



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***SÍNTESIS Y ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE
CONJUGADOS DENDRIMÉRICOS CON UN
RESORCINARENO ABIERTO COMO NÚCLEO***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

CARLOS HERNÁNDEZ MONTALBÁN

México, CDMX

Año 2022





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: M. en C. Ana Adela Sánchez Mendoza

VOCAL: Profesor: Dr. José Federico del Rio Portilla

SECRETARIO: Profesor: Dr. Marcos Martínez García

1er. SUPLENTE: Profesor: Dr. Javier Ordoñez Hernández

2do. SUPLENTE: Profesor: Dr. Martha Verónica Escárcega Bobadilla

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 6-C, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Marcos Martínez García

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Luis Daniel Pedro Hernández

SUSTENTANTE:

Carlos Hernández Montalbán

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las herramientas necesarias para el desarrollo de mi formación profesional.

Al Dr. Marcos Martínez García por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, así como la asesoría brindada durante el desarrollo de este tema.

A la M. en C. Ana Adela Sánchez Mendoza, al Dr. José Federico del Rio Portilla y al Dr. Marcos Martínez García por sus revisiones y sus valiosas aportaciones a este trabajo.

Al proyecto IN 232220 (DGAPA-UNAM) por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente proyecto.

Al CONACYT al apoyo económico proporcionado para la manutención (No. becario 16632), el desarrollo y conclusión del presente trabajo.

Al Instituto de Química por brindarme las facilidades para el desarrollo de este trabajo.

Asimismo, a los técnicos académicos:

- M. en C. Elizabeth Huerta Salazar.
- Q. María de los Ángeles Peña.
- M. en C. Héctor Ruiz Olivares.
- Dr. Rubén Luis Gaviño Ramírez.
- Q. F. B. María del Rocío Patiño Maya.
- M. en C. Lucía del Carmen Márquez Alonso.
- Q. Eréndira García Ríos.
- M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz.
- Q. María de la Paz Orta Pérez.
- Dr. Francisco Javier Pérez Flores.
- I. Q. Luis Velasco Ibarra.
- Dr. María del Carmen García González.
- M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan.

*...la inteligencia más rudimentaria no tendría ninguna dificultad
en comprender que estar informado siempre es preferible a
desconocer...*

José Saramago

Agradecimientos especiales

Todo esto nunca lo habría logrado sin el apoyo de mi mamá, Lina. Gracias a ti por todos los esfuerzos y sacrificios que pusiste a lo largo de toda mi formación académica. Gracias por los consejos, las pláticas, las llamadas de atención y las risas que tuvimos a lo largo del camino, nuevamente, sin ti no lo hubiera logrado. Te amo.

Gracias a ti, Maru. Por ser mi segunda madre, por estar ahí para ayudarme, apoyarme y reprenderme siempre que lo necesité. Nunca encontraré la manera de agradecerte todo el apoyo que me has brindado. Gracias por todo.

Luis, gracias por ser el hermano que nunca tuve. Por escucharme, aconsejarme y brindarme tu apoyo siempre que lo necesite. Eres una de las personas que más admiro y que siempre me inspira a ser mejor persona.

Gracias Aimee, por estar ahí. Por ser esa amiga que siempre estaba ahí, aconsejándome en las buenas y en las malas, por escuchar y motivarme a seguir adelante.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, Irving, Sabrina, Isaac, Ulises y Daniel por hacer mi estadía en el laboratorio más agradable durante el tiempo que estuve.

Gracias a Miguel Ángel Pérez, por ser una de las personas más bondadosas que he conocido. Por apoyarme a lo largo de todo el tiempo en el pude coincidir contigo y por dejarme varias enseñanzas. Espero encontrarte en otra vida para poder seguir aprendiendo de ti.

Gracias a todas las personas que estuvieron ahí, apoyándome, aconsejándome, haciendo todo mi desarrollo profesional de una manera más agradable, y haciendo la carrera más amena, de verdad gracias a ustedes.

Finalmente, gracias Ramón, por ser mi papá, por apoyarme y ser junto con mi mamá, una de las personas más importantes, esto también es por ti, donde quiera estés, gracias.

Tabla de contenido

Lista de abreviaturas	i
Capítulo 1. Introducción	1
Introducción.....	2
Capítulo 2. Antecedentes.....	4
Calixarenos	5
Resorcinarenos	6
Síntesis de los resorcinarenos.....	6
Resorcinarenos abiertos.....	7
Dendrímeros	9
Historia	10
Estructura de los dendrímeros.....	11
Síntesis de dendrímeros	12
Los dendrímeros como acarreadores de fármacos.....	16
Clorambucilo	17
Síntesis del clorambucilo.....	18
Mecanismo de acción del clorambucilo	19
Anti-inflamatorios no esteroideos	19
Ibuprofeno	20
Indometacina.....	21
Naproxeno	22
Capítulo 3. Objetivos.....	24
Objetivo general	25

Objetivos particulares.....	25
Capítulo 4. Reactivos y Equipos	26
Reactivos y disolventes.....	27
Reactivos.....	27
Disolventes.....	27
Equipos	28
Capítulo 5. Sección experimental	29
Obtención de los conjugados dendrímero-fármaco de primera generación .	30
Síntesis del dendrímero de primera generación.....	30
Síntesis de los conjugados dendrímero-fármacos de primera generación	33
Pruebas de actividad biológica.....	36
Ensayo de citotoxicidad Sulforrodamina (SRB)	36
Metodología para el ensayo de Sulforrodamina (SRB)	37
Capítulo 6. Resultados y análisis.....	39
Síntesis del dendrímero de primera generación	40
Síntesis del núcleo dendrítico	40
Síntesis del dendrímero de G 0.5	44
Síntesis del dendrímero de G 1.0	50
Síntesis de los conjugados dendrímero-fármaco	58
Síntesis del conjugado dendrímero-clorambucilo.....	58
Síntesis del conjugado dendrímero-ibuprofeno	62
Síntesis del conjugado dendrímero-indometacina.....	66
Síntesis del conjugado dendrímero-naproxeno.....	73
Ensayo de sulforrodamina (SRB) en derivados	79

Capítulo 7. Conclusiones.....	80
Capítulo 8. Artículo	80

Lista de abreviaturas

°C: Grados Celsius

λ : Longitud de onda

δ : Desplazamiento químico

AINES: Antiinflamatorio no esterooidal

Ar: Aromático

CDCl₃: Cloroformo deuterado

CH₂Cl₂: Diclorometano

cm⁻¹: Centímetros a la menos uno

DCC: Diciclohexilcarbodiimida

DCU: Diciclohexilurea

DEPT: Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización

DMAP: 4-(Dimetilamino)-piridina

DMF: N, N-Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆: Dimetilsulfóxido deuterado

d: Doblete

EM: Espectrometría de masas

FT-IR: Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

IE: Impacto electrónico

J: Constante de acoplamiento

m: Multiplete

MALDI: Desorción/Ionización mediante laser asistida por Matriz

MeOH: Metanol

MeOD: Metanol deuterado

MHz: Megahertz

mL: Mililitro

nm: Nanómetro

PAMAM: Poli(amidoamino)

ppm: Partes por millón

q: Cuarteto

RMN ¹H: Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno

RMN ¹³C: Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Singulete

sa: Señal ancha

t: Triplete

TOF: Tiempo de vuelo

UV-vis: Ultravioleta-visible

Capítulo 1. Introducción

Introducción

En el cuerpo humano, las células se regeneran continuamente en un ciclo donde las células más viejas mueren de acuerdo con la programación genética que define su ciclo de vida, conocida como apoptosis. En algunos casos, se producen mutaciones en los genes relacionados con la regulación de la división celular y la muerte, que puede conducir al crecimiento celular anormal incontrolado, produciendo tumores en tejidos y órganos. Las proteínas mutantes participan en procesos que promueven la metástasis: diseminación de células anormales, proliferación y supervivencia celular. Estas características son particulares de tumores malignos, es decir, tumores cancerígenos.

Actualmente, el cáncer es uno de los mayores retos de salud pública en México. Para el año 2020, esta enfermedad, se presenta con una tasa de mortalidad superior a 75 por cada 100,000 habitantes. Dentro de las principales causas de muerte por cáncer, se encuentra el cáncer de mama, de próstata e hígado. Su tratamiento a menudo implica someter al paciente a un protocolo de administración de fármacos, sin embargo, solo una mínima parte del principio activo alcanza el nivel deseado de eficacia. Esto se debe a la mala absorción y pérdida en el metabolismo y excreción, ya que cada molécula del fármaco tiene una ventana terapéutica en términos de concentración por encima de la cual es tóxico y por debajo de la cual es ineficaz. La dosificación convencional de medicamentos da como resultado un ciclo frecuente que se encuentra entre los niveles tóxicos e ineficaces, dependiendo de la regularidad con la que se suministra el tratamiento.

En el presente proyecto, se propone un mecanismo por el cual, se podría aumentar la eficacia de la dosis y disminuir así los efectos colaterales que presentan algunos fármacos anticancerígenos comerciales administrados, mediante el diseño y síntesis de conjugados con nanoestructuras dendriméricas.

Con base en lo anterior, se realizó la síntesis del resorcinareno abierto, obteniendo por primera vez estructuras dendriméricas, al hacer reaccionar el macrociclo con bromoacetato de metilo y etanolamina. La caracterización de los

compuestos obtenidos se describe en el capítulo cinco, mientras que la discusión de los resultados sobre la síntesis de los dendrímeros así como la actividad biológica de cada conjugado dendrímero-fármaco se encuentra en el capítulo seis. Cabe mencionar, que el conjugado dendrímero-clorambucilo presentó una mayor actividad en dos líneas celulares, con respecto al resto de conjugados, mientras que los conjugados dendrímero-fármaco con naproxeno e indometacina solo mostró actividad en una línea celular. Finalmente, se presentan las conclusiones obtenidas en durante el desarrollo del proyecto.

Capítulo 2. Antecedentes

Calixarenos

Los calixarenos son $[1_n]$ -metaciclofanos que se obtienen a través de la condensación de fenoles con aldehídos bajo diferentes condiciones de reacción. David Gutsche¹ fue el primero en nombrarlo como calixarenos. El nombre se deriva del griego *Calix* que significa *vaso* o *cáliz*, mientras que la palabra *areno* indica la presencia del grupo arilo en la estructura (Figura 1).



Figura 1. Comparación del calix[4]areno con un cáliz.

Existen tres tipos de calixarenos estudiados hasta el momento:

- a) **Calixareno tipo I:** también son llamados como $[1_n]$ -metaciclofanos. Son compuestos cíclicos que no poseen ningún grupo funcional en su estructura (Figura 2a).
- b) **Calixarenos tipo II:** son aquellos que se obtienen entre la condensación de un alquilfeno y formaldehído en un medio básico (Figura 2b).
- c) **Calixarenos tipo III:** son los que se obtienen a través de la condensación del resorcinol con diferentes aldehídos bajo condiciones de catálisis ácida (Figura 2c).

¹ Gutsche, D.; Muthukrishnan, R. J. (1978), *J. Org. Chem.*, 43(25), 4905-4906.

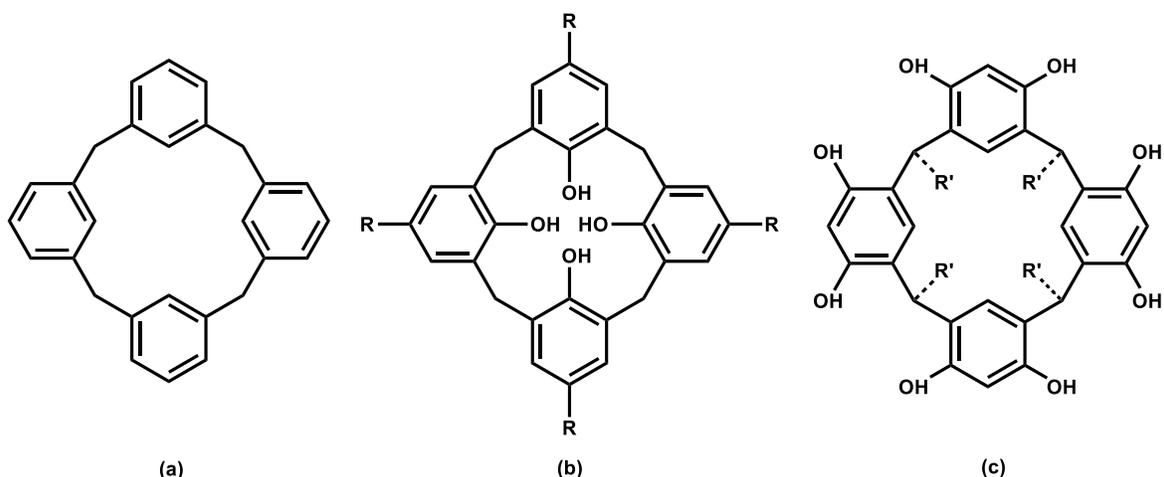


Figura 2. Estructuras de los calixarenos. a) Calixareno I. b) Calixareno II. c) Calixareno III.

Resorcinarenos

En 1872 se reportó los resultados de la reacción entre resorcinol y benzaldehído catalizada por ácido². Se obtuvo un sólido que en medio básico adquiriría una coloración distinta al sólido. En 1940, Niederl y Vögel estudiaron los productos de la reacción entre el resorcinol y diferentes aldehídos, obteniendo un producto con una proporción 4:4 arilo-aldehído, respectivamente. Finalmente en 1978, Erdtman³ determinó la estructura de estos compuestos mediante difracción de rayos X.

Síntesis de los resorcinarenos

La obtención de los resorcinarenos se lleva a cabo mediante la condensación entre el aldehído y resorcinol, generalmente empleando etanol como disolvente y con catálisis ácida (Figura 3).

² Timmerman, P.; Verboon, W. Reinhoudt, D. N. (1996). *Tetrahedron*, 52(8), 2666.

³ Erdtman, H.; Högber, S.; Abrahamsson, S.; Nilson, B. (1968). *Tetrahedron Lett.* 14, 1679-1682.

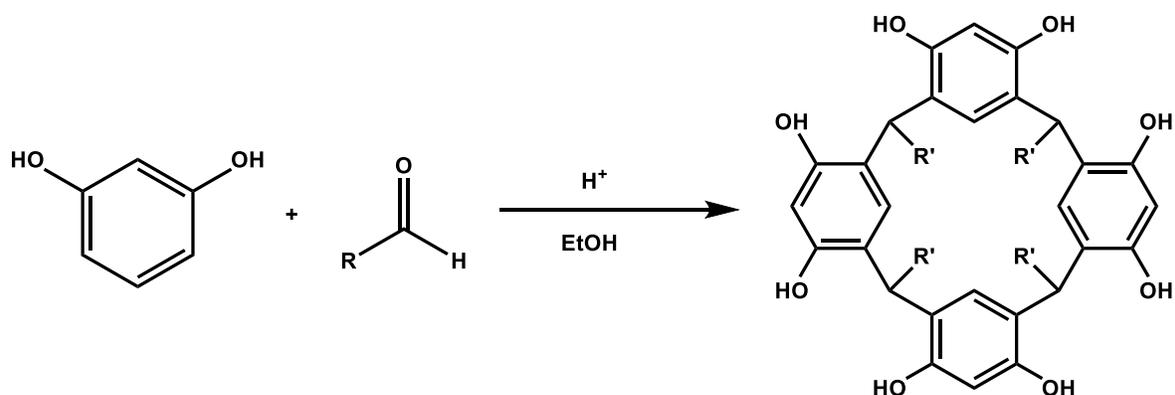


Figura 3. Síntesis generalmente de un resorcinareno.

El mecanismo propuesto para la obtención del resorcinareno se lleva a cabo mediante una sustitución electrofílica aromática y una condensación del grupo carbonilo con el aldehído.

Resorcinarenos abiertos

La química de los resorcinarenos ha sido bastante explorada e investigada a lo largo de los años, un ejemplo de ello ha sido la síntesis de estas moléculas empleando principios de química verde⁴⁵. Sin embargo, una de las mayores aportaciones que se registraron para este tipo de moléculas fue la síntesis de resorcinarenos abiertos⁶.

Este tipo de moléculas generará una serie de nuevos ligantes, así como del desarrollo de dendrímeros con una geometría diferente a las ya reportadas debido a la estructura del núcleo.

Para ello, Cominetti y compañía, emplearon 4-clororesorcinol con tres diferentes aldehídos: ftaraldehído, isoftaraldehído y tereftaldehído siguiendo la síntesis convencional de los resorcinarenos, es decir, HCl al 37% en EtOH, obteniendo rendimientos del 80, 91 y 67%, respectivamente. Sin embargo, se planteó una segunda metodología, la cual consistía en emplear MeSO₃H al 8% en una mezcla éter dietílico:diclorometano, 1:1. Con esta nueva ruta de síntesis, se lograron

⁴ Roberts, B. A.; Cave, W. V. G.; Raston, C. L.; Scott, J. L. (2001). *Green Chemistry*, 3, 280-284.

⁵ Sardjono, R. E.; Kadarohman, A.; Mardhiyan, A. (2012). *Procedia Chemistry*, 4, 224-231.

⁶ Cominetti, M. M. D.; Hughes, D. L.; Mathews, S. E. (2016). *Org. Biomol. Chem.*, 14, 10161-10164.

rendimientos del 94% para el ftalaldehído, mientras que para el derivado del isoftalaldehído no se obtuvo ningún resultado mejor con respecto a la síntesis clásica. Finalmente, en el caso del tereftaldehído se obtuvo un rendimiento del 87%, por lo que la nueva metodología, resultó ser más adecuada para la obtención del resorcinareno con este aldehído. Las estructuras de los compuestos se confirmaron mediante RMN ^1H y difracción de rayos X (Figura 4).

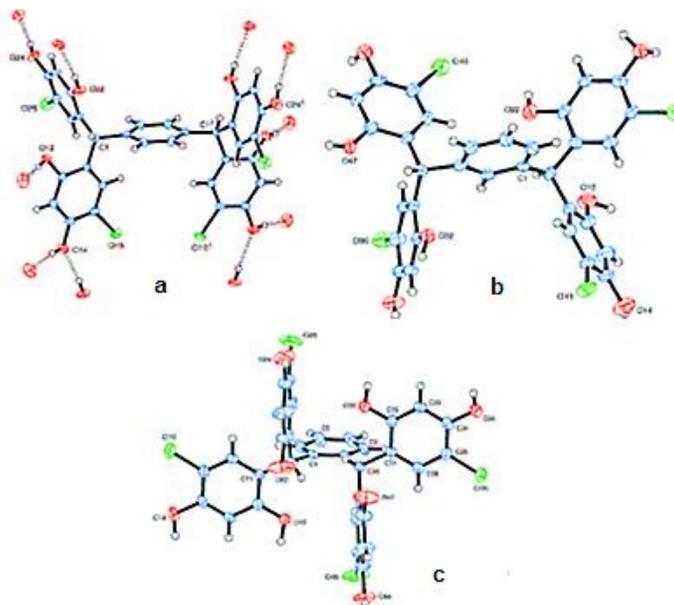


Figura 4. Estructuras de los resorcinarenos abiertos. a) Derivado del tereftaldehído. b) Derivado del isoftaldehído. c) Derivado del ftaldehído.

Una de las aplicaciones que se dio en el trabajo por parte de Cominetti y colaboradores fue la síntesis de una estructura dendrímica funcionalizada con ocho moléculas de calixarenos en la superficie, que, a su vez, presentaba treinta y dos aminas al en la periferia (Figura 5).

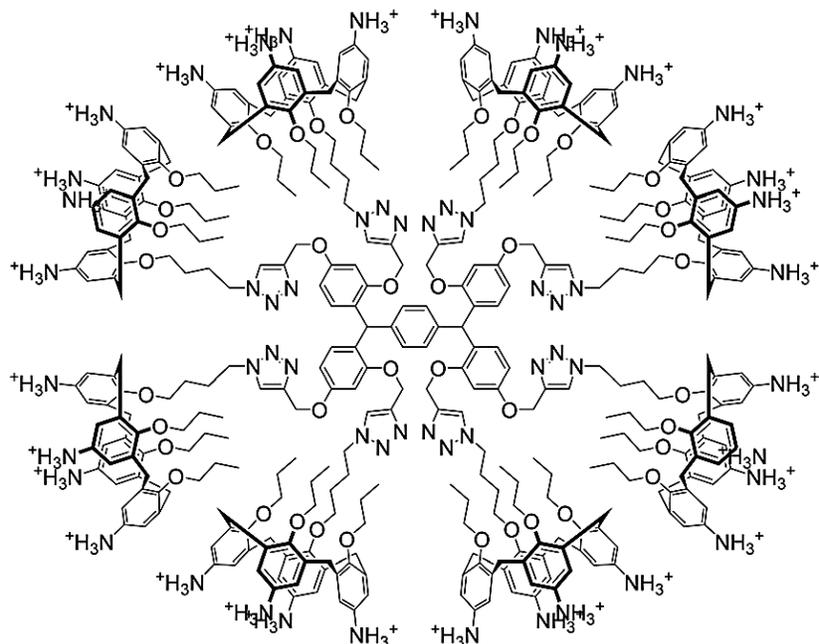


Figura 5. Estructura dendrímica con un núcleo de resorcinareno abierto.

De manera general, el uso de un halógeno como agente protector permite mantener el control en la condensación, para obtener análogos del resorcinareno, con una geometría bien definida sin la necesidad de realizar técnicas de purificación.

Este tipo de moléculas, presentan una alta versatilidad para el desarrollo de aplicaciones biológicas. Mientras que en el campo de la ingeniería de cristales, se puede aprovechar, ya que cuando se encuentra en su forma cristalina, tiende a formar estructuras escalonadas.

Dendrimeros

La palabra dendrímero proviene de las palabras griegas *dendrón*, que significa árbol y *meros*, que significa parte, debido a la estructura química de este tipo de compuestos. Los dendrimeros son polímeros tridimensionales con un alto grado de ramificación y alto peso molecular⁷.

⁷ Caminade, A. M.; Turrin, C. O.; Laurent, R.; Ouali, A.; Delavaux-Nicot, B. (2011). *Dendrimers: Towards Catalytic, Material and Biomedical Uses*. Toulouse, Francia: Wiley.

Historia

El primer tipo de moléculas dendríticas reportadas se originó a partir de una adición tipo Michael con propilamina y acrilonitrilo, obteniendo el producto con dos nitrilos terminales, posteriormente se realizó una reducción con NaBH_4 en presencia de Co^{2+} . El producto final de la reacción es una cadena con aminas terminales⁸ (Figura 6). Sin embargo, a pesar de que esta ruta de síntesis resultó ser innovadora, se reportaron problemas con la pureza y bajos rendimientos.

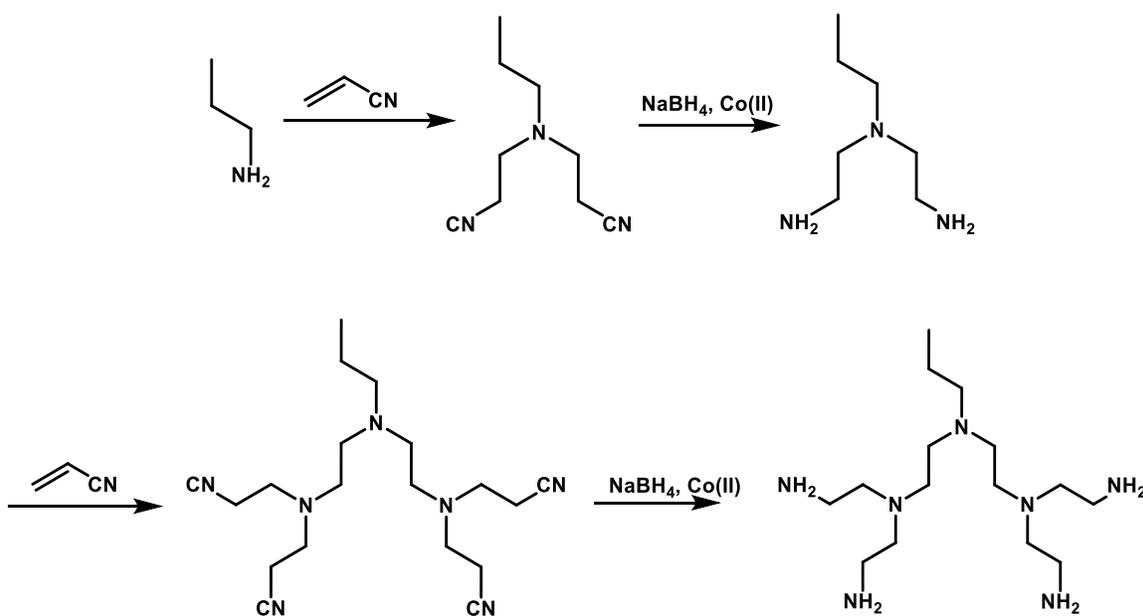


Figura 6. Primera ruta de síntesis de moléculas tipo cascada.

Años más tardes, en 1985, Tomalia y colaboradores⁹, prepararon la primera familia de dendrímeros a partir de una unidad central, mediante etapas de reacción sucesivas. Estos compuestos, conocidos como PAMAM (poliamidoamina) (Figura 7) no presentaron el problema que tenían los productos de Vögtle. Casi al mismo tiempo, Newkome¹⁰, reportó la síntesis de amidas dendriméricas. Para finales de 1980, Frétche, Hawker y Philippides¹¹ desarrollaron una nueva ruta de síntesis, la cual consiste en la construcción del dendrímero partiendo desde la periferia,

⁸ Vögtle, F.; Richardt, G.; Werner, N. (2009). *Dendrimer Chemistry*. Alemania: Wiley.

⁹ Tomalia, D. A.; Baker, H.; Deald, J.; Hall, M.; Kallog, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. (1985). *Polym. J.*, 17(1), 117-132.

¹⁰ Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. (1985). *J. Org. Chem.*, 50(11), 2003-2004.

¹¹ Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. (1990). *J. Am. Chem. Soc.*, 112(21), 7638-7647.

finalizando en el centro. Finalmente, en 1993, Meijer y Mülhaupt¹²¹³, propusieron una modificación al método de Vögtle, preparando dendrímeros poli(propilenimina), PPI.

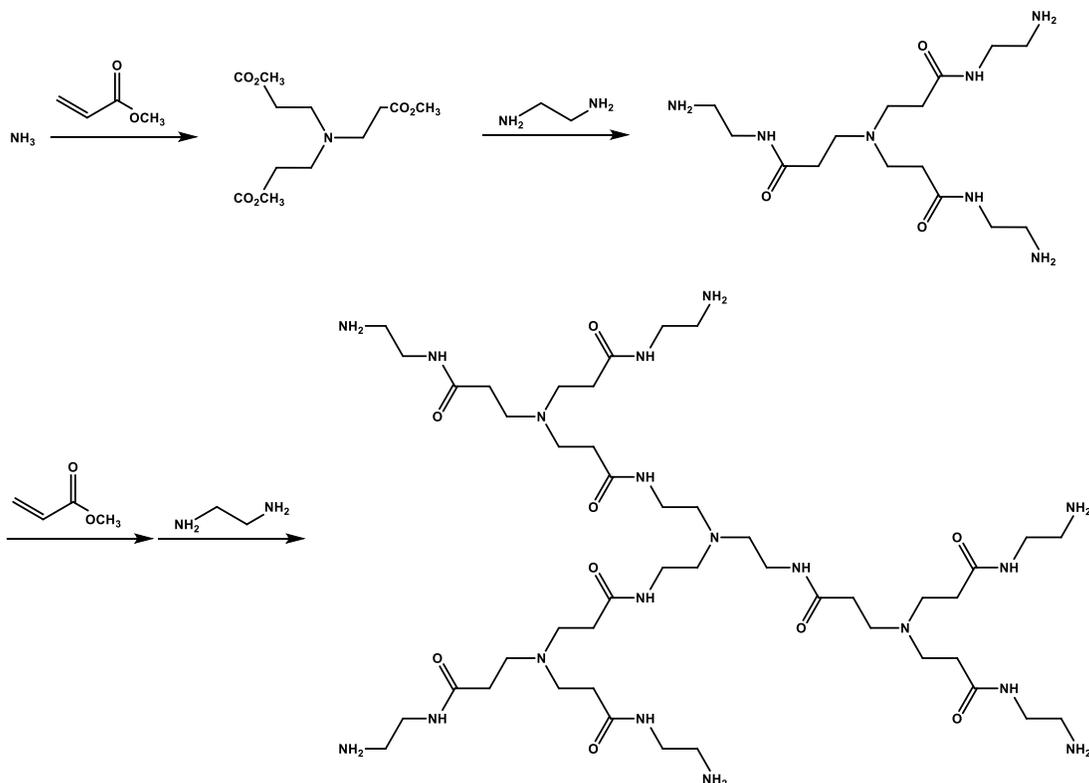


Figura 7. Síntesis del primer dendrímero tipo PAMAM.

Estructura de los dendrímeros

Un dendrímero está constituido por las siguientes partes:

- **Núcleo:** es la base sobre la cual se va construyendo el dendrímero. Es importante ya que va a determinar la forma y el número de generaciones que se pueden obtener (Figura 8).

¹² De Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. E. (1993). *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 32(9), 1308-1311.

¹³ Wörner, C.; Mülhaupt, R. (1993). *Angew. Chemie Int. Ed. English*, 32(9), 1306-1308.

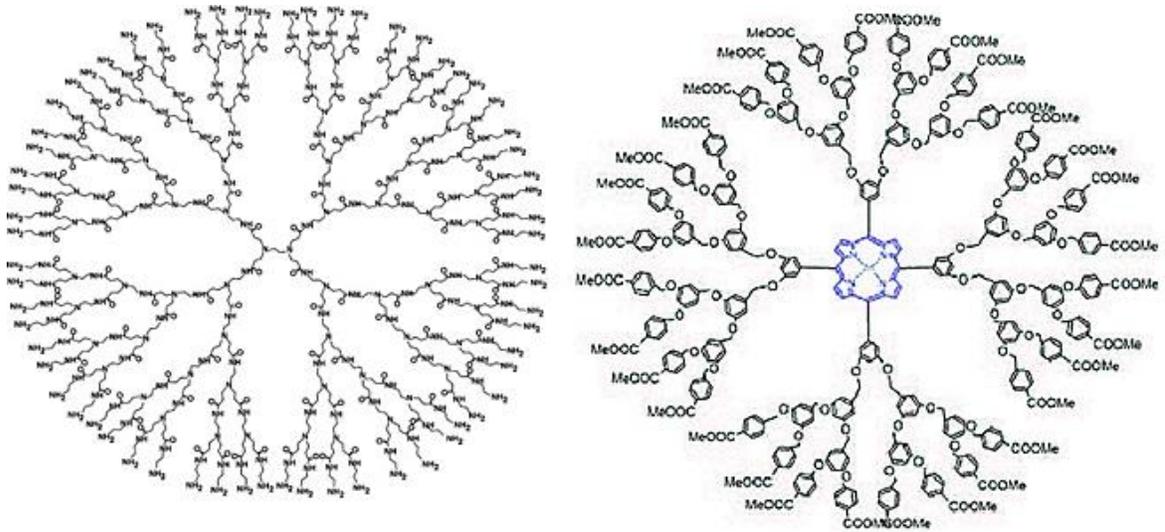


Figura 8. Dendrímtero tipo PAMAM con un núcleo de etilendiamina. Dendrímtero tipo Frechet con un núcleo de porfirina.

- **Dendró:** es la cuña dendrítica sin el núcleo. Es una molécula ramificada que tiene diferentes grupos funcionales tanto en el núcleo y en la periferia, y que se sintetiza paso a paso para obtener un crecimiento exponencial. Finalmente, el último paso se une desde el punto focal de este al núcleo funcional, obteniendo el dendrímtero.
- **Generación:** la generación de un dendrímtero es el número de veces que se pasa por un punto focal o un punto de ramificación desde el núcleo hasta la periferia¹⁴.
- **Grupos terminales:** son los grupos que se encuentran en la periferia del dendrímtero y que le van a brindar diferentes propiedades a estas macromoléculas.

Síntesis de dendrímteros

Existen diversas metodologías para la obtención de estos polímeros, sin embargo, las más empleadas son:

¹⁴ Boas, U.; Christensen, J. B.; Heegaard, P. M. H. (2009) *Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools*. Reino Unido: RSC Publishing.

a) **Método divergente.** Esta metodología se basa en ir agregando una unidad monomérica al núcleo de forma repetitiva, hasta llegar a la periferia del dendrímtero¹⁵. De manera sencilla, esta ruta de síntesis se puede interpretar como el crecimiento del dendrímtero de “adentro hacia afuera”.

De forma general, la síntesis divergente se basa en dos operaciones básicas: (a) la activación de un grupo terminal del monómero para generar una molécula con mayor reactividad, (b) una vez realizada la activación, se procede con el acoplamiento de un monómero (Figura 9).

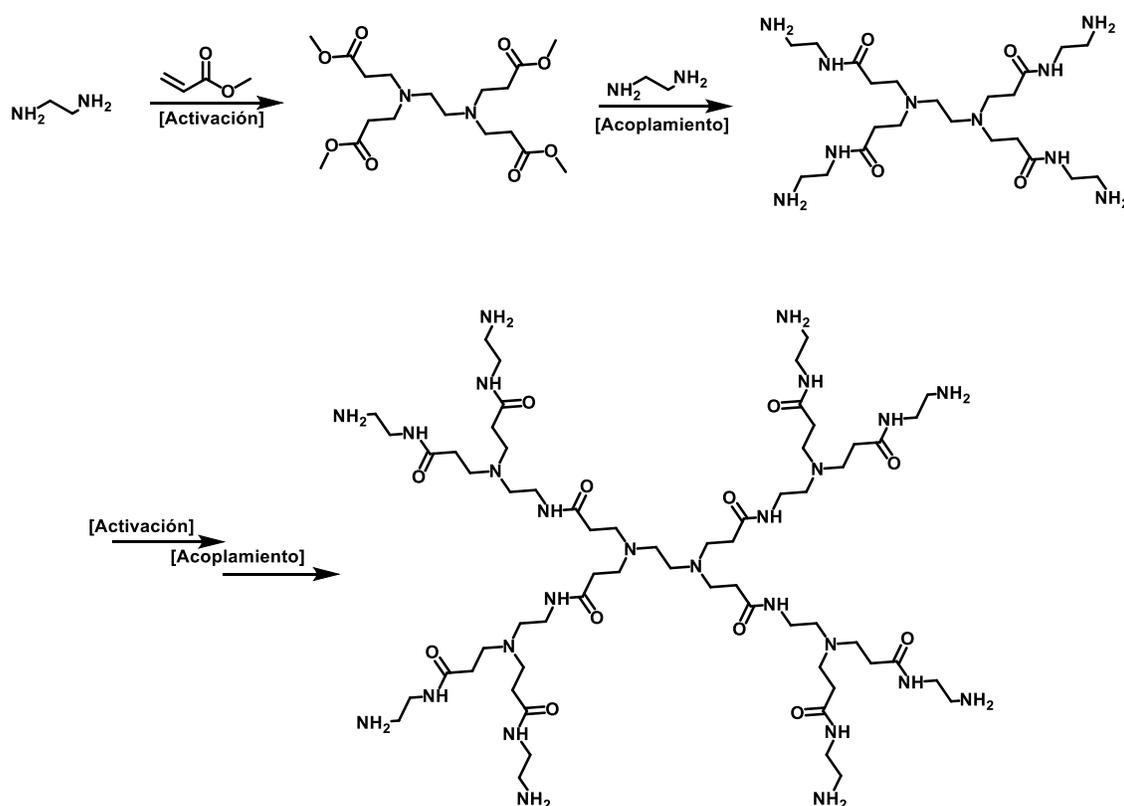


Figura 9. Síntesis divergente de un dendrímtero de generación 2.0.

Las ventajas y desventajas que presenta la ruta divergente en la síntesis de dendrímteros son:

➤ **Ventajas**

¹⁵ Newkome, G. R.; Moorefield, C. N.; Vögtle, F. (2002). *Dendrimers and Dendrons. Concepts, Syntheses, Applications*. Alemania: Wiley.

- Alcanzar pesos moleculares altos.
- Obtener una gran cantidad de grupos terminales en la periferia.
- Posibilidad de alcanzar altas generaciones en los dendrímeros, sin embargo, se ve limitado por el tamaño del núcleo.

➤ **Desventajas**

- Probabilidad de que no todos los grupos terminales reaccionen durante el acoplamiento o activación.
- Defectos estructurales.
- Excesos de los monómeros conforme va aumentando la generación del dendrímero.
- Problemas de purificación, ya que los subproductos obtenidos tendrán propiedades similares al producto principal.

b) Método convergente. El método convergente es una estrategia en la que, los dendrímeros, son construidos desde la periferia hacia el núcleo¹⁶, es decir, “de afuera hacia a dentro”.

La síntesis de las ramificaciones se inicia a partir de un monómero que contiene un punto focal no activado, el cual, a través de una reacción de acoplamiento con un grupo terminal, permite la obtención de un dendrón de primera generación (Figura **10a**). La activación del punto focal da como resultado el dendrón activado, que a su vez, puede reaccionar con el monómero para dar como resultado un dendrón de segunda generación (Figura **10b**). Este proceso de reacciones de acoplamiento y activación se puede repetir de manera sucesiva para generar dendrones de generación grandes. Una vez que se ha llegado a la generación deseada, se hace una última reacción de acoplamiento entre los dendrones acoplados y el núcleo, obteniendo el dendrímero (Figura **10c**).

¹⁶ Vögtle, F.; Richardt, G.; Werner, N. (2009). *Dendrimer Chemistry: Concepts, Synthesis, Properties, Applications*. Alemania: Wiley.

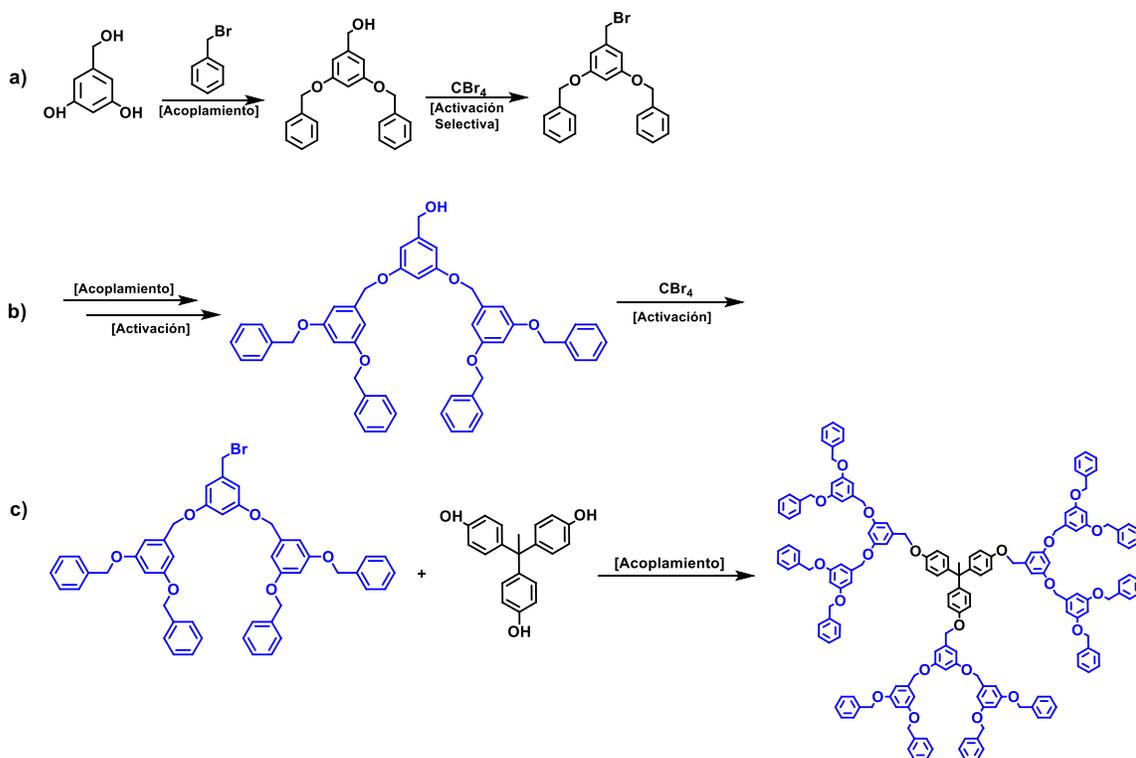


Figura 10. Síntesis convergente para la obtención de un dendrímoro de segunda generación.

La ruta convergente presenta las siguientes ventajas y desventajas¹⁷:

➤ **Ventajas**

- No se necesitan excesos durante la reacción ya que se puede considerar que la reacción va en cantidades equimolares.
- La purificación es sencilla, ya que los subproductos tienen propiedades diferentes al producto principal.

➤ **Desventajas**

- En función del tamaño del dendrón, pueden existir defectos estructurales.

¹⁷ Newkome, G. R.; Moorefield, C. N.; Vögtle, F. (2002). *Dendrimers and Dendrons. Concepts, Syntheses, Applications*. Alemania: Wiley.

Los dendrímeros como acarreadores de fármacos

Una de las principales aplicaciones que tienen los dendrímeros es el transporte de fármacos. Esto se puede realizar mediante dos formas: a) la formación de complejos supramoleculares que se obtienen a través de interacciones no covalentes y b) la obtención de un conjugado dendrímero-fármaco mediante enlaces covalentes¹⁸.

Los dendrímeros tipo PAMAM, tiene la capacidad de formar micelas, esto se debe a que el núcleo presenta un comportamiento hidrofóbico, mientras que cada una de las generaciones que lo componen, se comporta de manera hidrofílica, por lo que los hacen candidatos para el encapsulamiento de fármacos.

En los dendrímeros PAMAM, el encapsulamiento del fármaco se realiza con base en carácter hidrofílico de este, ya que si presenta este comportamiento no se podrá realizar de manera adecuada, sin embargo, si el comportamiento es hidrofóbico, sucederá todo lo contrario.

Para la formación del conjugado dendrímero-fármaco, este puede tener grupos amina o alcoholes, con el propósito de obtener el dendrímero con grupos éster o amida, sin embargo, también existen dendrímeros con puentes disulfuro^{19,20}, hidrazonas, etc. La cantidad de fármacos que se pueden conjugar con el dendrímero va a depender del número de sitios reactivos que se tengan en la periferia.

Existe una serie de características para que un dendrímero pueda emplearse como un acarreador de fármacos, las cuales son²¹:

- No debe de ser tóxico.
- No debe de ser inmunogénico.

¹⁸ Parry, A. Z.; Pandey, R. (2017). *Dendrimers in Medical Science*. Canada: Apple Academic.

¹⁹ Kurtoglu, Y. E.; Navath, R. S.; Wang, B.; Kannan, S.; Romero, R.; Kannan, R. M. (2009). *Biomaterials*. 30, 2112-2121.

²⁰ Navath, R. S.; Kurtoglu, Y. E.; Wang, B. Kannan, S.; Romero, R.; Kannan, R. (2008). *Bioconjugate Chem*. 19, 2446-2455.

²¹ Gonzalo, T.; Muñoz-Fernández, M. A. (2008). *Dendrímeros y sus aplicaciones biomédicas*. Madrid.

- Tener la capacidad de poder permear barreras biológicas, tales como membranas celulares, membranas microbiológicas, tejido sanguíneo.
- El fármaco debe de ser estable durante el desarrollo del estudio clínico.
- Debe de ser capaz de reconocer diferentes estructuras biológicas.

La principal forma en la que se libera un fármaco es mediante el cambio de pH. Este mecanismo se explica ya que una de las principales diferencias entre una célula sana y una célula tumoral es el pH. En el caso de la primera se encuentra que el pH es neutro, mientras que en el segundo tipo, se tiene un pH ligeramente ácido, lo que ocasiona que las aminos internas se protonen, ocasionando que un agradamiento en la molécula y finalmente liberando el fármaco²².

Clorambucilo

Para combatir el cáncer, se han desarrollados diferentes fármacos, tanto compuestos inorgánicos como orgánicos, sin embargo, la principal desventaja de estos compuestos es una baja selectividad entre células sanas y células tumorales.

El clorambucilo es un fármaco que se emplea contra la leucemia crónica linfática, linfomas y carcinomas avanzados en el ovario y de mama²³. El clorambucilo sobre los límites permitidos ocasiona náuseas, mielotoxicidad y neurotoxicidad. Desafortunadamente, al igual que los agentes alquilantes, este tipo de fármaco no es específico con las células, lo que ocasiona estrés oxidativo todas las células²⁴.

²² Boas, U.; Christensen, J. B.; Heegaard, P. M. H. (2009) *Dendrimers in Medicine and Biotechnology: New Molecular Tools*. Reino Unido: RSC Publishing.

²³ (2005, 2020). Chlorambucil, Drugbank. Recuperado el 03 de marzo de 2020 del sitio web: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00291>

²⁴ Reux, B.; Weber, V.; Galmier, M. J.; Borel, M.; Madesclaire, M.; Madelmont, J. C.; Debiton, E.; Coundert, P. (2008). *Bioorg. Med. Chem.* 16, 5004-5020.

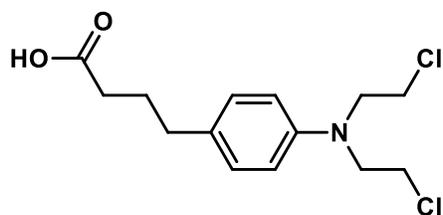


Figura 11. Estructura del clorambucilo.

Síntesis del clorambucilo

Fue sintetizado por primera vez en el año de 1937 por Evertt²⁵ y fue autorizado para uso clínico en 1957. A continuación, se muestra la ruta de síntesis de dicho fármaco (Figura 12).

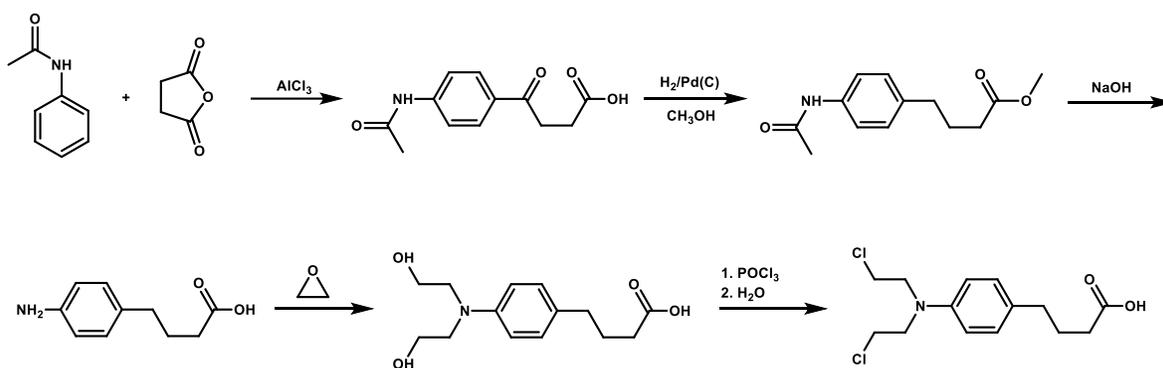


Figura 12. Síntesis de clorambucilo propuesto por Everett.

Conforme paso el tiempo, se propusieron nuevas rutas de síntesis, en las cuales el fundamento es el mismo, simplemente se tiene una variación de una o dos reacciones.

A continuación, se muestra una ruta de síntesis para dicho fármaco, partiendo del ácido 4-fenilbutanoico²⁶ (Figura 13).

²⁵ Everett, J. L.; Roberts, J. J. (1937). *J. Amer. Chem. Soc.* 59(96), 2386-2392.

²⁶ Gaudreault, R. C.; Lacroix, J.; Pagé, M.; Joly, L. P. (1988). *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 77(2), 185-187.

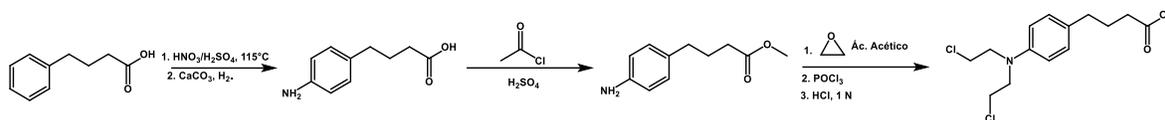


Figura 13. Síntesis alternativa para la obtención del clorambucilo.

Mecanismo de acción del clorambucilo

El mecanismo de acción del clorambucilo consiste en el hecho de que los pares electrónicos del nitrógeno de la amina son fuertemente nucleofílicos y estos pueden reaccionar de manera adecuada con los sitios electrofílicos de la cadena del ADN, lo que propicia la formación enlaces covalentes.

En un inicio, el nitrógeno desplaza al cloro, lo que ocasiona la formación de un ion conocido como aziridinio, el cual recibe un ataque nucleofílico por parte del N-7 de la guanina, lo que origina que dicha base nitrogenada se alquile por parte del catión aziridinio. Este pase se repite por segunda ocasión para lograr una interrupción de la replicación del ADN, ocasionando que las células ya no se reparen²⁷²⁸ (Figura 14).

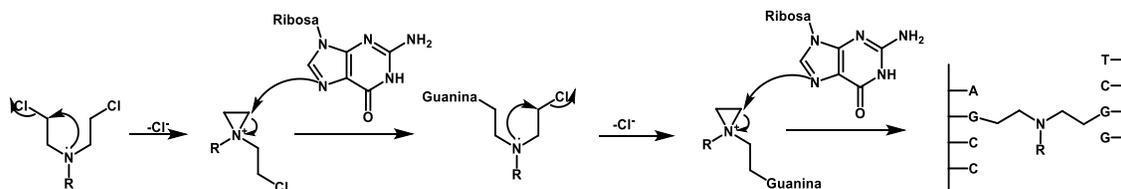


Figura 14. Mecanismo de acción del clorambucilo.

Anti-inflamatorios no esteroideos

Los anti-inflamatorios no esteroideos son una familia de fármacos con estructuras diferentes que se emplean para el tratamiento de problemas reumáticos así como los síntomas de inflamación. Sin embargo, también se ha observado que está familia de fármacos tiene una actividad antitumoral²⁹.

²⁷ Palavarapu, A.; Stillabower, J. A.; Stubblefield, S. G.; Taylor, W. M.; Baik, M. H. (2012). *J. Org. Chem.* 77, 5914-5921.

²⁸ Saffhill, R.; Margison, G. P.; O'Connor, P. J. (1985). *Biochimica et Biophysica Acta.* 823, 111-145.

²⁹ Hil'ovska, L.; Jendželovský, R.; Fedoročko, P. (2015). *Molecular and Clinical Oncology.* 3, 3-12.

El mecanismo de acción de esta familia aún no se tiene bien estudiado, sin embargo, se ha propuesto que el compuesto inhibe la actividad de las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), lo que provoca una disminución en la síntesis de la prostaglandina³⁰.

A continuación, se desarrollará un poco acerca de los AINEs que se emplearon, siendo el ibuprofeno, indometacina y naproxeno.

Ibuprofeno

El ibuprofeno fue descubierto en 1961 por Stewart Adams y es un derivado del ácido propiónico que posee un centro quiral. Debido a lo anterior, el isómero S es el que posee la actividad biológica, sin embargo, el organismo es capaz de convertir el (*R*)-ibuprofeno en (*S*)-ibuprofeno a través de una enzima³¹.

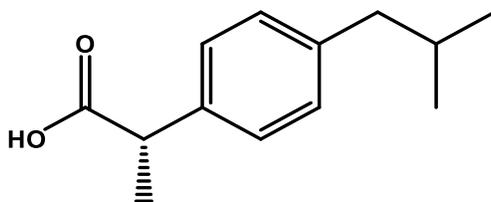


Figura 15. Estructura del ibuprofeno.

Para la síntesis del ibuprofeno se han reportado diversas rutas sintéticas^{32,33}, sin embargo, la mas simple es la acilación del isobutilbenceno con cloruro de acetilo, para la obtención de 4-isobutilacetofenona. Posteriormente, se trata con NaCN para obtener la cianohidrina correspondiente y finalmente, un rearreglo con ácido yodídrico con fósforo, obteniendo el fármaco.



Figura 16. Síntesis del ibuprofeno.

³⁰ Ulrich, C. M.; Bigler, J.; Potter, D. (2006). *Nature Publishing*. 6, 130-140.

³¹ Chen, C. S.; Shieh, W. R.; Lu, P. H.; Harriman, S.; Chen, C. Y. (1991). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1078 (3), 411-417.

³² Nicholson, J. S.; Adams, S. S. (1966). E.U.A., 3228831.

³³ Nicholson, J. S.; Adams, S. S. (1968). E.U.A., 3385886.

Otra ruta sintética consiste en la clorometilación del isobutilbenceno con formaldehído y HCl obteniendo alcohol 4-isobutilbencilíco, posteriormente se trata con NaCN³⁴. Finalmente, se realiza una reacción ácido-base con los protones ácido del carbono alfa al grupo nitrilo seguida de una metilación, finalizando con una hidrólisis ácida del nitrilo obteniendo del ácido carboxílico.

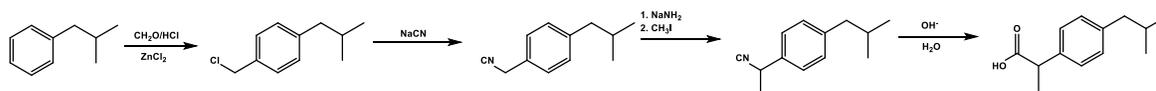


Figura 17. Variante de la síntesis del ibuprofeno.

Indometacina

La indometacina fue sintetizada por Merck en 1963. Es un fármaco que pertenece al grupo de los derivados del ácido acético. La indometacina se emplea para el tratamiento de la osteoartritis, artritis reumatoide, así como en los usos generales de los AINES, reducción del dolor, inflamación y reducción de fiebre, sin embargo, la eficacia de este terapéutico es limitada, debido a su escasa solubilidad en agua, biopermeabilidad y adicionalmente, trae consigo efectos secundarios desfavorables³⁵.

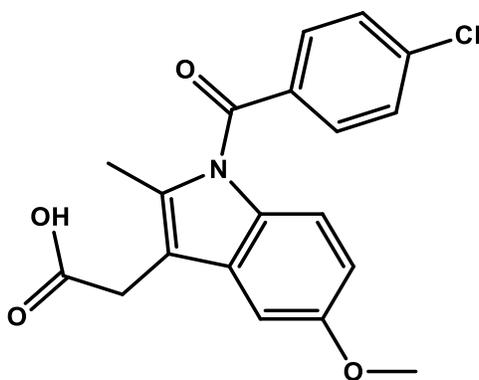


Figura 18. Estructura de la indometacina.

³⁴ White, D. R. (1977). E.U.A., 4021478.

³⁵ Gorzkiewicz, M.; Janaszewska, A.; Ficker, M.; Svenningsen, S. W.; Christensen, J. B.; Klajnert-Maculewicz, B. (2019). *Colloids and Surfaces Biointerfaces*. 181, 959-962.

La síntesis reportada comienza a partir de la 4-metoxifenilhidrazina, para formar el indol mediante la reacción de Fischer con el éster metílico del ácido levulínico. El éster del ácido acético se hidroliza y posteriormente se protege el grupo ácido carboxílico con terbutanol. A continuación, se realiza una reacción de amidación con cloruro de 4-clorobenzoilo en DMF usando NaH como base. Finalmente, se hace la reacción de desprotección necesaria³⁶.

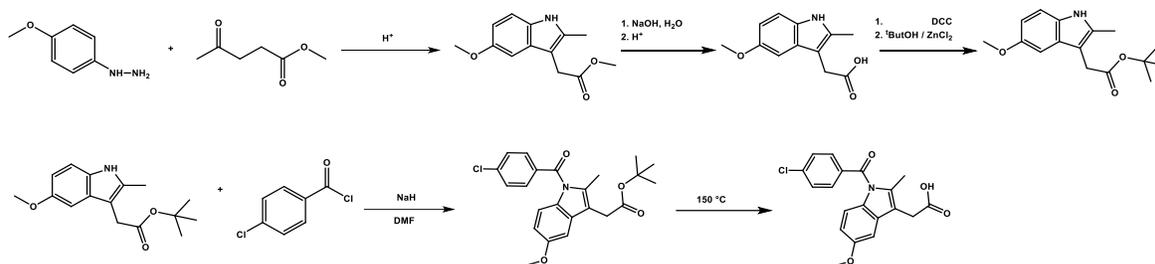


Figura 19. Ruta sintética por Merck para la obtención de la indometacina.

Naproxeno

El naproxeno es un fármaco que pertenece al grupo de los AINES, en concreto, de los derivados del ácido propiónico. Fue sintetizado por la compañía Syntex³⁷ en 1976. Este compuesto, a diferencia del ibuprofeno que comercializa en forma ópticamente pura, el isómero S. Al igual que sus análogos, el naproxeno exhibe propiedades como analgésicos, para reducir la fiebre y acción antiinflamatoria de larga duración.

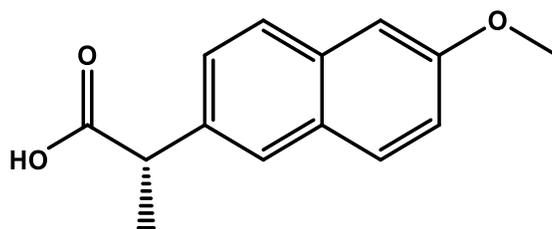


Figura 20. Estructura del naproxeno.

La síntesis de este fármaco se desarrolla de manera similar a la síntesis del ibuprofeno, partiendo del 6-metoxinaftaleno, posteriormente se realiza o bien una

³⁶ Shen, T. Y.; Westfield, J. (1964). E.U.A., 3161654.

³⁷ Harrington, P.; Lodewijk, E. (1997). *Org. Process Res. Dev.* 1(1), 72-76.

acetilación o una clorometilación, para la obtención de los compuestos correspondientes.

Capítulo 3. Objetivos

Objetivo general

Realizar la síntesis del resorcinareno abierto, funcionalizarlo y obtener conjugados dendriméricos entre el resorcinareno y cuatro fármacos diferentes; clorambucilo, ibuprofeno, indometacina y naproxeno, para determinar su efecto citotóxico en seis líneas celulares.

Objetivos particulares

- Sintetizar y caracterizar el resorcinareno abierto como núcleo dendrítico.
- Sintetizar y caracterizar el dendrímero de primera generación con etanolamina.
- Sintetizar y caracterizar el conjugado dendrímero-clorambucilo de primera generación.
- Sintetizar y caracterizar el conjugado dendrímero-ibuprofeno de primera generación.
- Sintetizar y caracterizar el conjugado dendrímero-indometacina de primera generación.
- Sintetizar y caracterizar el conjugado dendrímero-naproxeno de primera generación.
- Conocer el efecto citotóxico de los conjugados dendrímero-fármaco.

Capítulo 4. Reactivos y **Equipos**

Reactivos y disolventes

Reactivos

4-Clororesorcinol 98% (Aldrich)

4-(Dimetilamino)-piridina 99% (Aldrich)

Ácido metanosulfónico al 8% (Aldrich)

Bromoacetato de metilo 97% (Aldrich)

Carbonato de potasio 99%

Clorambucilo 99% (Aldrich)

Diciclohexilcarbodiimida 99% (Aldrich)

Etanolamina 98% (Aldrich)

Terftaldicarboxaldehído 99% (Aldrich)

Disolventes

Acetato de etilo

Acetona

Diclorometano

N,N-Dimetilformamida

Etanol

Éter dietílico

Hexano

Metanol

El acetato de etilo, acetona, diclorometano, metanol y hexano fueron purificados por medio de destilación simple empleando como agente desecante hidróxido de

potasio (acetato de etilo y hexano), cloruro de calcio (acetona y diclorometano) y óxido de calcio (metanol).

Equipos

▪ **Resonancia Magnética Nuclear**

Bruker Avance	300 MHz ¹ H y 75 MHz ¹³ C
Bruker Fourier	300 MHz ¹ H y 75 MHz ¹³ C
Jeol, Eclipse	300 MHz ¹ H y 75 MHz ¹³ C
Bruker Avance III	400 MHz ¹ H y 100 MHz ¹³ C
Referencia	¹ H Tetrametilsilano (Me ₄ Si, 0.00 ppm)
Disolventes	Cloroformo deuterado Dimetilsulfóxido deuterado Metanol deuterado

▪ **Espectrofotometría de UV-vis**

Espectrofotómetro UV-vis Shimadzu, U160

▪ **Espectrofotometría de FT-IR**

Espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27

▪ **Espectrofotometría de Masas**

Espectrómetro de masas Jeol, The AccuTOF JMS-T100LC, DART

Espectrómetro de masas, The MStation JMS-700, Electro-spray

Espectrómetro de masas Jeol, SX 102 A, FAB⁺

Espectrómetro de masas, Bruker MicroFlex, MALDI-TOF

▪ **Análisis elemental**

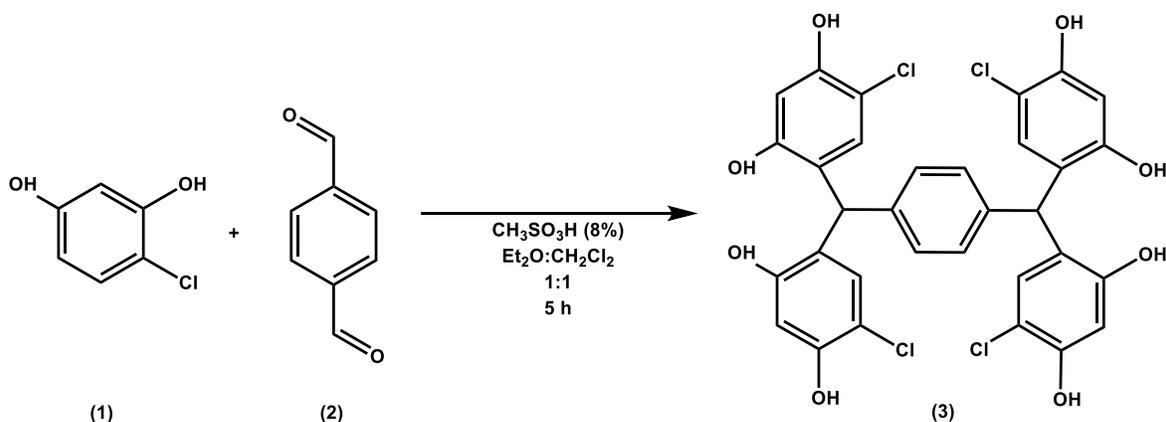
Thermo Scientific, modelo Flash 2000

Capítulo 5. Sección
experimental

Obtención de los conjugados dendrímero-fármaco de primera generación

Síntesis del dendrímero de primera generación

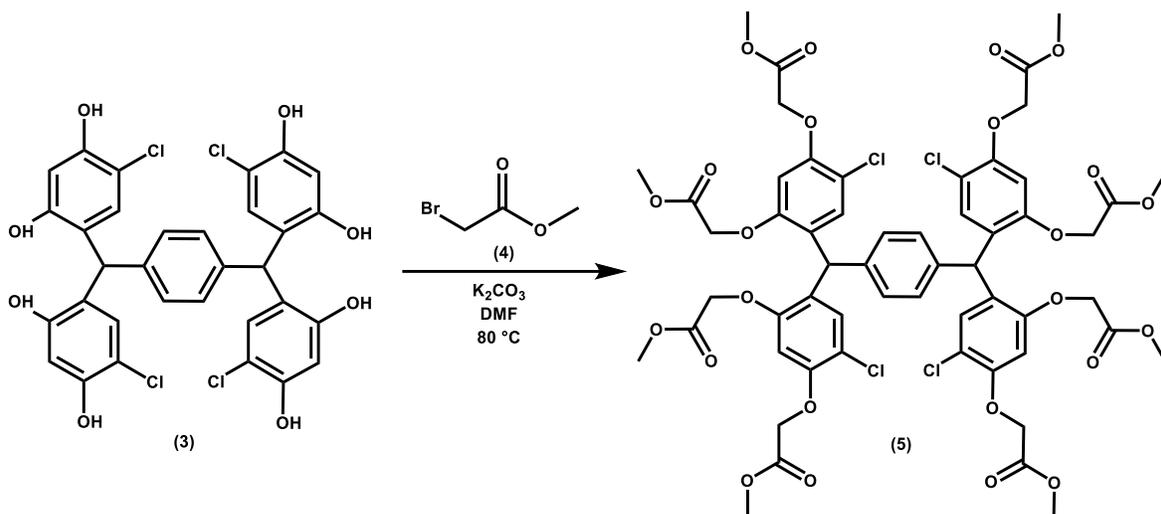
Síntesis del núcleo dendrítico



Esquema 1. Síntesis del núcleo dendrítico.

En un matraz de fondo redondo se colocaron 1.004 g (7.5 mmol) de tereftaldehído y 4.005 g (31.1 mmol) de 4-clororesorcinol en 30 mL de una mezcla de $\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2:\text{Et}_2\text{O}$, 1:1. Transcurridos 10 minutos, se adicionaron lentamente 2.5 mL de ácido metanosulfónico al 8%. La reacción se dejó en agitación durante 5 h a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo, se agregó 70 mL de éter dietílico y se observó la formación de un precipitado, el cual se dejó agitación durante 12 h. Una vez pasado el tiempo, se detuvo la agitación y se filtró al vacío, realizando lavados con agua (Esquema 1).

Síntesis del dendrímico de G 0.5

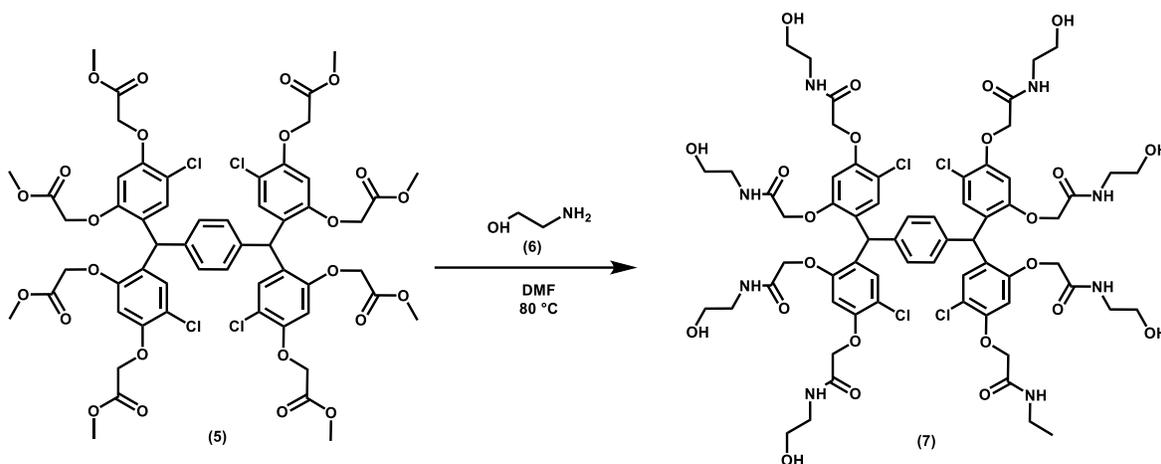


Esquema 2. Síntesis del dendrímico de G 0.5.

En un matraz de fondo redondo se disolvieron 1.063 g (0.157 mmol) del compuesto **3** en 25 mL de DFM. Posteriormente se adicionaron 5.2135 g (37.723 mmol) de K_2CO_3 y se dejó en agitación durante 30 minutos. A continuación, se agregó lentamente 2.7 mL (26.67 mmol) de bromoacetato de metilo, calentando a $60\text{ }^\circ\text{C}$, durante 6 horas. Transcurrido el tiempo, se aumentó la temperatura hasta $90\text{ }^\circ\text{C}$ y se dejó en agitación durante 12 h. Una vez pasadas las 12 h, se detuvo el calentamiento y agitación, permitiendo que la mezcla de reacción alcanzará una temperatura ambiente.

Se filtró la mezcla de reacción descartando el sólido obtenido, mientras que se evaporó el disolvente a presión reducida. Una vez evaporado, se agregó 50 mL de acetona obteniendo un precipitado, el cual fue separado por filtración al vacío y lavado con acetona y CH_2Cl_2 , obteniendo el compuesto **5** (Esquema 2).

Síntesis del dendrímico de G 1.0

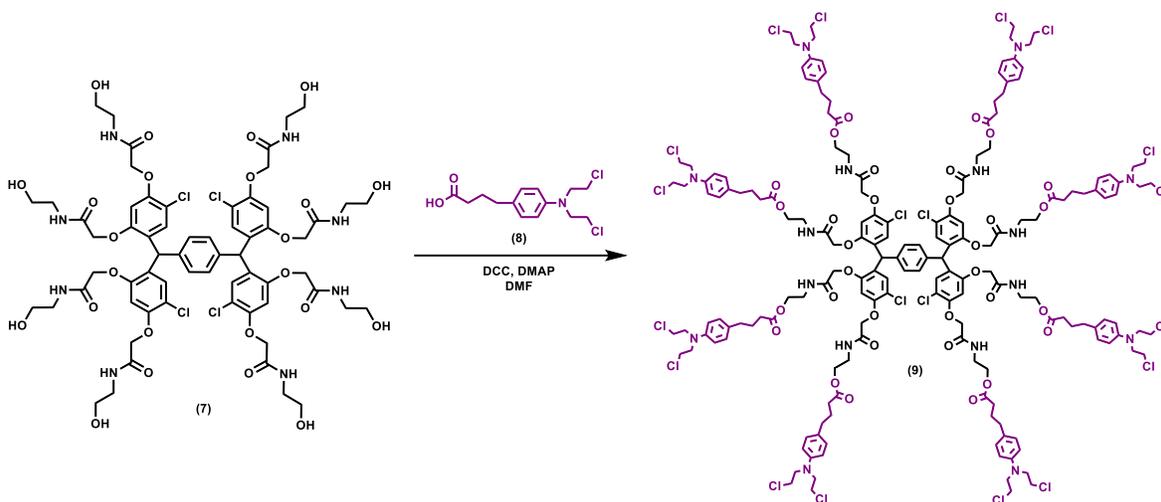


Esquema 3. Síntesis del dendrímico de G 1.0.

En un matraz de fondo redondo se adicionaron 0.975 g (0.778 mmol) del compuesto **5** en 25 mL de DMF. A continuación, se añadió 1.8 mL (31.09 mmol) de etanolamina. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 24 h a una temperatura de 90°C. Transcurrido el tiempo, se evaporó el disolvente a presión reducida y al líquido resultante se le agregaron 40 mL de agua y se dejó en agitación durante 4 h. El producto obtenido se aisló por filtración al vacío y se le realizaron varios lavados con agua para obtener el compuesto **7** (Esquema 3).

Síntesis de los conjugados dendrímero-fármacos de primera generación

Síntesis del conjugado dendrímero-clorambucilo de G 1.0

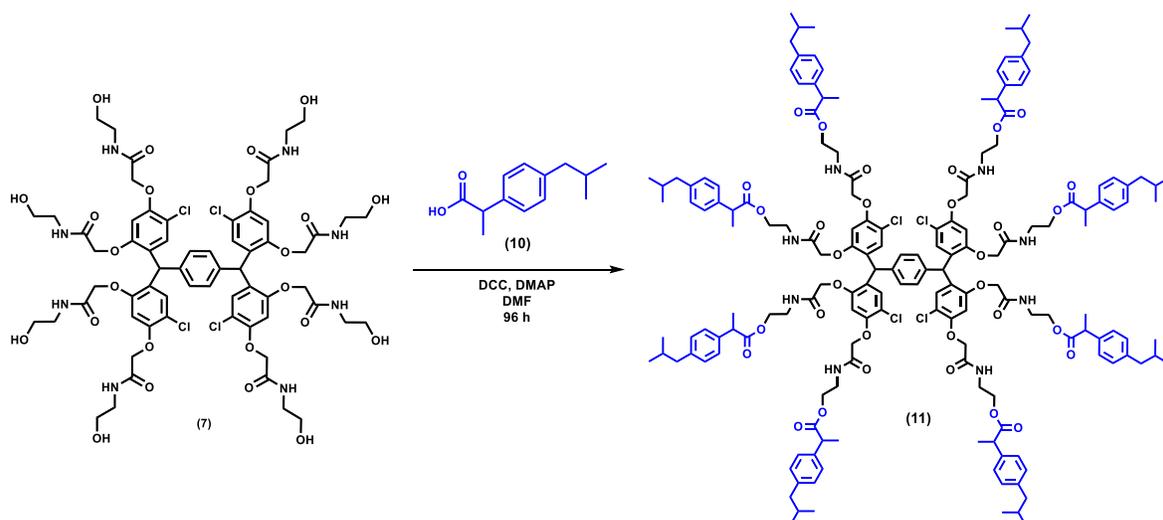


Esquema 4. Síntesis del conjugado resorcinareno-clorambucilo de G 1.0.

En un matraz de fondo redondo se disolvieron 0.413 g (1.367 mmol) de clorambucilo en 10 mL de DMF. Adicionalmente se agregó 0.286 g (1.386 mmol) de DCC y 0.035 g (0.286 mmol) de DMAP. Esta mezcla se dejó en agitación durante una hora en un baño de hielo. Transcurrido el tiempo, se añadió 0.098 g (0.066 mmol) del compuesto **7** y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 3 días. Al término de ese tiempo, se evaporó el disolvente a presión reducida y el sólido obtenido fue disuelto en CH_2Cl_2 , observándose un precipitado el cual fue separado por filtración, realizando por quintuplicado este procedimiento.

Posteriormente, el filtrado fue soportado en sílica para separarlo por columna cromatográfica, utilizando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo (50:50) y fue aumentando la polaridad de elusión hasta que el producto eluyó con acetato de etilo (Esquema **4**).

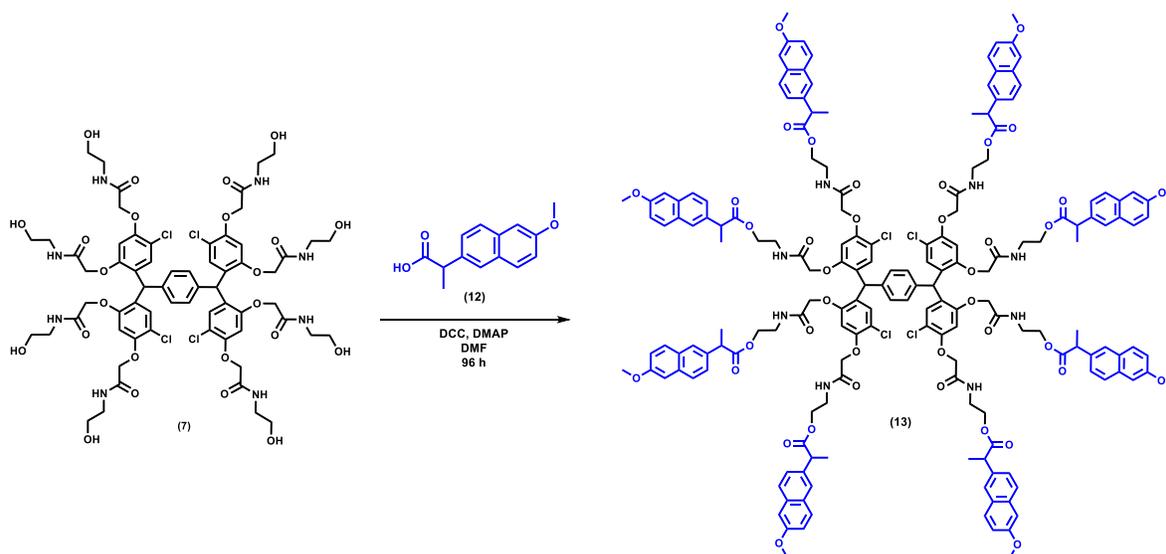
Síntesis del conjugado dendrímico-ibuprofeno de G 1.0



Esquema 5. Síntesis del conjugado dendrímico-ibuprofeno de G 1.0.

En un matraz de fondo redondo se disolvieron 0.277 g (1.343 mmol) de ibuprofeno en 10 mL de DMF. Adicionalmente se agregó 0.277 g (1.373 mmol) de DCC y 0.017 g (0.1392 mmol) de DMAP. La mezcla se dejó en agitación durante una hora en baño de hielo, y posteriormente se adicionó 0.100 g (0.0673 mmol) del compuesto **7** y se dejó en agitación durante 96 h. Una vez transcurrido dicho tiempo se evaporó el disolvente y se agregó MeOH, observando la formación de un precipitado, el cual se filtró al vacío y se realizaron lavados con metanol para eliminar el ibuprofeno sin reaccionar. De esa forma se obtuvo el compuesto **11** (Esquema 5).

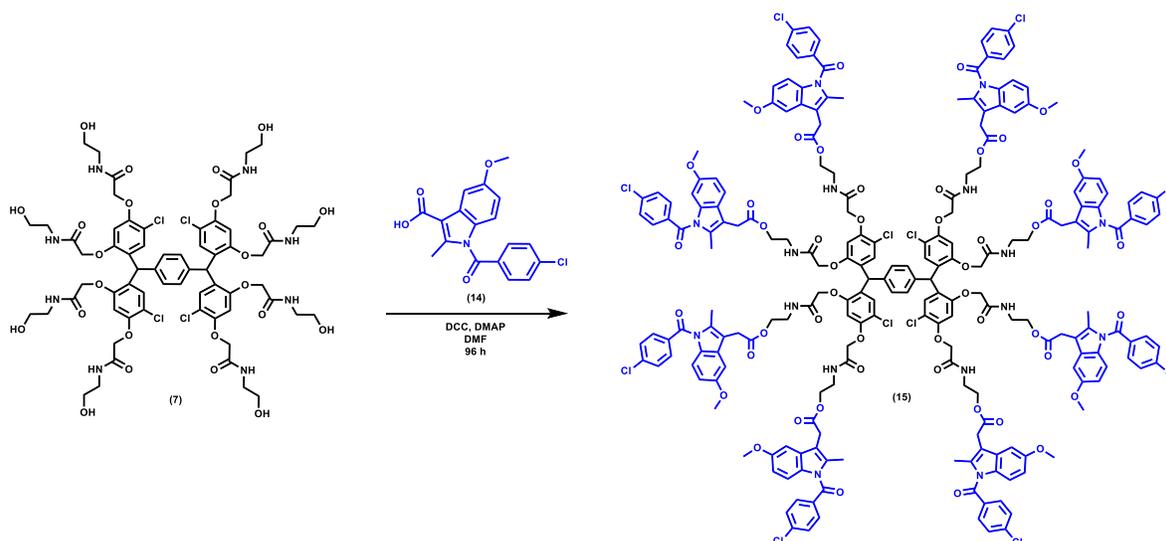
Síntesis del conjugado dendrímico naproxeno de G 1.0



Esquema 6. Síntesis del conjugado dendrímico-naproxeno de G 0.1.

En un matraz de fondo plano se disolvió 0.312 g (1.355 mmol) de naproxeno en 10 mL de DMF, además se agregó 0.282 g (1.367 mmol) de DCC y 0.034 g (0.278 mmol) de DMAP, dejando esta mezcla en agitación durante una hora en un baño de hielo. Al finalizar el tiempo, se adicionó 0.105 g (0.0677 mmol) del compuesto **7** y se dejó en agitación durante 96 h. Concluyendo este tiempo, se evaporó el disolvente y se agregó MeOH, observándose la presencia de un precipitado, el cual se lavó en repetidas con metanol para eliminar el naproxeno sin reaccionar, obteniendo el compuesto **13** (Esquema 6).

Síntesis del conjugado dendrímero-indometacina de G 1.0



Esquema 7. Síntesis del conjugado dendrímero-indometacina de G 1.0.

En un matraz de fondo plano se disolvió 0.049 g (1.369 mmol) de indometacina en 10 mL de DMF. Posteriormente se agregó 0.284 g (1.376 mmol) de DCC y 0.035 g (0.2864 mmol) de DMAP. La mezcla se dejó en agitación durante una hora en baño de hielo y finalizado el tiempo, se adicionó 0.106 g (0.0714 mmol) del compuesto **7** y se mantuvo en agitación durante 96 h. Finalizado el tiempo de agitación, se evaporó el disolvente, y se agregó MeOH, observándose la presencia de un precipitado, el cual se filtró al vacío y se realizaron lavados con metanol para eliminar la indometacina sin reaccionar, obteniendo el compuesto **15** (Esquema 7).

Pruebas de actividad biológica

Ensayo de citotoxicidad Sulforrodamina (SRB)

El ensayo de la sulforrodamina B (SRB) fue desarrollado en 1990, y es uno de los métodos ampliamente usados en la determinación y selección de compuestos con altos niveles de citotoxicidad *in vitro*³⁸³⁹. El ensayo se basa en la habilidad de unión de la SRB a componentes proteínicos de la célula que han sido fijados a las

³⁸ Skehan, P.; J. (1990). *Natl. Cancer Inst.* 82, 1107.

³⁹ Vichai, V.; Kirtikara, K. (2006). *Nature protocols*, 1, 1112.

placas de la cultura tisular por ácido tricloroacético. La SRB es un colorante rosa brillante, el cual es un aminoxantano con dos grupos sulfónicos que se unen a residuos de aminoácidos con carácter básico en condiciones ligeramente ácidas, que se disocian bajo condiciones básicas. Como la unión de SRB es estequiométrica a la cantidad de colorante extraído de las células teñidas, es directamente proporcional a la masa celular. Este ensayo ha sido ampliamente usado en pruebas de toxicidad de fármacos con líneas celulares cancerosas y no cancerosas⁴⁰.

En el presente trabajo se realizó el estudio *in vitro* en seis líneas celulares de cáncer humano: K-562 (leucemia mieloide crónica humana), SKLU-1 (adenocarcinoma pulmonar humano), HCT-15 (adenocarcinoma colorrectal humano), PC-3 (cáncer de próstata humano), MCF-7 (cáncer mama), U-251 (glía de sistema nervioso central, SNC) y COS-7 (células de riñón de mono (no cancerosa)).

Metodología para el ensayo de Sulforrodamina (SRB)

De un cultivo celular, las células fueron tomadas y diluidas en un medio fresco, formando una suspensión en 100 μ L que contienen entre 5000 y 10000 células por pozo, los cuales fueron colocados en los 96 pozos de las microplacas (Costar). El material fue incubado a 37°C por 24 h en una atmosfera de CO₂ al 5%. Subsecuentemente, 100 μ L de una disolución de los compuestos a probar, obtenidos por diluciones stock fueron adicionados en cada pozo. Los cultivos celulares fueron expuestos por 48 h a los compuestos, en un intervalo de concentración de 25 μ M.

Después del período de incubación, las células fueron fijadas a un sustrato plástico, mediante la adición de 50 μ L de ácido tricloroacético frío. Las placas fueron incubadas a 4°C por una hora, lavadas con agua, y secadas al aire. Las células fijadas con ácido triacético fueron teñidas por adición de SRB al 0.4%. El exceso de SRB fue removido con lavados de una disolución acuosa de ácido acético al 5%,

⁴⁰ Monks, A. J. (1991). *Natl. Cancer Inst.* 83, 757.

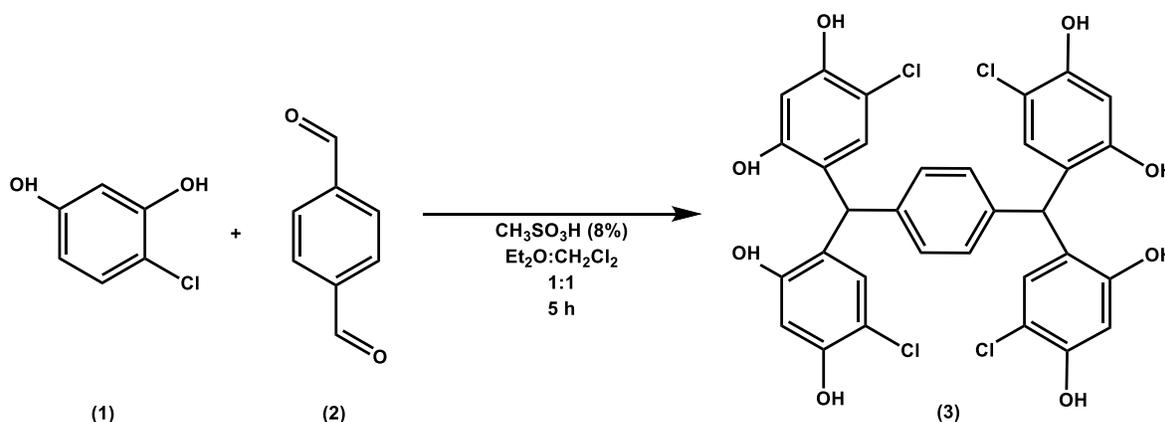
secadas al aire, y el colorante fijado fue solubilizado por adición de Tris base (100 μ L) 10 mM. Las placas fueron colocadas en agitación durante 5 minutos y la absorción fue determinada a 515 nm, usando el lector para placas de ELISA.

Capítulo 6. Resultados y análisis

Síntesis del dendrímero de primera generación

El interés por la síntesis de dendrímeros ha crecido a lo largo del tiempo ya que presentan una gran versatilidad al ser modificados tanto en el núcleo como los brazos dendríticos y grupos terminales. Esta capacidad de ser modificados en cada uno de los componentes ha hecho que puedan tener aplicaciones en distintas ramas de la ciencia. Una de sus principales características de estos es la baja polidispersidad y la síntesis controlada, ya que se lleva a cabo de manera iterativa paso a paso. En el presente proyecto de investigación, se realizó la síntesis de dendrímeros empleando un núcleo dendrítico de resorcinareno abierto, abriendo la puerta a una nueva familia de dendrímeros.

Síntesis del núcleo dendrítico



Esquema 1. Síntesis del resorcinareno abierto.

Se inició la síntesis del resorcinareno abierto **3**, como núcleo dendrítico partiendo del 4-clororesorcinol **1** con tereftaldehído **2** en condiciones ácidas durante 5 h (Esquema 1). Una vez que se purificó el compuesto, se obtuvieron los siguientes resultados.

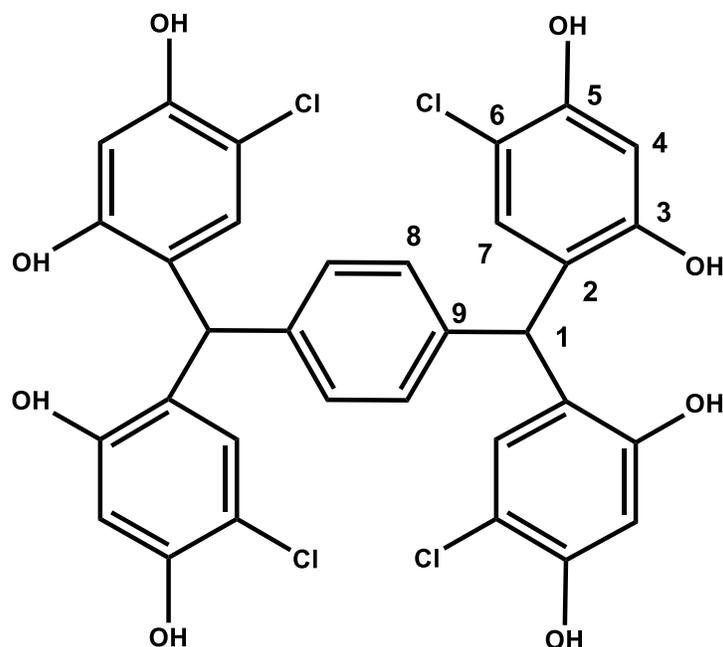


Figura 21. Compuesto 3. Resorcinareno abierto.

Aspecto físico: Sólido amarillo.

Rendimiento: 3.477 g (5.141 mmol). 69%.

UV-Vis (MeOH, nm): 290.0, 213.0.

FTIR (KBr, cm^{-1}): 3626, 3497, 3423, 3183, 1736, 1610, 1505, 1426, 1353, 1323, 1291, 1266, 1243, 1191, 1171, 1121, 1068, 1026, 890, 868, 840, 805, 784, 741, 714, 658, 635, 603, 566, 492, 466.

RMN ^1H (300 MHz, MeOD) δ (ppm): 5.62 (s, 2H, CH, **1**), 6.22 (s, 4H, Ar, **4**), 6.30 (s, 4H, Ar, **7**), 6.70 (s, 4H, Ar, **8**).

RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD) δ (ppm): 43.4 (CH, **1**), 104.8 (Ar, **4**), 114.5 (Ar-Cl, **6**), 125.2 (Ar_{ipso}, **2**), 129.9 (Ar, **8**), 131.5 (Ar, **7**), 142.6 (Ar_{ipso}, **9**), 152.8 (Ar-O, **3**), 155.6 (Ar-O, **5**).

EM IE (m/z): 636.

Análisis Elemental Calculado: para $\text{C}_{32}\text{H}_{22}\text{Cl}_4\text{O}_8$: C. 56.83, H. 3.28%.

Encontrado: C. 51.27, H. 3.51%.

Inicialmente, el compuesto **3** se caracterizó por RMN ^1H . En la figura **22**, se puede observar, un singlete a 5.62 ppm, correspondiente al protón del metino puente **1**; a 6.21 ppm y 6.29 ppm dos singletes asignados a los protones de los anillos aromáticos correspondientes a las unidades del 4-clororesorcinol **4**, **7**, mientras que a 6.69 ppm un singlete de los protones del anillo aromático central **8**.

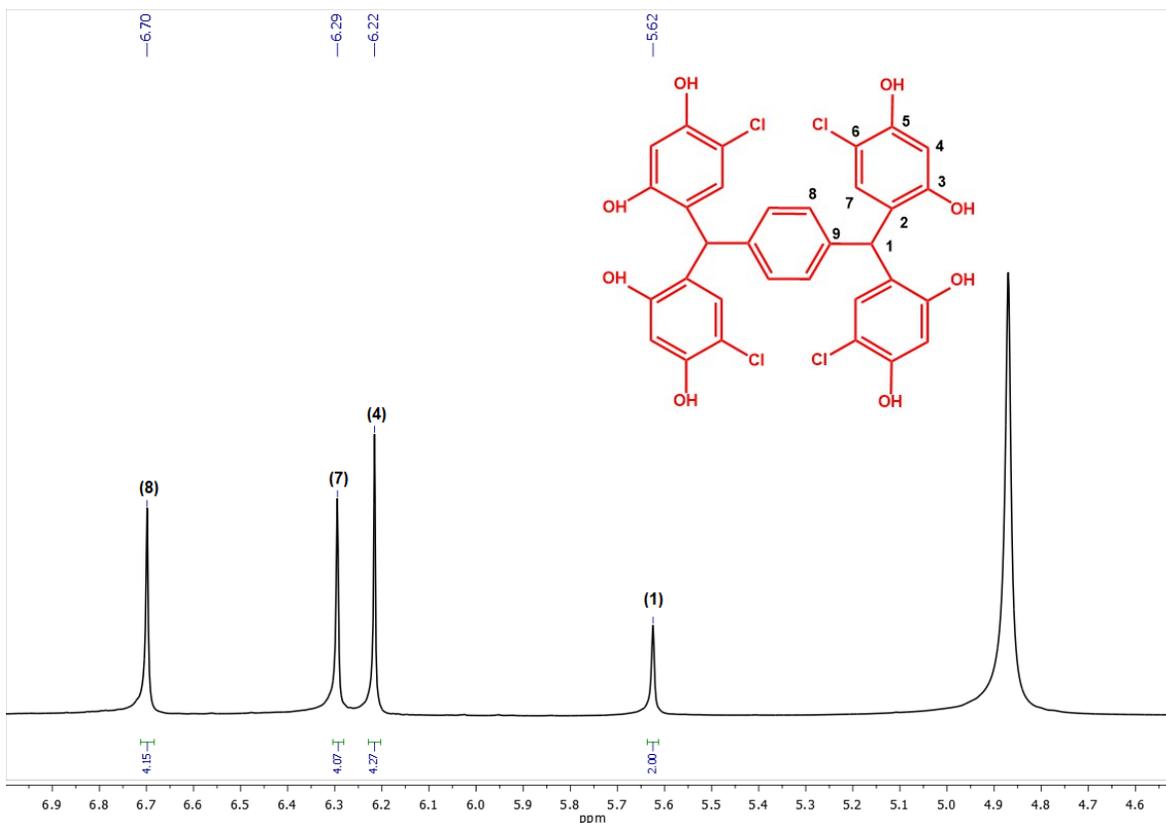


Figura 22. Espectro de RMN ^1H del resorcinareno abierto **3** (300 MHz, CCl_3D , 25°C).

La obtención del resorcinareno abierto **3** se confirmó por espectrometría de masas de impacto electrónico (IE). En el espectro, figura **23**, se observa un pico a 636 m/z correspondiente al ion molecular del compuesto **3**.

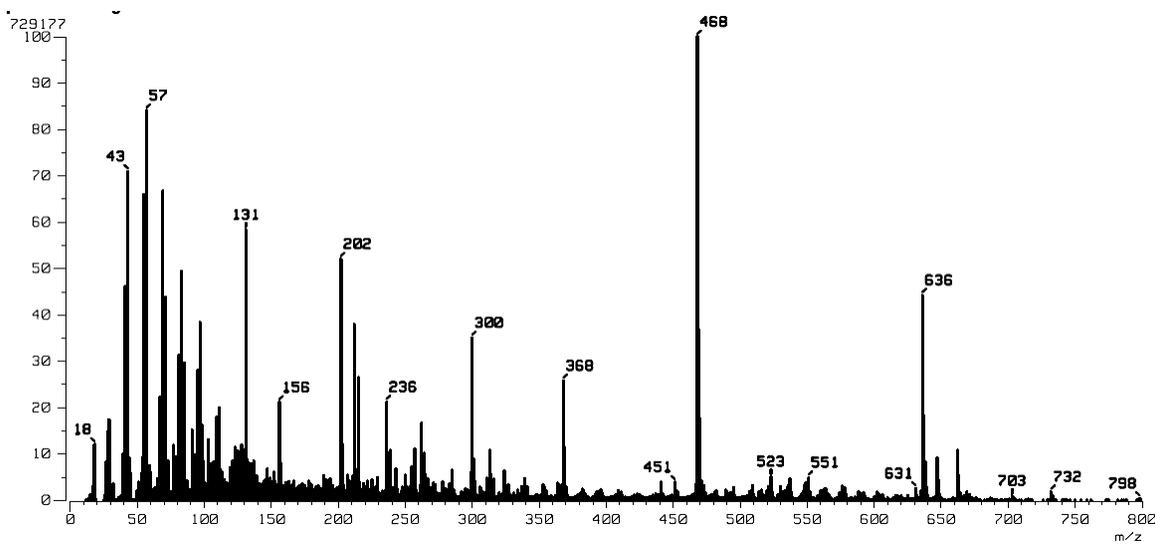


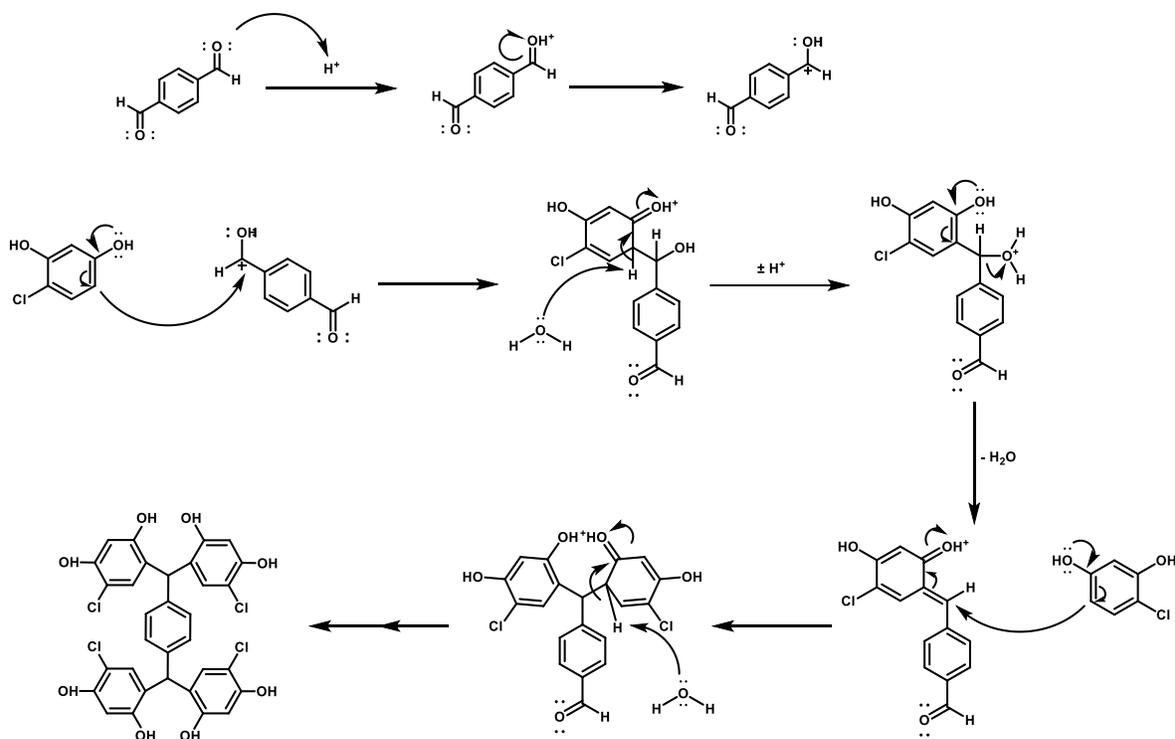
Figura 23. Espectro de masas IE del resorcinareno abierto **3**.

Para comprender la formación del compuesto **3**, se propone el siguiente mecanismo de reacción:

Mecanismo de reacción

La reacción inicia con la protonación del aldehído en el medio ácido (Esquema **2**), aumentando el carácter electrofílico del mismo, posteriormente se lleva a cabo una sustitución electrofílica aromática entre el 4-clororesorcinol y el aldehído protonado.

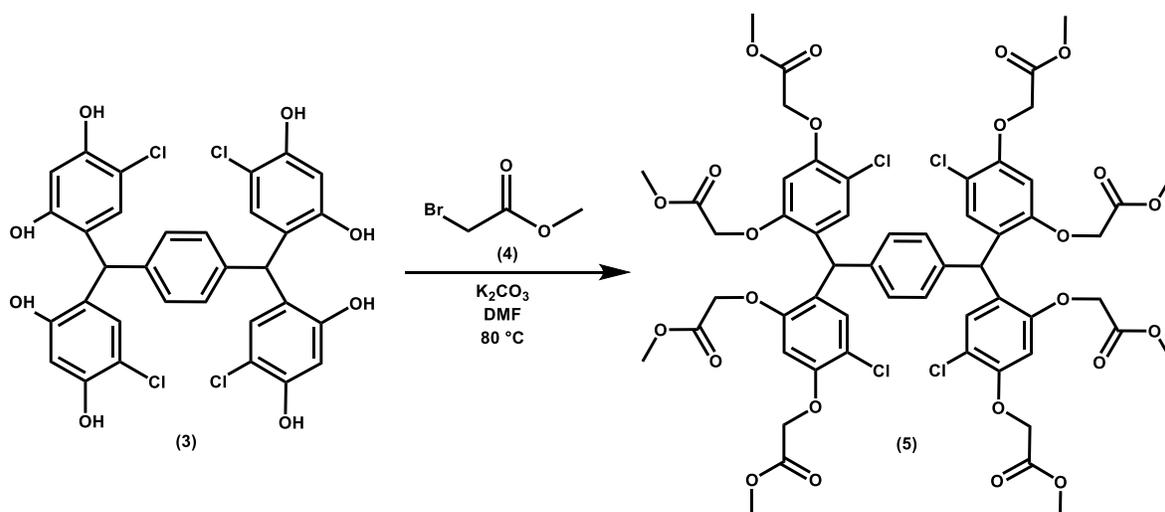
Como ya se mencionó, el aldehído protonado sufre un ataque por parte del carbono nucleofílico en posición *orto* al grupo OH, posteriormente el alcohol que se forma, se protona y se pierde una molécula de agua, generando un doble enlace, el cual realiza una adición electrofílica a la segunda unidad de 4-clororesorcinol. Finalmente, la base abstrae el protón, regenerando la aromaticidad en el sistema. La descripción del mecanismo se lleva a cabo en los dos sitios reactivos del tereftaldehído.



Esquema 2. Mecanismo de reacción para la formación de resorcinareno abierto.

Una vez que se obtuvo el núcleo dendrítico y se caracterizó, se procedió con la funcionalización para obtener el dendrímero de G 0.5.

Síntesis del dendrímero de G 0.5



Esquema 3. Síntesis del dendrímero de G 0.5.

Para la obtención del dendrímero G 0.5, se llevó a cabo una reacción de Williamson (Esquema 3), entre el bromoacetato de metilo **4** y el resorcinareno abierto en medio básico, favoreciendo la desprotonación del este último. Esta reacción permitió la activación de la molécula para la siguiente etapa de la síntesis. Con el compuesto puro, se obtuvieron los siguientes resultados.

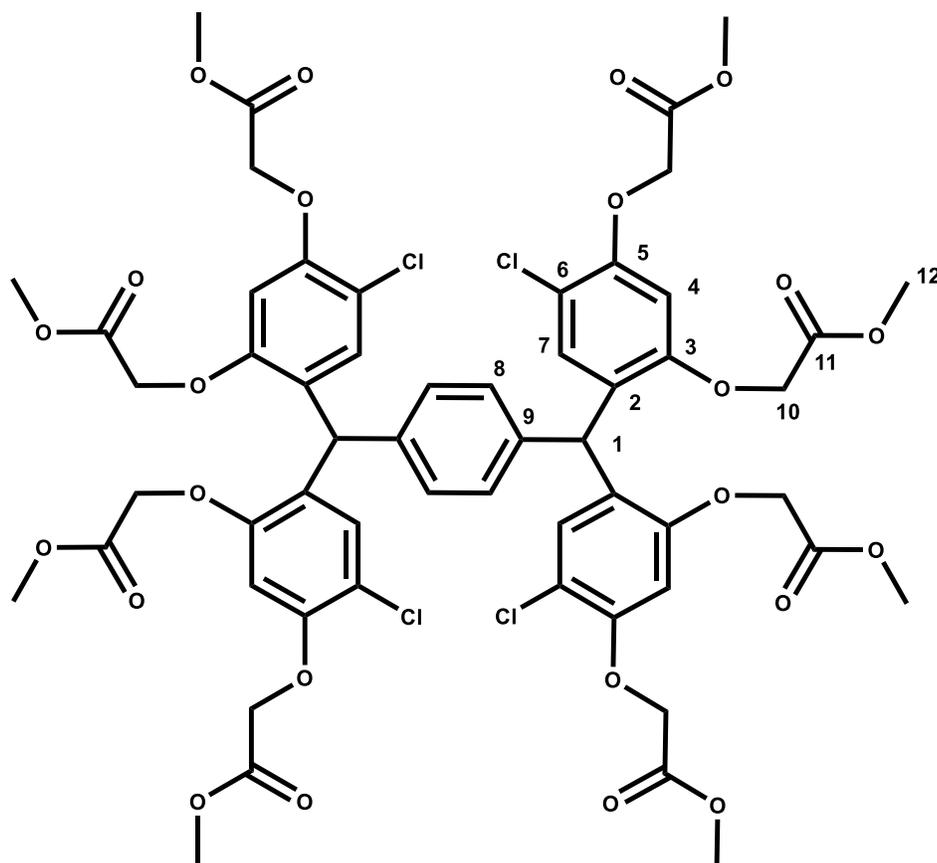


Figura 24. Compuesto **5**. Dendrímero de G 0.5.

Aspecto físico: Sólido blanco.

Rendimiento: 1.400 g (1.117 mmol). 71%.

UV-vis (DMSO, nm): 288.0.

FTIR (KBr, cm^{-1}): 2955, 2852, 1744, 1603, 1580, 1499, 1440, 1400, 1356, 1298, 1255, 1219, 1185, 1145, 1092, 1072, 1003, 895, 850, 815, 730, 681, 589, 459, 416.

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 3.61 (s, 12H, OCH₃, **12**), 3.70 (s, 12H, OCH₃, **12**), 4.70 (s, 8H, CH₂, **10**), 4.93 (s, 12H, CH₂, **10**), 5.99 (s, 2H, CH, **1**), 6.67 (s, 4H, Ar, **4**), 6.69 (s, 4H, Ar, **7**), 6.94 (s, 4H, Ar, **8**).

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 41.7 (CH, **1**), 51.7 (OCH₃, **12**), 51.8 (OCH₃, **12**), 65.3 (OCH₂, **10**), 65.7 (OCH₂, **10**), 100.3 (Ar, **4**), 112.7 (Ar-Cl, **6**), 125.7 (Ar_{ipso}, **2**), 128.6 (Ar, **8**), 130.0 (Ar, **7**), 140.2 (Ar_{ipso}, **9**), 152.2 (Ar-O, **3**), 154.6 (Ar-O, **5**), 168.7 (C=O), **11**).

EM MALDI-TOF (m/z): 1276.6 [M+Na].

Análisis Elemental Calculado: para C₅₆H₅₄Cl₄O₂₄: C. 53.69, H. 4.34%.

Encontrado: C. 53.11, H. 4.46%.

El compuesto **5**, se caracterizó por RMN ¹H. En la figura **25**, se pueden observar dos singuletes a 3.61 y 3.70 ppm asignados a los hidrógenos del grupo O-CH₃, **12**. A 4.70 y a 4.93 ppm dos singuletes de los hidrógenos del metileno **10** alfa al carbonilo. A 5.99 ppm un singulete debido a los hidrógenos de los metinos puente **1**. Finalmente, a 6.67, 6.69 y a 6.94 ppm se observan tres singuletes asignados a los hidrógenos de los anillos aromáticos.

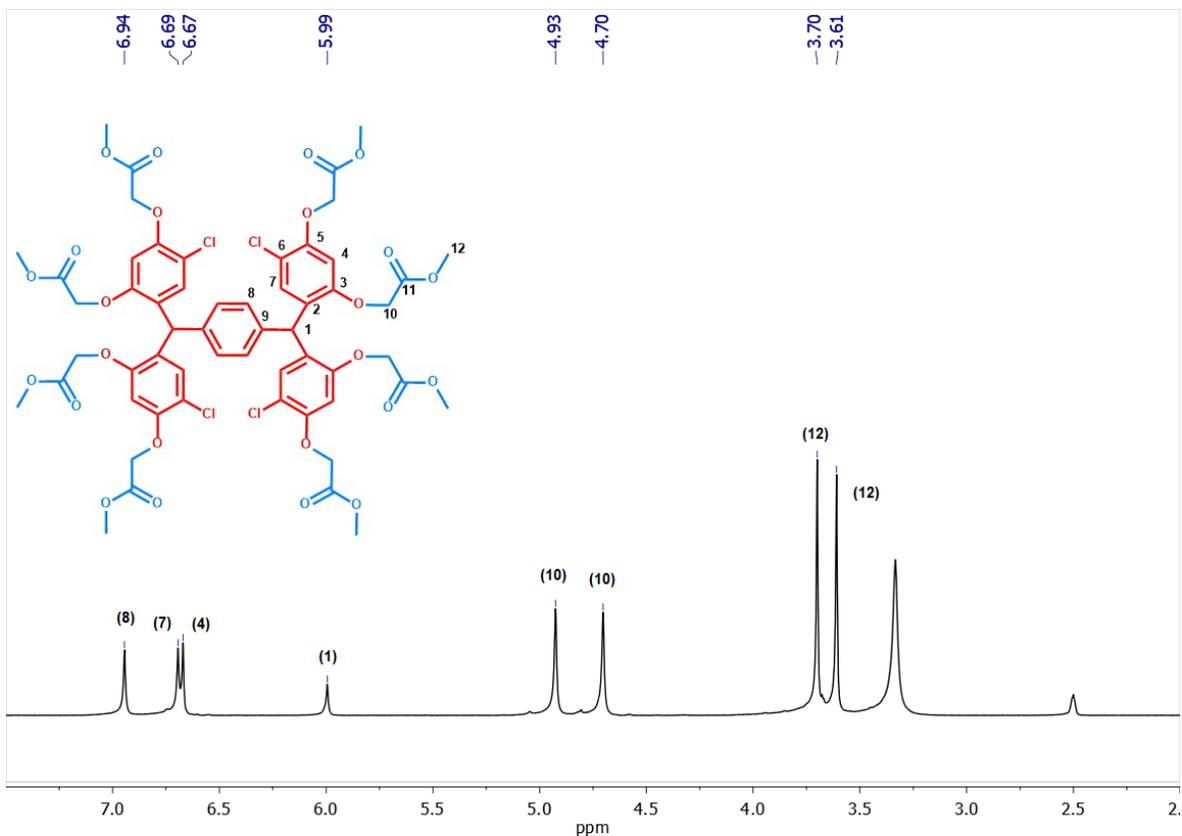


Figura 25. Espectro de RMN ^1H del compuesto **5**. (300 MHz, DMSO- d_6 , 25°C).

Para confirmar la obtención del compuesto **5**, se caracterizó por espectroscopía de infrarrojo (FITIR), figura **26**, donde se observan a 1744 cm^{-1} una banda característica de la vibración del carbonilo correspondiente al grupo éster y otra banda a 1580 cm^{-1} debida a las vibraciones de los grupos CH_3 .

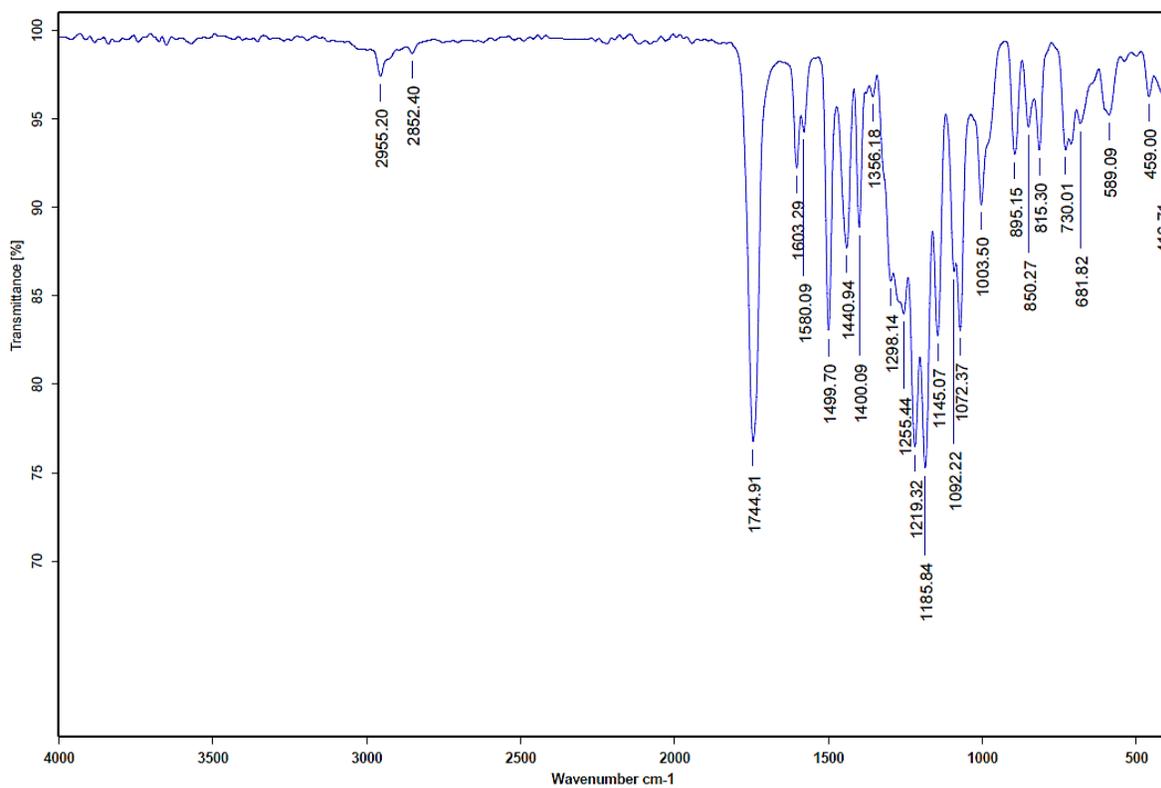


Figura 26. Espectro FTIR del compuesto **5**.

Adicionalmente, el compuesto **5**, se caracterizó por espectrometría de masas mediante la técnica MALDI-TOF. En la figura **27**, se observa un pico a 1276 m/z correspondiente al ion molecular $[M+Na]$ del compuesto **5**, confirmando de esta manera la obtención del dendrímero G 0.5.

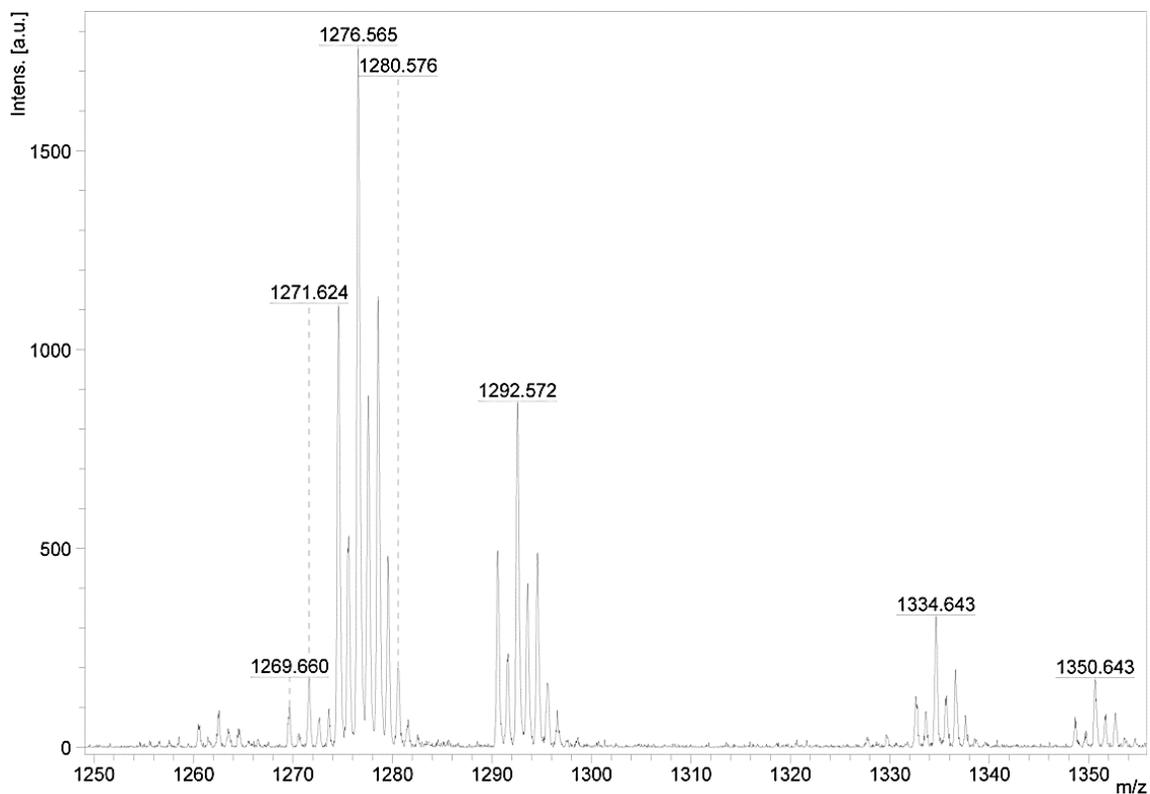
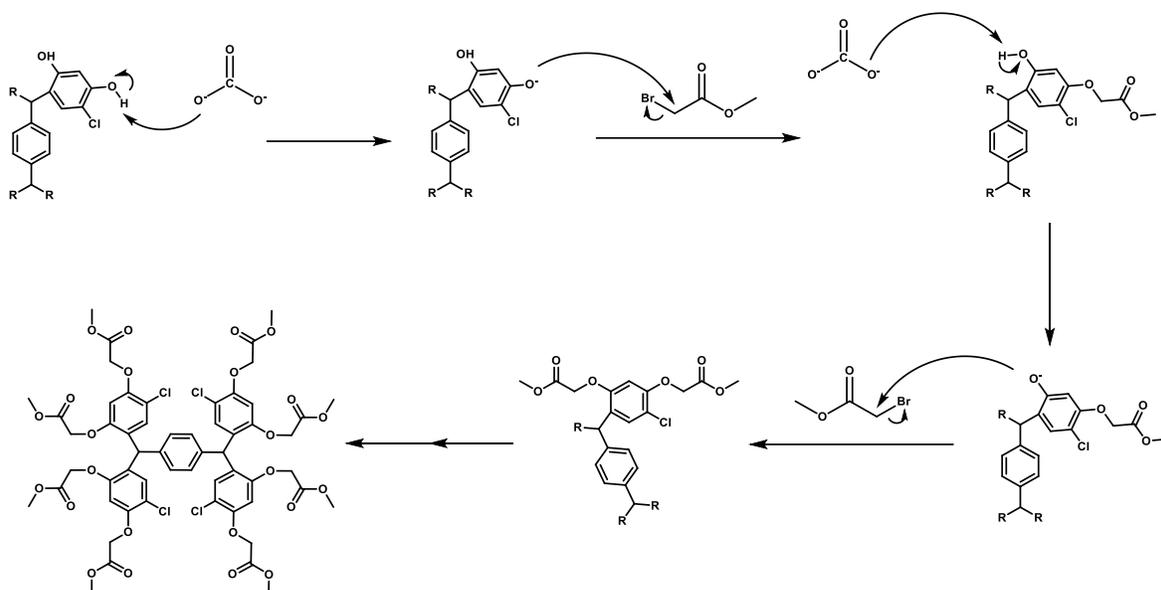


Figura 27. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **5**.

El dendrímero de G 0.5 se obtuvo a través de una reacción de Williamson, la cual se explica mediante el siguiente mecanismo.

Mecanismo de reacción

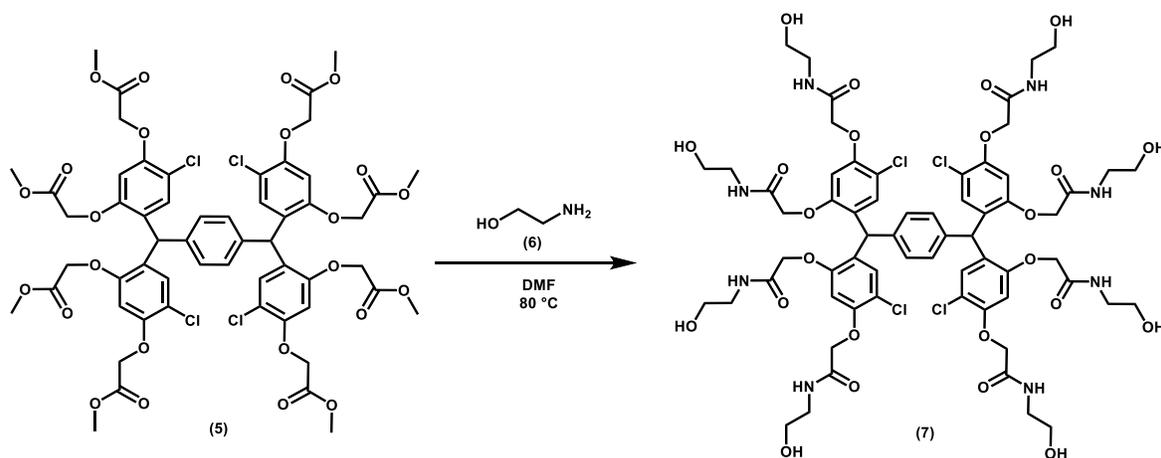
El primer paso de la reacción es una reacción ácido-base entre el carbonato de potasio y el grupo hidroxilo del resorcinareno, formando el ion fenóxido, el cual actúa como nucleófilo. Posteriormente, se lleva a cabo una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2). Los iones fenóxido desplazan al bromo del halogenuro de alquilo, para dar el dendrímero de G 0.5 y KBr (Esquema **4**).



Esquema 4. Mecanismo de reacción para la formación del dendrímico de G 0.5.

Obtenido y caracterizado el dendrímico de G 0.5, se procedió a la síntesis del dendrímico de primera generación G 1.0 mediante una aminólisis.

Síntesis del dendrímico de G 1.0



Esquema 5. Síntesis del dendrímico de G 1.0 a través de una aminólisis.

Una vez que se obtuvo el dendrímico de G 0.5, se procedió con la reacción de acoplamiento entre el compuesto 5 y etanolamina 6, a través de una reacción de aminólisis, obteniendo el compuesto 7 (Esquema 5).

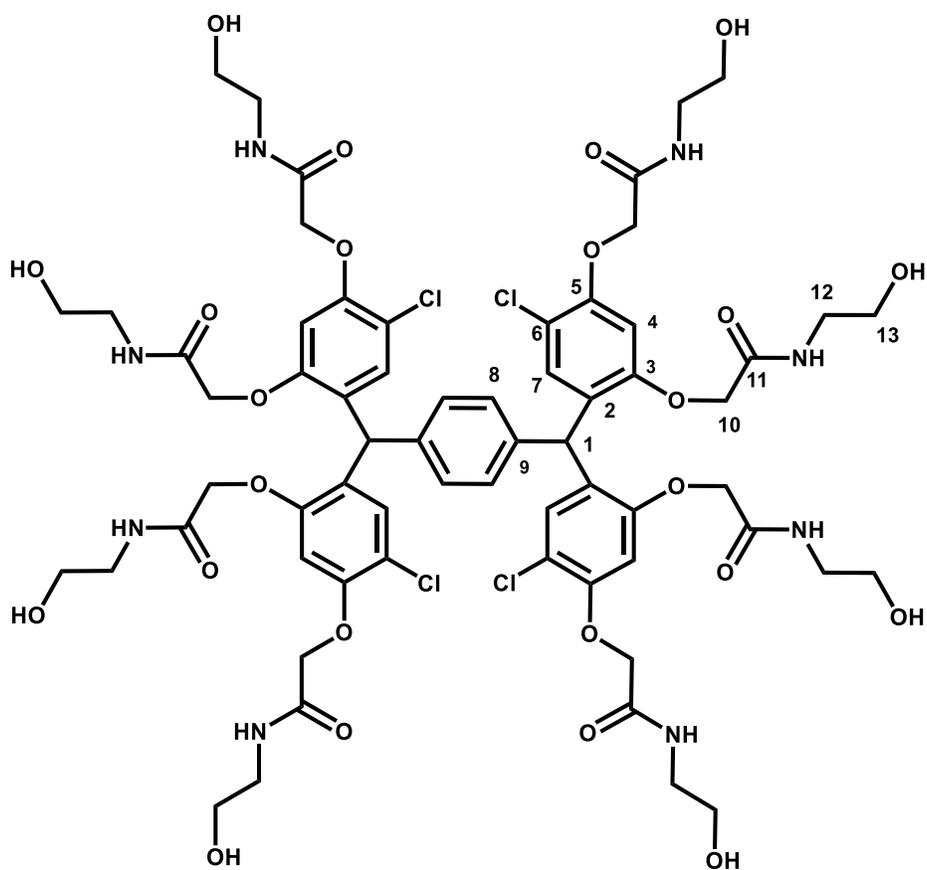


Figura 28. Compuesto 7. Dendrímero de G 1.0.

Aspecto físico: Sólido blanco.

Rendimiento: 0.714 g (0.481 mmol). 62%.

UV-vis (DMSO, nm): 291.0

FTIR (KBr, cm^{-1}): 3400, 2937, 2882, 1742, 1658, 1604, 1580, 1540, 1493, 1434, 1394, 1323, 1287, 1246, 1191, 1137, 1051, 901, 829, 731, 701, 643, 566, 459.

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 3.11 (s, 8H, CH_2NH , **12**), 3.24 (s, 8H, CH_2NH , **12**), 3.44 (s, 16H, CH_2OH , **13**), 4.44 (s, 8H, CH_2O , **10**), 4.61 (s, 8H, CH_2O , **10**), 6.09 (s, 2H, CH, **1**), 6.61 (s, 4H, Ar, **4**), 6.79 (s, 4H, Ar, **7**), 7.07 (s, 4H, Ar, **8**), 7.26 (s, 4H, NH, **12**), 7.81 (s, 4H, NH, **12**).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 41.0 (CH_2NH , **12**), 41.1 (CH_2NH , **12**), 41.9 (CH, **1**), 59.5 (CH_2OH , **13**), 59.6 (CH_2OH , **13**), 67.8 (OCH_2 , **10**), 67.9 (OCH_2 , **10**),

101.0 (Ar, **4**), 113.1 (Ar-Cl, **6**), 125.5 (Ar_{ipso}, **2**), 128.9 (Ar, **8**), 129.6 (Ar, **7**), 140.3 (Ar_{ipso}, **9**), 152.5 (Ar-O, **3**), 154.4 (Ar-O, **5**), 167.0 (C=O, **11**).

EM MALDI-TOF (m/z): 1487.007 [M+2].

Análisis Elemental Calculado para C₆₄H₇₈Cl₄N₈O₂₄: C. 51.76, H. 5.29, N. 7.55%.

Encontrado: C. 49.62, H. 5.36, N. 6.99%.

El compuesto **7**, fue caracterizado por RMN ¹H. En la figura **29**, se observa a 3.09 y a 3.24 ppm dos cuádrupletes correspondientes a los hidrógenos del metileno unido al grupo amida (CH₂-NH) **12**, con una constante de acoplamiento $J = 5.0$ Hz. A 3.43 ppm hay un cuádruplete que corresponde a los hidrógenos del metileno unido al OH (CH₂-OH) **13**, con una constante de acoplamiento $J = 4.7$ Hz. Posteriormente a 4.39 y a 4.61 ppm se observan dos singuletes que corresponden a los hidrógenos del metileno (O-CH₂-) **10** alfa al carbonilo. El singulete que se observa a 6.08 ppm corresponde al protón del metino **1** puente, mientras que las tres señales en 6.60, 6.79 y 7.02 ppm corresponden a los protones de los anillos aromáticos del resorcinareno abierto. Finalmente, a 7.26 y 7.81 ppm se observan dos triplete correspondientes a los hidrógenos unidos al nitrógeno perteneciente del grupo amida, con una constante de acoplamiento $J = 5.7$ Hz.

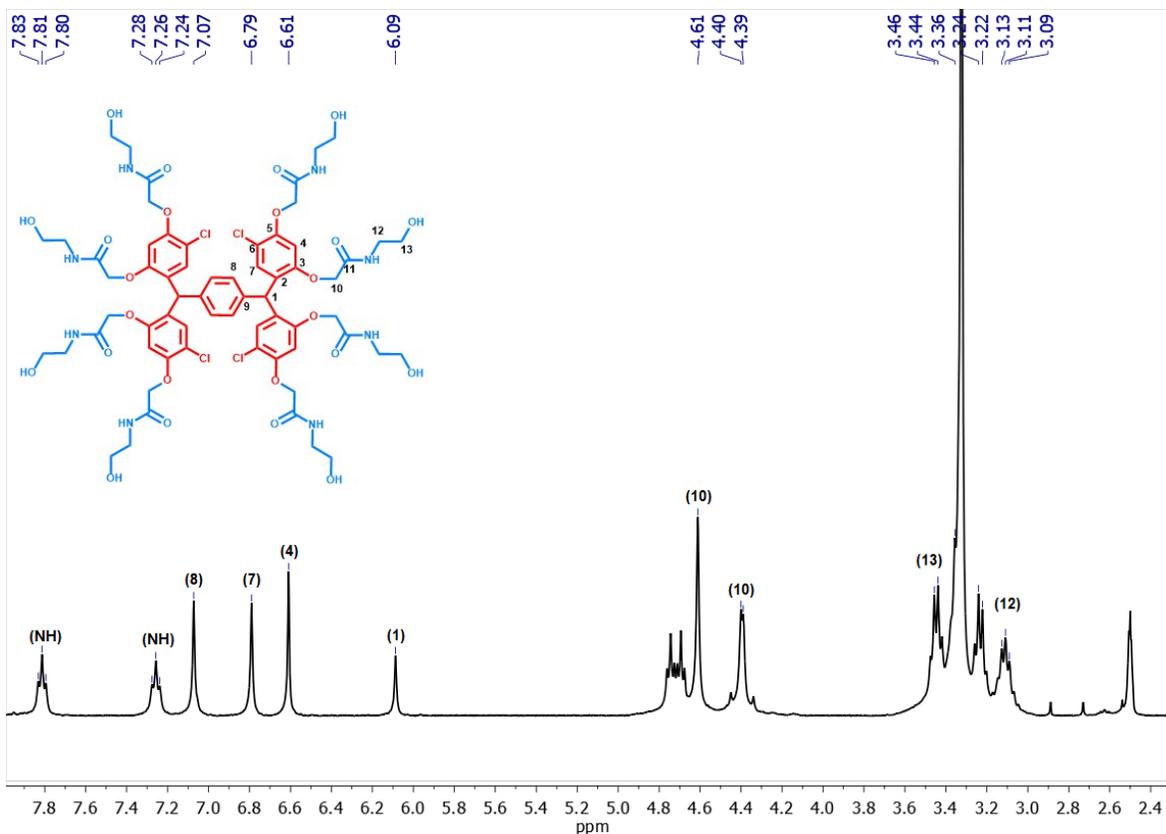


Figura 29. Espectro de RMN ^1H del compuesto **7** (300 MHz, DMSO- d_6 , 25°C).

El compuesto **7** se caracterizó por RMN ^{13}C . En la figura **30**, se observa a 41.0 y 41.1 ppm, dos señales correspondientes a los carbonos ($\text{CH}_2\text{-N}$) **12** unidos al nitrógeno. A 41.9 ppm una señal asignada al grupo CH **1** del metino puente. Posteriormente, se observan dos señales a 59.5 y 59.6 que corresponden a los carbonos de los metilenos ($\text{CH}_2\text{-OH}$) **13** de la etanolamina, y en seguida se observan dos señales a 67.8 y 68.0 de los carbonos ($\text{O-CH}_2\text{-}$) **10** alfa al carbonilo. En la zona aromática, se observa una señal a 101.0 ppm correspondiente al carbono **4** *orto* al grupo éter. En seguida, se observa la señal a 113.1 ppm que corresponde al carbono **6** unido al átomo de cloro. Las señales a 129.0 y 129.6 ppm corresponden al carbono unido al hidrógeno, **7** y **8**, respectivamente. En el caso de las señales a 125.5 y 140.3 ppm, corresponden a los carbonos *ipso* unidos al metino, **2** y **9**. Finalmente, las señales que aparecen en 152.5 y 154.4 ppm son de los carbonos unidos al oxígeno, **5** y **3**, mientras que la señal a 167.0 ppm corresponde al carbonilo del grupo amida **11**.

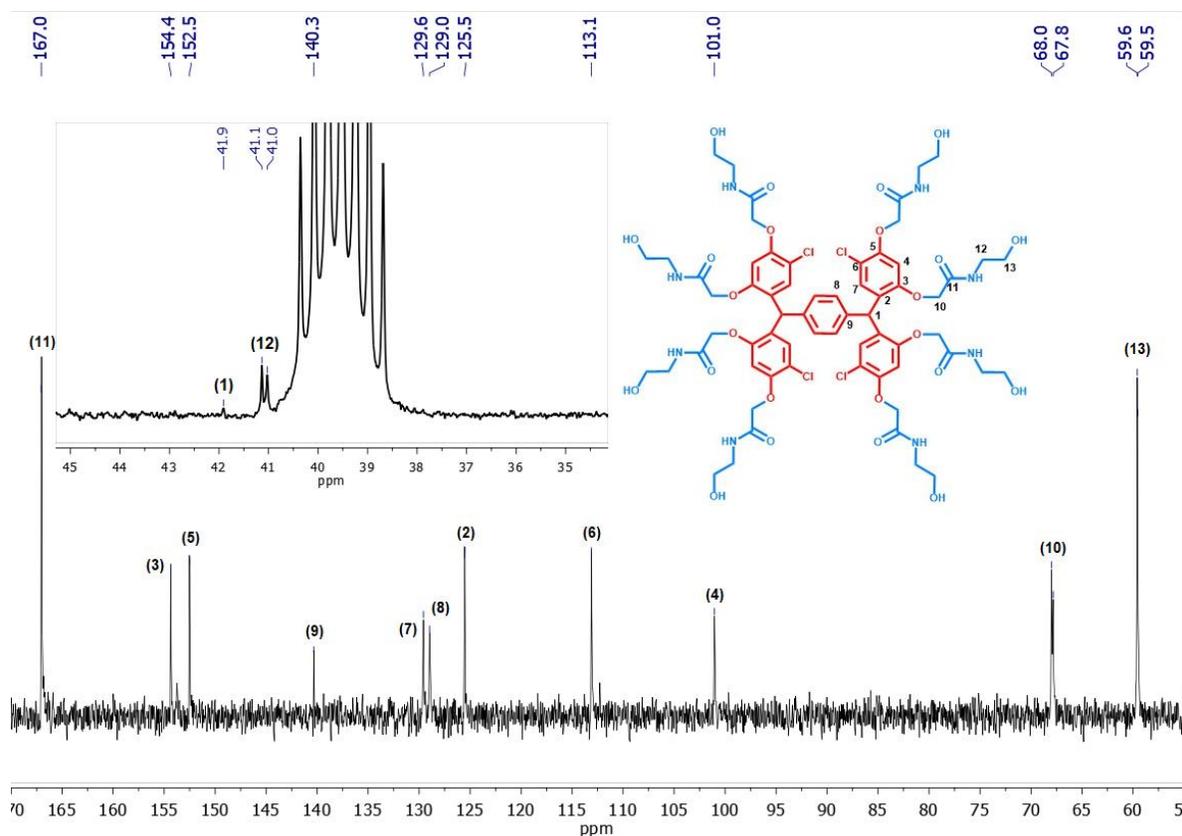


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **7** (75 MHz, DMSO- d_6 , 25°C).

Para asignar las señales correspondientes al carbono del metino puente, así como los carbonos correspondientes a los metilenos unidos al nitrógeno, se realizó un experimento de DEPT 135. En la figura **31**, se observan dos señales en 41.0 y 41.1 ppm, correspondientes a los carbonos **12** unidos al nitrógeno, posteriormente se observa la señal a 41.9 ppm, que corresponde al carbono **1** del metino puente, mientras que más adelante, también se observan tres señales que corresponden a los carbonos de los anillos aromáticos en 101.0, 128.9 y 129.5 ppm.

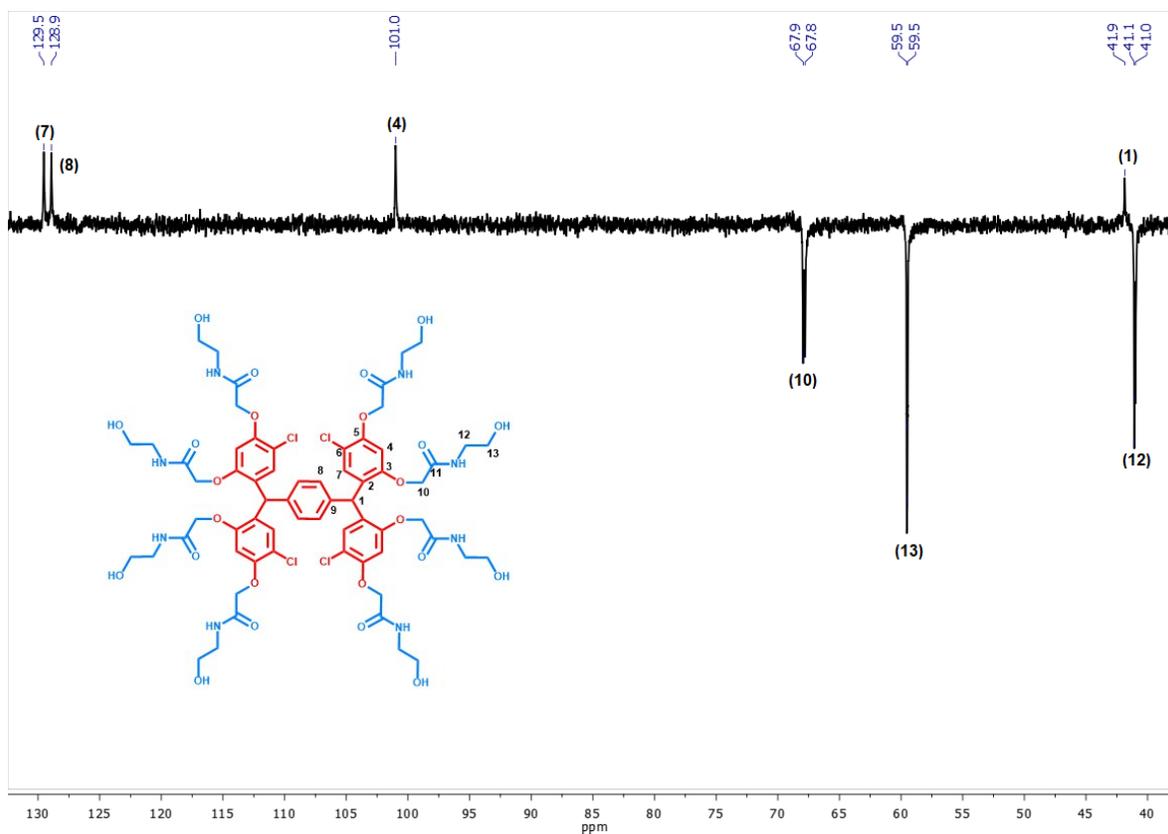


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 del compuesto **7** (75 MHz, DMS-d_6 , 25°C).

La obtención del compuesto **7**, se confirmó por espectrometría de masas mediante la técnica de MALDI-TOF. En la figura **32**, se observa un pico en 1487 m/z correspondiente al ion molecular $[\text{M}+2]$ del compuesto **7**.

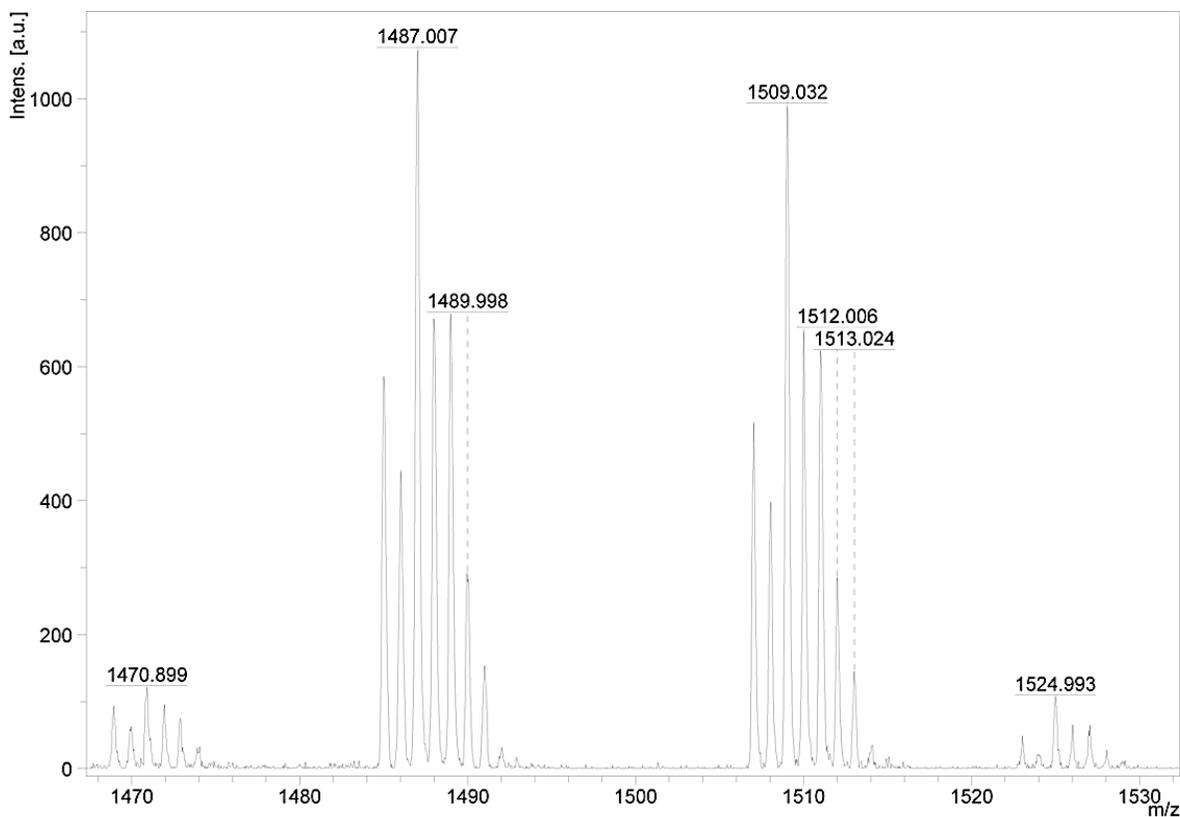
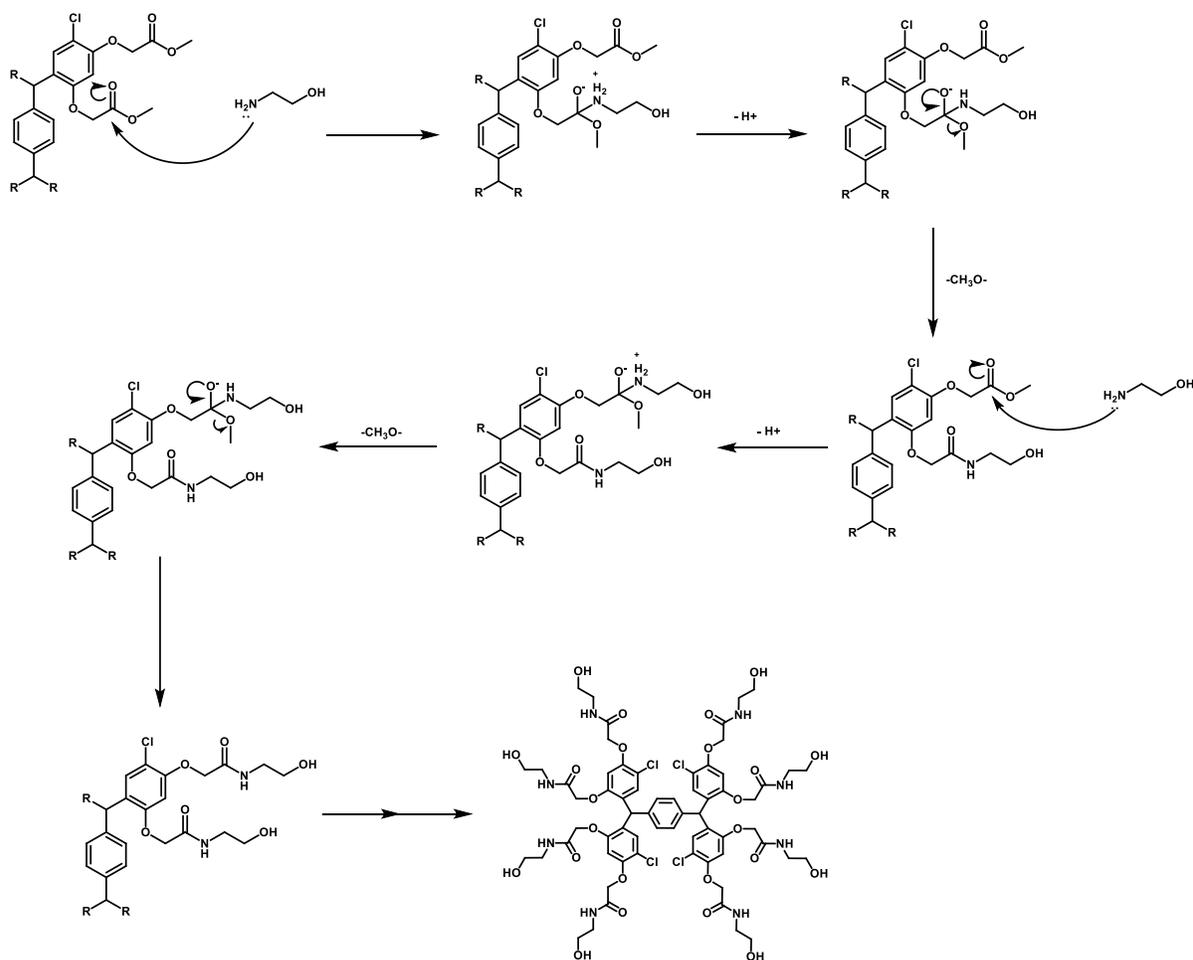


Figura 32. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **7**.

Como ya se mencionó, la obtención del dendrímero G 1.0 se llevó a cabo mediante una reacción de aminólisis entre el dendrímero de G 0.5 y etanolamina, que explica mediante el siguiente mecanismo de reacción.

Mecanismo de reacción

La reacción comienza con el ataque de la amina al carbono electrofílico, formando el intermediario tetraédrico; posteriormente otra amina sustrae uno de los hidrógenos de la amina cuaternaria, en seguida, el par de electrones del oxígeno se regresa para restituir al carbonilo, expulsando el grupo metóxido y formando la amida. Este mecanismo sucede en los ocho esteres terminales (Esquema **6**).

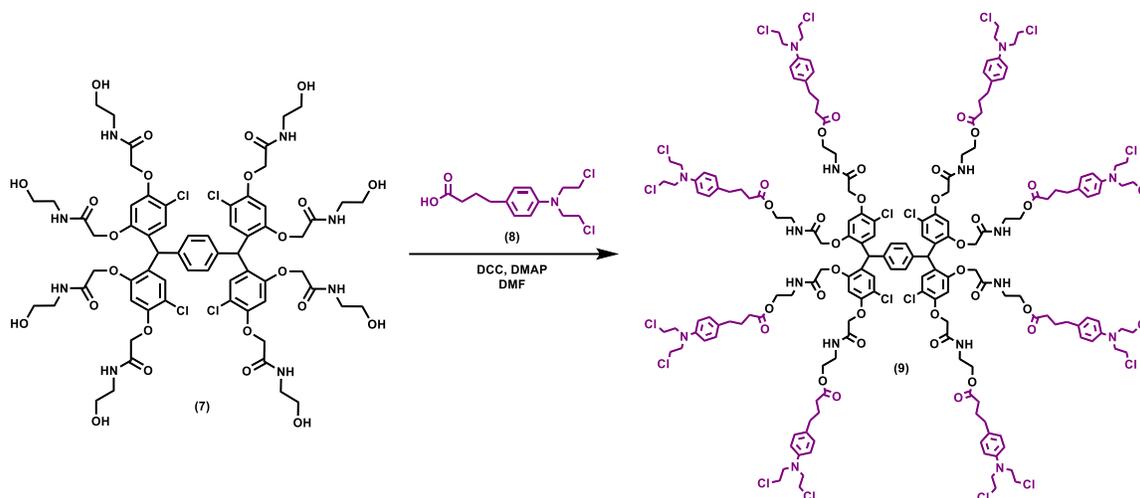


Esquema 6. Mecanismo de reacción de la aminólisis para la obtención del compuesto **7**.

Con base en los datos obtenidos a través de RMN ^1H y ^{13}C así como espectrometría de masas, se puede concluir que se obtuvo el dendrímero de primera generación partiendo del resorcinareno abierto, con ocho grupos etanolamina en la periferia, por lo que se procedió con la síntesis de los conjugados resorcinareno-fármaco, empleando clorambucilo, ibuprofeno, indometacina y naproxeno.

Síntesis de los conjugados dendrímero-fármaco

Síntesis del conjugado dendrímero-clorambucilo



Esquema 7. Síntesis del conjugado resorcinareno-clorambucilo de G 1.0.

Una vez que se obtuvo el dendrímero de G 1.0, se procedió con la reacción de acoplamiento con el clorambucilo **8**, empleando una reacción de esterificación de Steglich, empleando DCC y DMAP al 20% y DMF como disolvente (Esquema **7**).

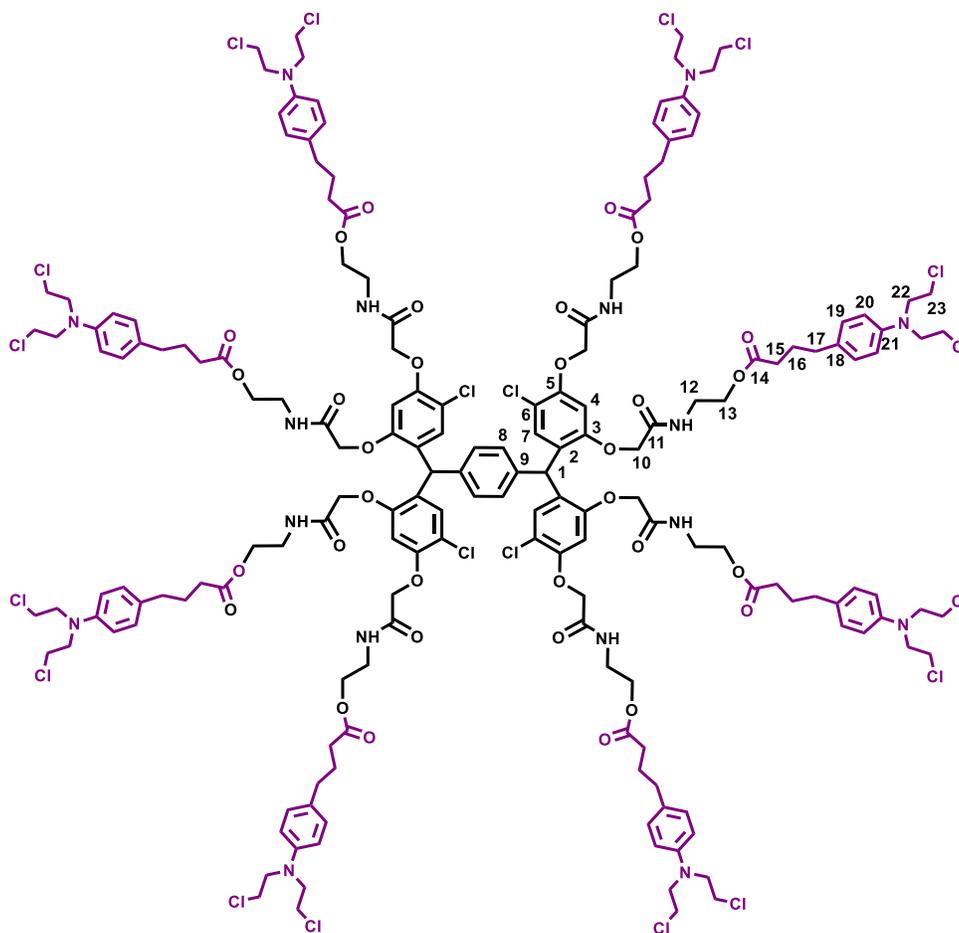


Figura 33. Compuesto **9**. Conjugado resorcinareno-clorambucilo de G 1.0.

Aspecto físico: Sólido café.

Rendimiento: 0.101 g (0.0268 mmol) 41 %.

UV-vis (CH₂Cl₂, nm): 285.5, 260.0.

FTIR (KBr, cm⁻¹): 3417, 2926, 2853, 1731, 1681, 1614, 1579, 1517, 1440, 1391, 1352, 1325, 1274, 1247, 1199, 1179, 1140, 1071, 1051, 903, 826, 802, 741, 699, 659, 555, 458, 414.

RMN ¹H (300 MHz, CCl₃D) δ(ppm): 1.88 (s, 16H, CH₂, **16**), 2.25 (s, 8H, CH₂Ar, **17**), 2.32 (s, 8H, CH₂Ar, **17**), 2.47 (s, 8H, CH₂CO, **15**), 2.53 (s, 8H, CH₂CO, **15**), 3.42 (s, 10H, CH₂NH, **12**), 3.60 (d, 32H, CH₂Cl, *J*= 6.0 Hz, **23**), 3.66 (d, 32H, CH₂N, *J*= 6.0 Hz, **22**), 4.03 (s, 8H, CH₂O, **13**), 4.18 (s, 8H, CH₂O, **13**), 4.29 (s, 8H, CH₂CO, **10**), 4.51 (s, 8H, CH₂CO, **10**), 6.04 (s, 2H, CH, **1**), 6.55 (s, 4H, Ar, **4**), 6.56

(s, 4H, Ar, **8**), 6.60 (d, 8H, Ar, $J=6.6$ Hz, **20**), 6.75 (s, 4H, Ar, **7**), 6.89 (d, 8H, Ar, $J=8.4$ Hz, **20**), 7.03 (d, 16H, Ar, $J=8.4$ Hz, **19**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CCl_3D) δ (ppm): 26.7 (CH_2 , **16**), 33.5 (CH_2CO , **15**), 33.6 (CH_2CO , **15**), 34.0 (CH_2Ar , **17**), 34.1 (CH_2Ar , **17**), 38.4 (CH_2NH , **12**), 40.7 (CH_2N , **22**), 42.4 (CH , **1**), 53.6 (CH_2Cl , **23**), 53.7 (CH_2Cl , **23**), 62.3 (CH_2O , **13**), 62.9 (CH_2O , **13**), 68.5 (CH_2CO , **10**), 101.3 (Ar, **4**), 112.3 (Ar, **20**), 116.0 (Ar-Cl, **6**), 126.6 (Ar_{ipso} , **2**), 129.6 (Ar, **8**), 129.7 (Ar, **19**), 129.8 (Ar, **19**), 130.3 (Ar_{ipso} , **18**), 130.4 (Ar_{ipso} , **18**), 130.8 (Ar, **7**), 140.8 (Ar_{ipso} , **9**), 144.5 (Ar-N, **21**), 144.6 (Ar-N, **21**), 152.7 (Ar-O, **3**), 154.4 (Ar-O, **5**), 167.3 (C=O, **11**), 167.5 (C=O, **11**), 173.5 (C=O, **14**), 173.9 (C=O, **14**).

EM MALDI-TOF (m/z): 3772.1 [M-2].

Análisis Elemental Calculado: para $\text{C}_{176}\text{H}_{214}\text{Cl}_{20}\text{N}_{16}\text{O}_{32}$: C. 56.00, H. 5.71, N. 5.94%. **Encontrado:** C. 56.02, H. 5.69, N. 5.95%.

Inicialmente, el conjugado resorcinareno-clorambucilo **9** se caracterizó por RMN ^1H . En la figura **34**, se observan cuatro multipletes a 1.88, 2.04, 2.30 y 2.49 ppm correspondientes a los hidrógenos de los metilenos $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C=O}$ **16**, **15** y **17** alfa, beta y gamma al carbonilo del clorambucilo respectivamente. A continuación, a 3.42 ppm correspondientes a los hidrógenos del metilo **12** unido al nitrógeno de la amida. A 3.60 y 3.66 se observan dos dobletes correspondientes a los hidrógenos del metileno ($\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$) **22** y **23** unidos al nitrógeno y al cloro provenientes de la cadena N-alquilclorada, con una constante de acoplamiento de $J=6.0$ Hz, y $J=6.0$ Hz, respectivamente. A 4.03 y 4.18 ppm se observan dos multipletes asignados a los hidrógenos del metileno ($\text{CH}_2\text{-O}$) **13** unido al oxígeno. A 4.27 y 4.51 ppm se observan dos señales debidas a los hidrógenos del metileno ($\text{CH}_2\text{-C=O}$) **10** alfa al carbonilo.

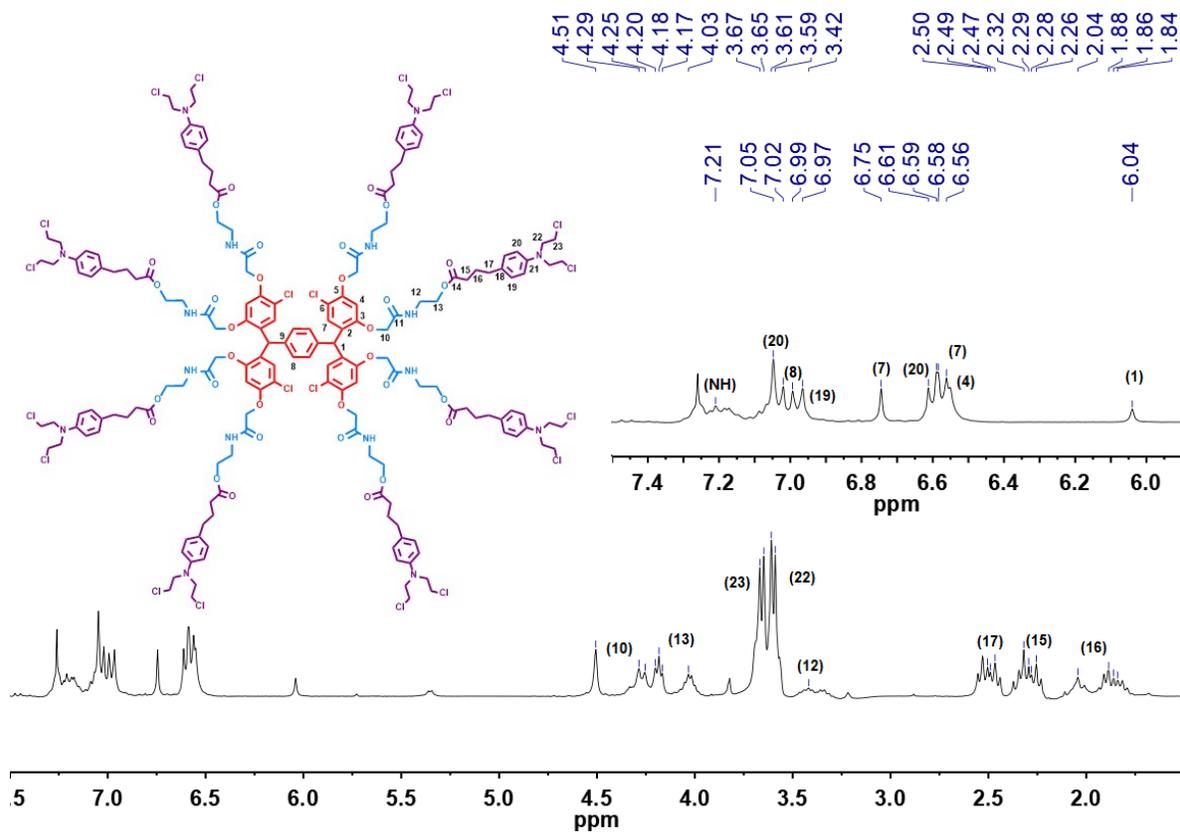


Figura 34. Espectro de RMN ^1H del compuesto **9** (300 MHz, CCl_3D , 25°C)

Para confirmar la obtención del compuesto **9**, se caracterizó por espectrometría de masas mediante la técnica de MALDI-TOF. En la figura **35**, se observa a 3772.1 m/z, un pico que corresponde al ion molecular $[\text{M}-2]$ del conjugado con clorambucilo **9**.

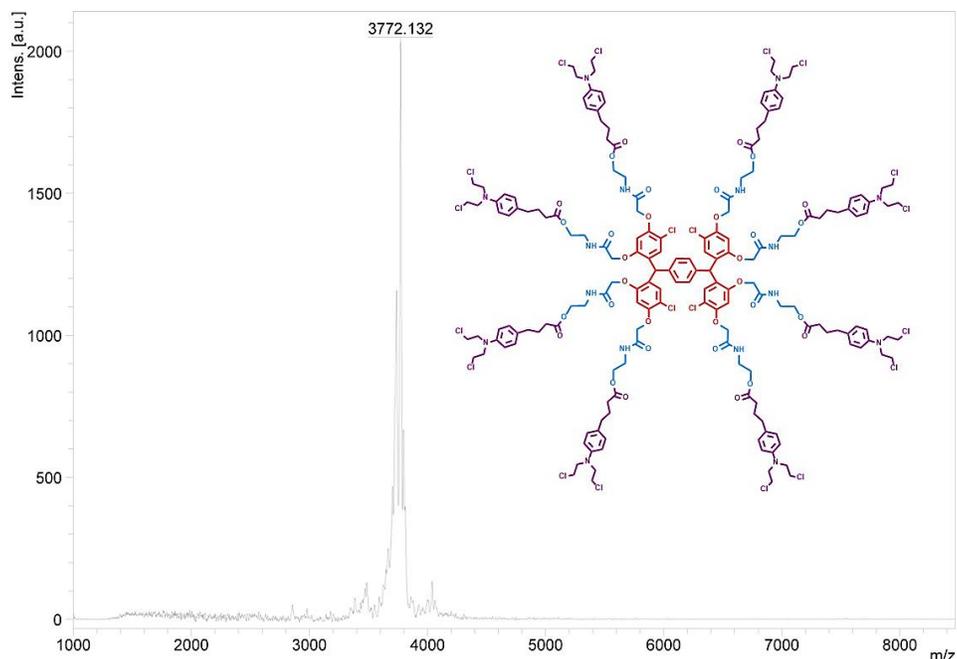
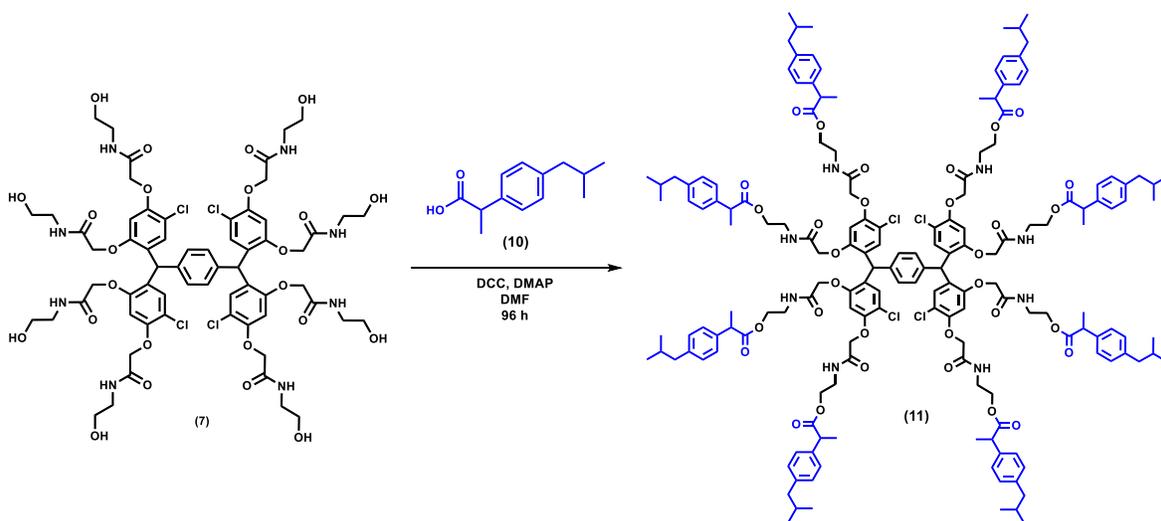


Figura 35. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **9**.

Síntesis del conjugado dendrímero-ibuprofeno



Esquema 8. Síntesis del conjugado resorcinareno-ibuprofeno de G 1.0.

Para la obtención del conjugado dendrímero-ibuprofeno se hizo la reacción entre el dendrímero del resorcinareno abierto **7** e ibuprofeno **10** con DCC y DMAP al 5%, usando DMF como disolvente, mientras que la purificación se realizó con lavados con metanol (Esquema **8**).

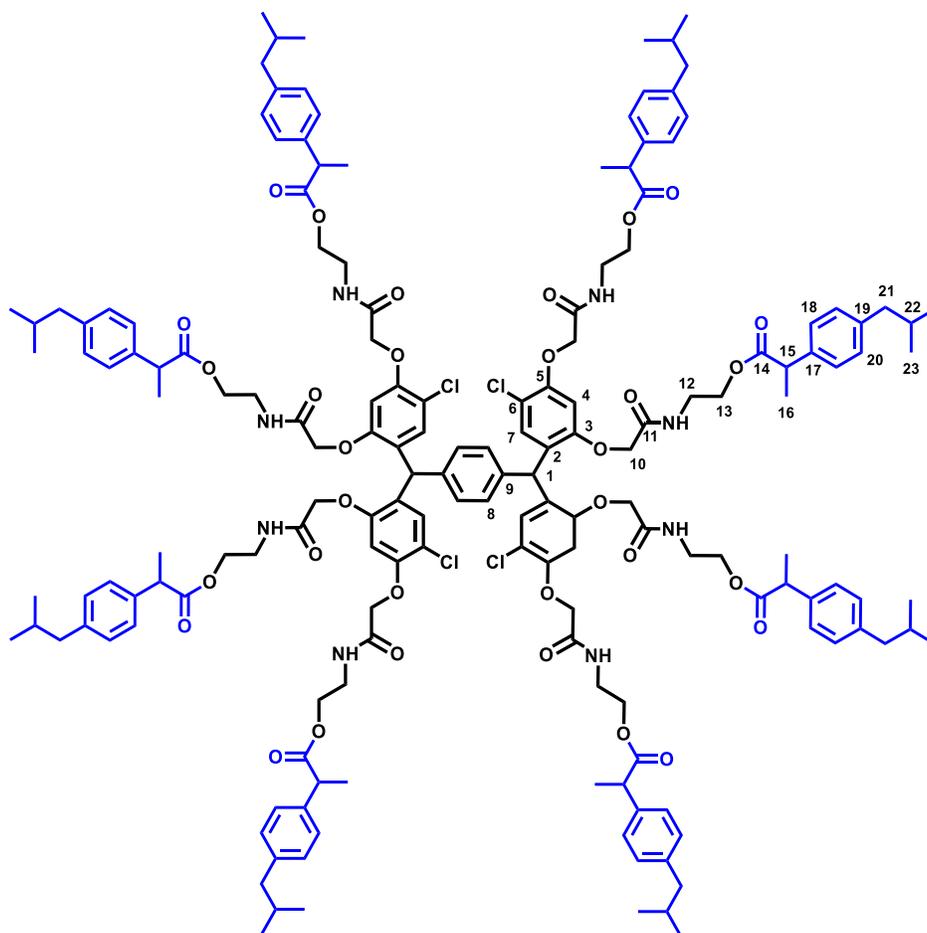


Figura 36. Compuesto **11**. Conjugado resorcinareno-ibuprofeno de G 1.0.

Aspecto físico: Sólido gris.

Rendimiento: 0.525 g (0.176 mmol). 62%.

UV-vis (CH₂Cl₂, nm): 286.5, 234.0.

FTIR (KBr, cm⁻¹): 3399, 2953, 2924, 2868, 2849, 1735, 1681, 1604, 1579, 1531, 1499, 1436, 1395, 1366, 1322, 1292, 1246, 1198, 1155, 1093, 1070, 1051, 1022, 901, 846, 777, 725, 691, 635, 553, 460, 411.

RMN ¹H (300 MHz, CCl₃D) δ(ppm): 0.85 (d, 24H, CH₃, *J*= 6.3 Hz, **23**), 1.38 (d, 12H, CH₃, *J*= 5.4 Hz, **16**), 1.46 (d, 12H, CH₃, *J*= 7.2 Hz, **16**), 1.81 (m, 8H, CH, *J*= 6.3 Hz, **22**), 2.36 (d, 8H, CH₂, *J*= 7.2 Hz, **21**), 2.40 (d, 8H, CH₂, *J*= 7.2 Hz, **21**), 3.34 (s, 5H, CH₂NH, **12**), 3.62 (s, 12H, CH₂NH, **12**), 3.70 (q, 8H, CH, *J*= 7.2 Hz, **15**), 4.01 (s, 8H, CH₂O, **13**), 4.17 (s, 8H, CH₂O, **13**), 4.21 (s, 8H, CH₂CO, **10**), 4.51 (s,

8H, CH₂CO, **10**), 5.98 (s, 2H, CH, **1**), 6.57 (s, 4H, Ar, **4**), 6.74 (s, 4H, Ar, **7**), 6.94 (d, 8H, Ar, $J=8.7$ Hz, **20**), 7.04 (s, 4H, Ar, **8**), 7.08 (m, 16H, Ar, $J=7.8$ Hz, **18**), 7.17 (d, 12H, Ar, $J=8.1$ Hz, **20**).

RMN ¹³C (75 MHz, CCl₃D) δ (ppm): 18.6 (CH₃, **16**), 18.7, (CH₃, **16**), 22.5 (CH₃, **23**), 30.3 (CH, **22**), 38.3 (CH₂NH, **12**), 42.9 (CH, **1**), 44.9 (CH₂, **21**), 45.1 (CH, **15**), 62.3 (CH₂O, **13**), 63.2 (CH₂O, **13**), 68.5 (CH₂CO, **10**), 101.2 (Ar, **4**), 116.1 (Ar-Cl, **6**), 126.5 (Ar_{ipso}, **2**), 127.1 (Ar, **8**), 127.2 (Ar, **20**), 129.5 (Ar, **18**), 130.8 (Ar, **7**), 137.5 (Ar_{ipso}, **17**), 140.7 (Ar_{ipso}, **9**), 140.8 (Ar_{ipso}, **19**), 152.8 (Ar-O, **3**), 153.4 (Ar-O, **5**), 167.2 (C=O, **11**), 167.4 (C=O, **11**), 175.1 (C=O, **14**), 175.2 (C=O, **14**).

EM MALDI-TOF (m/z): 3017 [M+MeOH].

Análisis Elemental Calculado: para C₁₆₈H₂₀₆Cl₄N₈O₃₂: C. 67.46, H. 6.94, N. 3.75%. **Encontrado:** C. 67.29, H. 6.84, N. 3.57%.

El compuesto **11**, en un inicio se caracterizó por RMN ¹H. En la figura **37**, se observa un singulete a 0.85 ppm correspondientes a los hidrógenos de los metilos (CH₃) **23** correspondientes a la cadena del isobutilo. Posteriormente, a 1.38 y 1.46 ppm se observa un par de dobletes asignados a los hidrógenos del metilo (CH₃) **16** beta al carbonilo con constantes de acoplamiento $J=5.4$ Hz y $J=7.2$ Hz, respectivamente. A continuación, a 1.81 ppm un multiplete correspondiente al hidrógeno de metilo (CH) **22**. A 2.36 y 2.40 ppm dos dobletes asignados a los hidrógenos del metileno (CH₂) **21** con una constante $J=7.2$ Hz y $J=7.2$ Hz, respectivamente, de la cadena del isobutilo. A 3.34 y 3.62 ppm dos señales debidas a los grupos (CH₂-NH) de los brazos dendríticos **12**. A 3.70 un cuarteto asignado al grupo (CH) **15** con una constante de acoplamiento $J=7.2$ Hz. A 4.01 y a 4.17 ppm, dos señales anchas correspondientes a los grupos (CH₂-O) **13** de los brazos dendríticos. A 4.21 y a 4.51 ppm dos señales anchas debidas a los grupos (CH₂-C=O) **10**. A 5.98 ppm se observa el singulete correspondiente al hidrógeno del metino **1** puente. A 6.44 ppm, se observa una señal ancha correspondiente a los hidrógenos de la amida, posteriormente se observan dos señales anchas a 6.57 y a 6.73 ppm, correspondientes a los hidrógenos de los anillos aromáticos, **4** y **7**, respectivamente. Finalmente, en la región que comprende desde 6.90 a 7.20 ppm

se observan las señales correspondientes a los hidrógenos del anillo aromático **20**, **18** proveniente del ibuprofeno, así como los hidrógenos del benceno central **8** en el resorcinareno, y una señal final para los hidrógenos de las amidas.

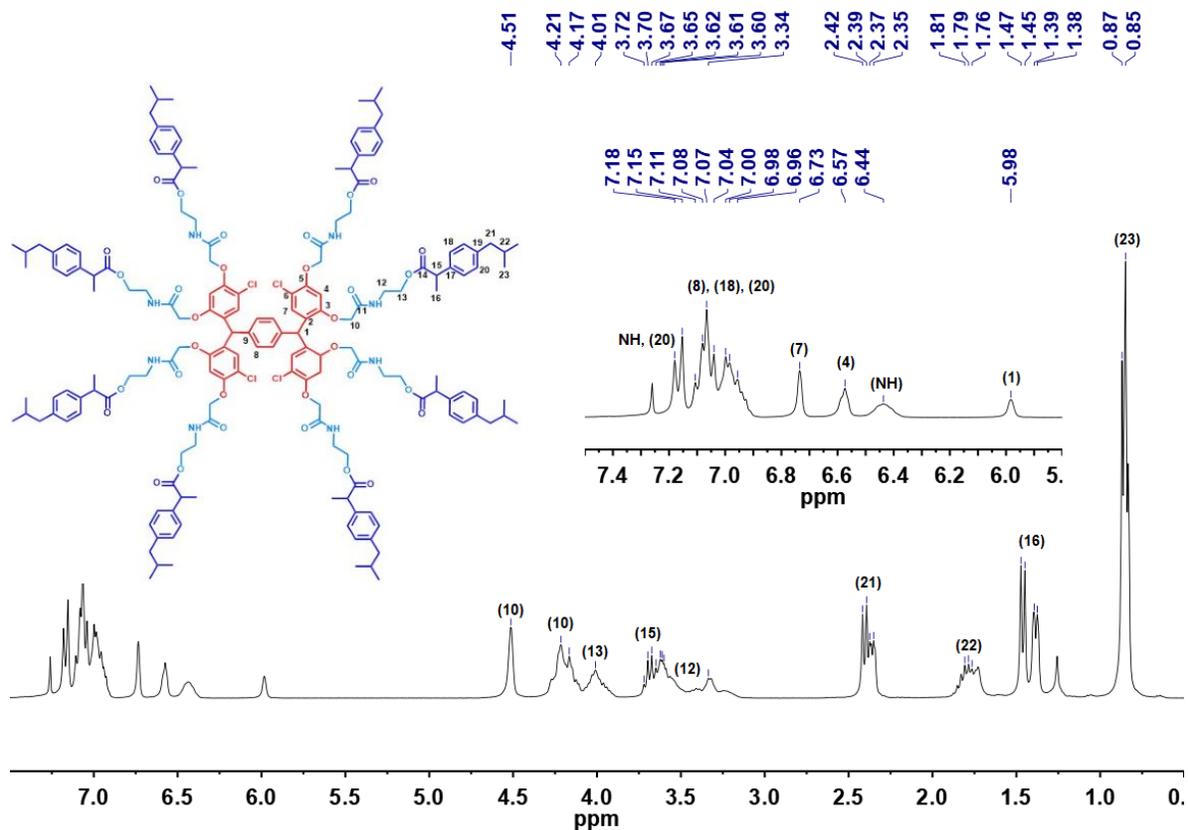


Figura 37. Espectro de RMN ^1H del compuesto **11** (300 MHz, CCl_3D , 25°C)

El compuesto **11** se caracterizó por espectrometría de masas MALDI-TOF. En la figura **38**, se observa un pico a 3017 m/z correspondiente al ion molecular $[\text{M}+\text{MeOH}]$ del conjugado con ibuprofeno **11**.

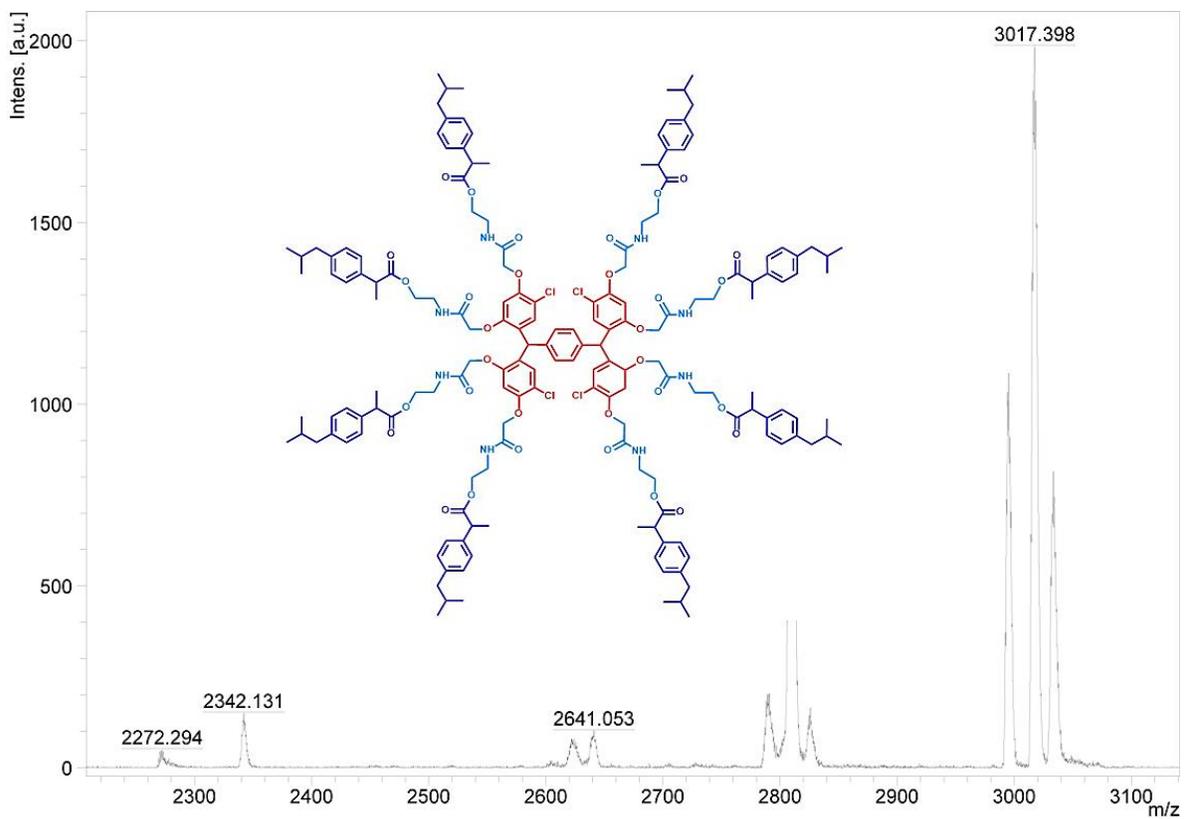
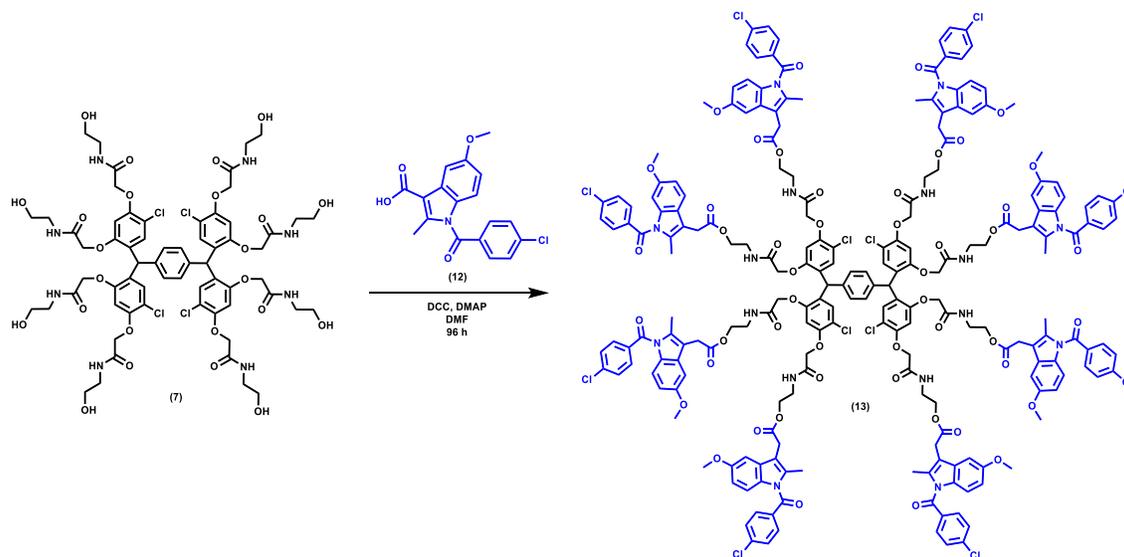


Figura 38. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **11**.

Síntesis del conjugado dentrímero-indometacina



Esquema 9. Síntesis del conjugado resorcinareno-indometacina de G 1.0.

Para la obtención del conjugado con indometacina, se empleó la misma metodología del conjugado anterior, se colocó el dendrímero de primera generación **7** con indometacina **12** con DCC/DMAP ocupando DMF como disolvente y purificando con lavados de metanol (Esquema **9**).

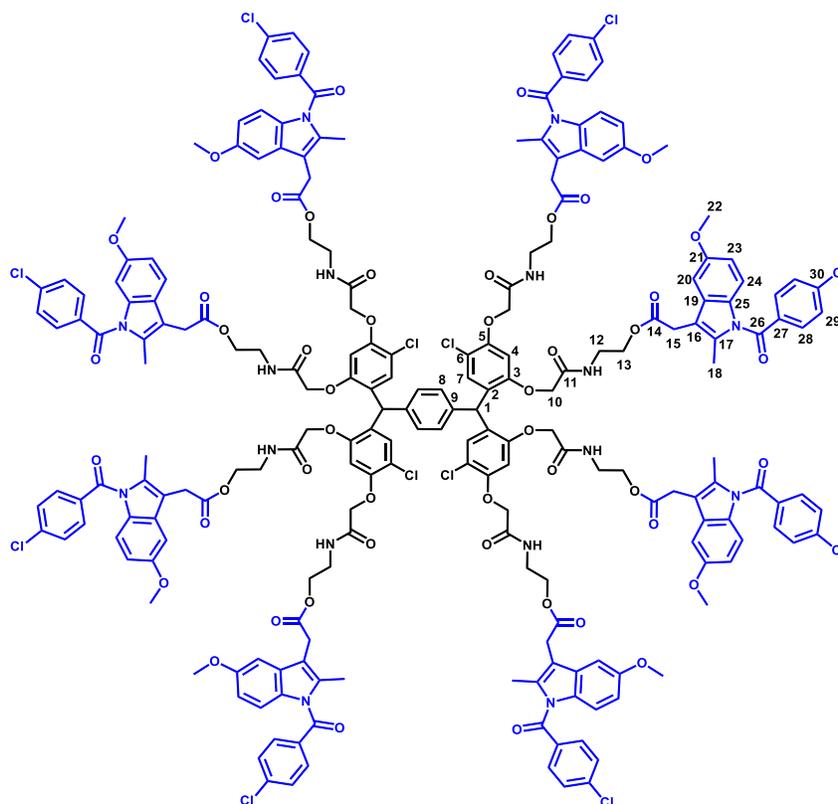


Figura 39. Compuesto **13**. Conjugado resorcinareno-indometacina de G 1.0.

Aspecto físico: Sólido amarillo.

Rendimiento: 0.124 g (0.0230 mmol) 45 %.

UV-vis (CH₂Cl₂, nm): 321.0, 234.0.

FTIR (KBr, cm⁻¹): 3408, 2928, 2853, 1735, 1680, 1591, 1529, 1477, 1456, 1437, 1397, 1356, 1316, 1289, 1257, 1220, 1199, 1162, 1139, 1088, 1067, 1036, 1013, 994, 925, 904, 832, 805, 753, 735, 688, 663, 646, 561, 547, 481.

RMN ¹H (300 MHz, CCl₃D) δ(ppm): 2.26 (s, 12H, CH₃, **18**), 2.31 (s, 12H, CH₃, **18**), 3.34 (s, 8H, CH₂NH, **12**), 3.61 (s, 8H, CH₂NH, **12**), 3.57 (s, 8H, CH₂, **15**), 3.63 (s, 12H, CH₂, **15**), 3.68 (s, 12H, OCH₃, **22**), 3.74 (s, 12H, OCH₃, **22**), 4.06 (s, 8H,

CH₂O, **13**), 4.22 (s, 8H, CH₂O, **13**), 4.39 (s, 8H, CH₂CO, **10**), 5.99 (s, 2H, CH, **1**), 6.45 (s, 4H, Ar, **4**), 6.59 (s, 4H, Ar, **7**), 6.70 (s, 4H, Ar, **8**), 6.80 (d, 8H, Ar, *J*= 9.0 Hz, **23**), 6.89 (d, 8H, Ar, *J*= 12.0 Hz, **25**), 7.03 (s, 8H, Ar, **20**), 7.41 (d, 16H, Ar, *J*= 8.4 Hz, **29**), 7.61 (d, 16H, Ar, *J*= 8.4 Hz, **28**).

RMN ¹³C (75 MHz, CCl₃D) δ(ppm): 13.4 (CH₃, **18**), 13.5 (CH₃, **18**), 30.2 (CH₂, **15**), 38.2 (CH₂NH, **12**), 38.3 (CH₂NH, **12**), 43.0 (CH, **1**), 55.8 (OCH₃, **22**), 62.9 (CH₂O, **13**), 63.4 (CH₂O, **13**), 68.4 (CH₂CO, **10**), 101.4 (Ar, **20**), 101.7 (Ar, **4**), 111.3 (Ar, **23**), 111.7 (Ar, **23**), 112.1 (Ar, **24**), 112.3 (Ar, **24**), 115.1 (Ar_{ipso}, **16**), 115.9 (Ar-Cl, **6**), 126.6 (Ar_{ipso}, **2**), 129.2 (Ar, **29**), 129.3 (Ar, **29**), 129.6 (Ar, **8**), 130.5 (Ar, **7**), 130.6 (Ar_{ipso}, **25**), 130.7 (Ar_{ipso}, **25**), 130.9 (Ar, **27**), 131.3 (Ar, **28**), 133.8 (Ar_{ipso}, **17**), 134.0 (Ar_{ipso}, **17**), 136.1 (Ar_{ipso}, **19**), 136.3 (Ar_{ipso}, **19**), 139.4 (Ar-Cl, **30**), 139.5 (Ar-Cl, **30**), 140.9 (Ar_{ipso}, **9**), 152.6 (Ar-O, **5**), 154.4 (Ar-O, **3**), 156.0 (Ar-O, **21**), 156.1 (Ar-O, **21**), 167.4 (C=O, **11**), 167.5 (C=O, **11**), 168.4 (C=O, **26**), 170.8 (C=O, **14**), 171.3 (C=O, **14**).

EM MALDI-TOF (m/z): 4195.6 [M+1].

Análisis Calculado: para C₂₁₆H₁₉₀Cl₁₂N₁₆O₄₈: C. 61.72, H. 4.56, N. 5.33%.

Encontrado: C. 61.73, H. 4.55, N. 5.33%.

El compuesto **13** fue caracterizado por RMN ¹³C. En la figura **40**, se observan dos señales a 13.4 y 13.5 ppm correspondientes al carbono del metilo (CH₃) **18** unido al heterociclo. A continuación, se observa a 30.2 ppm el carbono del metileno (CH₂) **15** alfa al carbonilo de la indometacina. Las siguientes señales que se observan a 38.2 y 38.3 ppm corresponden a los carbonos de los metilenos (-CH₂-N) **12** unidos a nitrógeno, mientras que la señal de 43.0 ppm corresponde al carbono del metino (CH) **1** puente. Posteriormente, a 55.8 ppm corresponde al carbono del metilo (O-CH₃) **22**, más adelante se pueden observar dos señales a 62.9 y 63.4 ppm correspondiente al carbono de metileno (O-CH₂) **13** de los brazos dendríticos, a 68.4 ppm se observa una señal correspondiente al metileno (O-CH₂-CO) **10** alfa al carbonilo.

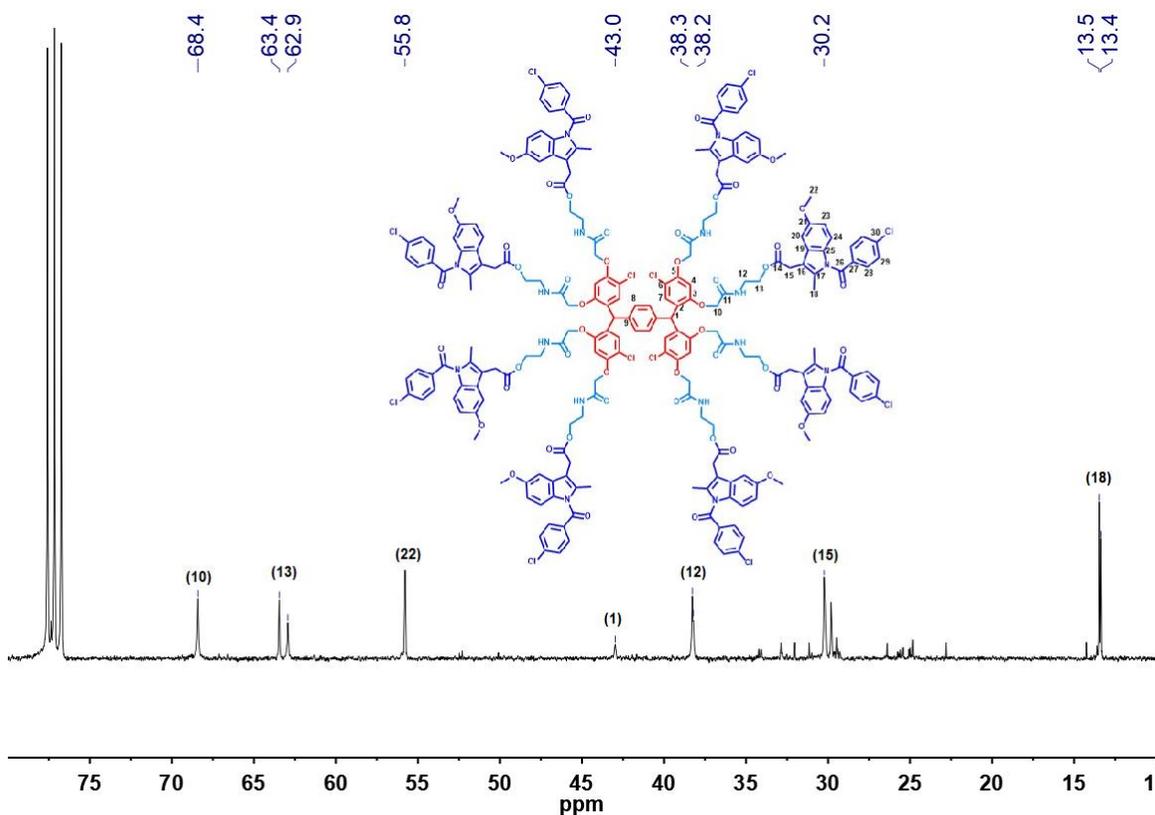


Figura 40. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **13**. Región de carbono con hibridación sp³ (75 MHz, CCl₃D, 25°C).

En la figura **41**, se muestra la región correspondiente a los carbonos con hibridación sp². Primero se observa una señal a 101.4 ppm, que corresponde a carbono aromático **20** en la posición cinco del indol, mientras que la señal a 101.7 ppm pertenece al carbono aromático **4** *orto* al grupo éter en el resorcinareno abierto. A continuación, se tienen señales a 111.3 y 111.7 ppm, correspondientes a carbono aromático **23** en la posición siete del heterociclo, a 112.1 y 112.3 ppm que pertenece al carbono aromático **24** en la posición ocho del indol. La señal a 115.1 ppm corresponde al carbono aromático **16** unido al metileno alfa al carbonilo, mientras a 115.9 ppm se asignó al carbono aromático **6** unido a cloro. La señal a 126.6 ppm corresponde al carbono aromático **2** unido al metino puente. A 129.2 y 131.2 ppm, se observan dos señales correspondientes a los carbonos aromáticos del resorcinareno **8**, **9**, así como las señales correspondientes a los carbonos aromáticos **29**, **25**, **27**, **28** provenientes de la indometacina. Las señales a 133.8 y a 134.0 ppm pertenecen al carbono aromático **17** alfa al nitrógeno del indol, mientras

que las señales a 136.1 y 136.3 ppm se asignaron al carbono aromático **19** en la posición cuatro el compuesto heterocíclico. Las siguientes señales que se observan a 139.4 y 139.5 ppm son las correspondientes al carbono aromático **30** unido a cloro, que pertenece a la indometacina, la siguiente señal a 140.9 ppm corresponde al carbono aromático **9** unido al metino puente. Se observan cuatro señales, en 152.6 y 154.4, que corresponden a los carbonos aromáticos unidos oxígeno del resorcinareno, **5** y **3**, respectivamente. Mientras que las dos señales a 156.0 y 156.1 ppm corresponden al carbono aromático **21** unido a oxígeno en posición seis al indol. Finalmente, a 167.4 y 167.5 ppm se observan las señales correspondientes al carbono del carbonilo **11** de la amida del núcleo, mientras que la señal en 170.8 ppm fue asignada al carbonilo **26** de la amida del heterociclo y las dos señales restantes en 170.8 y 171.3 ppm pertenecen al carbono del carbonilo **14** del éster.

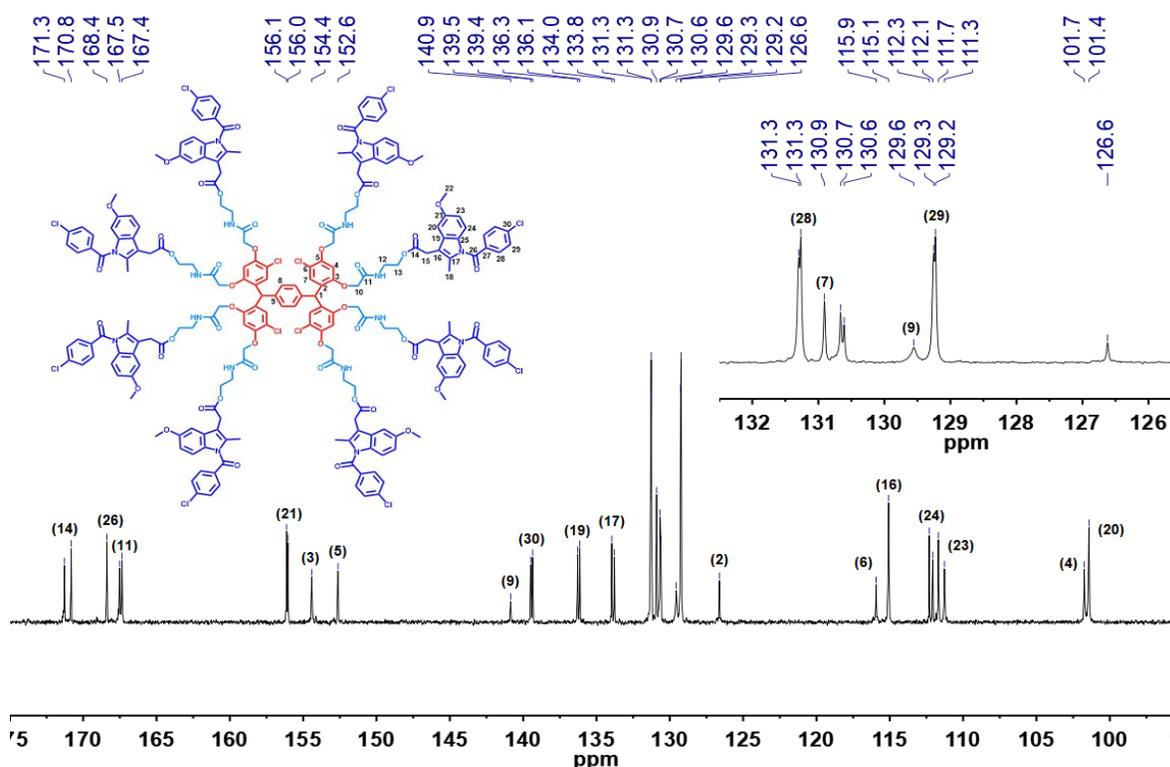


Figura 41. Espectro de RMN ¹³C del compuesto **13**. Región de carbono con hibridación sp² (75 MHz, CCl₃D, 25°C).

En la figura **42**, se presenta el espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³C DEPT 135 en donde se pueden observar las señales de los carbonos CH₃ y CH

del lado positivo y mientras que en el lado negativo se encuentran los carbonos CH₂. El espectro de RMN DEPT 135 nos permitió hacer la asignación de los grupos presentes en la estructura del conjugado resorcinareno-indometacina.

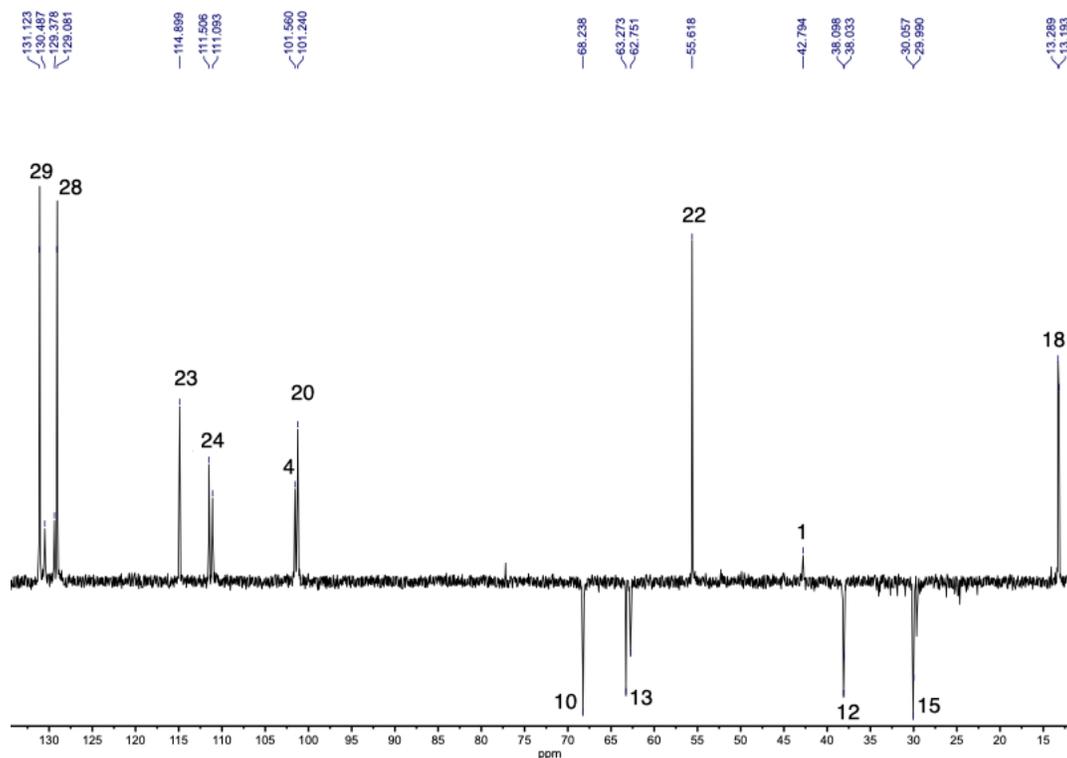


Figura 42 Espectro de RMN ¹³C DEPT 135 del compuesto **13** (75 MHz, CCl₃D, 25°C).

En la figura **43**, se presenta el espectro de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones HSQC (¹H-¹³C) en donde se puede observar la correlación que existe entre el espectro de RMN de ¹H y de ¹³C, que nos permitió realizar la asignación de las señales con los grupos presentes en la estructura del conjugado resorcinareno-indometacina.

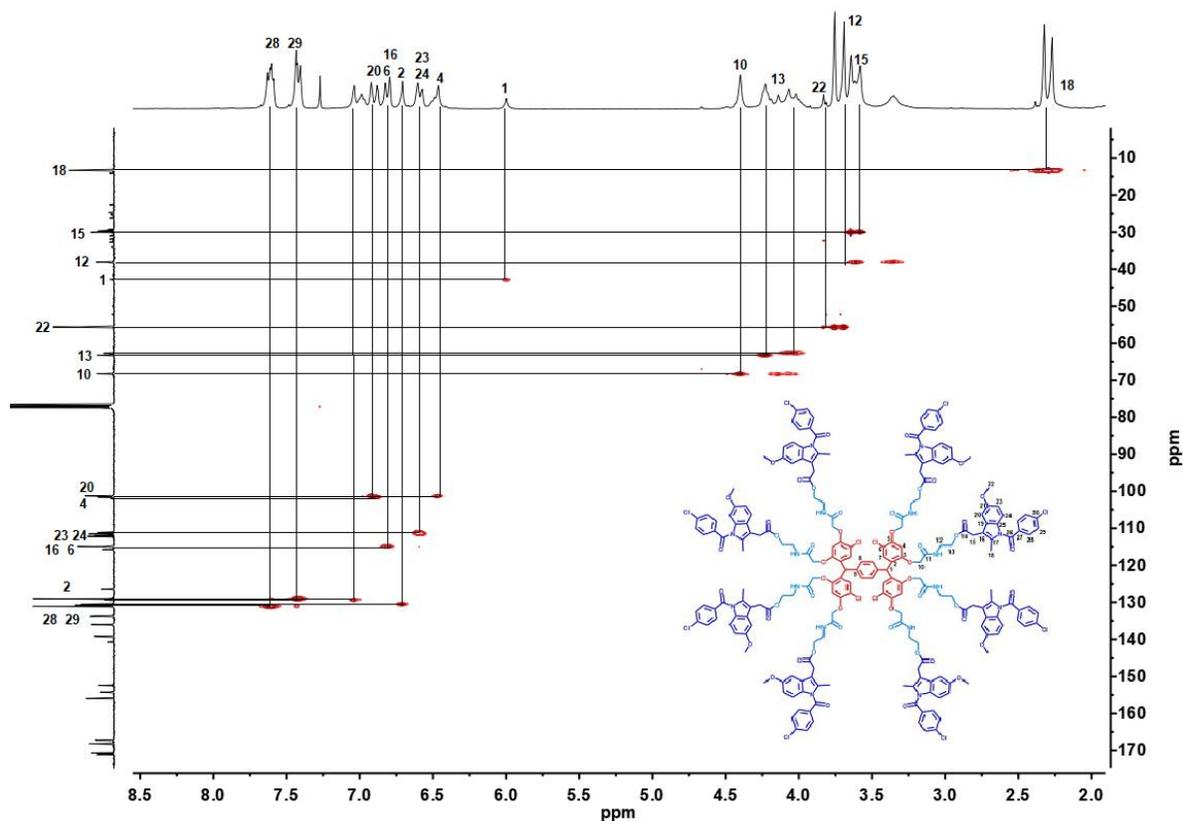


Figura 43. Espectro de RMN (2D, HSQC ^1H y ^{13}C) del compuesto **13**.

Para confirmar la obtención del compuesto **13**, se caracterizó por espectrometría de masas MALDI-TOF. En la figura **44**, se observa un pico a 4056.2 m/z correspondiente al ion molecular $[\text{M}+1]$ del conjugado con indometacina.

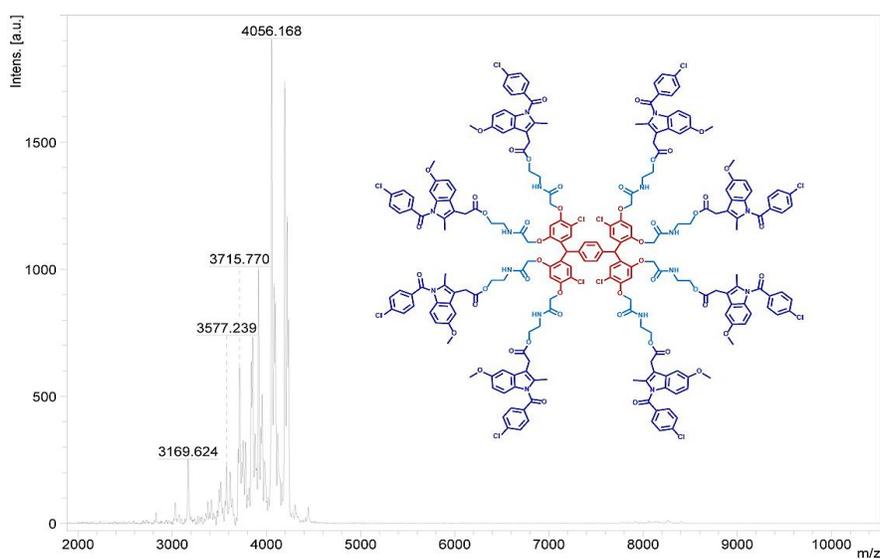
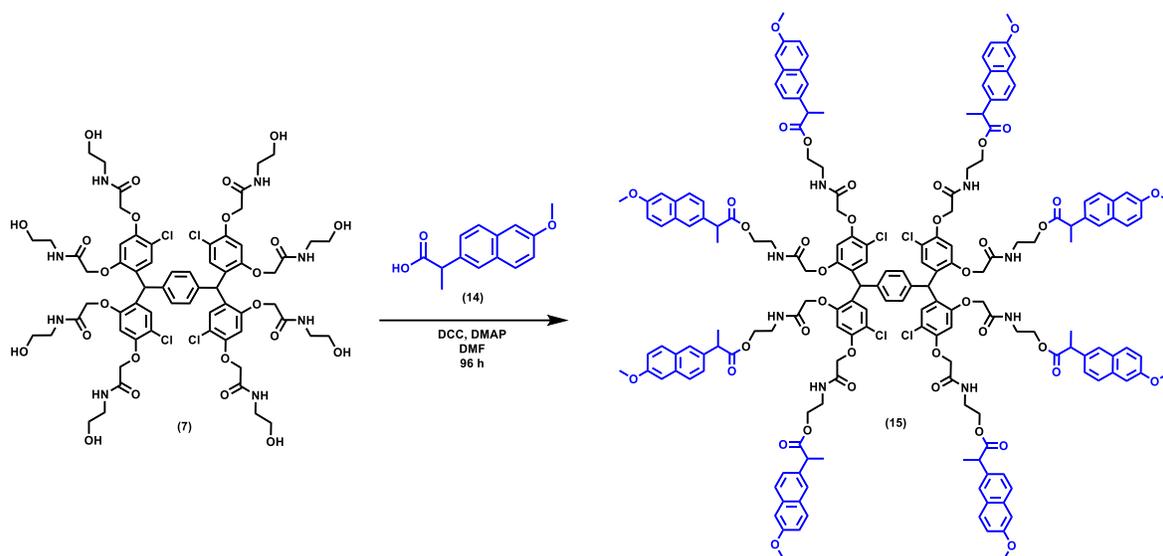


Figura 44. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **13**.

Síntesis del conjugado dendrímico-naproxeno



Esquema 10. Síntesis del conjugado resorcinareno-naproxeno de G 1.0.

La síntesis del conjugado con naproxeno se empleó las mismas condiciones de reacción, partiendo del dendrímico **7** con naproxeno **14** (Esquema **10**).

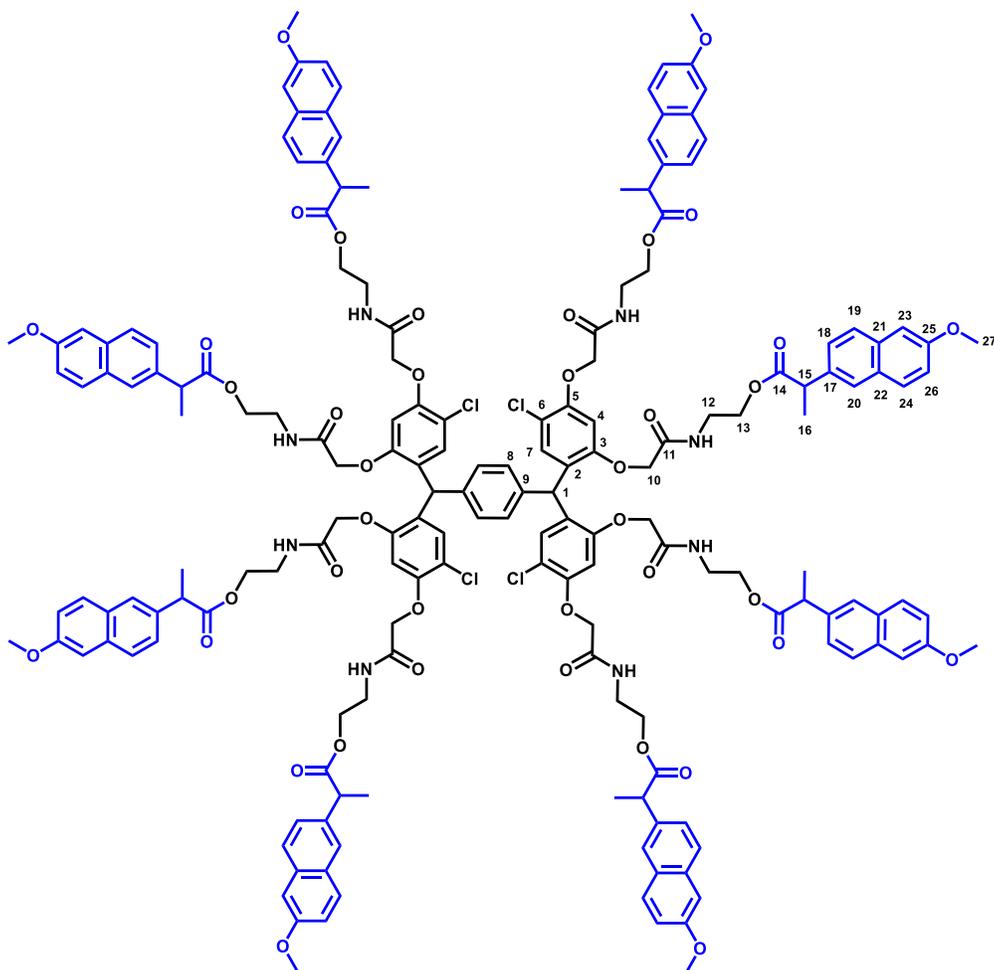


Figura 45. Compuesto **15**. Conjugado resorcinareno-naproxeno de G 1.0.

Aspecto físico: Sólido blanco.

Rendimiento: 0.181 g (0.0569 mmol) 80 %.

UV-vis (CH₂Cl₂, nm): 332.5, 318.5, 274.5, 264.5, 238.0

FTIR (KBr, cm⁻¹): 3407, 2933, 1731, 1685, 1634, 1604, 1528, 1503, 1485, 1451, 1437, 1392, 1373, 1321, 1262, 1230, 1217, 1173, 1152, 1088, 1052, 1030, 925, 892, 851, 809, 745, 686, 668, 549, 474, 410.

RMN ¹H (300 MHz, CCl₃D) δ(ppm): 1.44 (d, 12H, CH₃, *J*= 6.9 Hz, **16**), 1.53 (d, 12H, CH₃, *J*= 6.9 Hz, **16**), 3.23 (s, 5H, CH₂NH, **12**), 3.57 (s, 7H, CH₂NH, **12**), 3.73 (q, 8H, CH, *J*= 6.9 Hz, **16**), 3.80 (s, 12H, OCH₃, **27**), 3.81 (s, 12H, OCH₃, **27**), 3.95 (s, 8H, CH₂CO, **10**), 8.23 (s, 8H, CH₂O, **13**), 4.19 (s, 8H, CH₂O, **13**), 4.34 (s, 8H,

CH₂CO, **10**), 5.92 (s, 2H, CH, **1**), 6.32 (s, 4H, Ar, **4**), 6.73 (s, 4H, Ar, **7**), 6.96 (s, 4H, Ar, **8**), 7.02 (m, 16H, Ar, **24**, **26**) 7.27 (m, 8H, Ar, **20**), 7.52 (m, 8H, Ar, **23**), 7.62 (m, 16H, Ar, **18**, **19**).

RMN ¹³C (75 MHz, CCl₃D) δ(ppm): 18.5 (CH₃, **16**), 18.6 (CH₃, **16**), 38.2 (CH₂NH, **12**), 38.3 (CH₂NH, **12**), 43.0 (CH, **1**), 45.3 (CH, **15**), 45.5 (CH, **15**), 55.4 (OCH₃, **27**), 63.2 (CH₂O, **13**), 68.2 (CH₂CO, **10**), 101.2 (Ar, **4**), 105.7 (Ar, **23**), 115.8 (Ar-Cl, **6**), 115.9 (Ar-Cl, **6**), 119.0 (Ar, **26**), 119.1 (Ar, **26**), 126.0 (Ar, **19**), 126.1 (Ar, **20**), 126.2 (Ar, **20**), 127.2 (Ar, **18**), 127.3 (Ar, **18**), 126.5 (Ar_{ipso}, **2**), 128.8 (Ar_{ipso}, **22**), 128.9 (Ar_{ipso}, **22**), 129.2 (Ar, **24**), 129.3 (Ar, **24**), 129.5 (Ar, **8**), 130.6 (Ar, **7**), 130.7 (Ar, **7**), 133.7 (Ar_{ipso}, **21**), 133.8 (Ar_{ipso}, **21**), 135.4 (Ar_{ipso}, **17**), 140.9 (Ar_{ipso}, **9**), 152.6 (Ar-O, **5**), 154.2 (Ar-O, **3**), 154.3 (Ar-O, **3**), 157.7 (Ar-O, **25**), 157.8 (Ar-O, **25**), 167.3 (C=O, **11**), 167.4 (C=O, **11**), 175.0 (C=O, **14**), 175.2 (C=O, **14**).

EM MALDI-TOF (m/z): 3176.9 [M-3].

Análisis Calculado: para C₁₇₆H₁₇₄Cl₄N₈O₄₀: C. 66.41, H. 5.51, N. 3.52%.

Encontrado: C. 66.42, H. 5.56, N. 3.51%.

El compuesto **15** se caracterizó por RMN ¹H. En la figura **46**, se observa un par de dobletes a 1.45 y 1.53 ppm asignados a los hidrógenos del metilo (CH₃) **16** beta al carbonilo, con una constante de acoplamiento *J*= 6.9 Hz. Posteriormente se observan cuatro señales anchas a 3.25, 3.40, 3.51 y 3.59 ppm debido a los hidrógenos del metileno (CH₂-NH) **12** unido a nitrógeno. A 3.75 ppm se observa un multiplete que corresponde al hidrógeno del metino (CH) **16** alfa al carbonilo. A 3.81 se tiene un triplete asignado a los hidrógenos del metilo (CH₂-O) **27** unido al oxígeno, así como el hidrógeno del metino (CH) **16**, con una constante de acoplamiento *J*= 2.5 Hz. A 3.92, 3.96 y 4.02 ppm se observan tres señales anchas que corresponden los hidrógenos del metileno (CH₂-O) **13** unido a oxígeno proveniente de la etanolamina, mientras que el multiplete y singulete que se observan a 4.19 y 4.33, se asignaron a los hidrógenos del metileno (CH₂-O) **10** alfa al carbonilo. A 5.93 ppm se observa un singulete asignado al hidrógeno del metino (CH) **1** puente. A 6.27 y 6.32 ppm dos señales anchas debidas a los hidrógenos del anillo aromático **4** en posición *orto* al grupo éter del resorcinareno, y a los hidrógenos

del anillo aromático **7** en posición *orto* al cloro. De 6.98 a 7.52 ppm se observan las señales asignadas a los hidrógenos de los anillos aromáticos, tanto del núcleo **8**, como al fármaco, **18**, **19**, **20**, **23**, **24** y **26**. Finalmente, para los hidrógenos de la amida, se observa un singulete a 6.47 ppm, y dos dobletes a 7.34 y a 7.61 ppm con constantes de acoplamiento $J = 7.7$ Hz y $J = 7.4$ Hz, respectivamente.

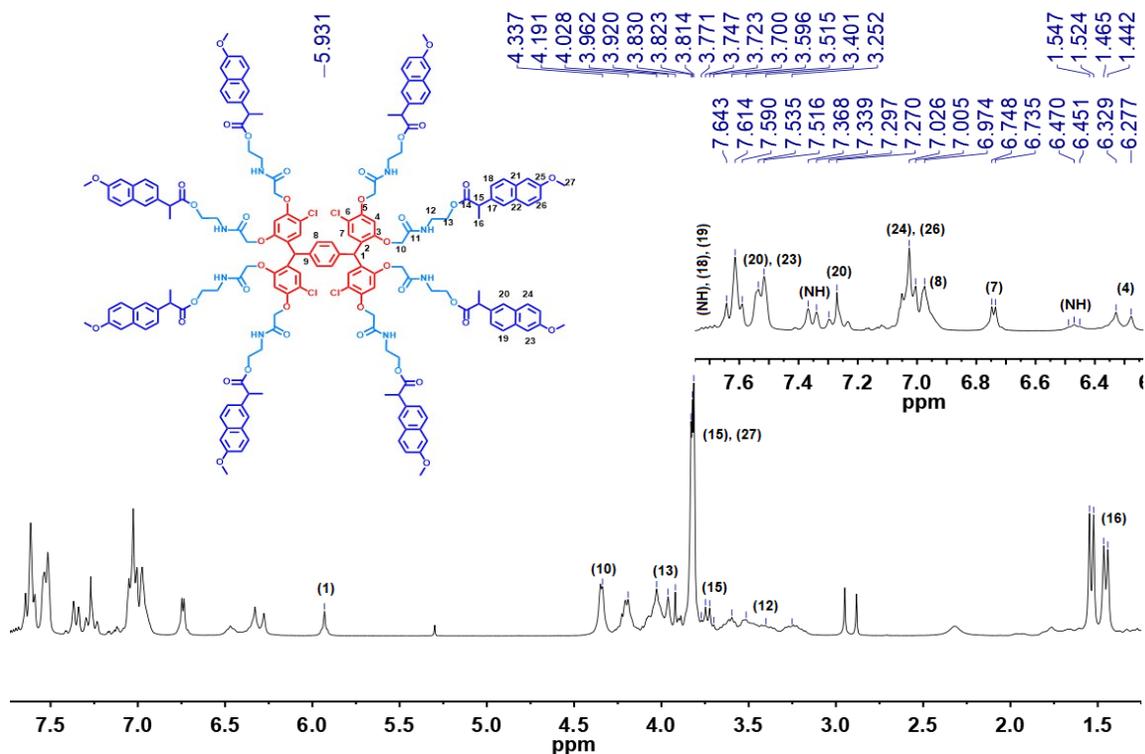


Figura 46. Espectro de RMN ^1H del compuesto **15** (75 MHz, CCl_3D , 25°C).

Para confirmar la asignación de señales se empleó resonancia magnética nuclear de ^{13}C DEPT 135 (Figura **47**) y DEPT 90. En el primero se observan los protones de los grupos CH y CH_3 positivos y los CH_2 negativos y en el caso del DEPT 90 se observan únicamente los protones de los grupos CH y CH_3 (Figura **47b**).

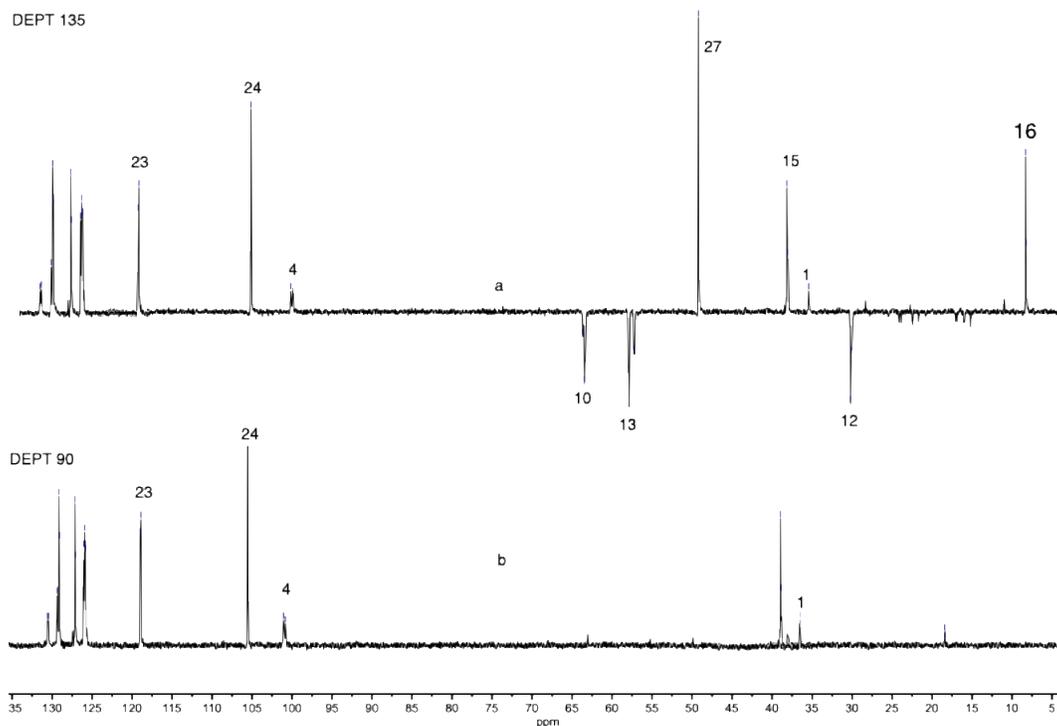


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135 a) y DEPT 90 b) del compuesto **15** (75 MHz, CCl_3D , 25°C).

La formación del compuesto **15** se confirmó por espectrometría de masas. En la figura **48**, se observa un pico 3176.9 m/z correspondiente al ion molecular $[\text{M}-3]$, confirmando la obtención del conjugado con naproxeno.

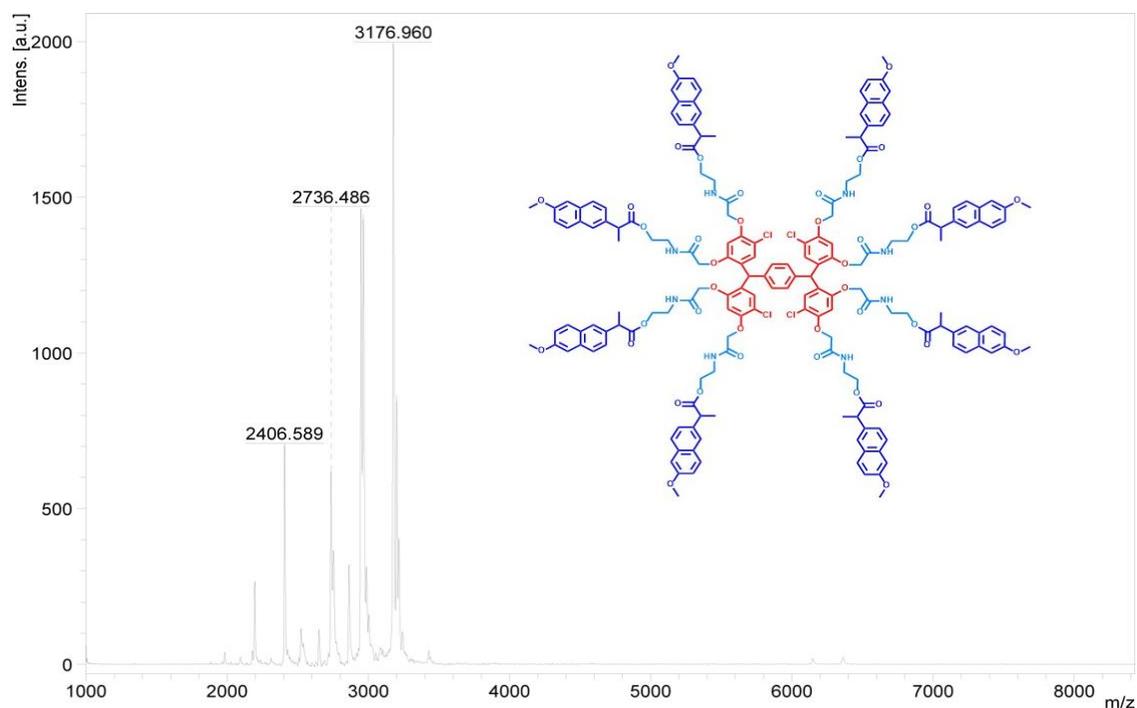
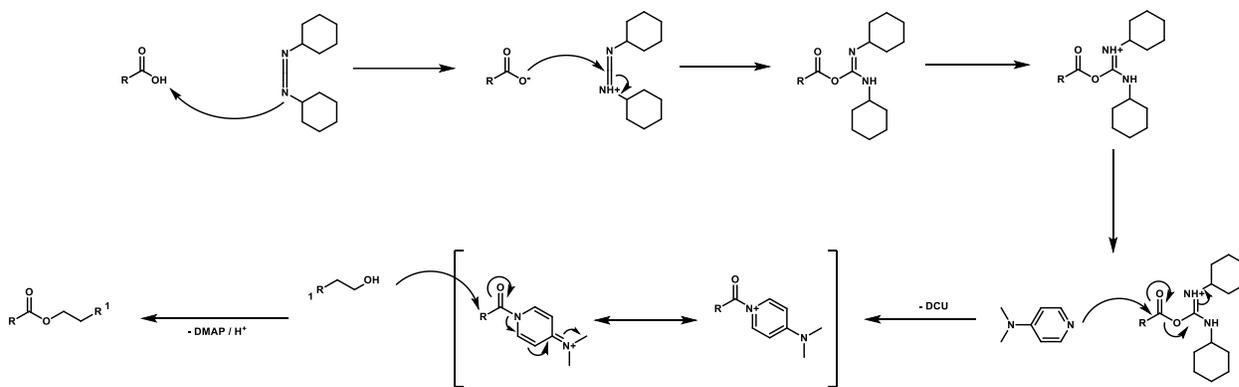


Figura 48. Espectro de masas MALDI-TOF del compuesto **15**.

Mecanismo de reacción

En el caso de los cuatro conjugados resorcinareno-fármaco, se llevó a cabo mediante una esterificación de Steglich, en la cual la DDC tiene el rol de ser un agente de acoplamiento, mientras que la DMAP funciona como catalizador.

La síntesis comienza con una reacción ácido-base entre la DCC y el ácido carboxílico, el cual conlleva a la formación de la *O*-acilisourea correspondiente. Posteriormente, la DMAP ataca al carbono del carbonilo del ácido, liberando DCU y dejando un éster activado, el cual reacciona con los alcoholes del dendrímero de primera generación, produciendo la formación de un intermediario tetraédrico. El par de electrones regresa a formar el doble enlace del grupo carbonilo, dando como producto el conjugado resorcinareno-fármaco, regenerando DMAP y obteniendo como subproducto DCU (Esquema **11**).



Esquema 11. Mecanismo de reacción propuesta para la esterificación de Steglich empleada para la obtención de los conjugados resorcinareno-fármaco.

Ensayo de sulforrodamina (SRB) en derivados

Todos los compuestos fueron elegidos para la evaluación de su actividad biológica en seis líneas celulares de cáncer humano, que es la U251 (glía de sistema nervioso central), PC-13 (células de cáncer de próstata), K-562 (células de leucemia), HCT-15 (células de cáncer de colon), MCF-7 (células de cáncer de mama) y SKLU-1 (células de cáncer de pulmón) y COS-7 (células de riñón de mono (no cancerosa)).

Para la determinar la citotoxicidad tumoral humana se determinó usando el colorante de unión a proteínas de sulforrodamina en el ensayo de microcultivos para medir el crecimiento celular.

De acuerdo con la citotoxicidad evaluado de los fármacos solos, Tabla 1, se puede observar que el ibuprofeno, prácticamente no presenta actividad anticancerígena en las líneas celulares estudiadas. En el caso del naproxeno e indometacina presenta actividad citotóxica contra la línea K-562 con 229 y 20.8% inhibición de crecimiento, mientras que la indometacina también presenta actividad contra la línea U-251 en un 20.4% de inhibición (Tabla 1).

En el caso del clorambucilo, que es un fármaco que se emplea comercialmente y en la actualidad se indicación principal es contra la leucemia linfática crónica. De

los resultados, Tabla 1, se puede observar que inhibe prácticamente a todas las líneas celulares incluyendo la línea celular COS-7.

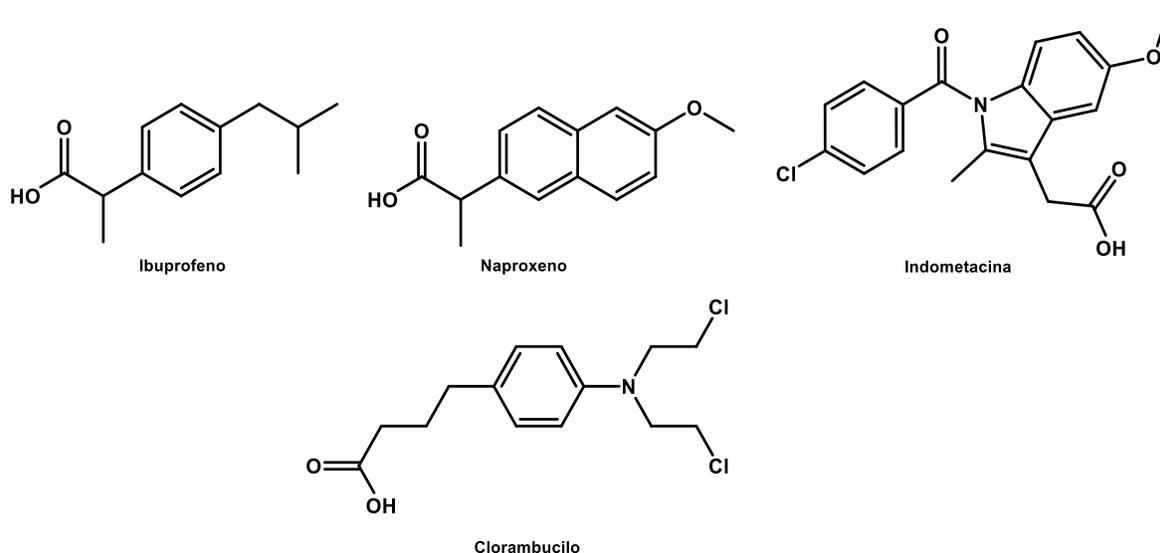
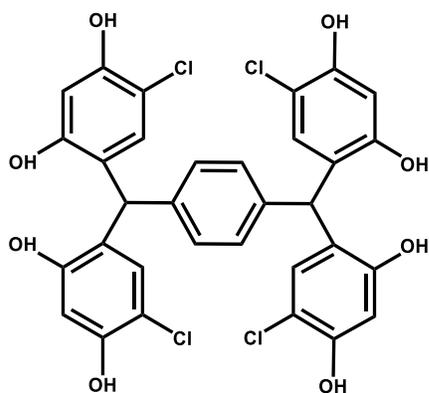


Tabla 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular de las líneas celulares tumorales humanas para los fármacos a 25 μ M en DMSO.

Compuesto	Línea celular						
	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
Ibuprofeno	NC	NC	NC	NC	2.4	0.6	NC
Naproxeno	NC	NC	22.9	NC	NC	NC	NC
Indometacina	20.4	NC	20.8	NC	NC	NC	NC
Clorambucilo	29.1	16.5	28.2	3.7	NC	26.2	42.2

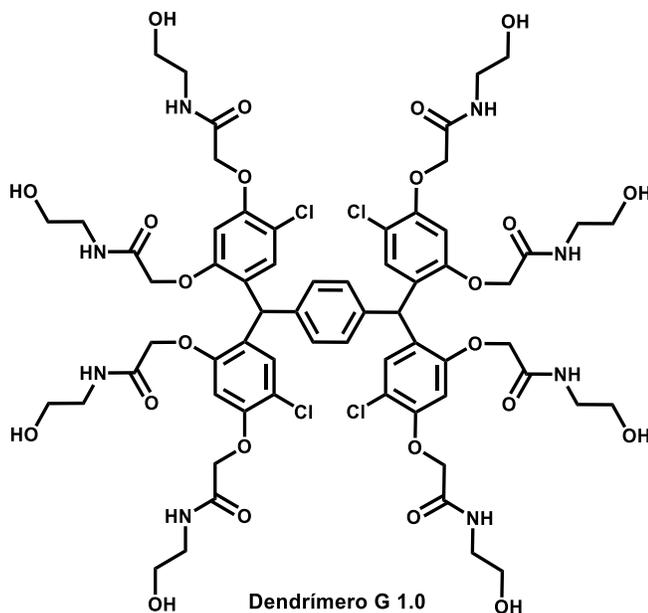
De la tabla 2, se puede observar que la actividad citotóxica en contra de las líneas celulares estudiadas el compuesto 3 en contra de las líneas U-251, K-562, HCT-15, MCF-7 y COS-7.

El dendrímero de G 1.0, no presentó ninguna actividad citotóxica. De esto, es importante recalcar que mientras que el núcleo 3 presento actividad contra la línea COS-7, mientras que el dendrímero de generación 1.0 ya no presenta dicha actividad.



Núcleo

3



Dendrímero G 1.0

7

Para el caso del conjugado **9** con clorambucilo presento una alta actividad en contra de cinco líneas celulares U-251, PC-3, K-562, MCF-7 y SKLU-1. De las cuales las más significativas fueron las de U-251 con un 34%, K-562 con un 38%. Para las líneas PC-3, MCF-7 y SKLU-1 con porcentajes de inhibición fueron del 23%. Cabe mencionar que ahora como conjugado el clorambucilo con el núcleo dendrimérico no presento actividad contra COS-7, lo que indica que es un prospecto para ser empleado como un fármaco anticancerígeno.

En el caso de los conjugados con fármacos antiinflamatorios como el ibuprofeno **11**, no presento actividad anticancerígena, mientras que los conjugados con indometacina y naproxeno presentaron actividad anticancerígena únicamente contra la línea celular U-251, el conjugado con indometacina con un porcentaje de inhibición del 17% mientras que el conjugado con naproxeno con un 9.6%. Este resultado es importante ya que los conjugados son selectivos a una sola línea celular.

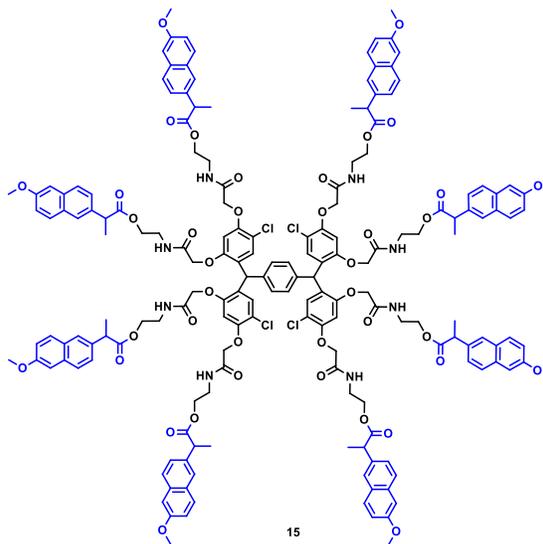
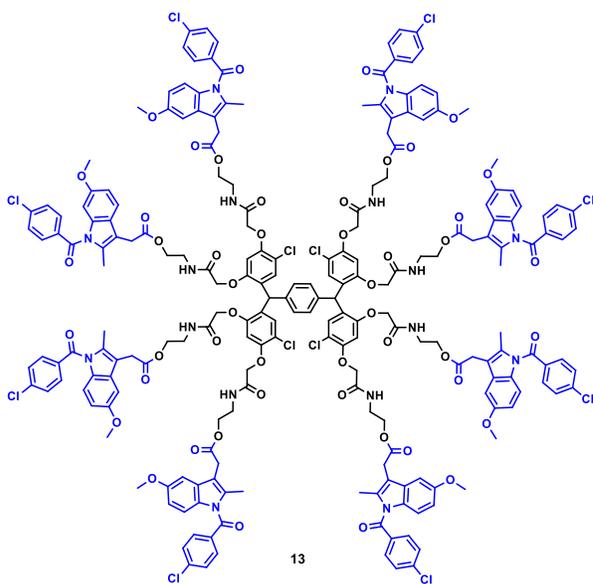
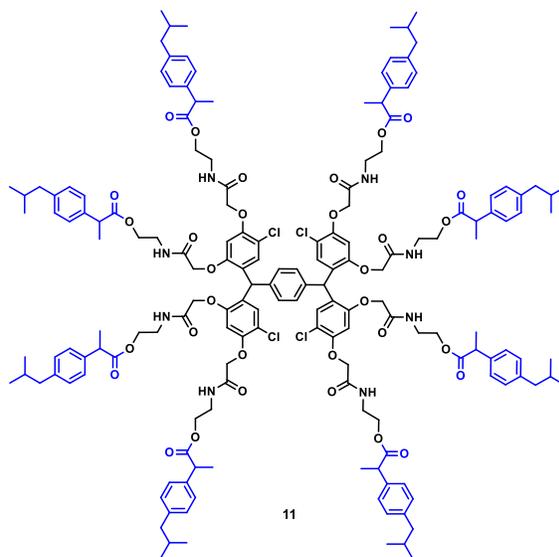
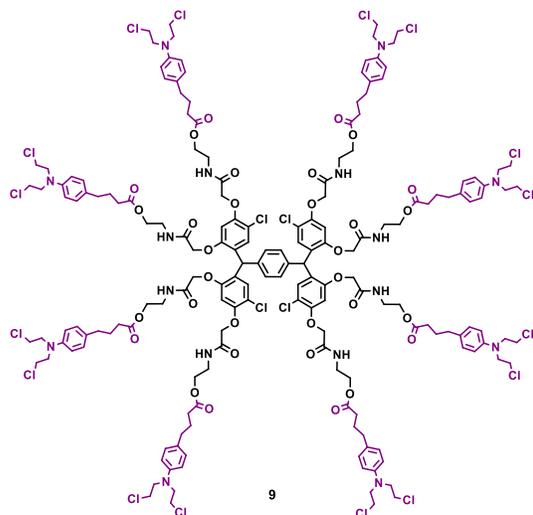


Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento celular de las líneas celulares tumorales humanas para los compuestos **3, 7, 9, 11, 13** y **15** a 25 μ M en DMSO.

Comp.	% de inhibición del crecimiento celular						
	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
3	8.3	NC	4.5	1.2	4.4	NC	6.5
7	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
9	34.4	23.2	38.7	8.2	22.7	23.6	NC
11	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
13	17.4	NC	NC	NC	NC	NC	NC
15	9.6	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Con base en los resultados obtenidos sobre la actividad anticancerígena se puede concluir que, el conjugado del resorcinareno abierto con clorambucilo es un buen prospecto para ser empleado como un fármaco anticancerígeno contra U-251 y K-562, y a su vez no presenta una actividad citotóxica en la línea COS-7, por lo que el clorambucilo conjugado presenta una mejor selectividad con respecto a células sanas con respecto al clorambucilo libre.

Para el caso de los conjugados con fármacos antiinflamatorios no esteroideos, se concluyó que el conjugado del resorcinareno abierto con indometacina es altamente selectivo contra una sola línea celular U-251.

Finalmente, se observó que los conjugados dendriméricos con clorambucilo y con fármacos no esteroideos con ibuprofeno, indometacina y naproxeno no presentan una actividad contra las células sanas COS-7.

Capítulo 7. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en la presente investigación, se puede concluir lo siguiente:

- Con base en los resultados obtenidos por RMN ^1H y ^{13}C , en una y dos dimensiones, FTIR, UV-vis, espectrometría de masas y análisis elemental, se confirmó que por primera vez, que se obtuvo el dendrímero de primera generación con una molécula de resorcinareno abierto y ocho grupos de etanolamina en su estructura.
- Se confirmó la obtención del conjugado resorcinareno-clorambucilo de primera generación, obteniendo ocho moléculas de clorambucilo en la periferia. Se ratificó la obtención de los conjugados dendrímeros con los AINES; ibuprofeno, indometacina y naproxeno, teniendo como resultado ocho moléculas del fármaco en los grupos terminales.

Con base en los resultados obtenidos sobre la actividad anticancerígena de los conjugados dendrímeros se puede concluir que:

- El conjugado de resorcinareno-clorambucilo presente actividad citotóxica en las líneas celulares U-251 (glía de sistema nervioso central) y K-562 (células de leucemia).
- Para los conjugados con fármacos antiinflamatorios no esteroideos se concluyó que el conjugado del resorcinareno abierto con indometacina es altamente selectiva contra una sola línea celular U-251 (glía de sistema nervioso central).
- Se observó que los conjugados dendriméricos con clorambucilo y con los fármacos no esteroideos como ibuprofeno, indometacina y naproxeno no presentan actividad contra las células sanas COS-7 (células de riñón de mono (no cancerosas)).

Capítulo 8. Artículo



Synthesis and anticancer activity of open-resorcinarene conjugates

Luis Daniel Pedro-Hernández^a, Carlos Hernández-Montalbán^a, Elena Martínez-Klimova^b,
Teresa Ramírez-Ápan^a, Marcos Martínez-García^{a,*}

^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior, Coyoacán, C.P 04510 México, D.F., Mexico

^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Interior, Coyoacán, C.P 04510 México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Open-resorcinarene
Dendrimers
Anticancer activity
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
Chlorambucil

ABSTRACT

The first example of conjugation of open-resorcinarenes with chlorambucil, ibuprofen, naproxen and indomethacin are presented. The cytotoxic properties of the obtained conjugates were tested against the cancer cell lines U-251, PC-3, K-562, HCT-15, MCF-7 and SKLU-1. It was found that the conjugate with chlorambucil, naproxen or indomethacin (having 8 moieties) was toxic towards cancer cell lines U-251 and K-562, with no activity against non-cancerous COS-7 cells. The conjugates with naproxen and indomethacin showed high selectivity towards U-251 tumor cells.

Introduction

Resorcinarenes represent a well-known family of macrocyclic compounds formed by 4, 5 or more resorcinol units connected by methylene bridges.¹ Recently, a new subclass of resorcinarenes was reported, named open-resorcinarenes² and pillar[n]enes.³ These molecules show a great diversity of properties. The three-dimensional shape of these molecules is directed by their conformation and can be readily controlled. The open-resorcinarenes with 4 or more phenols are particularly attractive, as they can be easily functionalized through O-alkylation reactions. This makes open-resorcinarenes extremely useful to obtain a new class of dendrimer cores⁴ due to the formation of functionalized multivalent systems. Conjugated dendrimer systems may improve the therapeutic efficiency by increasing their water solubility, bio-permeability and may help to overcome drug resistance, provide targeted delivery and reduce systemic toxicity.^{5,6} Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as ibuprofen, naproxen or indomethacin are three types of effective anti-inflammatory, antipyretic and analgesic drugs. The antitumor effect of NSAIDs is mainly attributed to the inhibition of cyclooxygenase (COX) enzyme activity, especially the inhibition of COX-2. COX-2 is over-expressed in many inflammatory and cancerous tissues and plays an important role in tumorigenesis.^{8–10} Our previous studies using resorcinarenes^{6,7,11} to obtain dendrimers to investigate their biological activity and selectivity against specific biological targets showed good anticancer activity (Scheme 1).

In this paper we report the synthesis of open resorcinarene-dendrimer conjugates with chlorambucil, ibuprofen, naproxen and indomethacin and their anticancer activity.

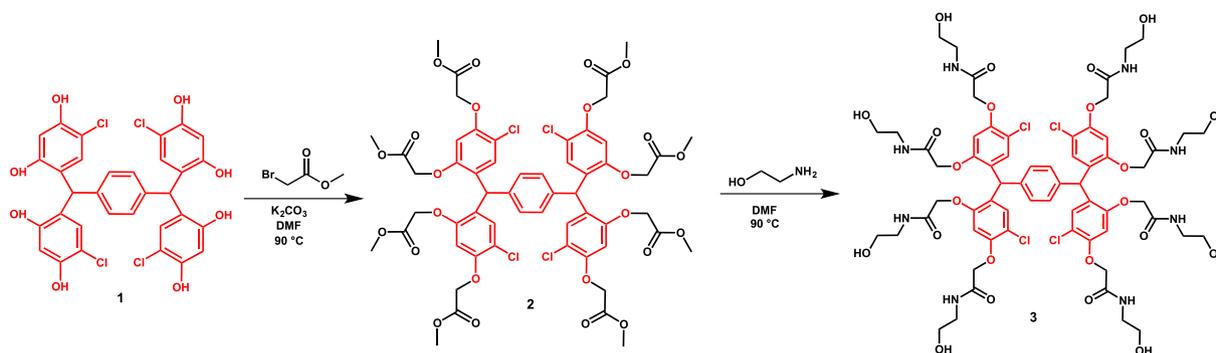
The open-resorcinarene **1** was obtained from terephthalaldehyde and 4-chlororesorcinol with methanesulfonic acid.¹² The open-resorcinarene-dendrimers were obtained in good yields. Initially from the open-resorcinarene **1** was obtained the ester derivative **2**. The ester was used to obtain the amide **3** with 8 hydroxyl groups at the end of the chain.

With terminal OH groups, the open resorcinarene-dendrimer was functionalized with the acid group of chlorambucil, ibuprofen, naproxen or indomethacin in DCC and DMAP to obtain the conjugates **3**, **4**, **5** and **6** with eight chlorambucil, ibuprofen, naproxen or indomethacin moieties (Scheme 2). Conjugate **4** was characterized by ¹H NMR spectroscopy. In the spectrum (Fig. 1a) we observed four multiples at δ_{H} 1.88, 2.04, 2.30 and 2.49 ppm corresponding to the hydrogens of the methylene groups CH₂–CH₂–CH₂–C=O *alpha*, *beta* and *gamma*, and to the carbonyl of the chlorambucil, respectively. At δ_{H} 3.60 and δ_{H} 3.66, two doublets corresponding to the methylene hydrogens (N–CH₂–CH₂–Cl) due to the *N*-alkylchlorinated chain, with a coupling constant of $J = 6.0$ Hz, $J = 6.0$ Hz respectively, were observed. At δ_{H} 6.04 ppm, a broad signal corresponding to the hydrogen of the methine bridge (CH) was observed. In the region of aromatics, three singlets were observed at δ_{H} 6.56, δ_{H} 6.74 and δ_{H} 7.02 ppm, corresponding to the protons of the aromatic rings of the open resorcinarene. For full characterization of the compounds, see Supplementary Material.

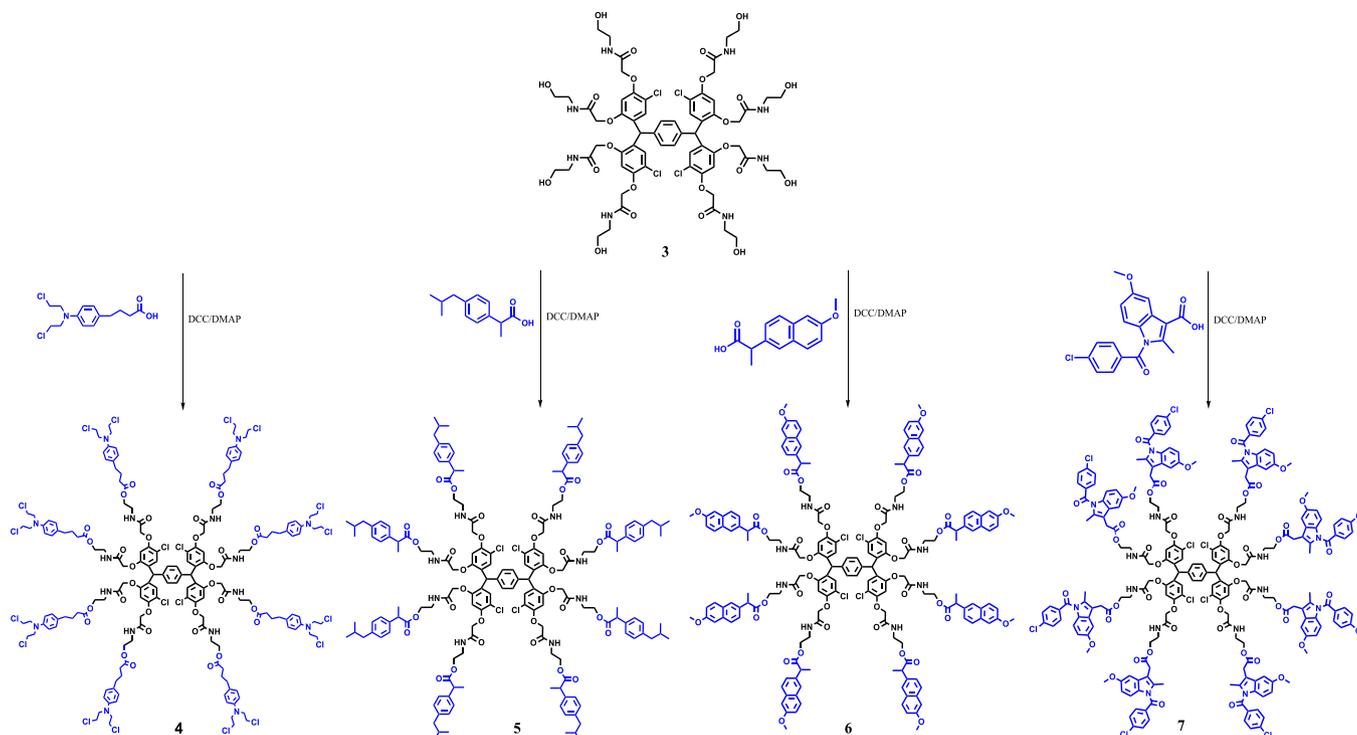
Conjugate **5** was characterized by ¹H NMR spectroscopy (Fig. 1b), and in the spectrum the most important signals are two signals at δ_{H} 0.85 and 2.42 and one multiplet at δ_{H} 1.78 due to the CH₃, CH₂ and CH group at the isopropyl group of ibuprofen respectively, and two

* Corresponding author.

E-mail address: margar@unam.mx (M. Martínez-García).



Scheme 1. Synthesis of open-resorcinarene dendrimer 3.



Scheme 2. Open-resorcinarene dendrimer conjugates of chlorambucil 4, ibuprofen 5, naproxen 6 and indomethacin 7.

doublets at δ_H 7.16 and δ_H 7.09 due to the *para* substituted phenyl at ibuprofen with a coupling constants $J = 7.5$ Hz, $J = 7.2$ Hz, respectively. For full characterization of the compounds, see [Supplementary Material](#).

Conjugate 6 was characterized by ^1H NMR spectroscopy (Fig. 1c), and in the spectrum the most important signals are two doublets at δ_H 1.45 and 1.53 due to the CH_3 groups, at δ_H 3.75 one multiplet due to the CH group, one triplet at δ_H 4.19 due the $\text{O}-\text{CH}_3$ group for the naproxen moiety. In the case of the aromatic protons of naproxen, four doublets were observed from δ_H 6.98 to δ_H 7.61 with coupling constants $J = 7.7$ Hz, $J = 7.4$ Hz, respectively. For full characterization of the compounds, see [Supplementary Material](#).

Conjugate 7 was characterized by ^1H NMR spectroscopy (Fig. 1d), and in the spectrum the most important signals are two singlets at δ_H 2.26 and δ_H 2.31 due to the CH_3 at indomethacin, two signals at δ_H 3.57 and δ_H 3.63 due to the $\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ groups and two signals at δ_H 3.68 and δ_H 3.74 due to $\text{O}-\text{CH}_3$ groups at indomethacin. Two doublets at δ_H 7.41 and δ_H 7.61 due to the aromatic protons of the *para* chloro-substituted benzene with a coupling constant $J = 8.4$ Hz, respectively, at the indomethacin moiety. For full characterization of the compounds, see [Supplementary Material](#).

All the synthesized compounds 1–7 and starting drugs

chlorambucil, ibuprofen, naproxen and indomethacin were screened for their cytotoxic activity against: U-251 (human glioblastoma), PC-3 (human prostatic adenocarcinoma), K-562 (human chronic myelogenous leukemia cells), HCT-15 (human colorectal adenocarcinoma), MCF-7 (human mammary adenocarcinoma), SKLU-1 (human lung adenocarcinoma) cancer cell lines and monkey kidney fibroblast cells (COS-7) according to the MTT method.¹³

The data is shown in [Table 1](#), revealing that three of the synthesized open-resorcinarenes and derivative-compounds 1–3 were not toxic against the listed above cancer cell lines as well as the starting ibuprofen. Naproxen was slightly active against the K-562 cell line. In contrast, indomethacin showed weak cytotoxicity against U-251 and K-562 and chlorambucil was active against all the studied cancer cell lines, also it was active against non-cancerous COS-7 cells with IC_{50} 43.51 ± 1.19 μM . Therefore, the concentration of the conjugates was diluted 8 times to have the anticancer activity for one molecule of the drug to compare to the free drug.

Cytotoxic activity tests revealed that free chlorambucil showed strong activity against the U-251, PC-3 and HCT-15 cell lines, as well as against normal COS-7 cells. In comparison, the chlorambucil-conjugate 4 showed similar activity against the U-251 cell line but improved activity against K-562, MCF-7, SKLU-1, and more importantly, was less

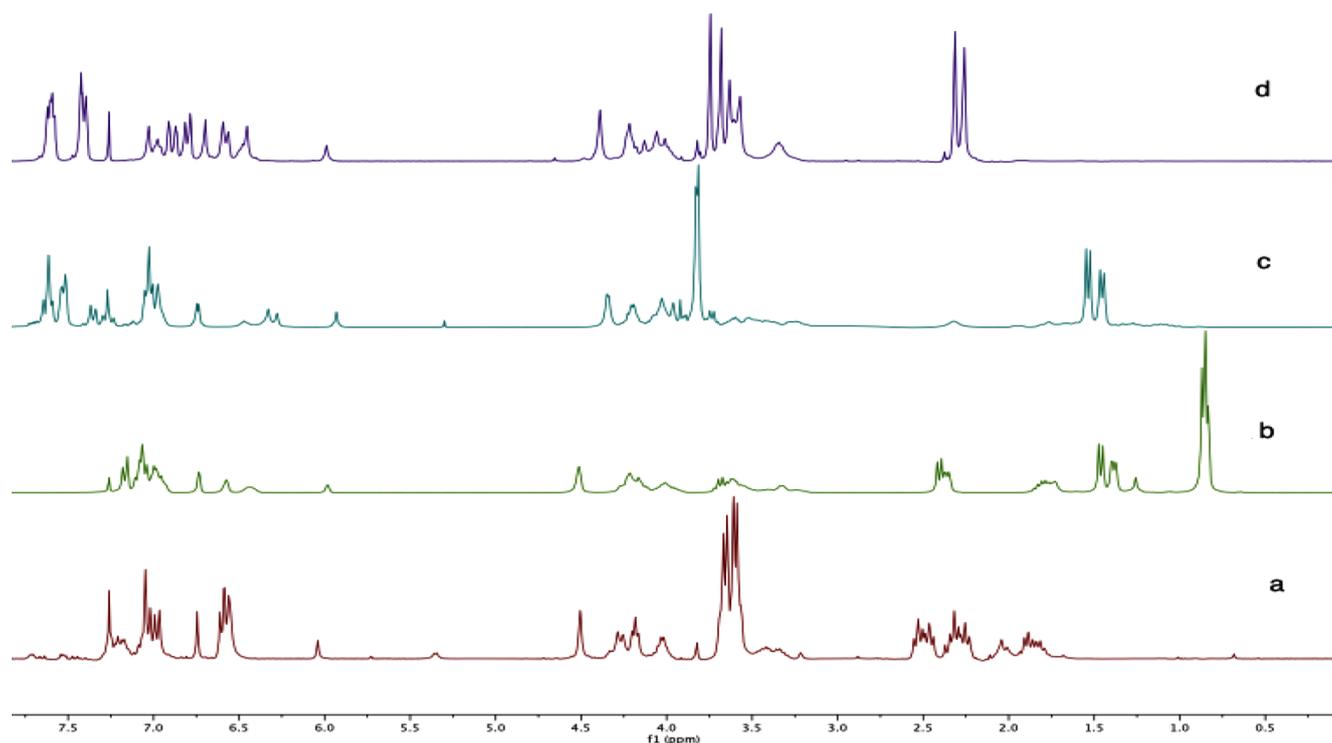


Fig. 1. ^1H NMR spectra of the conjugates with a) chlorambucil, b) ibuprofen, c) naproxen and d) indomethacin.

toxic for the normal COS-7 line. In the case of free ibuprofen, the strongest activity was observed against the MCF-7 and SKLU-1 cancer cell lines and was very slightly toxic against the COS-7 cell line. In comparison, the ibuprofen-conjugate 5 showed no activity against any cell line. Free naproxen was toxic only for the K-562 cancer cell line, but the naproxen-conjugate 6 showed toxicity only against the U-251 cancer cell line. Free indomethacin showed its strongest activity against U-251, and similar activity against the U-251 cell line was also observed with the indomethacin-conjugate 7.

Conjugates 4, 5, 6 and 7 were not toxic to the “normal” kidney fibroblast COS-7 cell line.

Novel conjugates of open-resorcinarene-dendrimers with chlorambucil, ibuprofen, naproxen and indomethacin were synthesized. Cytotoxic activity of all synthesized compounds was evaluated by their ability to inhibit metabolic activity against cell lines U-251 (human glioblastoma), PC-3 (human prostatic adenocarcinoma), K-562 (human chronic myelogenous leukemia cells), HCT-15 (human colorectal adenocarcinoma), MCF-7 (human mammary adenocarcinoma), and SKLU-1

(human lung adenocarcinoma). It was shown that compounds 4, 6 and 7 produced a noticeable cytotoxicity; in the case of conjugate 4 towards cancer cell lines U-251 and K-562 with no activity against non-cancerous COS-7 cells, whereas the conjugates 6 and 7 showed activity only against U-251 suggesting the selectivity of these conjugates to inhibit the growth of certain tumor cells. Collectively, the results suggest that compound 7 could inhibit cell proliferation. Conjugation of naproxen and chlorambucil seems to have contributed to the appearance of new cytotoxic properties.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Table 1

In vitro growth inhibitory effect of compounds 1–7 and chlorambucil, ibuprofen, naproxen, indomethacin in human cell lines.

Compound	IC ₅₀ (μM)						
	U-251	PC-3	K-562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	COS-7
Chlorambucil	33.11 ± 5.14	16.4 ± 2.14	103 ± 1.16	3.11 ± 3.24	> 100	300 ± 5.14	43.51 ± 1.19
Ibuprofen	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	92.14 ± 1.16	90.61 ± 1.11	> 1000
Naproxen	> 1000	> 1000	181 ± 1.16	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Indomethacin	20.45 ± 5.47	> 1000	190. ± 1.16	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
1	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
2	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
3	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
4	24.29 ± 4.09	34 ± 2.19	51.39 ± 1.32	201 ± 4.09	81 ± 4.09	80 ± 4.09	> 1000
5	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
6	50.3 ± 1.20	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
7	23.11 ± 2.14	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000

^aIC₅₀ (mM) values obtained from MTT assays. Cells were incubated with compounds for 48 h. The results represent the mean ± SD of two independent trials, performed in triplicate; NC non cytotoxic.

Acknowledgments

This research was funded by DGAPA, grant number IN232220 and EMK was supported by a postdoctoral fellowship from CONACyT. We would like to thank Huerta S. E., Patiño M. M. R., Peña Gonzalez M. A., Rios Ruiz L. F. Orta-Pérez Ma., and Gaviño Ramírez R.L., for technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127275>.

References

1. Gutsche CD, Muthukrishnan R. *J Org Chem.* 1978;43:4905–4906.

2. Kudo H, Hayashi R, Mitani K, Yokozawa T, Kasuga NC, Nishikubo T. *Angew Chem Int Ed.* 2006;45:7948–7952.
3. Hiroyuki T, Takemura H. *Curr Org Chem.* 2009;13:1633–1653.
4. Thakuria R, Sarma B, Nangia A. *New J Chem.* 2010;34:623–636.
5. Aitipamula S, Nangia A. *Supramol Chem.* 2005;17:17–25.
- [6]. Pedro-Hernández LD, Martínez-Klimova E, Cortez-Maya S, Mendoza-Cardozo S, Ramírez-Ápan T, Martínez-García M. *Nanomaterials.* 2017;7:163–173.
- [7]. Pedro-Hernández LD, Martínez-Klimova E, Martínez-Klimov ME, et al. *Curr Med Chem.* 2018;18:993–1000.
- [8]. Kurtoglu YE, Navath RS, Wang B, Kannan S, Romero R, Kannan RM. *Biomaterials.* 2009;30:2112–2121.
- [9]. Baron JA, Sandler RS. *Annu Rev Med.* 2000;51:511–523.
- [10]. Raegg C, Dormond O. *Sci World J.* 2001;1:808–811.
- [11]. Mendoza-Cardozo S, Pedro-Hernández LD, Organista-Mateos U, et al. *Drug Dev Ind Pharm.* 2019;45:683–688.
- [12]. Cominetti MMD, Hughes DL, Matthews SE. *Org Biomol Chem.* 2016;14:10161–10164.
- [13]. Monks A, Scudiero D, Skehan P, et al. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83:757–766.