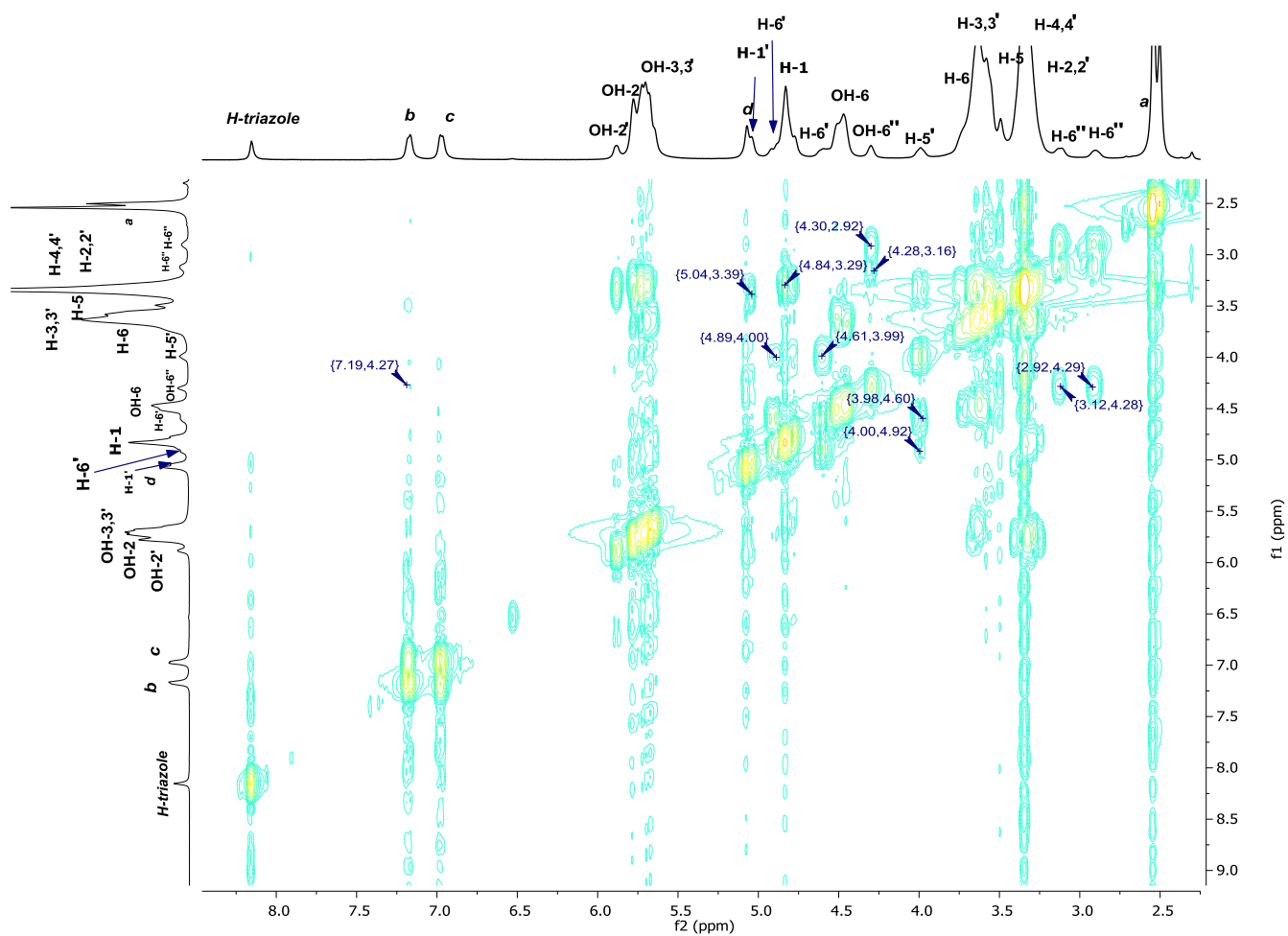
Espectro 72. Espectro IR (ATR) del compuesto A



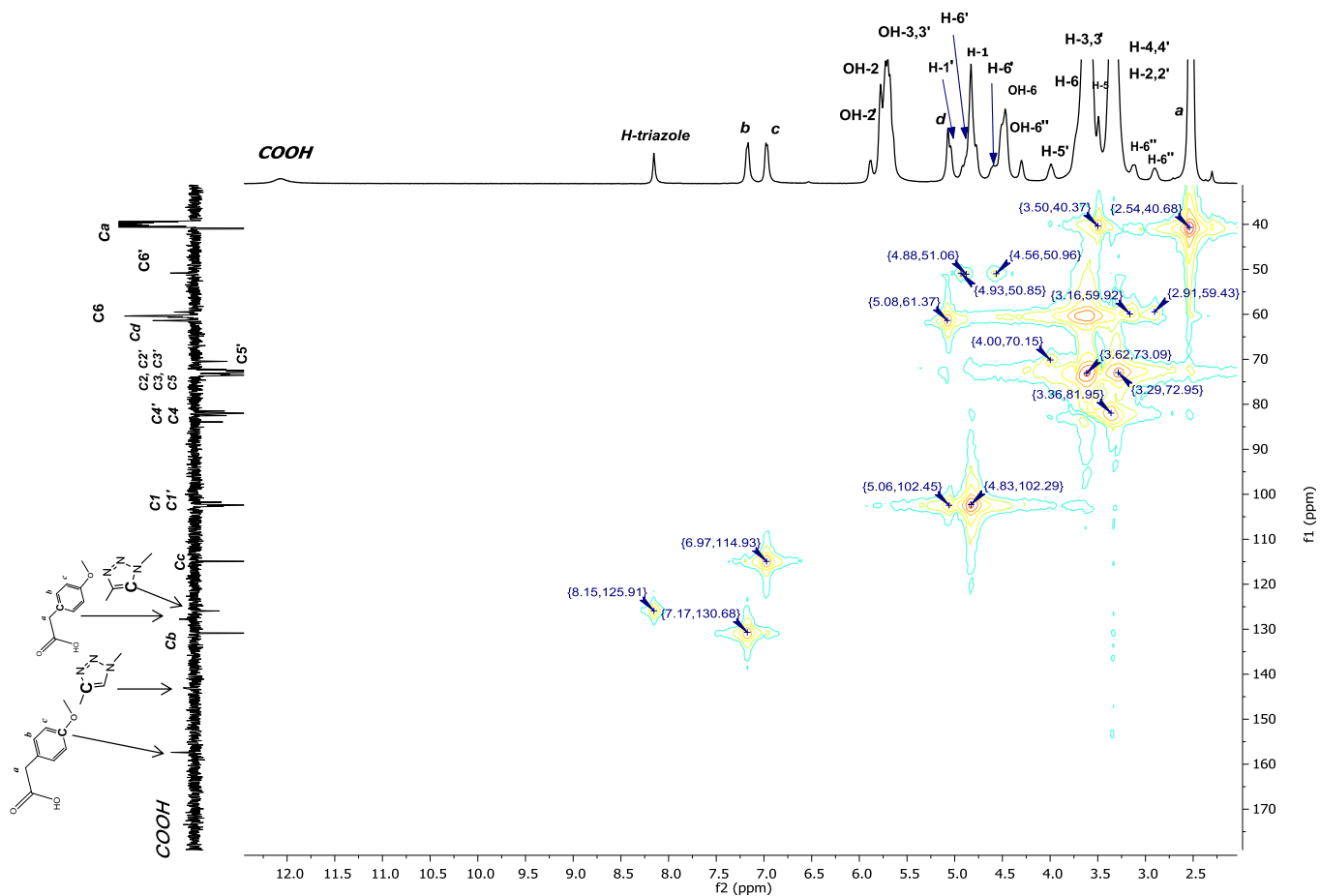
Espectro 73. Espectro ESI del compuesto A



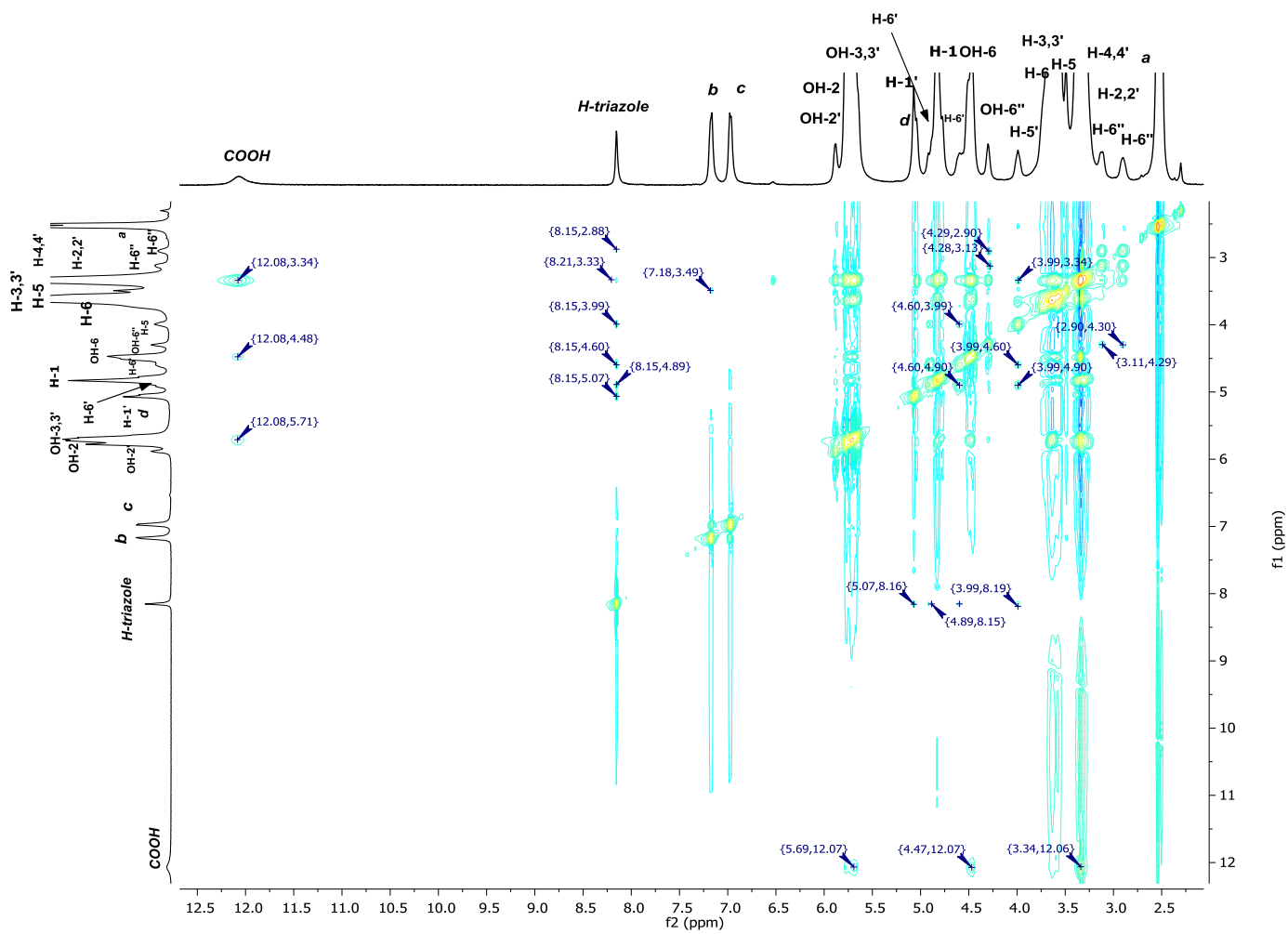
Espectro 75. RMN ^{13}C del compuesto B en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



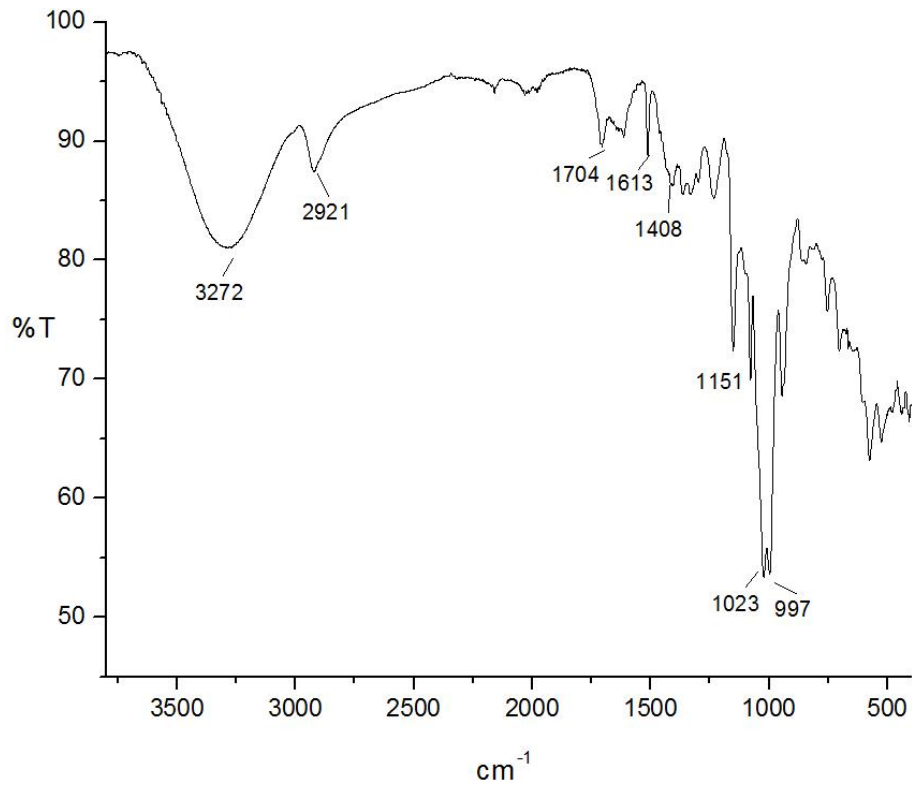
Espectro 76. RMN 2D ^1H - ^1H COSY del compuesto B en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



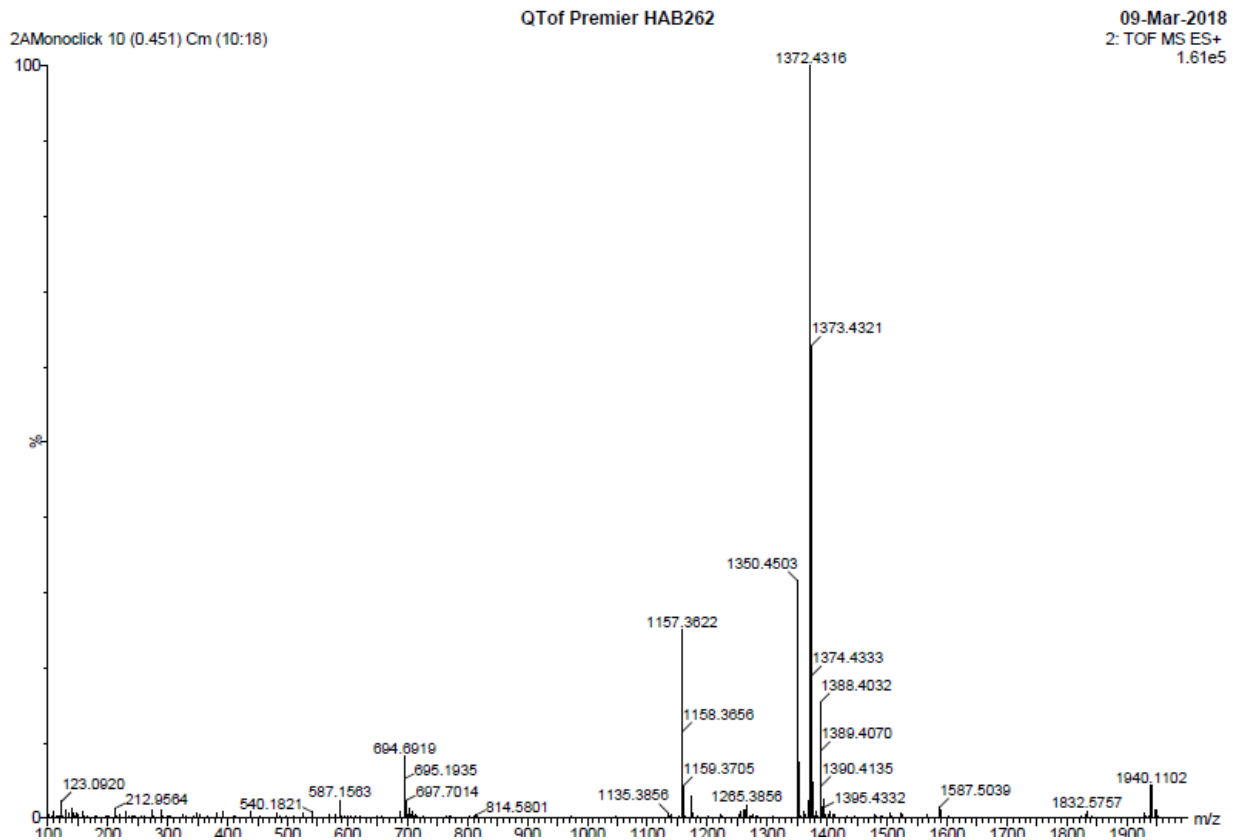
Spectro 77. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto B en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



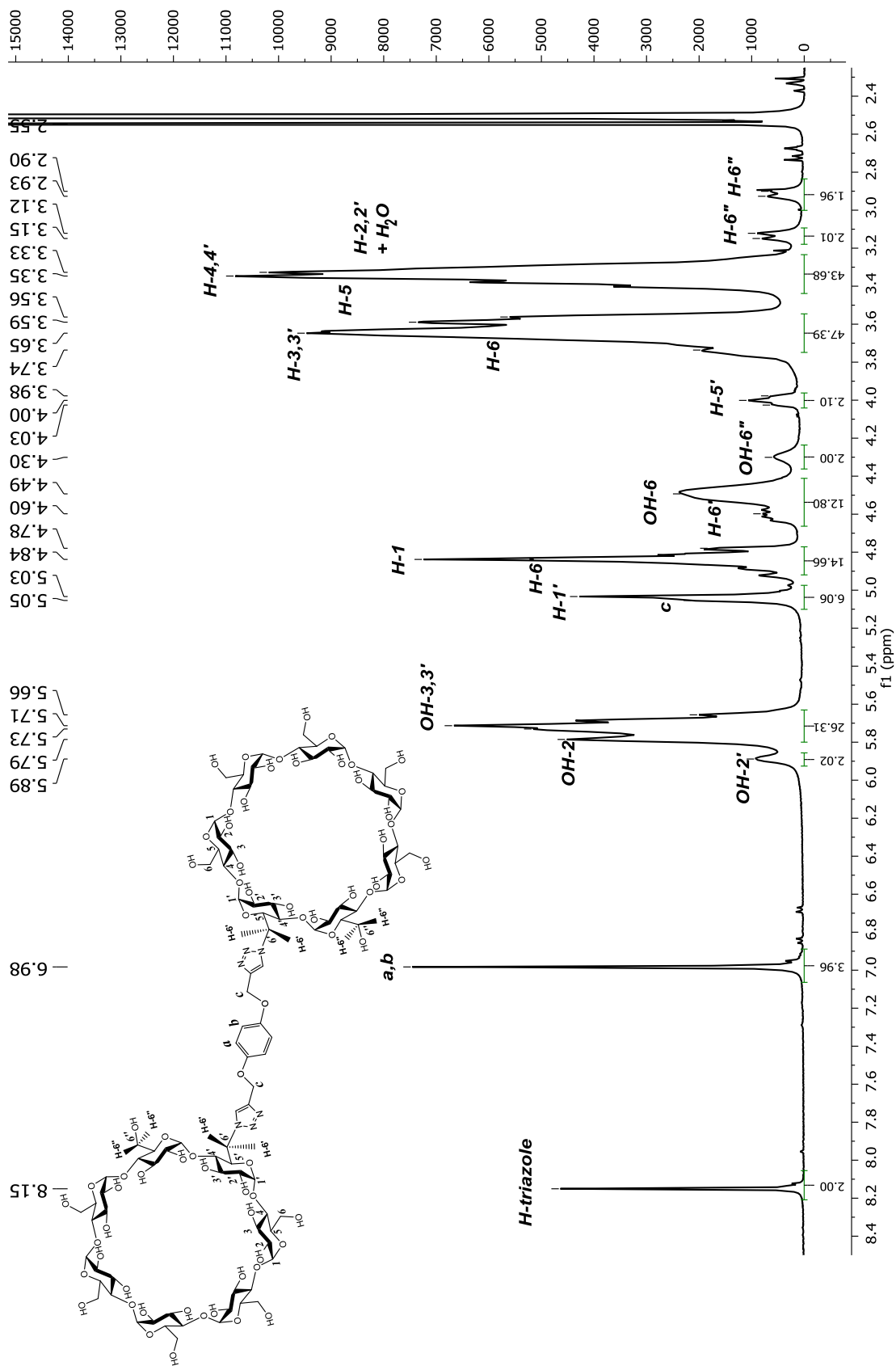
Espectro 78. RMN 2D ^1H - ^1H NOESY del compuesto B en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



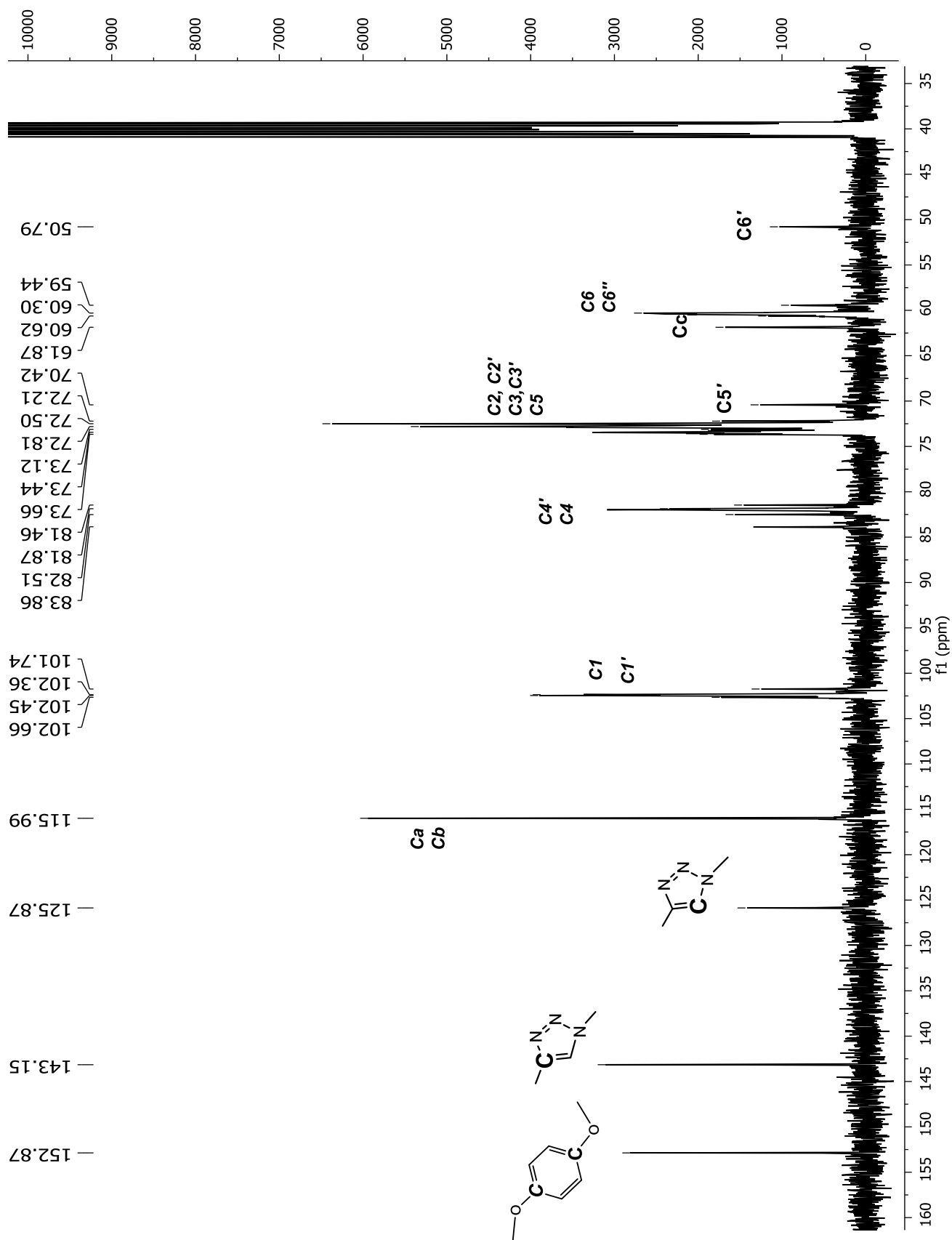
Espectro 79. Espectro IR (ATR) del compuesto B



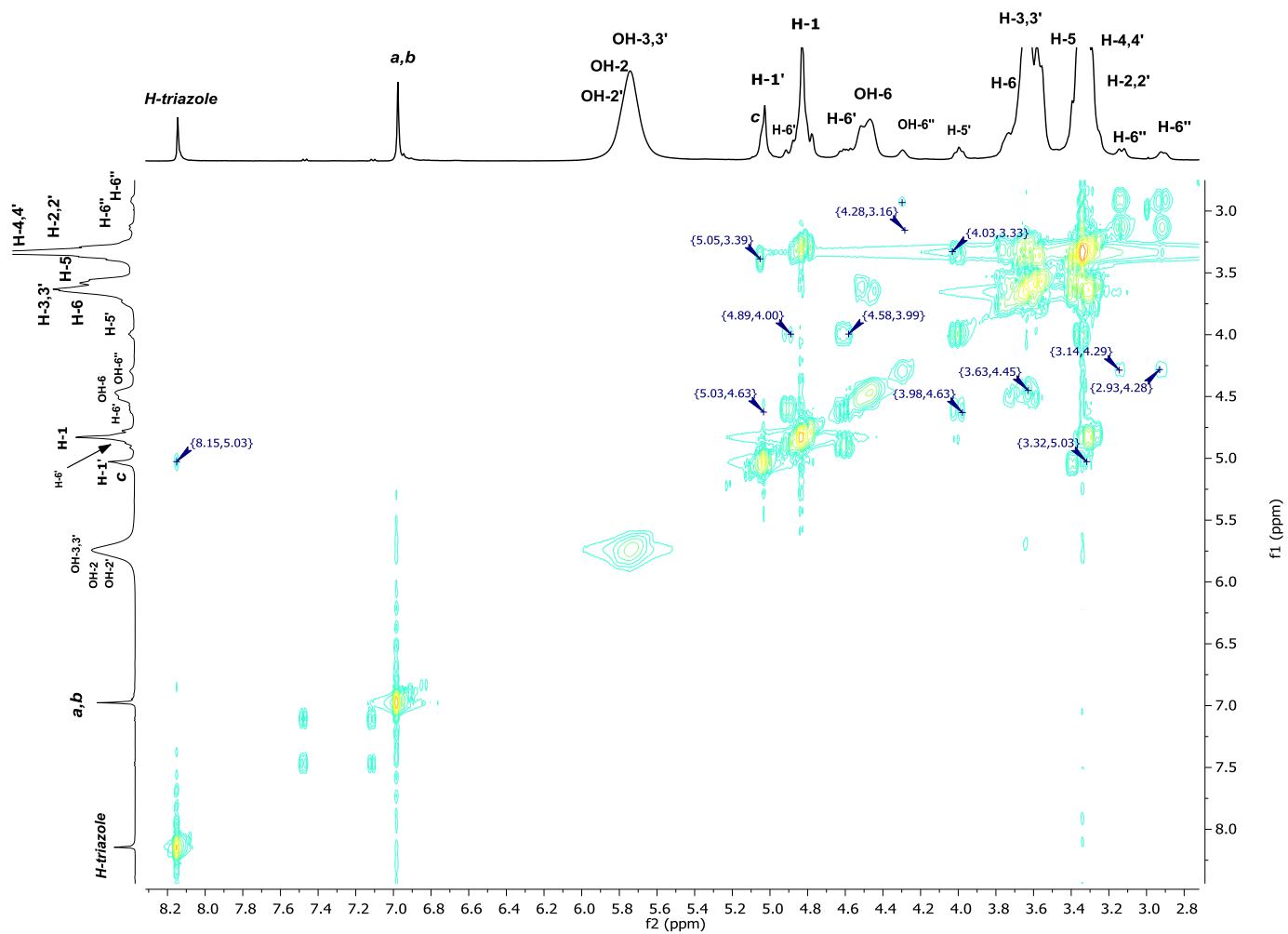
Espectro 80. Espectro ESI del compuesto B



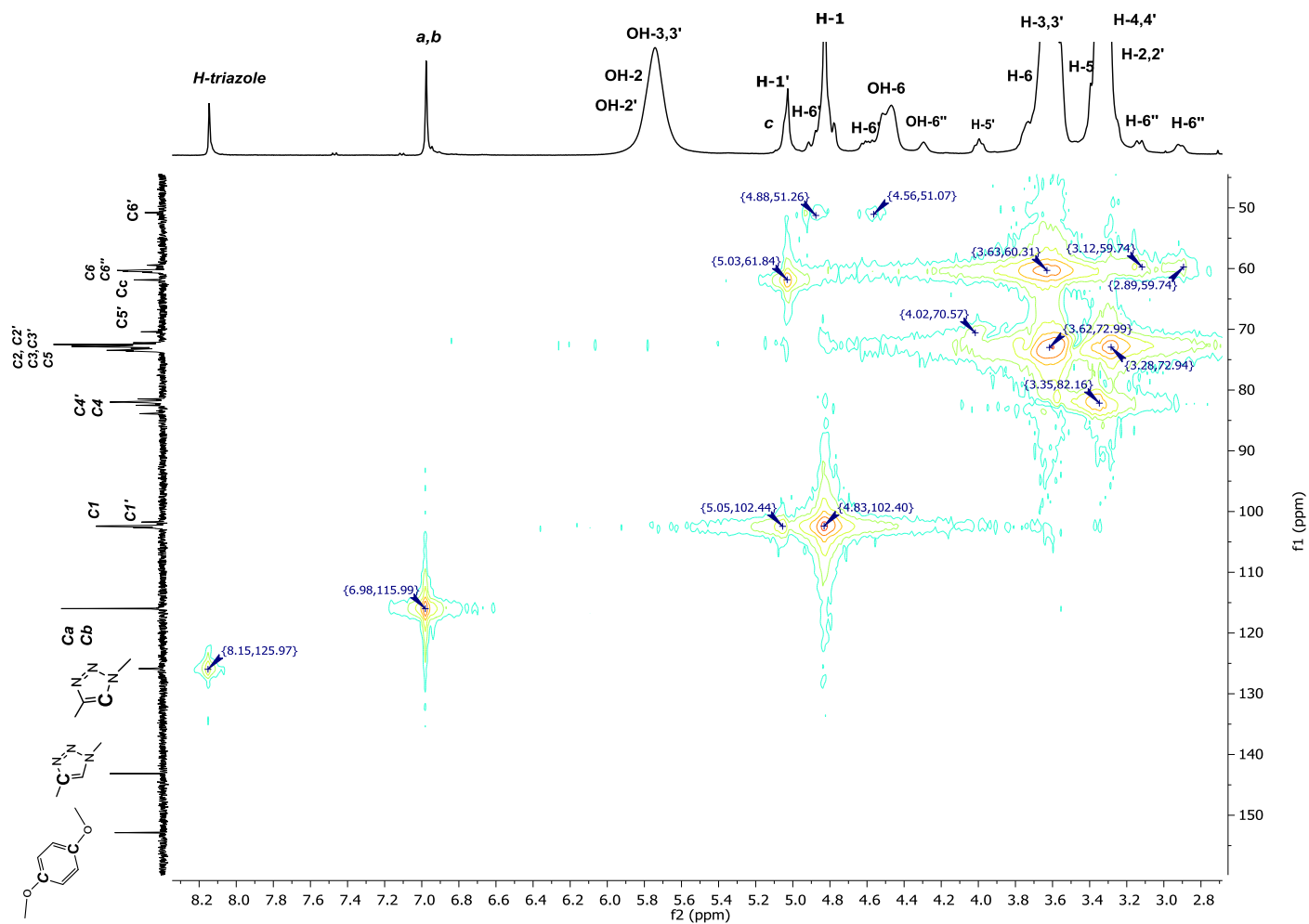
Espectro 81. RMN ^1H del compuesto C en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



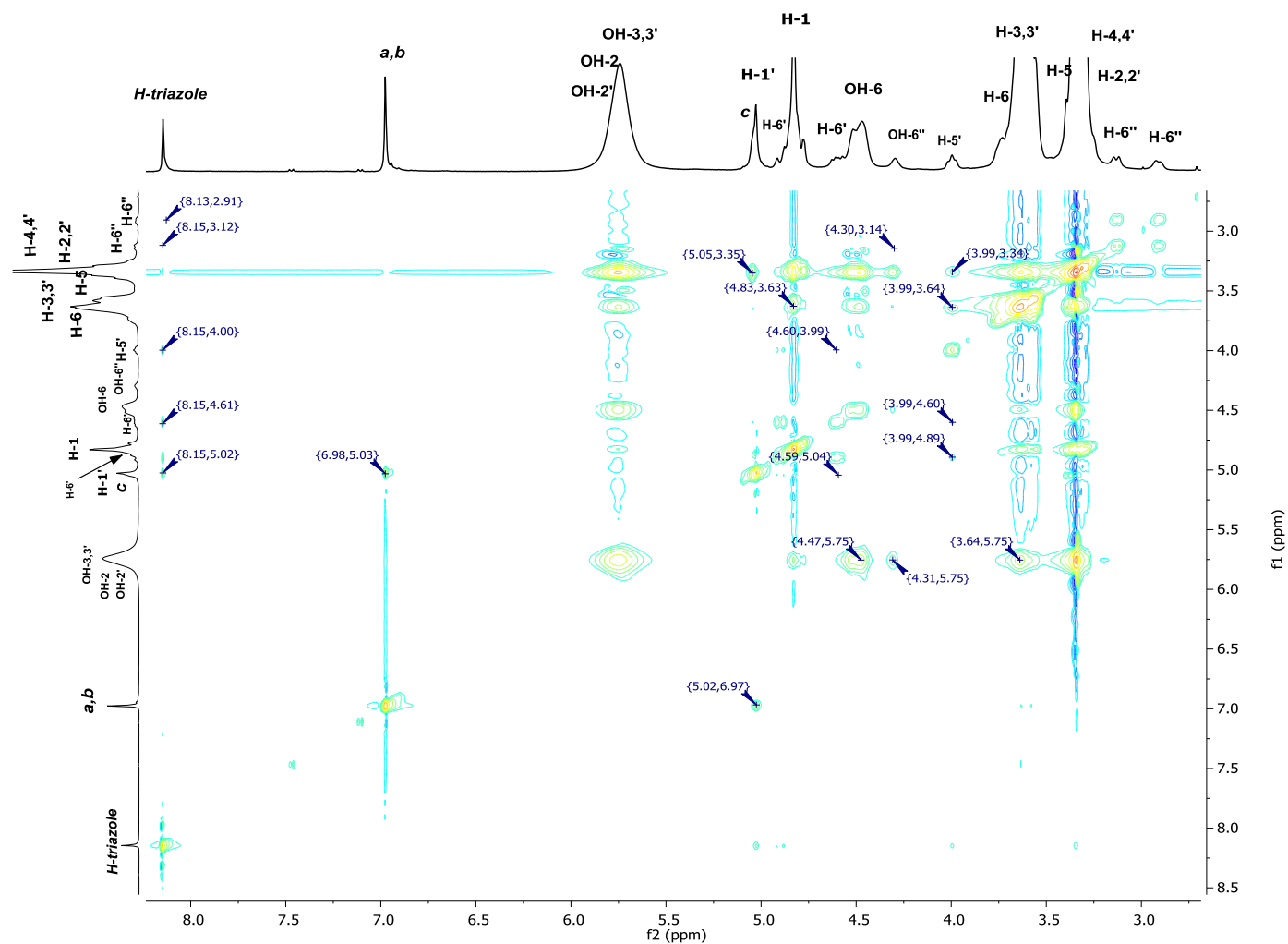
Espectro 82. RMN ^{13}C del compuesto C en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



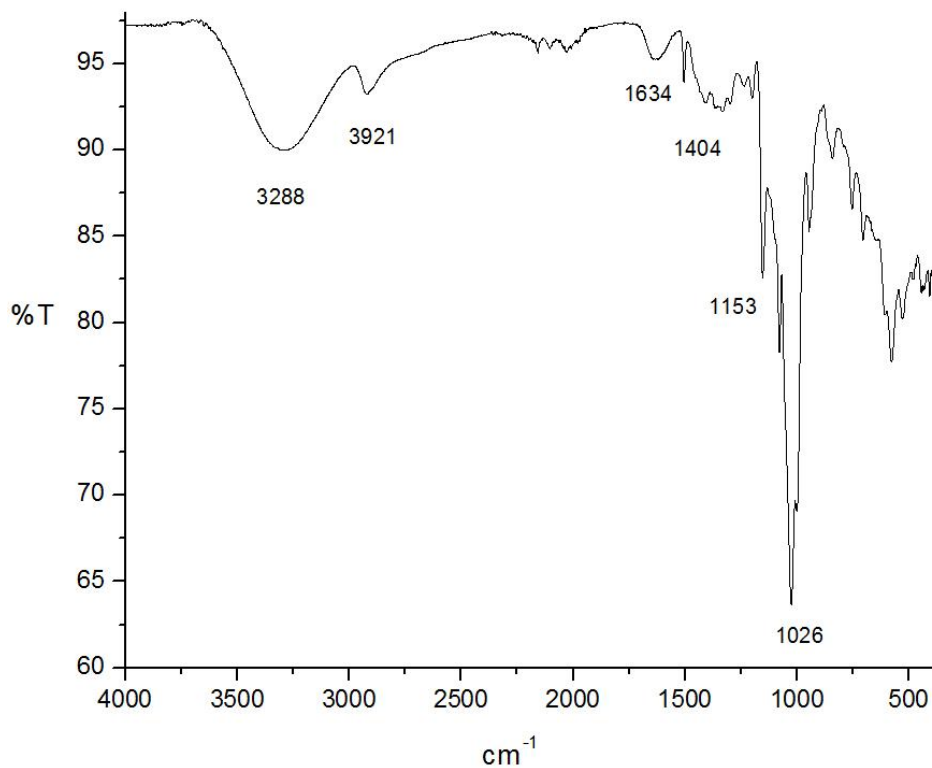
Espectro 83. RMN 2D ^1H - ^1H COSY del compuesto C en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



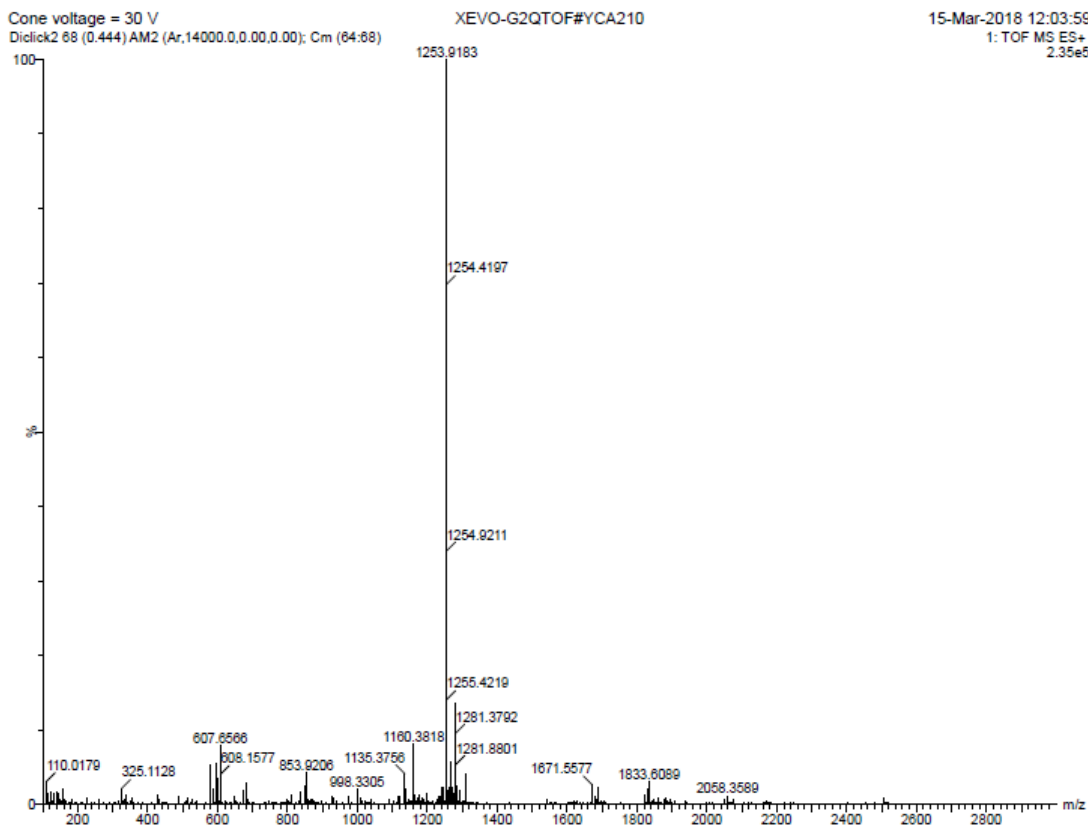
Espectro 84. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto C en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



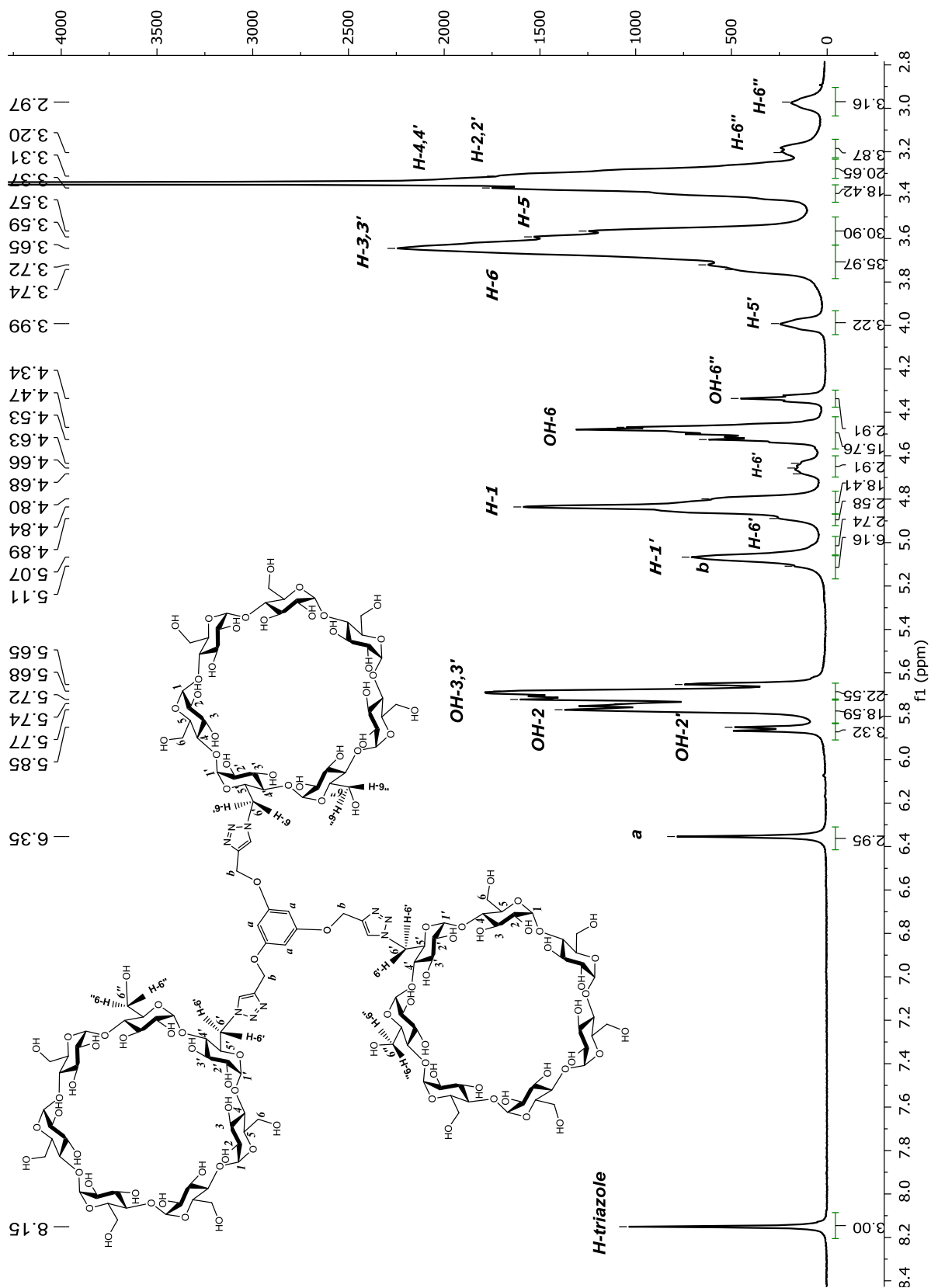
Espectro 85. RMN 2D ^1H - ^1H NOESY del compuesto C en DMSO- d_6 a 400 MHz.



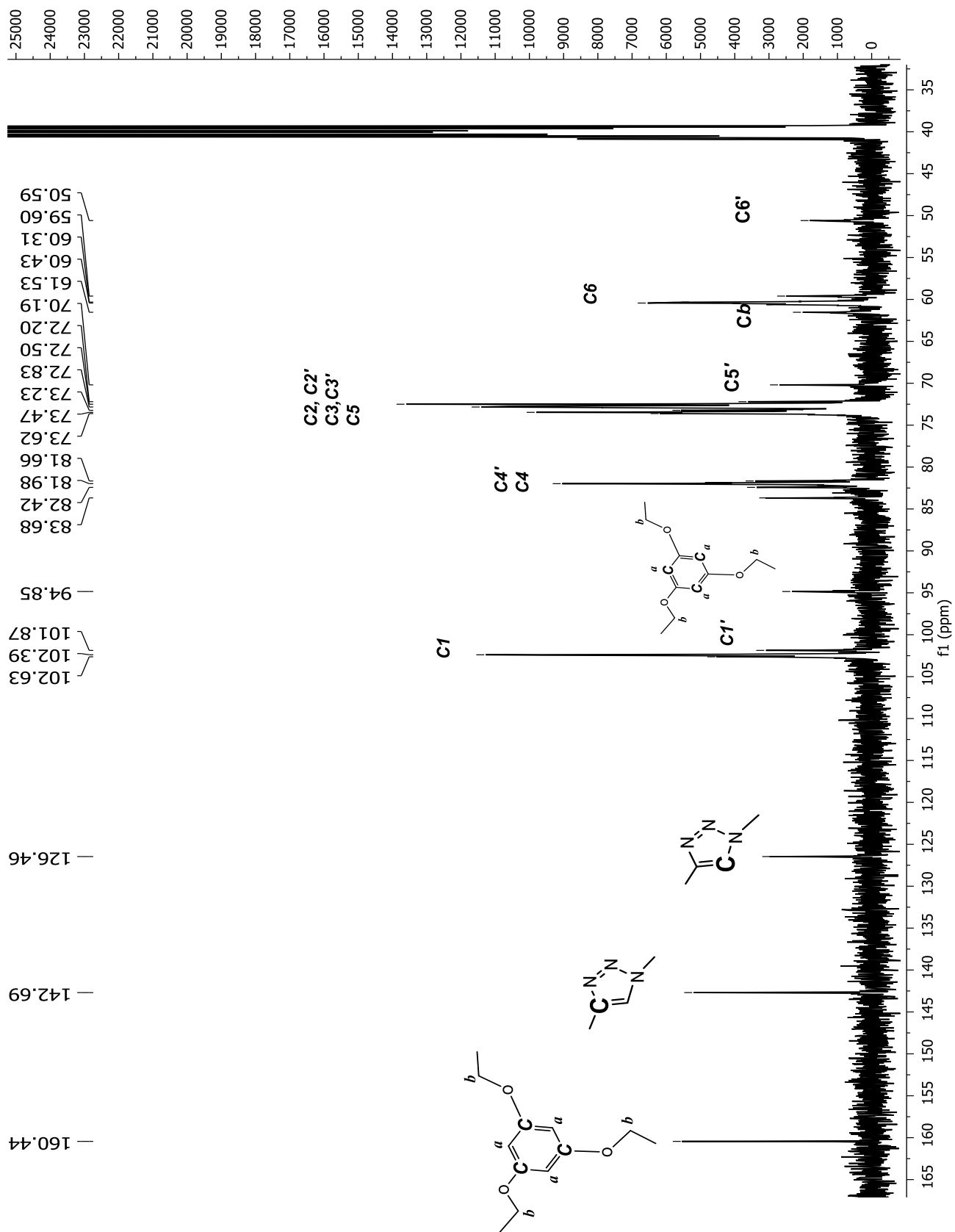
Espectro 86. Espectro IR (ATR) del compuesto C



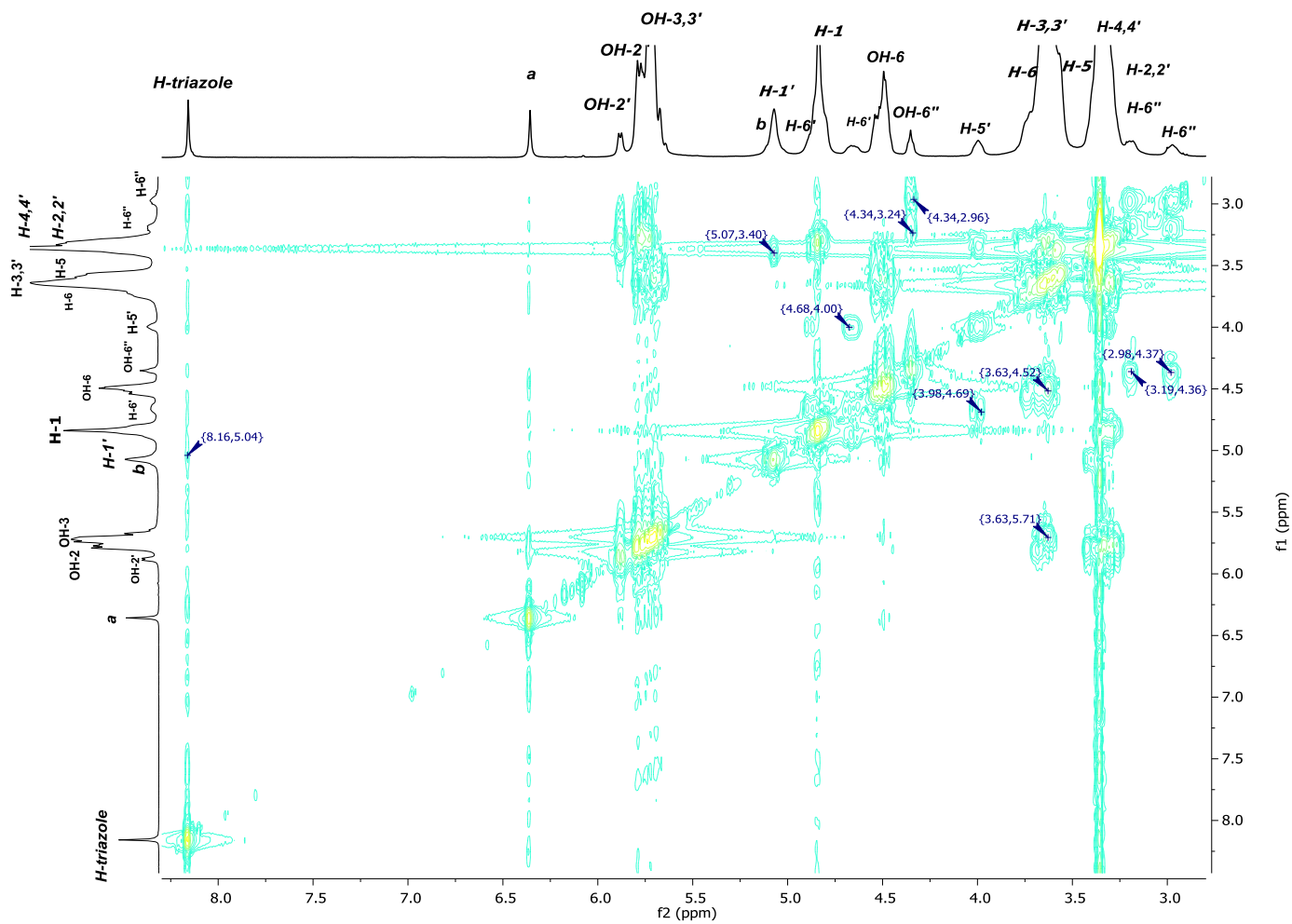
Espectro 87. Espectro ESI del compuesto C



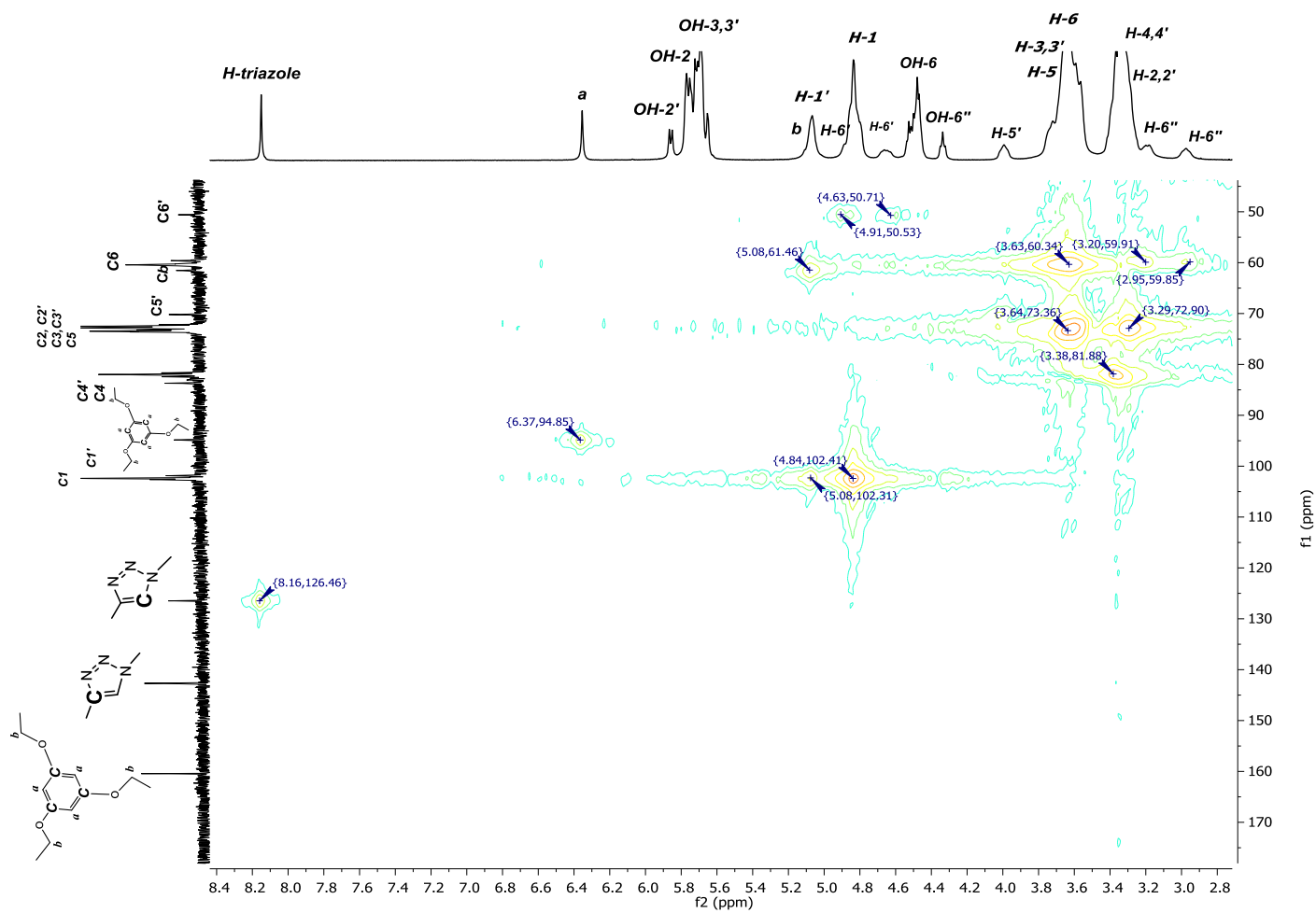
Espectro 88. RMN ^1H del compuesto D en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



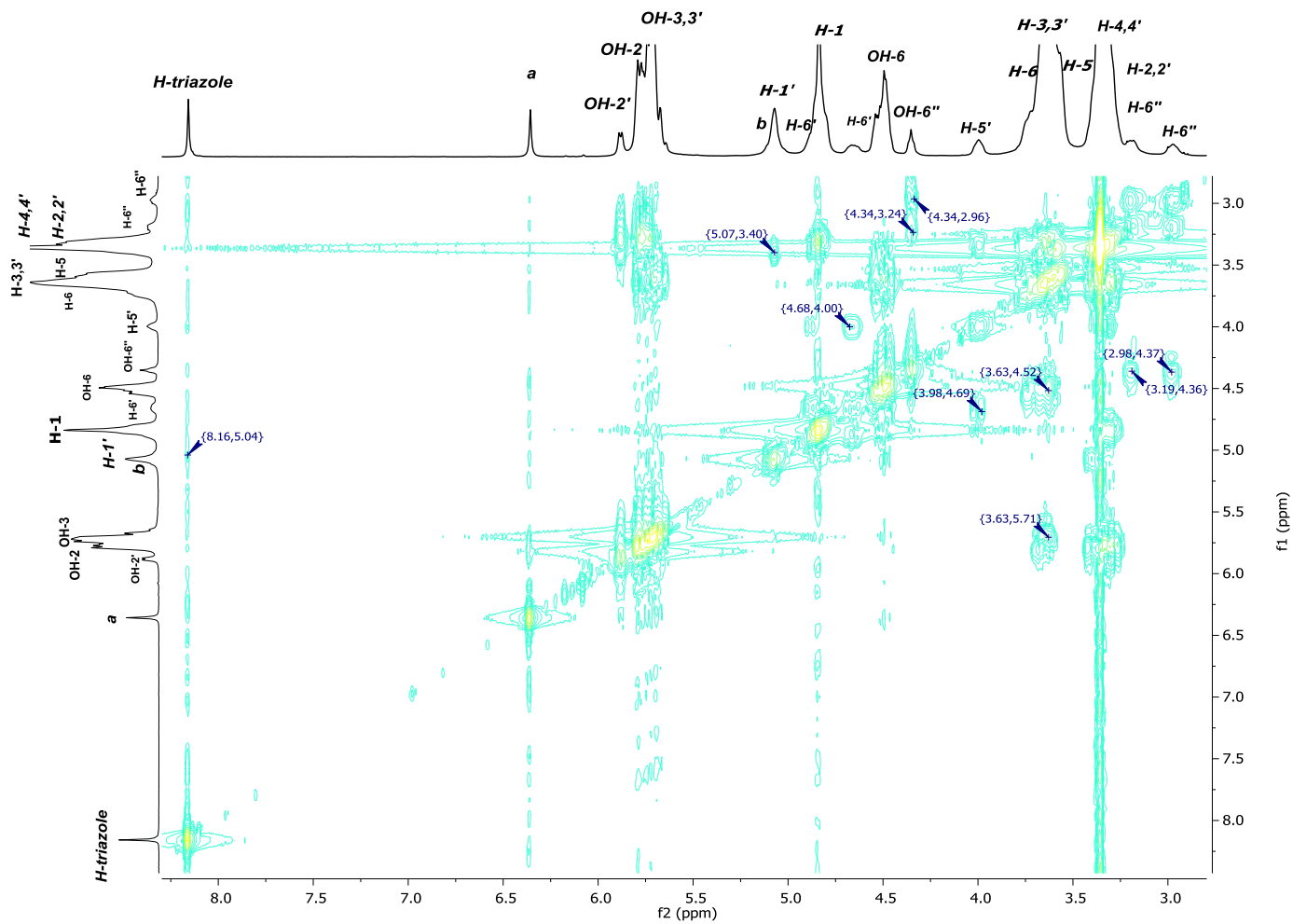
Espectro 89. RMN ^{13}C del compuesto D en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



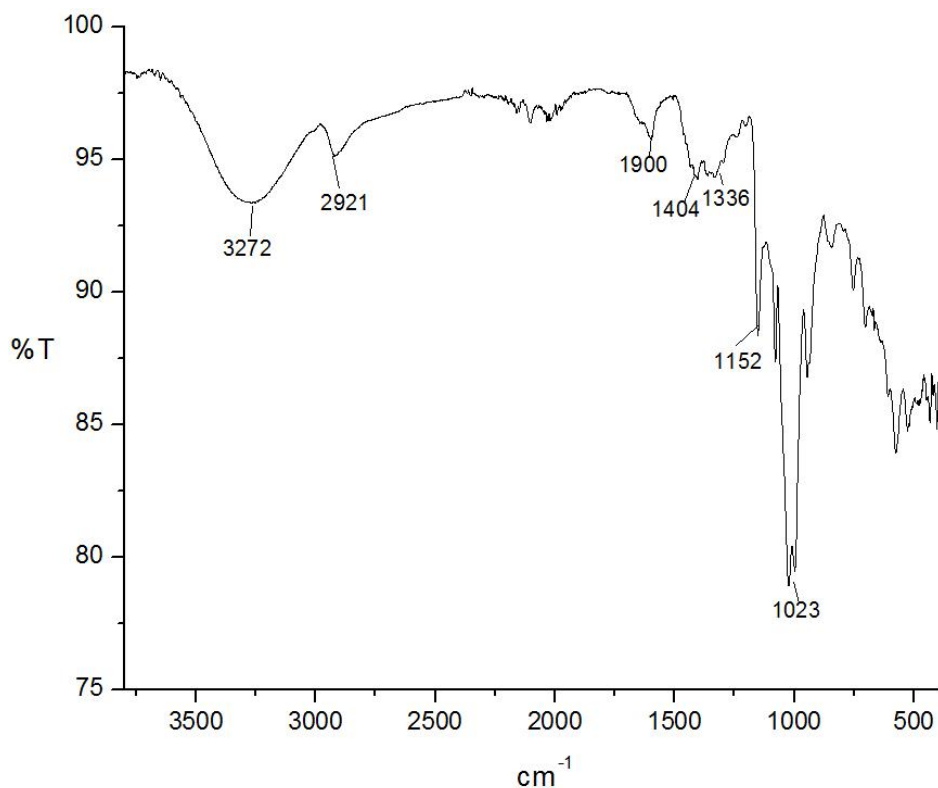
Espectro 90. RMN 2D ^1H - ^1H COSY del compuesto D en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



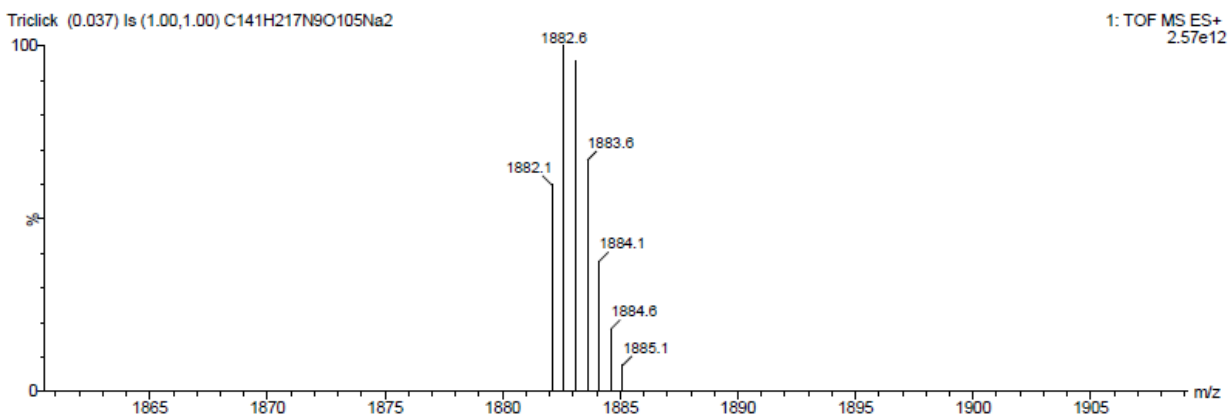
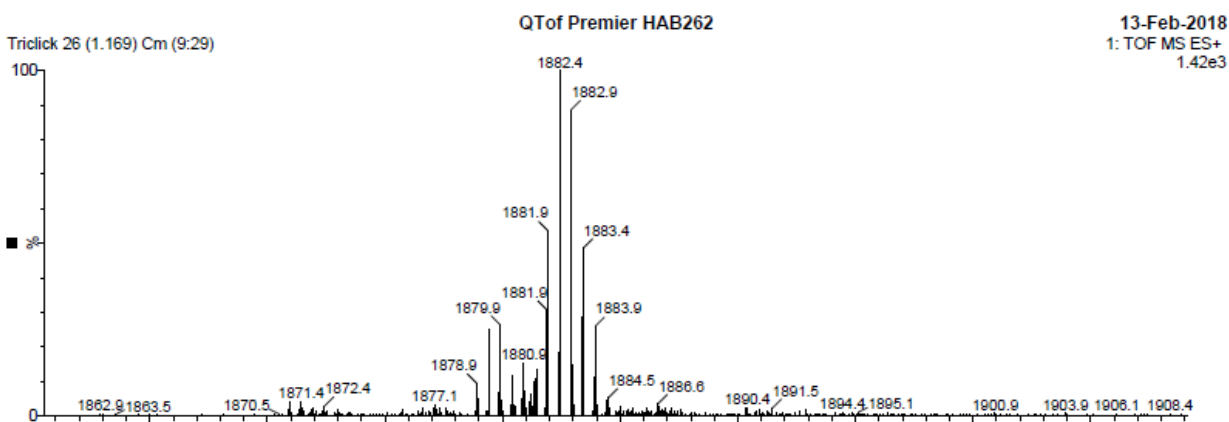
Espectro 91. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto D en DMSO-d_6 a 400 MHz.



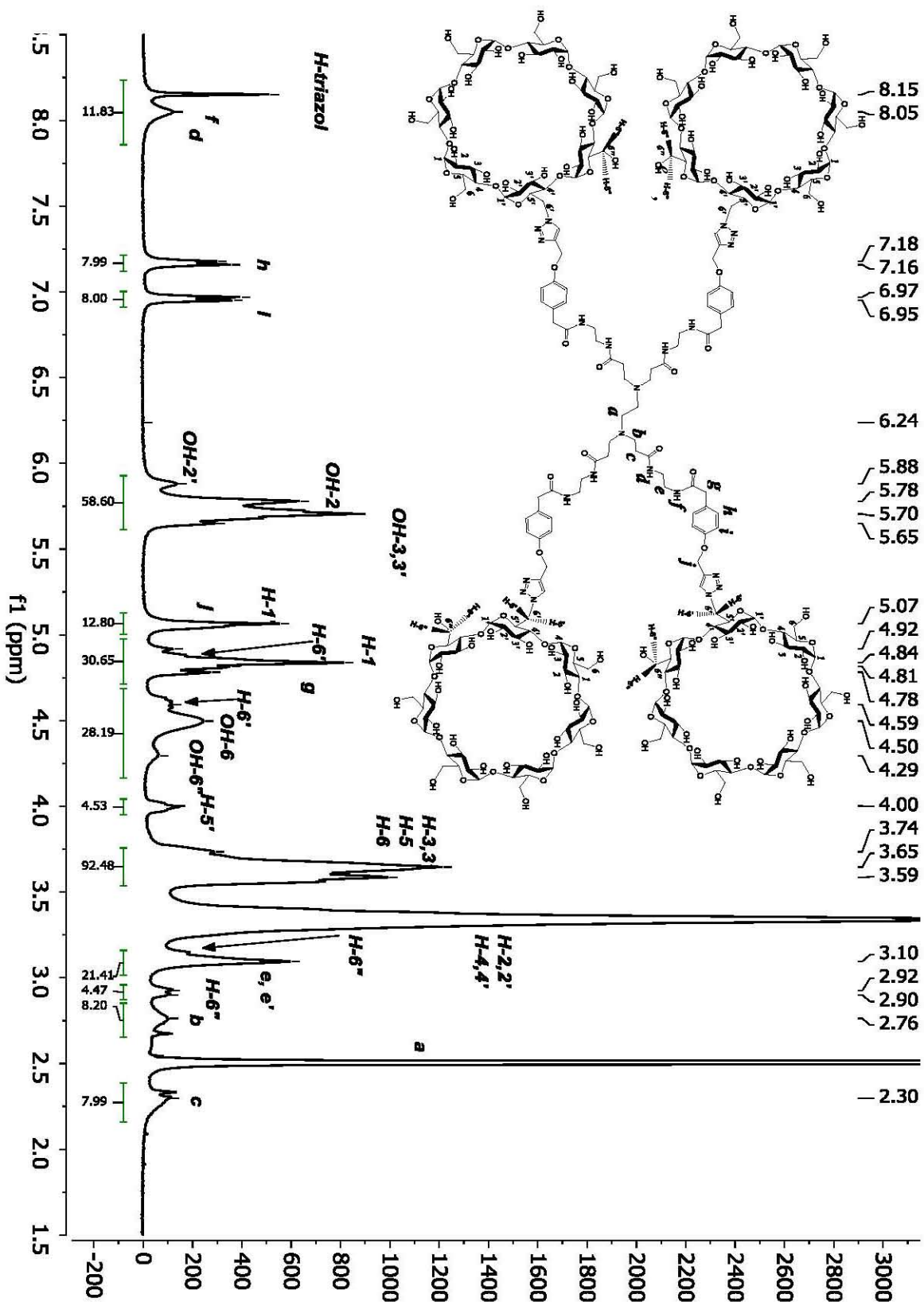
Espectro 92. RMN 2D ^1H - ^1H NOEY del compuesto D en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.

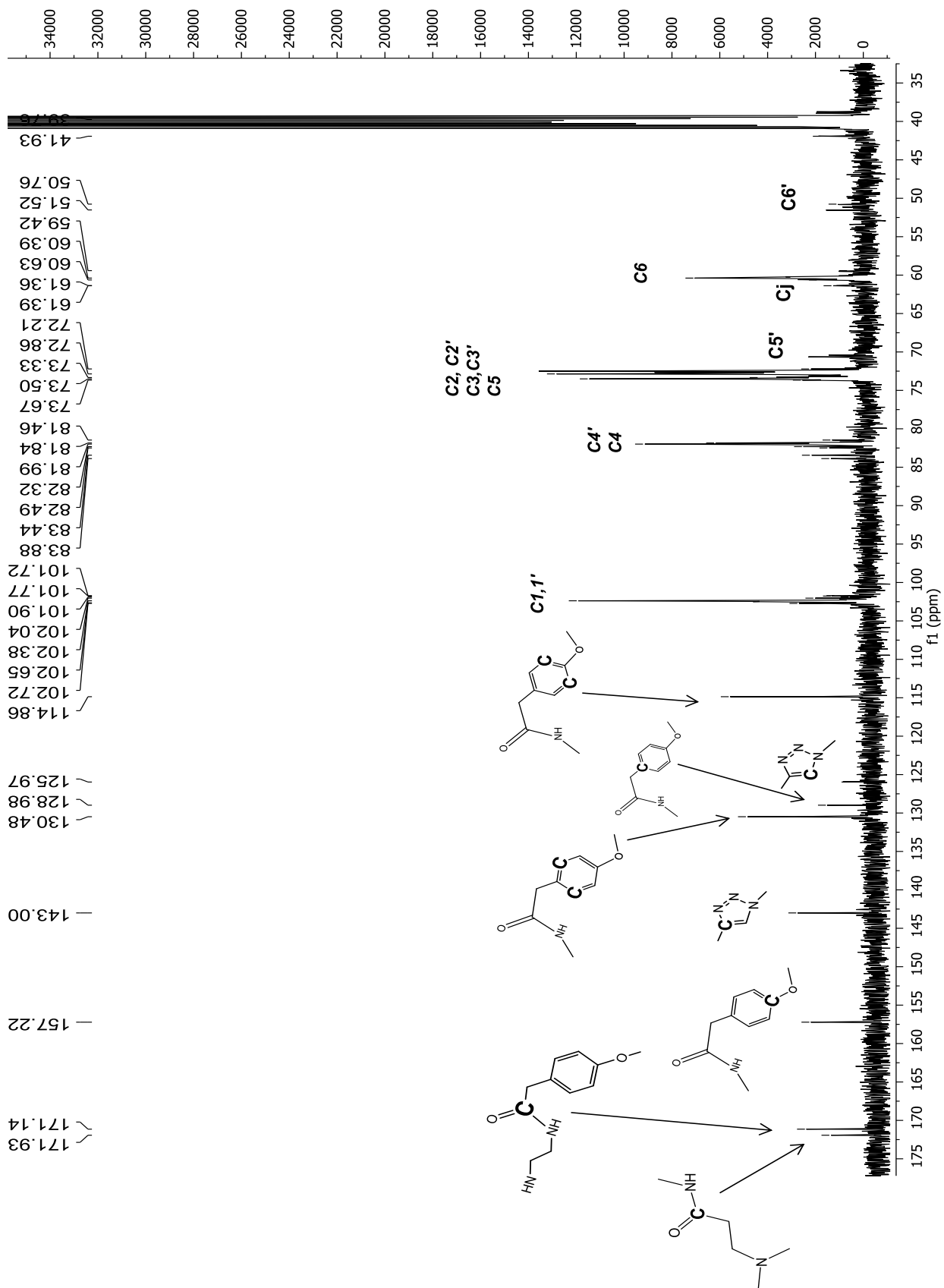


Espectro 93. Espectro IR (ATR) del compuesto D

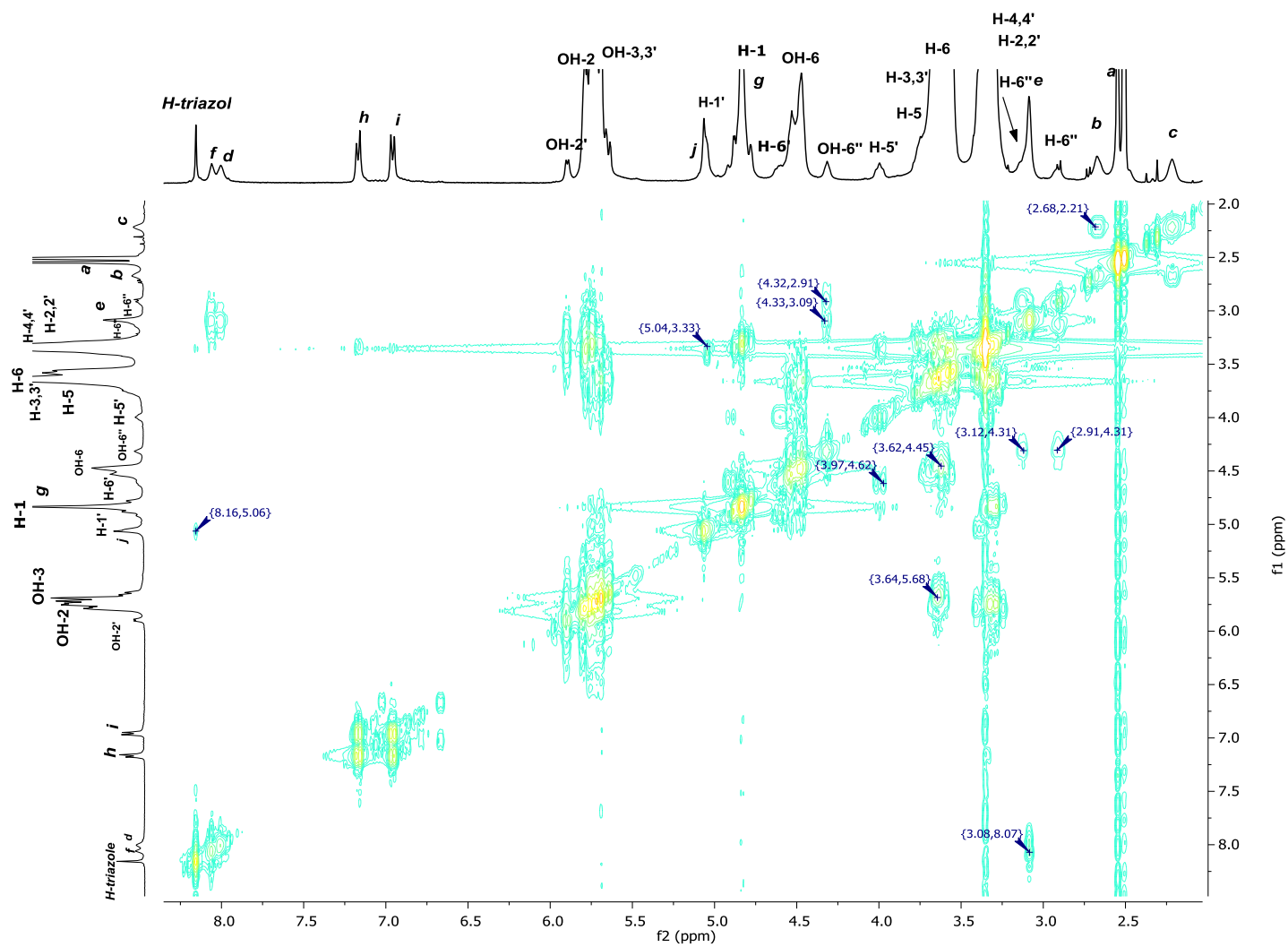


Espectro 94. Espectro ESI del compuesto D

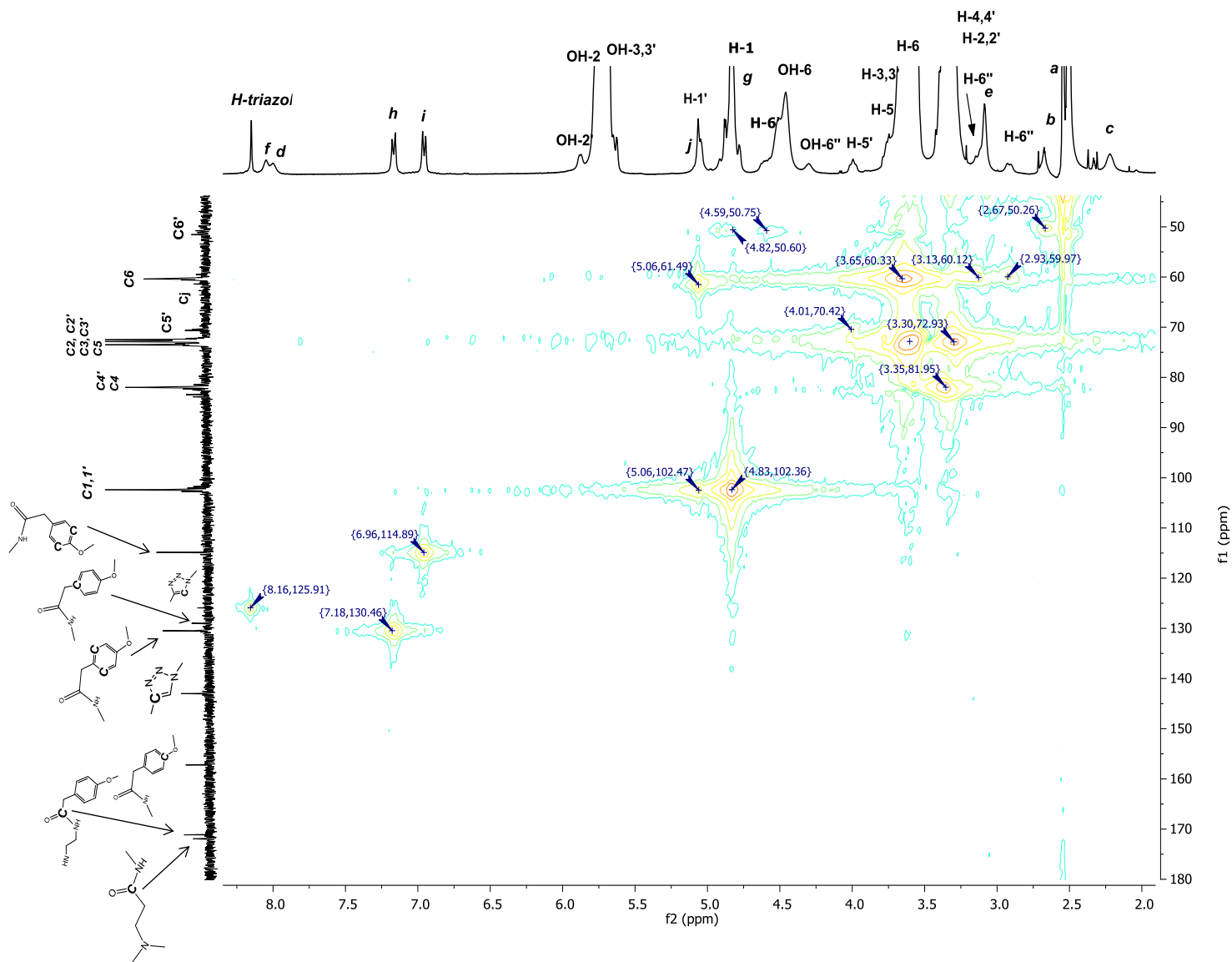
Espectro 95. ^1H RMN del compuesto en $\text{DMSO-}d_6$ E a 400 MHz.



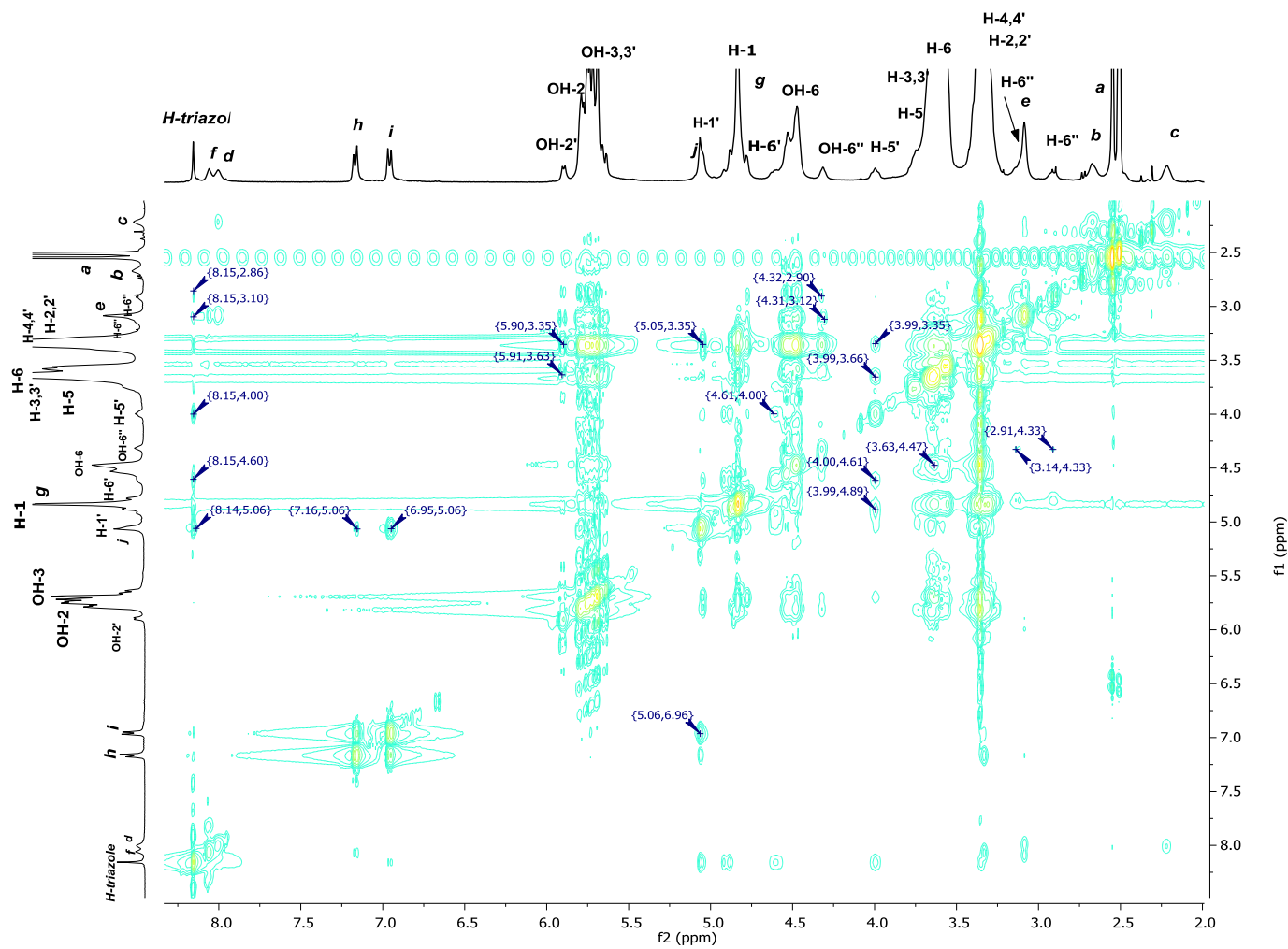
Espectro 96. RMN ^{13}C del compuesto E en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



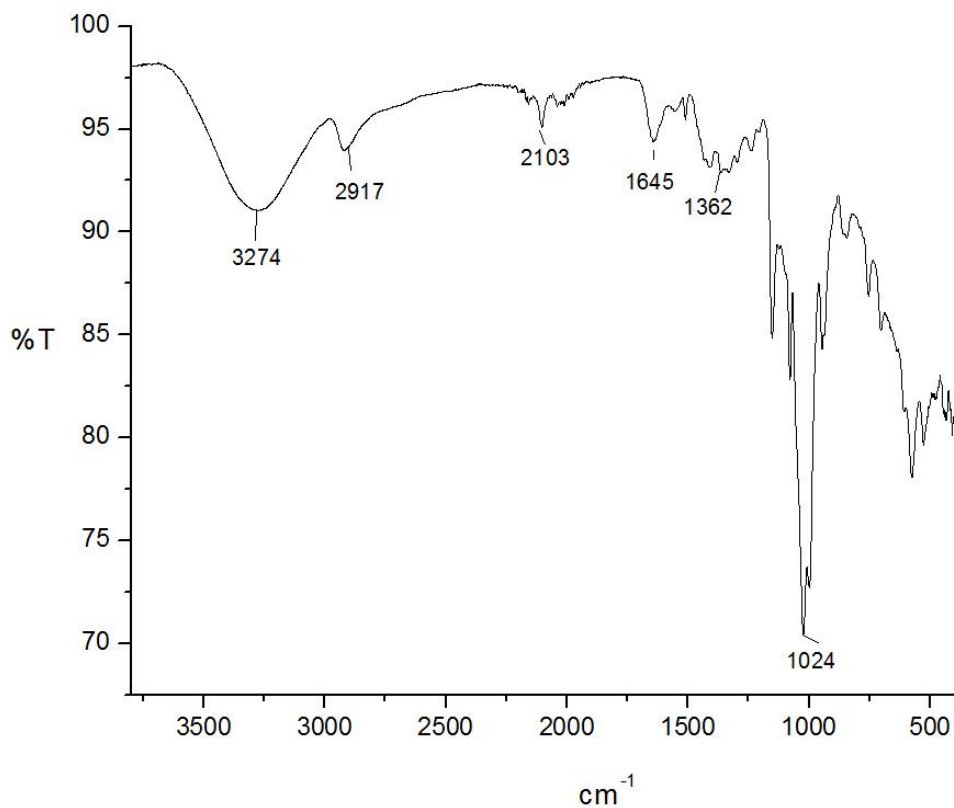
Espectro 97. RMN 2D ^1H - ^1H COSY del compuesto E en DMSO-d_6 a 400 MHz.



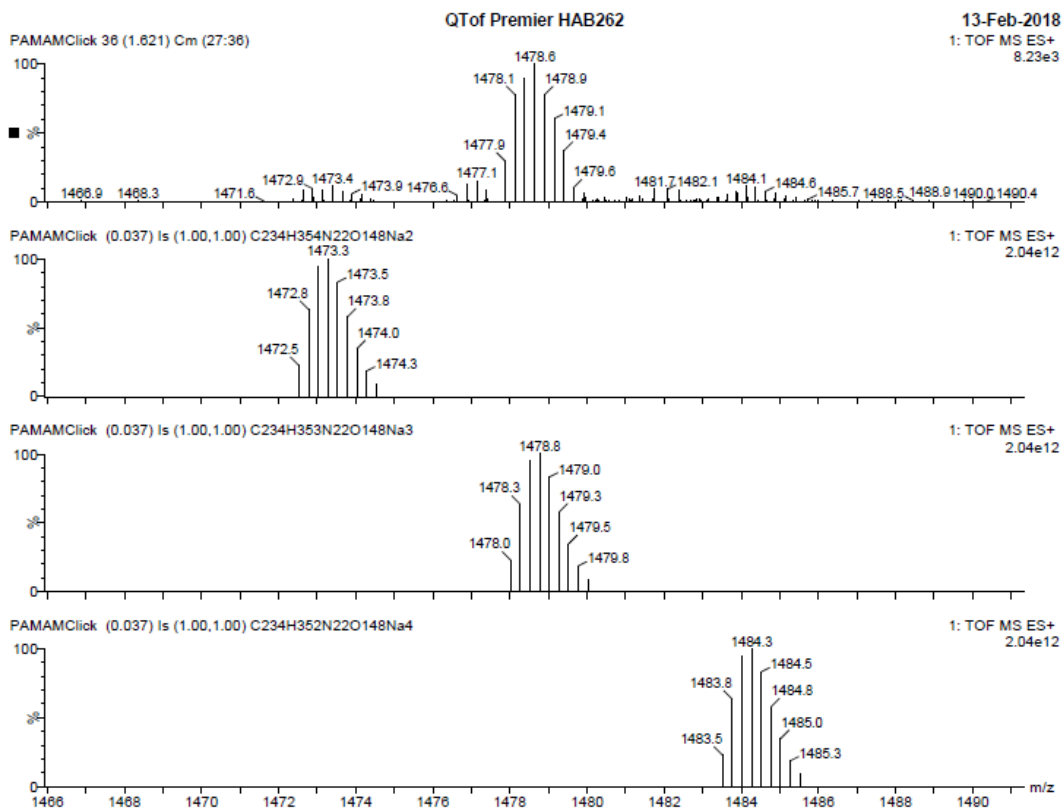
Espectro 98. RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC del compuesto E en $\text{DMSO-}d_6$ a 400 MHz.



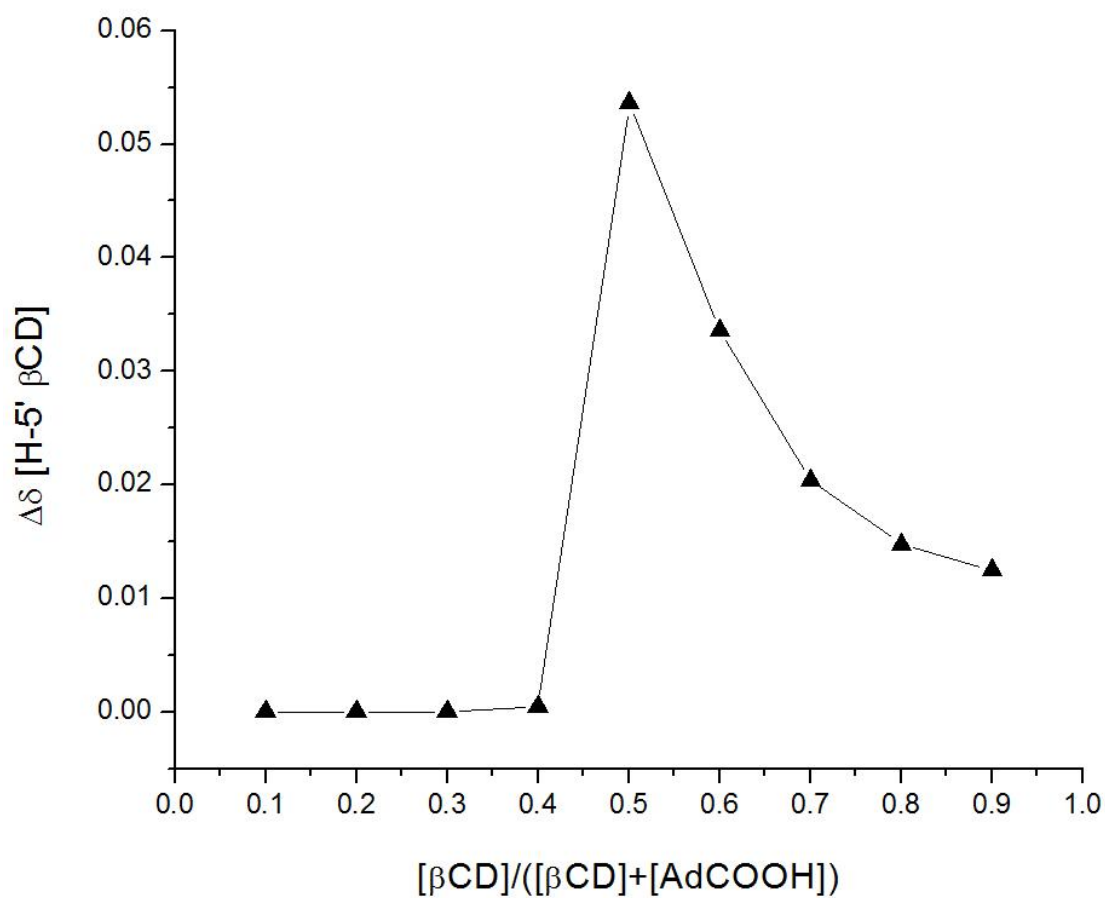
Espectro 99. RMN 2D ^1H - ^1H NOESY del compuesto E en $\text{DMSO}-d_6$ a 400 MHz.



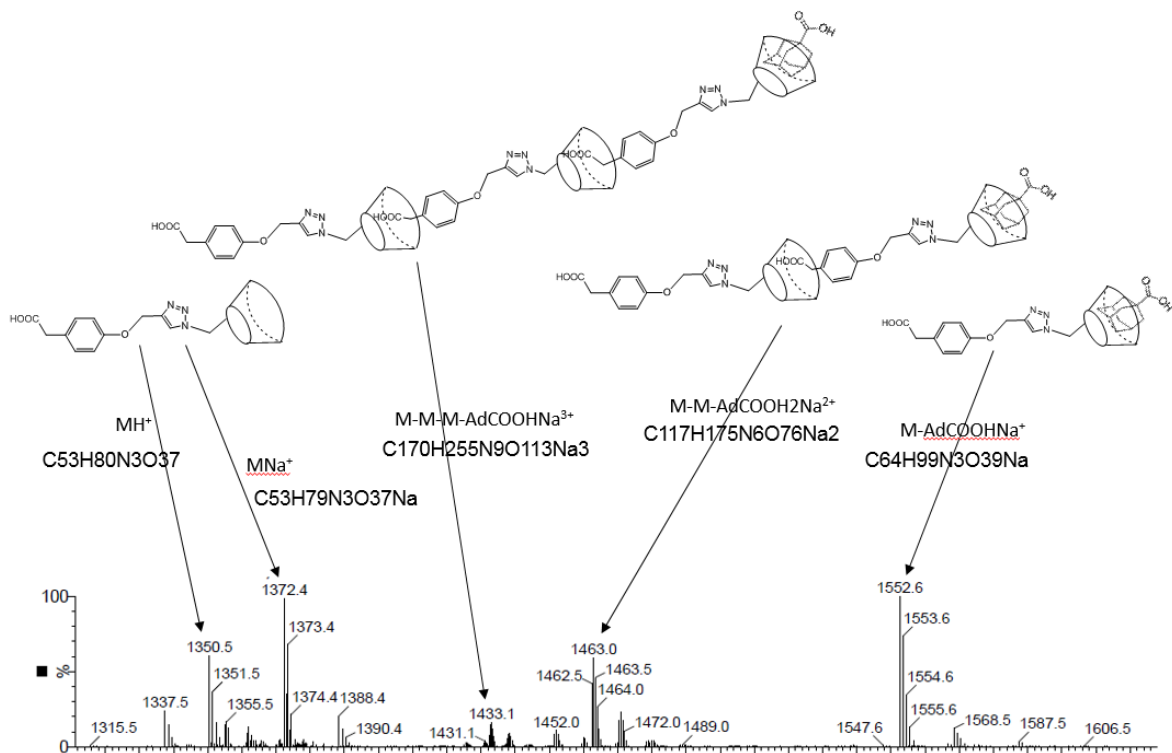
Espectro 100. Espectro IR (ATR) del compuesto E



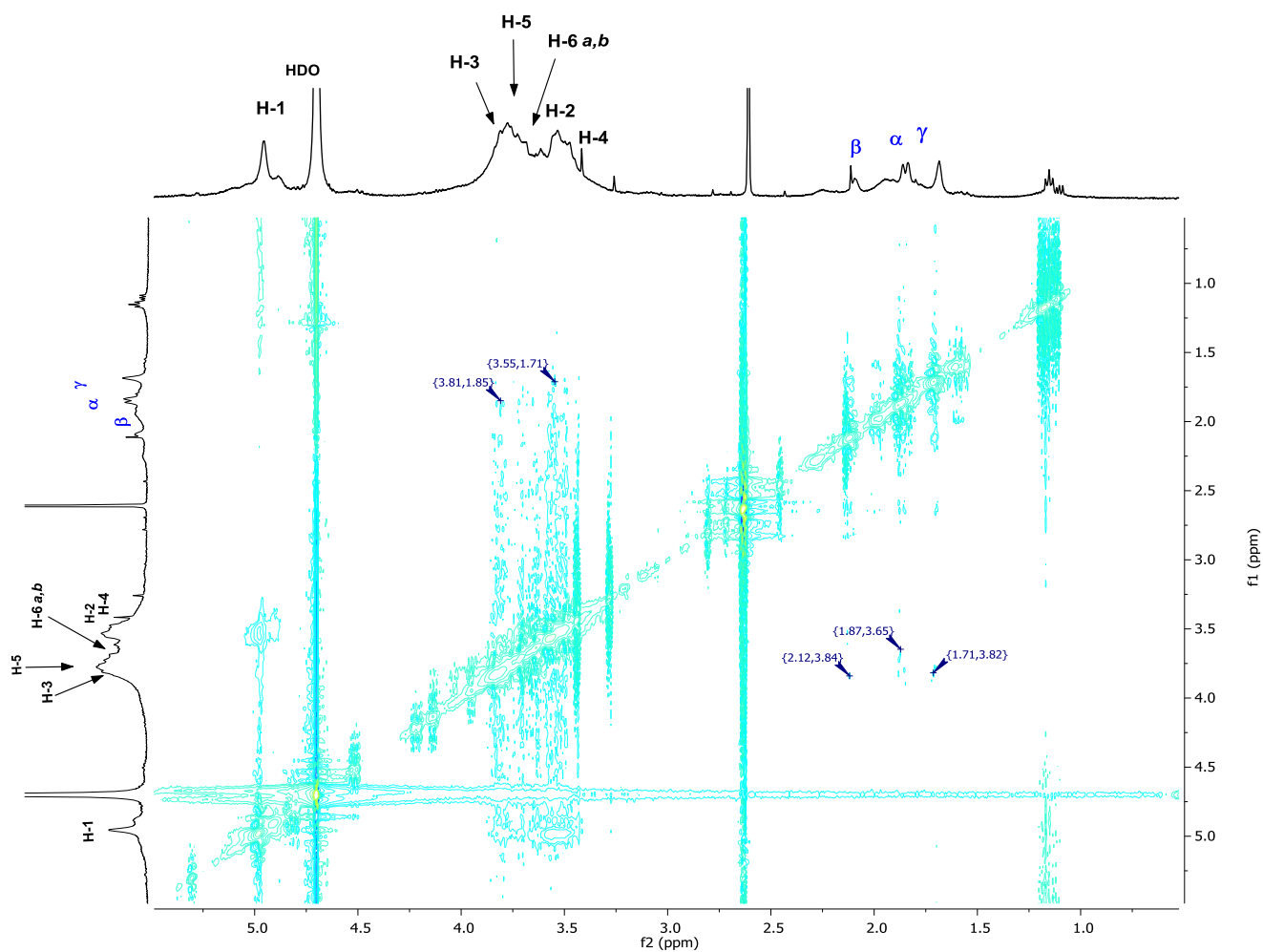
Espectro 101. Espectro ESI del compuesto E



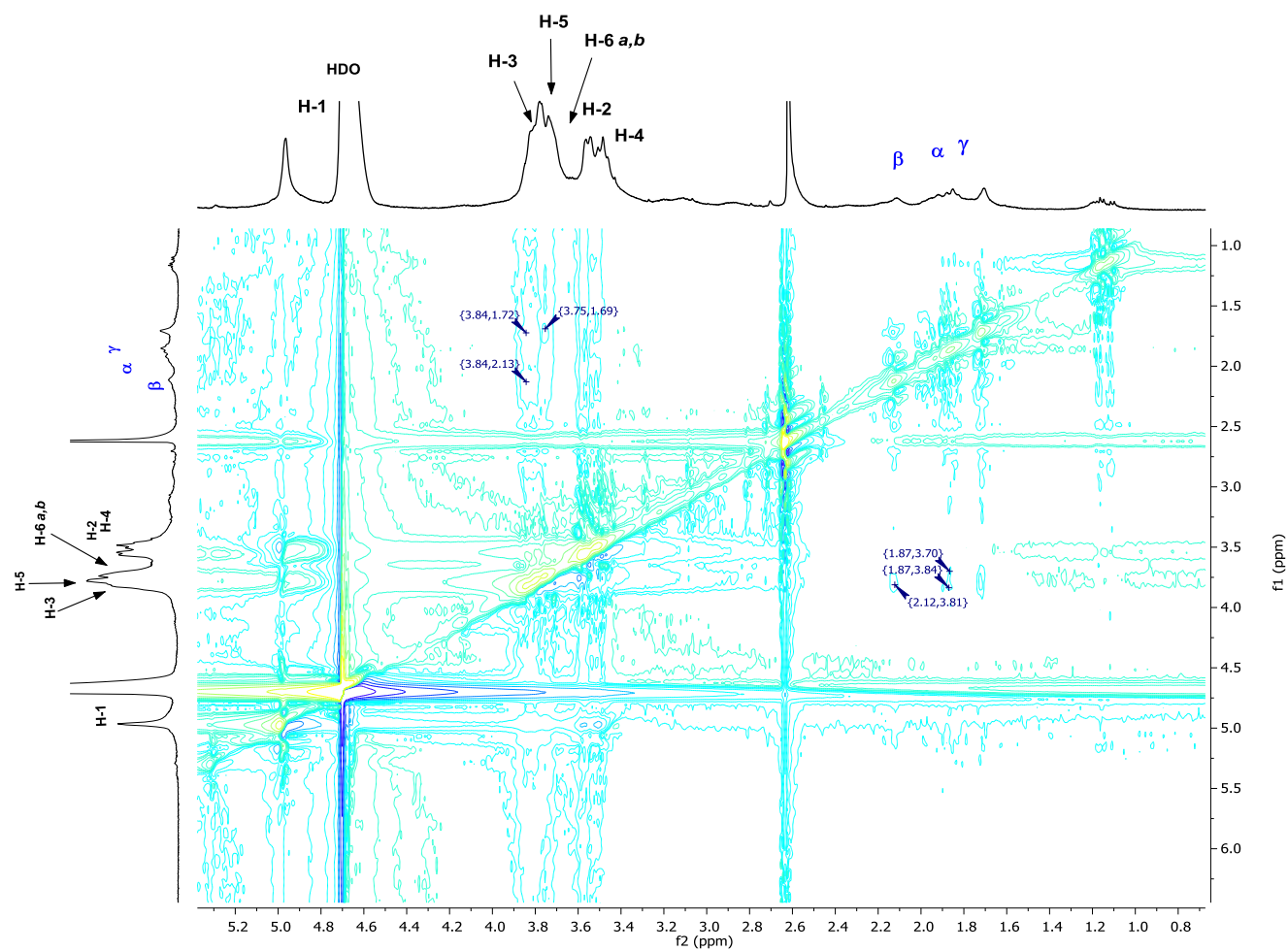
Gráfica 1. Método de Job para el compuesto D.



Espectro 102: ESI-TOF del CI B/AdCOOH, en un intervalo m/z: 1320-1620.



Espectro 103. RMN 2D ^1H - ^1H ROESY del CI D/Ad-h-Dox en D_2O a 400 MHz.



Espectro 104. RMN 2D ^1H - ^1H ROESY del CI E/Ad-h-Dox en D_2O a 400 MHz.

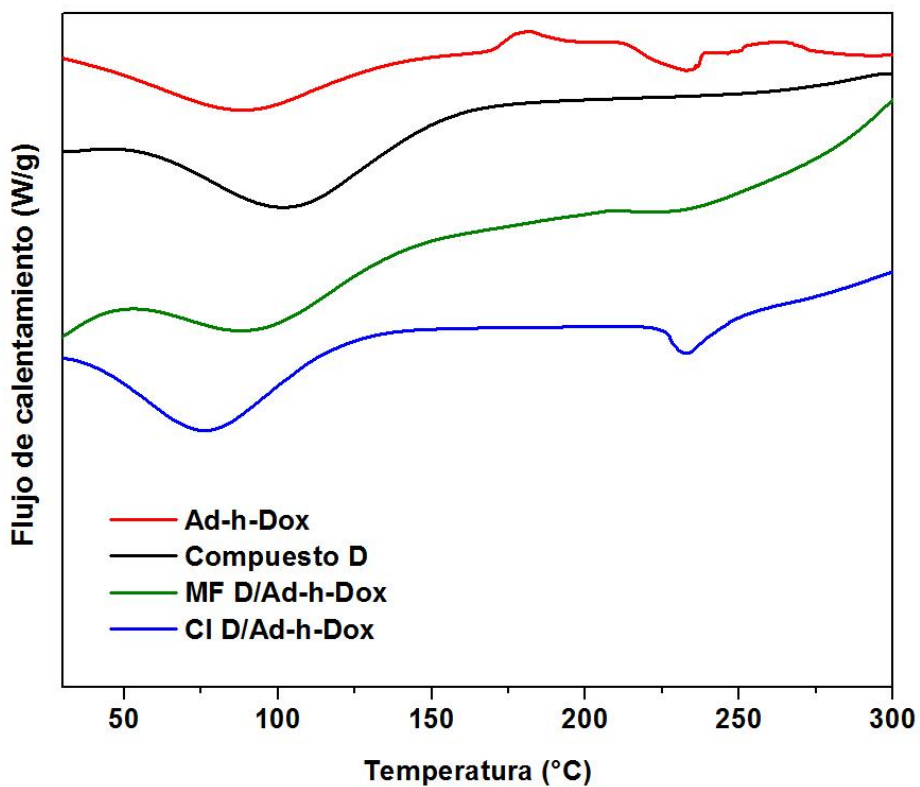


Figura 1. Perfil térmico DSC del CI D/Ad-h-Dox

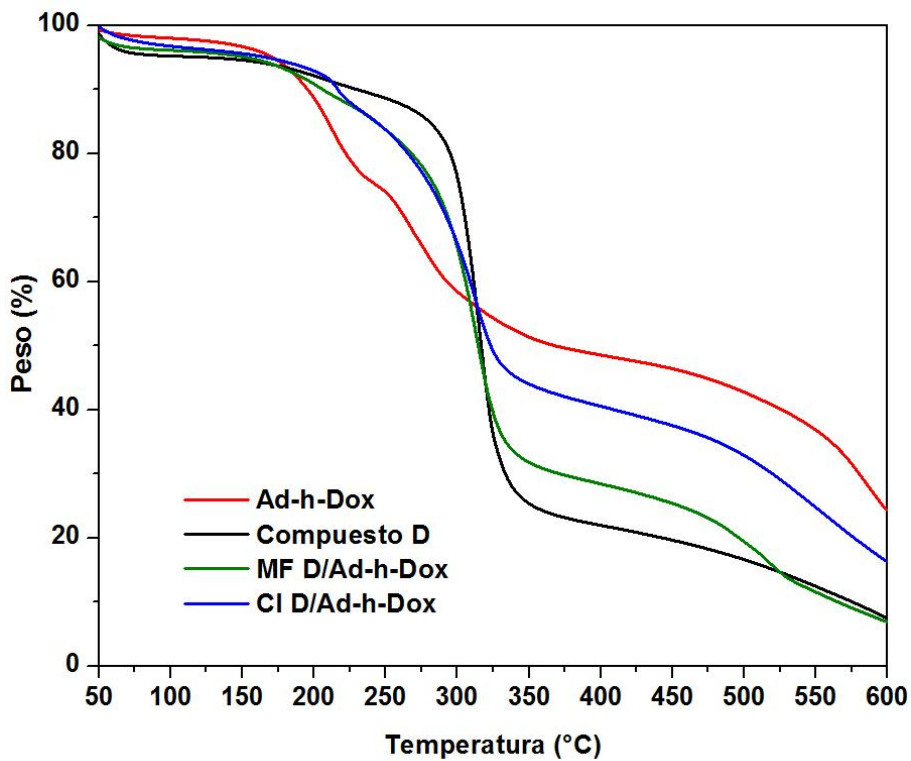


Figura 2. Perfil térmico TGA del CI D/Ad-h-Dox

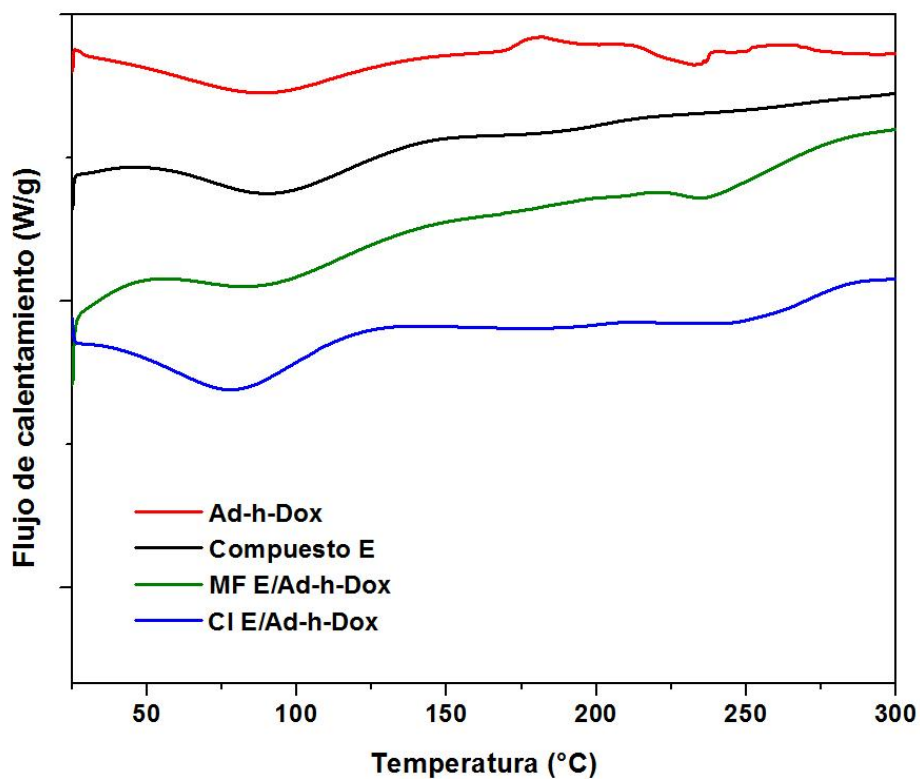


Figura 3. Perfil térmico DSC del CI E/Ad-h-Dox

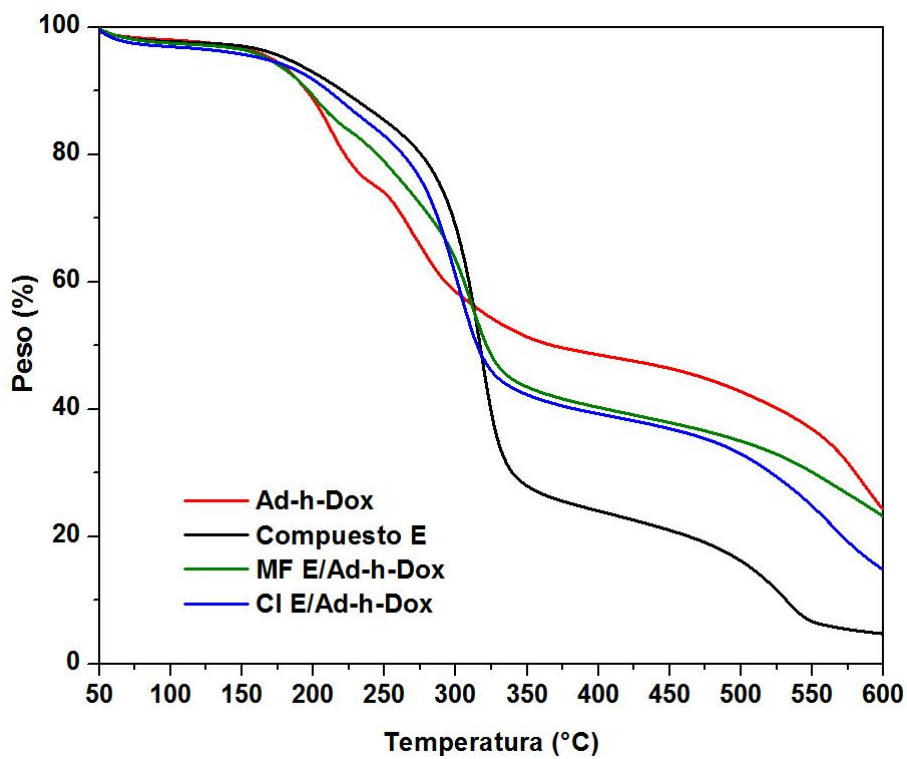
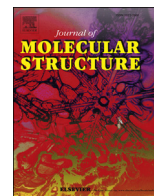


Figura 4. Perfil térmico TGA del CI D/Ad-h-Dox



Optimized synthesis, characterization and *in vitro* systematic evaluation of adamantane-doxorubicin prodrugs sensitive to pH in breast cancer cells

Israel González-Méndez ^a, José D. Solano ^b, Pasquale Porcu ^a, Andrea Ruiu ^a,
Yareli Rojas-Aguirre ^{a,**}, Ernesto Rivera ^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior Ciudad Universitaria, CP 04510, México City, Mexico

^b Facultad de Química, Departamento de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior Ciudad Universitaria, CP 04510, México City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 July 2018

Received in revised form

14 September 2018

Accepted 15 September 2018

Available online 21 September 2018

Keywords:

Doxorubicin

pH sensitive prodrugs

Breast cancer

Adamantane

ABSTRACT

Doxorubicin(Dox) is a potent anti-cancer drug used in the treatment of triple negative breast cancer (TNBC), however, it causes dose-dependent cardiotoxicity once the treatment is concluded. One of the new strategies to overcome this problem is the design of pH sensitive prodrugs, which can improve its selectivity and reduce the toxic effects of the free drug. For that reason, the synthesis of Dox attached to adamantane (Ad) was firstly optimized by using three different pH sensitive linkers; ester, amide and hydrazone in order to reduce the toxicity of free Dox. To evaluate the stimulus-sensitive behavior of the prodrugs, the kinetics of the *in vitro* hydrolysis of the three proposed linkers was determined by simulating both, the pH of the tumor microenvironment and the intracellular pH changes that occur in the tumor tissue. The cytotoxic activity of the hydrazone-cleavable prodrug showed a similar behavior to the free drug as well as the best release profile, using a new promising linker in the development of Dox prodrugs. The obtained results demonstrate the importance of choosing the appropriate linker in the design of pH sensitive Dox prodrugs which can improve the drug efficiency and used in the design of controlled drug delivery systems.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Dox is one of the most effective chemotherapeutics for the treatment of leukaemia and a broad variety of solid tumors [1]. However, its adverse effects, specifically dose-dependency, myelosuppression and lethal cardiotoxicity limit its use and the outcomes of the therapy [2–4]. Prodrugs are pharmacologically inactive chemical entities that, after their administration, are bio-transformed into pharmacologically active species [5]. Targeted prodrug approach is one of the new trends in the treatment of cancer. An important strategy to achieve the local activation of prodrugs involves the use of pH sensitive conjugates [6]. Therefore,

antineoplastic prodrugs come up as one of the strategies to increase selectivity, improve therapeutic indexes and reduce toxicity to normal tissues. The integration of prodrugs with nanotechnology-based drug delivery strategies has given rise to nanosystems improving prodrug stability and increasing drug availability. Moreover, multifunctional platforms containing prodrugs have been designed for targeted and smart stimuli-triggered drug release [7,8]. In these platforms the prodrug can be covalently attached to the nanocarrier or one of its components (building block or polymer scaffold), or it can be simply loaded into the system.

The design of Dox prodrugs is an approach that has been continuously explored to overcome Dox side effects. Furthermore, a number of nanocarriers containing Dox prodrugs have been investigated [7]. These delivery nanosystems include from simple liposomes and micelles to sophisticated platforms displaying multiple functionalities i.e. theranostics, response to external or internal stimuli and intracellular targeting [9,10].

* Corresponding author. Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior Ciudad Universitaria, CP 04510, México City, Mexico.

** Corresponding author.

E-mail address: riverage@unam.mx (E. Rivera).

A considerable number of works report the *in vitro* and *in vivo* effectiveness of Dox delivery smart platforms [11–13], however, none of them has been approved. At their best, some have reached Phase II clinical studies but any has even proceeded to Phase III, due to their structural complexity that makes very difficult to obtain them in a reproducible manner and to scale up the synthetic processes, which are generally expensive and involve several steps. In addition, is very difficult to predict the interaction of the multiple components with target and biological barriers. In summary, these platforms are too intricate to be translational [14,15].

The release of a drug is a quite complex process. It is unrealistic to simplify the delivery mechanisms for all the nanocarriers and make them to fulfill the targeting, cell attachment, internalization, and the release requirements. Therefore, a better understanding of drug delivery systems is crucial to make a good choice of the linker and the triggering mechanism that will generate the active drug. Their processes are fundamental to develop clinically achievable nanoformulations. This fact has motivated us to focus our research on the rational design of Dox prodrugs delivery systems through the systematic study of all their components at physicochemical and biological levels, keeping in mind the following requirements: a) an easy and affordable synthesis; b) feasible materials to be used as excipients and suitable for scaling them up; c) structurally simple systems.

To start our investigation, we selected three Dox prodrugs formed by the conjugation of Dox to an adamantyl moiety using different linkers: amide (Ad-a-Dox), hydrazone (Ad-h-Dox), and ester (Ad-e-Dox). The engineering of drug delivery systems by supramolecular design has gained great attention since reversible and tunable features that characterize supramolecular materials can afford carrier systems with controlled and predictable drug release. Cyclodextrin (CD) is a well-known structural unit used in the design of supramolecular host-guest drug delivery nanosystems.

Given that adamantane is a guest that fits perfectly into the CD cavity [16–18], it has been frequently employed in prodrug design and in the construction of CD-based supramolecular platforms. Dox is not the exception and there are several works reporting Ad-Dox prodrugs loaded into CD-based supramolecular platforms [19–21].

With the aim to be sure about the potential success of CD-based platforms, we focused the present work exclusively on the study of Ad-Dox systems. Firstly, we report novel and simple synthetic procedures for the obtainment of Ad-a-Dox and Ad-e-Dox. Moreover, we have optimized of the synthesis of Ad-h-Dox, and studied whether the activation can occur under *in vitro* acidic conditions (Fig. 1), acidic environment in tumor tissue) as well as their cytotoxicity in the estrogen receptor-positive (MCF-7) and the triple-negative breast cancer cells (TNBC). To our knowledge, this is the first time that these Dox prodrugs are systematically studied and evaluated against TNBC.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All starting materials were commercially available, reagent grade, and were used without any further purification. Reactions were monitored by analytical TLC on pre-coated silica gel 60 F254 plates (Aldrich). Infrared spectra were recorded on a Nicolet FT-5SX spectrophotometer. ^1H NMR spectra were recorded on a Bruker spectrometer (400 MHz). Chemical shifts are reported in ppm (δ) and the signals are described as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), broad (br), multiplet (m), and doublet of doublets (dd); coupling constants are reported in Hz. ESI-MS were carried out on a JEOL JMS-AX505-HA instrument. 1-Adamantanecarboxylic acid (Ad-COOH), 1-[(1-(cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)-dimethylamino-morpholino)]uranium-hexa-fluoro-phosphate (COMU), triethylamine (TEA) Doxorubicin hydrochloride (DOX•HCl), 4-dimethylaminopyridinium (DMAP) and 4-(dimethylamino)pyridinium 4-toluenesulfonate (DPTS) were prepared according to the procedures described in the literature (Moore J.S. & Stupp S.I., 1990). Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), hydrazine hydrate ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50–60%), trifluoroacetic acid (TFA), formic acid (FA) were purchased from Sigma-Aldrich. Dimethyl sulfoxide (DMSO), *N,N'*-dimethylformamide (DMF) and dichloromethane (CH_2Cl_2) were dried over CaH_2 and distilled under vacuum prior to use. All the other reagents and solvents were purchased from J.T.

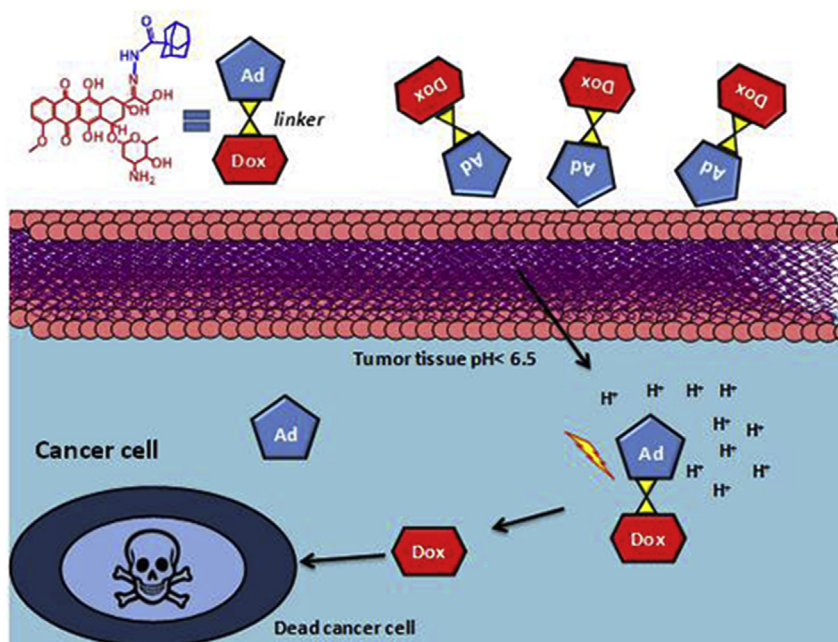


Fig. 1. Proposed model of internalization of the Ad-h-Dox prodrug and mechanism of drug release induced by pH. (single).

DEPTQ (101 MHz, DMSO-*d*₆; δ , ppm): 214.13 C13, 186.98 C12, 186.83 C5, 161.57 C1, 156.53 C11, 155.11 NC=O, 154.92 C6, 136.66 C3, 135.99 C10a, 135.11 C6a, 134.50 C4a, 120.45 C12a, 120.18 C4, 119.44 C2, 111.33 C11a, 111.09 C5a, 100.84 C1', 75.44 C8, 70.25 C10, 68.69 C4', 67.25 C5', 64.14 C14, 57.04 CH₃O, 46.97 C3', 37.04 C9, 32.55 C7, 30.42 C2', 28.63 CH₃, 17.54 CH₃-C5'. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3455 O-H (st), 3338 N-H (st), 1686 C=O (st), 1615-1579 C=O, 1407 C=C (st), 1284 C-O-C (st), 1112, 1071, 1018 C-O.

2.2.5. Synthesis of adamantyl-modified doxorubicin with an ester-bond

This conjugate was prepared according to the following procedure: Ad-COOH (42 mg, 0.23 mmol) mixed with DCC (57.7 mg, 0.28 mmol), DMAP (34 mg, 0.28 mmol) and DPTS (17 mg, 0.058 mmol) were suspended in 5 mL of anhydrous CH₂Cl₂ and stirred at room temperature for 1 h under nitrogen atmosphere. Then, Dox-Boc (100 mg, 0.15 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (2.5 mL) and slowly added to Ad-COOH/DCC/DMAP/DPTS. The resulting mixture was stirred overnight under inert atmosphere. The solvent was evaporated at reduced pressure; the crude product was dissolved in methanol (5 mL) and TFA (100 μ L) was added during 20 min. The product was purified by TLC plates R_f =0.6 (CH₂Cl₂:MeOH/98:2) to give a red solid (62 mg, 0.0914 mmol) (yield: 91%). ESI: m/z 706 [M]⁺; M.p.: >200 °C; ¹H NMR (400 MHz) (DMSO-*d*₆, δ): 13.88 (s, 1H)p, 13.11 (s, 1H)p', 7.81 (m, 2H)b,a, 7.55 (dd, J =8.31 Hz, 1H)c, 6.12 (s, 1H)OH", 5.58 (d, J =7.82 Hz, 1H)h, 5.52 (br, 1H)OH", 5.22 (q, J =18.1, 17.61 Hz, 2H)n, 5.02 (s, 1H)g, 4.13 (m, 1H)i, 3.94 (s, 3H)d, 3.77 (m, 1H)k, 3.37 (br, 1H)j, 2.89 (q, J =18.58, 2H)e, 2.26 (m, 1H)f, 2.01 (s, 3H) β , 1.91 (s, 6H) α , 1.69 (s, 6H) γ , 1.50 (m, 1H)l, 1.22 (m, 3H)m. ¹³C NMR-DEPTQ (101 MHz, DMSO-*d*₆; δ , ppm): 219.04 C13, 191.31 C12, 180.72 C5, 165.48 -COO-, 160.79 C1, 159.20 C11, 140.91 C6, 140.25 C10a, 139.37 C3, 138.75 C6a, 124.70 C4a, 124.44 C12a, 123.69 C4, 115.50 C2, 115.35 C11a, 105.22 C5a, 79.69 C1', 74.76 C8, 74.49 C10, 72.83 C4', 71.53 C3', 68.38 C5', 61.29 C14, 53.31 CH₃O, 49.51 C9, 41.39 α , 40.79 γ , 36.78 C7, 34.53 β , 32.32 C2', 21.71 CH₃-C5'. FT-IR (ATR, cm⁻¹): 3453 O-H (st), 3326 N-H (st), 1727 C=O (st), 1615-1580 C=O, 1409 C=C (st), 1282 C-O-C (st), 1122, 1081, 1013 C-O.

2.3. Biological procedures

2.3.1. Cell culture

The human breast cancer cell lines ER-positive MCF-7 and MDA-MB-231 were selected for this study and purchased from the ATCC[®] (Manassas, VA USA). Cell lines were grown in D-MEM medium (Cellgro corning Manassas, VA USA) with 10 mM of non-essential amino acids, supplemented with 10% heat inactivated FBS. These two adherent epithelial cell lines were maintained under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 ± 1 °C in a thermo scientific incubator model 3110 (Grand Island, NY, USA).

2.3.2. Western blot for procaspase 3

Cultures of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to a confluence of 90% were lysed with proteases cocktail and the SDS-page, protein transfer and immunodetection were carried out as described by Solano J.D et al. [23] The primary and secondary antibodies for procaspase 3 and actin in the ab136812 kit were purchased from Abcam (Cambridge, MA).

2.3.3. Cytotoxicity studies

To determine the cytotoxic activity of these prodrugs in the selected cell lines, a tetrazolium salt based on a colorimetric assay was used [23]. Each of these cells lines were seeded in a 96 well plate at a density of 6.5 × 10³ cells/well and at a volume of 200 μ L of

medium. After 24 h, the cells formed a monolayer and 50 μ L of medium was added with different concentrations of the prodrugs (with amide, ester and hydrazine linkers) and their hydrolyzed products. The treated cells were cultured in six wells by concentration, and the experiments were performed three times independently. Cell viability was determined after 48 h by adding 20 μ L of 2.5 mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium-bromide (MTT). The insoluble formazan, produced during an incubation period of 4 h at 37 °C, was measured. The supernatant was removed solubilizing the formed formazan crystals by adding 250 μ L of DMSO. The absorbance of each well was read at 550 nm using an ELISA reader (BIO-RAD, model 680, U.K.). Absorbance was directly related to % cell viability, and control cells without treatment were considered 100% viability. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined from interpolating concentration vs inhibition curve by Graphpad Prism 6.0 (La Jolla CA, USA) as the drug concentration varies, which resulted in a 50% reduction in the cell viability.

2.4. Kinetics of hydrolysis

The hydrolysis kinetics was investigated in phosphate buffers at pH = 7.4, 6.5 and citrate buffers at pH = 4.5 and 3.5. Three replicates of each test were performed. The temperature of the whole was 37 ± 1 °C. Samples were withdrawn at predetermined time intervals and replaced with the same medium release volume. The withdrawn samples were assayed for free Dox content by measuring the absorbance at 480 nm.

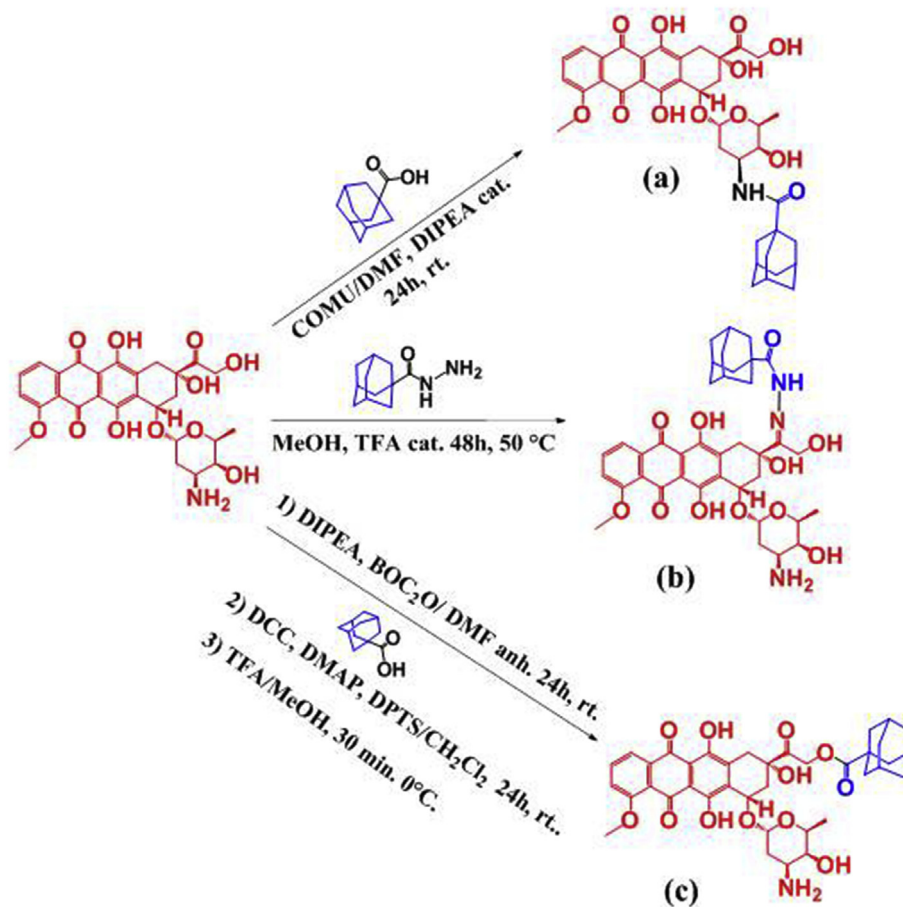
3. Results and discussion

3.1. Synthesis

Nowadays it is mandatory to develop affordable, reproducible and quantitative synthetic methods in order to exploit them, that is why we discuss a cost-effective method to obtain Ad-a-Dox. The amide bond formation is fundamentally important in organic synthesis [24,25] as well as in the drug delivery field. COMU, an effective reagent in solution, is one of the coupling agents which arise from the group of salts based on uronium/aminium, phosphonium salts and iminium [26]. Hence, we incorporated COMU to form the amide bond, which resulted in a simple, quantitative and good performance synthesis to prepare Ad-a-Dox prodrug with an easy work up. Since this reaction generates only water-soluble by-products, the number of purification steps was reduced without the need of a complicated purification process.

The synthesis of Ad-h-Dox was reported for the first time by Luo G. et al. [22] In this work, the synthesis of the hydrazide intermediate was optimized. Ad-COOH was esterified in a conventional manner in acidic medium with heating. However, these reaction conditions favors the generation of by-products besides the precipitation of the main product, which is obtained in low yield. The methodology employs mild reaction conditions and the product is quantitatively obtained (yield > 80%) with a slight generation of toxic waste into the environment (Scheme S1).

To synthesize Ad-e-Dox, we implemented a novel method for the modification of the primary hydroxyl group of Dox (Scheme 1) leading to an efficient and quantitative esterification. The first step consisted on the protection of the amino group with Boc₂O (yield up to 95%), and the second one was the esterification of the primary alcohol using a modified Steglich reaction [27]. Previous works reported that the use of DPTS considerably improved the reaction yield [28]. Since the tertiary alcohol can be removed via an unimolecular mechanism (E₁), the system HCl/MeOH at room temperature, TFA/CH₂Cl₂ at 0 °C, and FA at room temperature are very



Scheme 1. Synthesis of the Ad-Dox prodrugs having **a)** amide, **b)** hydrazone and **c)** ester links. (**single**).

efficient for the quantitative deprotection of Boc, avoiding the elimination of the tertiary alcohol and the cleavage of the ester link in Ad-Dox.

During the work-up, we noticed that the success in obtaining a pure product depends in a big measure on the silica particle size. By using normal silica, Ad-e-Dox and residual free Dox remain trapped and cannot be eluted with polar solvents, even by using an alumina matrix in the purification. However, we found that a pore size of 60 Å and a particle size of 5–17 µm were optimal for the purification of this system.

3.2. Characterization of the prodrugs by NMR spectroscopy

As part of the systematic study, a complete and detailed characterization of all synthetic intermediaries was carried out (Figs. S2–S4). We noticed that the signals in ^1H NMR spectra of Ad-Dox prodrugs and free Dox are only partially assigned [29,30], particularly the signals present in the aliphatic zone and the OH groups (primary, secondary and tertiary alcohols). This is of great concern especially if the parent drug is modified to generate a new entity, which must be further tracked in order to guarantee its synthesis and biotransformation with reproducible results. That is why we performed two-dimensional ^1H NMR experiments (Fig. 2, COSY spectra) in order to correlate better the proton signals with their corresponding carbons (Fig. 3, HMQC spectra). In this way, the signals for both, free Dox and Dox prodrugs were unequivocally assigned.

The ^1H NMR spectrum of the Ad-a-Dox in $\text{DMSO-}d_6$ shows a

doublet at 6.64 ppm, due to the proton bound to the heteroatom of the amide as well as the appearance of signals between 1.67 and 1.99 ppm related to the Ad ring of the expected product (Fig. 4 and S5). In contrast, the Ad-h-Dox shows the N–H signal at 6.38 ppm (Fig. 4 and Fig. S6). The signals of the primary and secondary alcohols show an up-field shift due to the change in the electronic environment caused by the Ad ring. The FTIR spectrum of Ad-h-Dox shows the characteristic stretching band of O–H at 3435 cm^{-1} , jointly with the disappearance of the stretching band of the ketone at 1729 cm^{-1} to give a hydrazone, whose stretching band of the =N–H bond appears at 3241 cm^{-1} [31]. We can also observe the typical stretching bands of C=O with intra hydrogen bonded quinone in the region of $1614\text{--}1579\text{ cm}^{-1}$, C–O–C at 1281 cm^{-1} , C–O of tertiary alcohol at 1110 cm^{-1} , C–O of secondary alcohol at 1069 cm^{-1} , C–O of primary alcohol at 1008 cm^{-1} and C=C bonds of the aromatic rings at 1407 cm^{-1} . All these signals demonstrate the obtainment of the desired hydrazone derivative.

Regarding the Ad-a-dox prodrug, besides the bands described above, the appearance of a stretching band at 3431 cm^{-1} due to N–H bond stands out. On the other hand, for the Ad-e-Dox derivative, the band of the ketone appears at a higher frequency (1727 cm^{-1}) due to the inductive influence of the corresponding ester linker [32], with respect to the band of the ketone in the native Dox, which appears at 1724 cm^{-1} (Fig. S7).

The intermediates produced during the synthesis of Ad-e-Dox were also characterized. It was noticed that in the protected Dox-Boc, the methyl signals appear at 1.33 ppm and the signals of the hydroxyl groups are down-field shifted since the signal

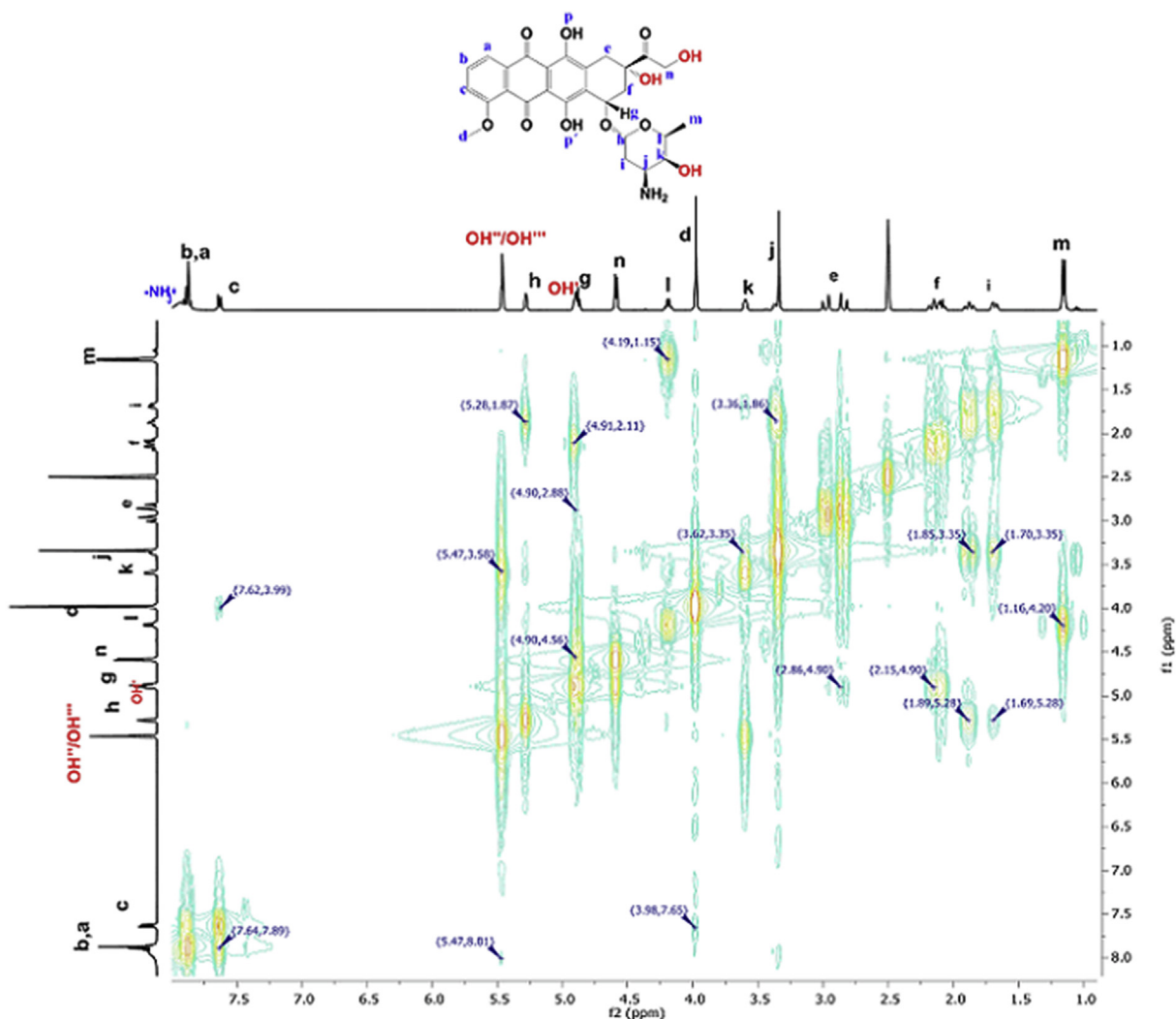


Fig. 2. Correct assignment of free Dox in DMSO- d_6 by RMN 2D ^1H - ^1H COSY. (2-column).

corresponding to the OH''' appears as a singlet, shifting from 5.46 to 6.12 ppm ($\Delta = 0.66$ ppm). This is caused by the esterification which totally modifies the electronic environment of the OH''' , thereby confirming that the esterification exclusively takes place in the primary OH . This shift can be easily confused with an elimination of the OH''' to give the corresponding alkene (product E_1), which appears at down field. However, we made the corresponding HMQC experiments to confirm the obtention of the Boc deprotected product without the formation of the E_1 product (Fig. S8). In this experiment, we found that the signal at 6.12 ppm does not correlate with any carbon, which confirms an effective deprotection of the amino group and the generation of the expected product. Moreover, the signals of protons **h** and **g** are down-field shifted, maybe due to a conformational change caused by the presence of Ad.

3.3. Cytotoxic activity

In vitro cytotoxicity of Dox prodrugs (amide, hydrazone and ester derivatives) and hydrolysis products was estimated using MTT assay in MCF-7 and TNBC cells. These cell lines were authenticated by morphological observation (data not shown) evaluating the expression of procaspase 3 protein by western blot analysis (Fig. 5).

As reported by Ref. [33] MDA-MB-321 presents procaspase 3, while MCF-7 does not, which is a very characteristic feature for both cell lines.

The prodrug Ad-h-Dox showed the best *in vitro* behavior after 48 h of exposure (Table 1), since for both cell lines it exhibited similar activity to that of free Dox, suggesting that the *in vitro* rupture of the sensitive pH binding is more efficient. A less potent behavior was shown by the prodrug Ad-a-Dox, which exhibited moderate activity in both cell lines. This compartment can be explained by the previous observations with the amide bond which is known to be very chemically stable in biological environments [34–36]. The cytotoxicity of the prodrug Ad-e-Dox was poor, so we assumed that the ester does not cleave under our experimental conditions, thereby causing a diminution of the biological activity. Nevertheless in an *in vivo* model, the presence of esterases could accelerate the hydrolysis of the prodrug [34,37]. The resulting hydrolysis products were evaluated to corroborate that the biological effect was only due to the drug and not to its hydrolysis byproducts, which coincides with its null activity. In summary, we confirmed that there is no significant difference between the cytotoxicity of Dox and Ad-h-Dox, suggesting that the bioactivity was retained despite the changes in the Dox structure.

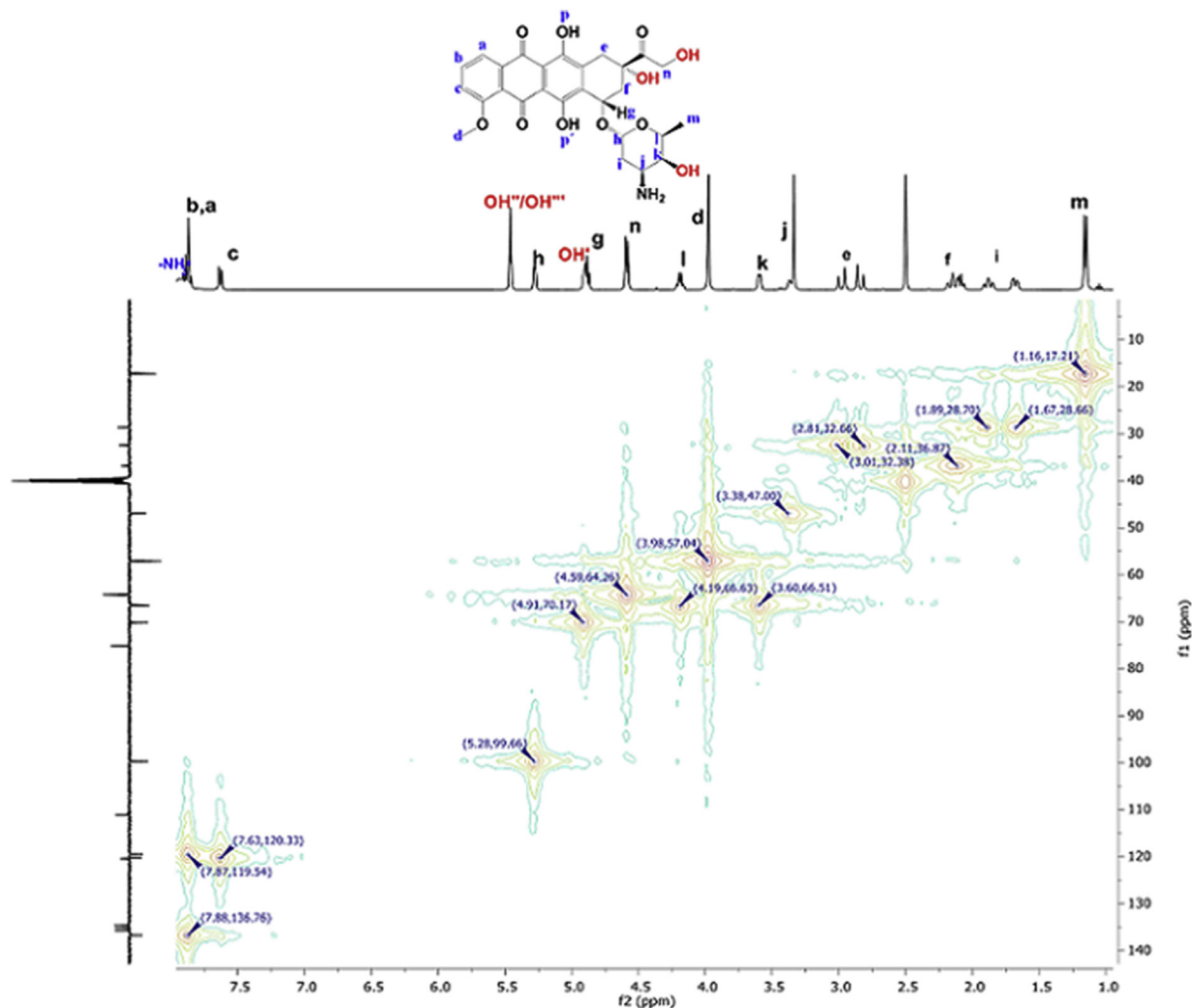


Fig. 3. Correct assignment of free Dox in DMSO- d_6 by RMN 2D ^1H - ^{13}C HMQC. (2-column).

3.4. Kinetics of hydrolysis of prodrugs Ad-Dox

The hydrolysis kinetics of the three obtained prodrugs was evaluated at physiological pH = 7.4 and other pH values, taking into account the acid microenvironment that characterizes tumors (pH 6.5) and the pH gradient at which the prodrug would be exposed if internalized (pH 4.5–3.5) (Fig. 6) [38–40]. The stability of Ad-Dox prodrugs under acidic conditions revealed that only Ad-h-Dox is prone to be hydrolyzed at pH = 4.5, while it remains intact at pH = 6.5. It is crucial to keep this in mind since it has been stated that Ad-h-Dox can be hydrolyzed in the acidic surroundings of a tumor [34] affecting healthy and cancer cells alike. Here, we find that this phenomenon does not occur and Ad-h-Dox would display stability during transport in the body (blood pH = 7.4) and releases the drug only with the appropriate change of pH (inside the cancer cells).

It was found that Ad-a-Dox and Ad-e-Dox were not hydrolyzed at any of the tested pH values (7.4, 6.5, 4.5 and 3.5) at 37 °C, assuming that this behavior could affect the cytotoxic activity (data not shown). If the prodrugs were kept intact, in the case of Ad-e-Dox the Ad moiety would be interfering with Dox pharmacophoric sites [41], which causes a loss of biological activity. The lower cytotoxicity of Ad-a-Dox could be explained by the complexity of the cleavage of the amide bond. These outcomes should be taken into account for the rational design and

development of Dox prodrugs taking advantage of the characteristics of the tumor phenomenon, since the conventional methods for the administration of Dox do not deliver therapeutic concentrations in the target sites and show a lack of specificity, which affects healthy tissues of the body. It is necessary a rational choice of an appropriate linker able to face these challenges. Ad-h-Dox displayed a promising potential to be used in the design of Dox delivery systems. In fact, it is currently studied for that aim. However, we consider of great importance to investigate in detail the prodrug behavior before uploading it into a complex platform.

4. Conclusions

We report a novel synthetic procedure to obtain Ad-a-Dox and Ad-e-Dox prodrugs as well as the optimization of the synthesis of Ad-h-Dox. All methods include a few steps and an easy work-up. In addition, they showed to be affordable and reproducible. Herein, we have demonstrated that acid conditions are required for the hydrolysis of Ad-h-Dox and therefore its bioactivation can occur intracellularly.

Ester and amide bonds have been successfully used in prodrugs design. In our case, the outcomes indicate that these linkers are not working as expected, in particular Ad-e-Dox, which was inactive against our biological model. Although Ad-h-Dox is being currently

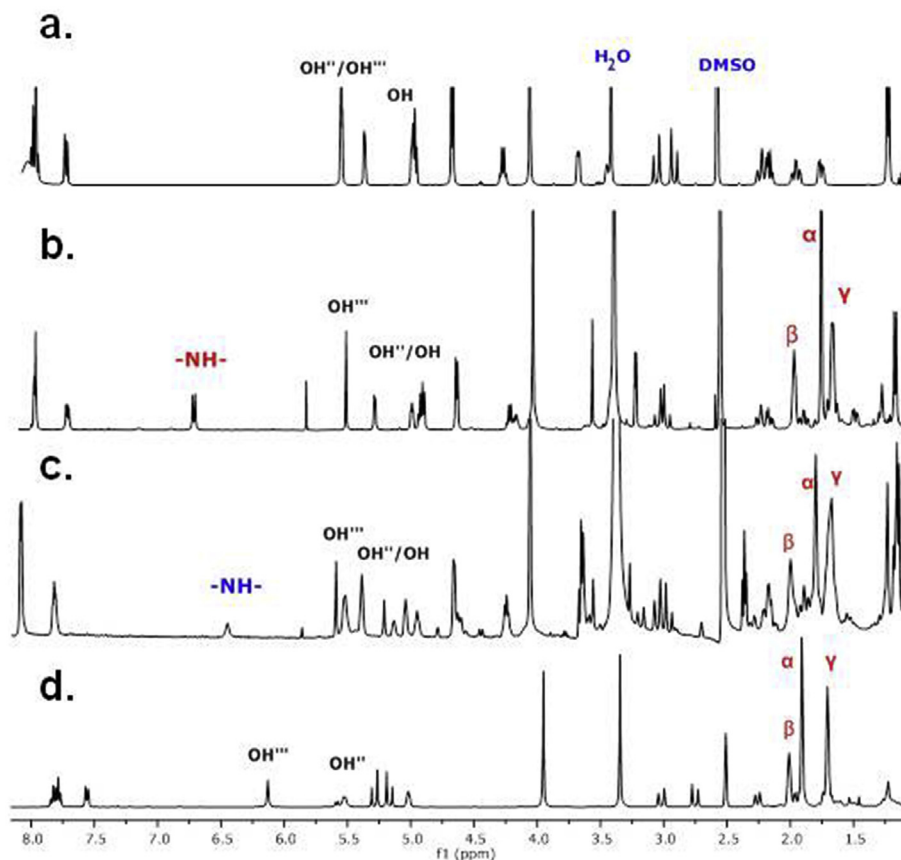


Fig. 4. Characterization of the Ad-Dox prodrugs by ^1H NMR in $\text{DMSO}-d_6$, **a.** Dox, **b.** Ad-a-Dox, **c.** Ad-h-Dox, **d.** Ad-e-Dox. (single).

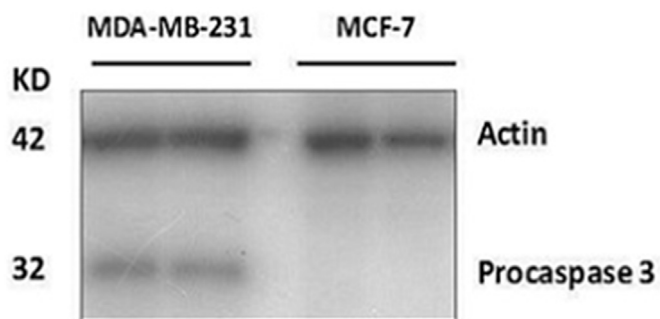


Fig. 5. Presence and absence of procaspase 3 determined using 40 μg of the cell extract from both cell lines by western Blot, actin was used as constitutive protein control. (single).

Table 1
IC₅₀ values of Ad-Dox prodrugs ^a.

Compounds and hydrolysis products	IC ₅₀ (μM) at 48 h of treatment	
	MCF-7 cells	MDA-MB-231 cells
Ad-a-Dox	21.88 \pm 1.76	12.53 \pm 1.58
Ad-e-Dox	SA	SA
Ad-h-Dox	16.45 \pm 1.28	6.78 \pm 1.6
Ad-COOH	SA	SA
Ad-NH-NH ₂	SA	SA
Dox	6.99 \pm 1.31	3.56 \pm 0.7

SA: without activity.

^a Data represent mean of three experiments independents \pm SD (n = 3).

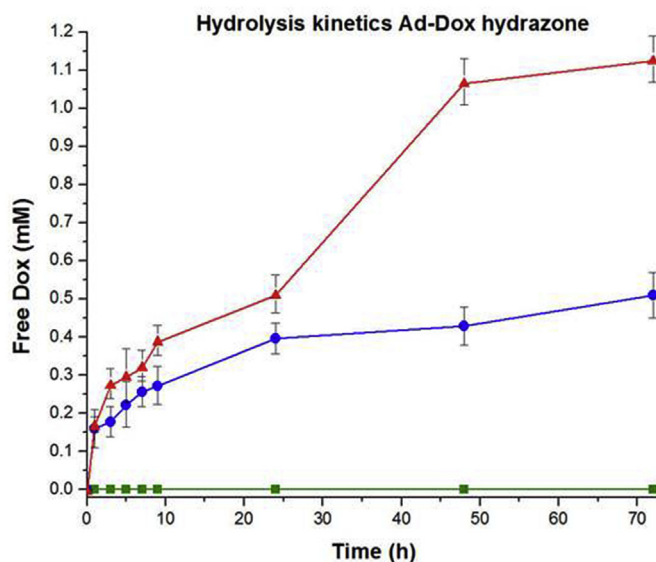


Fig. 6. Hydrolysis kinetics the prodrug Ad-h-Dox, \blacksquare pH 7.4, \blacktriangle pH 3.5 and \bullet pH 4.5. (single).

studied in the design of smart platforms for Dox delivery, this is the first time that it is evaluated against TNBC cells. Thus, it might be a promising candidate to be used in the treatment of this type of cancer. Further biological studies will be performed to investigate the mechanism of cell death as well as the biological behavior when it is loaded into a supramolecular platform.

Acknowledgements

We are grateful to Gerardo Cedillo for his help with ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and Miguel Canseco for his assistance in the characterization of the compounds. We thank CONACYT (Projects 253155 and 279380) for financial support. I. González-Méndez thanks Posgrado en Ciencias Químicas UNAM and CONACYT for scholarship and financial support, respectively. YRA is grateful to Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-915), Facultad de Química UNAM and Materials Research Institute (Project IIM-1306).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.09.044>.

References

- [1] D. Nielsen, C. Maere, T. Skovsgaard, Cellular resistance to anthracyclines, *Gen. Pharmacol.* 27 (1996) 251–255.
- [2] S. Aroui, S. Brahim, M. De Waard, A. Kenani, Biochemical and Biophysical Research Communications Cytotoxicity, intracellular distribution and uptake of doxorubicin and doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides in different cell lines: a comparative study, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391 (2010) 419–425.
- [3] T. Šimůnek, M. Šterba, O. Popelová, M. Adamcová, R. Hrdina, V. Gerši, Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron, *Pharmacol. Rep.* 61 (2009) 154–171.
- [4] Y. Octavia, C.G. Tocchetti, K.L. Gabrielson, S. Janssens, H.J. Crijns, A.L. Moens, Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52 (2012) 1213–1225.
- [5] S.D. Clas, R.I. Sanchez, R. Nofsinger, Chemistry-enabled drug delivery (pro-drugs): recent progress and challenges, *Drug Discov. Today* 19 (2014) 79–87.
- [6] S. Rollas, G. Küçükgüzel, Hydrazone, amide, carbamate, macromolecular and other prodrugs of doxorubicin, *Open Drug Deliv. J.* 2 (2008) 77–85.
- [7] C. Luo, J. Sun, B. Sun, Z. He, Prodrug-based nanoparticulate drug delivery strategies for cancer therapy, *Trends Pharmacol. Sci.* 35 (2014) 556–566.
- [8] Y. Ge, Y. Ma, L. Li, The application of prodrug-based nano-drug delivery strategy in cancer combination therapy, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 146 (2016) 482–489.
- [9] M. Cagel, E. Grotz, E. Bernabeu, M.A. Moretton, D.A. Chiappetta, Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside, *Drug Discov. Today* 22 (2017) 270–281.
- [10] U. Kanwal, N. Irfan Bukhari, M. Ovais, N. Abass, K. Hussain, A. Raza, Advances in nano-delivery systems for doxorubicin: an updated insight, *J. Drug Target.* 26 (2018) 296–310.
- [11] D. Peer, J.M. Karp, S. Hong, O.C. Farokhzad, R. Margalit, R. Langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 751–760.
- [12] Z. Li, S. Tan, S. Li, Q. Shen, K. Wang, Cancer drug delivery in the nano era: an overview and perspectives, *Oncol. Rep.* 38 (2017) 611–624.
- [13] Z.G. Chen, Small-molecule delivery by nanoparticles for anticancer therapy, *Trends Mol. Med.* 16 (2010) 594–602.
- [14] S. Tran, P.J. DeGiovanni, B. Piel, P. Rai, Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery, *Clin. Transl. Med.* 6 (2017), 44–21.
- [15] S.K. Singh, S. Singh, J.W. Lillard, R. Singh, Drug delivery approaches for breast cancer, *Int. J. Nanomed.* 12 (2017) 6205–6218.
- [16] Z. Dan, H. Cao, X. He, L. Zeng, L. Zou, Q. Shen, Z. Zhang, Biological stimuli-responsive cyclodextrin-based host-guest nanosystems for cancer therapy, *Int. J. Pharm.* 483 (2015) 63–68.
- [17] J.J. Yin, S. Sharma, S.P. Shumyak, Z.X. Wang, Z.W. Zhou, Y. Zhang, P. Guo, C.Z. Li, J.R. Kanwar, T. Yang, S.S. Mohapatra, W. Liu, W. Duan, J.C. Wang, Q. Li, X. Zhang, J. Tan, L. Jia, J. Liang, M.Q. Wei, X. Li, S.F. Zhou, Synthesis and biological evaluation of novel folic acid receptor-targeted, β-cyclodextrin-based drug complexes for cancer treatment, *PLoS One* 8 (2013) 1–20.
- [18] T. Loftsson, P. Jarho, M. Måsson, T. Järvinen, Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opin. in Drug Delivery* 2 (2005) 335–351.
- [19] L. Chen, X. Zhao, Y. Lin, Y. Huang, Q. Wang, A supramolecular strategy to assemble multifunctional viral nanoparticles, *Chem. Commun.* 49 (2013) 9678–9680.
- [20] H. Fan, Q.-D. Hu, F.-J. Xu, W.-Q. Liang, G.-P. Tang, W.-T. Yang, In vivo treatment of tumors using host-guest conjugated nanoparticles functionalized with doxorubicin and therapeutic gene pTRAIL, *Biomaterials* 33 (2012) 1428–1436.
- [21] Q.-D. Hu, H. Fan, Y. Ping, W.-Q. Liang, G.-P. Tang, J. Li, Cationic supramolecular nanoparticles for co-delivery of gene and anticancer drug, *Chem. Commun.* 47 (2011) 5572–5574.
- [22] G. Luo, X. Xu, J. Zhang, J. Yang, Y. Gong, Q. Lei, H. Jia, C. Li, R. Zhuo, X. Zhang, Encapsulation of an adamantane-doxorubicin prodrug in pH-responsive polysaccharide capsules for controlled release, *Appl. Mater. Interfaces* 4 (2012) 5317–5324.
- [23] J.D. Solano, I. González-sánchez, M.A. Cerbón, Á. Guzmán, M.A. Martínez-urbina, M.A. Vilchis-reyes, E.C. Martínez-zuñiga, C. Alvarado, A. Quintero, E. Díaz, The products of the reaction between 6-amine-1, 3-dimethyl uracil and bis-chalcones induce cytotoxicity with massive vacuolation in HeLa cervical cancer cell line, *Eur. J. Med. Chem.* 60 (2013) 350–359.
- [24] E. Valeur, M. Bradley, Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents, *Chem. Soc. Rev.* 2 (2009) 606–631.
- [25] A. El-faham, F. Albericio, COMU: a third generation of uronium-type, *J. Peptide Sci.* 16 (2010) 6–9.
- [26] A. El-faham, S. Funosas, R. Prohens, COMU: a safer and more effective replacement for benzotriazole-based, *Chem. Eur. J.* 15 (2009) 9404–9416.
- [27] B. Neises, W. Steglich, Simple method for the esterification of carboxylic acids, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 17 (1978) 12–14.
- [28] J.M. Landeros, F. Belmont-Bernal, A.T. Pérez-González, M.I. Pérez-Padrón, P. Guevara-Salazar, I.G. González-Herrera, P. Guadarrama, A two-step synthetic strategy to obtain a water-soluble derivative of curcumin with improved antioxidant capacity and in vitro cytotoxicity in C6 glioma cells, *Mater. Sci. Eng. C* 71 (2017) 351–362.
- [29] X. Ke, D.J. Coody, C. Yang, A.C. Engler, J.L. Hedrick, Y.Y. Yang, pH-sensitive polycarbonate micelles for enhanced intracellular release of anticancer drugs: a strategy to circumvent multidrug resistance, *Polym. Chem.* 5 (2014) 2621–2628.
- [30] H. Liu, C. Qiao, J. Yang, X. Zhang, Nanoparticles as siRNA drug delivery system for cancer treatment: in vitro and in vivo, *J. Mater. Chem. B* 2 (2014) 5910–5924.
- [31] P. Demir, F. Akman, Molecular structure, spectroscopic characterization, HOMO and LUMO analysis of PU and PCL grafted onto PEMA-co-PHEMA with DFT quantum chemical calculation, *J. Mol. Struct.* 1134 (2017) 404–415.
- [32] F. Akman, Experimental and theoretical investigation of molecular structure, vibrational analysis, chemical reactivity, electrostatic potential of benzyl methacrylate monomer and homopolymer, *Can. J. Phys.* 94 (2016) 853–864.
- [33] S. Yang, Q. Zhou, X. Yang, Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (2007) 903–911.
- [34] H. Gheybi, M. Adeli, Supramolecular anticancer drug delivery systems based on linear-dendritic copolymers, *Polym. Chem.* 6 (2015) 2580–2615.
- [35] K. Kono, C. Kojima, N. Hayashi, E. Nishisaka, K. Kiura, S. Watarai, A. Harada, Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(-amidoamine) dendrimers bearing adriamycin, *Biomaterials* 29 (2008) 1664–1675.
- [36] T. Etrych, M. Jelínková, B. Říhová, K. Ulbrich, N. Hpmá, Copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties, *J. Contr. Release* 73 (2001) 89–102.
- [37] C. Clementi, K. Miller, A. Mero, R. Satchi-Fainaro, G. Pasut, Dendritic poly(-ethylene glycol) bearing paclitaxel and alendronate for targeting bone neoplasms, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 1063–1072.
- [38] J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi, X.J. Liang, pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy, *Biotechnol. Adv.* 32 (2014) 693–710.
- [39] S.R. Paliwal, R. Paliwal, H.C. Pal, A.K. Saxena, P.R. Sharma, P.N. Gupta, G.P. Agrawal, S.P. Vyas, Estrogen-anchored pH-sensitive liposomes as nano-module designed for site-specific delivery of doxorubicin in breast cancer therapy, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 176–186.
- [40] K. Ulbrich, V. Subr, K. Ulbrich, Polymeric anticancer drugs with pH- controlled activation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 10233–11050.
- [41] C.A. Frederick, L.D. Williams, G. Ughetto, G.A. van der Marel, H.J. van Boom, A. Rich, A.H.J. Wang, Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin, *Biochemistry* 29 (1990) 2538–2549.