



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DESARROLLO DE NUEVOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS PARA
APLICACIONES POTENCIALES EN LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE
FÁRMACOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. KENDRA IVÓN SORROZA MARTÍNEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. ERNESTO RIVERA GARCÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO DE NUEVOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS PARA
APLICACIONES POTENCIALES EN LA LIBERACIÓN CONTROLADA
DE FÁRMACOS**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. KENDRA IVÓN SORROZA MARTÍNEZ

**DR. ERNESTO RIVERA GARCÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES**



Ciudad de México, mayo 2023.



PARTE DEL PRESENTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN LOS SIGUIENTES CONGRESOS:

- ✓ XXIX International Materials Research Congress (IMRC-2021). Cancún, México. Trabajo: “First Class of Phosphorus Dendritic Compounds Containing B-Cyclodextrin Units in The Periphery Prepared by CuAAC”. Poster presentation.

- ✓ XXX International Materials Research Congress (IMRC-2022). Cancún, México. Trabajo: “Reversal of Tumbling Process in Phosphorus Dendritic Compounds Containing Cyclodextrin Units in The Periphery”. Poster presentation.

- ✓ International Conference on Polymers and Advanced Materials “Polymat 2022”, Huatulco, México, Trabajo: “Reversal of Tumbling Process in Phosphorus Dendritic Compounds Containing Cyclodextrin Units in The Periphery”. Poster presentation.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

- (1) **Sorroza-Martínez, K.**; González-Méndez, I.; Vonlanthen, M.; Moineau-Chane Ching, K. I.; Caminade, A. M.; Illescas, J.; Rivera, E. First Class of Phosphorus Dendritic Compounds Containing β -Cyclodextrin Units in the Periphery Prepared by CuAAC. *Molecules* 2020, 25 (18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184034>.

- (2) **Sorroza-Martínez, K.**; González-Méndez, I.; Vonlanthen, M.; Cuétara-Guadarrama, F.; Illescas, J.; Zhu, X. X.; Rivera, E. Guest-Mediated Reversal of the Tumbling Process in Phosphorus-Dendritic Compounds Containing β -Cyclodextrin Units: An Nmr Study. *Pharmaceuticals* 2021, 14 (6). <https://doi.org/10.3390/ph14060556>.





JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Sofía Guillermina Burillo Amezcua
Vocal	Dra. Liudmila Fomina
Vocal	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Vocal	Dr. Francisco Hernández Luis
Secretario	Dr. Gerardo Leyva Gómez

ASESOR

Dr. Ernesto Rivera García

SUSTENTANTE

M. en C. Kendra Ivón Sorroza Martínez





Este trabajo se desarrolló en:

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





AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme el privilegio de formar parte de ella.

Al Instituto de Investigaciones en Materiales por brindarme toda la infraestructura necesaria para realizar este proyecto de investigación.

Al Dr. Ernesto Rivera, por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo durante este tiempo, por confiar en mi trabajo y por sus aportaciones para mi desarrollo académico y personal, por su apoyo incondicional en todo momento.

Al apoyo financiero ofrecido por DGAPA a través del proyecto PAPIIT – IN103322 y por el Proyecto Bilateral México – Quebec CONACYT – FRQ 279380 para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, CVU: 771826), por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Francisco Hernández Luis y la Dra. María Josefa Bernad Bernad, por compartir sus conocimientos conmigo, por darme su apoyo y asesoría durante estos años, por su interés en mi formación y por preocuparse por mi progreso académico.

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

Al Q. Miguel Ángel Canseco por su asistencia en la realización de los espectros de UV-Visible.

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

Al Dr. Ignacio González Sánchez y al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, del departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, por realizar un extraordinario trabajo en la determinación de la actividad citotóxica.





A la M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz y a la Q. Eréndira García Ríos del área de Cromatografía del Instituto de Química por el apoyo en la realización de los espectros de masas.

A los integrantes del jurado, la Dra. Sofia Guillermina Burrillo Amezcuca, Dra. Liudmila Fomina, Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, el Dr. Francisco Hernández Luis y el Dr. Gerardo Leyva Gómez, por su disposición y sus valiosas aportaciones para enriquecer mi trabajo.





DEDICATORIAS

Dedico este trabajo al Dr. Israel González Méndez quien ha sido mi apoyo incondicional en todo momento. Gracias por creer en mí, por escucharme, por tus consejos sabios, por ayudarme y por estar a mi lado en cada momento feliz pero también en cada momento de incertidumbre. Gracias por ser esa persona tan especial y única que eres. Este logro también es tuyo AMOR DE MI VIDA porque sin tu amor y tu paciencia nada de esto hubiera sido posible; me has inspirado, motivado y ayudado a crecer como persona y como profesional. Que este trabajo sea una prueba más de nuestro amor, de nuestra confianza y de nuestra capacidad de hacer realidad nuestros sueños. TE AMO MÁS ALLÁ DE LAS PALABRAS.





Eres mi razón, mi paz, mi sol...eres lo que tanto a Dios yo le pedía.....SIMPLEMENTE GRACIAS POR ESTAR CONMIGO.....te llevo siempre conmigo AMOR DE MI VIDA...Israel G.M.





INDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Nanomedicina en el tratamiento del cáncer.....	5
1.2. Sistemas de administración de fármacos.....	7
1.3. Dendrimeros.....	9
1.3.1. Propiedades de los dendrimeros.....	11
1.3.1.1. Monodispersidad.....	11
1.3.1.2. Tamaño y forma a nanoescala.....	12
1.3.1.3. Polivalencia.....	12
1.3.1.4. Biocompatibilidad de los dendrimeros.....	12
1.3.1.5. Solubilidad.....	13
1.3.2. Dendrimeros en la administración de fármacos.....	13
1.3.3. Dendrimeros de fósforo.....	14
1.3.4. Ingeniería de superficie de los dendrimeros.....	16
1.4. Ciclodextrinas.....	17
1.4.1. Complejos de inclusión (CI) con CDs.....	19
1.4.2. Adamantano (Ad).....	20
1.5. Química “click”.....	20
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo general.....	24
4.2. Objetivos particulares.....	24
5. METODOLOGÍA	25
5.1. REACTIVOS Y EQUIPO.....	25
5.2. SÍNTESIS Y DESCRIPCIÓN.....	26
5.2.1. Síntesis de los intermediarios HO-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -alquino (n = 3 y 4), A y B.....	26





5.2.2.	Síntesis de P_3N_3 -[O-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -alquino] ₆ (n = 3 y 4) C y D.....	27
5.2.3.	Síntesis de 6-O-monotosil-β-ciclodextrina (mOTs-βCD), E.....	28
5.2.4.	Síntesis de 6-O-monoazido-β-ciclodextrina (mN ₃ -βCD), F.....	29
5.2.5.	Síntesis de los compuestos dendríticos P_3N_3 -[O-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -βCD] ₆ (n = 3 y 4) G y H.....	29
5.3.	DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS G Y H.....	31
5.4.	DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRIA POR EL MÉTODO DE JOB PARA LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS G Y H.....	31
5.5.	PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN (CI).....	31
5.5.1.	Método general para la preparación de CI.....	32
5.5.2.	Preparación del CI Compuesto dendrítico G/Ad-COOH (1:6).....	32
5.5.3.	Preparación del CI Compuesto dendrítico H/Ad-COOH (1:6).....	32
5.5.4.	Preparación del CI Compuesto dendrítico G/Ad-h-Dox (1:6).....	33
5.6.	DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS).....	33
5.7.	DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL CI COMPUESTO DENDRÍTICO G/Ad-h-Dox.....	34
5.8.	ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	34
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	35
6.1	SÍNTESIS.....	35
6.1.1.	Síntesis de los intermediarios HO-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -alquino (n = 3 y 4), A y B.....	35
6.1.2.	Caracterización de los intermediarios HO-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -alquino (n = 3 y 4), A y B.....	35
6.1.3.	Síntesis de P_3N_3 -[O-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -alquino] ₆ (n = 3 y 4), C y D.....	39
6.1.4.	Caracterización de los compuestos P_3N_3 -[O-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -alquino] ₆ (n = 3 y 4), C y D.....	39
6.1.5.	Síntesis de 6-O-monotosil-β-ciclodextrina (mOTs-βCD), E.....	43
6.1.6.	Caracterización del intermediario E.....	44
6.1.7.	Síntesis de 6-O-monoazido-β-ciclodextrina (mN ₃ -βCD), F.....	47
6.1.8.	Caracterización de 6-O-monoazido-β-ciclodextrina (mN ₃ -βCD), F.....	47
6.1.9.	Síntesis de los compuestos dendríticos P_3N_3 -[O-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -βCD] ₆ (n = 3 y 4) G y H.....	50
6.1.10.	Caracterización de los compuestos dendríticos P_3N_3 -[O-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -βCD] ₆ (n = 3 y 4) G y H.....	51
6.2.	DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS G Y H.....	55





6.3.	CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS P_3N_3 -[O-C ₆ H ₄ -O-(CH ₂) _n -BCD] ₆ (n = 3 Y 4) G Y H EN D ₂ O POR RMN.....	56
6.4.	DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA POR EL MÉTODO DE JOB PARA LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS G Y H.....	62
6.5.	PREPARACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN (CI).....	65
6.6.	CARACTERIZACIÓN DEL CI COMPUESTO DENDRÍTICO G/AdCOOH.....	65
6.7.	CARACTERIZACIÓN DEL CI COMPUESTO DENDRÍTICO G/Ad-h-Dox.....	69
6.8.	DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS).....	73
6.9.	DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL CI COMPUESTO DENDRÍTICO G/Ad-h-Dox.....	75
7.	CONCLUSIONES	79
8.	BIBLIOGRAFÍA	80
9.	ANEXOS	90

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores CI_{50} (μ M) a 48 h de tratamiento del compuesto dendrítico G y de los correspondientes CI.....	77
---	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los mecanismos de orientación pasiva y activa en los tumores.....	6
Figura 2. Sistemas de liberación de fármacos más utilizados en nanomedicina.....	9
Figura 3. Estructura general de un dendrímero.....	10
Figura 4. Principales métodos de síntesis de dendrímeros, (A) Síntesis divergente y (B) Síntesis convergente.....	11
Figura 5. Tipos de interacción dendrímero – fármaco: a encapsulación física, b interacción electrostática con la periferia, y c unión covalente con los grupos terminales.....	14
Figura 6. Estructura química de los dendrímeros de carbosilano y de los dendrímeros de fosfohidrazona.....	15
Figura 7. Ingeniería de superficie de los dendrímeros.....	17
Figura 8. Representaciones esquemáticas de (a) estructura química general de las CDs, (b) la estructura tridimensional de las CDs, y (c) estructura química y dimensiones de la α CD, β CD y γ CD.....	18
Figura 9. Formación del CI con β -ciclodextrina y una molécula huésped.....	20





Figura 10. Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) a 400 MHz del intermediario A.....	36
Figura 11. Espectro de ^{13}C – DEPTQ RMN (DMSO- d_6) a 100 MHz del intermediario A.....	37
Figura 12. Espectro de masas por DART del intermediario A.....	38
Figura 13. Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) a 400 MHz del intermediario C.....	40
Figura 14. Espectro de ^{13}C – DEPTQ RMN (DMSO- d_6) a 100 MHz del intermediario C.....	41
Figura 15. Espectro de ^{31}P RMN (DMSO- d_6) del intermediario C.....	42
Figura 16. Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) del intermediario E.....	45
Figura 17. Espectro de ^{13}C RMN (DMSO- d_6) del intermediario E.....	43
Figura 18. Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) del intermediario F.....	48
Figura 19. Espectro de ^{13}C RMN (DMSO- d_6) del intermediario F.....	49
Figura 20. Asignación de los hidrógenos en RMN del compuesto dendrítico G.....	52
Figura 21. Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) del compuesto dendrítico G.....	53
Figura 22. Espectro de RMN 2D HMQC (DMSO- d_6) del compuesto dendrítico G.....	54
Figura 23. Espectro de ^{31}P RMN (DMSO- d_6) del compuesto dendrítico G.....	55
Figura 24. Espectro de ^1H RMN del compuesto dendrítico G en D_2O	58
Figura 25. Espectro de RMN 2D HMQC del compuesto dendrítico G en D_2O	59
Figura 26. Espectro de RMN 2D NOESY del compuesto dendrítico G en D_2O	60
Figura 27. Amplificación de las zonas (A) aromática y (B) alifática en el espectro de RMN 2D NOESY del compuesto dendrítico G en D_2O	61
Figura 28. Las 13 posibles conformaciones propuestas para los compuestos dendríticos G y H con 0 a 6 cavidades invertidas.....	62
Figura 29. Titulación por RMN ^1H del compuesto dendrítico G.....	63
Figura 30. Gráfica de Job para el CI del compuesto dendrítico G/AdCOOH.....	64
Figura 31. Espectro de ^1H RMN del CI G/AdCOOH en D_2O	66
Figura 32. Espectro de RMN 2D NOESY del CI G/AdCOOH en D_2O	67
Figura 33. Amplificación de las zonas (A) aromática y (B) alifática en el espectro de RMN 2D NOESY del CI G/AdCOOH en D_2O	68
Figura 34. Análisis térmico por DSC del CI G/AdCOOH.....	69
Figura 35. Espectro de ^1H RMN del CI G/Ad-h-Dox en D_2O	70
Figura 36. Espectro de RMN 2D NOESY del CI G/Ad-h-Dox en D_2O	71
Figura 37. Amplificación de la zona alifática del espectro de RMN 2D NOESY del CI G/Ad-h-Dox en D_2O	71
Figura 38. Análisis térmico por DSC del CI G/Ad-h-Dox.....	72





Figura 39. Análisis térmico por TGA del CI G/Ad-h-Dox.....	73
Figura 40. Distribución de tamaño del compuesto dendrítico G.....	74
Figura 41. Distribución de tamaño del CI G/Ad-h-Dox.....	74
Figura 42. Cinética de liberación de Dox del CI G/Ad-h-Dox.....	76

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntesis de los compuestos dendríticos $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ (n=3 o 4) (G y H).....	26
Esquema 2. Preparación del CI G/Ad-COOH (1:6).....	32
Esquema 3. Preparación del CI H/Ad-COOH (1:6).....	33
Esquema 4. Preparación del CI G/Ad-h-Dox (1:6).....	33
Esquema 5. Síntesis de los intermediarios A y B.....	35
Esquema 6. Síntesis de los intermediarios C y D.....	39
Esquema 7. Síntesis del intermediario E.....	43
Esquema 8. Síntesis del intermediario F.....	47
Esquema 9. Ruta sintética para la obtención de los compuestos dendríticos G y H.....	50





RESUMEN

Bajo este contexto, el presente proyecto consiste en el diseño, síntesis y caracterización de dos nuevos compuestos dendríticos homólogos que contienen un núcleo hexafuncional de ciclotrifosfaceno (P_3N_3) y unidades de β -ciclodextrina (β CD) en la periferia; se seleccionó a la β CD ya que por el tamaño de su cavidad puede encapsular una gran variedad de fármacos, además ya está aprobada por la FDA para su uso como excipiente. Químicamente, es un oligosacárido cíclico compuesto por siete unidades de glucopiranosas, al presentar una estructura tridimensional de cono truncado presenta una superficie hidrofílica y una cavidad hidrofóbica que le permite formar complejos de inclusión (CI) con moléculas huésped de la misma naturaleza.

Para la construcción de los compuestos dendríticos, el P_3N_3 y la β CD se unieron mediante la reacción de cicloadición azida – alquino catalizada por cobre (I) (CuAAC, por sus siglas en inglés), la cual es una herramienta poderosa en la fabricación de nuevos materiales. Para obtener la completa sustitución de las seis posiciones del núcleo de P_3N_3 , se estudiaron dos enlazadores que consisten en un anillo aromático y una cadena alifática con diferente tamaño. Se obtuvo que con ambos enlazadores se logró funcionalizar totalmente la periferia y así se obtuvieron los dos compuestos dendríticos P_3N_3 - $[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta$ CD] $_6$ ($n = 3$ (CD G) y 4 (CD H)). Los compuestos dendríticos G y H presentaron una solubilidad en agua considerablemente alta (>1 g/mL).

Por otra parte, se realizó el análisis conformacional en agua de los compuestos dendríticos G y H para determinar si la cavidad de la β CD estaba disponible para formar complejos de inclusión con moléculas huésped. Se encontró que la molécula de glucopiranosas modificadas de las unidades de β CD presentaba un fenómeno de volteo de 360° , resultando en la inclusión del enlazador en la cavidad de la β CD. Este fenómeno limitaría la posibilidad de que los compuestos dendríticos puedan complejar otras moléculas. Utilizando una molécula huésped con alta afinidad a la cavidad de la β CD, el ácido 1-adamantancarboxílico (AdCOOH), se logró revertir este fenómeno de volteo. Se utilizó la versatilidad del AdCOOH para construir un profármaco con la doxorubicina (Dox), un fármaco utilizado en la quimioterapia. El AdCOOH y la Dox se unieron a través de un enlace hidrazona (Ad-h-Dox) el cual se hidroliza en presencia de valores de pH ácidos.

Un vez que se construyó el profármaco Ad-h-Dox, se formó el CI compuesto dendrítico G/Ad-h-Dox, el cual fue caracterizado en sólido, por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA); y en solución, por RMN 2D y dispersión dinámica de la luz (DLS). Se llevó a cabo el estudio de la liberación de la carga terapéutica del CI G/Ad-h-Dox a diferentes valores de pH





(7.4, 6.5, 4.5 y 3.5) y se determinó que la liberación del fármaco (Dox) sucede solo a valores de pH ácidos (4.5 y 3.5).

Todos los compuestos obtenidos y los CI se probaron en líneas celulares carcinogénicas HeLa (adenocarcinoma cervical humano), K-562 (leucemia mieloide crónica humana), SKLU-1 (adenocarcinoma de pulmón humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano, triple negativo), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano, positivo a receptores de estrógeno) y SW-620 (cáncer de colon). En conclusión, el diseño racional de estos compuestos dendríticos $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ ($n = 3$ (CD G) y 4 (CD H)) permitió la liberación controlada del fármaco Dox y presentaron una actividad biológica similar al fármaco libre, por lo que, estos sistemas de liberación controlada de Dox tienen potencial aplicación en el tratamiento del cáncer.





ABSTRACT

In this context, the present project consists of the design, synthesis, and characterization of two new homologous dendritic compounds that contain a hexafunctional nucleus of cyclotriphosphazene (P_3N_3) and β -cyclodextrin (β CD) units in the periphery; β CD was selected since, due to the size of its cavity, it can encapsulate a wide variety of drugs, and it is also already approved by the FDA for use as an excipient. Chemically, it is a cyclic oligosaccharide composed of seven glucopyranose units, presenting a three-dimensional structure of a truncated cone, it has a hydrophilic surface and a hydrophobic cavity that allows it to form inclusion complexes (IC) with guest molecules of the same nature.

For the construction of dendritic compound, P_3N_3 and β CD were joined by the copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) reaction, which is a powerful tool in the fabrication of new materials. To obtain the complete substitution of the six positions of the core of P_3N_3 , two linkers consisting of an aromatic ring and an aliphatic chain with different sizes were studied. It was obtained that with both linkers it was possible to fully functionalize the periphery and thus the two dendritic compounds P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n- β CD]₆ (n = 3 (DC G) and 4 (DC H)) were obtained. Dendritic compounds G and H presented considerably high-water solubility (>1 g/mL).

On the other hand, conformational analysis in water of dendritic compounds G and H was performed to determine if the β CD cavity was available to form inclusion complexes with guest molecules. The modified glucopyranose molecule of the β CD units was found to exhibit a 360° tumbling phenomenon, resulting in the inclusion of the linker in the β CD cavity. This phenomenon would limit the possibility that dendritic compounds can complex other molecules. Using a guest molecule with high affinity to the β CD cavity, 1-adamantancarboxylic acid (AdCOOH), it was possible to reverse this tumbling phenomenon. The versatility of AdCOOH was used to construct a prodrug with doxorubicin (Dox), a drug used in chemotherapy. AdCOOH and Dox were linked through a hydrazone bond (Ad-h-Dox) which hydrolyzes in the presence of acidic pH values.

Once the Ad-h-Dox prodrug was constructed, the CI dendritic compound G/Ad-h-Dox was formed, which was characterized in solid, by differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA); and in solution, by 2D NMR and dynamic light scattering (DLS). The study of the release of the therapeutic load of CI G/Ad-h-Dox was carried out at different pH values (7.4, 6.5, 4.5 and 3.5) and it was determined that the release of the drug (Dox) occurs only at acid pH values (4.5 and 3.5).





All obtained compounds and ICs were tested in carcinogenic cell lines HeLa (human cervical adenocarcinoma), K-562 (human chronic myeloid leukemia), SKLU-1 (human lung adenocarcinoma), MDA-MB-231 (human breast adenocarcinoma, triple negative), MCF-7 (human breast adenocarcinoma, estrogen receptor positive), and SW-620 (colon cancer). In conclusion, the rational design of these dendritic compounds $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ ($n = 3$ (DC G) and 4 (DC H)) allowed the controlled release of the drug Dox and they presented a biological activity similar to the free drug, therefore, these Dox controlled release systems have potential application in the treatment of cancer.





1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nanomedicina en el tratamiento del cáncer

Se puede definir a la nanomedicina como la nanotecnología aplicada a la salud y la medicina. La nanomedicina es un campo pionero de la nanotecnología, que, junto con la integración de otras disciplinas, como la biología, la ciencia de los materiales, la química, la ingeniería biomédica, la farmacología y la química medicinal han permitido avances considerables en su desarrollo. La nanomedicina se ocupa del desarrollo de poderosas técnicas para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades y administrar ciertos compuestos con actividad biológica para su tratamiento¹⁻³.

En comparación con las terapias convencionales para el tratamiento del cáncer, la nanomedicina se ha convertido en un método innovador, debido a su alto potencial y eficacia con una toxicidad mínima, en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer¹.

Un desafío clave que debe superarse antes de que se pueda maximizar la eficacia del tratamiento de varias enfermedades, entre ellas el cáncer, es el transporte de los fármacos al sitio objetivo. Además, la falta de selectividad, los efectos secundarios indeseables, la eficacia limitada y la mala biodistribución son solo algunos de los problemas que se encuentran al usar las terapias convencionales. Por lo tanto, las investigaciones se están enfocando en desarrollar sistemas que estén altamente regulados y puedan cumplir múltiples funciones. Cuando un fármaco se dirige con éxito a un sitio deseado y se acumulan principalmente allí, se denomina “entrega dirigida”. Se utilizan dos tipos de entrega dirigida para la administración de fármacos basados en nanotecnología: la orientación pasiva y activa (Figura 1).



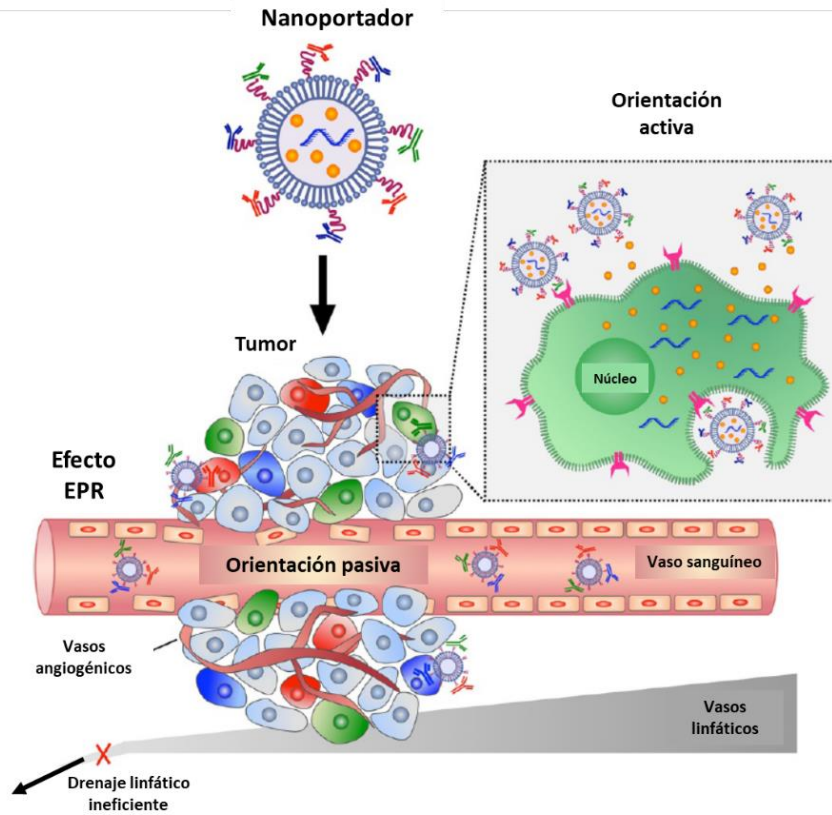


Figura 1. Representación de los mecanismos de orientación pasiva y activa en los tumores. Imagen tomada de Peer⁴.

En el primer método, la orientación pasiva, se utilizan las propiedades del sitio del tumor para concentrar los nanoacarreadores en el mismo. Los principales factores utilizados para esto son el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR, por sus siglas en inglés) y el microambiente tumoral. En el efecto EPR se utilizan los espacios intersticiales que se generan entre las células endoteliales adyacentes por la presencia de vasos sanguíneos angiogénicos imperfectos en el tejido tumoral. Además, también hay un sistema de drenaje linfático ineficiente; por lo tanto, los nanoacarreadores eventualmente ingresarán a los tejidos tumorales y se quedarán retenidos, lo que resulta en una permeabilidad y retención aumentada, favoreciendo la orientación pasiva en los tumores. La acumulación de los nanoacarreadores en los tumores está determinada por una serie de factores, incluidas sus propiedades de superficie, su tamaño, la vida media en circulación sistémica que presenten y el grado de angiogénesis en el tumor³. El microambiente tumoral alterado también puede ser utilizado por muchos nanoacarreadores para administrar fármacos en el tumor, se utilizan



propiedades del microambiente como pH ácido, un mayor potencial redox y una secreción diferente de enzimas¹.

En la orientación activa, también se utilizan las propiedades de las células tumorales, como los receptores de superficie celular sobreexpresados por las células cancerosas. Sin embargo, la focalización se logra mediante la decoración de las superficies de los nanoportadores con ligandos que se unen a los receptores sobreexpresados en las células tumorales. Esta estrategia mejorará la afinidad de los nanoportadores por la superficie de las células cancerosas y, por lo tanto, aumentará la penetración del fármaco¹. Se han reconocido un gran número de receptores y sus ligandos, los cuales se han sintetizado e investigado su comportamiento *in vitro* e *in vivo*. Estas uniones ligando – receptor se han convertido en potenciales modelos para promover la tecnología de la orientación activa⁵.

Actualmente, existe un gran interés en la aplicación de la nanomedicina como medio para desarrollar nuevos sistemas y herramientas de administración de fármacos³. Se han diseñado una amplia variedad de sistemas de liberación de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés) que han mostrado ser candidatos potenciales para el diagnóstico y la terapia eficaz contra el cáncer. Los DDS presentan varias ventajas sobre las terapias convencionales como mejorar la acumulación de fármacos en los tejidos tumorales mediante la orientación pasiva y/o activa; mejoran la farmacocinética de los sistemas prolongando el tiempo en circulación; protegen los fármacos de la degradación; potencian otras estrategias terapéuticas como las radioterapias, la terapia fotodinámica, la terapia fototérmica, etc.; y disminuyen la toxicidad causada por los fármacos terapéuticos².

1.2. Sistemas de administración de fármacos

En los últimos años, el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos representa una revolución en la medicina, ya que se han diseñado para abordar las deficiencias de la administración convencional de medicamentos y para mejorar el cumplimiento del paciente⁶. Se define a los DDS como un dispositivo o una formulación que permite la introducción de un fármaco en el cuerpo. Mejoran su seguridad y eficacia al controlar la velocidad, el tiempo y el lugar de liberación de los fármacos en el cuerpo⁷. También, mejoran la absorción del fármaco y lo protegen de la degradación.

Cuando el fármaco es transportado por un DDS, el perfil de distribución y de eliminación de éste se rige principalmente por las características del vehículo más que por las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Por esta razón los DDS se han explotado para mejorar la eficacia del fármaco y el índice





terapéutico, al mismo tiempo que se minimiza la toxicidad del fármaco y los efectos secundarios fuera del objetivo⁸.

El perfil espacio – temporal de las características intracelulares es bastante específico en el tumor y puede adoptarse para reconocer selectivamente células cancerosas al detectar condiciones anormales. En los últimos años, se han diseñado DDS que funcionen bajo demanda de los niveles intracelulares o subcelulares, que puedan detectar y sentir señales biológicas intracelulares particulares, y responder lógicamente a las condiciones específicas para liberar los fármacos en el momento correcto. Se han utilizado parámetros biológicos como el pH intracelular, el glutatión, las especies reactivas de oxígeno, la hipoxia, las enzimas, el adenosín trifosfato, etc⁹.

El pH se ha aplicado durante mucho tiempo como un desencadenante interno ideal en el diseño de terapias que responden a estímulos con el objetivo de la liberación discriminatoria de medicamentos contra el cáncer en los tejidos tumorales o dentro de las células tumorales. Se cree que el gradiente de pH aparente en los tumores se atribuye al aumento de la glucólisis, seguida de la producción de protones y de lactato. En general, el valor normal de pH de los tejidos y la sangre es entre 7.35 – 7.45, mientras que el pH extracelular tumoral oscila entre 7.2 – 6.5. El pH después de la endocitosis cambia de una forma más radical, donde el valor del pH puede caer a 6.0 – 5.5 en los endosomas tempranos, a 5.5 – 4.5 en los endosomas tardíos e incluso a 4.5 – 3.5 en los lisosomas. La acidez en varios orgánulos subcelulares ha sido el estímulo más utilizado para desencadenar la liberación de fármacos en los DDS⁹⁻¹².

Dentro de los DDS que se han desarrollado para la nanoterapia antitumoral están los liposomas, las micelas, los dendrímeros, las nanocápsulas, los polimerosomas, los niosomas, los nanotubos de carbono, y las nanopartículas poliméricas, lipídicas e inorgánicas¹³⁻¹⁵ (Figura 2). Debido a su estructura macromolecular única y bien definida, los dendrímeros son andamios atractivos para una variedad de aplicaciones en el campo de la investigación biomédica, se están empleando ampliamente para para la administración de fármacos en aplicaciones oncológicas y con propósito de diagnóstico. Los dendrímeros pueden contener fármacos, ligandos dirigidos o agentes de imagen, aunque también pueden ser útiles para otros fines, como las transfección de genes para administrar combinaciones de fármacos en sitios específicos del tumor con mayor eficacia y menos daño a los órganos que no son el objetivo¹⁶.



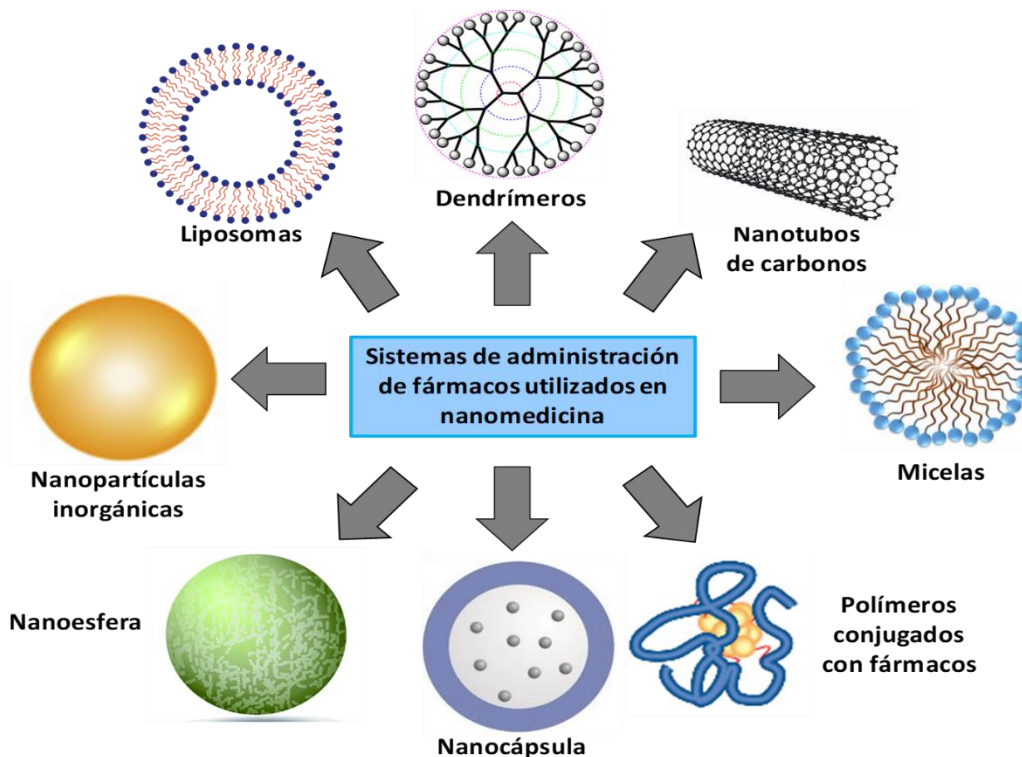


Figura 2. Sistemas de liberación de fármacos más utilizados en nanomedicina.

1.3. Dendrimeros

Dendrímero es un término derivado de la palabra griega: “dendri” que significa ‘como un árbol’ y “meros” que significa ‘una parte de’. Los dendrimeros son moléculas que no se encuentran de forma natural, sino que se construyen sintéticamente en los laboratorios. Estos tienen ramificaciones similares a una estructura en forma de árbol y son nanomoléculas con forma esférica y simetría radial. Un dendrímero está compuesto por tres partes: (a) un núcleo, (b) múltiples capas de ramificaciones compuestas por unidades repetitivas; y (c) una superficie que contiene los grupos funcionales de la última generación (Figura 3). La generación ‘G’ del dendrímero depende de las capas de ramificación, y es el número de generaciones lo que ayuda a determinar el tamaño total de un dendrímero¹⁷. Al menos tres rasgos característicos de los dendrimeros contrastan fuertemente con los de los polímeros lineales: (i) un dendrímero se puede aislar como un único compuesto monodisperso; (ii) a medida que aumenta su peso molecular, las propiedades de los dendrimeros (solubilidad, reactividad química, etc.) están denominadas por la naturaleza de los grupos terminales y (iii) el crecimiento de los dendrimeros está matemáticamente limitado, debido al impedimento estérico que presentan las generaciones más altas¹⁶.

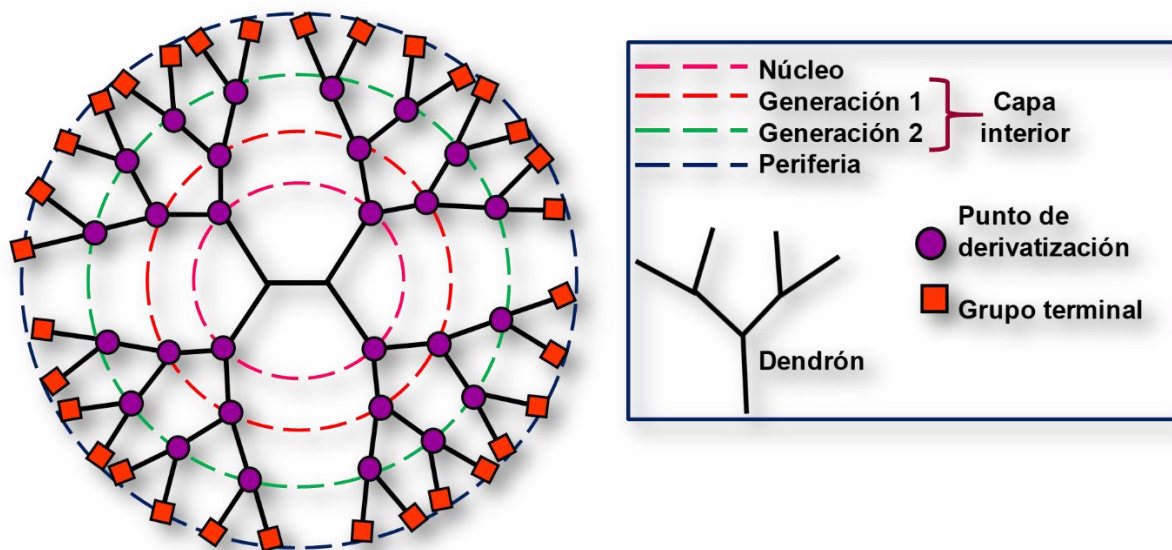
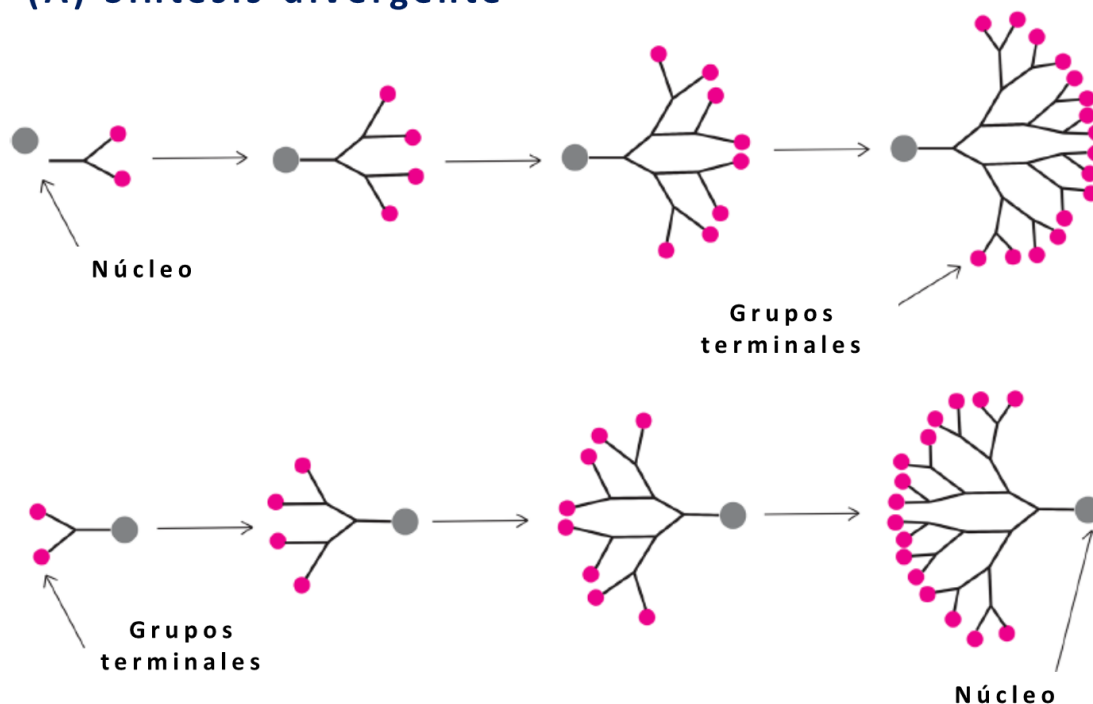


Figura 3. Estructura general de un dendrímero.

Los dendrímeros se sintetizan mediante diversos tipos de metodologías, como la síntesis divergente, la síntesis convergente, el crecimiento exponencial mixto, el método de hipernúcleos y el de monómeros ramificados, química “click”, etc. De todas ellas, la síntesis divergente y la síntesis convergente son las más utilizadas (Figura 4). El método divergente implica hacer crecer el dendrímero hacia afuera desde el núcleo, a través de pasos repetidos de acoplamiento y activación. Este método de síntesis es más favorable para la fabricación a gran escala, ya que requiere menos trabajo de purificación¹⁷⁻¹⁹. En contraste, en la síntesis convergente, el crecimiento comienza en la periferia del dendrímero y avanza hacia el núcleo, se hacen reaccionar varios dendrones con un núcleo multifuncional para obtener el producto. Este método permite la construcción de dendrímeros asimétricos, pero requiere numerosos pasos de purificación, por lo que es menos utilizado para comercialización de dendrímeros^{16,20}.

(A) Síntesis divergente



(B) Síntesis convergente

Figura 4. Principales métodos de síntesis de dendrímeros, (A) Síntesis divergente y (B) Síntesis convergente. Imagen tomada y modificada de Nikzamir et al²¹.

1.3.1. Propiedades de los dendrímeros

Los dendrímeros presentan propiedades que los hacen particularmente útiles para una gran variedad de aplicaciones, como bajo índice de polidispersión, tamaño y forma a nanoescala, polivalencia, biocompatibilidad y solubilidad.

1.3.1.1. Monodispersidad

Los dendrímeros son la clase de macromoléculas que se pueden construir con estructuras moleculares bien definidas y por lo tanto, se pueden obtener monodispersos a diferencia de los polímeros lineales, cuya síntesis produce una gama de especies moleculares que difieren en peso molecular. La monodispersidad de tamaño en los dendrímeros es el resultado de una síntesis iterativa bien diseñada, que permite que las reacciones se completen y que los productos dendríticos se purifiquen en pasos intermedios durante su crecimiento. La monodispersidad de los dendrímeros se ha



verificado ampliamente mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), espectrometría de masas (MS), electroforesis en gel y microscopia electrónica de barrido (TEM)²².

1.3.1.2. Tamaño y forma a nanoescala

Se ha reportado que los dendrímeros de generaciones inferiores (G0 – G3) presentan formas elipsoidales, mientras que los dendrímeros de generación superior (G4 – G10) tienen formas casi esféricas. Se ha reportado que entre mayor sea la generación del dendrímero se vuelven más globulares para extender su estructura molecular y así, disminuir la repulsión entre las ramas, característica que los vuelve imitadores sintéticos de las proteínas²².

1.3.1.3. Polivalencia

A diferencia de los polímeros lineales que contienen solo dos grupos terminales, los dendrímeros cuentan con múltiples grupos terminales que aumentan exponencialmente conforme aumentan la generación y, por lo tanto, estos grupos terminales se convierten en la interfaz principal entre el dendrímero y su entorno. Dependiendo de que grupos funcionales estén unidos en la periferia de un dendrímero, es como pueden comportarse para participar en múltiples interacciones con receptores en estructuras biológicas como membranas celulares²².

1.3.1.4. Biocompatibilidad de los dendrímeros

Para poder utilizar a los dendrímeros como agentes biológicos, tienen que cumplir ciertas demandas biológicas. Los dendrímeros deben ser: no tóxicos, no inmunogénicos (a menos que se trate de una vacuna), capaz de atravesar las barreras biológicas, capaces de permanecer en circulación durante el tiempo necesario para tener un efecto clínico y de interactuar con estructuras específicas²².

La citotoxicidad de los dendrímeros se ha estudiado ampliamente; se ha informado que, independientemente de la estructura, los dendrímeros catiónicos tenían generalmente un efecto más hemolítico y citotóxico incluso en concentraciones relativamente bajas en comparación con los dendrímeros aniónicos y neutros. También se ha informado que la hemólisis aumenta con el aumento de la generación²².





1.3.1.5. Solubilidad

En comparación con los análogos lineales, los dendrímeros demuestran una solubilidad significativamente mayor. Las interacciones iónicas, los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas son los mecanismos por los cuales los dendrímeros aumentan su solubilidad. Por lo tanto, los dendrímeros son capaces de mejorar la solubilidad, la biodistribución y la eficacia de agentes terapéuticos. La presencia de varios grupos terminales es responsable de la alta solubilidad y reactividad de los dendrímeros. Los dendrímeros con una superficie con grupos hidrofílicos son solubles en disolventes polares, mientras que los dendrímeros con grupos hidrofóbicos son solubles en disolventes no polares. Además de los grupos funcionales; la naturaleza de las unidades repetitivas, el número de generación y el núcleo, también influyen en la solubilidad del dendrímero²³.

1.3.2. Dendrímeros en la administración de fármacos

Como ya se mencionó, los dendrímeros han demostrado ser un sistema ideal de administración de fármacos debido a su particular estructura y propiedades únicas. La estructura de los dendrímeros determina el número y tipo de molécula de fármaco que puede formar complejos con los dendrímeros o incorporarse a ellos. El número de generación de los dendrímeros afecta el potencial de carga de fármaco: generaciones altas de dendrímeros proporcionan más espacio para la molécula huésped y posee una mayor cantidad de grupos funcionales para la interacción con las moléculas²¹.

Existen diversos tipos de interacción que se puede llevar a cabo entre los dendrímeros y los fármacos: encapsulación física, interacciones electrostáticas y unión covalente (Figura 5). En el primer mecanismo de interacción, los dendrímeros encapsulan a la moléculas de fármaco dentro de sus ramas, debido a la naturaleza abierta de la estructura dendrítica. Los fármacos poco solubles pueden interactuar con las cavidades internas a través de interacciones hidrofóbicas porque éstas cavidades son de la misma naturaleza. Para maximizar el potencial de carga de fármaco dentro del dendrímero, las características de las cavidades internas deben considerarse cuidadosamente en el diseño de la estructura dendrítica.

En el mecanismo de interacciones electrostáticas, las moléculas de fármaco que poseen cargas opuestas a las cargas que poseen los grupos funcionales de la periferia del dendrímero, son atraídas y por lo tanto, se forma una interacción electrostática, la cual puede aumentar la solubilidad de los fármacos hidrofóbicos. Finalmente, en el último mecanismo de interacción dendrímero – fármaco, las moléculas de fármaco son conjugadas de forma covalente a los dendrímeros. Cuando los fármacos se



unen covalentemente a los dendrímeros, su liberación se produce por ruptura enzimática o química de enlaces fácilmente escindibles. Este tipo de unión mejora la estabilidad de los fármacos y proporciona una mejor liberación controlada²¹.

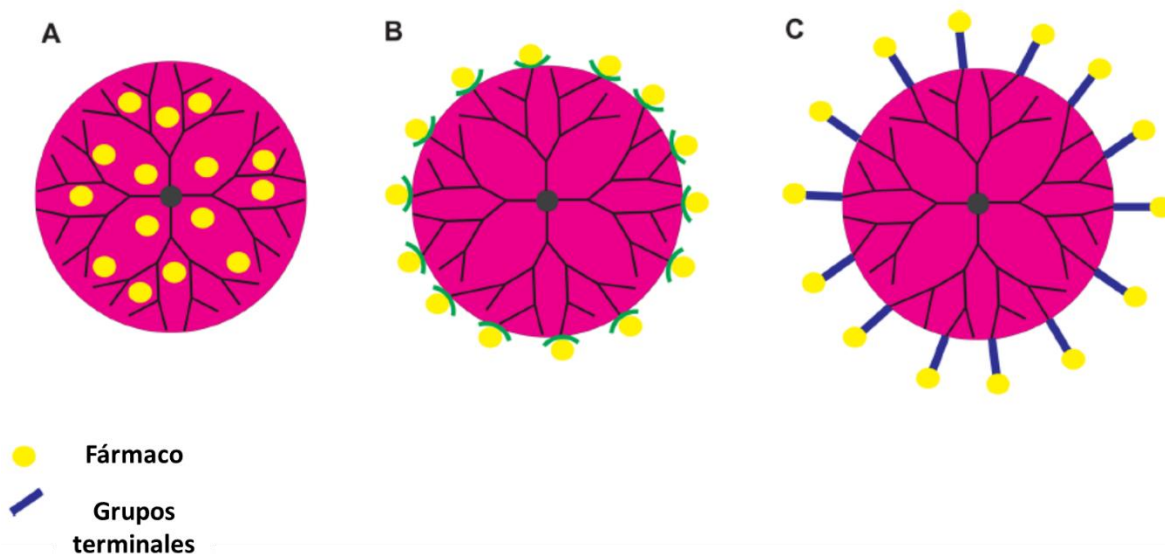


Figura 5. Tipos de interacción dendrímero – fármaco: **a** encapsulación física, **b** interacción electrostática con la periferia, y **c** unión covalente con los grupos terminales. Imagen tomada y modificada de Nikzamid et al²¹.

1.3.3. Dendrímeros de fósforo

Hasta la fecha, se han sintetizado más de 200 tipos de dendrímeros, los cuales han sido agrupados en diferentes familias según sus estructuras; la mayoría se basan en ramificaciones orgánicas compuestas de carbono e hidrógeno (dendrímeros de polifenilo), y también oxígeno (dendrímeros de polibenciléter), o nitrógeno (como los dendrímeros de poli(propilenoimina (PPI)), o tanto oxígeno como nitrógeno (como son los dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM)). Sin embargo, otros tipos de dendrímeros que tienen elementos “inorgánicos” como parte de su estructura, ya sea en el núcleo o como puntos de ramificación, como son los dendrímeros de poli(carbosilano) (CBS) y los dendrímeros que contienen fósforo (dendrímeros de fosfohidrazona) también han sido sintetizados (Figura 6).

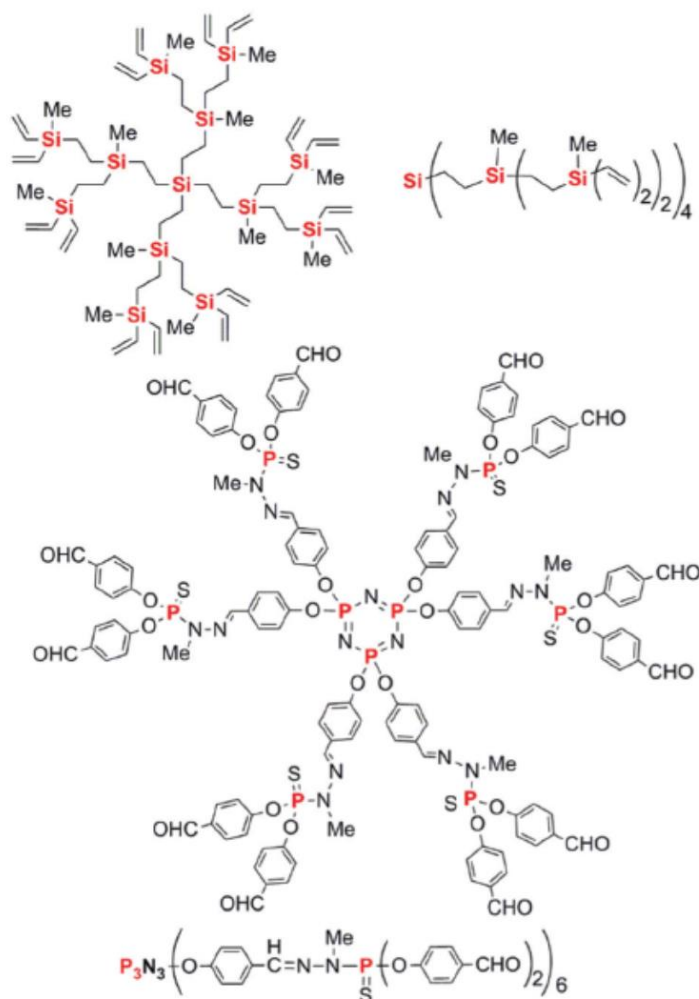


Figura 6. Estructura química de los dendrímeros de carbosilano y de los dendrímeros de fosfohidrazona. Imagen tomada y modificada de Caminade²³.

Los dendrímeros de fósforo se han vuelto especialmente atractivos por sus propiedades, pero también por su fácil caracterización gracias a RMN ³¹P, la cual se puede utilizar incluso para estructuras muy complejas. En 1994, Majoral y su grupo describieron el primer método de síntesis de dendrímeros de fósforo hasta generaciones grandes (G12), el cual hasta la fecha es el más utilizado. Los primeros reportes sobre dendrímeros de fósforo se realizaron con un núcleo trifuncional a base de P(S)Cl₃, pero posteriormente, la mayoría de los experimentos se realizaron con el núcleo hexafuncional a base de ciclotrifosfaceno (P₃N₃Cl₆)^{24–26}.

El hexaclorociclotrifosfaceno es una herramienta muy valiosa para sintetizar dendrímeros. Cuando se utiliza como núcleo proporciona directamente seis grupos funcionales, lo que significa seis



ramas que emanan del núcleo, mientras que la mayoría de los dendrímeros tienen entre 2 y 4 ramas unidas al núcleo²⁷.

Los dendrímeros que contienen fósforo se han utilizado para una variedad de aplicaciones, incluyendo catálisis, fabricación de nanomateriales y en la nanomedicina, ya sea como acarreadores de fármacos o como fármacos *per se*^{23,28}.

1.3.4. Ingeniería de superficie de los dendrímeros

La funcionalización de la superficie de los dendrímeros parece ser el enfoque más efectivo para hacer del dendrímero un vehículo adecuado en el tratamiento del cáncer. La funcionalización de la superficie ofrece rutas convenientes para obtener nuevos dendrímeros con una periferia distinta a las primeras generaciones. El perfil de biocompatibilidad y seguridad de los dendrímeros se puede mejorar significativamente mediante la modificación de la superficie. Además, la funcionalización otorga algunas otras propiedades benéficas para su uso como DDS, incluida la mejora de la eficiencia de encapsulación del fármacos, la biodistribución mejorada y las propiedades farmacocinéticas, el aumento de la solubilidad, la orientación a un sitio específico, una mejor eficiencia de transfección y liberación controlada del fármaco, mejora en el perfil de estabilidad y potencial terapéutico mejorado. Los ligandos que se pueden conjugar a la periferia de los dendrímeros son: lípidos, aminoácidos, proteínas y péptidos, polímeros, carbohidratos y ciclodextrinas, entre otros (Figura 7)²⁹⁻³².



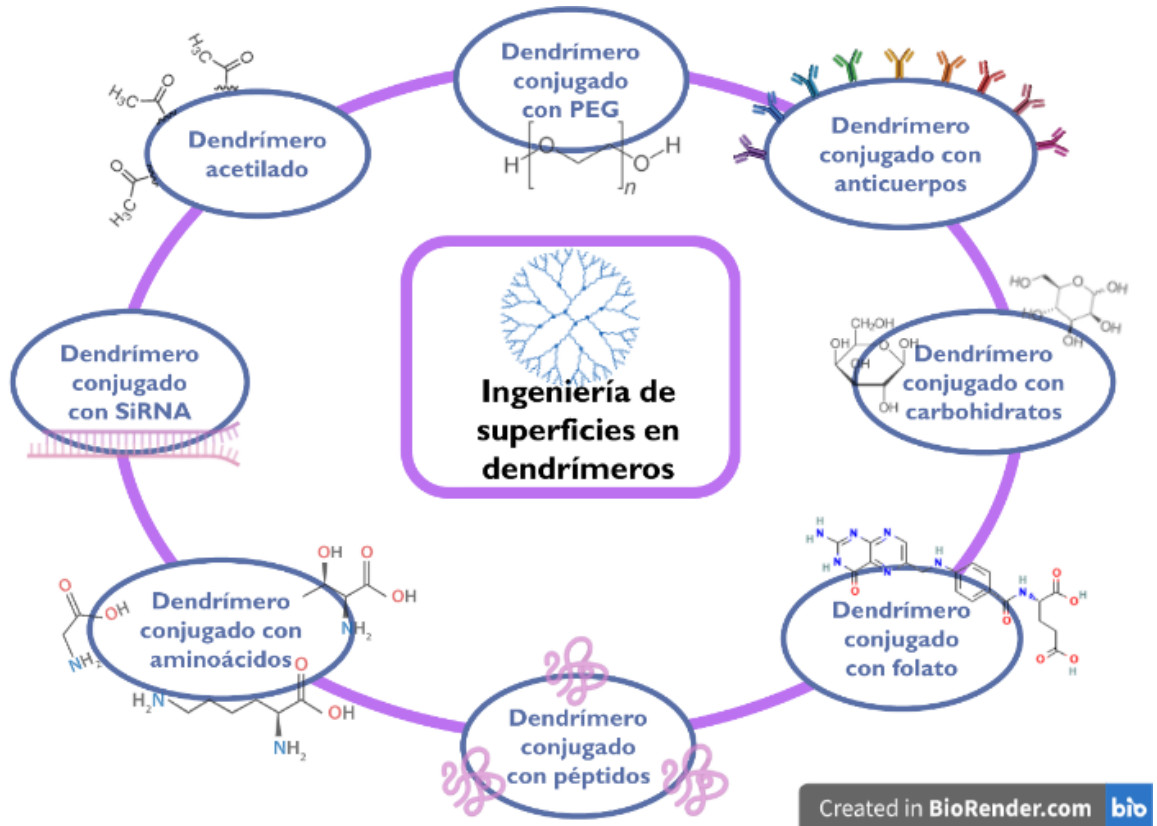


Figura 7. Ingeniería de superficie de los dendrímeros.

Los dendrímeros que incorporan carbohidratos en su estructura se denominan "glicodendrímeros". Estos dendrímeros se clasifican como dendrímeros centrados en carbohidratos, basados en carbohidratos y recubiertos de carbohidratos. El recubrimiento de dendrímeros con carbohidratos puede proporcionar varios beneficios sobre los que no están recubiertos, incluida la reducción de la toxicidad hemolítica, la citotoxicidad, la inmunogenicidad, la administración de fármacos en sitios específicos, la terapia génica y también el diagnóstico y tratamiento de cáncer. Específicamente, el acoplamiento de ciclodextrinas (CDs) a los dendrímeros resulta en la suma de las propiedades de ambos, provocando una mejora sinérgica en la administración de fármacos porque se aumenta la carga de fármaco^{33–35}.

1.4. Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos formados por unidades de glucopiranosas unidas a través de enlaces α -1,4. Las CDs se obtienen a partir de la degradación del almidón catalizada

por la enzima glucosiltransferasa. Las CDs originales, α -ciclodextrina (α CD), β -ciclodextrina (β CD) y γ -ciclodextrina (γ CD), poseen seis, siete y ocho unidades de glucopiranososa, respectivamente (Figura 8). Sus estructuras moleculares se parecen a un anillo molecular en forma de cono truncado en el que la superficie es hidrofílica y cuentan con una cavidad interna de naturaleza hidrofóbica. Los grupos funcionales hidroxilo están orientados hacia la superficie exterior, mientras que la cavidad interior está revestida con los carbonos y los oxígenos anoméricos del esqueleto de glucosa, lo que representa su carácter hidrofóbico. Los grupos hidroxilo primarios se ubican en la cara angosta del cono truncado, mientras que los grupos hidroxilo secundarios se ubican en la cara ancha de la estructura de las CDs³⁶.

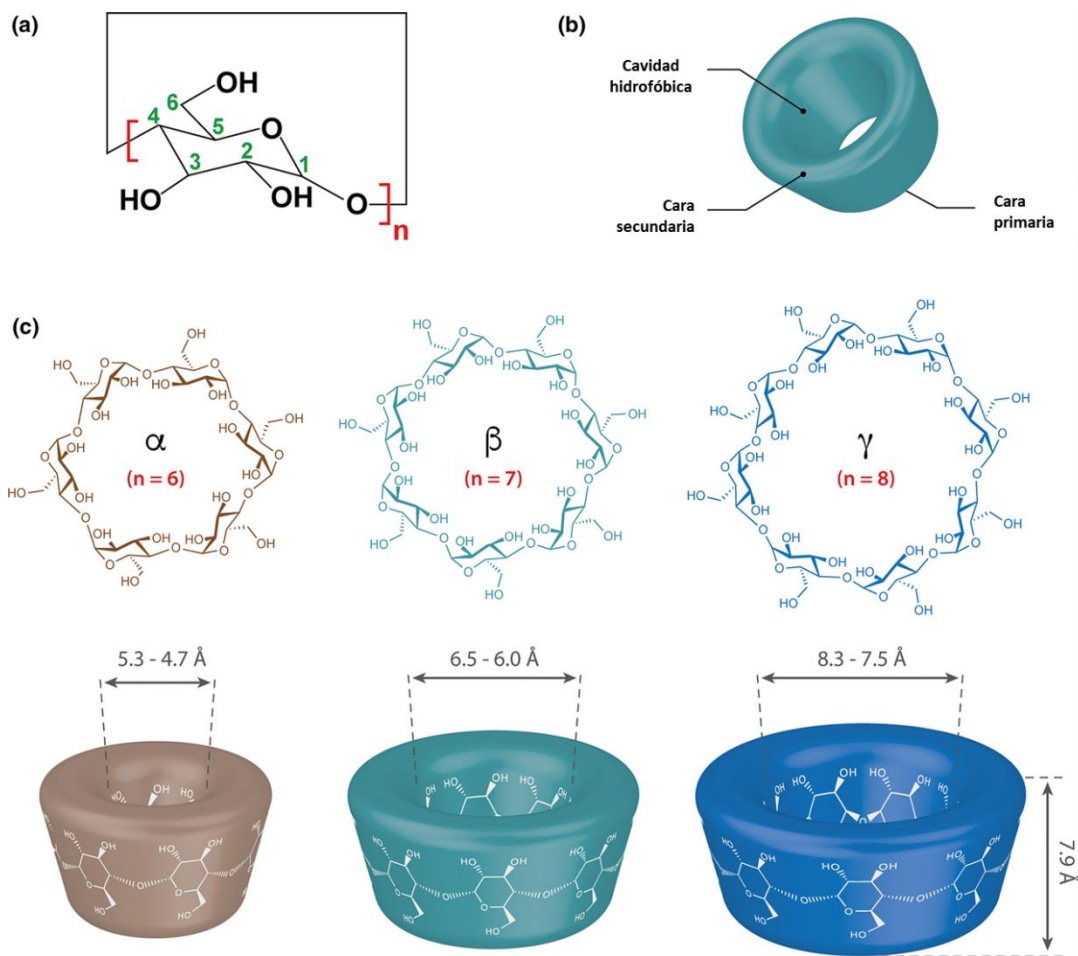


Figura 8. Representaciones esquemáticas de (a) estructura química general de las CDs, (b) la estructura tridimensional de las CDs, y (c) estructura química y dimensiones de la α CD, β CD y γ CD.

Imagen tomada y modificada de Crini et al³⁶.



Las CDs se han utilizado ampliamente debido a sus propiedades deseables, tales como una mayor capacidad de solubilización, mejores perfiles de absorción y menor toxicidad. La β CD es la más estudiada y utilizada con mayor frecuencia, en función de su fácil producción, bajo costo, disponibilidad y capacidad para formar complejos de inclusión con una amplia gama de sustancias y su capacidad de ser modificados químicamente. El orden de la solubilidad acuosa de las CDs nativas es: γ CD > α CD > β CD; se ha reportado que en la β CD existe la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre los hidroxilos secundarios de los carbonos 2 y 3, ocasionando que se forme una especie de cinturón y que conduce a una rigidez molecular, lo que reduce la capacidad de la β CD para formar enlaces de hidrógenos con las moléculas de agua circundantes. Por esta razón la β CD tiene la solubilidad en agua más baja de las CDs nativas. Se ha reportado la síntesis de β CD modificadas químicamente, que incluyen a la Metil- β CD (Me- β CD), a la sulfobutiléter- β CD (SBE- β CD), a la hidroxipopil- β CD (HP- β CD), etc.; para aumentar la solubilidad acuosa mediante la interrupción de los puentes de hidrógeno intermoleculares entre los grupos hidroxilo secundarios de la β CD nativa³⁶⁻³⁸.

1.4.1. Complejos de inclusión (CI) con CDs

Como ya se mencionó, la cavidad interna de las CDs es lipofílica en soluciones acuosas y puede atrapar reversiblemente moléculas (o parte de moléculas) apolares, dando lugar a un complejo de inclusión (CI). El complejo de inclusión resulta de la reacción de equilibrio entre las moléculas huésped libres y las CDs anfitrionas (Figura 9). El equilibrio se rige por una constante K: constante de afinidad (M^{-1}). Las fuerzas impulsoras responsables de la formación del CI incluyen interacciones electrostáticas, contribuciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, liberación de tensión conformacional e interacciones de transferencia de carga. La formación del CI le confiere nuevas propiedades a las moléculas incluidas: aumento de la solubilidad aparente en agua, biodisponibilidad, estabilidad, etc^{39,40}.



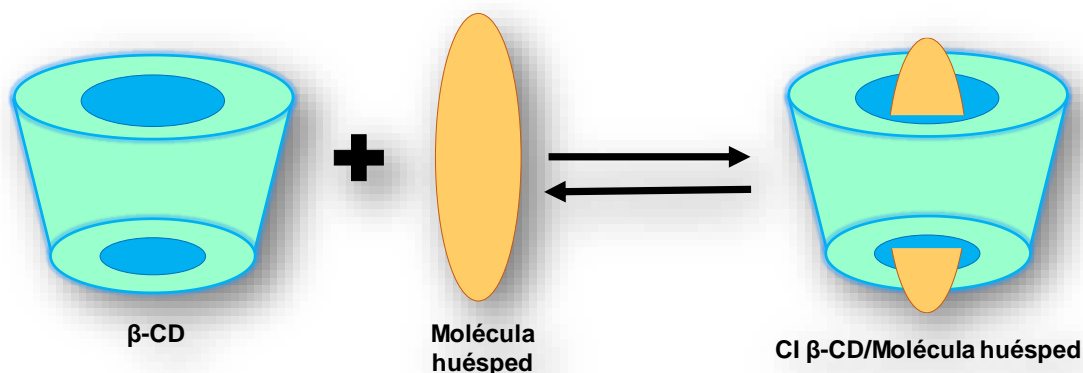


Figura 9. Formación del CI con β -ciclodextrina y una molécula huésped.

En la última década, se observó que las CDs y los CI han sido objeto de estudio para el desarrollo de nuevas plataformas con aplicaciones en el campo de la nanomedicina, por ejemplo, en la terapia del cáncer. Los sistemas basados en CDs pueden mejorar la biodisponibilidad, reducir la inmunogenicidad, modificar el metabolismo de los fármacos, mejorar la estabilidad, reducir la toxicidad y aumentar la vida media biológica de los fármacos después de la administración sistémica³⁹⁻⁴¹.

1.4.2. Adamantano (Ad)

El adamantano (Ad) está formado por cuatro ciclohexanos fusionados entre sí en conformaciones silla que logran una estructura estable libre de tensión y altamente simétrica. El grupo adamantilo es un grupo esférico con un diámetro de 7 Å que coincide perfectamente con el diámetro de la cavidad de la β CD. Los derivados de adamantano forman, por lo tanto, CI 1:1 con la β CD con valores altos de la constante de equilibrios de asociación. Debido a alta estabilidad, los CI β CD/Ad han encontrado varias aplicaciones importantes en el área de la biomedicina, específicamente para el desarrollo de DDS^{42,43}.

1.5. Química “click”

La química “click” ha sido definida como un concepto para efectuar un enlace entre dos moléculas, evitando el uso de intermediarios altamente reactivos. La química “click” describe una familia de reacciones modulares, eficientes, versátiles y fiables que han adquirido un papel fundamental como una de las herramientas sintéticas más útiles para la funcionalización de plataformas con una gama potencialmente amplia de aplicaciones. La reacción de tiol – eno, varias reacciones de cicloadición, así



como la reacción de adición de Michael y la cicloadición azida – alquino catalizada por cobre (I) (CuAAC, por sus siglas en inglés) son algunos ejemplos significativos de este concepto; siendo la reacción de CuAAC el ejemplo “de oro” debido a que fue la primer reacción que se catalogó en este campo y además, por sus aplicaciones en diversas áreas⁴⁴⁻⁴⁶.

La reacción de CuAAC es una modificación de la cicloadición clásica de Huisgen, que es la reacción entre un grupo azido con un grupo alquino terminal o intermedio en condiciones algo duras para dar un 1,2,3-triazol como una mezcla de 1,4- y 1,5-regioisómeros. En cambio, la reacción de CuAAC es regioespecífica, dando lugar exclusivamente a 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos. La cinética de reacción rápida para este tipo de reacciones significa que la química de conjugación se puede llevar a cabo en un período breve, lo cual es especialmente deseable si la conjugación involucra biomoléculas química o conformacionalmente inestables. Como resultado, este tipo de reacciones se ha utilizado ampliamente en una variedad de aplicaciones que incluyen modificaciones de biomoléculas frágiles⁴⁷⁻⁵⁰.

Las CDs modificadas por la reacción de química “click” son componentes básicos de estructuras más complejas utilizadas para DDS, para la modificación de superficies macromoleculares, para la preparación de dímeros y trímeros de CDs, y para la generación de diversos glucoconjugados, tales como glucodendrimeros⁵¹.







2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, la quimioterapia sigue siendo el pilar del tratamiento del cáncer, pero los efectos secundarios de los quimioterapéuticos limitan gravemente su uso clínico. La Dox es uno de los medicamentos más utilizados contra el cáncer en la práctica clínica debido a su eficacia. Recientemente se demostró que la Dox puede causar varios efectos secundarios, como daño cardíaco, tumores asociados al tratamiento e infertilidad, entre otros⁵². Todos estos efectos secundarios de la Dox se atribuyen en gran parte a una ineficiente distribución en el tumor y por consiguiente a la propagación en otros órganos lejos del objetivo. La nanomedicina se ha desarrollado con el objetivo de mejorar la entrega de agentes quimioterapéuticos y ayudar a superar los efectos secundarios asociados a estos medicamentos. Se han diseñado una variedad de nanoplataformas para la entrega localizada de fármacos para el tratamiento del cáncer, siendo la familia de los dendrímeros de los más estudiados por sus propiedades únicas y excepcionales; como su solubilidad en agua, tamaño uniforme y forma nanométrica, etc. Otro componente que se ha utilizado para la construcción de estas nanoplataformas son las ciclodextrinas, principalmente la β -ciclodextrina (β CD) ha sido elegida por el tamaño de su cavidad, la cual le permite formar complejos de inclusión (CI) con una variedad de moléculas huésped.

Es por esto por lo que, en este proyecto se propone el diseño de dos compuestos dendríticos, los cuales serán ensamblados con un profármaco construido a partir de adamantano (Ad) y el fármaco quimioterapéutico doxorubicina (Dox). Se espera que estos sistemas respondan al estímulo de pH para modular la liberación de la Dox solo en el sitio del tumor, y así disminuir los efectos secundarios asociados al tratamiento.





3. HIPÓTESIS

Los compuestos dendríticos homólogos, $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ ($n = 3$ y 4), serán construidos con núcleo de ciclotrifosfazeno (P_3N_3), el cual se funcionalizará completamente en las seis posiciones de la periferia con moléculas de βCD , sin importar el largo de la cadena alifática del enlazador, mediante la estrategia de química “click”. Una vez que se conjugaron las moléculas de βCD , su cavidad quedará disponible para formar complejos de inclusión (CI) con el profármaco de Ad-h-Dox, para obtener las plataformas G/Ad-h-Dox y H/Ad-h-Dox. Finalmente, estas plataformas liberarán la Dox de manera controlada en células carcinogénicas.





4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Diseñar y desarrollar racionalmente compuestos dendríticos homólogos con núcleo de P_3N_3 y moléculas de β CD en la periferia para la liberación controlada de Dox en células cancerígenas.

4.2. Objetivos particulares

- ✓ Síntesis y caracterización de los intermediarios de 4-(alquiloxi)fenol, monosustituidos por un grupo alquino
- ✓ Síntesis y caracterización de los intermediarios homólogos de P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-alquino]₆ ($n = 3$ y 4)
- ✓ Síntesis y caracterización de la m-OTs- β CD
- ✓ Síntesis y caracterización de la m-N₃- β CD
- ✓ Preparación, mediante la reacción de química “click”, purificación y caracterización de los compuestos dendríticos P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n- β CD]₆ ($n = 3$ (compuesto dendrítico I) y 4 (compuesto dendrítico II))
- ✓ Determinación cuantitativa de la solubilidad en agua de los compuestos dendríticos I y II
- ✓ Determinación del número de cavidades disponibles de β CD en los compuestos dendríticos I y II, utilizando una molécula modelo (Ad-COOH), por el método de Job por RMN ¹H
- ✓ Síntesis y caracterización de los intermediarios de Ad-COOH para el profármaco Ad-h-Dox
- ✓ Síntesis y caracterización del profármaco de Ad-h-Dox
- ✓ Seleccionar un compuesto dendrítico y preparar los CI con el profármaco Ad-h-Dox
- ✓ Caracterización del CI I / Ad-h-Dox mediante 2D RMN y en estado sólido (DSC y TGA)
- ✓ Evaluación de la liberación de Dox del CI I / Ad-h-Dox a diferentes valores de pH = 7.4, 4.5 y 3.5.
- ✓ Determinación de la actividad citotóxica mediante el ensayo MTT en líneas celulares HeLa (adenocarcinoma cervical humano), K-562 (leucemia mieloide crónica humana), SKLU-1 (adenocarcinoma de pulmón humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano, triple negativo), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano, positivo a receptores de estrógeno) y SW-620 (cáncer de colon) del profármaco Ad-h-Dox, de los compuestos dendríticos I y II sin carga y del CI I / Ad-h-Dox





5. METODOLOGÍA

5.1. REACTIVOS Y EQUIPO

Las materias primas utilizadas en la obtención de todos los intermediarios y de los compuestos finales se adquirieron comercialmente en grado reactivo. Las reacciones se monitorearon con la técnica analítica de cromatografía en capa fina (TLC), se utilizaron placas de gel de sílice 60 F254 previamente recubiertas (Sigma – Aldrich), y la detección se realizó bajo luz UV. Las purificaciones de los intermediarios y compuestos finales se realizaron por cromatografía en columna y se utilizó gel de sílice con un tamaño entre 60 – 200 μm (Sigma – Aldrich). La cromatografía de exclusión molecular (SEC) se realizó empleando medio acuoso como eluyente en una resina de: Bio-Gel P-10 medium del laboratorio BIO-RAD®.

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

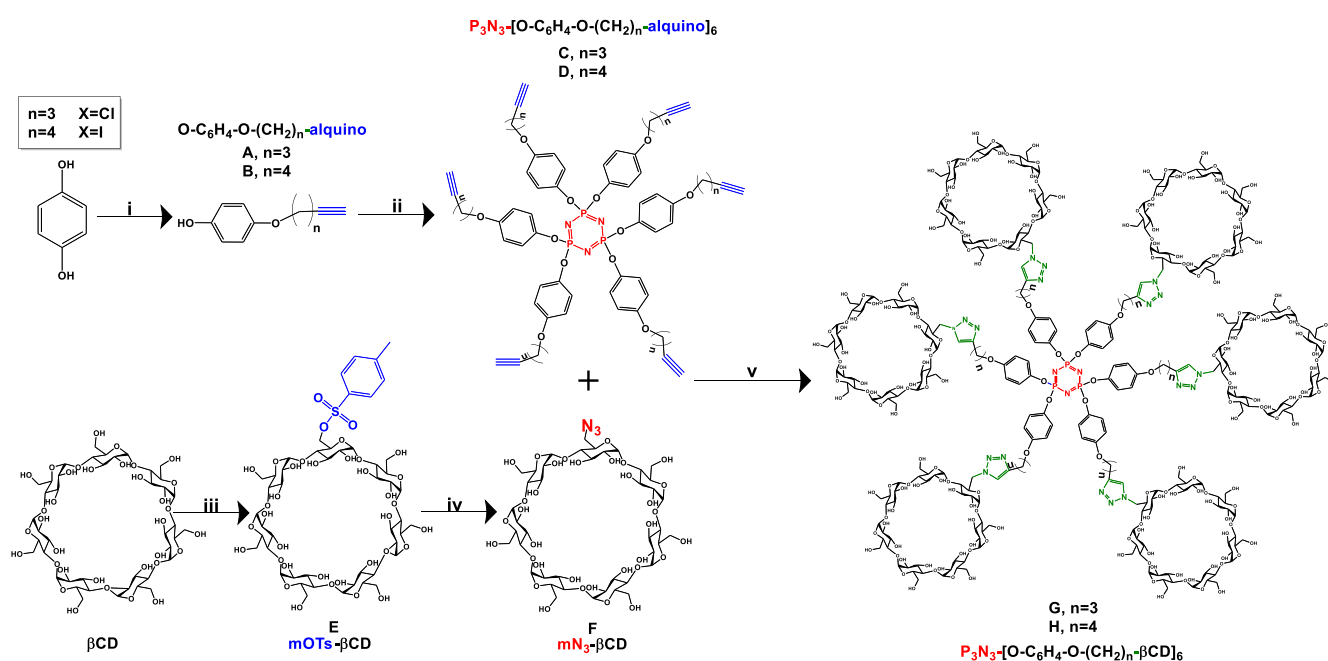
Asimismo, los espectros de masas de alta resolución por la técnica análisis directo en tiempo real (DART) (EM-DART-AR) se realizaron en un espectrómetro de masas Jeol The AccuTOF JMS-T100LC. Los espectros de Ionización por desorción con láser asistida por una matriz – tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se adquirieron en un equipo Agilent Technologies 6530 Accurate – Mass Q-TOF LC / MS. Se utilizó como matriz el ácido 2,5-dehidroxibenzoico (DHB) y fueron procesados en el Laboratorio de Espectrometría de masas y en el de Cromatografía de gases y líquidos del Instituto de Química, UNAM.



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

5.2. SÍNTESIS Y DESCRIPCIÓN

La síntesis de todos los intermediarios y de los compuestos dendríticos I y II se llevó a cabo de acuerdo con el **Esquema 1**.



Esquema 1. Síntesis de los compuestos dendríticos $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ ($n=3$ o 4) (**G** y **H**). Condiciones: i) K_2CO_3 , X-alquino, DMF anhidra, $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 36 h. ii) **A** o **B**, Cs_2CO_3 , $P_3N_3Cl_6$, THF anhidro, 7 días, RT. iii) $Ts_2O/NaOH$, H_2O , 2 h, RT. iv) NaN_3 , DMF anhidra, $80 \text{ }^\circ\text{C}$, 48 h. v) $mN_3-\beta CD$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, H_2Asc , $DMSO:H_2O$ (9.5:0.5), 80°C , 7 días.

5.2.1. Síntesis de los intermediarios $HO-C_6H_4-O-(CH_2)_n$ -alquino ($n = 3$ y 4), **A** y **B**

La síntesis de los intermediarios **A** y **B** se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento reportado por Ting y col.⁵³ con algunas modificaciones. Se disolvieron 5.4 g (48.75 mmol) de hidroquinona y 8.6 g (60.94 mmol) de K_2CO_3 en 100 mL de DMF anhidra; la mezcla se dejó a reflujo durante 2 horas a una temperatura de $72 \text{ }^\circ\text{C}$. Transcurrido este tiempo, se agregaron gota a gota 2.5 g



(24.4 mmol) del alquino a la mezcla de reacción y se dejó con agitación constante a 72 °C durante 48 horas. Posteriormente, se dejó enfriar la mezcla de reacción y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se obtuvo un aceite color café el cual fue disuelto en CH_2Cl_2 (150 mL) y la solución se extrajo con agua (3 x 50 mL). La fase orgánica se separó y se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto crudo, compuesto de hidroquinona sin reaccionar, y los productos mono y di – sustituidos, se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice y se utilizó una mezcla Hex / AcOEt (80:20). Se obtuvo la fracción del producto monosustituido (**A** y **B**) y se recristalizó en condiciones de frío / caliente, el producto final se recuperó por filtración y se dejó secar al vacío. Se obtuvieron 1.26 g de **A** como un sólido color beige (7.17 mmol, 29 %). Se obtuvieron 1.5 g de **B** como un sólido color amarillo (7.88 mmol, 66 %).

HO-C₆H₄-O-(CH₂)₃-alquino. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 8.90 (s, 1H, PhOH), 6.76 (d, *J* = 9 Hz, 2H, Ha), 6.68 (d, *J* = 9 Hz, 2H, Hb), 3.93 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, Hc), 2.80 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, C≡C-H), 2.31 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, He), 1.86 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, Hd); ¹³C-DEPTQ NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 152.01, 116.50, 116.20, 84.56, 72.34, 67.15, 28.67, 15.29. **DART-MS:** 177 m/z (M+H)⁺; 178 m/z (M + 2H)⁺.

HO-C₆H₄-O-(CH₂)₄-alquino. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 8.88 (s, 1H, PhOH), 6.75 (d, *J* = 9 Hz, 2H, Ha), 6.67 (d, *J* = 9 Hz, 2H, Hb), 3.88 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, Hc), 2.78 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, C≡C-H), 2.22 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, Hf), 1.75 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, Hd), 1.58 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H, He); ¹³C-DEPTQ NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 152.19, 151.88, 116.24, 116.14, 83.42, 72.19, 68.10, 28.75, 25.49, 18.26. **DART-MS:** 191 m/z (M)⁺; 192 m/z (M + H)⁺.

5.2.2. Síntesis de P₃N₃-[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-alquino]₆ (*n* = 3 y 4) **C** y **D**

La síntesis de los intermediarios **C** y **D** se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito por Folgado y col. ⁵⁴ con algunas modificaciones. Se disolvieron 500 mg (2.84 mmol) de **A** o **B** en THF anhidro (25 mL) y la solución se dejó agitar por 20 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregó 1.86 g (5.68 mmol) de Cs₂CO₃ a la mezcla de reacción y se dejó agitando durante 1 hora en un baño de hielo. Después, se agregaron 109.61 mg (0.32 mmol) de P₃N₃Cl₆ a la mezcla de reacción y ésta se dejó agitar a temperatura ambiente por 7 días en condiciones anhidras. La reacción fue monitoreada por ³¹P RMN y hasta que se comprobó la completa funcionalización del P₃N₃ se detuvo la reacción. La mezcla obtenida se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos para remover sales inorgánicas, se recuperó el sobrenadante y se evaporó el disolvente a presión reducida. El producto crudo contenía P₃N₃-[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-alquino]₆ completamente funcionalizado y monoalquino sin reaccionar, el cual fue





separado por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando CH_2Cl_2 como disolvente. Se obtuvo la fracción correspondiente al P_3N_3 completamente funcionalizado y se recristalizó en éter isopropílico frío. Se obtuvieron 220.3 mg (0.19 mmol, 59 %) de **C** y 156.6 mg (0.12 mmol, 52 %) de **D**, como sólidos blancos.

$\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-alquino]}_6$. **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 6.80 (d, $J = 9.2$ Hz, 12H, **Ha**), 6.76 (d, $J = 9.2$ Hz, 12H, **Hb**), 4.00 (t, $J = 2.5$ Hz, 12H, **Hc**), 2.81 (t, $J = 2.41$ Hz, 6H, $\text{C}\equiv\text{C-H}$), 2.34 (t, $J = 2.41$ Hz, 12H, **He**), 1.90 (t, $J = 2.41$ Hz, 12H, **Hd**); **$^{13}\text{C-DEPTQ NMR}$** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 156.34, 144.23, 122.21, 115.83, 84.36, 72.40, 67.11, 28.56, 15.31; **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): s, 9.93. **MALDI-TOF-MS**: 1187.62 m/z $[\text{M}]^+$.

$\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-alquino]}_6$. **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 6.78 (d, $J = 9.2$ Hz, 12H, **Ha**), 6.72 (d, $J = 9.2$ Hz, 12H, **Hb**), 3.94 (t, $J = 2.5$ Hz, 12H, **Hc**), 2.78 (t, $J = 2.41$ Hz, 6H, $\text{C}\equiv\text{C-H}$), 2.24 (t, $J = 2.41$ Hz, 12H, **Hf**), 1.80 (m, 12H, **Hd**); 1.61 (m, 12H, **He**); **$^{13}\text{C-DEPTQ NMR}$** (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 156.46, 144.19, 122.20, 115.77, 85.01, 72.17, 68.08, 28.64, 25.48, 18.28; **$^{31}\text{P-NMR}$** (162 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): s, 10.01. **MALDI-TOF-MS**: 1271.79 m/z $[\text{M+H}]^+$.

5.2.3. Síntesis de 6-O-monotosil- β -ciclodextrina (mOTs- β CD), **E**

La síntesis de este compuesto se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento reportado por Zhong y col.⁵⁵ con algunas modificaciones. En un matraz de fondo redondo se disolvieron 1.92 g (10.08 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico y 7.5 g (39 mmol) de cloruro de *p*-toluensulfonilo en 50 mL de CH_2Cl_2 . Esta solución se dejó agitar a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró y las aguas madres se concentraron a presión reducida. El residuo se recristalizó en hexano frío, se filtró y se dejó secar al vacío para obtener el anhídrido del *p*-toluensulfonilo (Ts_2O). Después, 2.5 g (7.6 mmol) Ts_2O y 5.75 g (5.1 mmol) de β CD se disolvieron en 125 mL de H_2O , la mezcla de reacción se dejó en agitación constante durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se agregó una solución de NaOH 2.5 M gota a gota a la mezcla de reacción y se agitó por 10 minutos más. Posteriormente, la mezcla obtenida se filtró, para separar los reactivos que no reaccionaron y se realizó el ajuste de pH de las aguas madres con la adición de NH_4Cl a un valor de 8. La suspensión obtenida se mantuvo a 4°C durante 12 horas, para después recuperar el sólido por filtración. El crudo de reacción se recristalizó en una mezcla acetona / agua (80:20) para obtener el compuesto **E** como un sólido color blanco con un rendimiento del 42 % (2.1 mmol).





¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 7.75 (b, 2H) a, 7.44 (b, 2H) b, 5.83 (d, J= 6.4 Hz, 1H) OH2', 5.78 (b, 6H) OH2, 5.71 (b, 7H) OH3, 4.84 (d, J=3.9 Hz, 6H) H1, 4.76 (d, J= 3.9 Hz, 1H) H1', 4.50 (m, 6H) OH6, 4.35 (m, 2H) H6'ab, 4.19 (m, 1H) H5', 3.65 (m, 12 H) H6ab, 3.60 (b, 7H) H3, 3.51 (m, 7H) H5, 3.30 (m, 7H) H2, 3.22 (m, 7H) H4, 2.42 (d, 3H) c. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 145.25, 133.09, 130.29, 128.03, 102.39, 101.74, 81.95, 81.21, 73.43, 73.16, 72.84, 72.48, 70.17, 69.36, 60.28, 21.62. **MALDI-TOF-MS** (m/z): 1311.591 [M + Na]⁺.

5.2.4. Síntesis de 6-O-monoazido-β-ciclodextrina (mN₃-βCD), F

En un matraz de fondo redondo, bajo condiciones anhidras se disolvieron 3.36 g (2.6 mmol) de **E** y 0.217 g (1.3 mmol) de KI en 8 mL de DMF anhidra. La mezcla de reacción se dejó en agitación a 80 °C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se evaporó la DMF a presión reducida y el residuo se recristalizó en una mezcla acetona / H₂O (1:1), después el sólido se recuperó por filtración y se dejó secar al vacío. El producto **F** se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 96 % (2.95 g, 2.5 mmol).

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 5.74 (m, 7H) OH2, 5.67 (m, 6H) OH3, 5.62 (d, J=2.4 Hz, 1H) OH3', 4.88 (d, J=3.5 Hz, 1H) H1', 4.83 (m, 6H) H1, 4.48 (m, 6H) OH6, 3.77 (m, 2H) H6', 3.68 (m, 12H) H6, 3.60 (m, 7H) H3, 3.55 (m, 7H) H5, 3.39 (m, 7H) H4, 3.29 (m, 7H) H2. **¹³C-NMR** (100 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 102.38, 102.04, 83.41, 81.99, 73.50, 73.30, 72.85, 72.67, 72.46, 70.63, 60.30, 51.53. **MALDI-TOF-MS** (m/z): 1182.764 [M + Na]⁺.

5.2.5. Síntesis de los compuestos dendríticos P₃N₃-[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-βCD]₆ (n = 3 y 4) G y H

En un matraz de fondo redondo, se disolvieron 80 mg (0.067 mmol) de **C** o **D** y 704 mg (0.607 mmol) de **F** en 8 mL de DMSO; la mezcla de reacción se desgasificó por burbujeo de argón durante 15 minutos. Por otra parte, se prepararon dos soluciones, la primera: una solución de 16.8 mg (0.067 mmol) de CuSO₄·5H₂O en 1 mL de DMSO. Para la segunda solución, se disolvieron 35.58 mg (0.202 mmol) de ácido ascórbico en 1 mL de una mezcla de DMSO / H₂O (0.5: 0.5 mL). Estas soluciones se agregaron gota a gota a la mezcla de reacción, primero la solución de CuSO₄·5H₂O y finalmente la solución de ácido ascórbico. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a 80 °C durante 7 días bajo atmosfera de nitrógeno, hasta que se comprobó el final de la reacción utilizando ³¹P RMN. Posteriormente, la mezcla de reacción se precipitó en un exceso de acetona y el sólido precipitado se recuperó por filtración y se purificó por SEC (Bio-Gel P-10 medium) usando agua como eluyente. Los productos se recuperaron por liofilización y se obtuvieron como sólidos blancos (0.041 mmol, 61% y 0.048 mmol, 88% para **G** y **H**, respectivamente).





Compuesto dendrítico G. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 7.82 (s, 6H, *H*-triazol), 6.87 (s, 24H, H-a, b), 5.87 (m, 7H, OH-2'), 5.78 (s, 36H, OH-2), 5.70-5.66 (m, 42H, OH-3,3'), 5.05 (s, 7H, H-1'), 4.84-4.78 (m, 42H, H-1; H-6'), 4.56-4.50 (m, 36H, H-6'; OH-6), 4.33 (s, 6H, OH-6''), 4.02 (m, 18H, H-c; H-5'), 3.65-3.59 (m, 138H, H-6, H-3,3', H-5), 3.41-3.28 (m, 84 H, H4,4', H-2,2' traslapado con H₂O), 3.12 (m, 7H, H-6''), 2.94 (m, 7H, H-6''), 2.77 (m, 12H, H-e), 2.05 (m, 12H, H-d); $^{13}\text{C-DEPTQ NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 156.55, 144.37, 123.37, 122.15, 115.93, 102.98, 102.02, 84.28, 82.36, 73.05, 72.88, 70.72, 68.13, 60.90, 59.80, 50.37, 29.42, 22.51. $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): s, 9.31. **MALDI-TOF-MS:** 8169.59 m/z [M+K]⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D₂O, δ ppm): 7.63–7.27 (m, 5H, H-triazol), 6.92–6.46 (m, 25H, H-a, b, H-*a*_{*i*}, *b*_{*i*}, H-triazol*i*), 5.29 (s, 7H, H-1'), 4.97–4.87 (m, 46H, H-1; H-6'), 4.39 (m, 7H, H-6'), 4.14–3.09(m, 302H, H-*c*_{*i*}, H-c, H-5', H-5, H-3,3', H-6, H-2,2', H-4,4'), 3.09 (m, 7H, H-6''), 2.74 (m, 20H, H-6'', H-e), 1.98 (m, 12H, H-d); $^{13}\text{C-DEPTQ NMR}$ (101 MHz, D₂O, δ ppm): 147.33, 145.43, 124.94, 124.86, 121.32, 120.94, 115.66, 101.82, 81.11, 70.97, 60.24, 59.70, 59.50, 51.07, 21.48, 28.03.

Compuesto dendrítico H. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 7.78 (s, 6H, *H*-triazol), 6.83 (s, 24H, H-a, b), 5.88 (m, 7H, OH-2'), 5.78-5.72 (s, 36H, OH-2), 5.70-5.63 (m, 42H, OH-3,3'), 5.05 (s, 7H, H-1'), 4.84-4.78 (m, 42H, H-1; H-6'), 4.58-4.49 (m, 36H, H-6'; OH-6), 4.34 (s, 6H, OH-6''), 3.96 (m, 18H, H-c; H-5'), 3.65-3.59 (m, 138H, H-6, H-3,3', H-5), 3.41-3.28 (m, 84 H, H4,4', H-2,2' traslapado con H₂O), 3.12 (m, 7H, H-6''), 2.94 (m, 7H, H-6''), 2.66 (m, 12H, H-f), 1.76 (m, 24H, H-d, e); $^{13}\text{C-DEPTQ NMR}$ (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 156.56, 147.25, 123.86, 122.11, 115.96, 102.98, 101.98, 84.18, 82.80, 82.33, 81.62, 73.94, 72.91, 68.38, 60.73, 59.77, 50.79, 29.27, 26.29, 22.50. $^{31}\text{P-NMR}$ (162 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): s, 9.42. **MALDI-TOF-MS:** 8254.30 m/z [M+K]⁺.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D₂O, δ ppm): (7.66–7.36 (m, 5H, H-triazol), 6.84–6.14 (m, 25H, H-a, b, H-*a*_{*i*}, *b*_{*i*}, H-triazol*i*), 5.29 (s, 7H, H-1'), 4.98–4.79 (m, 37H, H-1; H-6'), 4.36 (m, 7H, H-6'), 4.02–3.28(m, 197H, H-c, H-5', H-5, H-3,3', H-6, H-2,2', H-4,4'), 3.09 (m, 7H, H-6''), 2.73–2.62 (m, 13H, H-6'', H-f), 1.64 (m, 24H, H-d,e); $^{13}\text{C-DEPTQ NMR}$ (101 MHz, D₂O, δ ppm): 148.95, 146.05, 132.78, 127.77, 122.12, 115.28, 102.15, 81.50, 73.52, 72.39, 71.90, 60.56, 57.40, 28.52, 24.29.





5.3. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS G Y H

Para la determinación de la solubilidad en agua de los compuestos dendríticos G y H se utilizó una adaptación del método reportado por Jozwiakowski y Connors⁵⁶. Se colocaron cantidades en exceso de cada compuesto en tres viales independientes con tapa de rosca y capacidad de 5 mL, y se agregó a cada vial 1 mL de agua destilada. Los viales se sellaron con parafilm y se dejaron con agitación constante a 25°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se separó el sólido en exceso mediante filtración a través de una membrana Mili-Q (tamaño de poro 0.45 μm) tras la inyección de cada solución a través de jeringas de plástico desechables de 3 mL a 25 °C. El sobrenadante de cada muestra se colocó en tres viales diferentes. Las muestras fueron liofilizadas durante 24 horas y el sólido obtenido se pesó en una balanza con una incertidumbre de ± 0.0001 g para cuantificarlo.

5.4. DETERMINACION DE LA ESTEQUIOMETRIA POR EL MÉTODO DE JOB PARA LOS COMPUESTOS DENDRITICOS G Y H

Para el método de Job, se prepararon en D_2O dos soluciones stock: la primera solución, del compuesto dendrítico, de 3 mM respecto a las cavidades de βCD (Sol. 1). La segunda solución, de Ad-COOH (Sol. 2), de 3 mM. Con estas soluciones, se prepararon una serie de 9 muestras en tubos de RMN que contenían el compuesto dendrítico $\text{P}_3\text{N}_3\text{-}[\text{O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2)_n\text{-}\beta\text{CD}]_6$ ($n = 3$ o 4) y el Ad-COOH con una concentración total fija de 3 mM. Esto se logró mediante la introducción de cantidades crecientes de 50 μL hasta 450 μL de Sol. 2 desde el 1° hasta el 9° tubo de RMN. Después se agregaron cantidades decrecientes desde 450 hasta 50 μL de Sol. 1 en el correspondiente tubo de RMN. Así se obtuvieron soluciones con un volumen constante en fracciones molares variables en un rango de $0.1 < r < 0.9$. Posteriormente, cada tubo se analizó por ^1H RMN utilizando D_2O como estándar interno. Se analizó el cambio en el desplazamiento del átomo de hidrógeno de Ad-COOH, H- γ .

5.5. PREPARACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN (CI)

La preparación de los CI: Compuesto dendrítico G/Ad-COOH, compuesto dendrítico H/Ad-COOH, y del compuesto dendrítico G/Ad-h-Dox, se realizó por el método de cosolvencia – evaporación.

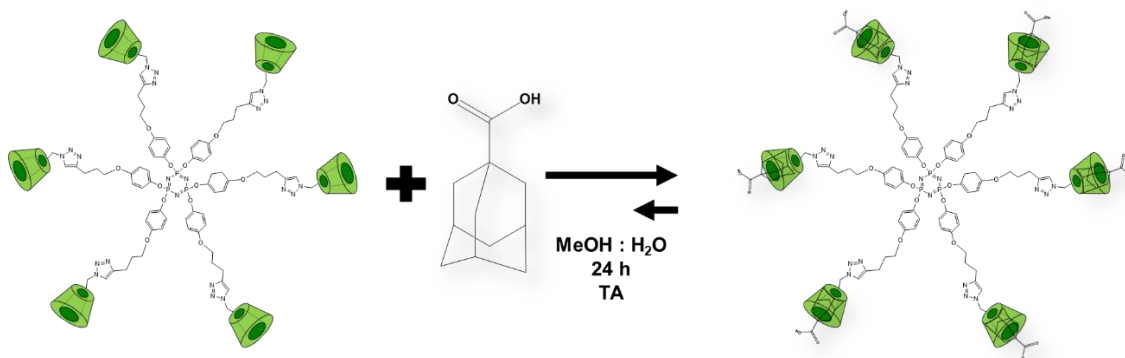


5.5.1. Método general para la preparación de CI

En un matraz de fondo redondo, se disolvió el compuesto dendrítico **G** o **H**, en 5 mL de agua destilada a temperatura ambiente y agitación vigorosa. A continuación, se agregó gota a gota una solución de Ad-COOH en 0.5 mL de MeOH. La solución se mantuvo en agitación constante durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el CI se recuperó por liofilización.

5.5.2. Preparación del CI Compuesto dendrítico G/Ad-COOH (1:6)

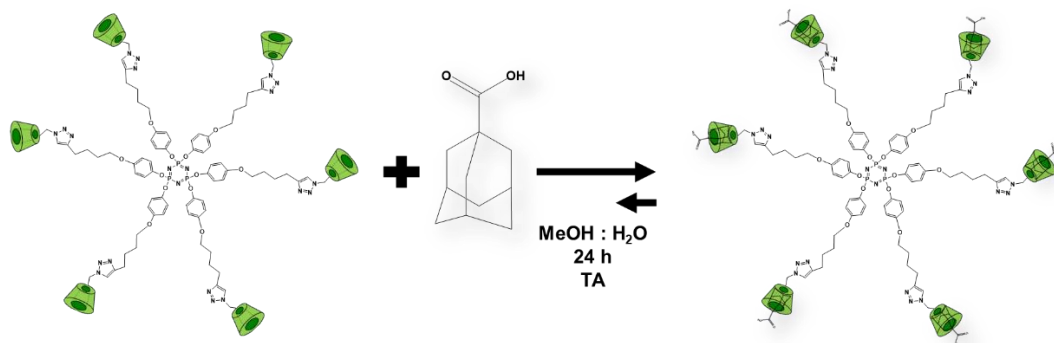
Siguiendo el procedimiento de la sección 5.5.1., se utilizaron 75.2 mg (3.08×10^{-3} mmol) del compuesto dendrítico G y 10 mg (0.056 mmol) de Ad-COOH en 0.5 mL. Se recuperaron 85 mg (0.057 mmol) de un sólido color blanco con un rendimiento del 98%.



Esquema 2. Preparación del CI G/Ad-COOH (1:6).

5.5.3. Preparación del CI Compuesto dendrítico H/Ad-COOH (1:6)

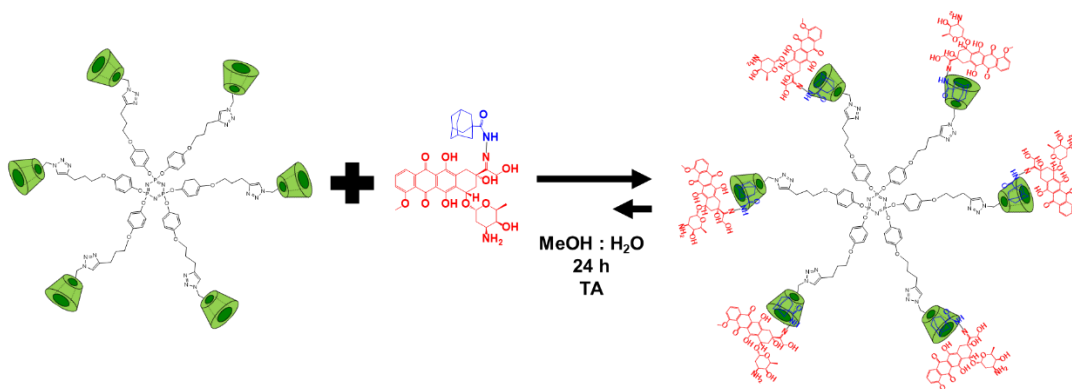
Siguiendo el procedimiento de la sección 5.5.1., se utilizaron 75.99 mg (3.08×10^{-3} mmol) del compuesto dendrítico H y 10 mg (0.037 mmol) de Ad-COOH en 0.5 mL. Se recuperaron 83 mg (0.056 mmol) de un sólido color blanco con un rendimiento del 98%.



Esquema 3. Preparación del CI H/Ad-COOH (1:6).

5.5.4. Preparación del CI Compuesto dendrítico G/Ad-h-Dox (1:6)

Siguiendo el procedimiento de la sección 5.5.1., se utilizaron 50 mg (6.15×10^{-3} mmol) del compuesto dendrítico I y 26.6 mg (0.056 mmol) de Ad-h-Dox en 0.5 mL. Se recuperaron 76 mg (0.056 mmol) de un sólido color rojo con un rendimiento del 99%.



Esquema 4. Preparación del CI G/Ad-h-Dox (1:6).

5.6. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

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



5.7. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL CI COMPUESTO DENDRÍTICO G/Ad-h-Dox

La cinética de liberación de la molécula Dox del CI se realizó por triplicado en soluciones buffer de fosfatos a pH = 4.5, 3.5 y 7.2 a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, utilizando una membrana Spectra / Por 6 TRUMP-LABS. Se tomaron alícuotas de 3 mL a intervalos de tiempo de 1, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 48 y 72 horas, se recuperó el mismo volumen de medio en cada muestra extraída. La cuantificación de Dox libre se realizó por espectrofotometría de UV a 480 nm.

5.8. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

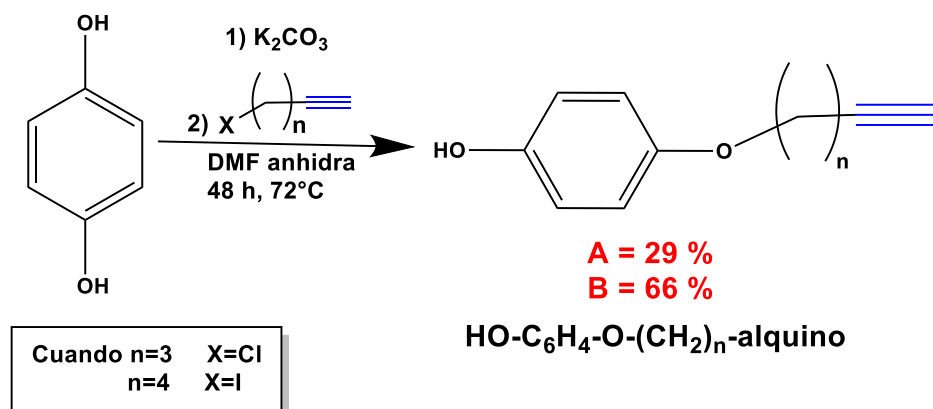
Los datos de actividad citotóxica fueron obtenidos mediante el método MTT con líneas celulares HeLa (adenocarcinoma cervical humano), K-562 (leucemia mieloide crónica humana), SKLU-1 (adenocarcinoma de pulmón humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano, triple negativo), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano, positivo a receptores de estrógeno) y SW-620 (cáncer de colon). Los valores de CI_{50} (μM) se determinaron a 48 horas de exposición *in vitro*. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes \pm el error estándar, fueron obtenidos a las concentraciones analizadas (1, 10, 30, 60 y 100 μM). El valor de CI_{50} se obtuvo mediante análisis de correlación no lineal utilizando el software GraphPad Prism 5. Estas determinaciones fueron realizadas por el Dr. Ignacio González Sánchez (Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM).



6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1. SÍNTESIS

6.1.1. Síntesis de los intermediarios HO-C₆H₄-O-(CH₂)_n-alquino (*n* = 3 y 4), A y B



Esquema 5. Síntesis de los intermediarios A y B.

La síntesis de los intermediarios A y B se muestra en el esquema 5. Se realizó una reacción de eterificación de Williamson entre la hidroquinona y el respectivo X-alquino (X = Cl para *n* = 3 y I para *n* = 4), se utilizó como base K₂CO₃ y DMF anhidra como disolvente de la reacción; esta reacción se llevó a cabo a una temperatura de 72 °C. La reacción de eterificación de Williamson es una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2)⁵⁷; el mecanismo por el que sucede esta reacción es la formación de un fenolato por el ataque del carbonato de potasio, después el fenolato atacará al halogenuro de alquilo y se formaran los productos. Debido a que en esta reacción se obtienen dos productos, el producto mono y el di-sustituido, es necesario purificar por cromatografía en columna con gel de sílice para obtener la fracción correspondiente al producto monosustituido.

6.1.2. Caracterización de los intermediarios HO-C₆H₄-O-(CH₂)_n-alquino (*n* = 3 y 4), A y B

Los intermediarios A y B fueron caracterizados por ¹H, ¹³C – DEPTQ RMN y DART. En el espectro de ¹H RMN del producto A (Figura 10) se observa a campo bajo δ_H= 8.9 la señal de un singlete que corresponde a un átomo de hidrógeno unido a un heteroátomo que corresponde al fenol. Después, a δ_H= 6.76 y 6.68 aparecen dos señales dobles que integran para 2H y que corresponden a los hidrógenos a y b, respectivamente. Consecutivamente, a δ_H= 3.93 se observa una señal triple que integra para 2H y que corresponde al metileno c, después a δ_H= 2.80 se localiza otra señal triple que

integra para 1H y que corresponde al grupo **alquino**. Finalmente, a $\delta_{\text{H}}= 2.31$ y 1.86 se observan dos señales, una triple y una múltiple que integran para 2H y que corresponden a los metilenos **e** y **d**. Las señales determinantes con las que se corroboró la obtención del producto monosustituido son las que corresponden al hidrógeno del fenol que integra únicamente para 1H, a los hidrógenos aromáticos que describen a un anillo sustituido con dos grupos funcionales diferentes y al hidrógeno del **alquino**.

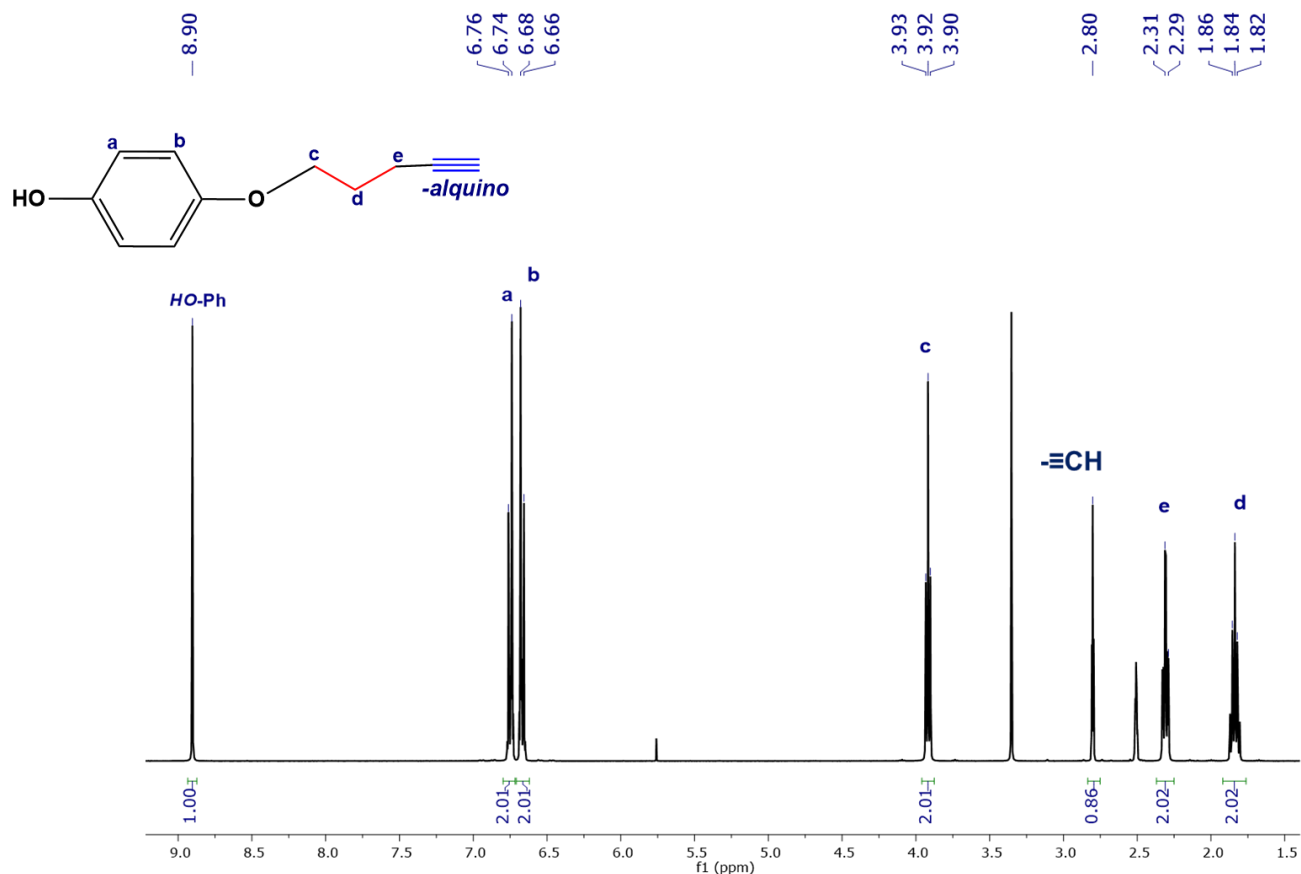


Figura 10. Espectro de ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) a 400 MHz del intermediario **A**.

Así mismo el análisis del espectro de ^{13}C – DEPTQ (Figura 11) muestra a $\delta_{\text{C}}= 152.01$ la señal que corresponde a los carbonos cuaternarios del anillo aromático, el carbono que sostiene al fenol y el que sostiene al éter. Después, a $\delta_{\text{C}}= 116.5$ aparecen los carbonos **a** del anillo aromático y a $\delta_{\text{C}}= 116.20$ aparece la señal que corresponde a los carbonos **b**. El carbono cuaternario del alquino aparece a $\delta_{\text{C}}= 84.56$ e inmediatamente después a $\delta_{\text{C}}= 72.34$ aparece el carbono del alquino terminal. Finalmente, a $\delta_{\text{C}}= 67.15$, 28.67 y 15.29 aparecen los carbonos de los metilenos **c**, **d** y **e**.

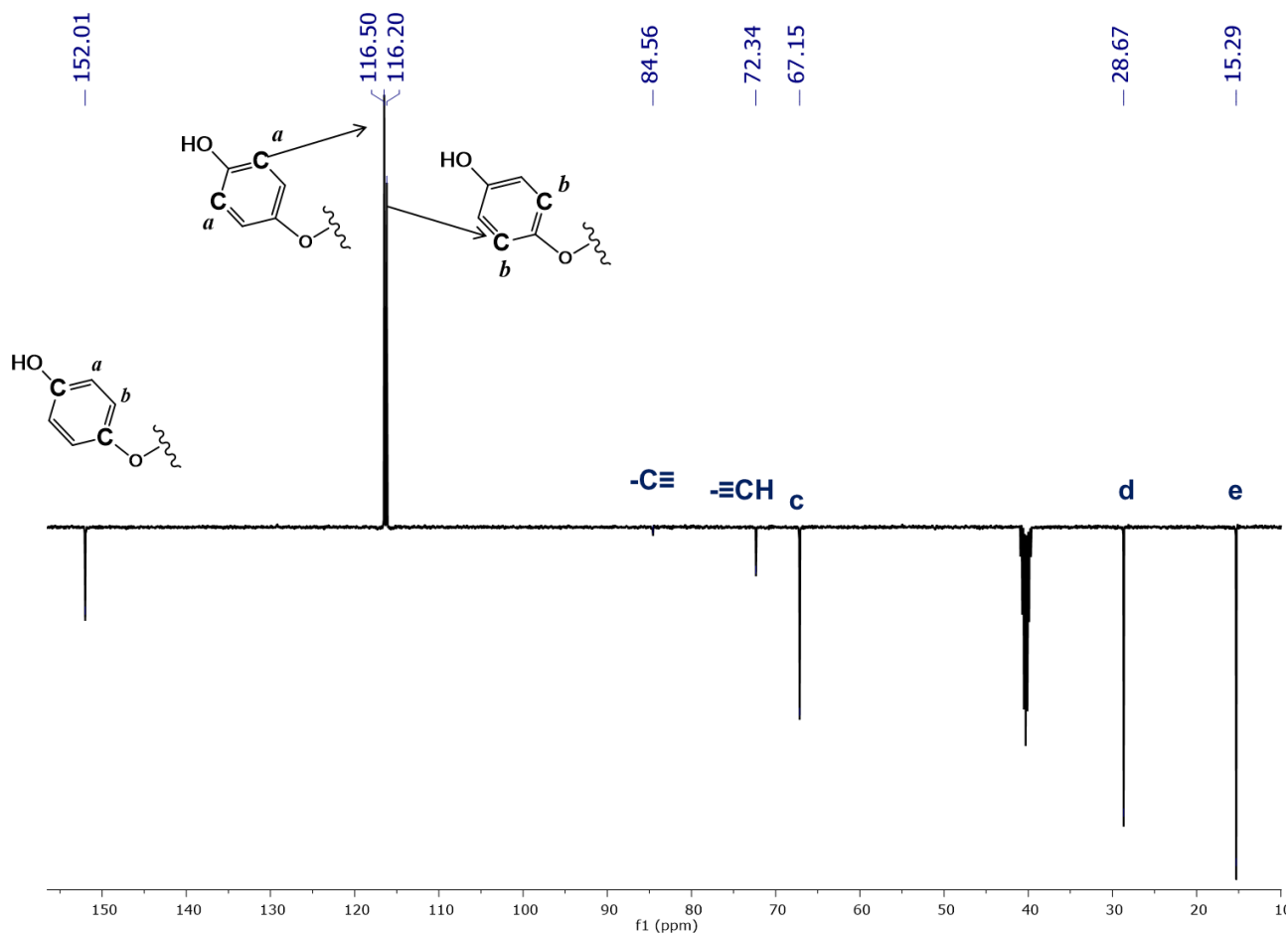


Figura 11. Espectro de ^{13}C – DEPTQ RMN ($\text{DMSO-}d_6$) a 100 MHz del intermediario **A**.

También, el intermediario **A** se caracterizó por espectrometría DART (Figura 12) se observa un pico base a 177 que corresponde al ión $[\text{M} + 1]$, lo que corresponde al peso molecular del compuesto esperado.

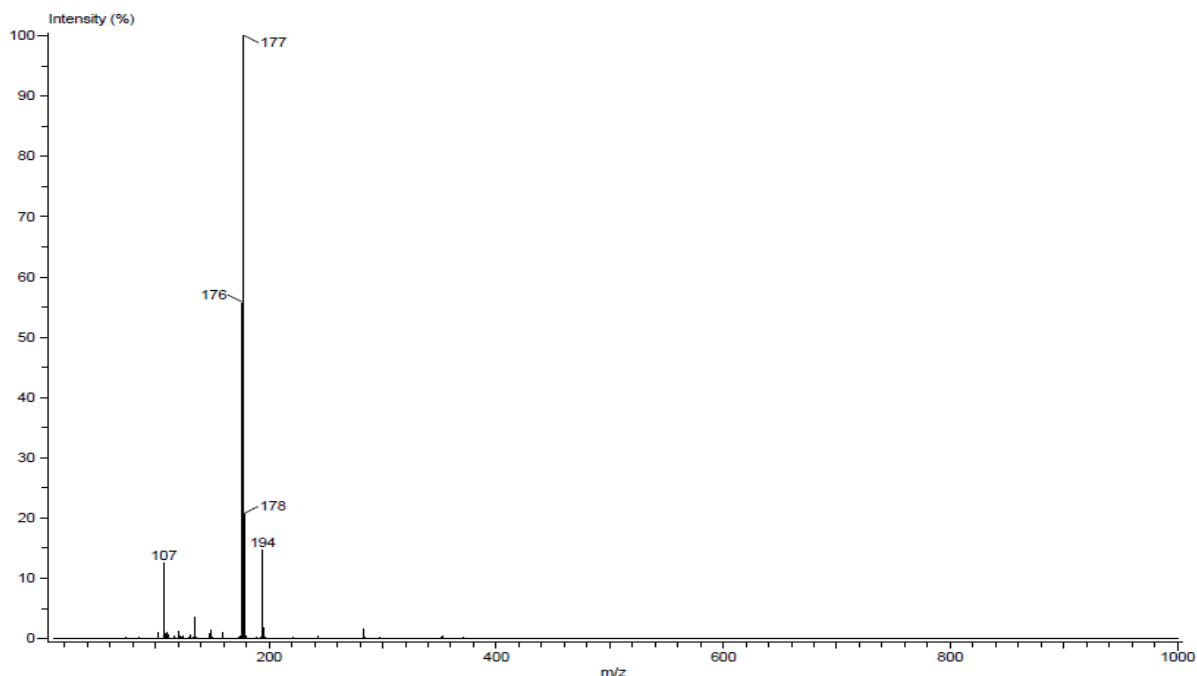
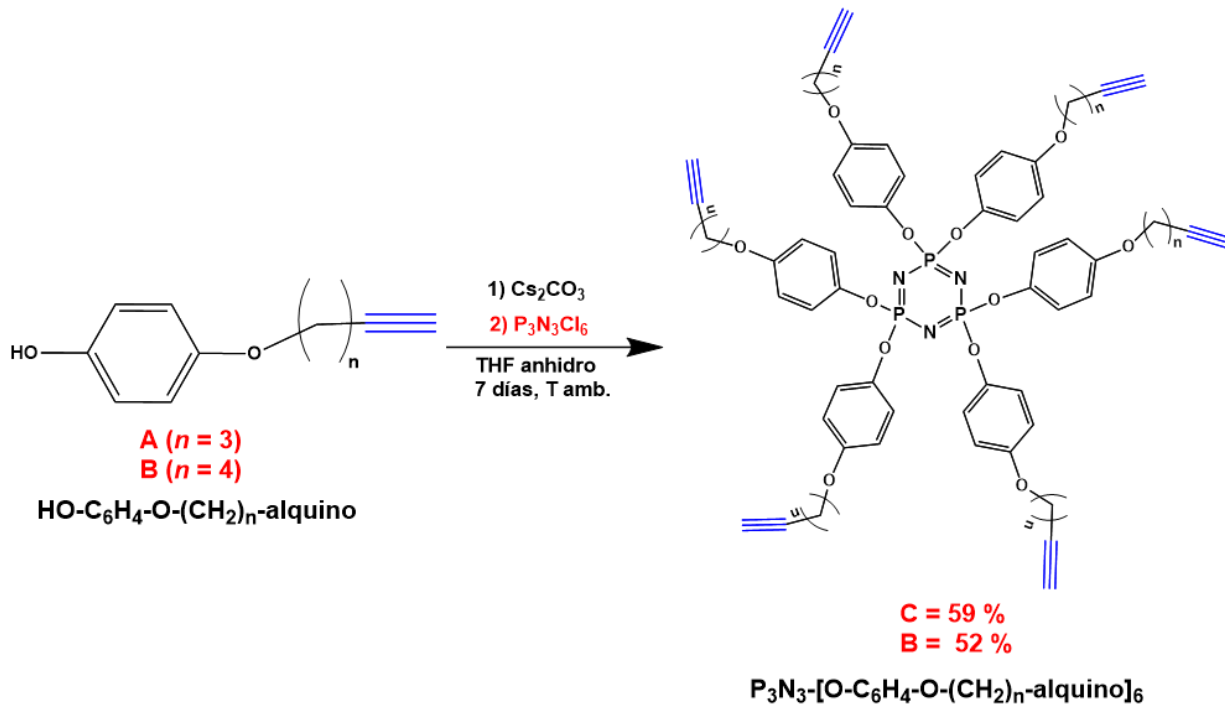


Figura 12. Espectro de masas por DART del intermediario **A**.

Un análisis similar se realizó para la caracterización del intermediario **B** (Anexo 1, Figura 43 - 45). En el espectro de ^1H RMN (Anexo 1, Figura 43) se observa a campo bajo $\delta_{\text{H}} = 8.88$ la señal de un singlete debida al hidrógeno del grupo fenol, después a $\delta_{\text{H}} = 6.75$ y 6.67 aparecen dos señales dobles que integran para 2H y que corresponden a los hidrógenos **a** y **b**, respectivamente. Consecutivamente, a $\delta_{\text{H}} = 3.88$ se observa una señal triple que integra para 2H y que corresponde al metileno **c**, después a $\delta_{\text{H}} = 2.78$ se localiza otra señal triple que integra para 1H y que corresponde al grupo **alquino**. Finalmente, a $\delta_{\text{H}} = 2.78$, 2.22 y 1.61 se observan tres señales, un triplete y dos múltiples que cada una integra para 2H y que corresponden a los metilenos **e**, **d** y **f**. Las señales determinantes con las que se corroboró la obtención del producto monosustituido son las mismas que en el intermediario **A**.

En el espectro de ^{13}C – DEPTQ (Anexo 1, Figura 44) se observan a $\delta_{\text{C}} = 152.19$ y 151.88 las señales que corresponden a los carbonos cuaternarios del anillo aromático. Después, a $\delta_{\text{C}} = 116.24$ aparecen los carbonos **a** del anillo aromático y a $\delta_{\text{C}} = 116.14$ aparece la señal que corresponde a los carbonos **b**. El carbono cuaternario del alquino aparece a $\delta_{\text{C}} = 83.42$ e inmediatamente después a $\delta_{\text{C}} = 72.19$ aparece el carbono del alquino terminal. Por último, a $\delta_{\text{C}} = 68.10$, 28.75 , 25.49 y 18.26 aparecen los carbonos de los metilenos **c**, **d**, **e** y **f**. Finalmente, también se comprobó la obtención del compuesto **B** por espectrometría DART (Anexo 1, Figura 45) ya que el pico base que se observa a 191 y corresponde al ion $[\text{M} + 1]$, lo que confirma el peso molecular esperado.

6.1.3. Síntesis de P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-alquino]₆ ($n = 3$ y 4), C y D



Esquema 6. Síntesis de los intermediarios C y D.

En el esquema 6 se muestra la síntesis de los intermediarios C y D. Para la síntesis de estos intermediarios, se realizó una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2). El carbonato de cesio abstrae un protón al intermediario $HO-C_6H_4-O-(CH_2)_n$ -alquino y se produce la formación del fenolato para que, después esté realice un ataque nucleofílico al hexaclorociclotrifosfaceno y así se produzca la formación del producto C o D. Para purificar el producto final, es necesario utilizar cromatografía en columna con gel de sílice y después recristalizar el producto en éter isopropílico frío. Se obtuvieron C y D con un rendimiento del 59 y 52 %, respectivamente.

6.1.4. Caracterización de los compuestos P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-alquino]₆ ($n = 3$ y 4), C y D

Para el compuesto C el espectro de 1H RMN (Figura 13) se observa a campo bajo $\delta_H = 6.8$ y 6.76 una señal doble de dobles que integra para 24H y que corresponde a los hidrógenos del anillo aromático y describen a un benceno con dos sustituyentes diferentes. En este caso, un átomo de oxígeno unido a átomo de fósforo y el otro sustituyente es un átomo de oxígeno unido a una cadena alifática. Después, a $\delta_H = 4.01$ aparece una señal triple que integra para 12H y pertenece a los hidrógenos de los metilenos c, los cuales se desplazan hacia campo bajo por la cercanía con el átomo de oxígeno el cual es más electronegativo, posteriormente en $\delta_H = 2.82$ observamos una señal triple

que integra para 6H y corresponde a los hidrógenos de los alquinos, finalmente hacia campo alto aparecen en $\delta_H = 2.36$ y 1.91 aparecen dos señales, una triple y una múltiple, que integran para 12H cada una. Todas las señales mencionadas tuvieron un ligero desplazamiento hacia campo bajo debido a la influencia del ciclotrifosfaceno. En comparación con las señales del respectivo producto monosustituido y con el análisis del espectro podemos confirmar que se llevó a cabo la sustitución en las seis posiciones del ciclotrifosfaceno con los intermediarios **A** y **B**.

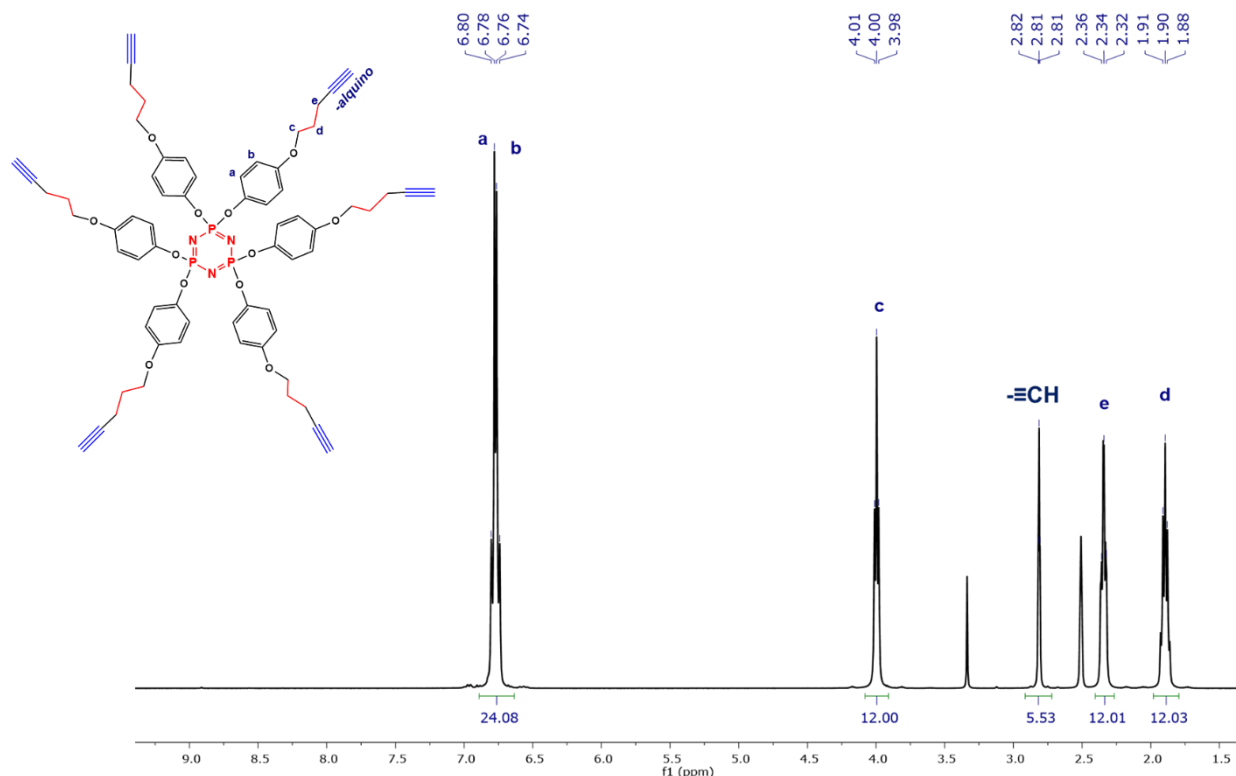


Figura 13. Espectro de ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) a 400 MHz del intermediario **C**.

En el espectro de ^{13}C – DEPTQ (Figura 14) se observan a $\delta_C = 156.34$ y 144.23 las señales que corresponden a los carbonos cuaternarios del anillo aromático y que debido a que ambos carbonos tienen diferentes sustituyentes presentan diferentes desplazamientos. Consecutivamente, a $\delta_C = 122.21$ y 115.83 observamos las señales de los carbonos **a** y **b** del anillo aromático, que presentan el mismo comportamiento en el desplazamiento que los carbonos cuaternarios. Después, a $\delta_C = 84.36$ se observa el carbono cuaternario del alquino, e inmediatamente, a $\delta_C = 72.40$ aparece la señal del carbono terminal del alquino. Finalmente, a $\delta_C = 67.11$, 28.56 y 15.31 se observan las señales de los carbonos de los metilenos **c**, **d** y **e**. Se puede observar un desplazamiento de las señales, principalmente las de los carbonos aromáticos hacia campo bajo, debido a la presencia del anillo de P_3N_3 .

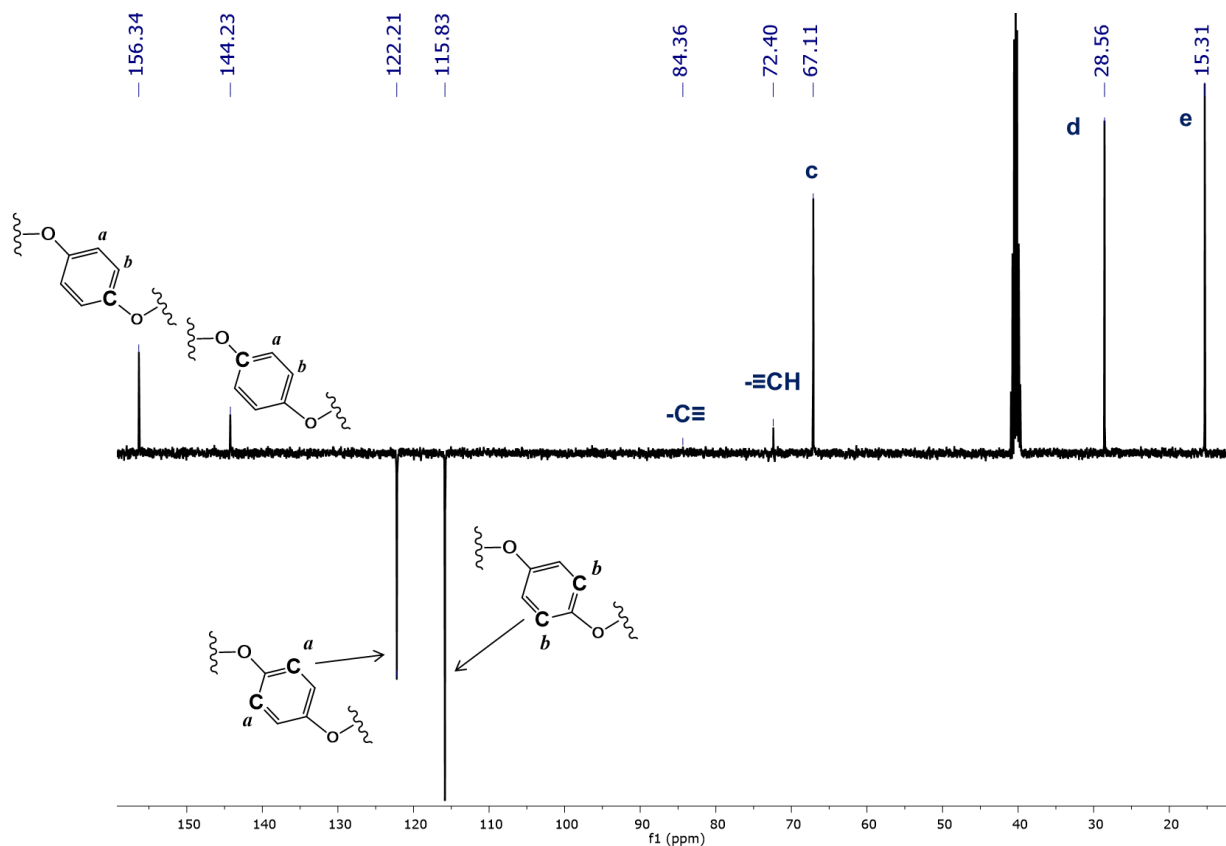


Figura 14. Espectro de ^{13}C – DEPTQ RMN ($\text{DMSO-}d_6$) a 100 MHz del intermediario **C**.

Para corroborar que se llevó a cabo la sustitución de los seis átomos de cloro por el compuesto **C** en el anillo de P_3N_3 , se utilizó ^{31}P RMN, en el espectro (Figura 15) se observa a $\delta_{\text{P}} = 9.93$ una señal que corresponde a los átomos de fósforo funcionalizados con el mismo grupo funcional, debido a que estos átomos presentan el mismo ambiente químico, se observa una sola señal. Si el anillo de P_3N_3 no estuviera completamente sustituido en las seis posiciones, se observaría más de una señal en el espectro.

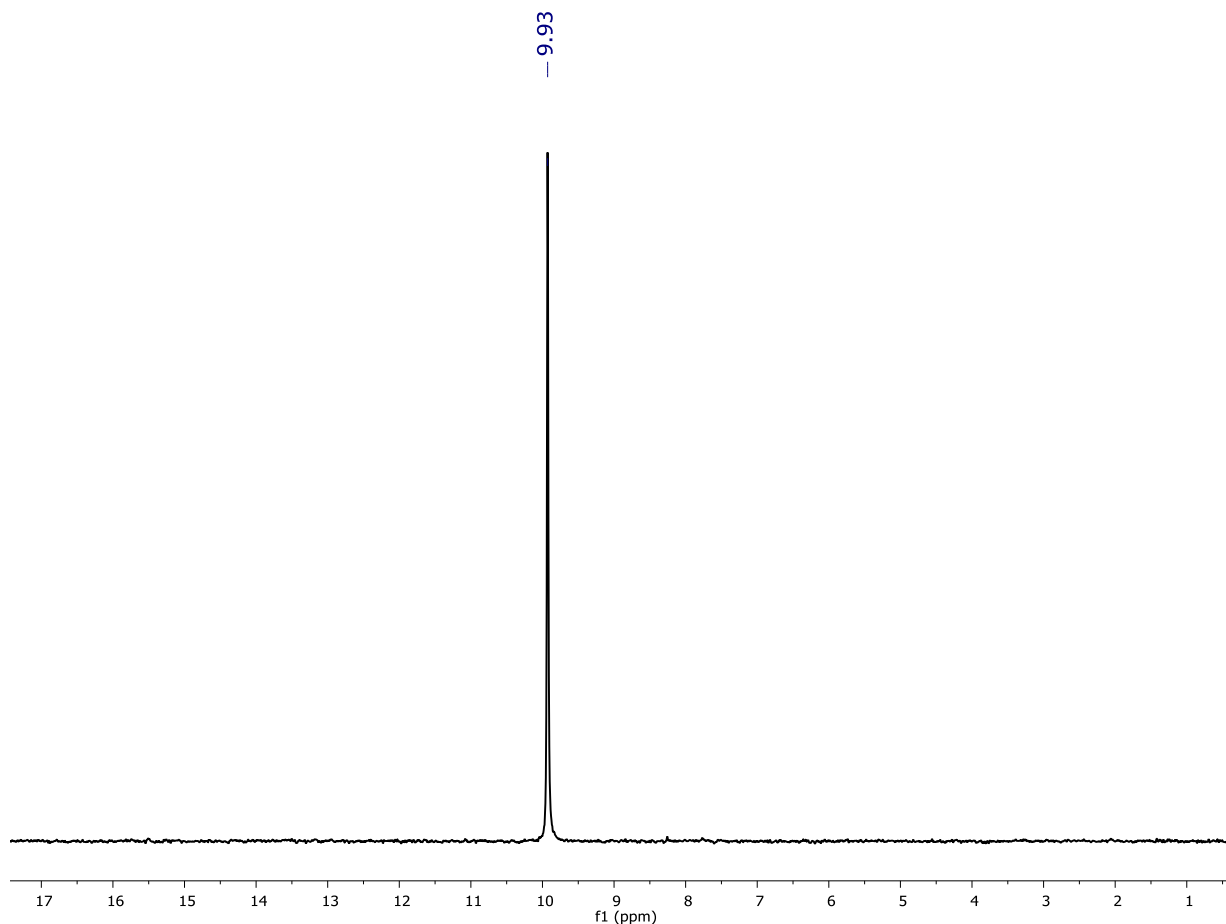


Figura 15. Espectro de ^{31}P RMN ($\text{DMSO-}d_6$) del intermediario **C**.

Finalmente, para el intermediario **C** se realizó la caracterización por espectrometría MALDI-TOF y en el espectro (Anexo 1, Figura 46) se observa un pico base a 1187.623 que corresponde al ión $[\text{M} + 1]$, lo que corresponde al peso molecular del compuesto esperado.

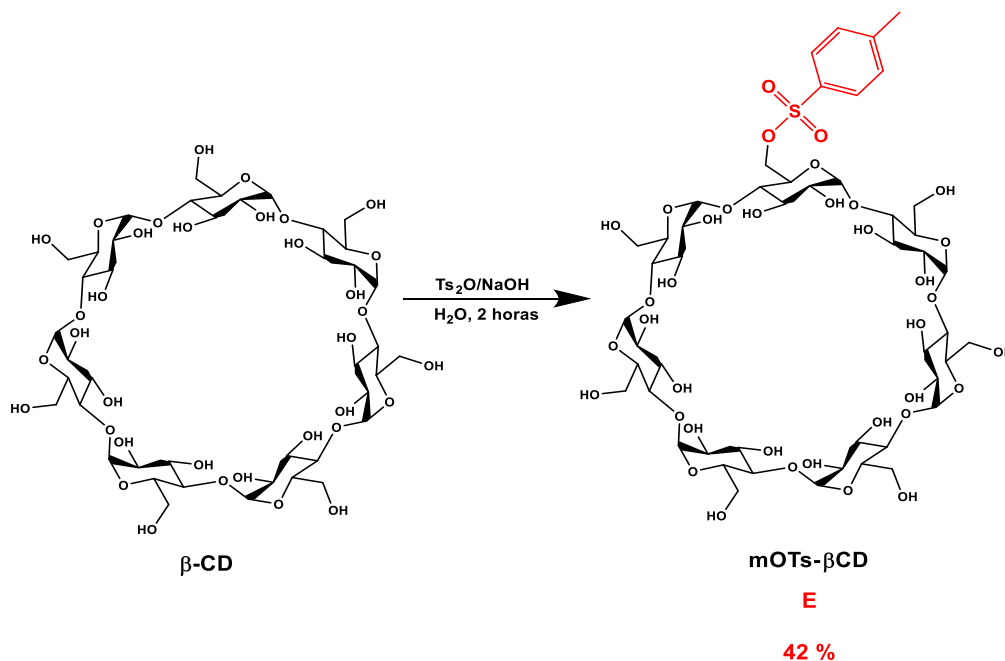
Para el intermediario **D** se realizó un análisis similar respecto a la caracterización (Anexo 1, Figura 47 - 50). En el espectro de ^1H RMN (Anexo 1, Figura 47) se observa a campo bajo $\delta_{\text{H}} = 6.78$ la señal de un doble de dobles y que integra para 24H y que corresponde a los hidrógenos **a** y **b** del anillo aromático, después a $\delta_{\text{H}} = 3.95$ aparece una señal triple integra para 12H y que corresponden a los hidrógenos del metileno **c**. Consecutivamente, a $\delta_{\text{H}} = 2.78$ se observa una señal triple que integra para 6H y que corresponde al grupo *alquino*. Finalmente, a $\delta_{\text{H}} = 2.25$, 1.80 y 1.63 se observan tres señales, un triple y dos múltiples que cada una integra para 12H y que corresponden a los metilenos **e**, **d** y **f**, respectivamente. Se puede observar el mismo comportamiento que el intermediario **C**, ya que las señales con las que se corroboró la adición de **D** al anillo de P_3N_3 fue que no se observa la señal del hidrógeno del fenol y la integración de las señales corresponde a seis grupos del intermediario **D** unidos

a P_3N_3 . Además, que las señales también presentaron un desplazamiento hacia campo bajo debido al cambio en su ambiente químico.

En el espectro de ^{13}C – DEPTQ del intermediario **D** (Anexo 1, Figura 48) se observan a $\delta_C= 156.46$ y 144.19 las señales que corresponden a los carbonos cuaternarios del anillo aromático. Después, a $\delta_C= 122.20$ aparecen los carbonos **a** del anillo aromático y a $\delta_C= 115.77$ aparece la señal que corresponde a los carbonos **b** del anillo aromático. El carbono cuaternario del alquino aparece a $\delta_C= 85.01$ e inmediatamente después a $\delta_C= 72.17$ aparece el carbono del alquino terminal. Finalmente, a $\delta_C= 68.08, 28.64, 25.48$ y 18.28 aparecen los carbonos de los metilenos **c, d, e** y **f**.

También se corroboró la completa funcionalización del anillo de P_3N_3 utilizando ^{31}P RMN, en el espectro (Anexo 1, Figura 49) se observa una señal a $\delta_P= 10.01$ debida a los fósforos del anillo de P_3N_3 y que confirma la sustitución en las seis posiciones del anillo con el mismo sustituyente. Finalmente, también se comprobó la obtención del compuesto **D** por espectrometría MALDI-TOF (Anexo 1, Figura 50) con un pico base a 1271.794 , que corresponde al ion $[M + 1]$, lo que confirma el peso molecular esperado.

6.1.5. Síntesis de 6-O-monotosil- β -ciclodextrina (mOTs- β CD), **E**



Esquema 7. Síntesis del intermediario **E**.



En el esquema 7 se presenta la síntesis del intermediario **E**. Dicho intermediario había sido previamente reportado y es uno de los intermediarios más importantes en la producción de β CD sustituidas, porque hasta hace un tiempo, su producción implicaba procedimientos largos y costosos, además de una purificación con disolventes tóxicos y lo más importante, se obtenían bajos rendimientos⁵⁸. Esta reacción consiste en funcionalizar un único grupo hidroxilo de la cara primaria de la β CD. El compuesto **E** se obtiene a través de la metodología propuesta por Zhong et al.⁵⁵, la cual consiste, primero, en la preparación del anhídrido del *p*-toluensulfonilo (Ts_2O) para después, hacerlo reaccionar en medio acuoso con la β CD; subsecuentemente se llevó a cabo la adición de base y se controló el tiempo. El intermediario **E** se obtuvo con un proceso de purificación sencillo y no se utilizó cromatografía para obtenerlo, además de que la reacción proporciona altos rendimientos para el producto monosustituido y no se obtuvieron mezclas de polisustitución.

6.1.6. Caracterización del intermediario **E**

El intermediario **E** se caracterizó por ^1H , ^{13}C – DEPTQ RMN y MALDI-TOF. A continuación, se describirán las señales que se observan en el espectro de ^1H RMN (Figura 16) del intermediario **E**. Cabe resaltar que, debido a la modificación de una molécula de glucopiranososa en la β CD, en el espectro se pueden distinguir las señales correspondientes al anillo funcionalizado con el grupo tosilo y las señales que corresponden al resto de los anillos de glucopiranososa de la β CD. En el espectro se observa en campo bajo a $\delta_{\text{H}} = 7.77$ y 7.45 dos señales dobles que integran para 2H cada una y que corresponden a los hidrógenos **a** y **b** del anillo aromático del grupo tosilo. Después a $\delta_{\text{H}} = 5.84$ aparece una señal debida al hidroxilo 2 (OH_2') del anillo de glucopiranososa modificado, después a $\delta_{\text{H}} = 5.79$ aparecen las señales que integran para 6H y 7H y que corresponden a los hidrógenos de los hidroxilos 2 y 3 (OH_2 y OH_3) localizados en la cara secundaria de la β CD. A continuación, a $\delta_{\text{H}} = 4.85$ aparece una señal múltiple que integra para 6H, atribuidas a los hidrógenos del carbono anomérico (H_1) de las moléculas de glucopiranososa sin modificar; inmediatamente después, a $\delta_{\text{H}} = 4.78$ se observa la señal que corresponde al hidrógeno del carbono anomérico (H_1') de la glucosa modificada. Después, entre $\delta_{\text{H}} = 4.53 - 4.44$ se observan señales múltiples que integran para 6H y que pertenecen a los hidrógenos de los hidroxilos unidos al carbono 6 (OH_6). Siguiendo el espectro, en $\delta_{\text{H}} = 4.39 - 4.32$ se aprecia una señal múltiple que integra para 2H y pertenece a los hidrógenos del C6 (H_6') del anillo de glucosa modificado; inmediatamente después, se observa a $\delta_{\text{H}} = 4.22$ una señal múltiple que integra para 1H y que corresponde al hidrógeno del carbono C5 (H_5') del anillo de glucosa modificado. También, entre $\delta_{\text{H}} = 3.71 - 3.20$ se observa un conjunto de señales que corresponden a los hidrógenos de los carbonos 6 (H_6) y de los carbonos 5 (H_5) de las unidades de glucosa que no sufrieron modificaciones. Además,



se encuentran los hidrógenos de los carbonos 3, 2 y 4 (H3), (H2) y (H4) de la β CD, los cuales no sufrieron cambios en su desplazamiento químico si los comparamos con el espectro de la β CD nativa. Finalmente, a $\delta_H = 2.44$ se localiza una señal singulete que integra para 3H y que pertenece a los hidrógenos del metilo del grupo tosilo. Con la presencia de las señales del grupo tosilo también podemos confirmar la monofuncionalización de la β CD.

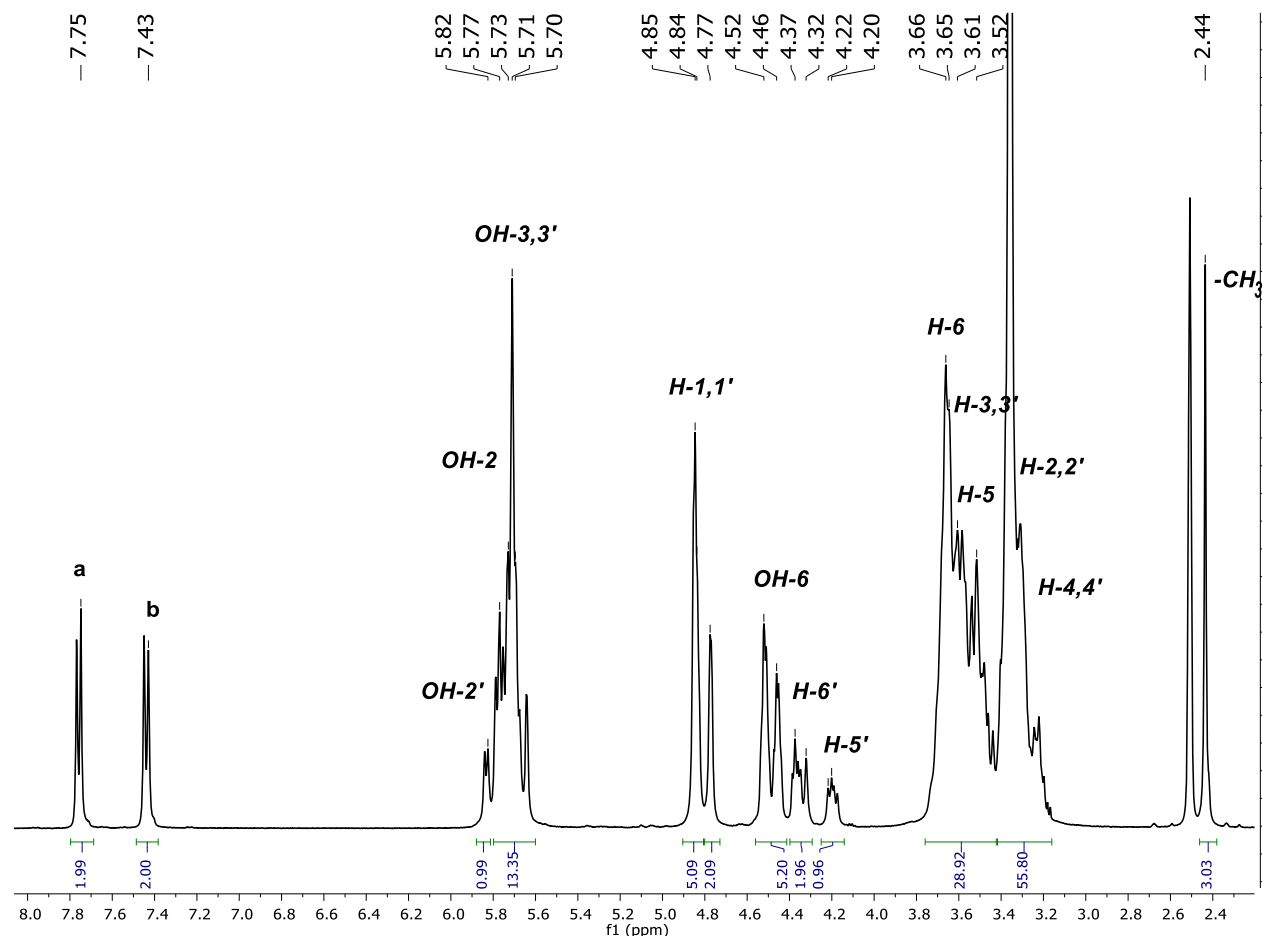


Figura 16. Espectro de ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) del intermediario **E**.

Continuando con la caracterización del intermediario **E**, en el espectro de ^{13}C RMN (Figura 17), se observa en $\delta_C = 145.25$ y 133.11 las señales que corresponden a los carbonos cuaternarios del anillo aromático del grupo tosilo, seguidos por las señales de los carbonos en posición *orto* y *meta* al grupo sulfonilo en $\delta_C = 130.33$ y 128.03 , respectivamente. Consecutivamente, a $\delta_C = 102.37$ y 101.73 aparecen los carbonos C1 de las unidades de glucopiranososa sin modificar y el carbono C1' del anillo de glucosa modificado; entre $\delta_C = 81.95 - 81.62$ se encuentran las señales de los carbonos C4 y C4' con el mismo comportamiento que los carbonos anteriores. Después, entre $\delta_C = 73.51 - 72.29$ se puede observar un conjunto de señales que pertenecen a los carbonos C2, C2', C3, C3', C5 y C5', seguidas de una señal

a $\delta_C = 69.35$ que corresponde al carbono C6' de la unidad de glucosa modificada. Finalmente, en $\delta_C = 60.36$ aparece una señal debida al carbono 6 (C6) de las unidades de glucosa sin modificar, seguida de una señal a $\delta_C = 21.66$ que pertenece al carbono del grupo metilo del sustituyente *p*-toluensulfonilo.

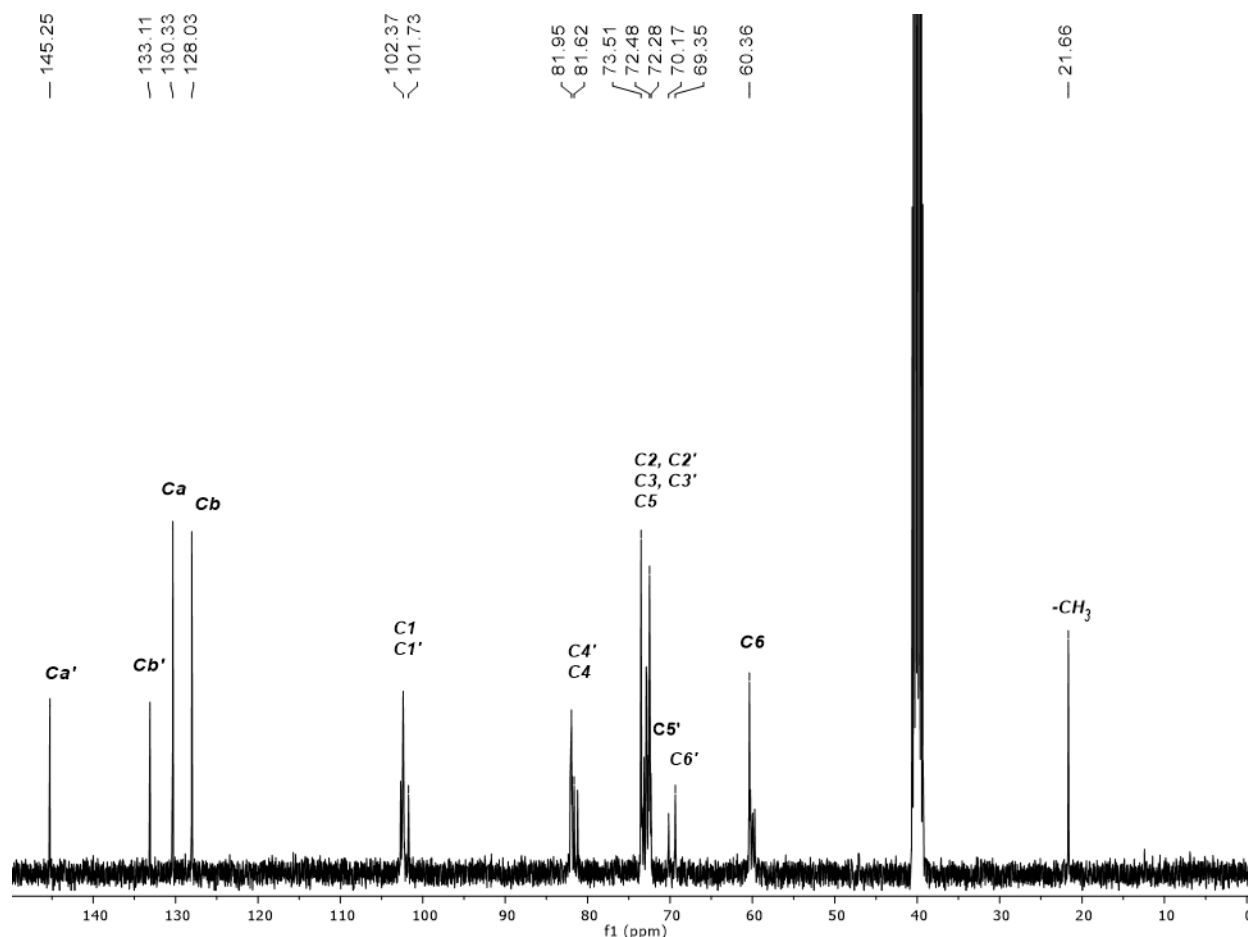
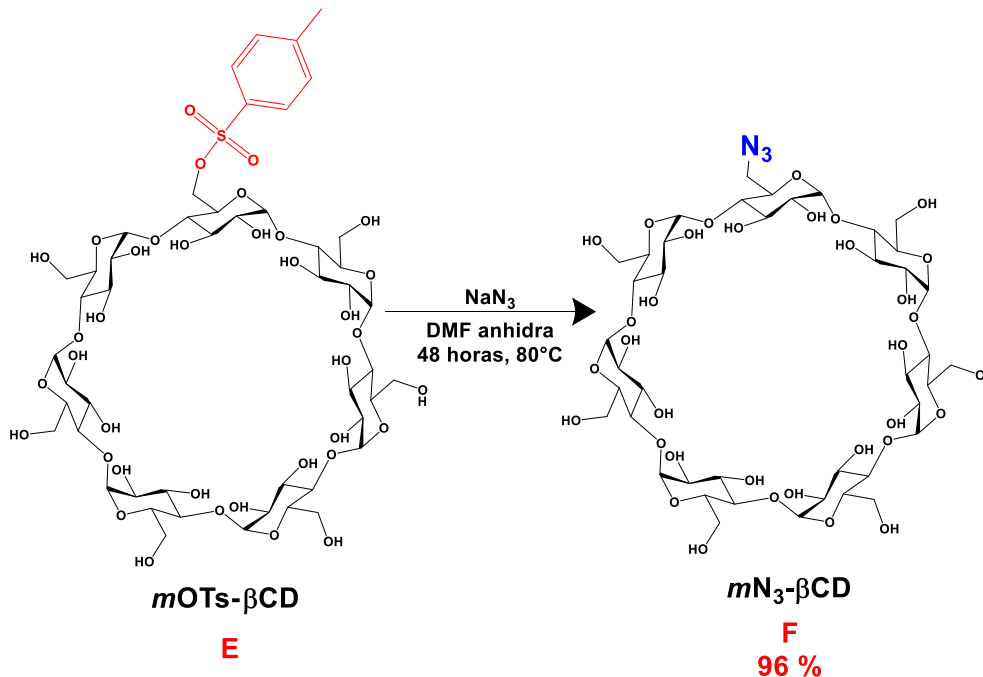


Figura 17. Espectro de ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) del intermediario E.

Para terminar de describir la caracterización del intermediario E. Se realizó la caracterización por espectrometría de MALDI-TOF. En el espectro (Anexo 1, Figura 51) se observa una señal a 1312.782 m/z que corresponde al ión molecular más un átomo de sodio [M+Na]⁺, la cual confirma el peso molecular del compuesto.

6.1.7. Síntesis de 6-*O*-monoazido- β -ciclodextrina (mN_3 - β CD), F



Esquema 8. Síntesis del intermediario **F**.

Antes de realizar la reacción de química “click”, la β CD debe funcionalizarse como lo hemos estado describiendo con la modificación anterior, con el intermediario **E**. Una de las funcionalizaciones más útiles es la introducción de un grupo azida, ya que la azido- β CD es un buen candidato para realizar la reacción de química “click” y así, poder construir estructuras más complejas, como los dendrímeros o compuestos dendríticos⁵⁹. En el esquema 8 se presenta la síntesis del intermediario **F**. Este intermediario ya había sido previamente reportado. El intermediario **F** se obtuvo mediante una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular ($\text{S}_\text{N}2$), en la que el grupo tosilo se sustituyó por un grupo azida en un medio polar aprótico, como es la DMF anhidra. El intermediario **F** se obtuvo con un rendimiento del 96 %.

6.1.8. Caracterización de 6-*O*-monoazido- β -ciclodextrina (mN_3 - β CD), F

El intermediario **F** se caracterizó por RMN ^1H en $\text{DMSO-}d_6$ (Figura 18). Se puede observar, principalmente, la desaparición de las señales que correspondían al grupo *p*-toluensulfonilo en el espectro del intermediario anterior debido a que en el intermediario **F** este grupo fue sustituido por el grupo azido. En $\delta_{\text{H}} = 5.80$ se observa una señal que integra para 7H y que corresponde a los hidrógenos de los hidroxilos OH2. Después entre $\delta_{\text{H}} = 5.72 - 5.63$ aparece un conjunto de señales que integran

para 6H y 1H y que pertenecen a los hidrógenos de los hidroxilos OH3 y OH3'. A continuación, a $\delta_H=4.88$ aparece una señal que integra para 1H y que se asigna para el hidrógeno H1' de la unidad de glucopiranososa modificada, y se puede observar que este protón sufre un efecto desprotector por la adición del grupo azido ya que sufre un desplazamiento hacia campo bajo comparado con el espectro anterior. Posteriormente, a $\delta_H=5.84$ se puede localizar una señal que integra para 6H y que pertenece a los hidrógenos H1 de las unidades de glucosa sin modificar. Inmediatamente, entre $\delta_H=4.57 - 4.47$ se localiza una señal múltiple que integra para 6H y que corresponde a los hidrógenos de los hidroxilos primarios (OH6) de la β CD. A $\delta_H=3.79$ se puede localizar una señal que integra para 2H y que corresponde a los hidrógenos H6' de la unidad de glucosa modificada con el grupo azido y se puede analizar que sufren un efecto protector por parte de este grupo, ya que sufren un desplazamiento hacia campo alto. Finalmente, entre 3.66 – 3.26 aparecen las señales que pertenecen a los hidrógenos H6, H3, H5, H4 y H2 de la β CD, los cuales no sufren cambios en su desplazamiento por la adición del grupo azido.

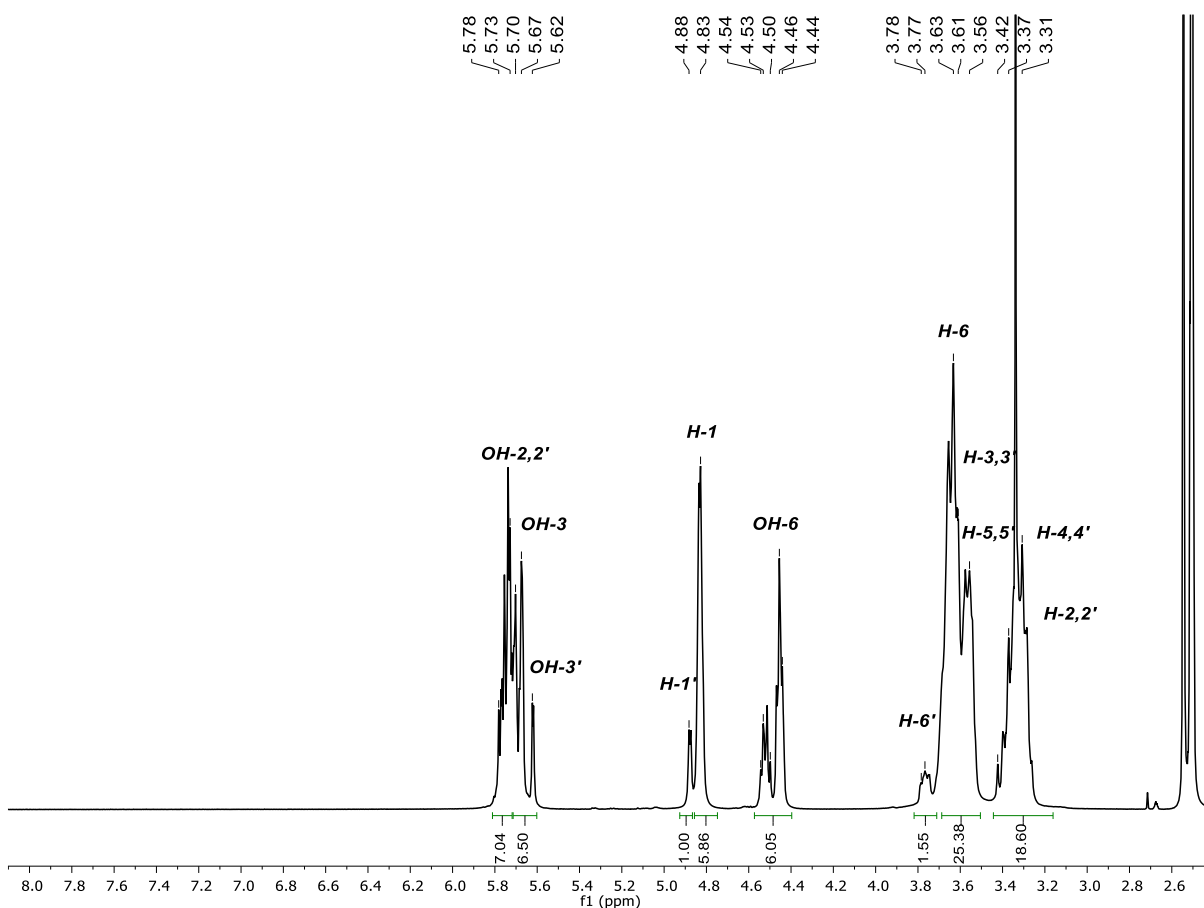


Figura 18. Espectro de ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) del intermediario F.

Para continuar con la caracterización del intermediario **F**, en el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19) se puede confirmar lo que se observa en el espectro de RMN ^1H , y es la desaparición de las señales del grupo *p*-toluensulfonilo debido a la sustitución de este grupo por el grupo azido. Continuando con el análisis del espectro, entre $\delta_{\text{C}} = 102.72 - 102.04$; aparecen la señal correspondiente a los carbonos C1 de las unidades de glucopiranososa sin modificar y la señal el carbono C1' del anillo de glucosa modificado; entre $\delta_{\text{C}} = 83.43 - 81.85$ se encuentran las señales de los carbonos C4 y C4' con el mismo comportamiento que los carbonos anteriores. Después, entre $\delta_{\text{C}} = 73.51 - 70.63$ se puede observar un conjunto de señales que pertenecen a los carbonos C2, C2', C3, C3', C5 y C5', seguidas de una señal a $\delta_{\text{C}} = 60.59$ debida a los carbonos C6 de las unidades de glucosa sin modificar. Finalmente, en $\delta_{\text{C}} = 51.55$ aparece una señal que corresponde al carbono 6 (C6') de la unidad de glucopiranososa modificada y que sufre un cambio en su desplazamiento hacia campo alto debido al efecto protector que causa el grupo azido sobre este carbono y que también se pudo observar en el espectro de RMN ^1H .

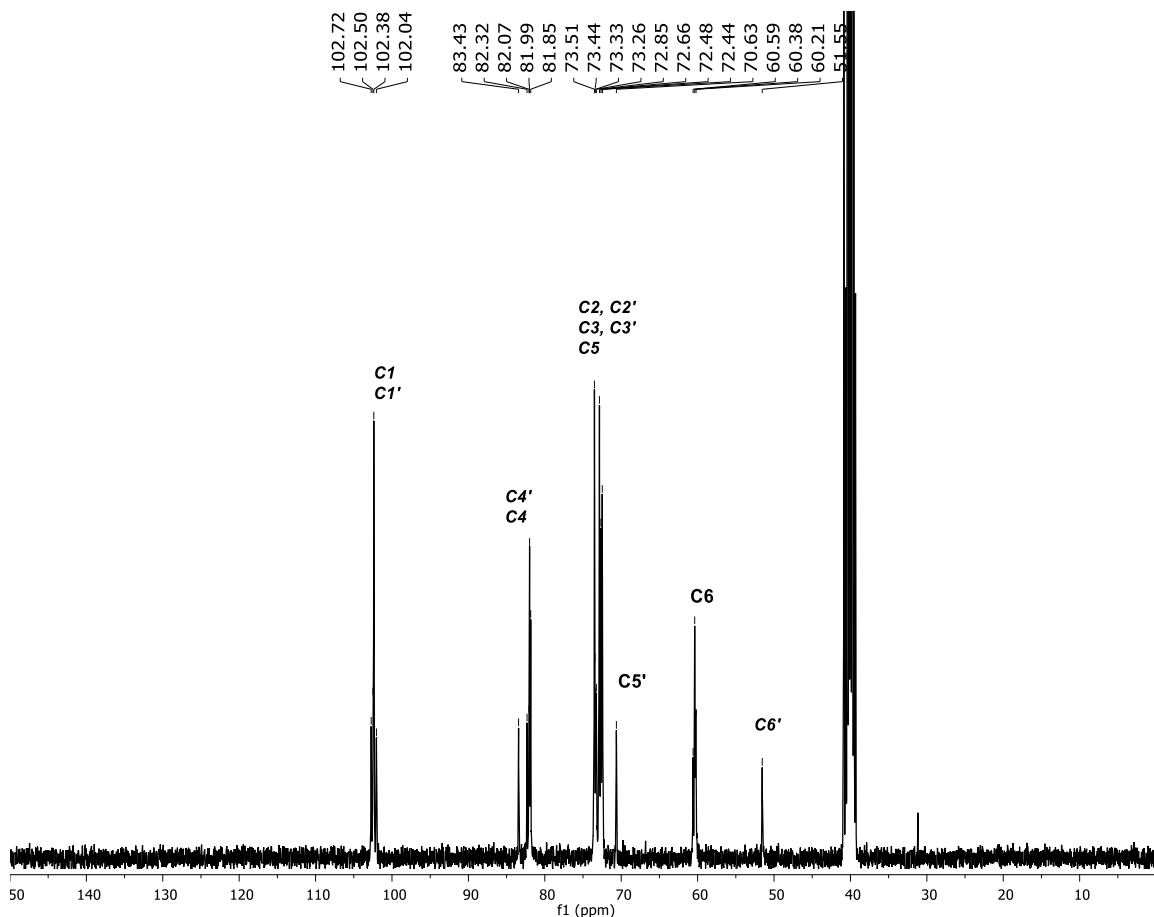
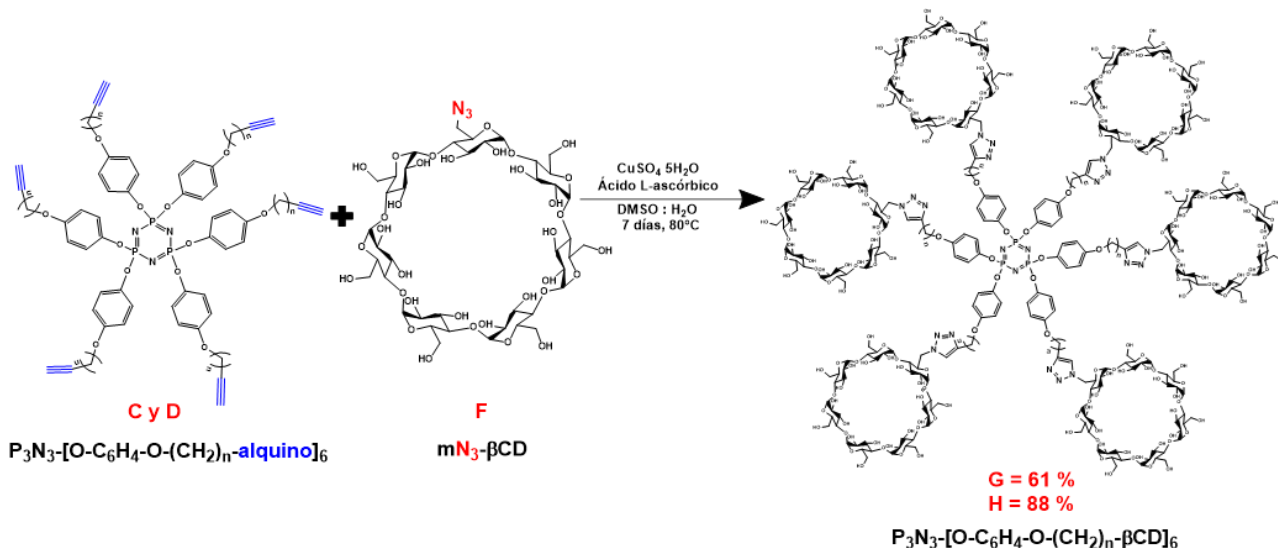


Figura 19. Espectro de ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) del intermediario **F**.

También, el intermediario **F** se caracterizó por espectrometría MALDI-TOF. En el espectro (Anexo 1, Figura 52) se observa una señal a 1183.625 m / z, la cual corresponde al ion molecular más un átomo de sodio $[M + Na]^+$, lo que confirma el peso molecular del compuesto esperado.

6.1.9. Síntesis de los compuestos dendríticos P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-βCD]₆ (n = 3 y 4) **G** y **H**



Esquema 9. Ruta sintética para la obtención de los compuestos dendríticos **G** y **H**.

Recientemente, el concepto de química “click” y, especialmente, la reacción de cicloadición de azida – alquino catalizada por cobre (I) (CuAAC por sus siglas en inglés) se adaptó a muchos campos en la química orgánica y se ha convertido en una herramienta sintética poderosa y atractiva para la construcción de moléculas macrocíclicas debido a su alta eficiencia y selectividad, tolerancia de grupos funcionales sensibles, altos rendimientos y condiciones de reacción suaves, con pocos o ningún subproducto. La reacción de CuAAC tiene la capacidad de producir exclusivamente 1,2,3-triazoles disustituidos en 1,4⁶⁰.

La reacción de CuAAC se considera un proceso que sucede en varios pasos. En el paso inicial, la ruta catalítica empieza cuando el ácido ascórbico reduce *in situ* el Cu (II) a Cu (I), entonces el cobre (I) ataca al grupo alquino y forma acetiluro de cobre a través de la coordinación con el alquino. En el siguiente paso, la azida se une al cobre y se forma un metalociclo de cobre no convencional. A continuación, el intermediario sufre una contracción anular favorecida energéticamente al formar un anillo de cinco miembros para dar un derivado de triazolilo de cobre, que tras una reacción ácido-base se obtiene el 1,2,3-triazol 1,4-disustituido deseado y el proceso catalítico se vuelve a regenerar^{60,61}.



Como ya se mencionó, la reacción de CuAAC es una herramienta muy útil para unir una gran diversidad de moléculas; principalmente, ha encontrado una amplia variedad de aplicaciones en la modificación de carbohidratos, ya que sus características estructurales permiten su modificación a las funcionalidades deseadas de alquino y azida para llevar a cabo el acoplamiento CuAAC⁶². Por supuesto que, este método en ascenso se introdujo en la química de las CDs, ya que proporciona una gran variedad de funcionalizaciones con altos rendimientos⁵⁹. Por estas razones, utilizamos la química “click” para obtener los compuestos dendríticos **G** y **H**; se utilizó como fuente de alquino a los intermediarios **B** y **C**, los cuales están conformados por el núcleo de ciclotrifosfaceno funcionalizado en sus seis posiciones con enlazadores que tienen diferente número de carbonos en la cadena alifática y un grupo alquino terminal, se evaluará si el tamaño de la cadena influye en la completa funcionalización del núcleo de P₃N₃ con moléculas de βCD utilizando la reacción de CuAAC. Por otra parte, como fuente de azida utilizamos al intermediario **F**, el cual es la βCD monofuncionalizada en la cara primaria con el grupo azido. Para el ciclo catalítico, se utilizó CuSO₄ · 5H₂O y ácido ascórbico. Todos los compuestos y catalizadores estaban disueltos en una mezcla de DMSO:H₂O que se mantuvo en agitación a 80 °C durante siete días. Se utilizó cromatografía de exclusión molecular para purificar los compuestos dendríticos y se obtuvieron rendimientos del 61 y 88 % para los compuestos dendríticos **G** y **H**, respectivamente.

6.1.10. Caracterización de los compuestos dendríticos P₃N₃-[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-βCD]₆ (n = 3 y 4) **G** y **H**

Para la caracterización de los compuestos dendríticos **G** y **H** se realizó un análisis a detalle para la correcta asignación de las señales utilizando RMN 1D y 2D (¹H, ¹³C, HMQC y COSY) en DMSO-*d*₆. En la **Figura 20** se observa la estructura del compuesto dendrítico **G** y como fueron asignados los hidrógenos en RMN. En el espectro de RMN ¹H del compuesto **G** (Figura 21) se pueden observar las siguientes señales: en δ_H= 7.82 aparece una señal singulete que corresponde al hidrógeno del anillo de triazol y que confirma que la reacción de CuAAC entre el grupo alquino y el grupo azido se ha llevado a cabo de manera exitosa pues integra para 6H lo que corresponde a las seis posiciones del anillo de ciclotrifosfaceno. Después a δ_H= 6.87 aparece una señal singulete que integra para 24H y que pertenece a los hidrógenos **a** y **b** del anillo aromático y que tuvieron un ligero desplazamiento hacia campo bajo debido a la funcionalización con las unidades de βCD. A continuación, entre δ_H= 5.87 – 5.66 se puede observar un conjunto de señales que corresponden a los hidrógenos de los hidroxilos 2 y 3 (OH-2', OH-2, OH-3 y 3') de las unidades de glucopiranososa sin modificar y de la unidad modificada. Posteriormente, a δ_H= 5.05 aparece una señal amplia que integra para 7H y que se puede asignar al



hidrógeno H-1' de la unidad de glucopiranososa modificada e inmediatamente después, entre $\delta_H = 4.84 - 4.78$ aparece un conjunto de señales que pertenecen a los hidrógenos H-1 de las unidades de glucosa sin modificar. La siguiente señal pertenece a los hidrógenos H-6' de la unidad modificada, la asignación de esta señal será discutida en la parte del análisis de los espectros bidimensionales. Inmediatamente después, entre $\delta_H = 4.56 - 4.50$ aparece un conjunto de señales que integran para 36H y que corresponden a los hidrógenos H-6' de la unidad de glucosa modificada y este conjunto de señales también abarca a los hidrógenos de los hidroxilos OH-6 de las unidades de glucopiranososa no modificadas de la β CD. A este conjunto de señales le sigue una señal singulete en $\delta_H = 4.33$ que pertenece a los hidrógenos de los hidroxilos OH-6'', esto quiere decir que el ambiente químico en la β CD cambia de tal manera con la formación del anillo de triazol por la conjugación al ciclo de P_3N_3 que se pueden distinguir los hidrógenos de los hidroxilos OH-6 vecinos a la unidad de glucosa modificada. Después, en el espectro aparece en $\delta_H = 4.02$ una señal amplia que integra para 18H y que se puede asignar para los hidrógenos de los metilenos c de la cadena alifática del enlazador y a los hidrógenos H-5' de las unidades de glucosa modificadas, los cuales sufrieron un desplazamiento hacia campo bajo debido al efecto de desprotección del anillo de triazol. Siguiendo con la discusión del espectro, entre $\delta_H = 3.65 - 3.59$ aparece un conjunto de señales que se pueden asignar a los hidrógenos H-6, H-5, H-3 y H-3' de la β CD. Después, en $\delta_H = 3.3$ se localiza también una señal amplia debida a los hidrógenos H-2, H-2', H4 y H4' de la β CD. A continuación, aparece en $\delta_H = 3.12$ y 2.94 dos señales que integran para 6H cada una y que corresponden a los hidrógenos H-6'' de la glucopiranososa vecina a la glucosa modificada en la β CD. Finalmente, en $\delta_H = 2.77$ y 2.05 aparecen dos señales que integran para 12 H cada una y que se asignan a los hidrógenos de los metilenos e y d de la cadena alifática del enlazador.

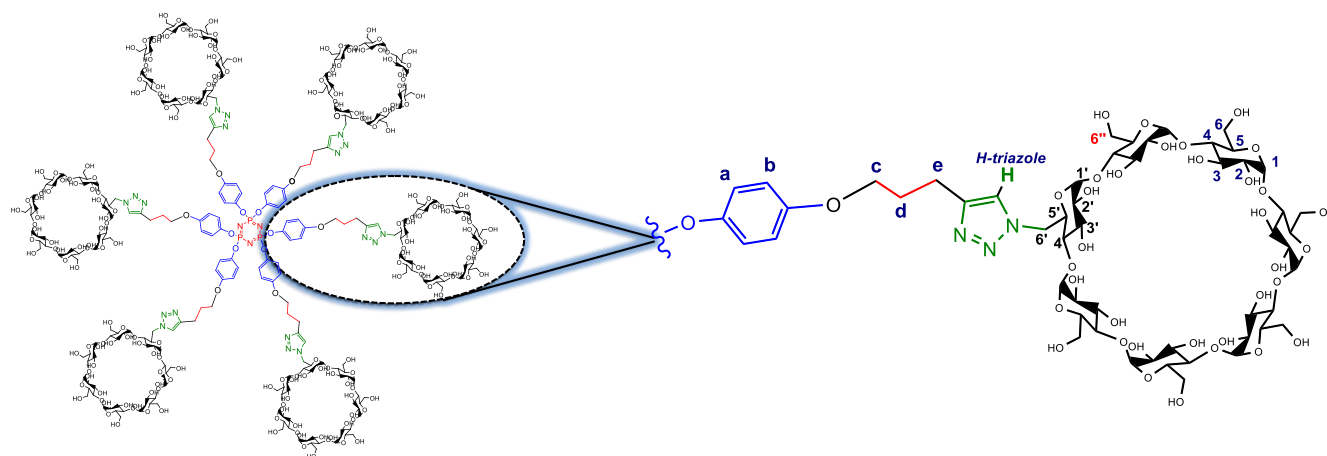


Figura 20. Asignación de los hidrógenos en RMN del compuesto dendrítico **G**.

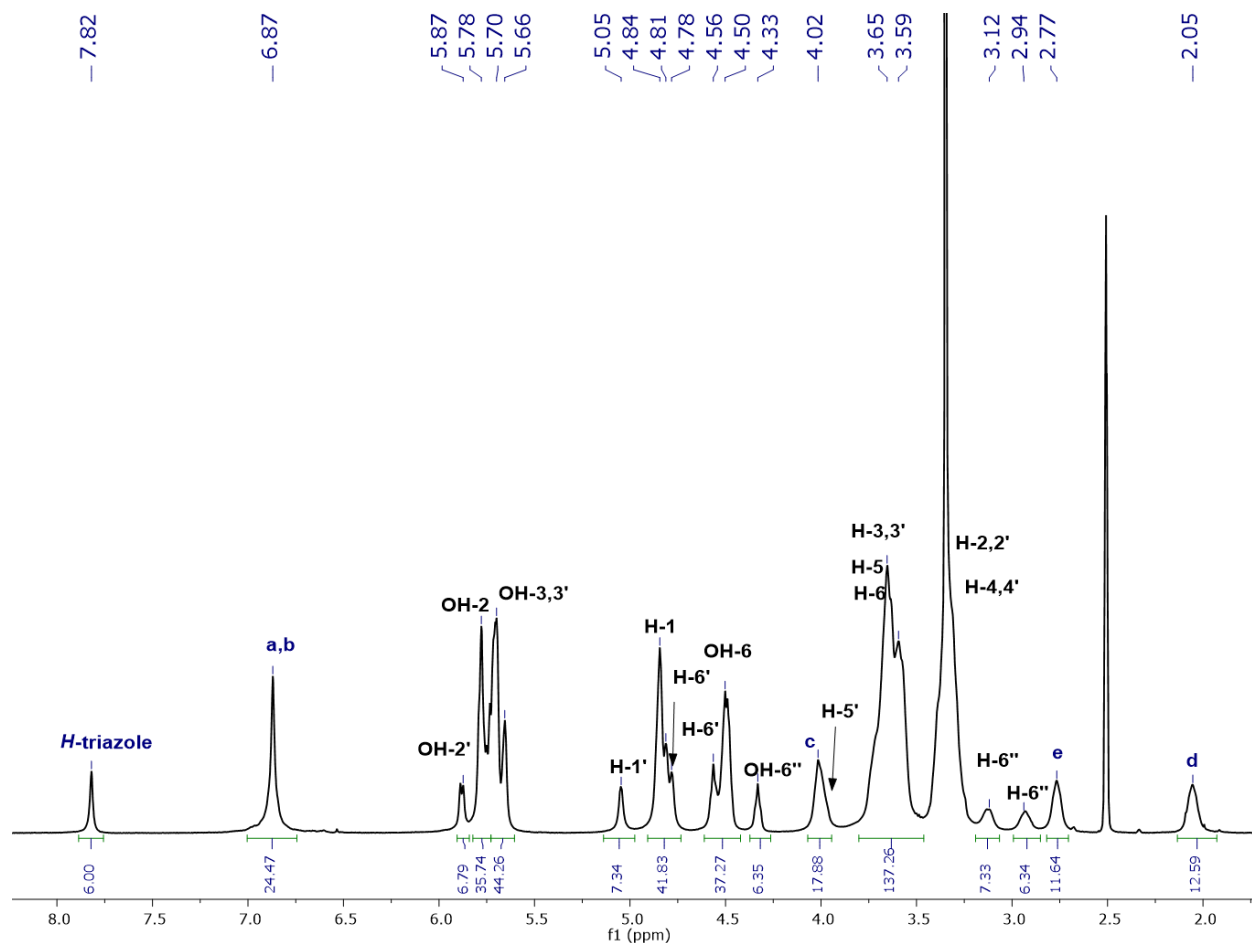


Figura 21. Espectro de ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) del compuesto dendrítico **G**.

Siguiendo con la caracterización del compuesto dendrítico **G**. El espectro de RMN HMQC (Figura 22) nos permitió identificar señales importantes, como son los hidrógenos diasterotópicos H-6' del carbono C6' de la unidad de glucopiranososa modificada de la βCD . Esta identificación se realizó por la correlación que tienen estos hidrógenos con una señal de carbono C6' a $\delta_{\text{C}} = 50.20$. El primer hidrógeno diasterotópico se identificó en $\delta_{\text{H}} = 4.85$, mientras que el segundo se localizó en $\delta_{\text{H}} = 4.48$. Esta asignación se corroboró por las interacciones en el espectro COSY (Anexo 1, Figura 54) por la correlación que tienen estos hidrógenos con los hidrógenos H-5' de la unidad de glucosa modificada. Es importante resaltar que los hidrógenos H-6' sufrieron un desplazamiento hacia campo bajo, en comparación con los hidrógenos H-6 de las unidades de glucosa sin modificar, debido a la formación del anillo de triazol, el cual ejerce un efecto de desprotección sobre estos. También, en este sentido, se pudo identificar a los hidrógenos diasterotópicos H-6'' del carbono C-6'' vecino a la unidad de glucosa modificada, esta identificación se logró realizar por la correlación de estos hidrógenos con una señal del carbono C6 en $\delta_{\text{C}} = 59.23$. El primer hidrógeno se localizó en 3.14 y el

segundo en $\delta_C = 2.94$. Estos hidrógenos sufrieron un desplazamiento hacia campo alto en comparación con los hidrógenos H-6 del resto de las unidades de glucosa sin modificar, por lo que se puede explicar que el triazol ejerce un efecto de protección sobre ellos. La asignación de estos hidrógenos se comprobó también con el espectro COSY, por la correlación de estos hidrógenos con los hidrógenos de los hidroxilos OH-6'' los cuales aparecen en $\delta_H = 4.33$. El resto de las señales de carbono para el compuesto **G** se asignaron a través del espectro ^{13}C RMN y se puede revisar en la Figura 53 del Anexo 1.

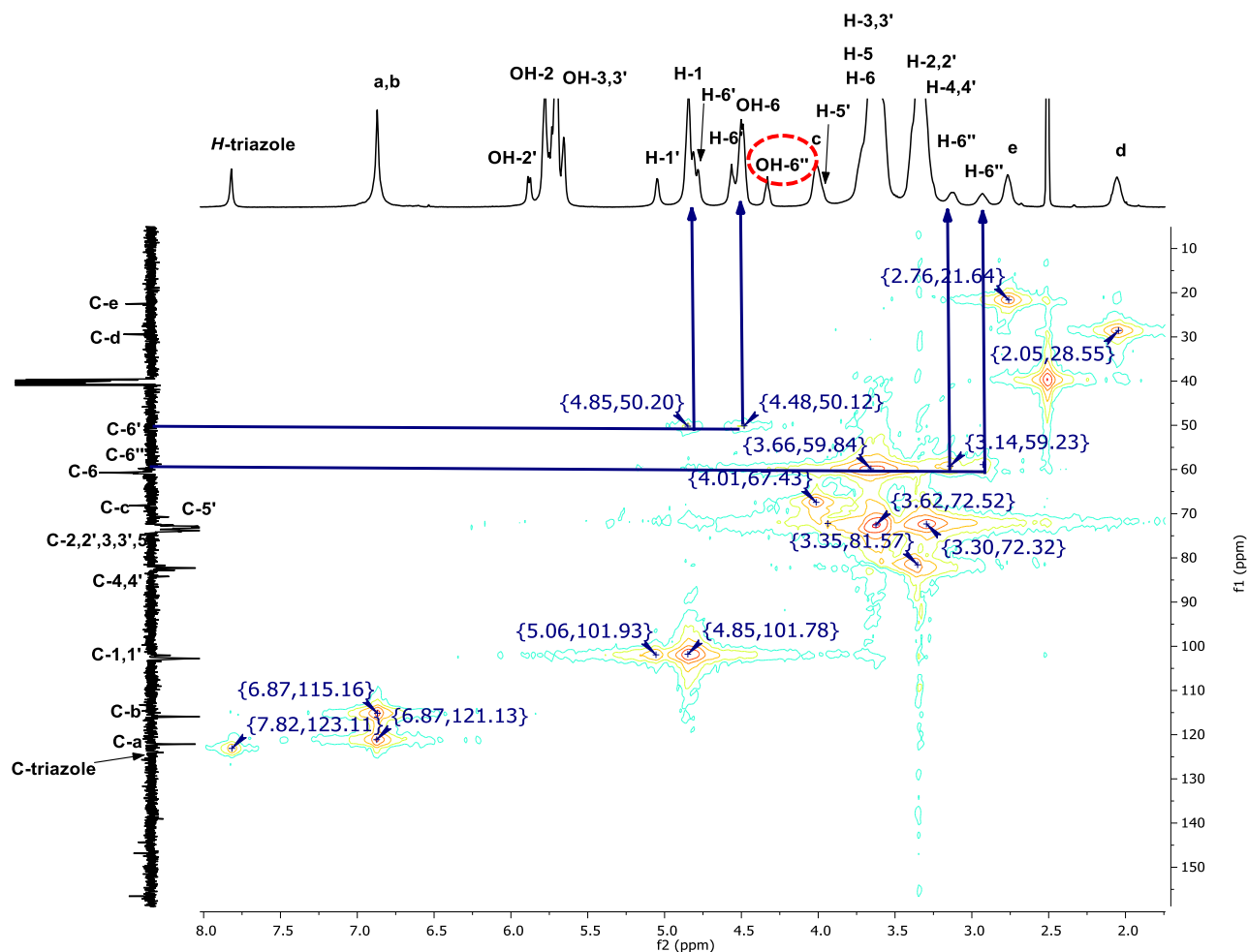


Figura 22. Espectro de RMN 2D HMQC ($\text{DMSO-}d_6$) del compuesto dendrítico **G**.

En el espectro de RMN ^{31}P se corroboró la completa funcionalización del anillo de P_3N_3 (Figura 23), debido a que aparece una señal única en $\delta_P = 9.31$ y que corresponde a los átomos de fósforo funcionalizados con el mismo grupo funcional, las unidades de βCD . Además, se puede observar un

cambio en el desplazamiento de la señal hacia campo alto, comparado con la señal del espectro ^{31}P del compuesto **C**, debido a un efecto protector que ejercen las ciclodextrinas sobre el núcleo de P_3N_3 .

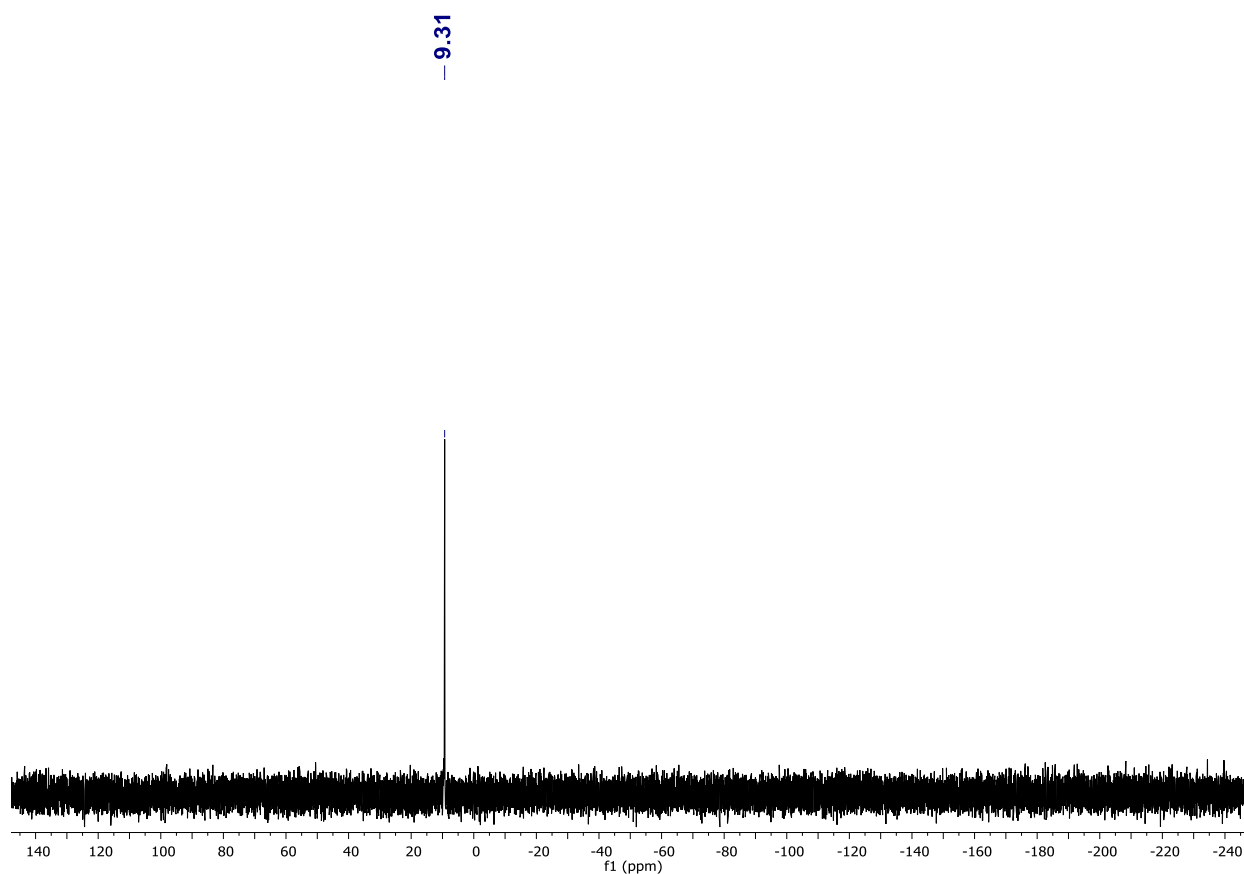


Figura 23. Espectro de ^{31}P RMN ($\text{DMSO}-d_6$) del compuesto dendrítico **G**.

Finalmente, el compuesto dendrítico **G** se caracterizó por espectrometría de MALDI-TOF. En el espectro (Anexo 1, Figura 55) se puede observar un pico a 8169.59 m / z que corresponde al ion molecular más un átomo de potasio $[\text{M} + \text{K}]^+$, lo que confirma la masa del compuesto esperado.

De esta misma manera se realizó la asignación para el compuesto dendrítico **H**, sus espectros se encuentran en el Anexo 1 (Figura 56 - 63).

6.2. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS **G** Y **H**

La βCD en los últimos años ha sido estudiada para aplicaciones en la industria farmacéutica, alimenticia, etc., debido al tamaño de su cavidad y relativa facilidad de modificación química. Como se mencionó anteriormente, la βCD presenta una estructura tridimensional de cono truncado con una superficie cubierta de grupos hidroxilo que le otorgan carácter hidrofílico, por lo tanto, presenta cierta



solubilidad acuosa⁶³. A pesar de esto, la máxima cantidad de β CD que se puede disolver (25°C, 1 atm) es 18.5 mg en 1 mL de agua, por lo que se considera un valor de solubilidad pobre si se compara con la solubilidad de las otras CDs. Se han realizado estudios sobre la solubilidad anómala de la β CD y se atribuye a diversos factores como una rigidez molecular debido a que los grupos hidroxilo OH2 y OH3 localizados en la cara secundaria de la β CD forman enlaces de hidrógeno entre sí, creando una unión completa e inflexible, limitando su capacidad para formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua del medio^{64,65}.

La baja solubilidad en agua de la β CD limita hasta cierto punto su aplicación y desarrollar estrategias para superar este inconveniente se ha vuelto un tema de estudio en los últimos años. Una de las estrategias que se ha desarrollado es la modificación química de los hidroxilos primarios y secundarios pues se ha demostrado que se mejora significativamente la solubilidad de la β CD⁶⁶. En la construcción de los compuestos dendríticos **G** y **H**, se unieron las unidades de β CD al núcleo de P_3N_3 a través de la modificación en un solo grupo hidroxilo OH6 de la cara primaria y fue importante evaluar el valor de la solubilidad de estos novedosos compuestos dendríticos. A través del método utilizado para la determinación de la solubilidad, se obtuvo que para ambos compuestos dendríticos la solubilidad en agua fue > 1 g / mL. Este valor es considerablemente alto si se compara con la solubilidad de la β CD nativa (18.5 mg / mL) y otros derivados de la β CD diseñados para aumentar la solubilidad de ésta, como son la sulfobutileter- β CD (> 500 mg / mL), O-metil- β CD (> 500 mg / mL) y la 2-hidroxipropil- β CD (> 600 mg / mL)⁶⁷. La obtención de este resultado puede deberse a que al modificar la β CD por la cara primaria para construir los compuestos dendríticos, se modificó la formación del puente de hidrógeno intramolecular y con ello la conformación que impide formar puentes de hidrógenos con las moléculas de agua circundantes.

6.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-BCD]₆ (n = 3 Y 4) **G** Y **H** EN D₂O POR RMN

Como se mencionó en la sección anterior, estudiar el comportamiento y elucidar la estructura de los compuestos dendríticos **G** y **H** en agua es determinante, debido a sus potenciales aplicaciones como acarreadores en sistemas biológicos⁶⁸. Por esta razón, se realizó un análisis conformacional completo y detallado de los compuestos dendríticos utilizando RMN 1D y 2D en D₂O, en el que se encontró que en estos compuestos dendríticos sucede un proceso de volteo de 360° en la unidad de glucopiranososa modificada de cada una de las moléculas de β CD, lo que provoca que el anillo de triazol y el enlazador queden en la cavidad de la CD. A continuación, se describe el análisis de los espectros que ayudaron a llegar a esta afirmación. En el espectro de RMN ¹H del compuesto dendrítico **G** (Figura





24) se puede observar un cambio significativo en la región de los aromáticos, debido a que las señales que corresponden al hidrógeno del triazol, H-triazol, y a los hidrógenos aromáticos, H-a y H-b, no aparecen como señales singuletes como se observaban en la caracterización en DMSO- d_6 (sección 6.1.10.). Entre $\delta_H = 7.63 - 7.27$ se observan cuatro señales que juntas integran para 5H y que corresponden a los hidrógenos de triazoles invertidos y no invertidos (H-triazol*i* y H-triazol). Después, entre $\delta_H = 6.92 - 6.46$ se aprecia el mismo fenómeno, múltiples señales que juntas integran para 25H y que se pueden asignar a una mezcla de señales de hidrógenos H-a y H-b aparentemente invertidos y no invertidos (H-a*i*, H-a, H-b*i* y H-b).

Con ayuda del espectro de RMN 2D HMQC y del espectro de RMN ^{13}C (Figura 64 en Anexo 1) del compuesto dendrítico **G** (Figura 25) se confirmó que las señales de los hidrógenos de los H-triazoles, los H-a y los H-b, invertidos y no invertidos correlacionaban con diversas señales de carbono entre $\delta_C = 124.94 - 115.66$ del espectro de RMN ^{13}C . Siguiendo con el análisis de la conformación del compuesto dendrítico **G**, en $\delta_H = 5.29$ y 4.97 se pueden localizar dos señales que corresponden a los hidrógenos H1' y H1 respectivamente, de la unidad de glucopiranososa modificada y el resto de las unidades de glucopiranososa sin modificar; ambas señales correlacionan con una señal de carbono en $\delta_C = 101.98$, en el espectro de 2D HMQC. Después, entre $\delta_H = 4.87 - 4.39$ se localizan dos señales correspondientes a los hidrógenos diasterotópicos no equivalentes H-6', estas dos señales correlacionan con el mismo carbono que aparece en $\delta_C = 51.07$. Inmediatamente después, aparecen dos señales en $\delta_H = 4.14$ y 4.03 que se asignan para los hidrógenos c invertidos y no invertidos, c y c*i*, de la cadena alifática del enlazador, ambas señales correlacionan con una misma señal de carbono en $\delta_C = 70.97$ y se observa que el proceso de volteo en la CD tiene el mismo impacto en este hidrógeno. Un fenómeno similar se puede observar entre $\delta_H = 3.57 - 3.27$ donde aparece un conjunto de señales que corresponden a los hidrógenos invertidos y no invertidos H-2,2', 4,4', los cuales también se vieron afectados de la misma manera por el fenómeno de volteo. El resto de las señales del espectro se observan en concordancia con la asignación que se hizo en DMSO- d_6 .



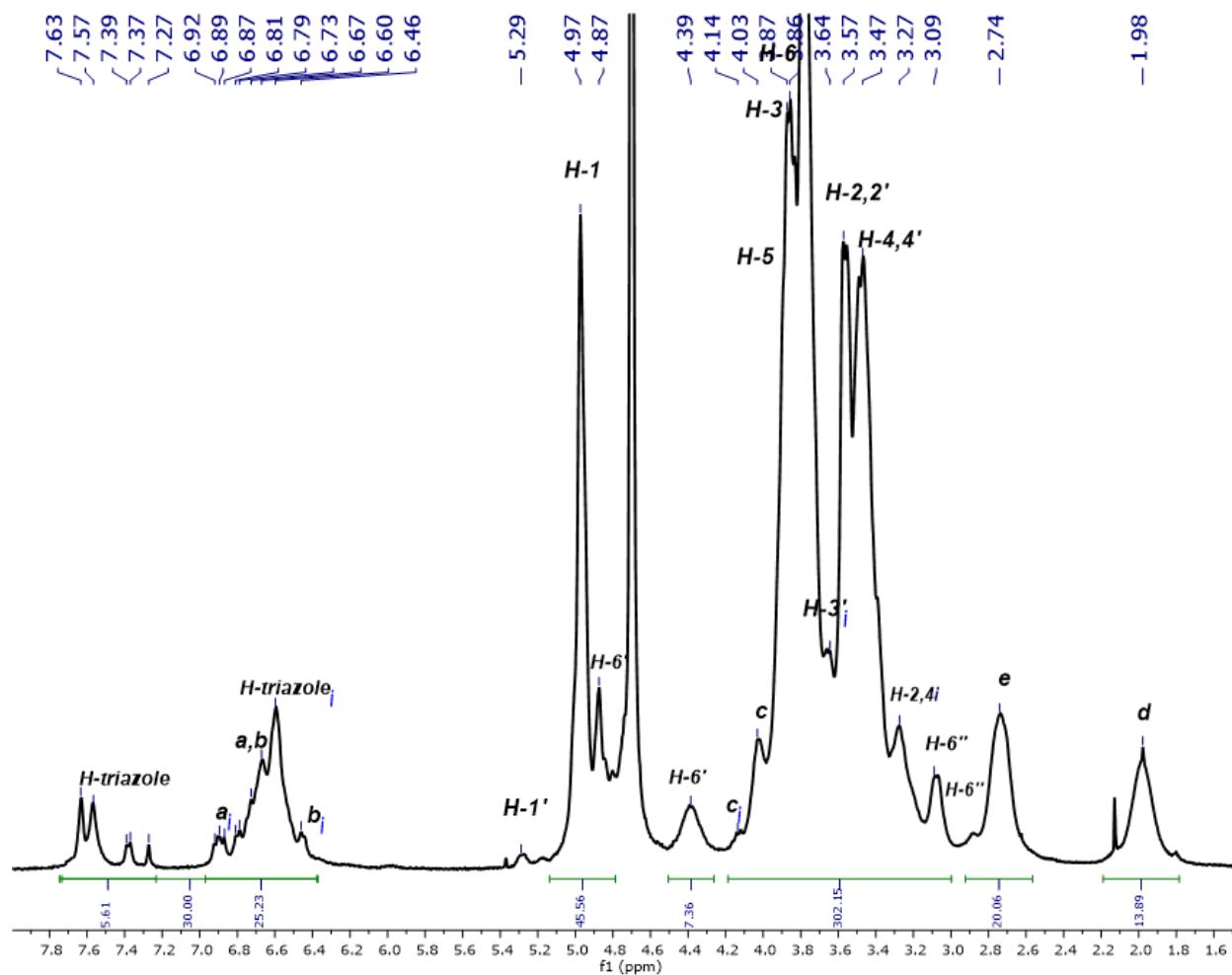


Figura 24. Espectro de ^1H RMN del compuesto dendrítico **G** en D_2O .



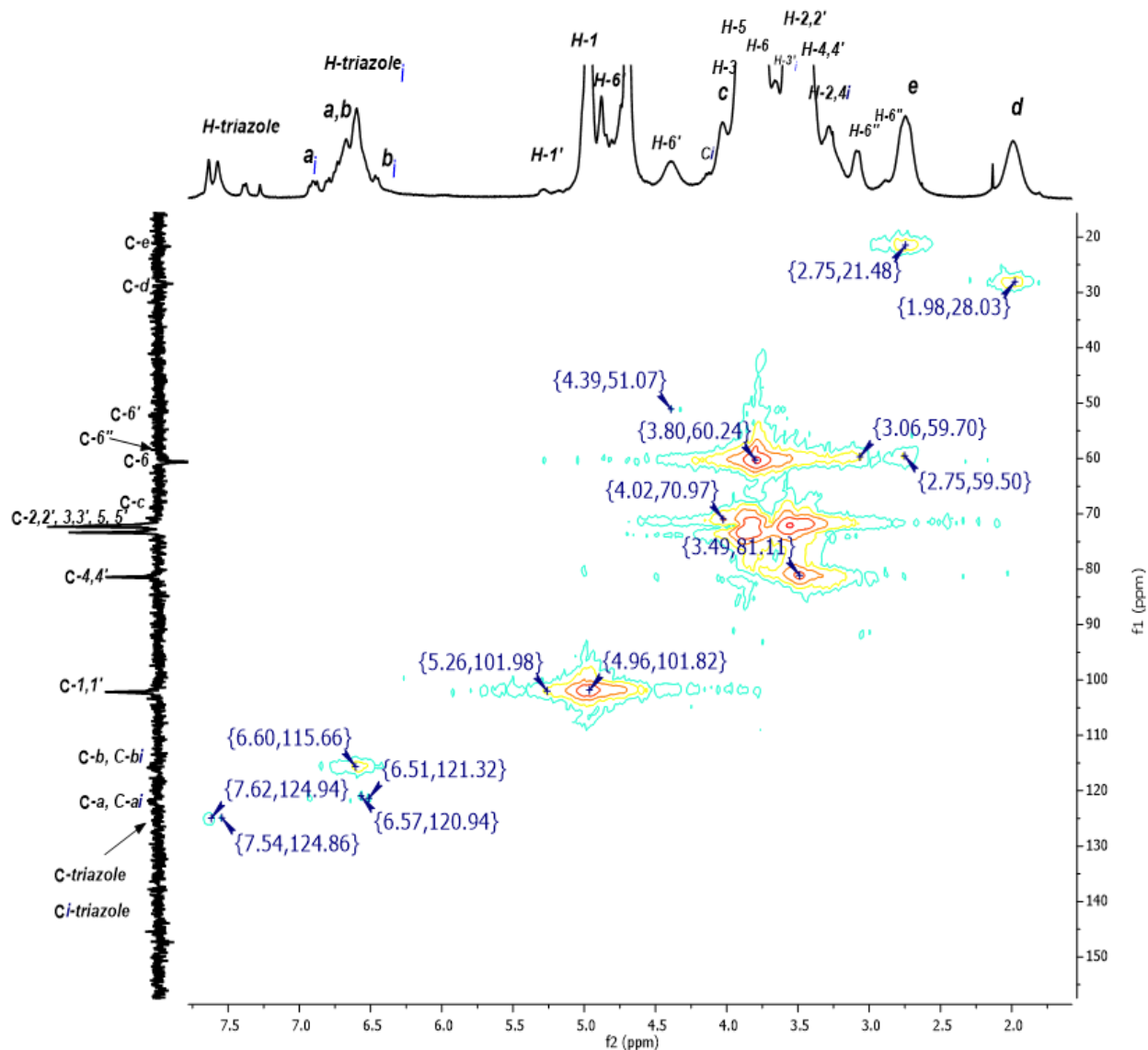


Figura 25. Espectro de RMN 2D HMQC del compuesto dendrítico **G** en D_2O .

Siguiendo con el análisis detallado de las señales de los espectros del compuesto dendrítico **G** con el fin de demostrar el impacto del fenómeno de volteo de las unidades de β CD sobre las señales descritas arriba, se realizó un estudio de las interacciones NOE para confirmar la inclusión del residuo aromático en la cavidad de la β CD. En la Figura 26 se observa el espectro de RMN 2D NOESY de **G**, en el cual se aprecian, resaltadas en cuadros azules, las correlaciones entre los hidrógenos del anillo aromático (H-a y H-b) y el del triazol (H-triazol), (invertidos y no invertidos), con los hidrógenos H-3 y H-5 localizados en la cavidad de la β CD.

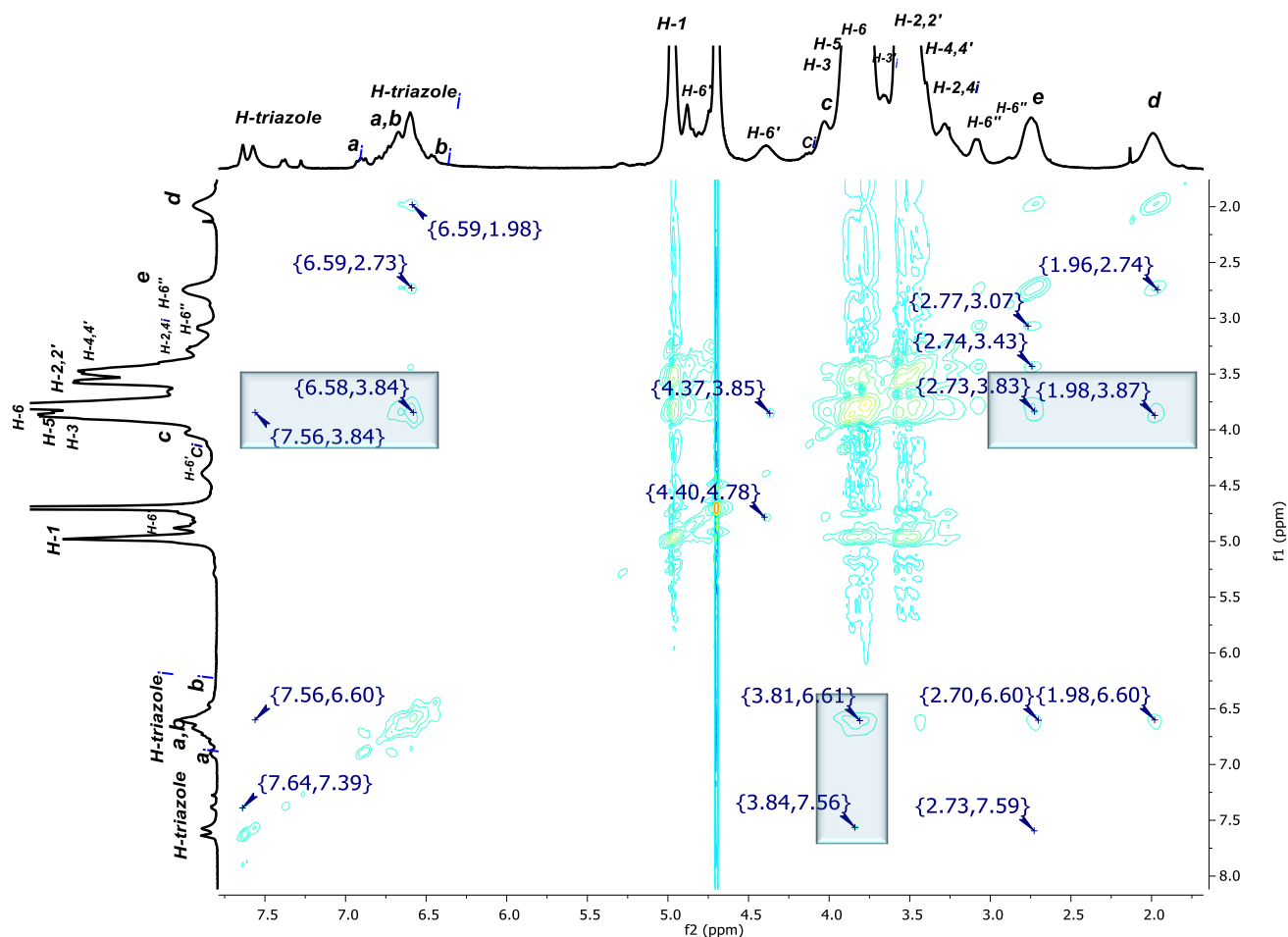


Figura 26. Espectro de RMN 2D NOESY del compuesto dendrítico **G** en D_2O .

La Figura 27A es un acercamiento al espectro de NOESY en la zona de aromáticos, se puede observar en $\delta_H = 7.65$ y 6.58 un conjunto de señales que se asignan a los hidrógenos H-triazol-invertidos, H-*a_i* y H-*b_i*, respectivamente, interactuando con los hidrógenos H-3,5 de la β CD en $\delta_H = 3.84$. Adicional a estas interacciones, también se puede observar la correlación de las señales de los hidrógenos H-*a_i* y H-*b_i* entre $\delta_H = 6.64 - 6.60$ con los hidrógenos de la β CD, H-2,2' y H4,4' entre $\delta_H = 3.51 - 3.44$; y también estos últimos hidrógenos correlacionan con la señal del H-triazol-invertido en $\delta_H = 7.56$. Estas observaciones pueden ser explicadas debido a que por el proceso de volteo de la unidad de glucopiranososa modificada en las moléculas de β CD, el grupo triazol y el residuo aromático del enlazador están interactuando con los hidrógenos H-2 y H-4 localizados en el exterior de la cara secundaria de la β CD. Después, el estudio se centró en el tipo de interacciones que se pueden presentar en la cadena alifática del enlazador, y se observan las correlaciones entre los hidrógenos de

los metilenos del enlazador, H-e,d, con los hidrógenos H-3,5 de la β CD (ver correlaciones entre 2.73 – 3.83 y 1.98 y 3.87, Figura 27B), lo cual indica que estos grupos metilenos sufren un proceso de torsión para poder incluirse dentro de la cavidad de la β CD.

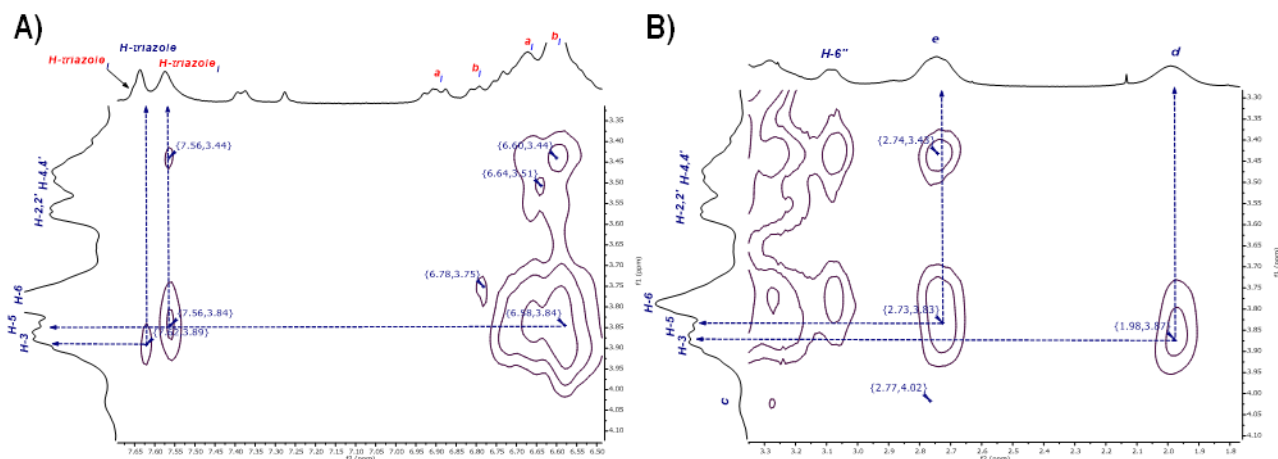


Figura 27. Amplificación de las zonas (A) aromática y (B) alifática en el espectro de RMN 2D NOESY del compuesto dendrítico **G** en D_2O .

Este mismo análisis se realizó para el compuesto dendrítico **H** y se llegaron a los mismos resultados aquí mencionados (Figuras 65 - 68 en el Anexo 1).

Con el análisis de estos resultados, se propone que el proceso de inversión de 360° de la unidad de glucopiranososa modificada en los compuestos dendríticos **G** y **H** es un proceso dinámico que puede dar origen a 13 posibles conformaciones en donde la cavidad de las moléculas de β CD queda ocupada por el anillo de triazol y por el enlazador, como se propone en la Figura 28. Este proceso de volteo 360° en las unidades de glucopiranososa de la β CD había sido previamente reportado con otro tipo de plataformas^{69–71}.

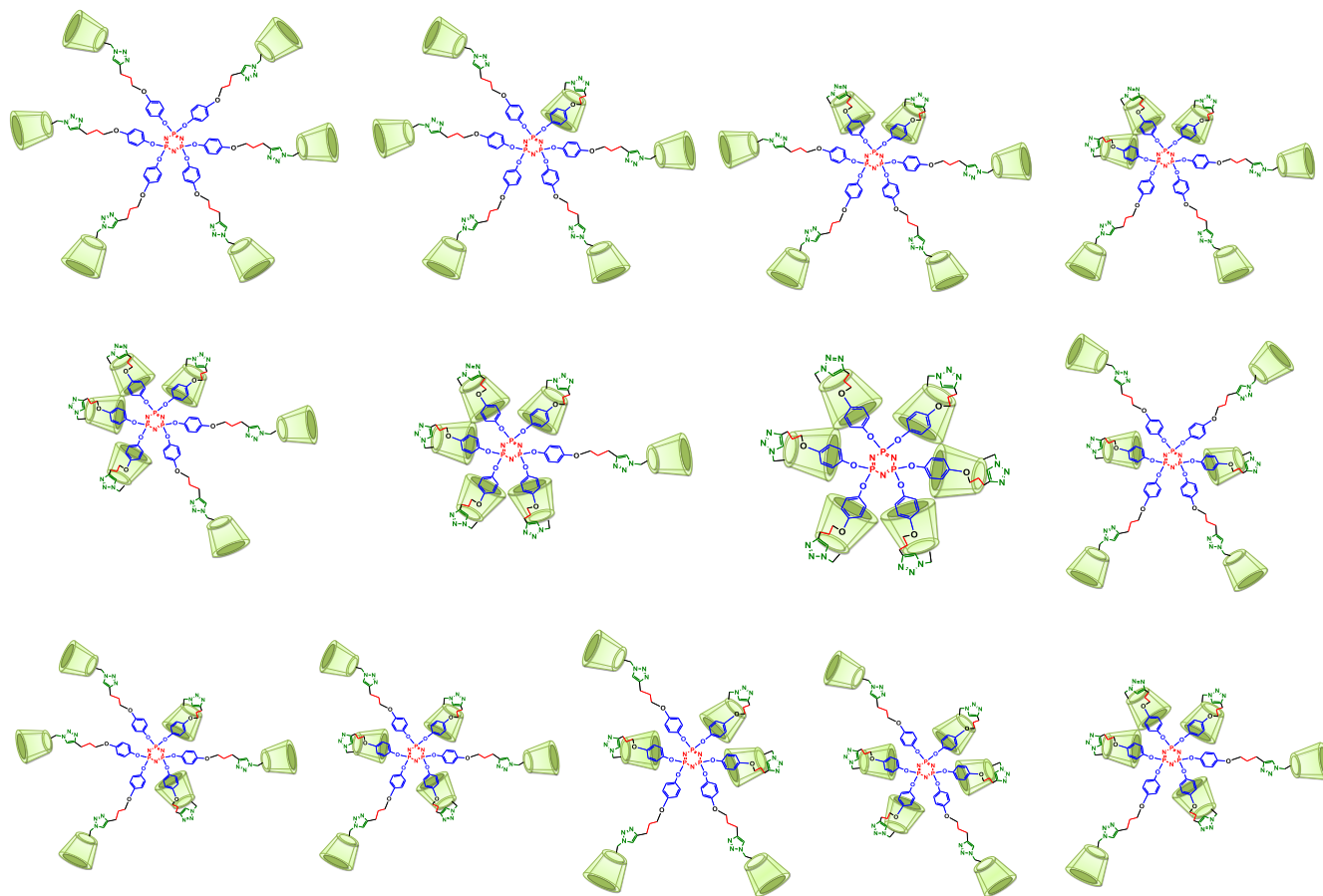


Figura 28. Las 13 posibles conformaciones propuestas para los compuestos dendríticos G y H con 0 a 6 cavidades invertidas.

6.4. DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA POR EL MÉTODO DE JOB PARA LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS G Y H

Después de confirmar, a través del análisis por RMN, el proceso dinámico de volteo que se lleva a cabo en los compuestos dendríticos **G** y **H** cuando se encuentran en medio acuoso. Se puede afirmar que la cavidad de las unidades de β CD puede resultar comprometida, ya que por la inclusión de enlazador queda impedida para incluir otro tipo de moléculas y con esto limitar la capacidad de los compuestos dendríticos como acarreadores de fármacos^{72,73}. En este aspecto, se ha reportado que el adamantano (Ad) es una molécula que presenta gran afinidad por la cavidad de la β CD y puede ser convenientemente utilizada para revertir el proceso de volteo en la CD^{71,74,75}. Para comprobar esta hipótesis, se realizó una titulación con cantidades crecientes de ácido adamantan-1-carboxílico

(AdCOOH) siguiendo los cambios en los espectros de RMN ^1H de los compuestos dendríticos **G** y **H** en D_2O (Figura 29 y Figura 69 en el Anexo 1).

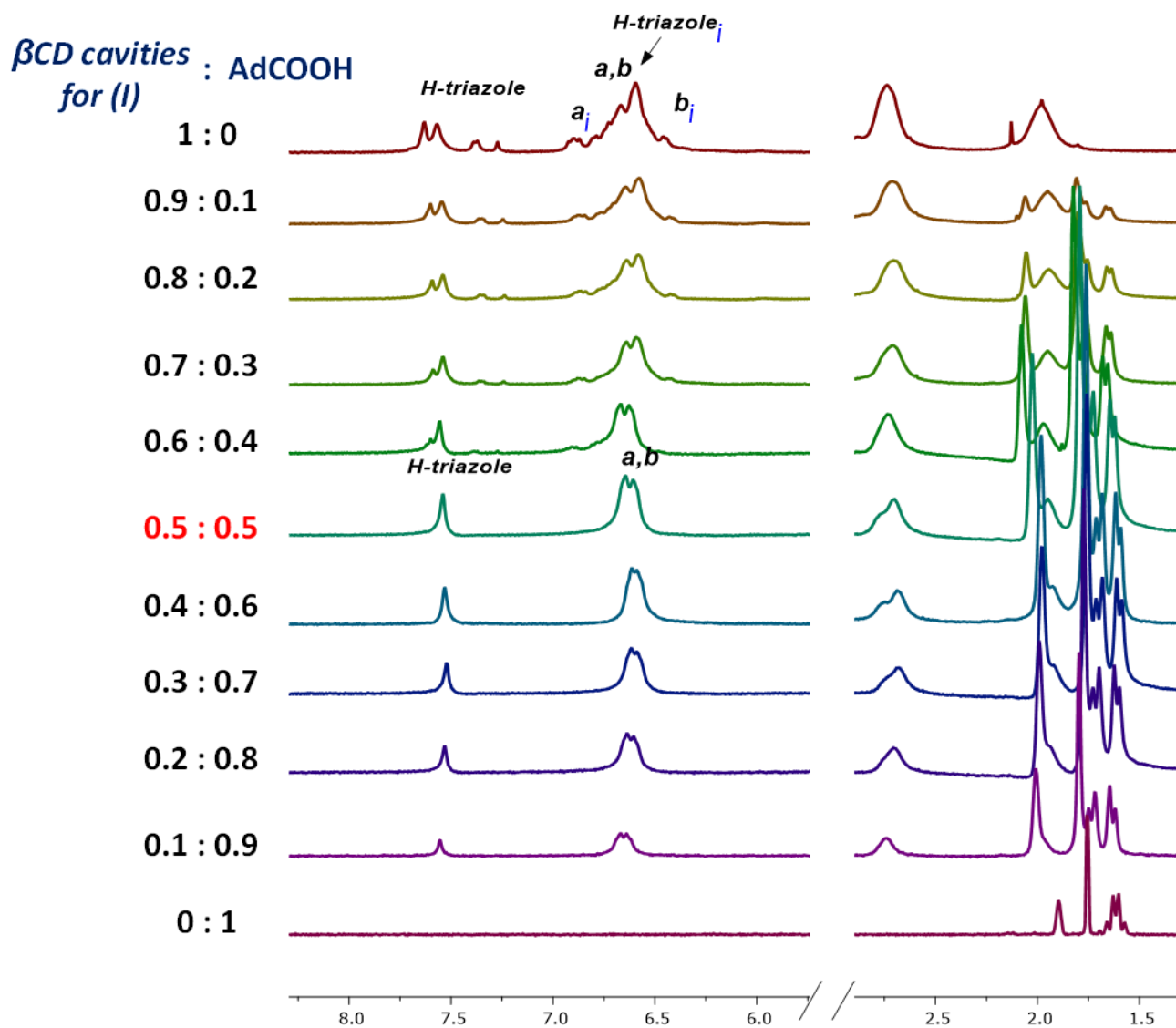


Figura 29. Titulación por RMN ^1H del compuesto dendrítico **G**.

En la Figura 30 se observan los resultados obtenidos de la titulación para el compuesto dendrítico **G** y AdCOOH. Para cada espectro se muestran las regiones de 8.5 – 5.5 ppm y de 3.0 a 1.0 ppm porque son las zonas donde se observa el decremento en la fracción molar para las mezclas de **G** y AdCOOH en D_2O . Cada espectro se enumeró utilizando la fracción molar $\text{XCD} = [\beta\text{CD}]/([\beta\text{CD}] + [\text{AdCOOH}])$ (desde 1 a 0) para una descripción más simple. En el espectro que representa la fracción molar de 0.9 respecto al compuesto dendrítico **G** se observan señales muy similares a las observadas

en el espectro en D₂O de **G** puro. Este comportamiento se mantiene hasta la relación molar de 0.6:0.4 (G:AdCOOH). Aunque es evidente que conforme la relación XCD disminuye, la forma del espectro llega a ser simple; a partir de la relación de 0.5:0.5 se observa una apariencia “normal” en la multiplicidad del hidrógeno del triazol, H-triazol, y de los hidrógenos del anillo aromático, H-a y H-b (ver la región de 8.00 – 6.00 ppm). Además del cambio en las señales anteriores, también se puede observar la desaparición de las señales que demostraron el proceso dinámico de volteo, que corresponden a los hidrógenos H*c* y H-2,2',2,4'*i* (sección 6.3.). Estos resultados revelan que la conformación del compuesto dendrítico **G**, cuando se lleva a cabo la formación de los complejos de inclusión con AdCOOH, vuelve a ser extendida como se describió en la caracterización del compuesto **G** puro en DMSO-*d*₆. Este análisis refuerza que el proceso de volteo de las unidades de CD del compuesto dendrítico **G** fue revertido completamente.

Uno de los mejores métodos utilizados para conocer la estequiometría de los complejos de inclusión anfitrión – huésped es el método de Job o el método de las variaciones continuas. La gráfica del Job se construyó trazando XCD vs. $\Delta\delta[\beta\text{CD}]$, donde $\Delta\delta$ es la diferencia del desplazamiento del hidrógeno de la βCD sin y con AdCOOH, como se describió arriba. El punto de inflexión en la gráfica se encuentra en 0.5, con esto se confirma que la estequiometría del CI entre el compuesto dendrítico **G** y el AdCOOH es 1:1 (respecto a las cavidades de CD disponibles en el compuesto dendrítico) (Figura 30). Este mismo análisis se realizó para determinar la estequiometría en el compuesto dendrítico **H** y se encontró que se respeta la misma estequiometría, 1:1 (Figura 70, Anexo 1).

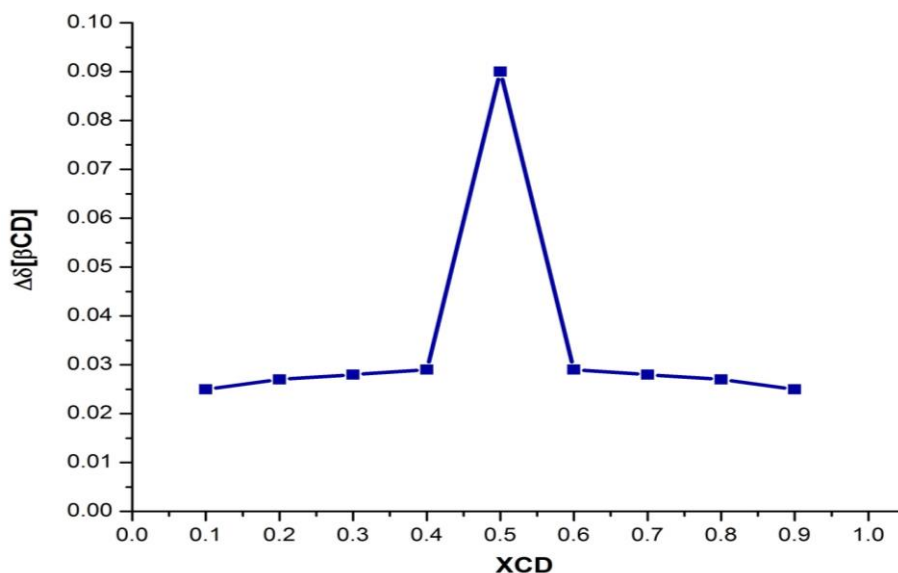


Figura 30. Gráfica de Job para el CI del compuesto dendrítico **G**/AdCOOH. $XCD = [\beta\text{CD}]/([\beta\text{CD}] + [\text{AdCOOH}])$, $\Delta\delta$ = diferencia de desplazamiento del hidrógeno de la βCD



6.5. PREPARACION DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN (CI)

Existe una amplia variedad de técnicas para la preparación de complejos de inclusión con moléculas de β CD y su selección se basa en la rapidez, la simplicidad, el rendimiento y el costo, los cuales son parámetros importantes para optimizar la calidad de los complejos de inclusión y que determinaran las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas del producto final⁷⁶⁻⁷⁹. Existen diferentes formas de nombrar a estas técnicas de preparación; en general, algunas se llevan a cabo en estado sólido como el método de amasado. El otro grupo pertenece a las técnicas que se llevan a cabo en solución, la más utilizada es la preparación del CI en medio acuoso; aunque por lo general, se requiere el uso de cosolventes para ayudar a que la molécula huésped este en solución. Tras la disolución de la CD y el huésped, las soluciones resultantes se mezclan y procesan mediante distintos métodos; por ejemplo, liofilización, coprecipitación, ultrasonido, difusión, secado por aspersion o evaporación rotatoria⁸⁰. En este caso, la formación del CI se llevó a cabo utilizando una estequiometría 1:1 de acuerdo con los resultados obtenidos en el método de Job; el procedimiento fue mezclar los compuestos dendríticos **G** y **H** disueltos en agua con la molécula huésped (AdCOOH o Ad-h-DOX) disuelta en metanol, después de 24 h de permanecer la mezcla en agitación, se obtuvo el sólido por liofilización. En el caso del AdCOOH, se seleccionó como molécula huésped, ya que como se mencionó en la sección anterior, es una molécula que presenta alta afinidad por la cavidad de la β CD, con una constante de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ en medio acuoso, por lo que la formación del CI β CD/AdCOOH es un candidato importante para ser estudiada a detalle en la construcción de sistemas de administración de fármacos^{81,82}.

Como se mencionó, los derivados de adamantano (Ad) forman CI inusualmente fuertes con la molécula de β CD. Se han diseñado prototipos de fármacos prometedores a base de Ad para la entrega controlada de fármacos, uno de ellos es el profármaco entre Ad y Dox^{75,83}. Es por esto que se decidió utilizar el profármaco de Ad y Dox, Ad-h-Dox, con un enlace hidrazona. La preparación de este CI también se realizó utilizando la estequiometría 1:1 en relación con el compuesto dendrítico **G** y el profármaco Ad-h-Dox con el mismo procedimiento mencionado arriba.

6.6. CARACTERIZACIÓN DEL CI COMPUESTO DENDRÍTICO G/AdCOOH

Para confirmar que la formación del CI se llevó a cabo de manera exitosa con las seis cavidades de β CD en el compuesto dendrítico **G** y las moléculas de AdCOOH, se llevó a cabo la caracterización en solución y en estado sólido del CI G/AdCOOH. La caracterización en solución se realizó por RMN 1D y 2D; los estudios por RMN de ^1H en D_2O brindan información útil sobre la orientación en solución de



la molécula huésped en la cavidad de la molécula anfitriona⁸⁴. En el espectro del CI G/AdcOOH (Figura 31) se observan en $\delta_H = 7.54$, 6.64 y 6.61 señales bien definidas que integran para 6 y 24H y que corresponden a los hidrógenos del triazol y del anillo aromático. Después, en la región entre $\delta_H = 5.5$ y 2.5 se observan las señales que corresponden a los hidrógenos de las moléculas de β CD y del enlazador, dentro de estas señales no se observa ninguna que pueda dar indicio del volteo de las CDs. Finalmente, entre $\delta_H = 2.00$ y 1.50 se observan tres señales que corresponden a los hidrógenos H- β , H- α y H- γ del AdCOOH.

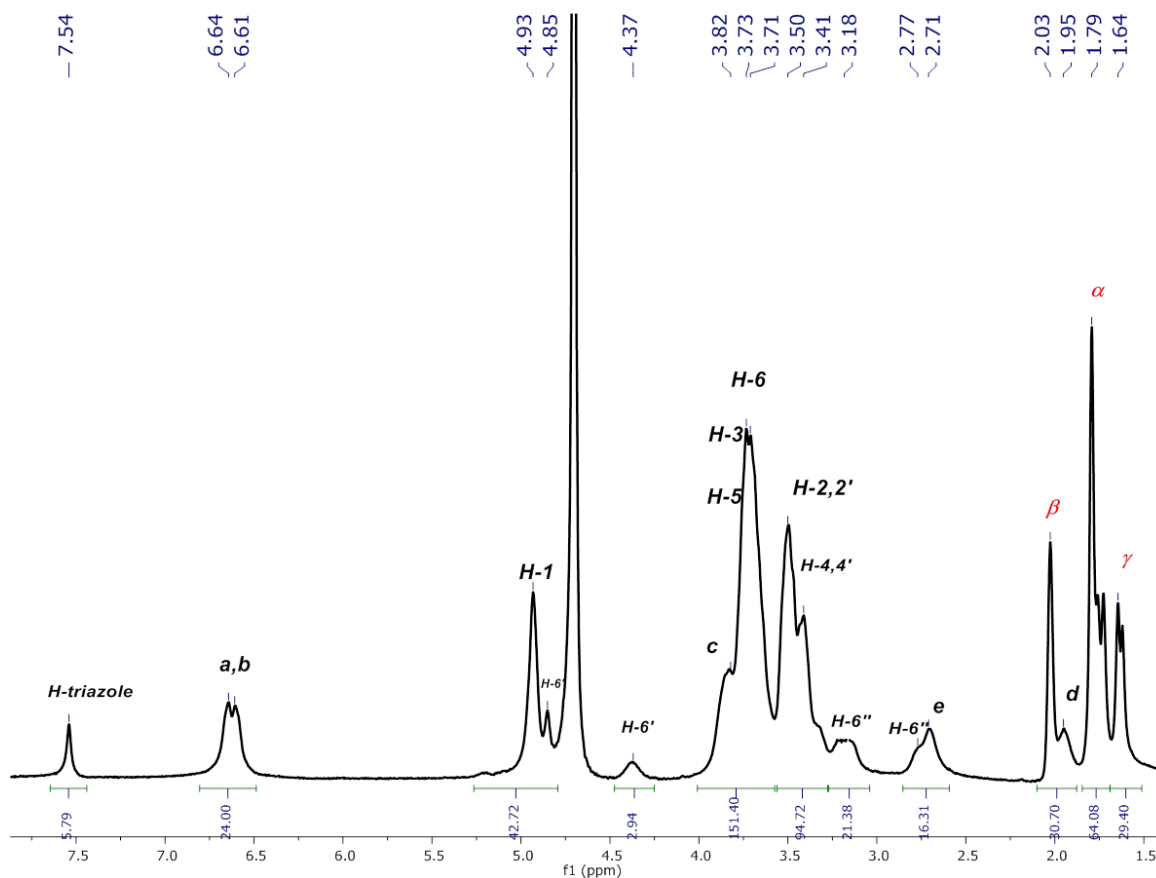


Figura 31. Espectro de ^1H RMN del CI G/AdCOOH en D_2O .

Cuando se lleva a cabo la formación del CI, la proximidad espacial entre la molécula anfitriona y la molécula huésped genera un efecto NOE, que puede ser evidenciado por un experimento ROESY y/o NOESY y son particularmente útiles para aclarar la estructura tridimensional del CI⁸⁴. Dada la conformación de la β CD, se sabe que los hidrógenos H3 y H5 se encuentran en la cavidad interna de la CD y son los que van a interactuar directamente con el huésped; estos hidrógenos son los que se rastrean para comprobar que se ha llevado a cabo la formación del complejo. En la Figura 32 se observa

el espectro de RMN 2D NOESY en D₂O del CI de G/AdCOOH y entre $\delta_H = 3.70$ y 3.71 dos señales que corresponden a los hidrógenos H3 y H5 de la β CD y que correlacionan con las señales de los hidrógenos del AdCOOH localizadas entre $\delta_H = 1.99$ y 1.61 (Figura 33B). Además, en la amplificación del espectro NOESY (Figura 33A) se observa en $\delta_H = 6.59$ que los hidrógenos de los metilenos H-a y H-b que corresponden al enlazador, solamente interactúan con los hidrógenos del metileno H-c en $\delta_H = 3.84$; por lo que podemos comprobar que no se está llevando a cabo el fenómeno de volteo en ninguna cavidad de las unidades de β CD del compuesto dendrítico. Con estas interacciones observadas en el espectro NOESY podemos confirmar que se llevó a cabo exitosamente la formación del CI G/AdCOOH.

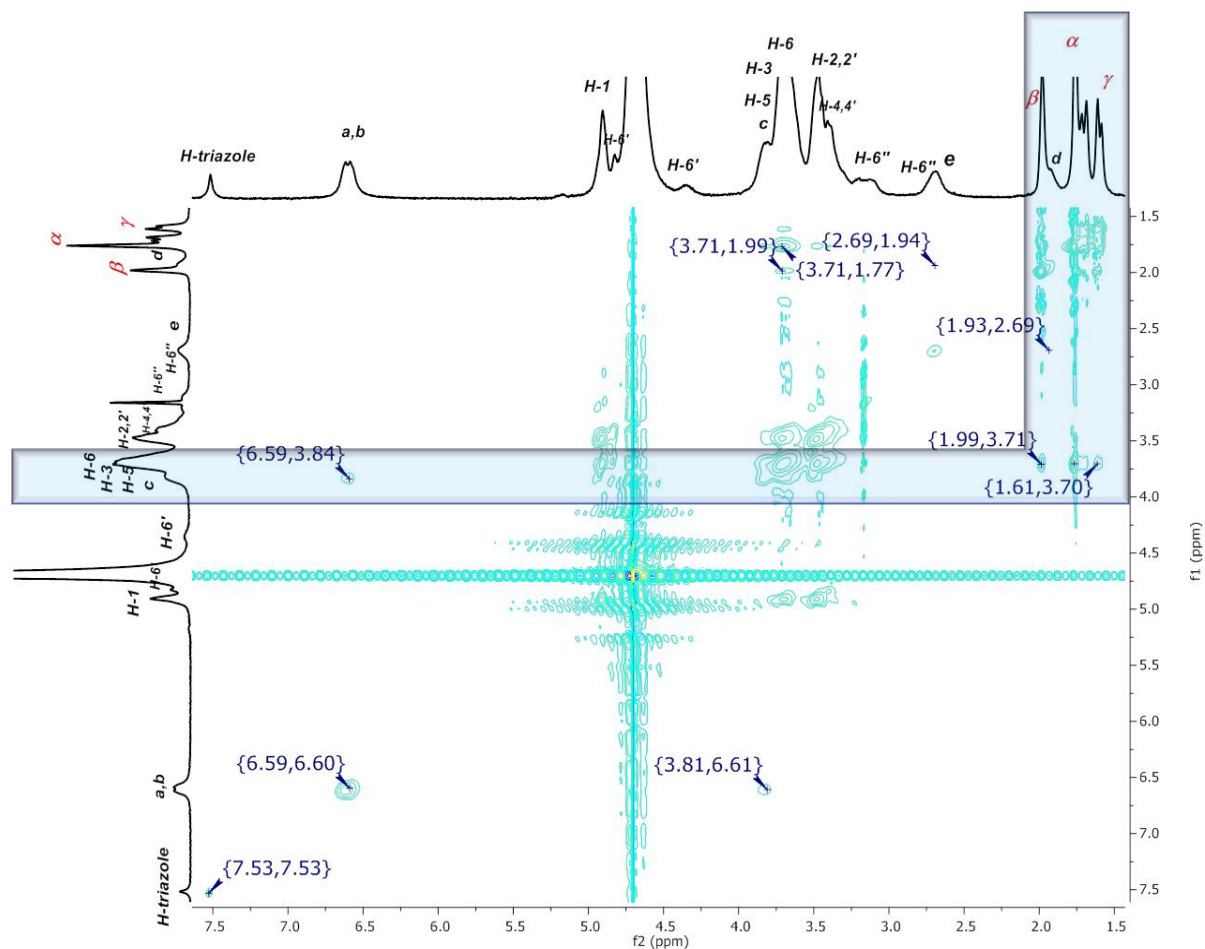


Figura 32. Espectro de RMN 2D NOESY del CI G/AdCOOH en D₂O.

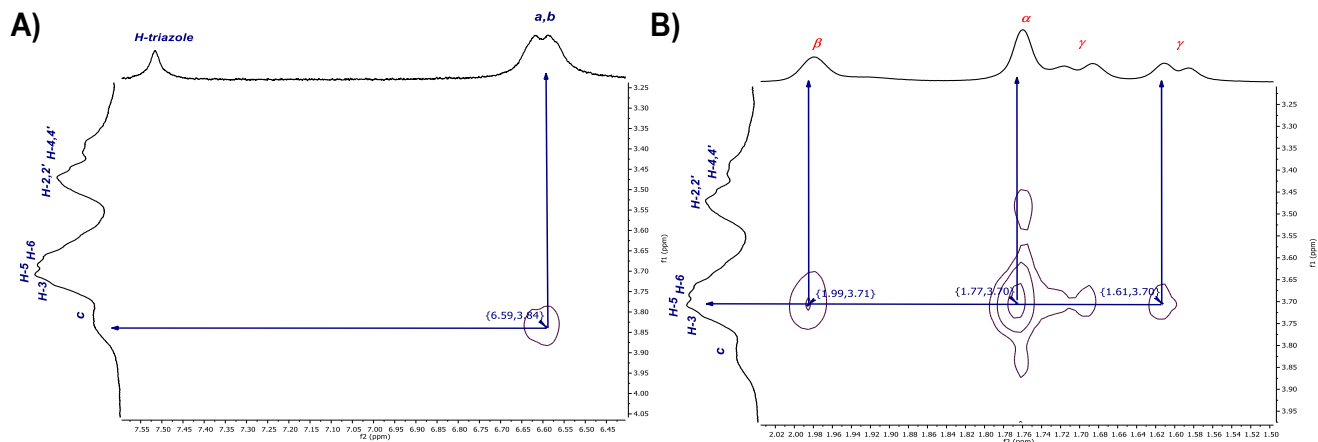


Figura 33. Amplificación de las zonas (A) aromática y (B) alifática en el espectro de RMN 2D NOESY del CI G/AdCOOH en D₂O.

En lo que respecta a la caracterización en estado sólido del CI, los métodos de análisis térmico, que comúnmente incluyen calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) son esenciales para proporcionar datos importantes, además de que son métodos confiables, simples y relativamente rápidos. La DSC ha demostrado ser una técnica analítica muy poderosa en la caracterización de CI en estado sólido, ya que proporciona información detallada sobre las propiedades físicas y energéticas de los sistemas, así como las interacciones que suceden en estos. Es común que el análisis TGA de los CI se utilice en conjunto con el análisis de DSC para respaldar y ayudar a interpretar los resultados de DSC. El TGA permite determinar los cambios en el peso de la muestra con respecto al cambio de temperatura^{85,86}. En los resultados de análisis térmico por DSC del compuesto dendrítico G, del AdCOOH y del CI de G/AdCOOH (Figura 34) se observa principalmente que, en el perfil del CI no aparece el pico endotérmico en 172 – 176 °C que corresponde al punto de fusión del AdCOOH, debido a que hubo pérdida de la cristalinidad de la molécula como consecuencia de la formación del complejo con la CD. Esto se comprueba con el perfil de TGA (Figura 29, del Anexo 1) del CI ya que se observa que la descomposición sucede a una temperatura mayor en comparación con la descomposición de los componentes individuales.

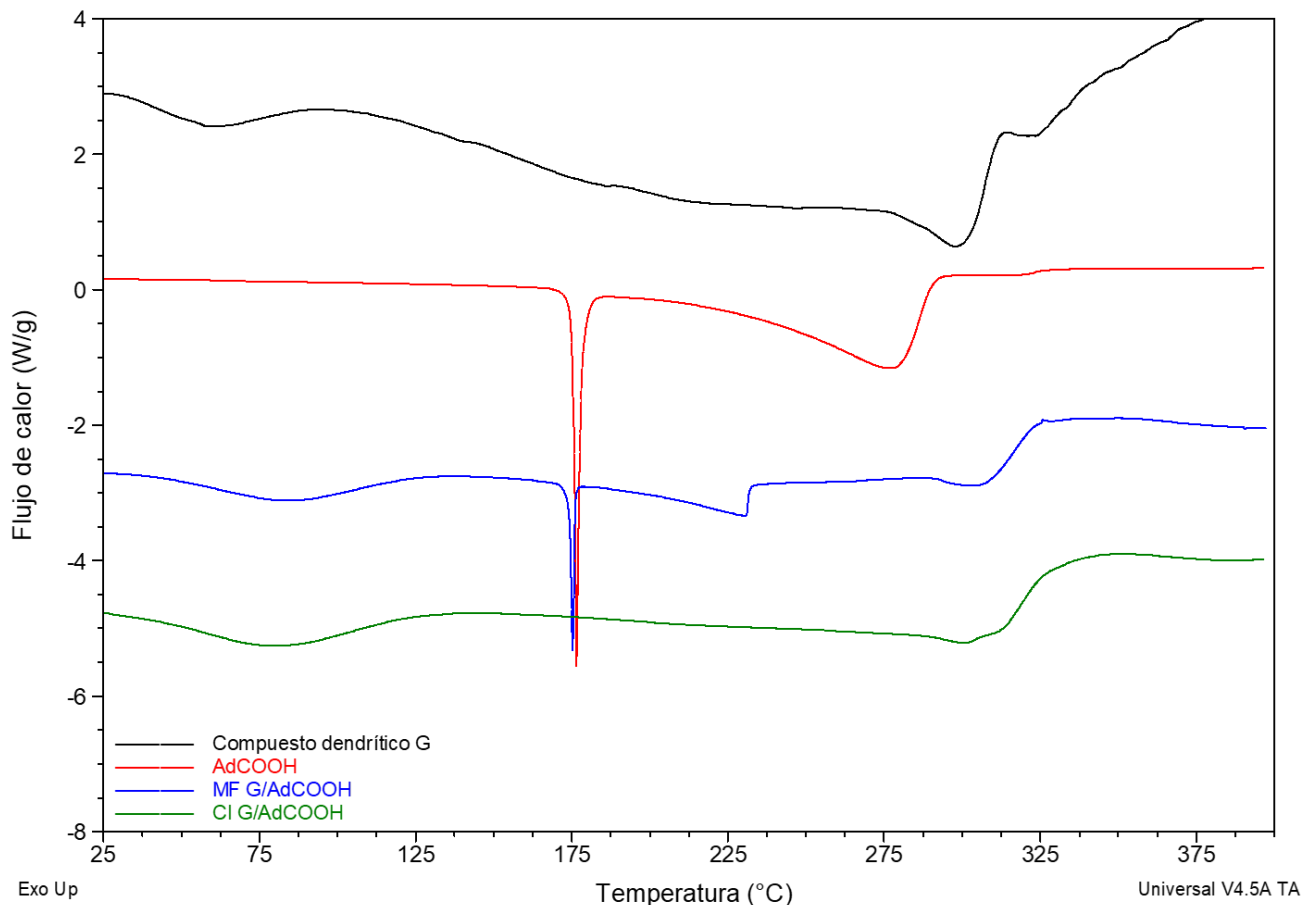


Figura 34. Análisis térmico por DSC del CI G/AdCOOH.

Un análisis similar se llevó a cabo para el CI H/AdCOOH (Figura 71 - 72 en Anexo 1).

6.7. CARACTERIZACIÓN DEL CI COMPUESTO DENDRÍTICO G/Ad-h-Dox

El CI G/Ad-h-Dox también fue caracterizado en solución y en sólido para comprobar que se respeta la estequiometría 1:6 y que el CI se formó con las seis cavidades de β CD disponibles en el compuesto dendrítico G. En el espectro de RMN de ^1H (Figura 35) se observa en $\delta_{\text{H}} = 7.67$ la señal que corresponde a los hidrógenos del triazol, H-triazol, la cual se observa como una señal simple. Después en $\delta_{\text{H}} = 7.24$ y en 6.57 se observa un conjunto de señales que pertenecen a los hidrógenos del anillo aromático de la Dox y del enlazador, Hb, Ha, Hc, H-a y H-b, respectivamente. Después entre $\delta_{\text{H}} = 5.33$ y 3.08 se observan las señales que corresponden a los hidrógenos de las unidades de β CD y en las cuales no se observa alguna señal que indique un proceso de volteo en alguna unidad de β CD del compuesto dendrítico G. Siguiendo con la descripción del espectro, en $\delta_{\text{H}} = 2.76$ y 1.92 se observan

dos señales que corresponden a los hidrógenos de los metilenos del enlazador, H-e y H-d. Inmediatamente después, en $\delta_H = 2.24$ y 1.16 se aprecia un conjunto de señales que corresponden a los hidrógenos del metilo y el metileno de la Dox. Finalmente, entre $\delta_H = 2.06$ y 1.65 se observan las señales que se asignan a los hidrógenos del anillo de Ad, H- β , H- α y H- γ .

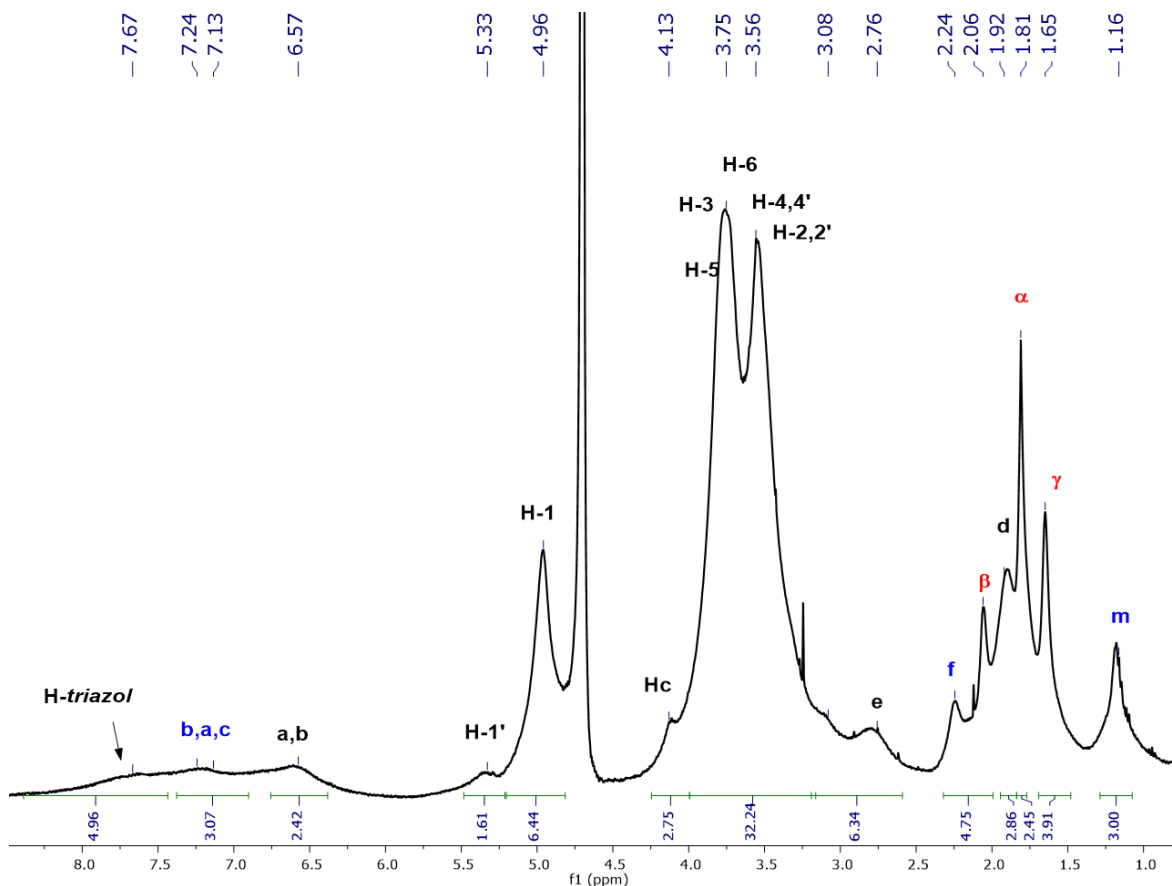


Figura 35. Espectro de ^1H RMN del CI G/Ad-h-Dox en D_2O .

Para un mayor análisis sobre la estructura que toma el CI en el espacio se realizó el análisis por RMN 2D y en el espectro de NOESY en D_2O (Figura 36 y 37) podemos observar, principalmente, la correlación de las señales del Ad en $\delta_H = 2.07$, 1.82 y 1.67 con las señales H-3 y H-5 localizados dentro de la cavidad de las unidades de βCD . Esto nos indica que existe una interacción entre estos hidrógenos y por lo tanto confirma que se ha llevado a cabo la formación del CI entre las unidades de βCD del compuesto dendrítico G con las moléculas del profármaco Ad-h-Dox.

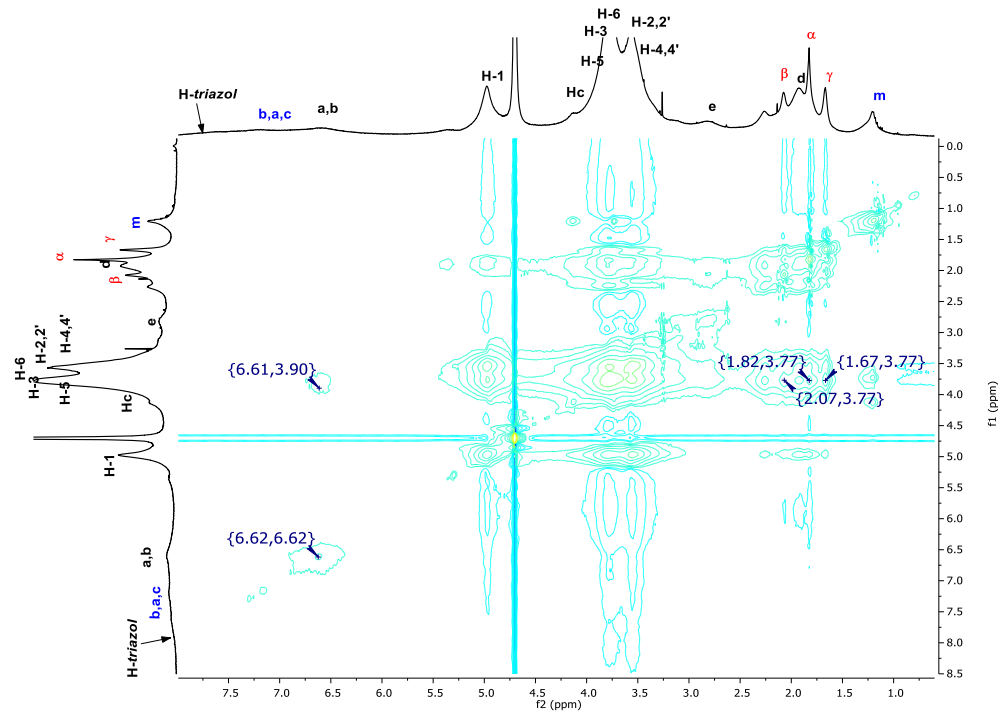


Figura 36. Espectro de RMN 2D NOESY del CI G/Ad-h-Dox en D₂O.

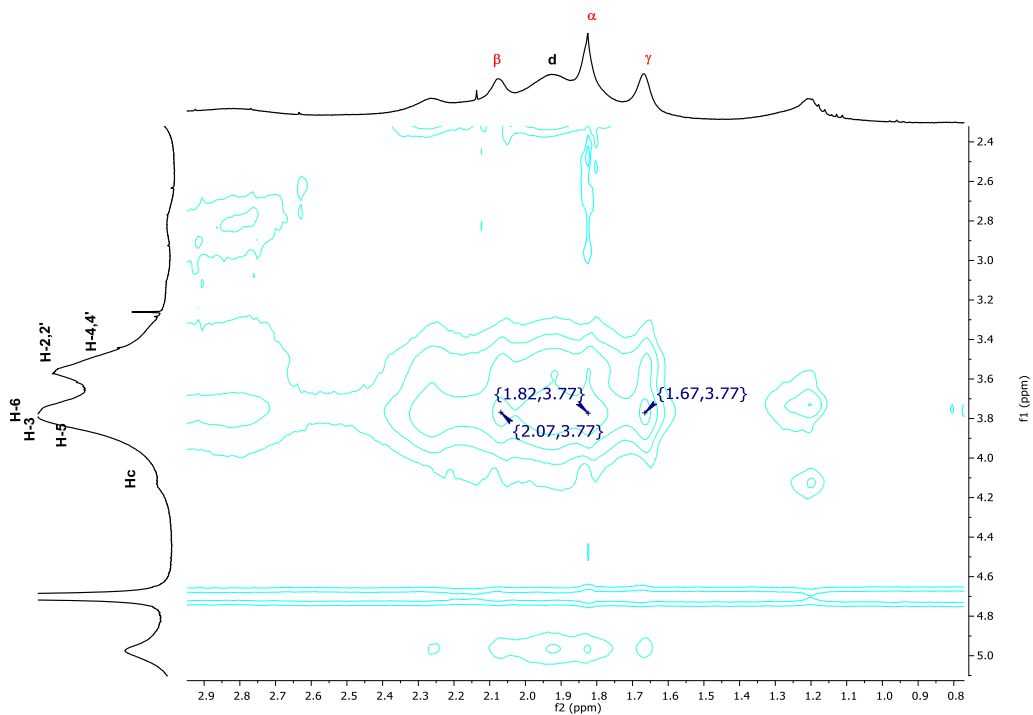


Figura 37. Amplificación de la zona alifática del espectro de RMN 2D NOESY del CI G/Ad-h-Dox en D₂O.

Continuando con el tema de la caracterización en estado sólido del CI G/Ad-h-Dox, se realizó el análisis térmico por DSC y TGA. En el perfil térmico por DSC (Figura 38) del compuesto dendrítico G, del Ad-h-Dox, de la mezcla física G/Ad-h-Dox y del CI G/Ad-h-Dox. En la gráfica de G se puede observar un pico endotérmico en 60 °C que se atribuye a la pérdida de las moléculas de agua localizadas en el interior de la cavidad de las unidades de β CD y en la periferia del compuesto dendrítico; después, en 300 °C aparece un pico endotérmico pronunciado que representa el proceso de degradación de G. En la curva de Ad-h-Dox se observa un pico endotérmico poco pronunciado en 75 °C que corresponde a la liberación de las moléculas de agua que pudieran estar unidas al profármaco, también en 167 °C se observa un poco exotérmico que puede resultar de un cambio en el estado cristalino del compuesto. Finalmente, destaca que en el CI se observan dos picos endotérmicos: el primero en el rango de 25 – 110 °C que corresponde al proceso de deshidratación del compuesto, el segundo pico en el rango de 170 – 260 °C, donde aparece la descomposición del CI, estas transiciones no son las mismas que las transiciones de los componentes individuales, esto debido a que cuando se forma el CI se forman una nueva entidad química y por lo tanto no se comporta como los componentes individuales. Esto se confirma con el perfil térmico por TGA (Figura 39) en donde se observa que el CI tiene mayor estabilidad térmica que el compuesto dendrítico sin acomplejar, ya que se observa una pérdida de peso más lenta en el CI que en la entidad individual.

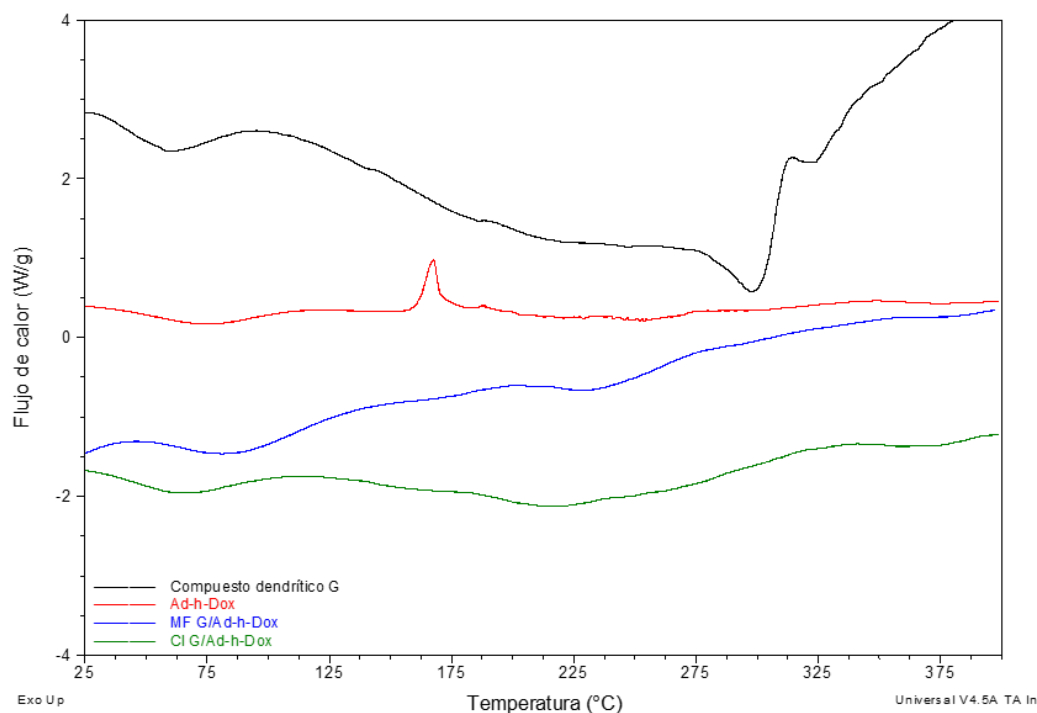


Figura 38. Análisis térmico por DSC del CI G/Ad-h-Dox.

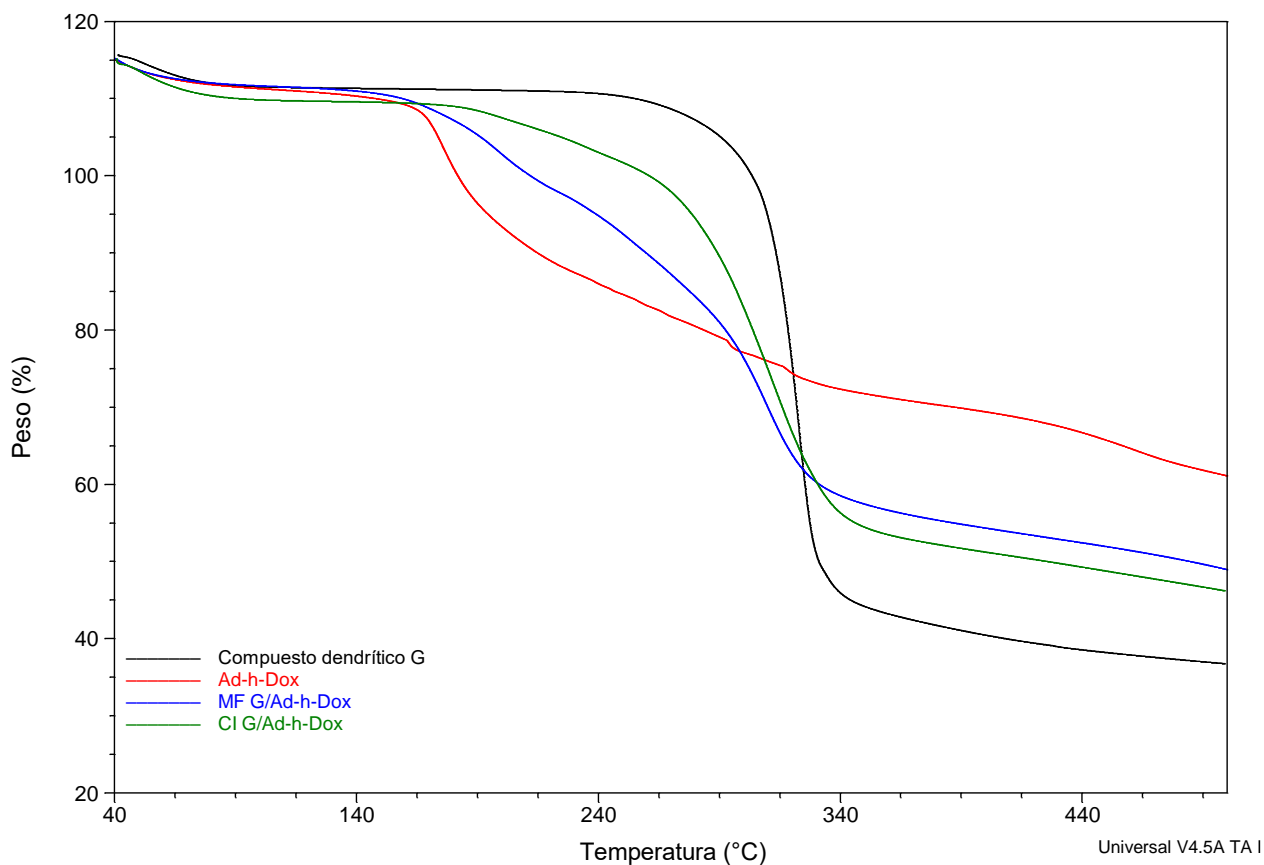


Figura 39. Análisis térmico por TGA del CI G/Ad-h-Dox.

6.8. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LOS COMPUESTOS DENDRÍTICOS POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

Una de las propiedades de los dendrímeros, dendrones y compuestos dendríticos es que debido a sus estrategias de síntesis se puede controlar con precisión su tamaño, forma y morfología, por lo que estas plataformas son monodispersas^{87,88}. Se utilizó la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) para determinar el promedio del radio hidrodinámico en agua del compuesto dendrítico G. En la Figura 40 se observa que aparecen dos picos, el primero con una intensidad del 92.6 % y que representa a la población que tiene un tamaño promedio de 4.330 ± 1.263 nm y otro pico muy pequeño que presenta una intensidad del 7.4 % y que representa a una población con un tamaño promedio de 3021 ± 1313 nm. Estos resultados indican que la mayoría de la población del compuesto dendrítico G es monodispersa y de tamaño nanométrico, pues se obtuvo un índice de polidispersión (PDI) de 0.212. Esto es debido a que este compuesto dendrítico se construyó con un método de síntesis controlado y

además, se sabe que este tipo de compuestos tienen también la propiedad de ser nanométricos⁸⁹. La segunda población, presente en proporción mínima, se puede deber a que las moléculas de β CD localizadas en la periferia de G estén formando agregados y estos tengan un tamaño mucho mayor, se ha reportado que este tipo de moléculas pueden tener agregación^{82,90}.

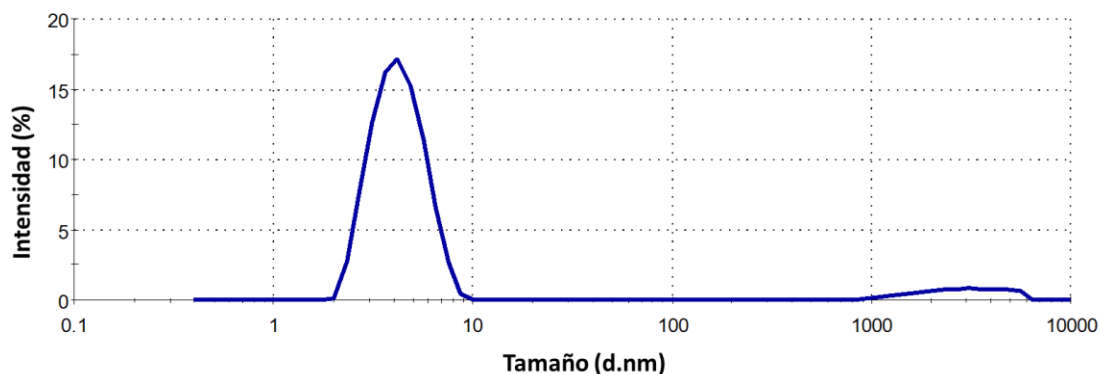


Figura 40. Distribución de tamaño del compuesto dendrítico **G**.

Después se determinó el tamaño de partícula del CI G/Ad-h-Dox (Figura 41), se obtuvo un PDI de 0.451 y, de la misma forma se encontraron dos picos que corresponden a dos diferentes poblaciones con tamaños diferentes. El primer pico, con un 79.1% de intensidad, tiene un tamaño de partícula promedio de 212.5 ± 112.6 nm; mientras que el segundo pico, presenta una intensidad de 20.9 % y se encontró que tiene un tamaño de 4234 ± 999.8 nm. Este cambio en el tamaño de partícula de G se debe a que al formar el CI con las moléculas de profármaco Ad-h-Dox aumenta el tamaño, ya que se están ensamblando 6 moléculas de profármaco por cada molécula de G. Además, el segundo pico se puede deber a que las unidades de ciclodextrina están espacialmente cercanas que se puedan estar favoreciendo la formación de agregados entre moléculas de CI por posibles interacciones pi entre los anillos de antraciclina de la molécula de la Dox.

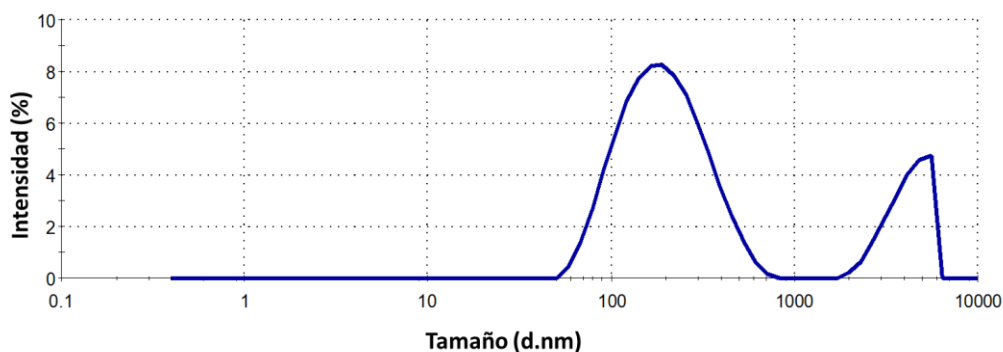


Figura 41. Distribución de tamaño del CI G/Ad-h-Dox.



6.9. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN DEL CI COMPUESTO DENDRÍTICO G/Ad-h-Dox

Los nanoacarreadores de fármacos sensibles al pH han atraído mucho interés por dos razones diferentes. La primera es que el microambiente tumoral es un espacio único que presenta diferente temperatura, pH y contenido enzimático, además de que el equilibrio redox también se encuentra alterado. Se ha estudiado que, en el microambiente tumoral, los niveles de pH se encuentran en valores ácidos debido a la glucólisis aeróbica y los cambios de la fosforilación oxidativa a otros tipos de metabolismo. Con el objetivo de administrar fármacos de manera focalizada para el tratamiento del cáncer, se pueden diseñar nanoacarreadores que respondan al pH ácido del microambiente; esto se logra mediante la creación de enlaces sensibles al pH ácido dentro de las nanoestructuras, provocando que en presencia de este valor de pH estos enlaces se rompan y se libere el fármaco⁵².

La segunda razón es que los endosomas en los que se incorporan los acarreadores a través de la endocitosis para ingresar a la célula, desarrollan ambientes también con valores de pH ácido (pH = 4.5 – 3.5), por lo tanto, la liberación del fármaco a partir del acarreador por el comportamiento del endosoma también puede ser un mecanismo para la liberación de este⁹¹. Se evaluó la liberación de Dox del CI G/Ad-h-Dox a 37 °C y valores de pH de 7.4, 6.5, 4.5 y 3.5, esto con el fin de simular los valores de pH que se presentan en el endosoma. A valores de pH 7.4 y 6.5 no hubo liberación de Dox. Después, en la Figura 42, se presenta la gráfica de la cinética de liberación del CI a pH 4.5 y 3.5, en donde podemos observar que en las primeras 12 horas del estudio hubo una liberación del 34 y 46 % respectivamente; posteriormente, en un período de 24 horas la liberación de Dox aumentó a 38 y 62 % a pH 4.5 y 3.5 respectivamente. Finalmente, la liberación del casi 100 % de la carga terapéutica del CI se llevó a cabo en 72 horas. Se puede observar que la liberación de Dox del CI es más rápida a un valor de pH 3.5; estos resultados nos indican que la plataforma diseñada con el compuesto dendrítico y el profármaco de Dox sólo liberará la carga terapéutica a valores de pH ácidos (4.5 – 3.5), mientras que a valores de pH fisiológicos no habrá liberación, por lo que se espera puedan disminuir los efectos secundarios asociados al fármaco y aumentar la eficacia de este último. Además, la liberación del fármaco a partir del acarreador también se lleva a cabo de manera prolongada en un intervalo de tiempo largo, lo que representa otra ventaja de este sistema.



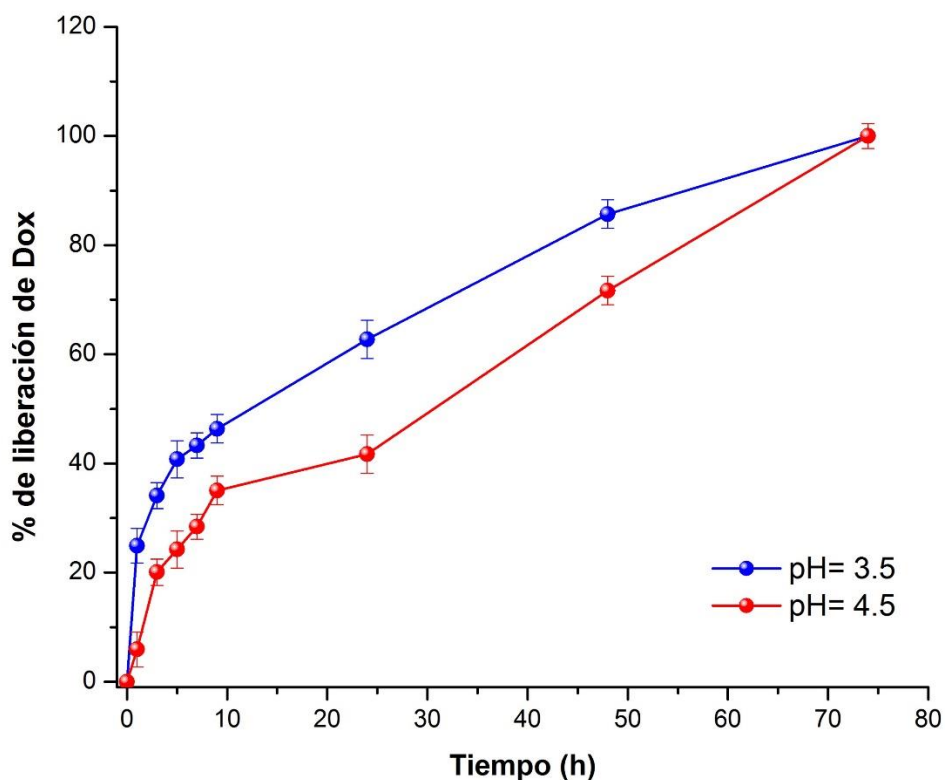


Figura 42. Cinética de liberación de Dox del CI G/Ad-h-Dox.

6.10. ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL COMPUESTO DENDRÍTICO G Y DE LOS CI G/AdCOOH Y G/Ad-h-Dox

Se determinó la actividad citotóxica de los compuestos en un ensayo independiente a 48 horas de exposición *in vitro* en líneas celulares carcinogénicas: HeLa (adenocarcinoma cervical humano), K-562 (leucemia mieloide crónica humana), SKLU-1 (adenocarcinoma de pulmón humano), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama humano, triple negativo), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano, positivo a receptores de estrógeno) y SW-620 (cáncer de colon), con el objetivo de evaluar que la actividad biológica que pudiera presentar la plataforma solo fuera atribuible a la carga terapéutica. Así, se analizaron la Dox, el profármaco Ad-h-Dox, el compuesto dendrítico G y sus respectivos CI, G/AdCOOH y G/Ad-h-Dox, los resultados de CI_{50} se presentan en la Tabla 1.



Tabla 1. Valores CI_{50} (μM) a 48 h de tratamiento del compuesto dendrítico G y de los correspondientes CI^a .

<i>Línea celular</i>	HeLa	K-562	SKLU-1	MDA-MB-231	MCF-7	SW-620
<i>Compuesto</i>						
<i>Compuesto dendrítico G</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA
<i>CI G/AdCOOH</i>	SA	SA	SA	SA	SA	SA
<i>CI G/Ad-h-Dox</i>	0.29 ± 0.06	1.14 ± 0.13	0.77 ± 0.10	0.80 ± 0.17	0.75 ± 0.12	0.50 ± 0.10
<i>Dox</i>	0.19 ± 0.02	2.37 ± 0.40	0.24 ± 0.04	0.50 ± 0.17	0.20 ± 0.03	0.44 ± 0.04
<i>Ad-h-Dox</i>	3.72 ± 0.50	17.26 ± 0.77	4.06 ± 0.51	10.26 ± 0.20	4.19 ± 0.72	6.72 ± 1.45

^a Los datos representan el promedio \pm ES (n = 3), SA: Sin Actividad, CI_{50} : Concentración necesaria para inhibir el 50% de crecimiento celular.

En los resultados de actividad citotóxica, se toma a la Dox libre como control positivo de la actividad, ya que es el agente quimioterapéutico que se utiliza tanto para cánceres sólidos como líquidos, y se puede ver en la Tabla 1 que presenta la mayor actividad de todos los compuestos evaluados en todas las líneas celulares que se probaron. Después, se probó la actividad del fármaco Ad-h-Dox y se observa que presenta una actividad biológica menor en comparación con la Dox libre. Este resultado es importante, ya que se espera que cuando la plataforma esté en circulación sistémica no tenga actividad biológica hasta que llegue al sitio del tumor y si el fármaco llegara a estar libre en el organismo no cause efecto significativo. Siguiendo con la discusión, los resultados de la actividad biológica del CI G/Ad-h-Dox muestran que, en general, los valores de CI_{50} son similares a los valores





de la Dox libre, aunque, es importante relacionar estos resultados con los obtenidos en el porcentaje de fármaco liberado en el tiempo de 48 horas, el cual es del 85 % y del 68 % a pH 3.5 y 4.5, respectivamente, por lo que aún no se ha liberado todo el fármaco del nanoacarreador y por eso no se observa una actividad biológica mayor. También, es importante resaltar que, en las líneas celulares de adenocarcinoma de mama humano, MCF-7 y MDA-MB-231, el CI G/Ad-h-Dox presenta actividad biológica en concentraciones nanomolares, del mismo modo que presenta la actividad la Dox libre.

Por último, en la evaluación de la actividad biológica del compuesto dendrítico G y del CI G/AdCOOH se obtuvo que no presentan actividad biológica y esto es importante, ya que, de acuerdo con el diseño racional de esta plataforma, se requiere que cuando el fármaco sea liberado del nanoacarreador, el compuesto dendrítico sin carga terapéutica pueda ser eliminado sin ningún efecto biológico durante su recorrido por el organismo. Con esto se demuestra el éxito en el diseño y construcción de este nuevo acarreador, el cual se convierte en un candidato prometedor para la carga y liberación de fármacos de manera controlada para el tratamiento del cáncer.





7. CONCLUSIONES

Se realizó la síntesis, usando la reacción de química “click”, de dos nuevos compuestos dendríticos, con núcleo de ciclotrifosfaceno (P_3N_3) y seis unidades de β CD en la periferia, G y H. Estos compuestos dendríticos mostraron una mejor solubilidad en agua que la β CD nativa. También, los compuestos dendríticos G y H mostraron conformaciones diferentes, dependiendo el disolvente en donde se encontraban disueltas. En agua, G y H presentaron un fenómeno de volteo en la unidad de glucopiranososa modificada de las unidades de β CD, causando que la cavidad de las ciclodextrinas quedara ocupada por el anillo de triazol y por el enlazador que une a cada una de las unidades de β CD al núcleo de P_3N_3 . Este fenómeno de volteo se puede revertir en ambos compuestos dendríticos con un huésped muy afín (AdCOOH) a la cavidad de la β CD y se demostró utilizando el método de Job.

El AdCOOH se utilizó para diseñar y construir un profármaco, con un fármaco quimioterapéutico, la Dox, que además sea sensible al pH ácido (Ad-h-Dox). Se formó y caracterizó el CI entre el compuesto dendrítico G y el profármaco Ad-h-Dox. La cinética de liberación de Dox a partir del CI G/Ad-h-Dox mostró una liberación prolongada y controlada en función del pH, ya que el fármaco se liberó solamente en valores de pH < 6.5, por lo que se espera que esta liberación solo ocurra en células tumorales. El CI G/Ad-h-Dox tiene una actividad citotóxica comparable con la Dox libre, a 48 horas de exposición en líneas celulares carcinogénicas. Todo esto demuestra que se llevó a cabo de manera exitosa el diseño y construcción de dos nuevas plataformas para la carga y liberación controlada de fármacos.





8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Nirmala, M. J.; Kizhuveetil, U.; Johnson, A.; G, B.; Nagarajan, R.; Muthuvijayan, V. Cancer Nanomedicine: A Review of Nano-Therapeutics and Challenges Ahead. *RSC Adv.* **2023**, 13 (13), 8606–8629. <https://doi.org/10.1039/d2ra07863e>.
- (2) Zhang, P.; Xiao, Y.; Sun, X.; Lin, X.; Koo, S.; Yaremenko, A. V.; Qin, D.; Kong, N.; Farokhzad, O. C.; Tao, W. Cancer Nanomedicine toward Clinical Translation: Obstacles, Opportunities, and Future Prospects. *Med* **2023**, 4 (3), 147–167. <https://doi.org/10.1016/j.medj.2022.12.001>.
- (3) Soni, A.; Bhandari, M. P.; Tripathi, G. K.; Bundela, P.; Khiriya, P. K.; Khare, P. S.; Kashyap, M. K.; Dey, A.; Vellingiri, B.; Sundaramurthy, S.; Suresh, A.; Pérez de la Lastra, J. M. Nano-Biotechnology in Tumour and Cancerous Disease: A Perspective Review. *J. Cell. Mol. Med.* **2023**, 27 (6), 737–762. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17677>.
- (4) Peer, D. Harnessing RNAi Nanomedicine for Precision Therapy. *Mol. Cell. Ther.* **2014**, 2 (1), 5. <https://doi.org/10.1186/2052-8426-2-5>.
- (5) Attia, M. F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omran, Z.; Vandamme, T. F. An Overview of Active and Passive Targeting Strategies to Improve the Nanocarriers Efficiency to Tumour Sites. *J. Pharm. Pharmacol.* **2019**, 71 (8), 1185–1198. <https://doi.org/10.1111/jphp.13098>.
- (6) Davoodi, P.; Lee, L. Y.; Xu, Q.; Sunil, V.; Sun, Y.; Soh, S.; Wang, C. H. Drug Delivery Systems for Programmed and On-Demand Release. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, 132, 104–138. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.002>.
- (7) Modification of Drug Release. Strateg. to Modify Drug Release from Pharm. *Syst.* **2015**, 15–28. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100092-2.00002-3>.
- (8) Sharma, P.; Negi, P.; Mahindroo, N. Recent Advances in Polymeric Drug Delivery Carrier Systems. *Adv. Polym. Biomed. Appl.* **2018**, 369–388.
- (9) Li, H. J.; Du, J. Z.; Du, X. J.; Xu, C. F.; Sun, C. Y.; Wang, H. X.; Cao, Z. T.; Yang, X. Z.; Zhu, Y. H.; Nie, S.; Wang, J. Stimuli-Responsive Clustered Nanoparticles for Improved Tumor Penetration and Therapeutic Efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, 113 (15), 4164–4169. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522080113>.





- (10) Sun, T.; Jiang, C. Stimuli-Responsive Drug Delivery Systems Triggered by Intracellular or Subcellular Microenvironments. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2023**, 196, 114773. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114773>.
- (11) Mi, P.; Kokuryo, D.; Cabral, H.; Wu, H.; Terada, Y.; Saga, T.; Aoki, I.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. A PH-Activatable Nanoparticle with Signal-Amplification Capabilities for Non-Invasive Imaging of Tumour Malignancy. *Nat. Nanotechnol.* **2016**, 11 (8), 724–730. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.72>.
- (12) Lee, E. S.; Gao, Z.; Bae, Y. H. Recent Progress in Tumor PH Targeting Nanotechnology. *J. Control. Release* **2008**, 132 (3), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.003>.
- (13) Pourmadadi, M.; Mahdi Eshaghi, M.; Ostovar, S.; Mohammadi, Z.; Sharma, R. K.; Paiva-Santos, A. C.; Rahmani, E.; Rahdar, A.; Pandey, S. Innovative Nanomaterials for Cancer Diagnosis, Imaging, and Therapy: Drug Delivery Applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2023**, 82 (February), 104357. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104357>.
- (14) Elsharkasy, O. M.; Nordin, J. Z.; Hagey, D. W.; de Jong, O. G.; Schiffelers, R. M.; Andaloussi, S. EL; Vader, P. Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems: Why and How? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, 159, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.04.004>.
- (15) Afzal, O.; Altamimi, A. S. A.; Nadeem, M. S.; Alzarea, S. I.; Almalki, W. H.; Tariq, A.; Mubeen, B.; Murtaza, B. N.; Iftikhar, S.; Riaz, N.; Kazmi, I. Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications. *Nanomaterials* **2022**, 12 (24), 1–27. <https://doi.org/10.3390/nano12244494>.
- (16) Grayson, S. M.; Fréchet, J. M. J. Convergent Dendrons and Dendrimers: From Synthesis to Applications. *Chem. Rev.* **2001**, 101 (12), 3819–3867. <https://doi.org/10.1021/cr990116h>.
- (17) Arora, V.; Abourehab, M. A. S.; Modi, G.; Kesharwani, P. Dendrimers as Prospective Nanocarrier for Targeted Delivery against Lung Cancer. *Eur. Polym. J.* **2022**, 180 (September), 111635. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111635>.
- (18) Tomalia, D. A. Birth of a New Macromolecular Architecture: Dendrimers as Quantized Building Blocks for Nanoscale Synthetic Polymer Chemistry. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30 (3–4), 294–324. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.01.007>.





- (19) Ficker, M.; Paolucci, V.; Christensen, J. B. Improved Large-Scale Synthesis and Characterization of Small and Medium Generation PAMAM Dendrimers. *Can. J. Chem.* **2017**, 95 (9), 954–964. <https://doi.org/10.1139/cjc-2017-0108>.
- (20) Pittelkow, M.; Christensen, J. B. Convergent Synthesis of Internally Branched PAMAM Dendrimers. *Org. Lett.* **2005**, 7 (7), 1295–1298. <https://doi.org/10.1021/ol050040d>.
- (21) Nikzamir, M.; Hanifehpour, Y.; Akbarzadeh, A.; Panahi, Y. Applications of Dendrimers in Nanomedicine and Drug Delivery: A Review. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2021**, 31 (6), 2246–2261. <https://doi.org/10.1007/s10904-021-01925-2>.
- (22) Nanjwade, B. K.; Bechra, H. M.; Derkar, G. K.; Manvi, F. V.; Nanjwade, V. K. Dendrimers: Emerging Polymers for Drug-Delivery Systems. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, 38 (3), 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.07.008>.
- (23) Santos, A.; Veiga, F.; Figueiras, A. Dendrimers as Pharmaceutical Excipients: Synthesis, Properties, Toxicity and Biomedical Applications; 2020; Vol. 13. <https://doi.org/10.3390/ma13010065>.
- (24) Caminade, A. M. Inorganic Dendrimers: Recent Advances for Catalysis, Nanomaterials, and Nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45 (19), 5174–5186. <https://doi.org/10.1039/c6cs00074f>.
- (25) Caminade, A. M. Phosphorus Dendrimers as Nanotools against Cancers. *Molecules* **2020**, 25 (15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153333>.
- (26) Caminade, A. M.; Majoral, J. P. Bifunctional Phosphorus Dendrimers and Their Properties. *Molecules* **2016**, 21 (4). <https://doi.org/10.3390/molecules21040538>.
- (27) Pérez-Carrión, M. D.; Posadas, I. Dendrimers in Neurodegenerative Diseases. *Processes* **2023**, 11 (2), 1–24. <https://doi.org/10.3390/pr11020319>.
- (28) Caminade, A. M.; Hameau, A.; Majoral, J. P. The Specific Functionalization of Cyclotriphosphazene for the Synthesis of Smart Dendrimers. *Dalt. Trans.* **2016**, 45 (5), 1810–1822. <https://doi.org/10.1039/c5dt03047a>.
- (29) Caminade, A. M. Phosphorus Dendrimers for Nanomedicine. *Chem. Commun.* **2017**, 53 (71), 9830–9838. <https://doi.org/10.1039/c7cc04949h>.





- (30) Mishra, V.; Gupta, U.; Jain, N. K. Surface-Engineered Dendrimers: A Solution for Toxicity Issues. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2009**, 20 (2), 141–166. <https://doi.org/10.1163/156856208X386246>.
- (31) Jevprasesphant, R.; Penny, J.; Attwood, D.; McKeown, N. B.; D'Emanuele, A. Engineering of Dendrimer Surfaces to Enhance Transepithelial Transport and Reduce Cytotoxicity. *Pharm. Res.* **2003**, 20 (10), 1543–1550. <https://doi.org/10.1023/A:1026166729873>.
- (32) Dey, A. D.; Bigham, A.; Esmaeili, Y.; Ashrafizadeh, M.; Moghaddam, F. D.; Tan, S. C.; Yousefiasl, S.; Sharma, S.; Maleki, A.; Rabiee, N.; Kumar, A. P.; Thakur, V. K.; Orive, G.; Sharifi, E.; Kumar, A.; Makvandi, P. Dendrimers as Nanoscale Vectors: Unlocking the Bars of Cancer Therapy. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, 86 (P2), 396–419. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.06.003>.
- (33) Yang, J.; Zhang, Q.; Chang, H.; Cheng, Y. Surface-Engineered Dendrimers in Gene Delivery. *Chem. Rev.* **2015**, 115 (11), 5274–5300. <https://doi.org/10.1021/cr500542t>.
- (34) Jain, K.; Kesharwani, P.; Gupta, U.; Jain, N. K. Dendrimer Toxicity: Let's Meet the Challenge. *Int. J. Pharm.* **2010**, 394 (1–2), 122–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.04.027>.
- (35) Arima, H.; Kihara, F.; Hirayama, F.; Uekama, K. Enhancement of Gene Expression by Polyamidoamine Dendrimer Conjugates with α -, β -, and γ -Cyclodextrins. *Bioconjug. Chem.* **2001**, 12 (4), 476–484. <https://doi.org/10.1021/bc000111n>.
- (36) Arima, H.; Motoyama, K.; Higashi, T. Sugar-Appended Polyamidoamine Dendrimer Conjugates with Cyclodextrins as Cell-Specific Non-Viral Vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65 (9), 1204–1214. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.04.001>.
- (37) Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (21), 10940–10975. <https://doi.org/10.1021/cr500081p>.
- (38) Soe, H. M. S. H.; Maw, P. D.; Loftsson, T.; Jansook, P. A Current Overview of Cyclodextrin-Based Nanocarriers for Enhanced Antifungal Delivery. *Pharmaceuticals* **2022**, 15 (12), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ph15121447>.
- (39) Shahriari, M.; Kesharwani, P.; Johnston, T. P.; Sahebkar, A. Anticancer Potential of Curcumin-Cyclodextrin Complexes and Their Pharmacokinetic Properties. *Int. J. Pharm.* **2023**, 631 (July 2022), 122474. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122474>.





- (40) Loftsson, T.; Sigurdsson, H. H.; Jansook, P. Anomalous Properties of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions. *Materials* (Basel). **2023**, 16 (6), 2223. <https://doi.org/10.3390/ma16062223>.
- (41) Kurkov, S. V.; Loftsson, T. Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **2013**, 453 (1), 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.055>.
- (42) Duchêne, D.; Bochot, A. Thirty Years with Cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **2016**, 514 (1), 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.030>.
- (43) Granadero, D.; Bordello, J.; Pérez-Alvite, M. J.; Novo, M.; Al-Soufi, W. Host-Guest Complexation Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy: Adamantane-Cyclodextrin Inclusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, 11 (1), 173–188. <https://doi.org/10.3390/ijms11010173>.
- (44) Paolino, M.; Ennen, F.; Lamponi, S.; Cernescu, M.; Voit, B.; Cappelli, A.; Appelhans, D.; Komber, H. Cyclodextrin-Adamantane Host-Guest Interactions on the Surface of Biocompatible Adamantyl-Modified Glycodendrimers. *Macromolecules* **2013**, 46 (9), 3215–3227. <https://doi.org/10.1021/ma400352m>.
- (45) Geng, Z.; Shin, J. J.; Xi, Y.; Hawker, C. J. Click Chemistry Strategies for the Accelerated Synthesis of Functional Macromolecules. *J. Polym. Sci.* **2021**, 59 (11), 963–1042. <https://doi.org/10.1002/pol.20210126>.
- (46) Taiariol, L.; Chaix, C.; Farre, C.; Moreau, E. Click and Bioorthogonal Chemistry: The Future of Active Targeting of Nanoparticles for Nanomedicines? *Chem. Rev.* **2022**, 122 (1), 340–384. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00484>.
- (47) Li, N.; Binder, W. H. Click-Chemistry for Nanoparticle-Modification. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21 (42), 16717–16734. <https://doi.org/10.1039/c1jm11558h>.
- (48) Anseth, K. S.; Klok, H. A. Click Chemistry in Biomaterials, Nanomedicine, and Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2016**, 17 (1), 1–3. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01660>.
- (49) Badria, A.; Badria, A. Chemistry: Click Chemistry: Chemistry: Promising Chemistry: Promising Chemistry : Structures. *Polymers* **2022**, 14, 4077.





- (50) Kondengadan, S. M.; Bansal, S.; Yang, C.; Liu, D.; Fultz, Z.; Wang, B. Click Chemistry and Drug Delivery: A Bird's-Eye View. *Acta Pharm. Sin. B* **2022**. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.10.015>.
- (51) Lallana, E.; Sousa-Herves, A.; Fernandez-Trillo, F.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. Click Chemistry for Drug Delivery Nanosystems. *Pharm. Res.* **2012**, 29, 1–34. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0568-5>.
- (52) Crini, G.; Fourmentin, S.; Fenyvesi, É.; Torri, G.; Fourmentin, M.; Morin-Crini, N. Cyclodextrins, from Molecules to Applications. *Environ. Chem. Lett.* **2018**, 16 (4), 1361–1375. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0763-2>.
- (53) Almajidi, Y. Q.; Kadhim, M. M.; Alsaikhan, F.; Turki Jalil, A.; Hassan Sayyid, N.; Alexis Ramírez-Coronel, A.; Hassan Jawhar, Z.; Gupta, J.; Nabavi, N.; Yu, W.; Ertas, Y. N. Doxorubicin-Loaded Micelles in Tumor Cell-Specific Chemotherapy. *Environ. Res.* **2023**, 227 (February). <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115722>.
- (54) Ting, C. H.; Chen, J. T.; Hsu, C. S. Synthesis and Thermal and Photoluminescence Properties of Liquid Crystalline Polyacetylenes Containing 4-Alkanyloxyphenyl Trans-4-Alkylcyclohexanoate Side Groups. *Macromolecules* **2002**, 35 (4), 1180–1189. <https://doi.org/10.1021/ma0107962>.
- (55) Folgado, E.; Guerre, M.; Bijani, C.; Ladmiral, V.; Caminade, A. M.; Ameduri, B.; Ouali, A. Well-Defined Poly(Vinylidene Fluoride) (PVDF) Based-Dendrimers Synthesized by Click Chemistry: Enhanced Crystallinity of PVDF and Increased Hydrophobicity of PVDF Films. *Polym. Chem.* **2016**, 7 (36), 5625–5629. <https://doi.org/10.1039/c6py01167e>.
- (56) Zhong, N.; Byun, H. S.; Bittman, R. An Improved Synthesis of 6-O-Monosyl-6-Deoxy- β -Cyclodextrin. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 (19), 2919–2920. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(98\)00417-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(98)00417-1).
- (57) Jozwiakowski, M. J.; Connors, K. A. Aqueous Solubility Behavior of Three Cyclodextrins. *Carbohydr. Res.* **1985**, 143 (C), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90694-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90694-3).
- (58) Ouellette, R. J.; Rawn, J. D. Ethers and Epoxides. *Org. Chem. Study Guid.* 2015, 277–297. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801889-7.00016-9>.





- (59) Tripodo, G.; Wischke, C.; Neffe, A. T.; Lendlein, A. Efficient Synthesis of Pure Monotosylated Beta-Cyclodextrin and Its Dimers. *Carbohydr. Res.* **2013**, 381, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.018>.
- (60) Faugeras, P. A.; Boëns, B.; Elchinger, P. H.; Brouillette, F.; Montplaisir, D.; Zerrouki, R.; Lucas, R. When Cyclodextrins Meet Click Chemistry. *European J. Org. Chem.* **2012**, No. 22, 4087–4105. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201200013>.
- (61) Singh, M. S.; Chowdhury, S.; Koley, S. Advances of Azide-Alkyne Cycloaddition-Click Chemistry over the Recent Decade. *Tetrahedron* **2016**, 72 (35), 5257–5283. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.07.044>.
- (62) Aragão-Leoneti, V.; Campo, V. L.; Gomes, A. S.; Field, R. A.; Carvalho, I. Application of Copper(I)-Catalysed Azide/Alkyne Cycloaddition (CuAAC) “click Chemistry” in Carbohydrate Drug and Neoglycopolymer Synthesis. *Tetrahedron* **2010**, 66 (49), 9475–9492. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.10.001>.
- (63) Agrahari, A. K.; Bose, P.; Jaiswal, M. K.; Rajkhowa, S.; Singh, A. S.; Hotha, S.; Mishra, N.; Tiwari, V. K. Cu(I)-Catalyzed Click Chemistry in Glycoscience and Their Diverse Applications. *Chem. Rev.* **2021**, 121 (13), 7638–7956. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00920>.
- (64) Naidoo, K. J.; Chen, J. Y. J.; Jansson, J. L. M.; Widmalm, G.; Maliniak, A. Molecular Properties Related to the Anomalous Solubility of β -Cyclodextrin. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108 (14), 4236–4238. <https://doi.org/10.1021/jp037704q>.
- (65) Poulson, B. G.; Alsulami, Q. A.; Sharfalddin, A.; El Agammy, E. F.; Mouffouk, F.; Emwas, A.-H.; Jaremko, L.; Jaremko, M. Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications. *Polysaccharides* **2021**, 3 (1), 1–31. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010001>.
- (66) Sandilya, A. A.; Natarajan, U.; Priya, M. H. Molecular View into the Cyclodextrin Cavity: Structure and Hydration. *ACS Omega* **2020**, 5 (40), 25655–25667. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02760>.
- (67) Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, 98 (5), 1743–1753. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>.





- (68) Sadaquat, H.; Akhtar, M. Comparative Effects of β -Cyclodextrin, HP- β -Cyclodextrin and SBE7- β -Cyclodextrin on the Solubility and Dissolution of Docetaxel via Inclusion Complexation. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2020**, 96 (3–4), 333–351. <https://doi.org/10.1007/s10847-020-00977-0>.
- (69) Sabadini, E.; Cosgrove, T.; Egídio, F. D. C. Solubility of Cyclomaltooligosaccharides (Cyclodextrins) in H₂O and D₂O: A Comparative Study. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341 (2), 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.11.004>.
- (70) Potier, J.; Menuel, S.; Azaroual, N.; Monflier, E.; Hapiot, F. Limits of the Inversion Phenomenon in Triazolyl-Substituted β -Cyclodextrin Dimers. *European J. Org. Chem.* **2014**, 2014 (7), 1547–1556. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201301681>.
- (71) Menuel, S.; Azaroual, N.; Landy, D.; Six, N.; Hapiot, F.; Monflier, E. Unusual Inversion Phenomenon of β -Cyclodextrin Dimers in Water. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, 17 (14), 3949–3955. <https://doi.org/10.1002/chem.201003221>.
- (72) González-Méndez, I.; Hameau, A.; Laurent, R.; Bijani, C.; Bourdon, V.; Caminade, A. M.; Rivera, E.; Moineau-Chane Ching, K. I. β -Cyclodextrin PAMAM Dendrimer: How to Overcome the Tumbling Process for Getting Fully Available Host Cavities. *European J. Org. Chem.* **2020**, 2020 (9), 1114–1121. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901823>.
- (73) Menuel, S.; Fontanay, S.; Clarot, I.; Duval, R. E.; Diez, L.; Marsura, A. Synthesis and Complexation Ability of a Novel Bis-(Guanidinium)-Tetrakis- (β -Cyclodextrin) Dendrimeric Tetrapod as a Potential Gene Delivery (DNA and SiRNA) System. Study of Cellular SiRNA Transfection. *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19 (12), 2357–2362. <https://doi.org/10.1021/bc800193p>.
- (74) Takashima, Y.; Fukui, Y.; Otsubo, M.; Hamada, N.; Yamaguchi, H.; Yamamoto, H.; Harada, A. Emission Properties of Cyclodextrin Dimers Linked with Perylene Diimide - Effect of Cyclodextrin Tumbling. *Polym. J.* **2012**, 44 (3), 278–285. <https://doi.org/10.1038/pj.2011.128>.
- (75) Harries, D.; Rau, D. C.; Parsegian, V. A. Solutes Probe Hydration in Specific Association of Cyclodextrin and Adamantane. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (7), 2184–2190. <https://doi.org/10.1021/ja045541t>.
- (76) González-Méndez, I.; Aguayo-Ortiz, R.; Sorroza-Martínez, K.; Solano, J. D.; Porcu, P.; Rivera, E.; Dominguez, L. Conformational Analysis by NMR and Molecular Dynamics of Adamantane-





Doxorubicin Prodrugs and Their Assemblies with β -Cyclodextrin: A Focus on the Design of Platforms for Controlled Drug Delivery. *Bioorganic Med. Chem.* **2020**, 28 (13), 115510. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115510>.

(77) Zhou, J.; Jia, J.; He, J.; Li, J.; Cai, J. Cyclodextrin Inclusion Complexes and Their Application in Food Safety Analysis: Recent Developments and Future Prospects. *Foods* **2022**, 11 (23). <https://doi.org/10.3390/foods11233871>.

(78) Ghosh, A.; Biswas, S.; Ghosh, T. Preparation and Evaluation of Silymarin β -Cyclodextrin Molecular Inclusion Complexes. *J. Young Pharm.* **2011**, 3 (3), 205–210. <https://doi.org/10.4103/0975-1483.83759>.

(79) Gharib, R.; Greige-Gerges, H.; Fourmentin, S.; Charcosset, C.; Auezova, L. Liposomes Incorporating Cyclodextrin-Drug Inclusion Complexes: Current State of Knowledge. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 129, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.048>.

(80) Cid-Samamed, A.; Rakmai, J.; Mejuto, J. C.; Simal-Gandara, J.; Astray, G. Cyclodextrins Inclusion Complex: Preparation Methods, Analytical Techniques and Food Industry Applications. *Food Chem.* **2022**, 384 (August 2021), 132467. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132467>.

(81) Paiva-Santos, A. C.; Ferreira, L.; Peixoto, D.; Silva, F.; Soares, M. J.; Zeinali, M.; Zafar, H.; Mascarenhas-Melo, F.; Raza, F.; Mazzola, P. G.; Veiga, F. Cyclodextrins as an Encapsulation Molecular Strategy for Volatile Organic Compounds— Pharmaceutical Applications. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2022**, 218 (August). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112758>.

(82) Carrazana, J.; Jover, A.; Mejjide, F.; Soto, V. H.; Tato, J. V. Complexation of Adamantyl Compounds by β -Cyclodextrin and Monoaminoderivatives. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109 (19), 9719–9726. <https://doi.org/10.1021/jp0505781>.

(83) Tran, D. N.; Colesnic, D.; Adam De Beaumais, S.; Pembouong, G.; Portier, F.; Queijo, Á. A.; Vázquez Tato, J.; Zhang, Y.; Ménand, M.; Bouteiller, L.; Sollogoub, M. Cyclodextrin-Adamantane Conjugates, Self-Inclusion and Aggregation versus Supramolecular Polymer Formation. *Org. Chem. Front.* **2014**, 1 (6), 703–706. <https://doi.org/10.1039/c4qo00104d>.

(84) González-Méndez, I.; Solano, J. D.; Porcu, P.; Ruiu, A.; Rojas-Aguirre, Y.; Rivera, E. Optimized Synthesis, Characterization and in Vitro Systematic Evaluation of Adamantane-Doxorubicin Prodrugs





Sensitive to PH in Breast Cancer Cells. *J. Mol. Struct.* **2019**, 1177, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.09.044>.

(85) Mura, P. Analytical Techniques for Characterization of Cyclodextrin Complexes in Aqueous Solution: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, 101, 238–250. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.022>.

(86) Novák, C.; Éhen, Z.; Fodor, M.; Jicsinszky, L.; Orgoványi, J. Application of Combined Thermoanalytical Techniques in the Investigation of Cyclodextrin Inclusion Complexes. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2006**, 84 (3), 693–701. <https://doi.org/10.1007/s10973-005-7605-8>.

(87) Mura, P. Analytical Techniques for Characterization of Cyclodextrin Complexes in the Solid State: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, 113, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.01.058>.

(88) Li, X.; Naeem, A.; Xiao, S.; Hu, L.; Zhang, J.; Zheng, Q. Safety Challenges and Application Strategies for the Use of Dendrimers in Medicine. *Pharmaceutics* **2022**, 14, 1292. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061292>.

(89) Yousefi, M.; Narmani, A.; Jafari, S. M. Dendrimers as Efficient Nanocarriers for the Protection and Delivery of Bioactive Phytochemicals. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2020**, 278. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102125>.

(90) Kesharwani, P.; Jain, K.; Jain, N. K. Dendrimer as Nanocarrier for Drug Delivery. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, 39 (2), 268–307. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005>.

(91) Coleman, A. W.; Nicolis, I.; Keller, N.; Dalbiez, J. P. Aggregation of Cyclodextrins: An Explanation of the Abnormal Solubility of β -Cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1992**, 13 (2), 139–143. <https://doi.org/10.1007/BF01053637>.

(92) Kanamala, M.; Wilson, W. R.; Yang, M.; Palmer, B. D.; Wu, Z. Mechanisms and Biomaterials in PH-Responsive Tumour Targeted Drug Delivery: A Review. *Biomaterials* **2016**, 85, 152–167. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.061>.





9. ANEXOS

(ESPECTROS DE RMN ^1H , ^{13}C , 2D; HMQC, NOESY;
EM, DSC Y TGA).



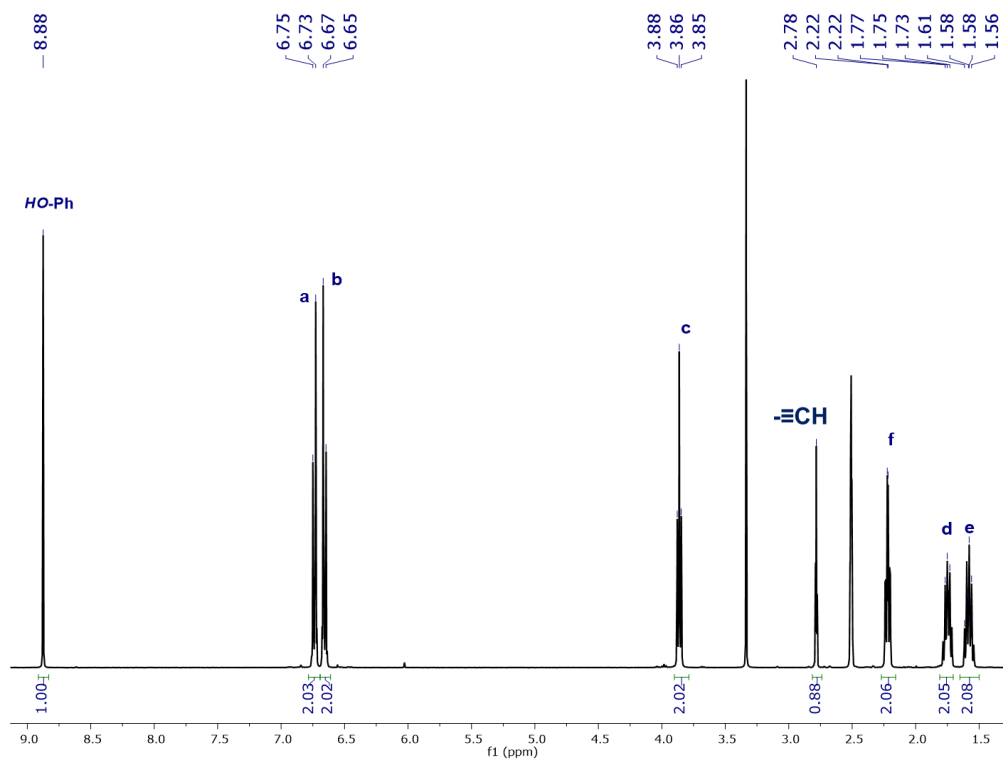


Figura 43. Espectro de ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) a 400 MHz del intermediario B.

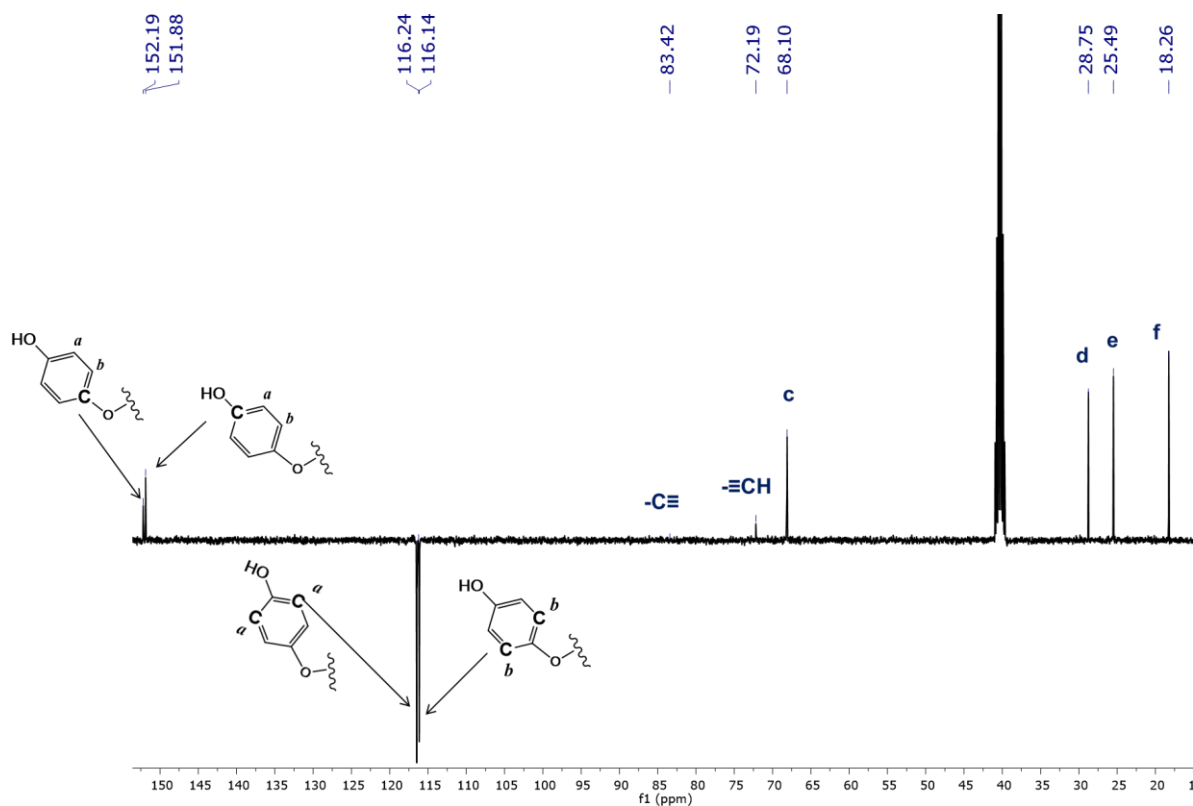


Figura 44. Espectro de ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) a 400 MHz del intermediario B.

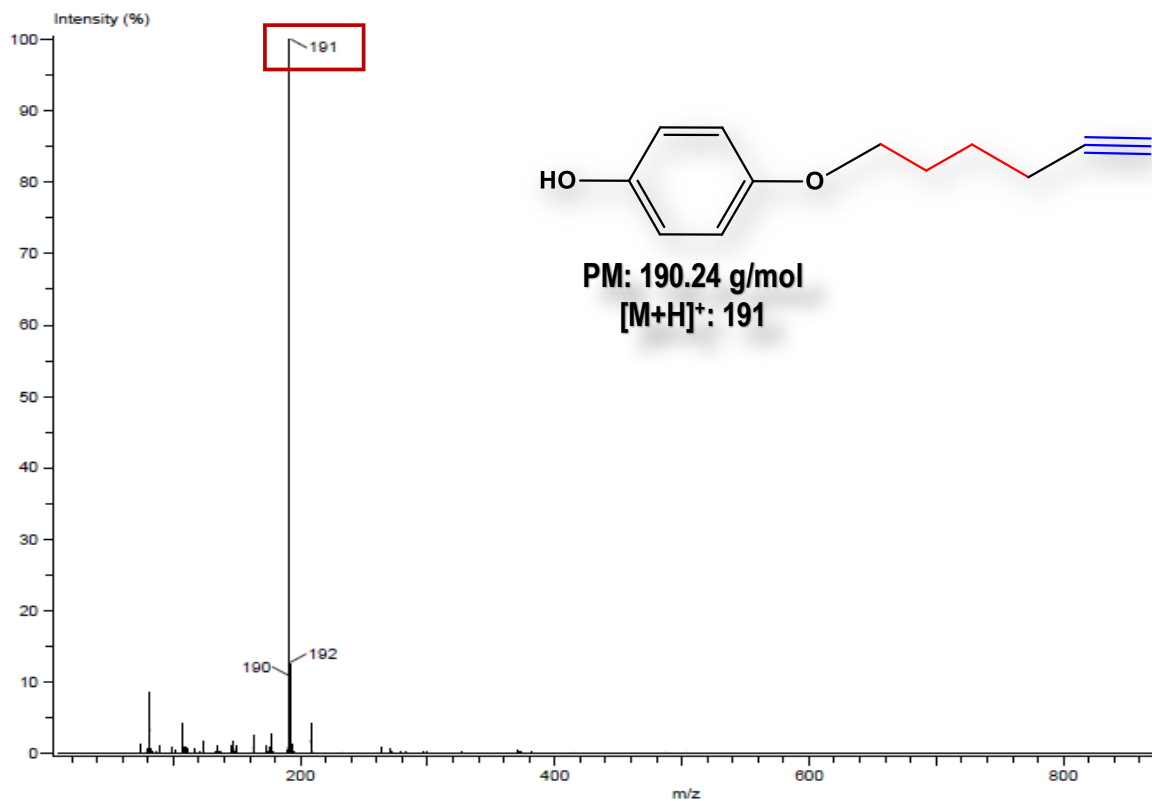


Figura 45. Espectro de masas por DART del intermediario B.

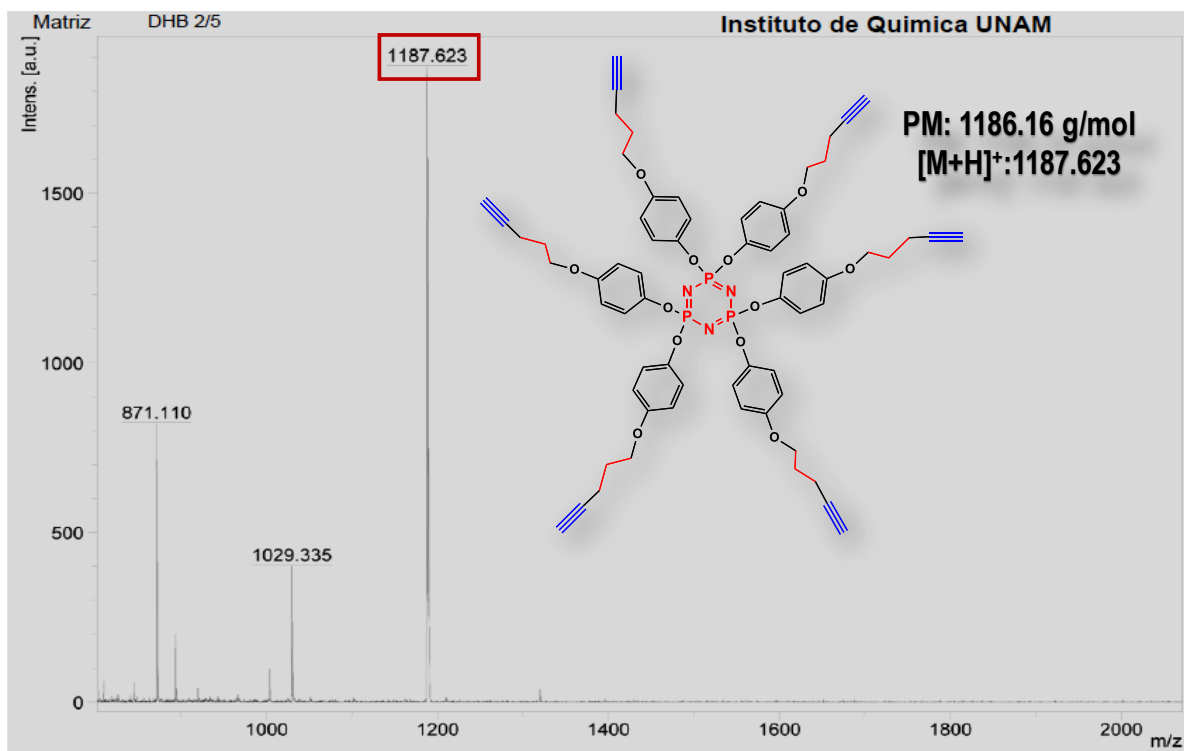


Figura 46. Espectro de masas por MALDI-TOF del intermediario C.

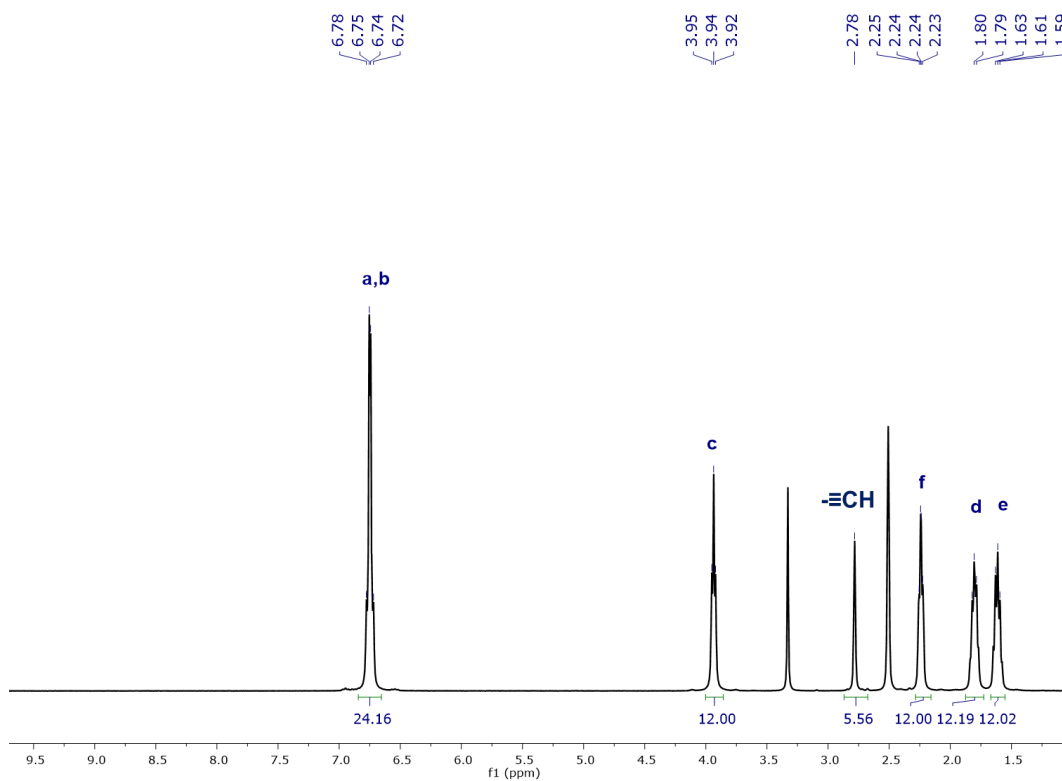


Figura 47. Espectro de ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) a 400 MHz del intermediario D.

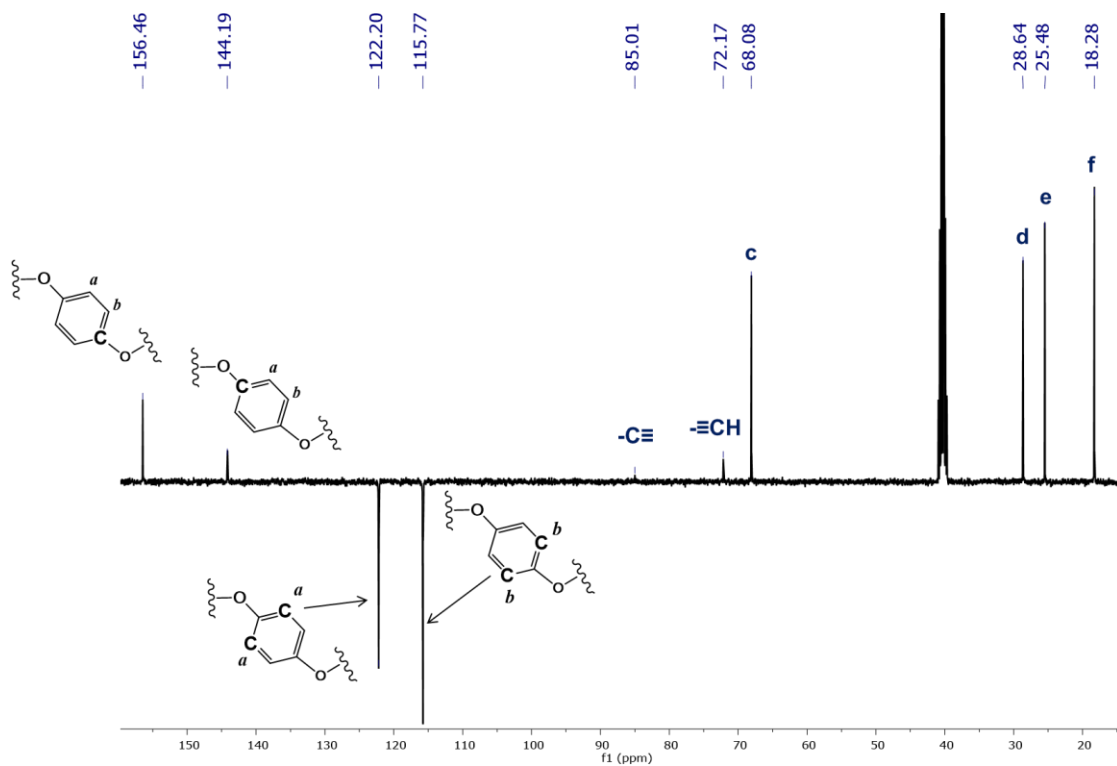


Figura 48. Espectro de ^{13}C RMN ($\text{DMSO-}d_6$) a 100 MHz del intermediario D.

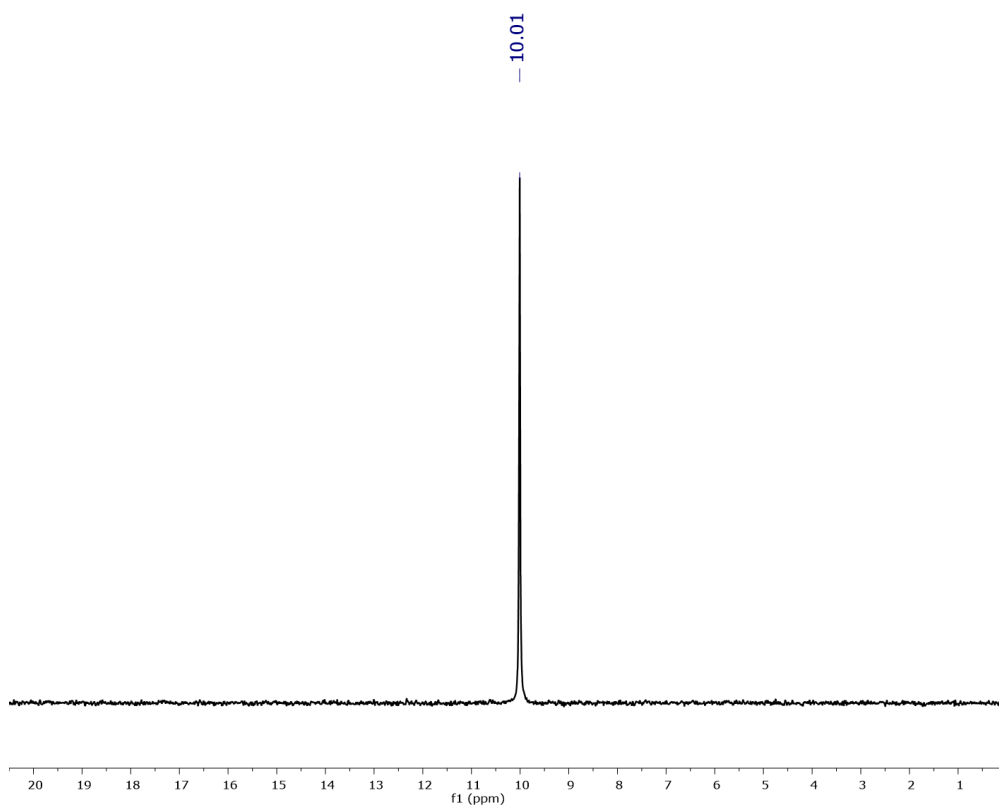


Figura 49. Espectro de ^{31}P RMN ($\text{DMSO}-d_6$) del intermediario D.

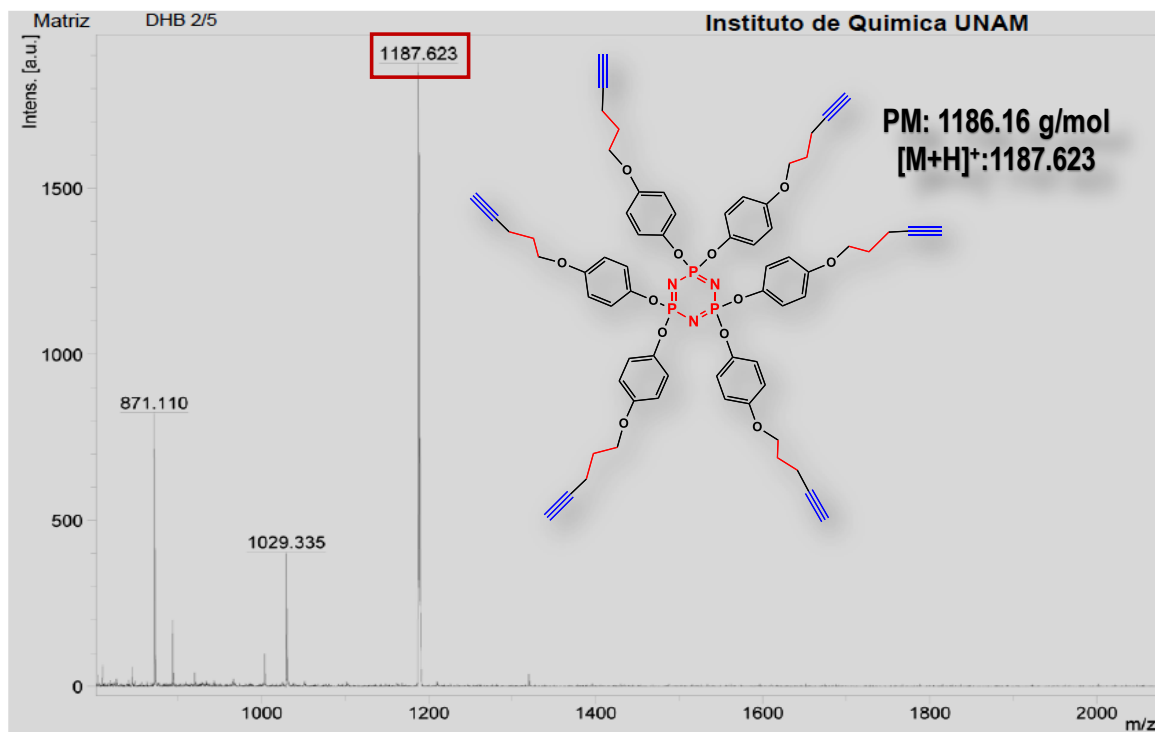


Figura 50. Espectro de masas por MALDI-TOF del intermediario D.

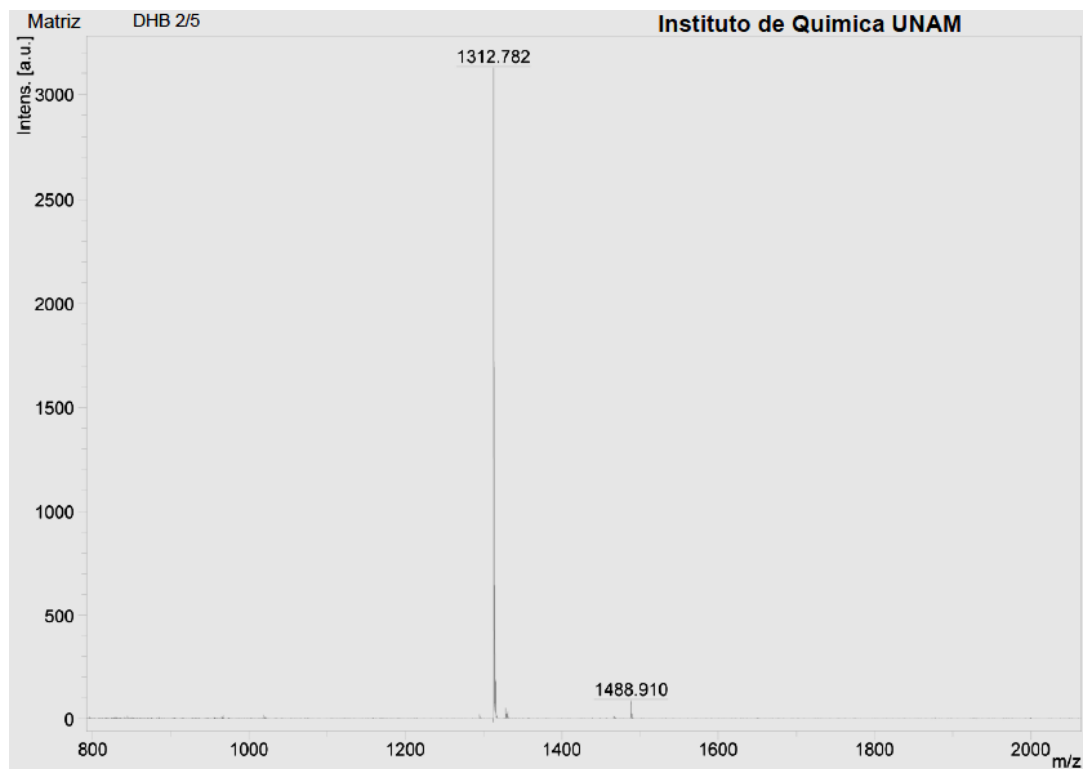


Figura 51. Espectro de masas por MALDI-TOF del intermediario E.

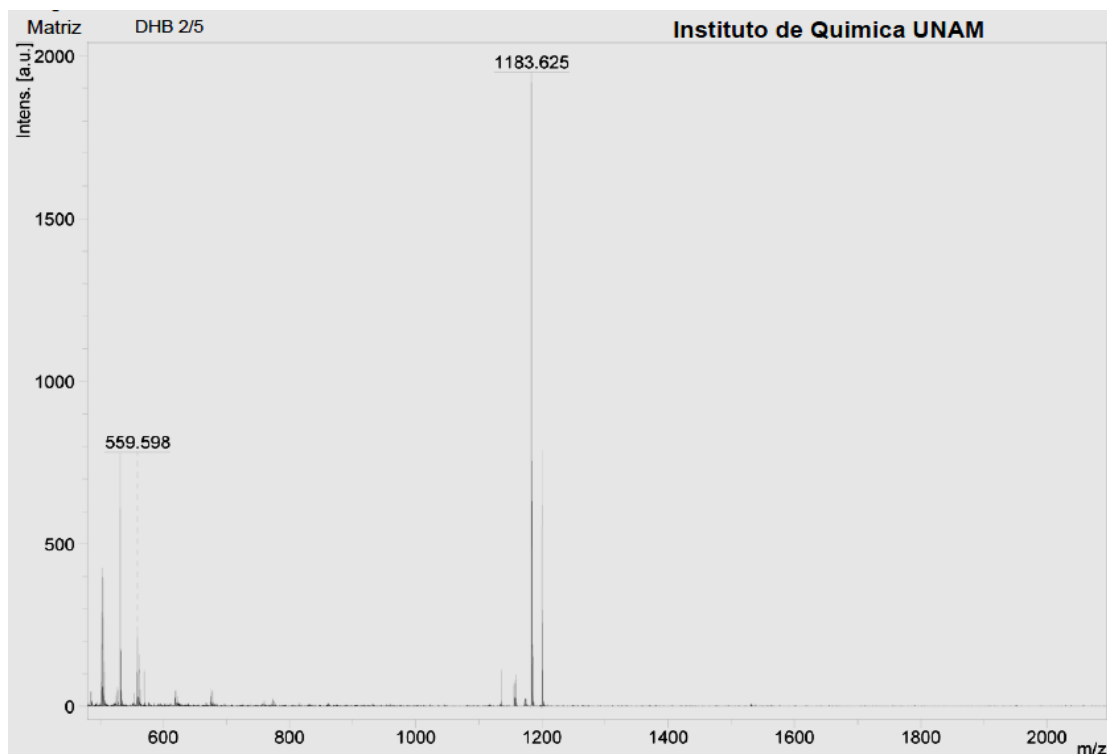


Figura 52. Espectro de masas por MALDI-TOF del intermediario F.

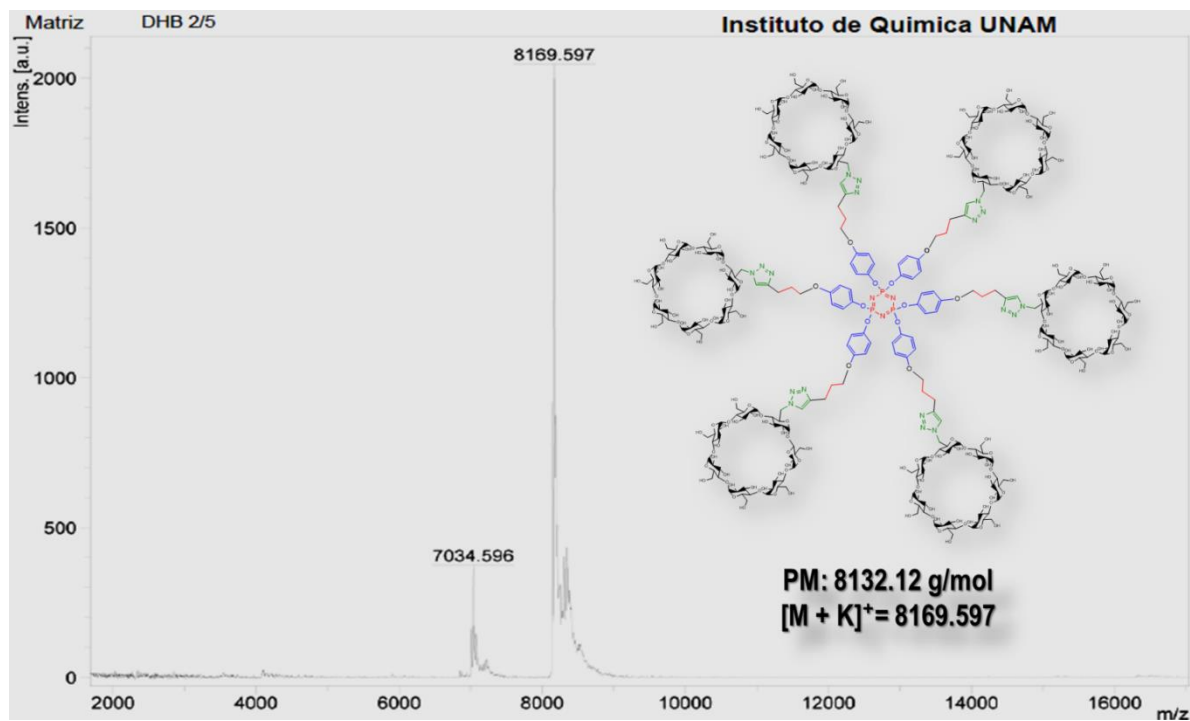


Figura 55. Espectro de masas por MALDI-TOF del compuesto dendrítico G.

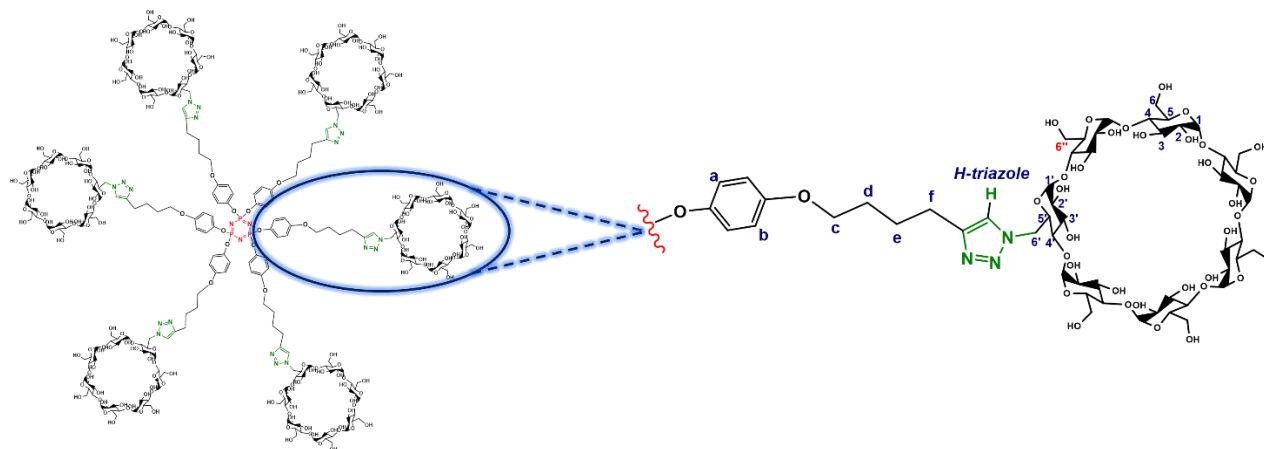


Figura 56. Asignación de los hidrógenos en RMN del compuesto dendrítico H.

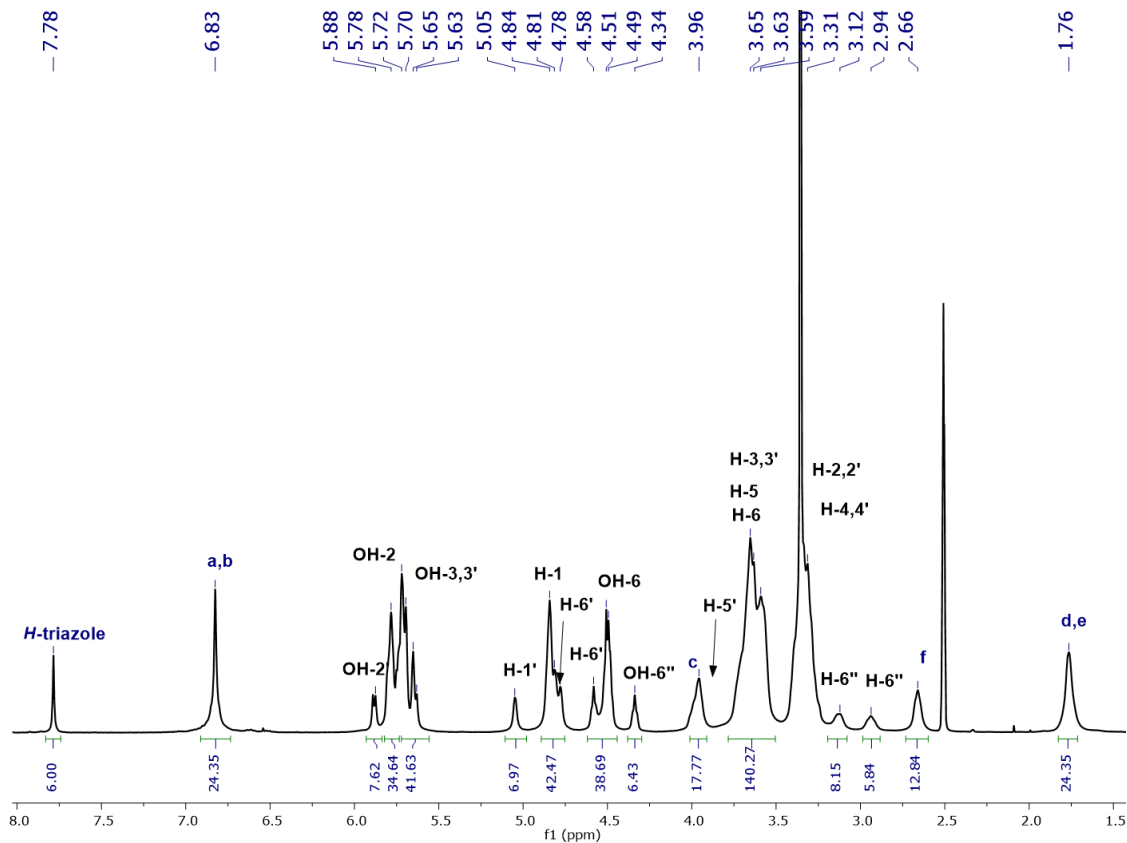


Figura 57. Espectro de ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$) a 400 MHz del compuesto dendrítico H.

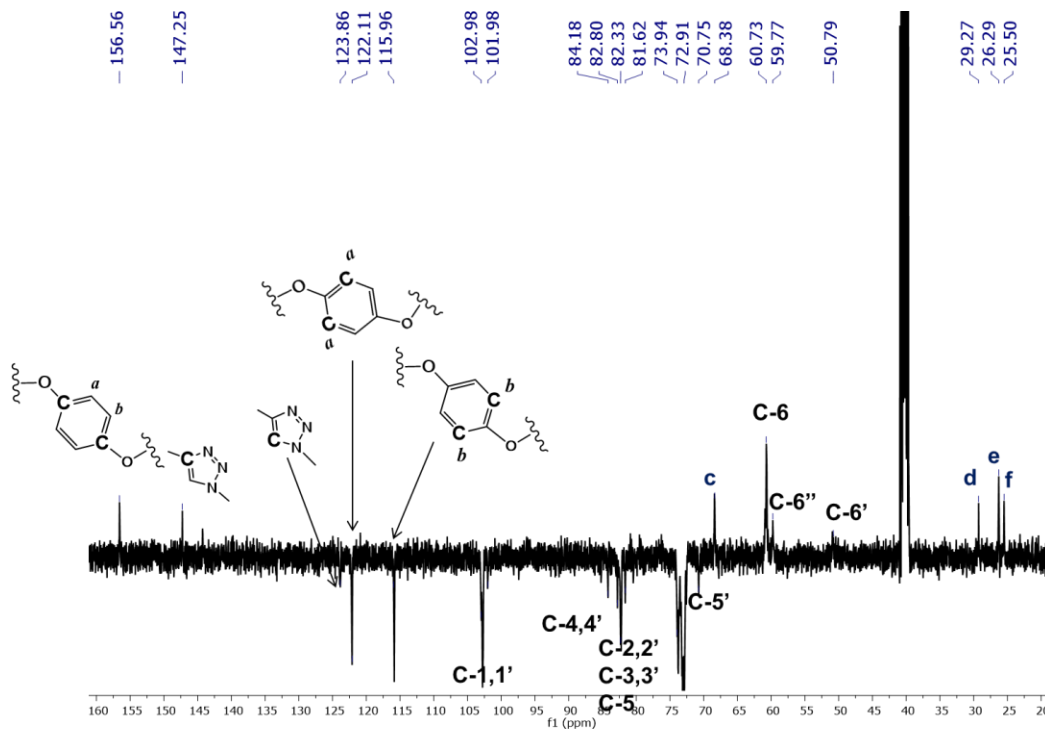


Figura 58. Espectro de ^{13}C RMN ($\text{DMSO}-d_6$) a 100 MHz del compuesto dendrítico H.

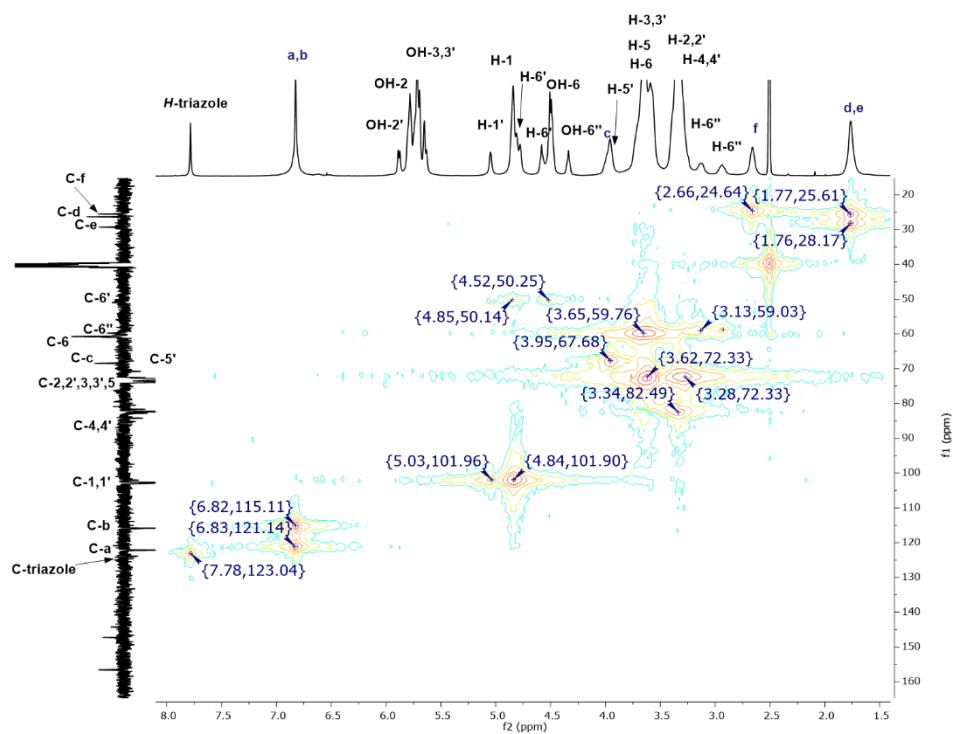


Figura 59. Espectro de RMN 2D HMQC (DMSO- d_6) del compuesto dendrítico H.

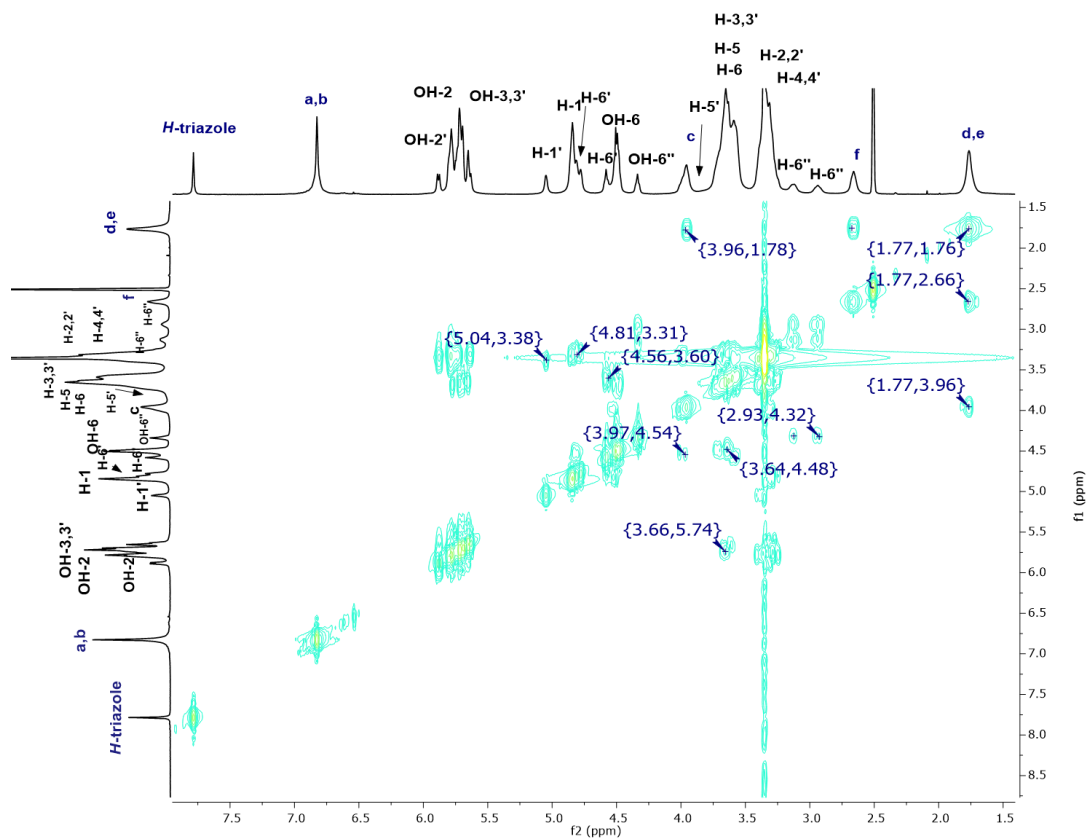


Figura 60. Espectro de RMN 2D COSY (DMSO- d_6) del compuesto dendrítico H.

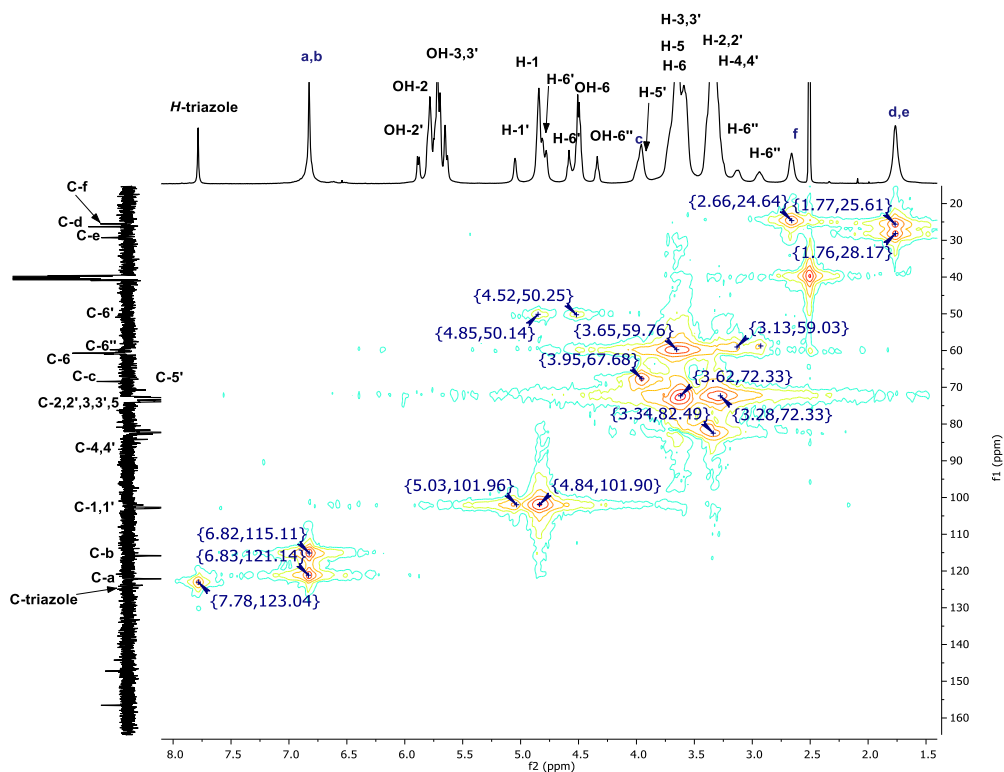


Figura 61. Espectro de RMN 2D NOESY (DMSO- d_6) del compuesto dendrítico H.

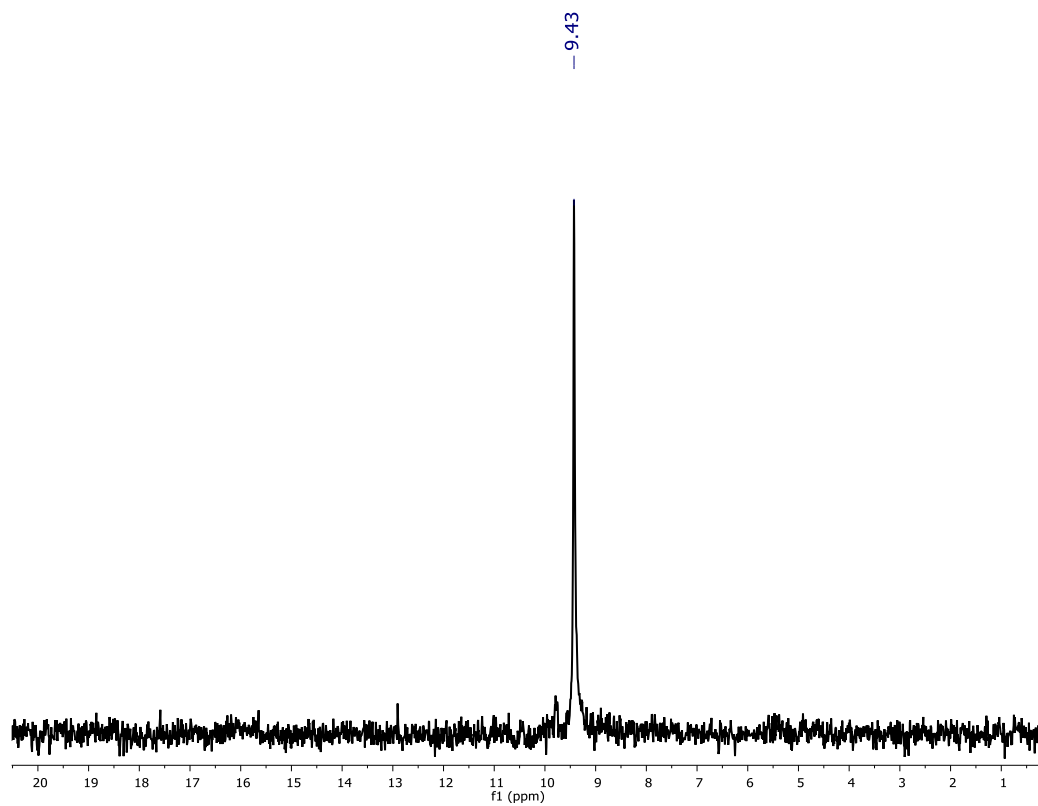


Figura 62. Espectro de ^{31}P RMN (DMSO- d_6) del compuesto dendrítico H.

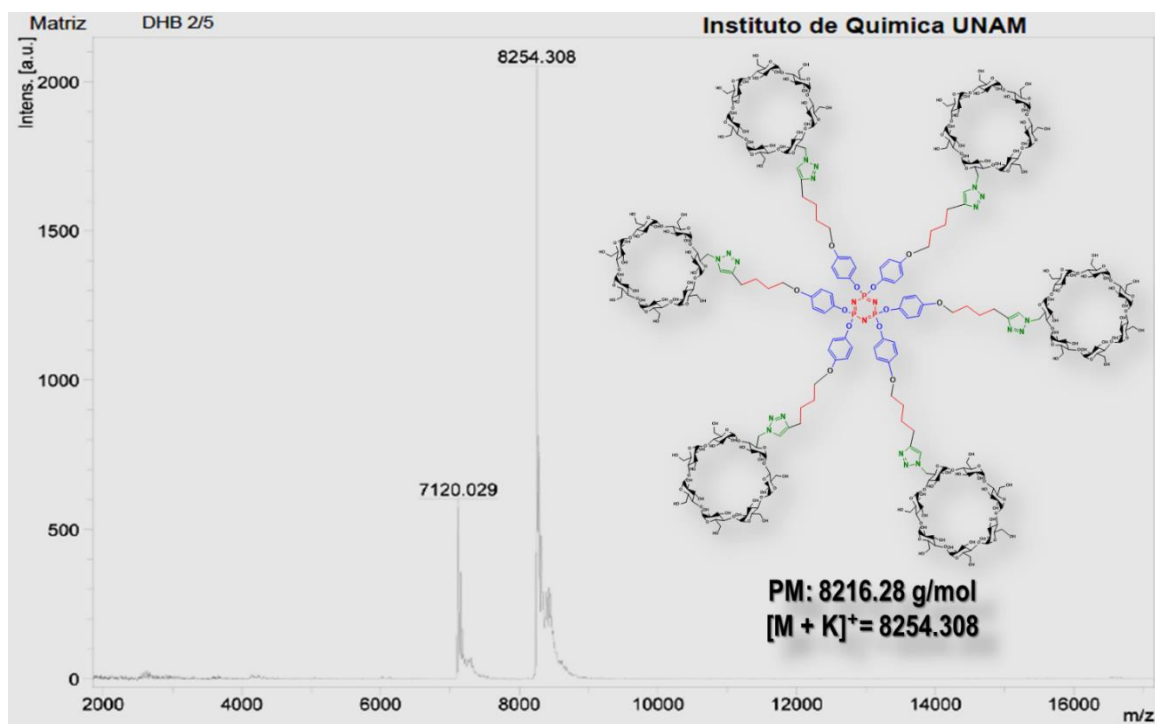


Figura 63. Espectro de masas por MALDI-TOF del compuesto dendrítico H.

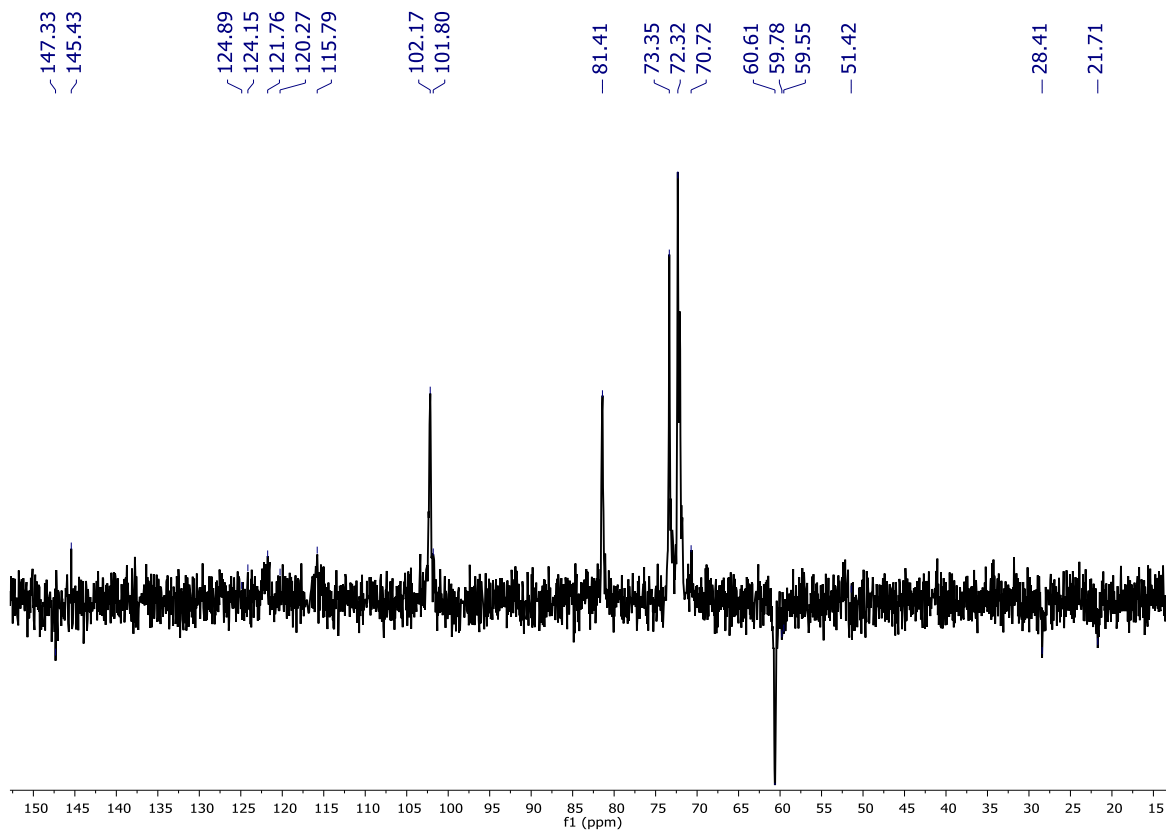


Figura 64. Espectro de DEPTQ RMN (D₂O) a 100 MHz del compuesto dendrítico G.

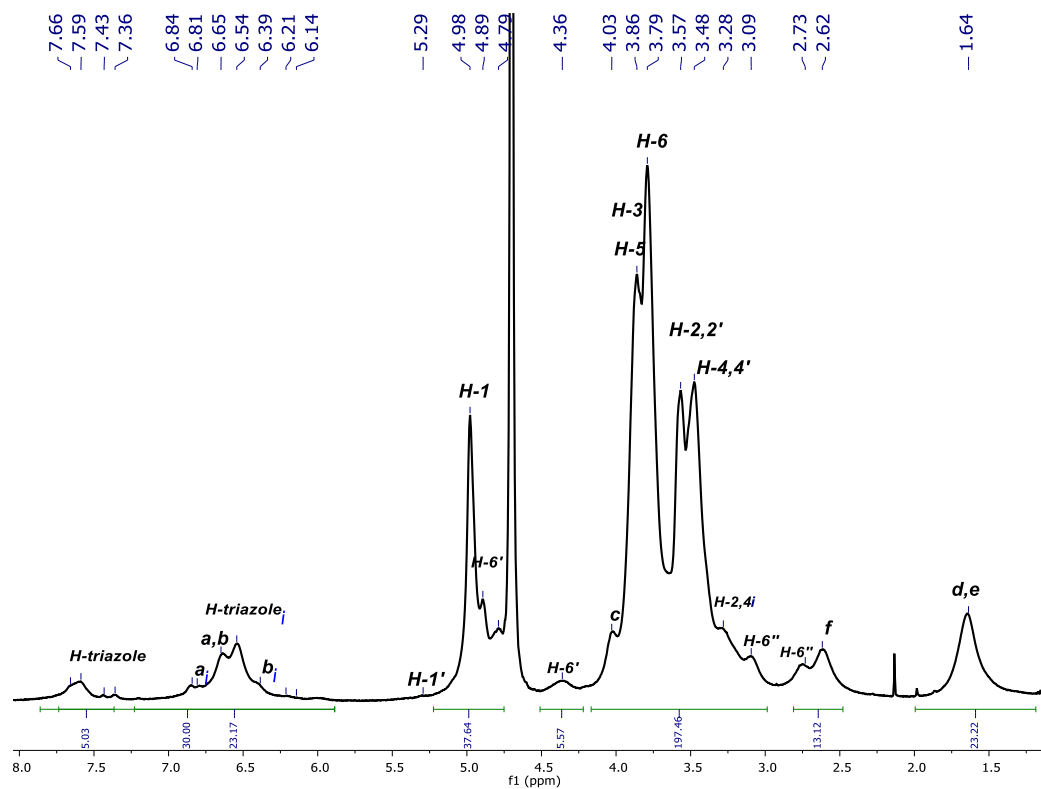


Figura 65. Espectro de ^1H RMN (D_2O) a 400 MHz del compuesto dendrítico H.

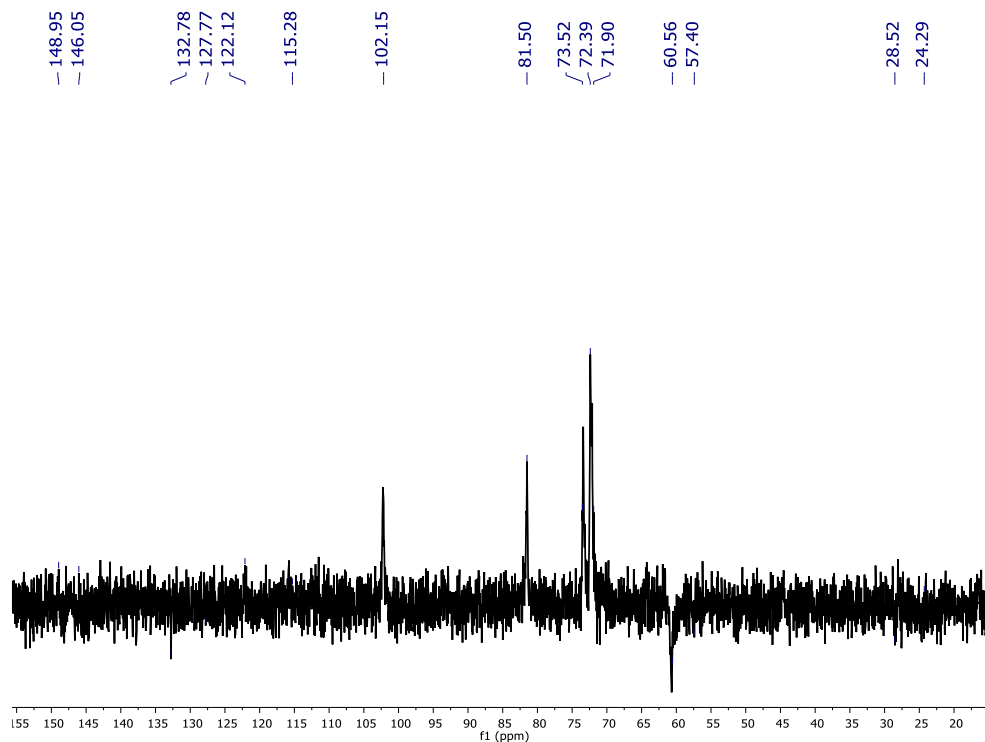


Figura 66. Espectro de DEPTQ RMN (D_2O) a 100 MHz del compuesto dendrítico H.

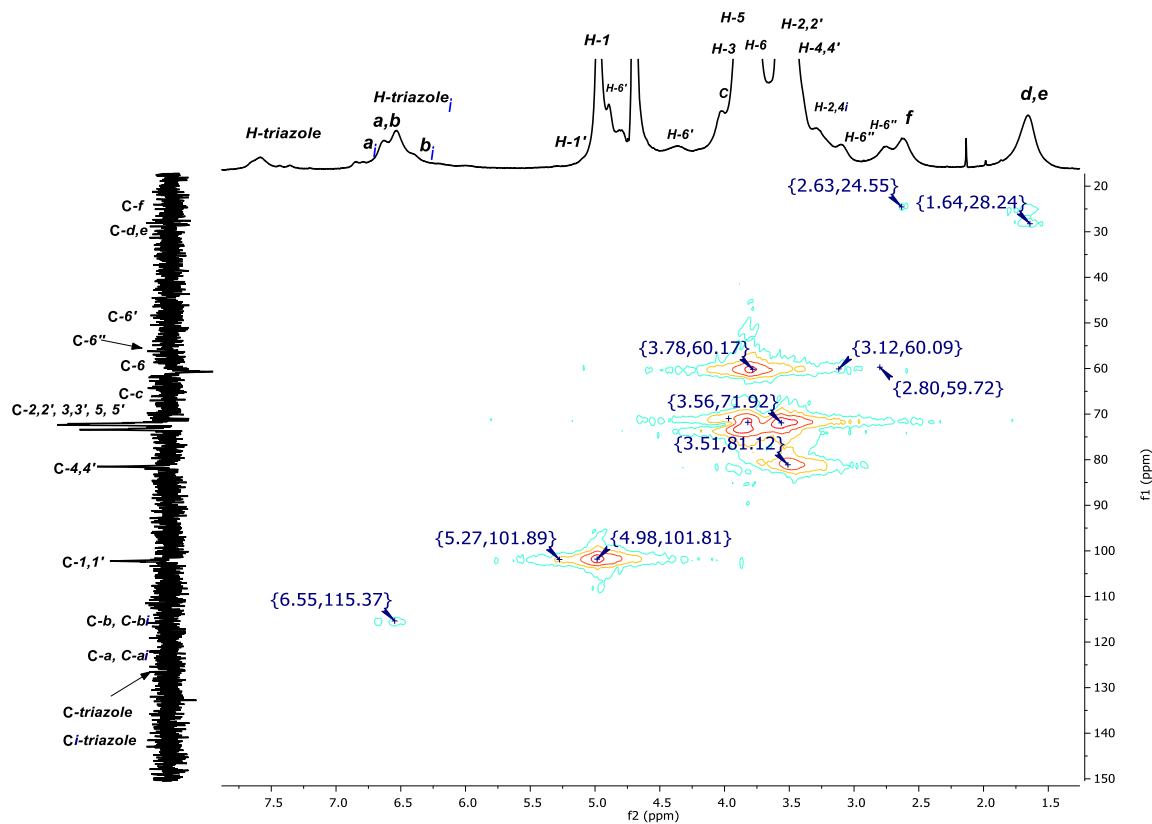


Figura 67. Espectro de RMN 2D HMQC (D₂O) del compuesto dendrítico H.

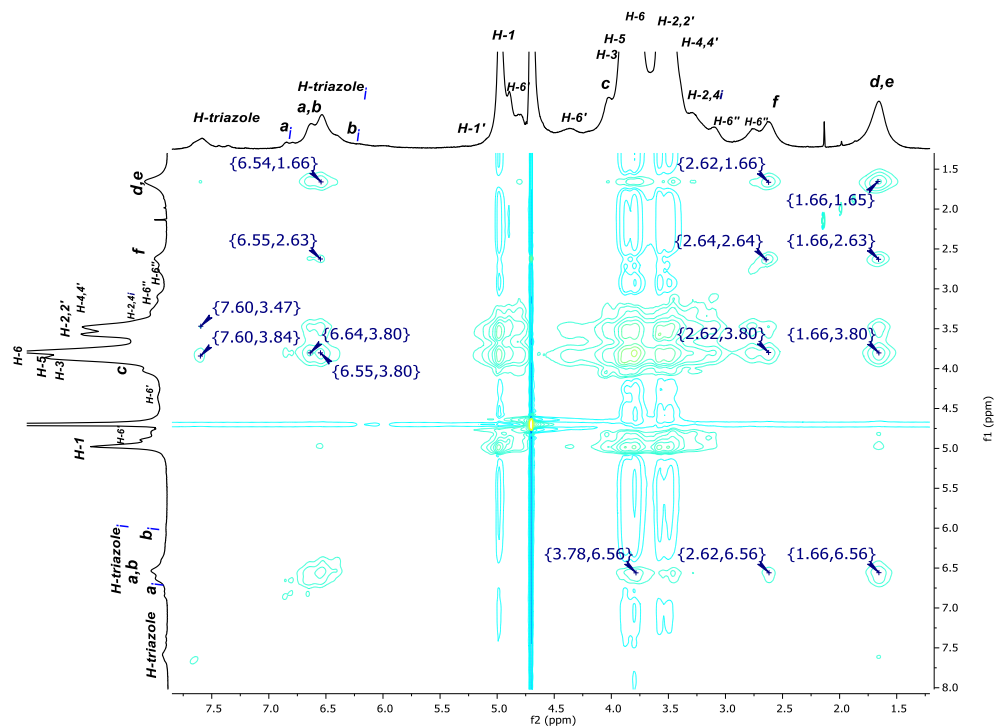


Figura 68. Espectro de RMN 2D NOESY (D₂O) del compuesto dendrítico H.

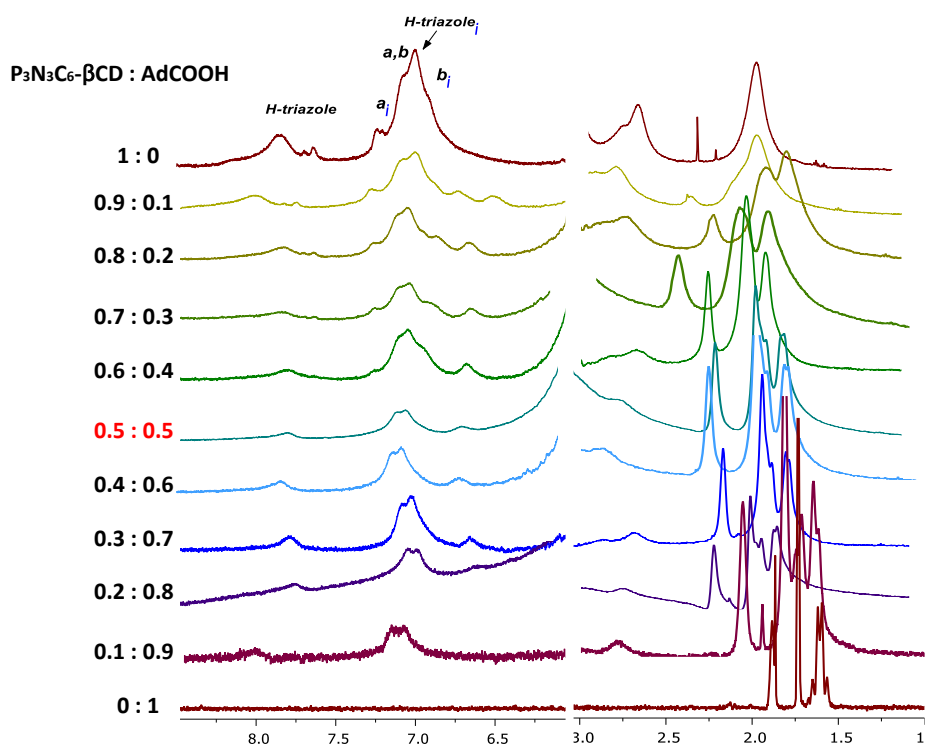


Figura 69. Titulación por RMN ^1H del compuesto dendrítico H.

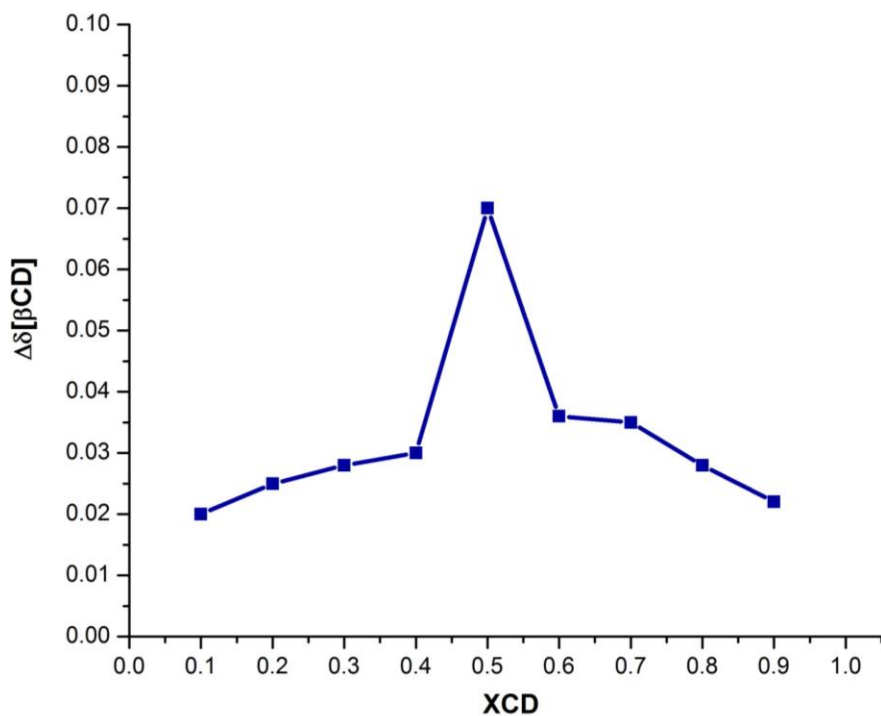


Figura 70. Gráfica de Job para el CI del compuesto dendrítico H/AdCOOH. $X_{\text{CD}} = \frac{[\beta\text{CD}]}{([\beta\text{CD}] + [\text{AdCOOH}])}$, $\Delta\delta$ = diferencia de desplazamiento del hidrógeno de la βCD .

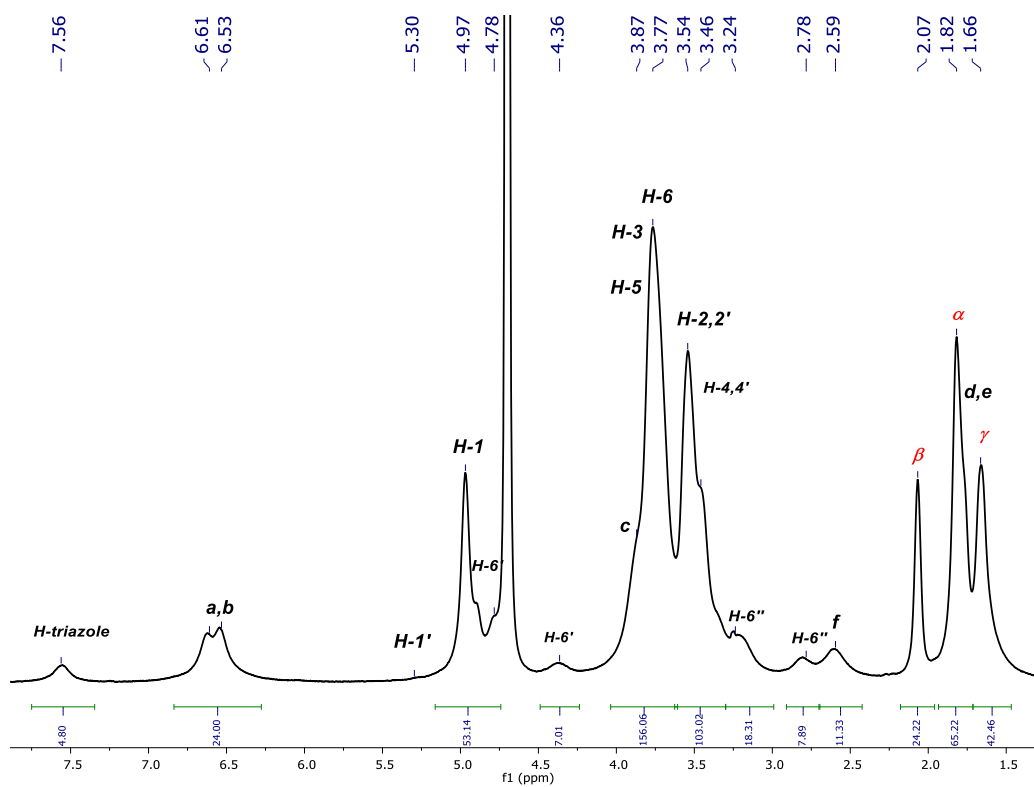


Figura 71. Espectro de ^1H RMN (D_2O) a 400 MHz del CI del compuesto dendrítico **H/AdCOOH**.

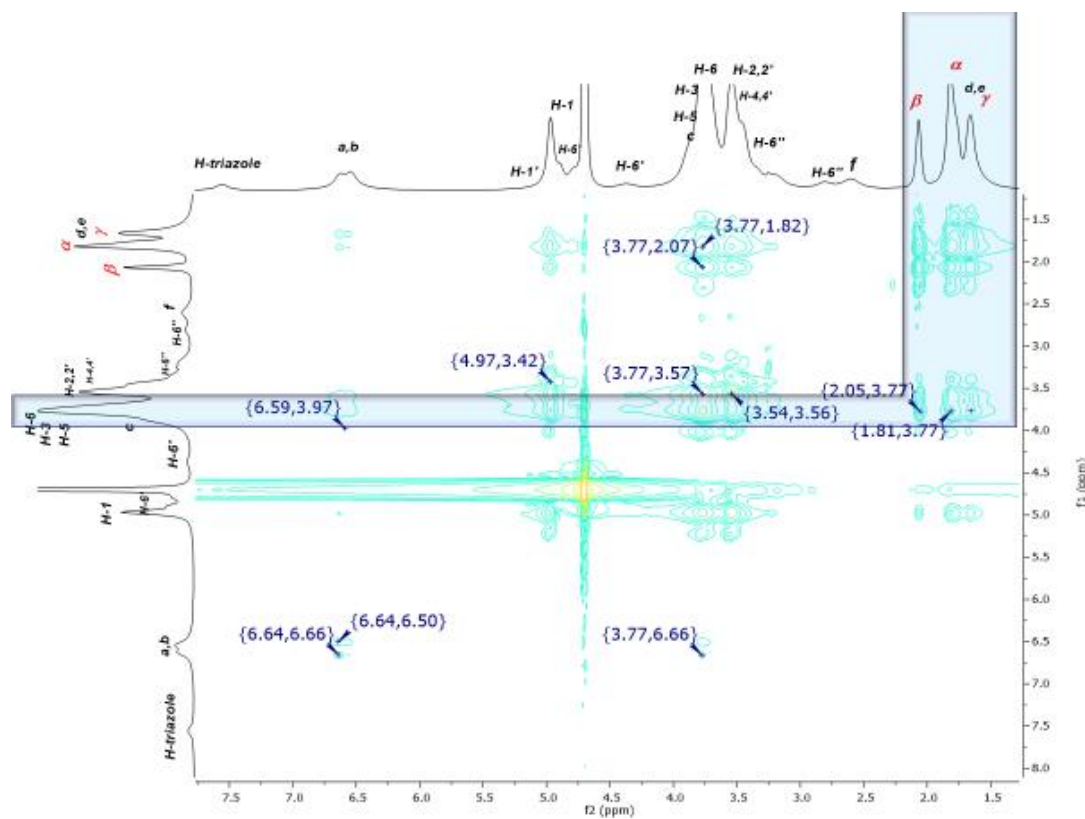


Figura 72. Espectro de RMN 2D NOESY (D_2O) del CI del compuesto dendrítico **H/AdCOOH**.

Article

First Class of Phosphorus Dendritic Compounds Containing β -Cyclodextrin Units in the Periphery Prepared by CuAAC

Kendra Sorroza-Martínez ¹, Israel González-Méndez ^{1,*}, Mireille Vonlanthen ¹, Kathleen I. Moineau-Chane Ching ^{2,3} , Anne-Marie Caminade ^{2,3} , Javier Illescas ⁴  and Ernesto Rivera ^{1,*}

¹ Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Mexico City CP 04510, Mexico; kendraivn17@gmail.com (K.S.-M.); mireille.vonlanthen@gmail.com (M.V.)

² CNRS, LCC (Laboratoire de Chimie de Coordination), 205 route de Narbonne, BP 44099, F-31077 Toulouse, CEDEX 4, France; kathleen.chane@lcc-toulouse.fr (K.I.M.-C.C.); anne-marie.caminade@lcc-toulouse.fr (A.-M.C.)

³ LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, 31077 Toulouse, France

⁴ Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Toluca, Avenida Tecnológico S/N Col. Agrícola Bellavista, Metepec CP 52140, Mexico; fillescasm@toluca.tecnm.mx

* Correspondence: israelgonzalezme@gmail.com (I.G.-M.); riverage@unam.mx (E.R.); Tel.: +52-55-56-22-47-33 (E.R.)

Academic Editor: Jørn Bolstad Christensen

Received: 21 July 2020; Accepted: 28 August 2020; Published: 4 September 2020



Abstract: A new class of phosphorus dendritic compounds (PDCs) having a cyclotriphosphazene (P_3N_3) core and decorated with six β -cyclodextrin (β CD) units, named P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n- β CD]₆, where $n = 3$ or 4 was designed, and the synthesis was performed using copper (I) catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC). To obtain the complete substitution of the P_3N_3 , two linkers consisting of an aromatic ring and an aliphatic chain of two different lengths were assessed. We found that, with both linkers, the total modification of the periphery was achieved. The two new obtained dendritic compounds presented a considerably high water solubility (>1 g/mL). The compounds comprised in this new class of PDCs are potential drug carrier candidates, since the conjugation of the β CD units to the P_3N_3 core through the primary face will not only serve as surface cover but, also, provide them the faculty to encapsulate various drugs inside the β CDs cavities.

Keywords: phosphorus dendritic compounds; β -cyclodextrin; CuAAC reaction

1. Introduction

The use of nanomedicine confers a substantial potentiality for drug delivery and targeted release, as it increases the safety by reducing toxic effects in nontargeted organs and tissues [1–3]. In recent years, many researchers have focused on the development of dendrimers, since they have distinctive properties, such as monodispersity, a large number of easily available functional groups on the surface and an extraordinary capability to encapsulate host molecules within their hydrophobic environment, making them ideal nanocarriers for the targeted delivery (with or without ligand) of therapeutic and diagnostic agents [4–6].

Dendrimers are well-defined hyper-branched three-dimensional macromolecules. Structurally, dendrimers have a core from which branches (or arms) are derived and end with multiple peripheral groups that determine their macroscopic properties [7]. Dendrimers can be constructed starting from the core towards the periphery (divergent synthesis) or through a top-down approach, from the

appropriate outer residues (convergent synthesis) [8]. It is clear that, when designing a new dendrimer, the chemical composition of the core, branches and peripheral groups will have crucial implications for enhancing possible biomedical applications, either by themselves or as nanocarriers [9].

Among the diverse existing types of dendrimers, phosphorus containing dendrimers, (i.e., dendrimers having phosphorus derivatives in their structure) play a special role in applications such as drug delivery, gene therapy and biomaterials, among others [10,11].

In 1994, Caminade et al. described the first method for the synthesis of high-generation phosphorus dendrimers (PDs), which is still the most widely used, since it allows numerous changes at the level of the core, branches or terminal groups, conferring biocompatible functions for the use in biological applications [12]. In this way, PD synthesis can be started from different cores; however, hexachlorocyclotriphosphazene ($P_3N_3Cl_6$) is the most used core, since it provides twice the number of final groups, compared with thiophosphoryl chloride ($P(S)Cl_3$) [10]. Using the $P_3N_3Cl_6$ core, modifications to the terminal groups of the PDs can be achieved with different molecules in order to improve the biocompatible properties. One of the strategies used is the conjugation with different types of carbohydrates to improve the aqueous solubility and correlate the structures with the impacts on biological behaviors [13,14]. For instance, the construction of PDs with mannose residues in its periphery was employed as a strategy for the treatment of lung inflammation [15]. Furthermore, PDs conjugated with mannopyranoside have been used as multivalent carbohydrate protein-binding recognition probes [16]. Finally, PDs were used as noncovalent carriers of aminolactitol carbohydrate for treatment against the HIV virus [17].

With the focus of developing carbohydrate-conjugated dendrimers, diverse modifications of poly(amidoamines) (PAMAM) dendrimers with cyclodextrin molecules (CDs) have been reported for multiple applications [18–21]; however, this strategy has not yet been reported for PDs. CDs are cyclic oligosaccharides, composed of six or more glucopyranose units linked by α (1-4)-glucosidic bonds. Typical native CDs contain six, seven or eight glucose units and are named α -, β - and γ -, respectively. Due to the lack of free rotations between glucose units, CDs present a truncated cone shape and a hydrophobic internal cavity. β -cyclodextrin (β CD) is the most studied and frequently used CD, due to its low cost, availability and ability to encapsulate a wide range of molecules in its internal cavity. The variable reactivity of the hydroxyl groups and the remarkable encapsulation properties that can modify and/or improve the physical, chemical and biological characteristics of host molecules make it the perfect candidate to be used as building blocks in the construction of drug delivery systems [22–24].

Synthesis mediated by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) to produce 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles has been demonstrated to be effective in the design of new dendrimers. CuAAC coupling confers high specificity, mild reaction conditions and quantitative synthetic yields [25]. The physicochemical properties of the triazole ring are particularly favorable when added to structures with biological applications, since triazole units act as rigid bonds. Unlike amides, the triazole ring cannot be hydrolytically cleaved, oxidized or reduced [26].

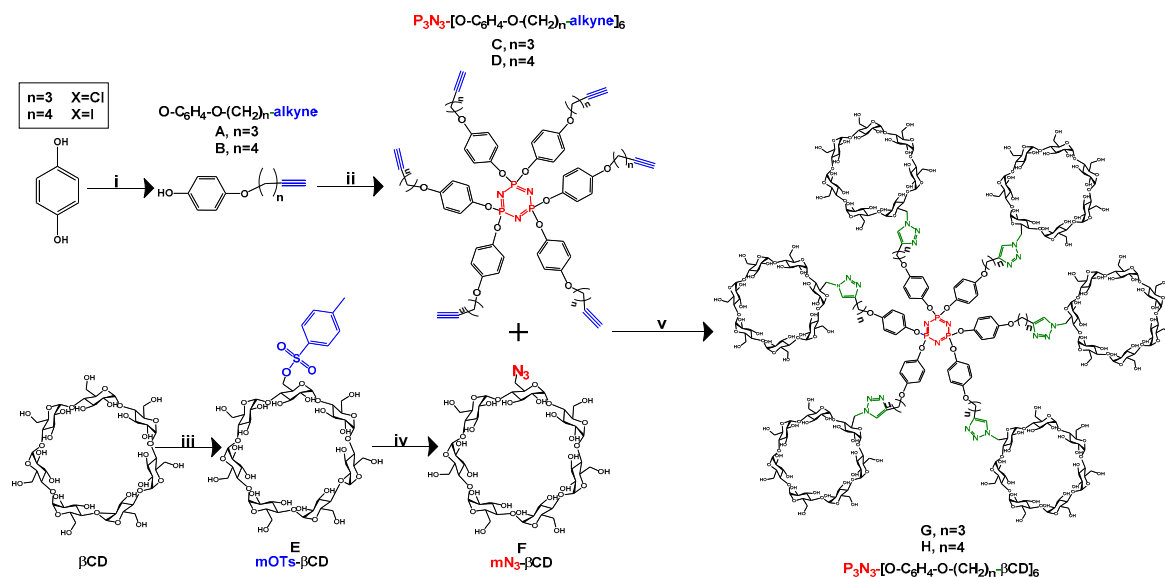
For all these reasons, in this work, we propose the design, synthesis and characterization of a first class of phosphorus dendritic compounds (PDCs) decorated with β CD units, using aromatic rings and aliphatic chains as spacers $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ ($n = 3$ or 4). We selected P_3N_3 as the core, and in the first step, alkyne groups were added to the periphery. Finally, the grafting of β CD units was carried out by the CuAAC reaction. The grafting of β CD units on its primary side will allow the secondary face to be available for the formation of inclusion complexes, so that these new PDCs are potential candidates as drug nanocarriers and may have applications in nanomedicine.

2. Results and Discussion

2.1. Synthesis

The synthetic route of intermediates $HO-C_6H_4-O-(CH_2)_n$ -alkyne (where $n = 3$ or 4) is shown in Scheme 1. The intermediates **A** and **B** were prepared via a Williamson etherification reaction between

the hydroquinone and the respective *X*-alkynes (*X* = Cl for *n* = 3 and I for *n* = 4), using K_2CO_3 as a base and anhydrous *N,N*-dimethylformamide (DMF) as the solvent at 72 °C. Mono and difunctionalized products were obtained, and they could be separated by column chromatography. Subsequently, the fraction corresponding to the monofunctionalized product was recrystallized in a cold/hot hexane to give the compounds **A** and **B** [27].



Scheme 1. Synthesis of $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-βCD]_6$ (*n* = 3 or 4) phosphorus dendritic compounds (PDCs). Conditions: (i) K_2CO_3 , *X*-alkyne, *N,N*-dimethylformamide (DMF) anhydrous, 72 °C, 36 h. (ii) (**A**,**B**), Cs_2CO_3 , $P_3N_3Cl_6$, tetrahydrofuran anhydrous (THF) anhydrous, 7 days, room temperature (RT). (iii) $Ts_2O/NaOH, H_2O$, 2 h, RT. (iv) NaN_3 , DMF anhydrous, 80 °C, 48 h. (v) $mN_3-βCD$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, H_2Asc , dimethylsulfoxide (DMSO): H_2O (7:1), 80 °C, 7 days.

The synthetic route of intermediates $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-alkyne]_6$ (*n* = 3 or 4) **C** and **D** is shown in Scheme 1. The preparation of the intermediates was achieved, as previously reported in the literature but using phenols with a different substitution pattern [28]. The reaction proceeded through a substitution reaction of the Cl atoms attached to the P_3N_3 core; this substitution was carried out in basic and anhydrous medium using intermediates **A** and **B** to obtain compounds **C** and **D**, respectively.

The next step in the synthetic route was the formation of mOTs-βCD (**E**), followed by $mN_3-βCD$ (**F**), which is shown in Scheme 1. For the synthesis of mOTs-βCD, the most efficient technique reported in the literature was employed to modify a single position of the native βCD [29], with minimal differences in the purification of the final product. It is worth noticing that this synthetic step was crucial in the design of our PDCs. In particular, the βCD tosylation method provided high yields compared to other previously reported methods [30,31]. Then, the tosyl group of compound **E** was replaced by an azide group through a nucleophilic substitution reaction to give compound **F** [32].

Once the necessary intermediates, alkynes ($P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-alkyne]_6$) and azide ($mN_3-βCD$) were obtained, the CuAAC reaction was carried out, as shown in Scheme 1. According to the design of these novel PDCs, we used two linkers with different lengths of the aliphatic chain to assess whether this factor had an influence on the complete functionalization of all positions of the P_3N_3 core. To carry out the CuAAC reaction, we used a Cu(I) catalyst synthesized in situ, with $CuSO_4$ as the copper source and H_2Asc as a reducing agent, using dimethylsulfoxide (DMSO) as the ideal solvent, since it solubilizes the azide and the respective alkynes. To ensure the complete functionalization of the six core groups of P_3N_3 , an excess of $mN_3-βCD$ was added. The final PDCs **G** and **H** were purified by size exclusion chromatography, using water as the eluent, and were obtained in high purity and with yields of >50%. We found that the length of the linker did not affect the complete functionalization

of P_3N_3 with the β CD units, since all six positions of the P_3N_3 core were functionalized with both proposed linkers.

2.2. Characterization

The full characterization of all the synthetic intermediates and final compounds was carried out. Regarding intermediates **A** and **B**, in the 1H -NMR spectra (Figures S1 and S4 are available in Supplementary Materials (SM)) in $DMSO-d_6$, it is possible to observe the signal corresponding to the proton of the alkyne group at 2.80 and 2.78 ppm, respectively. Moreover, the signal of the phenol proton appeared between 8.90 and 8.88 ppm. The structure of intermediates **A** and **B** was also confirmed by the ^{13}C -NMR spectra (Figures S2 and S5 are available in SM), in which the signals corresponding to the carbons of the alkyne group appeared at 84.56 and 72.34 ppm and at 83.42 and 72.19 ppm, respectively. The structure of these intermediates was also confirmed by mass spectrometry using the Direct Analysis in Real Time (DART) technique (Figures S3 and S6 are available in SM). The molecular ions appeared at 177 m/z (**A**) and 191 m/z (**B**), which correspond to the molecular weights of the proposed compounds.

The presence of phosphorus in the core allowed simple monitoring by ^{31}P -NMR; furthermore, this allowed to verify the completion of the reactions in each synthesis step, as well as the integrity of the entire structure [33]. For the characterization of the intermediates **C** and **D**, a single signal corresponding to the complete functionalization was observed in the ^{31}P -NMR spectrum (Figures S9 and S13 are available in SM). Furthermore, the complete functionalization of the phosphorous core was confirmed with the rest of the characterization. In the 1H -NMR spectrum (Figures S7 and S11 are available in SM), the disappearance of the signal corresponding to the phenol proton present in intermediates **A** and **B**, as mentioned above, is clearly observed due to its grafting on P_3N_3 . The structure of **C** and **D** was also confirmed by ^{13}C -NMR (Figures S8 and S12 are available in SM) and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Figures S10 and S14 ESI), where the molecular ions appeared at 1187.623 m/z and 1271.794 m/z , which correspond to the molecular weights of compounds **C** and **D**, respectively. The structures of the compounds $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-alkyne]_6$ (where $n = 3$ or 4) were confirmed by all the characterization data.

The full characterization of two new $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ (**G**) and (**H**) PDCs using NMR techniques (1H -, ^{13}C -NMR and 2D NMR Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation (HMQC) and Homonuclear Correlation Spectroscopy (COSY)) (Figures S15–S17 and S19–S22 are available in SM) was carried out in $DMSO-d_6$. The classical signals of the linkers and native β CD units are in agreement with those reported in previous works [17,26]. Moreover, it was possible to observe the differentiation for some protons of the modified glucopyranose unit of the β CD (see Figure 1). The signals of protons H-1', H-5' and, particularly, H-6' appeared at a lower field than those of H-1, H-5 and H-6 of the nonfunctionalized subunits, due to the change in their chemical environment after the CuAAC reaction. In the same way, it was possible to identify the H-6'' diastereotopic protons, corresponding to one $-CH_2-OH$ fragment contiguous to the substituted one at 3.12 and 2.94 ppm (see HMQC in Figure 2). Therefore, H-6'' and the adjacent OH-6'' on the primary face (around 4.33 ppm) appeared significantly upfield-shifted in comparison to their respective analogs H-6 and OH-6 because of the change in chemical environment due to the neighboring substitution. In this step, ^{31}P -NMR was used to assess the completion of the reactions and to assure the complete functionalization of the six positions of P_3N_3 . This was confirmed by the appearance of a single signal (at 9.31 ppm) in the ^{31}P -NMR spectrum of $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ (where $n = 3$, compound **G**). This signal exhibited an upfield shift compared to the signal corresponding to $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-alkyne]_6$ (where $n = 3$, compound **C**) (at 9.93 ppm), because P_3N_3 is protected by β CD molecules (Figure 3). The same behavior was observed in the ^{31}P -NMR spectrum (Figure S24 is available in SM) of $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ (where $n = 4$, compound **H**). Finally, the structures of these new dendrimers were corroborated by MALDI-TOF mass spectrometry (Figures S18 and S23 are available in SM). The molecular ions appeared mainly at 8169.59 m/z and at 8254.30 m/z , corresponding to the molecular weights of the PDCs **G**

and H, respectively. Furthermore, the signals at 7034.596 m/z and 7120.029 m/z for compounds G and H, respectively, correspond to partial ionization, since complete ionization of the molecule is complex when using this technique. This difficulty has been previously reported for other phosphorus dendrimers [34].

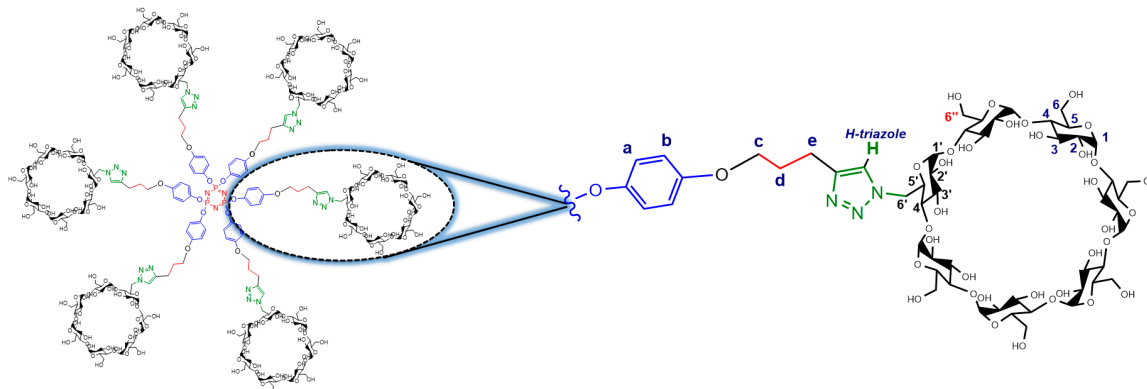


Figure 1. Assignment of the protons in the NMR of $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_3-\beta CD]_6$ dendritic compounds (PDCs).

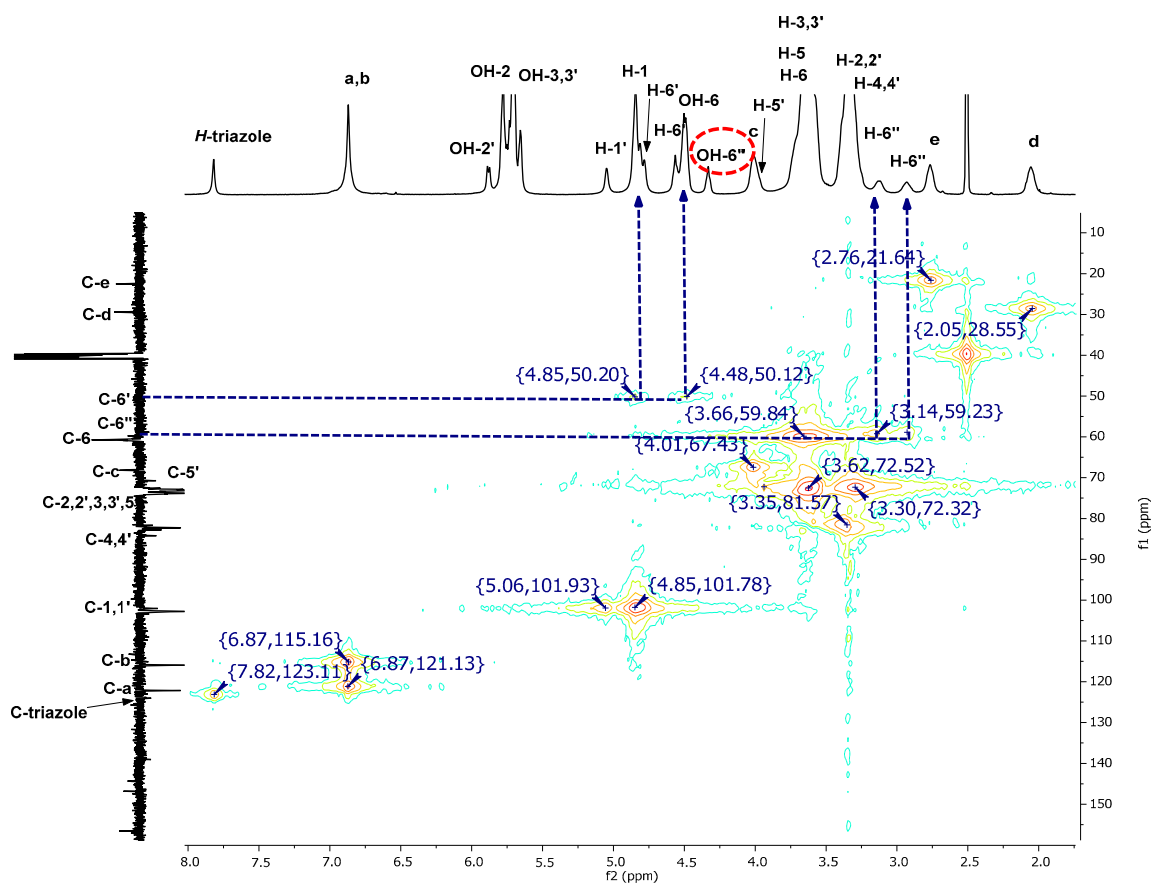


Figure 2. 2D NMR Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation (HMQC) spectra of $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_3-\beta CD]_6$ PDCs in $DMSO-d_6$.

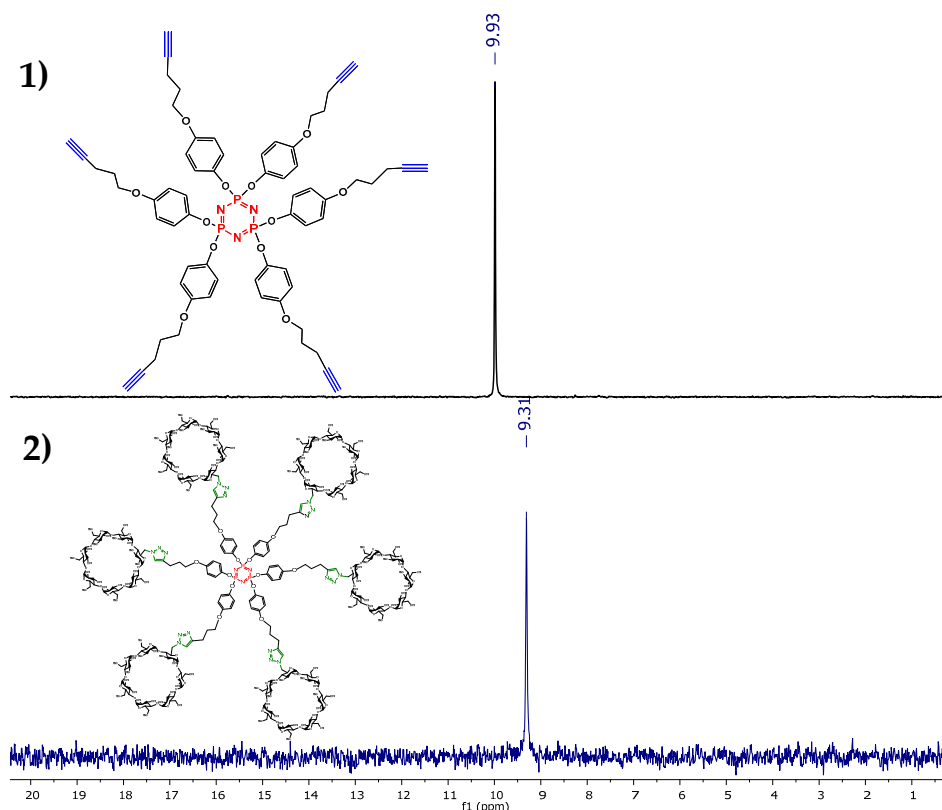


Figure 3. Split of ^{31}P -NMR in $\text{DMSO-}d_6$ of (1) $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-alkyne]}_6$ (compound C) and (2) $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-}\beta\text{CD]}_6$ (PDC G).

2.3. Determination of Water Solubility for $\text{P}_3\text{N}_3\text{-(O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-}\beta\text{CD)}_6$ PDCs

Among all the special properties of dendrimers, their high solubility makes an important difference compared to linear polymers. Differences in solubility between hyper-branched and linear polymers can be of several orders of magnitude, up to 10^6 times, in some cases [35]. Among all the solvents used to dissolve dendrimers, water is especially important when considering biological applications. In recent years, the importance of water-soluble phosphorous-containing dendrimers has increased. In most cases, the water solubility of these compounds was dependent mainly on the reactivity of terminal groups in the periphery [36]. Therefore, the determination of the water solubility of our new PDCs was carried out, according to a method previously reported in the literature [37]. It was found that, for both PDCs, the solubility in water was $>1\text{g/mL}$. These results represent a considerably higher solubility compared to the solubility of native βCD (18.5 mg/mL) and of other commercial βCD derivatives, such as sulfobutylether- βCD ($>500\text{ mg/mL}$), *O*-methyl- βCD ($>500\text{ mg/mL}$) and 2-hydroxypropyl- βCD ($>600\text{ mg/mL}$) [38]. Water-soluble phosphorous-containing dendrimers with cationic or anionic end groups have been reported; nevertheless, their water solubility was dependent on the pH [17,35]. On the contrary, the advantage of our new $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-}\beta\text{CD]}_6$ PDCs ($n = 3$ and 4) is that their solubility in water is conferred by the βCD units in standard conditions.

3. Materials and Methods

3.1. General Notes

All starting materials were commercially available reagent grade and were used without any further purification. Hexachlorocyclotriphosphazene ($\text{P}_3\text{N}_3\text{Cl}_6$), 5-chloro-1-pentyne, 6-iodo-1-hexyne, hydroquinone, β -cyclodextrin (βCD), *p*-toluenesulfonyl chloride (Cl-Ts), *p*-toluenesulfonic acid (OH-Ts), *N,N*-dimethylformamide anhydrous (DMF), potassium carbonate (K_2CO_3), cesium carbonate (Cs_2CO_3), dimethylsulfoxide (DMSO), ascorbic acid (H_2Asc), Bio-Gel P-10 medium from Bio-Rad (Hercules,

CA, USA), potassium iodide (KI), sodium azide (NaN_3), sodium hydroxide (NaOH), copper sulfate pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), diisopropyl ether, dichloromethane (CH_2Cl_2), ethyl acetate (EtOAc), tetrahydrofuran anhydrous (THF), hexane (HEX), methanol (MeOH), ethanol (EtOH) and acetone (CH_3COCH_3) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.2. Synthetic Procedures

3.2.1. Synthesis of $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-alkyne}$ ($n = 3$ and 4) **A** and **B**

The synthesis of the intermediates **A** and **B** was carried out according to a previously reported procedure, with some modifications [27,28]. A dry hydroquinone solution (24.03 mmol) in DMF (250 mL) was refluxed for 30 min at 72°C , K_2CO_3 (30.04 mmol) was added and the mixture was refluxed for 1 h. To this mixture, alkyne (12.02 mmol) was added dropwise over 2 h. The resulting mixture was refluxed for 36 h, then cooled to 25°C and filtered. The filtrate was evaporated under reduced pressure. The resulting brown oil was dissolved in CH_2Cl_2 (150 mL), and the solution was extracted with water (3×50 mL), the organic phase was dried with anhydrous Na_2SO_4 and the solvent was evaporated. The crude product was composed of a mixture of unreacted hydroquinone, the monofunctionalized and the difunctionalized products, which were separated by column chromatography on silica gel using hexanes:EtOAc (8:2). Once the fraction corresponding to the monofunctionalized product was obtained, it was recrystallized from hot/cold hexane, and the final product was recovered by filtration; the solid was left to dry overnight under vacuum. $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-alkyne}$ was obtained as a beige solid (7.17 mmol, 29%). $\text{HO-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_4\text{-alkyne}$ was obtained as a yellow solid (7.88 mmol, 66%).

HO-C₆H₄-O-(CH₂)₃-alkyne. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 8.90 (s, 1H, PhOH), 6.76 (d, $J = 9$ Hz, 2H, Ha), 6.68 (d, $J = 9$ Hz, 2H, Hb), 3.93 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H, Hc), 2.80 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, C \equiv C-H), 2.31 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H, He), 1.86 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H, Hd); $^{13}\text{C-DEPTQ NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 152.01, 116.50, 116.20, 84.56, 72.34, 67.15, 28.67, 15.29. DART-MS: 177 m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; 178 m/z ($\text{M} + 2\text{H}$) $^+$.

HO-C₆H₄-O-(CH₂)₄-alkyne. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 8.88 (s, 1H, PhOH), 6.75 (d, $J = 9$ Hz, 2H, Ha), 6.67 (d, $J = 9$ Hz, 2H, Hb), 3.88 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H, Hc), 2.78 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, C \equiv C-H), 2.22 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H, Hf), 1.75 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H, Hd), 1.58 (t, $J = 2.4$ Hz, 2H, He); $^{13}\text{C-DEPTQ NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 152.19, 151.88, 116.24, 116.14, 83.42, 72.19, 68.10, 28.75, 25.49, 18.26. DART-MS: 191 m/z (M) $^+$; 192 m/z ($\text{M} + \text{H}$) $^+$.

3.2.2. Synthesis of $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-alkyne]}_6$ ($n = 3$ and 4) **C** and **D**

The synthesis of intermediates **C** and **D** was carried out according to a previously reported procedure, with some modifications [39]. A solution of intermediate **A** or **B** (2.84 mmol) in dry THF (25 mL) was stirred for 20 min. Cs_2CO_3 (5.68 mmol) was added to this solution and stirred for 1 h. Afterwards, $\text{P}_3\text{N}_3\text{Cl}_6$ (0.32 mmol) was added to the reaction mixture, and it was left stirring at room temperature for 7 days, until the reaction was complete, monitored by $^{31}\text{P-NMR}$. The reaction mixture was then centrifuged at 10,000 rpm for 20 min to remove inorganic salts, the supernatant was recovered and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude product contained fully functionalized $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-alkyne]}_6$ and the unreacted monoalkynes, which were separated by column chromatography on silica gel using CH_2Cl_2 as the eluent. Once the fraction corresponding to the functionalized P_3N_3 was obtained, it was recrystallized from cold isopropyl ether. $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-alkyne]}_6$ ($n = 3$ or 4) were obtained as white solids (0.19 mmol, 59% and 0.12 mmol, 52% for **C** and **D**, respectively).

P₃N₃-[O-C₆H₄-O-(CH₂)₃-alkyne]₆. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ ppm): 6.80 (d, $J = 9.2$ Hz, 12H, Ha), 6.76 (d, $J = 9.2$ Hz, 12H, Hb), 4.00 (t, $J = 2.5$ Hz, 12H, Hc), 2.81 (t, $J = 2.41$ Hz, 6H, C \equiv C-H), 2.34 (t, $J = 2.41$ Hz, 12H, He), 1.90 (t, $J = 2.41$ Hz, 12H, Hd); $^{13}\text{C-DEPTQ NMR}$ (101 MHz, $\text{DMSO-}d_6$,

δ ppm): 156.34, 144.23, 122.21, 115.83, 84.36, 72.40, 67.11, 28.56, 15.31; ^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): s, 9.93. MALDI-TOF-MS: 1187.62 m/z (M) $^+$.

P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-alkyne]₆. ^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 6.78 (d, J = 9.2 Hz, 12H, Ha), 6.72 (d, J = 9.2 Hz, 12H, Hb), 3.94 (t, J = 2.5 Hz, 12H, Hc), 2.78 (t, J = 2.41 Hz, 6H, C \equiv C-H), 2.24 (t, J = 2.41 Hz, 12H, Hf), 1.80 (m, 12H, Hd); 1.61 (m, 12H, He); ^{13}C -DEPTQ NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 156.46, 144.19, 122.20, 115.77, 85.01, 72.17, 68.08, 28.64, 25.48, 18.28; ^{31}P -NMR (162 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): s, 10.01. MALDI-TOF-MS: 1271.79 m/z (M + H) $^+$.

3.2.3. Synthesis of 6-*O*-monotosyl- β -cyclodextrin (mOTs- β CD) E

Following the procedure previously reported [29], in a round-bottom flask, *p*-toluenesulfonic acid (0.0101 mol) and *p*-toluenesulfonyl chloride (0.039 mol) were dissolved in 50 mL of CH₂Cl₂ and stirred at room temperature for 12 h. Then, the reaction mixture was filtered, and the filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was recrystallized (3 \times) with cold hexane, and the product (Ts₂O) was allowed to dry under vacuum. Afterwards, in a round-bottom flask, β CD (0.0051 mol) and Ts₂O (0.0076 mol) were dissolved in 150 mL of H₂O. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature; after this time, a 2.5-M aqueous NaOH solution was added. The reaction mixture was stirred for 10 min. Subsequently, the mixture was filtered, and the pH of the filtrate was adjusted to 8 with a saturated solution of ammonium chloride to give a precipitate. The mixture was filtered, and the precipitate was recrystallized (3 \times) in acetone. The product E was obtained as a white solid (0.0021 mol, 42%).

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 7.75 (b, 2H) a, 7.44 (b, 2H) b, 5.83 (d, J = 6.4 Hz, 1H) OH2', 5.78 (b, 6H) OH2, 5.71 (b, 7H) OH3, 4.84 (d, J = 3.9 Hz, 6H) H1, 4.76 (d, J = 3.9 Hz, 1H) H1', 4.50 (m, 6H) OH6, 4.35 (m, 2H) H6'ab, 4.19 (m, 1H) H5', 3.65 (m, 12 H) H6ab, 3.60 (b, 7H) H3, 3.51 (m, 7H) H5, 3.30 (m, 7H) H2, 3.22 (m, 7H) H₄, 2.42 (d, 3H) c. ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 145.25, 133.09, 130.29, 128.03, 102.39, 101.74, 81.95, 81.21, 73.43, 73.16, 72.84, 72.48, 70.17, 69.36, 60.28, 21.62. MALDI-TOF-MS (m/z): 1311.591 (M + Na) $^+$.

3.2.4. Synthesis of 6-*O*-monoazido- β -cyclodextrin (mN₃- β CD) F

Following a previously reported procedure [32], in a round-bottom flask, mOTs- β CD (0.0016 mol), NaN₃ (0.005 mol) and KI (0.0008 mol) were dissolved in 8 mL of anhydrous DMF. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 48 h. After this time, DMF was evaporated under reduced pressure, and the residue was recrystallized in a mixture, H₂O:Acetone (1:1), and allowed to dry under vacuum. The product F was obtained as a white solid (0.0014 mol, 88%).

^1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 5.74 (m, 7H) OH2, 5.67 (m, 6H) OH3, 5.62 (d, J = 2.4 Hz, 1H) OH3', 4.88 (d, J = 3.5 Hz, 1H) H1', 4.83 (m, 6H) H1, 4.48 (m, 6H) OH6, 3.77 (m, 2H) H6', 3.68 (m, 12H) H6, 3.60 (m, 7H) H3, 3.55 (m, 7H) H5, 3.39 (m, 7H) H4, 3.29 (m, 7H) H2. ^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 102.38, 102.04, 83.41, 81.99, 73.50, 73.30, 72.85, 72.67, 72.46, 70.63, 60.30, 51.53. MALDI-TOF-MS (m/z): 1182.764 (M + Na) $^+$.

3.2.5. Synthesis of P₃N₃-[O-C₆H₄-O-(CH₂)_{*n*}- β CD]₆ PDCs (n = 3 or 4) G and H

P₃N₃-(O-C₆H₄-O-(CH₂)_{*n*}-alkyne)₆ (n = 3 or 4) (0.055 mmol) and mN₃- β CD (0.496 mmol) were dissolved in DMSO (5 mL); this mixture was degassed by bubbling argon for 10 min. A solution of CuSO₄•5H₂O (0.055 mmol) in a DMSO:H₂O mixture (0.5:0.5 mL), followed by a solution of H₂Asc (0.165 mmol) in DMSO:H₂O mixture (0.5:0.5 mL), were added dropwise over 5 min. The reaction mixture was heated to 80 °C with vigorous stirring and under the argon atmosphere for 7 days, until the reaction was complete, monitored by ^{31}P NMR. At the end of this time, the reaction mixture was cooled and precipitated dropwise into cold acetone (200 mL). The precipitate was filtered under vacuum.

The obtained solid was purified by size exclusion chromatography using Bio-Gel[®] P-10 medium and water as the eluent. Once the corresponding fractions were obtained, they were lyophilized to evaporate the water. PDCs **G** and **H** were obtained as white solids (0.041 mmol, 61% and 0.048 mmol, 88% for **G** and **H**, respectively).

P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₃-βCD]₆. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 7.82 (s, 6H, *H*-triazole), 6.87 (s, 24H, *H*-a, b), 5.87 (m, 7H, OH-2'), 5.78 (s, 36H, OH-2), 5.70–5.66 (m, 42H, OH-3,3'), 5.05 (s, 7H, *H*-1'), 4.84–4.78 (m, 42H, *H*-1; *H*-6'), 4.56–4.50 (m, 36H, *H*-6'; OH-6), 4.33 (s, 6H, OH-6''), 4.02 (m, 18H, *H*-c; *H*-5'), 3.65–3.59 (m, 138H, *H*-6, *H*-3,3', *H*-5), 3.41–3.28 (m, 84 H, *H*4,4', *H*-2,2' overlapped with H₂O), 3.12 (m, 7H, *H*-6''), 2.94 (m, 7H, *H*-6''), 2.77 (m, 12H, *H*-e), 2.05 (m, 12H, *H*-d); ¹³C-DEPTQ NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 156.55, 144.37, 123.37, 122.15, 115.93, 102.98, 102.02, 84.28, 82.36, 73.05, 72.88, 70.72, 68.13, 60.90, 59.80, 50.37, 29.42, 22.51. ³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): s, 9.31. MALDI-TOF-MS: 8169.59 *m/z* (M + K)⁺.

P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 7.78 (s, 6H, *H*-triazole), 6.83 (s, 24H, *H*-a, b), 5.88 (m, 7H, OH-2'), 5.78–5.72 (s, 36H, OH-2), 5.70–5.63 (m, 42H, OH-3,3'), 5.05 (s, 7H, *H*-1'), 4.84–4.78 (m, 42H, *H*-1; *H*-6'), 4.58–4.49 (m, 36H, *H*-6'; OH-6), 4.34 (s, 6H, OH-6''), 3.96 (m, 18H, *H*-c; *H*-5'), 3.65–3.59 (m, 138H, *H*-6, *H*-3,3', *H*-5), 3.41–3.28 (m, 84 H, *H*4,4', *H*-2,2' overlapped with H₂O), 3.12 (m, 7H, *H*-6''), 2.94 (m, 7H, *H*-6''), 2.66 (m, 12H, *H*-f), 1.76 (m, 24H, *H*-d, e); ¹³C-DEPTQ NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): 156.56, 147.25, 123.86, 122.11, 115.96, 102.98, 101.98, 84.18, 82.80, 82.33, 81.62, 73.94, 72.91, 68.38, 60.73, 59.77, 50.79, 29.27, 26.29, 22.50. ³¹P-NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆, δ ppm): s, 9.42. MALDI-TOF-MS: 8254.30 *m/z* (M + K)⁺.

3.3. Characterization

¹H-, ¹³C- and ³¹P-NMR measurements were carried out on a Bruker spectrometer (Bruker, Beerlika, MA, USA) (400 MHz) using DMSO-*d*₆ as solvent. Chemical shifts are reported in ppm (δ), and the signals were described as singlet (s), doublet (d), triplet (t) and multiplet (m); coupling constants (*J*) were reported in Hz. DART and MALDI-TOF mass measurements were performed on a JEOL JMS-AX505-HA instrument (Peabody, MA, USA) and on a Bruker Daltonics Flex Analysis instrument (Bruker, Beerlika, MA, USA), respectively. Matrices of 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), dithranol (DIT) and 2-acetylphloroglucinol (THAP) were used for MALDI-TOF.

3.4. Determination of Water Solubility for P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_{*n*}-βCD]₆ PDCs

The determination of the solubility of the P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_{*n*}-βCD]₆ PDCs was carried out according to a method previously reported by Jozwiakowski and Connors [36], with modifications. One gram of the compound was placed in three amber vials of 5 mL with a screw cap, and 1 mL of water was added. The vials were sealed with parafilm to avoid water evaporation. They were stirred in an oil bath at a constant temperature of 25 ± 0.01 °C for 48 h. The supernatant was separated from the solid phase by filtration through a Milli-Q membrane (pore size of 0.45 μm) by injection of the mixture into disposable plastic syringes (Franklin Lakes, NJ, USA) of 3 mL at 25 °C. The supernatant of each sample was placed in three different vials. The samples were lyophilized for 48 h, and the obtained solids were weighed on a scale with an uncertainty of ±0.0001 g.

4. Conclusions

In this work, two novel phosphorus dendritic compounds (PDCs) containing a P_3N_3 as the core and βCD units as terminal groups were designed. The synthesis was carried out using the CuAAC reaction, giving high yields and products that were purified by a simple method. The complete functionalization of the P_3N_3 core of the new molecules was carried out using two aliphatic chains of different lengths as the linker. We found that there was no significant impact of the aliphatic chain length, since, with both linkers, the functionalization was complete. This is the first report for

PDCs of the type $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ arising from a novel design of water-soluble PDCs. The potential use of these new dendrimers as drug carriers for biomedical applications is currently under study.

Supplementary Materials: The following are available online: NMR & MS spectrum of the compounds.

Author Contributions: E.R.; I.G.-M.; K.I.M.-C.C. and A.-M.C.—design of the dendrimers. K.S.-M.—synthesis of the dendrimers. K.S.-M. and I.G.-M.—characterization of the dendrimers. K.S.-M. and I.G.-M.—contributed to manuscript writing. J.I.—data curation. E.R.; M.V.; J.I.; K.I.M.-C.C. and A.-M.C.—edited and revised the manuscript. E.R.—supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The financial support of the Quebec-Mexico Bilateral Research Program from FQRNT of Quebec and CONACYT of Mexico (Project 279380) is gratefully acknowledged. KS-M (No. 604166/771826) and IG-M (No. 510108/288832) are very grateful with Posgrado en Ciencias Químicas UNAM and CONACyT for the granted fellowships.

Acknowledgments: We thank Gerardo Cedillo, Lucero Ríos, María del Carmen García González and Francisco Javier Pérez Flores for their assistance with NMR and mass spectrometry measurements, respectively.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Su, H.H.; Koo, J.M.M.; Cui, H. One-component nanomedicine. *J. Control. Release.* **2015**, *219*, 383–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Duncan, R.; Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 2101–2141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Liu, J.; Huang, Y.; Kumar, A.; Tan, A.; Jin, S.; Mozhi, A.; Liang, X.J. pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnol. Adv.* **2014**, *32*, 693–710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kesharwani, P.; Jain, K.; Jain, N.K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 268–307. [[CrossRef](#)]
5. Tripathy, S.; Das, M.K. Dendrimers and their applications as novel drug delivery carriers. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2013**, *3*, 142–149. [[CrossRef](#)]
6. Majoral, J.P.; Caminade, A.M.; Maraval, V. The specific contribution of phosphorus in dendrimer chemistry. *Chem. Commun.* **2002**, *8*, 2929–2942. [[CrossRef](#)]
7. Sharma, A.K.; Gothwal, A.; Kesharwani, P.; Alsaab, H.; Iyer, A.K.; Gupta, U. Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery. *Drug Discov. Today.* **2017**, *22*, 314–326. [[CrossRef](#)]
8. Cloninger, M.J. Biological applications of dendrimers. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 742–748. [[CrossRef](#)]
9. Mignani, S.; El Kazzouli, S.; Bousmina, M.; Majoral, J.P. Dendrimer space concept for innovative nanomedicine: A futuristic vision for medicinal chemistry. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 993–1008. [[CrossRef](#)]
10. Caminade, A.M.; Turrin, C.O.; Majoral, J.P. Biological properties of phosphorus dendrimers. *New J. Chem.* **2010**, *34*, 1512–1524. [[CrossRef](#)]
11. Caminade, A.M. Phosphorus dendrimers for nanomedicine. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 9830–9838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Launay, N.; Caminade, A.M.; Lahana, R.; Majoral, J.P. A General Synthetic Strategy for Neutral Phosphorus-Containing Dendrimers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1589–1592. [[CrossRef](#)]
13. Sebastián, R.M.; Magro, G.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P. Dendrimers with *N,N*-disubstituted hydrazines as end groups, useful precursors for the synthesis of water-soluble dendrimers capped with carbohydrate, carboxylic or boronic acid derivatives. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6269–6277. [[CrossRef](#)]
14. Hadad, C.; Majoral, J.P.; Muzart, J.; Caminade, A.M.; Bouquillon, S. First phosphorous D-xylose-derived glycodendrimers. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1902–1905. [[CrossRef](#)]
15. Blattes, E.; Vercellone, A.; Eutamène, H.; Turrin, C.O.; Théodorou, V.; Majoral, J.P.; Caminade, A.M.; Prandi, J.; Nigou, J.; Puzo, G. Mannodendrimers prevent acute lung inflammation by inhibiting neutrophil recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 8795–8800. [[CrossRef](#)]
16. Touaibia, M.; Roy, R. First synthesis of “majoral-type” glycodendrimers bearing covalently bound α -D-mannopyranoside residues onto a hexachlocyclotriphosphazene core. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9292–9302. [[CrossRef](#)]

17. Blanzat, M.; Turrin, C.O.; Perez, E.; Rico-Lattes, I.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P. Phosphorus-containing dendrimers bearing galactosylceramide analogs: Self-assembly properties. *Chem. Commun.* **2002**, 1864–1865. [[CrossRef](#)]
18. González-Méndez, I.; Hameau, A.; Laurent, R.; Bijani, C.; Bourdon, V.; Caminade, A.M.; Rivera, E.; Moineau-Chane Ching, K.I. β -Cyclodextrin PAMAM Dendrimer: How to Overcome the Tumbling Process for Getting Fully Available Host Cavities. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 1114–1121. [[CrossRef](#)]
19. Arima, H.; Kihara, F.; Hirayama, F.; Uekama, K. Enhancement of gene expression by polyamidoamine dendrimer conjugates with α -, β -, and γ -cyclodextrins. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 476–484. [[CrossRef](#)]
20. Abdelwahab, A.F.; Ohyama, A.; Higashi, T.; Motoyama, K.; Khaled, K.A.; Sarhan, H.A.; Hussein, A.K.; Arima, H. Preparation and evaluation of polyamidoamine dendrimer conjugate with glucuronylglucosyl- β -cyclodextrin (G3) as a novel carrier for siRNA. *J. Drug Target.* **2014**, *22*, 927–934. [[CrossRef](#)]
21. Arima, H.; Motoyama, K.; Higashi, T. Sugar-appended polyamidoamine dendrimer conjugates with cyclodextrins as cell-specific non-viral vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1204–1214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Crini, G.; Fourmentin, S.; Fenyvesi, É.; Torri, G.; Fourmentin, M.; Morin-Crini, N. Fundamentals and Applications of Cyclodextrins. In *Cyclodextrin Fundamentals. Reactivity and Analysis*; Crini, G., Fourmentin, S., Lichtfouse, E., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2018; Volume 1, pp. 1–57. [[CrossRef](#)]
23. Tian, B.; Liu, Y.; Liu, J. Cyclodextrin as a magic switch in covalent and non-covalent anticancer drug release systems. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *242*, 116401. [[CrossRef](#)]
24. Zhang, D.; Lv, P.; Zhou, C.; Zhao, Y.; Liao, X.; Yang, B. Cyclodextrin-based delivery systems for cancer treatment. *Mater. Sci. Eng. C.* **2019**, *96*, 872–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Dias, A.P.; da Silva Santos, S.; da Silva, J.V.; Parise-Filho, R.; Ferreira, E.I.; El Seoud, O.; Giarolla, J. Dendrimers in the context of nanomedicine. *Int. J. Pharm.* **2020**, *573*, 118814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Aragão-Leoneti, V.; Campo, V.L.; Gomes, A.S.; Field, R.A.; Carvalho, I. Application of copper(I)-catalysed azide/alkyne cycloaddition (CuAAC) “click chemistry” in carbohydrate drug and neoglycopolymer synthesis. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9475–9492. [[CrossRef](#)]
27. Ting, C.H.; Chen, J.T.; Hsu, C.S. Synthesis and thermal and photoluminescence properties of liquid crystalline polyacetylenes containing 4-alkoxyloxyphenyl trans-4-alkylcyclohexanoate side groups. *Macromolecules* **2002**, *35*, 1180–1189. [[CrossRef](#)]
28. Cavero, E.; Zabolocka, M.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P. Design of bisphosphonate-terminated dendrimers. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *14*, 2759–2767. [[CrossRef](#)]
29. Zhong, N.; Byun, H.S.; Bittman, R. An improved synthesis of 6-O-monotosyl-6-deoxy- β -cyclodextrin. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2919–2920. [[CrossRef](#)]
30. Tripodo, G.; Wischke, C.; Neffe, A.T.; Lendlein, A. Efficient synthesis of pure monotosylated beta-cyclodextrin and its dimers. *Carbohydr. Res.* **2013**, *381*, 59–63. [[CrossRef](#)]
31. Yousef, T.; Hassan, N.; Akbar, E.A. Synthesis of the dendritic type β -cyclodextrin on primary face via click reaction applicable as drug nanocarrier. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *132*, 205–213. [[CrossRef](#)]
32. Liu, H.; Zhang, Y.; Hu, J.; Li, C.; Liu, S. Multi-responsive supramolecular double hydrophilic diblock copolymer driven by host-guest inclusion complexation between β -cyclodextrin and adamantyl moieties. *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210*, 2125–2137. [[CrossRef](#)]
33. Caminade, A.M.; Laurent, R.; Turrin, C.O.; Rebut, C.; Delavaux-Nicot, B.; Ouali, A.; Zabolocka, M.; Majoral, J.P. Phosphorus dendrimers as viewed by 31P NMR spectroscopy; Synthesis and characterization. *C. R. Chim.* **2010**, *13*, 1006–1027. [[CrossRef](#)]
34. Blais, J.C.; Turrin, C.O.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P. MALDI TOF mass spectrometry for the characterization of phosphorus-containing dendrimers. Scope and limitations. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5097–5105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Turrin, C.O.; Maraval, V.; Leclaire, J.; Dantras, E.; Lacabanne, C.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P. Surface, core, and structure modifications of phosphorus-containing dendrimers. Influence on the thermal stability. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3965–3973. [[CrossRef](#)]
36. Caminade, A.M.; Majoral, J.P. Water-soluble phosphorus-containing dendrimers. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30*, 491–505. [[CrossRef](#)]
37. Jozwiakowski, M.J.; Connors, K.A. Aqueous solubility behavior of three cyclodextrins. *Carbohydr. Res.* **1985**, *143*, 51–59. [[CrossRef](#)]

38. Loftsson, T.; Jarho, P.; Másson, M.; Järvinen, T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 335–351. [[CrossRef](#)]
39. Folgado, E.; Guerre, M.; Bijani, C.; Ladmiral, V.; Caminade, A.M.; Ameduri, B.; Ouali, A. Well-defined poly(vinylidene fluoride) (PVDF) based-dendrimers synthesized by click chemistry: Enhanced crystallinity of PVDF and increased hydrophobicity of PVDF films. *Polym. Chem.* **2016**, *7*, 5625–5629. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

Guest-Mediated Reversal of the Tumbling Process in Phosphorus-Dendritic Compounds Containing β -Cyclodextrin Units: An NMR Study

Kendra Sorroza-Martínez ¹, Israel González-Méndez ^{1,*}, Mireille Vonlanthen ¹, Fabián Cuétara-Guadarrama ¹, Javier Illescas ² , Xiao Xia Zhu ³ and Ernesto Rivera ^{1,*}

- ¹ Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, México City CP 04510, Mexico; kendraivn17@gmail.com (K.S.-M.); mireille.vonlanthen@gmail.com (M.V.); fabian.cuetara@comunidad.unam.mx (F.C.-G.)
- ² Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Toluca, Avenida Tecnológico S/N Col. Agrícola Bellavista, Metepec CP 52140, Mexico; fillescasm@toluca.tecnm.mx
- ³ Département de Chimie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada; julian.zhu@umontreal.ca
- * Correspondence: israelgonzalezme@gmail.com (I.G.-M.); riverage@unam.mx (E.R.); Tel.: +52-5556-224-733 (E.R.)



Citation: Sorroza-Martínez, K.; González-Méndez, I.; Vonlanthen, M.; Cuétara-Guadarrama, F.; Illescas, J.; Zhu, X.X.; Rivera, E. Guest-Mediated Reversal of the Tumbling Process in Phosphorus-Dendritic Compounds Containing β -Cyclodextrin Units: An NMR Study. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 556. <https://doi.org/10.3390/ph14060556>

Academic Editors: Laura Catenacci, Milena Sorrenti and Maria Cristina Bonferoni

Received: 21 May 2021
Accepted: 1 June 2021
Published: 11 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The conformational study of dendritic platforms containing multiple β -cyclodextrin (β CD) units in the periphery is relevant to determine the availability of β CD cavities for the formation of inclusion complexes in aqueous biological systems. In this work, we performed a detailed conformational analysis in D_2O , via 1D and 2D NMR spectroscopy of a novel class of phosphorus dendritic compounds of the type $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$ (where $n = 3$ or 4). We unambiguously demonstrated that a functionalized glucopyranose unit of at least one β CD unit undergoes a 360° tumbling process, resulting in a deep inclusion of the spacer that binds the cyclodextrin to the phosphorus core inside the cavity, consequently limiting the availability of the inner cavities. In addition, we confirmed through NMR titrations that this tumbling phenomenon can be reversed for all β CD host units using a high-affinity guest, namely 1-adamantanecarboxylic acid (AdCOOH). Our findings have demonstrated that it is possible to create a wide variety of multi-functional dendritic platforms.

Keywords: phosphorus dendritic compounds; β -cyclodextrin; tumbling process; host-guest interaction; 1-adamantanecarboxylic acid

1. Introduction

Dendrimers are nanometric-sized polymeric structures consisting of regularly branched layers obtained through the step-by-step incorporation of branching units (monomers) arranged around a central nucleus. Every time a new generation is created, the number of terminal functional groups is multiplied. Unlike hyperbranched polymers that are prepared via polymerization reactions, dendrimers are synthesized through consecutive and iterative steps, allowing total control of their final structure. A wide variety of dendrimers have been prepared and studied, most of which are purely organic. Furthermore, “inorganic” dendrimers [1], containing heteroatoms such as phosphorus or silicon in their molecular structure either in the nucleus or as branching points, have been reported [2–4]. Majoral and Caminade were pioneers in the synthesis and development of phosphorus dendrimers with a cyclotriphosphazene nucleus (hexachlorocyclotriphosphazene). These phosphorous dendrimers have found various applications [5], for instance, as anticancer agents [6], fluorescent probes, biomacromolecules, and anti-Alzheimer drugs [7].

The terminal groups of dendrimers determine their macroscopic properties such as solubility and reactivity; the latter allows a subsequent chemical modification of the final dendrimeric structure [8]. Surface engineering deals with the modification of the

dendrimer periphery, as it employs elegant strategies to improve the physico-chemical and biological properties of dendrimers [9,10]. In recent years, the development of surface-modified dendrimers with carbohydrates, specifically with cyclodextrins (CDs), has led to a synergistic effect on the properties of the obtained constructs [11–15].

From the multi-component structure perspective, the structural modification of individual CD molecules is not sufficient to meet the emerging needs for developing new optimized materials with multiple applications. Therefore, the inclusion of multiple CD units into complex molecular structures has been shown to endow important features, such as excellent physico-chemical properties [16]. For this reason, in addition to dendrimer design, various CD-containing structures such as dimers [17–21], trimers [15,22], and tetramers [23] have been developed.

β -Cyclodextrin (β CD) is a cyclic oligosaccharide formed by seven α -D-glucopyranose units bound by α -1,4 glycosidic bonds. Its truncated cone-like shape forms a cavity with hydrophobic character resulting from the inward-directed C-H bonds. Hydrophilic properties are conferred by the -OH groups lying on the outer surface of the cone [16,24]. Even though β CD has the lowest solubility in water among the reported CDs, it is the most cited CD for use as a building block. Features of β CD such as easy and cheap production, as well as its good biocompatibility, have earned its approval by the Food and Drug Administration (FDA) to be used as an excipient. β CD is a very versatile molecule, as it can be chemically modified in its primary and secondary hydroxyl groups. If the cavity remains accessible after chemical modification, unique supramolecular structures with different functionalities can be obtained [25,26].

While studying CD-containing dimers, trimers, and tetramers, an unusual inversion phenomenon was observed in the functionalized glucopyranose unit in water. This inversion or tumbling causes the spacer that links to the CDs with the platform to deeply insert into the CD cavity. Very recently, this phenomenon has been reported on the surface of CD-functionalized PAMAM dendrimers [15]. This tumbling depends on the type of spacer used, and, when favored, has a direct negative impact on the accessibility to the cavities of the CDs present in the platform. Therefore, it is of great importance to understand and control this tumbling unit to ensure the complete availability of CDs on multi-functionalized platforms [17,18,20].

A strategy employed to reverse the tumbling process in the functionalized glucopyranose unit is the use of the self-assembly of CDs. Self-assembly is a phenomenon in which simple molecules function as building blocks to spontaneously organize into more complex systems. The process of self-organization is carried out through different interaction mechanisms: electrostatic forces, van der Waals forces, π - π interactions, dispersion forces, or more specific bonds such as the formation of host-guest complexes, or “lock-and-key” binding [27,28]. CDs stand out of all macrocyclic molecules as a gold standard for the formation of host-guest complexes [29]. Among the many molecules studied as guests of the internal cavity of β CD, special attention has been paid to adamantane (Ad) because it fits firmly into the cavity, resulting in a very stable host-guest inclusion complex [30,31]. This interaction has been studied as a strategy to reverse the phenomenon of inversion in the glucopyranose unit of the β CD [15,19]. In addition, it can be used to create a variety of functionalities on nanoparticles and surfaces containing multiple CD units [32–34].

In a previous work, we reported the synthesis and characterization in DMSO- d_6 of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n- β CD]₆ ($n = 3$ or 4) dendritic compounds [14]. However, this medium is not representative of the real conformation to assure the complete availability of β CD cavities of this type of platform in aqueous biological systems. Therefore, in this work, we presented the full characterization of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n- β CD]₆ ($n = 3$ or 4) dendritic compounds with six neighboring β CD units in deuterium oxide (D₂O). Our aim was to elucidate the real conformation in water and identify whether the tumbling process is favored in this type of structure. Furthermore, the formation of the inclusion complex between the dendritic compounds and 1-adamantanecarboxylic acid (AdCOOH)

was investigated in order to demonstrate that it is entirely possible to block the tumbling process with the Ad guest in these multifunctional platforms.

2. Results and Discussion

2.1. Characterization

In a previous work, we reported the correct assignment of the ^1H - and ^{13}C -NMR signals of $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-}\beta\text{CD]}_6$ dendrimers **I** and **II**, where $n = 3$ and 4, respectively (see as **(I)** and **(II)** in Figure 1), in $\text{DMSO-}d_6$ employing HMQC and COSY 2D NMR experiments [14]. In this medium, the classical signals of the aromatic triazole ring protons and the disubstituted phenyl protons appeared as singlets, suggesting an extended conformation for the dendritic molecule (see (A) in Figure 2). This first approach to the spatial conformation of multi-functionalized $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-}\beta\text{CD]}_6$ molecules is not surprising, as it is well known that DMSO solvates each hydrogen atom of the CD OH groups, preventing the interaction with other media (for example, water) [35,36]. Besides, some DMSO molecules can penetrate inside the CD cavities, which blocks the ability of the CD to form inclusion complexes by competition of the interaction forces in the final system neighborhood [37,38].

As these compounds may be potentially used as nanocarriers in biological systems, the rigorous elucidation of their conformation in aqueous media is a determinant for such applications. For this reason, we have herein pursued the assignment of the signals in D_2O and have performed a conformational analysis via 2D NMR (through NOE interactions) of both native platforms and the corresponding inclusion complexes using AdCOOH as the guest molecule. First, the full characterization of native $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-}\beta\text{CD]}_6$ (**I**) and **(II)** using NMR techniques (^1H -, ^{13}C -NMR, and 2D NMR HMQC and COSY) (Figure 3 and Figures S1–S7 for **(II)** in SI) was carried out in D_2O . The ^1H -NMR spectrum of $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-}\beta\text{CD]}_6$ (**I**) showed a radical change in the aromatic region, as the signals corresponding to symmetric H-triazole and aromatic H-a, H-b protons no longer appeared as singlets, as observed for the extended conformation in DMSO (Figure 3). Instead, at least four different signals were observed between 7.63–7.27 ppm, which can be assigned to H-inverted triazoles (*i*). The same phenomenon was observed between 6.92–6.46 ppm where multiple signals corresponding to the mixed signals of H-a and H-b of the noninverted and inverted aromatic protons appeared.

A detailed analysis of the groups of signals between 7.63–6.46 ppm allowed the identification of the different protons of the platforms. The H-*ai* and H-*bi* aromatic protons of the branches bearing a reversed CD cavity correspond to the signals between 6.92–6.89 ppm. The group of signals between 6.81–6.67 ppm is due to the H-a and H-b aromatic protons of the branches bearing a nonreversed CD and to an additional proton assigned to an inverted triazole group. The integration of the signals between 7.63–6.46 ppm indicates that 5 out of 30 integrated protons correspond to the aromatic protons of five out of six triazole groups, meaning that, on average, at least one of the CD cavities underwent a tumbling process. Nevertheless, the above-mentioned multiple signals for different triazoles demonstrate an alternating dynamic tumbling phenomenon on all CDs in the periphery of dendritic compounds **(I)** and **(II)**, see Figure S3 in SI). In this way, the complexity of the signals between 7.63–7.27 ppm can be explained by the possible existence of 13 conformations for dendritic compounds **(I)** and **(II)** in water (see Figure 4).

Apart from the changes observed in the aromatic region of dendritic platforms **(I)** and **(II)** in D_2O , other regions of the spectrum were also affected due to the tumbling effect. Unequivocal assignments of the proton signals were made based on the previous analysis performed in $\text{DMSO-}d_6$ [14], combined with the information generated from 2D NMR experiments in D_2O . First, the 2D HMQC spectrum (see Figure 5) gave the confirmation for chemical shifts values of the multiple triazoles and inverted aromatic protons that correlated with distinctive carbon atoms in the region between 124.94–115.66 ppm of the ^{13}C -NMR spectrum. Further analysis allowed the assignment of the rest of the CD proton signals and the aliphatic chain of the linker. From the down-field shift to up-field shift, it was

possible to identify the H-1 and H-1' protons of the modified and normal glucopyranose, respectively. Immediately after these signals, the nonequivalent diastereotopic protons H-6' appeared as two sets of two signals: one set originating at 4.87 ppm and the other at 4.39 ppm, with both signals correlated to the same carbon at 51.07 ppm. It is important to notice that the tumbling of the CD cavity has the same impact on the Hc proton, as an additional signal appeared at 4.14 ppm, which correlated with the carbon signal at 70.97 ppm. This signal can only be due to one Hci because the rest of the group of signals was corresponding to the noninverted Hc protons. A similar phenomenon was observed for the signals at 3.49 ppm that correspond to H-2,2', 4,4' protons, which were affected by the surrounding tumbling process in the same manner. The rest of the signals were in concordance with the assignment made in DMSO- d_6 .

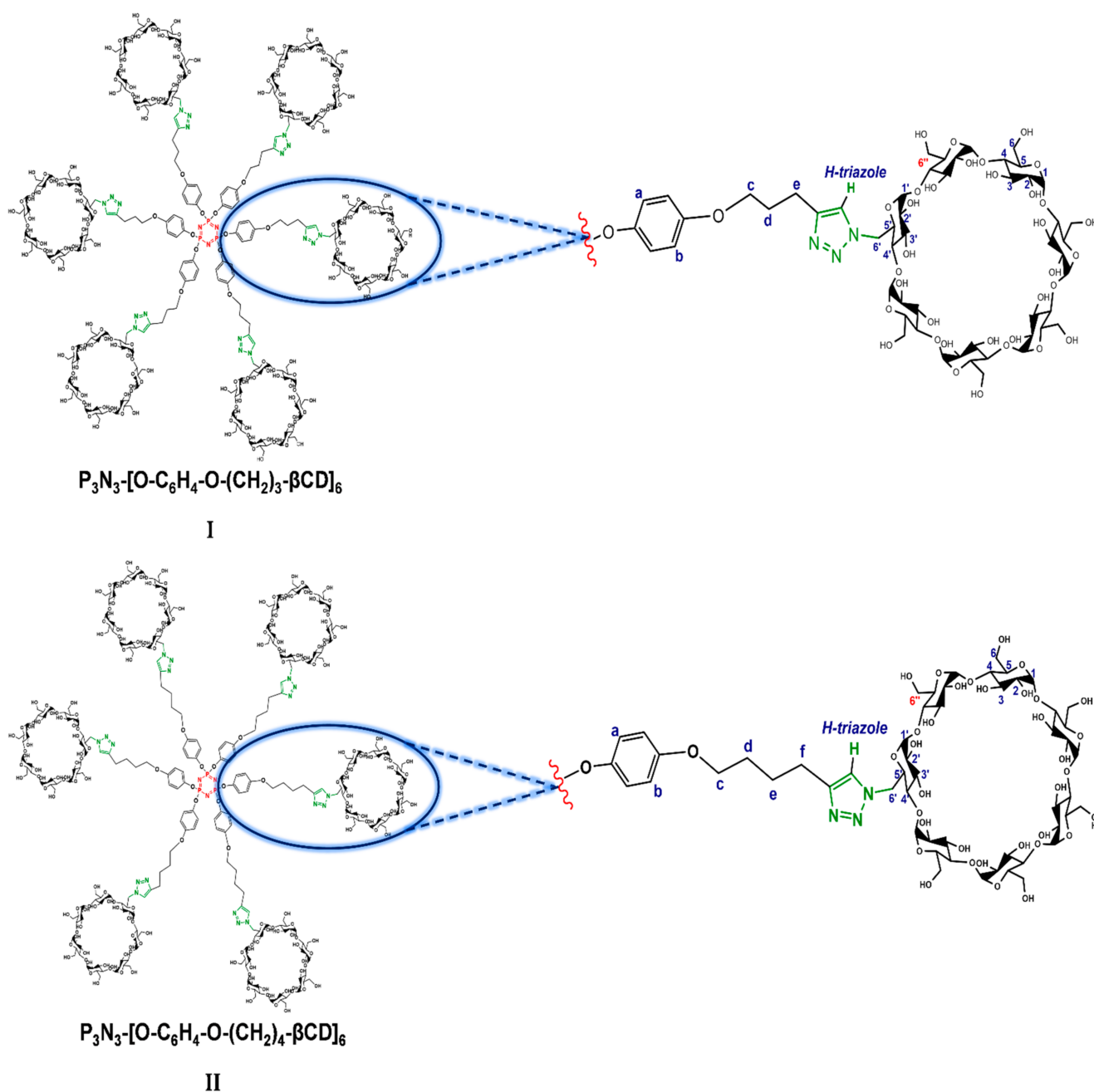


Figure 1. Structure of compounds $P_3N_3-[O-C_6H_4-O-(CH_2)_n-\beta CD]_6$, where $n = 3$ or and 4 (I and II, respectively) and the representative assignment of the proton signals in NMR.

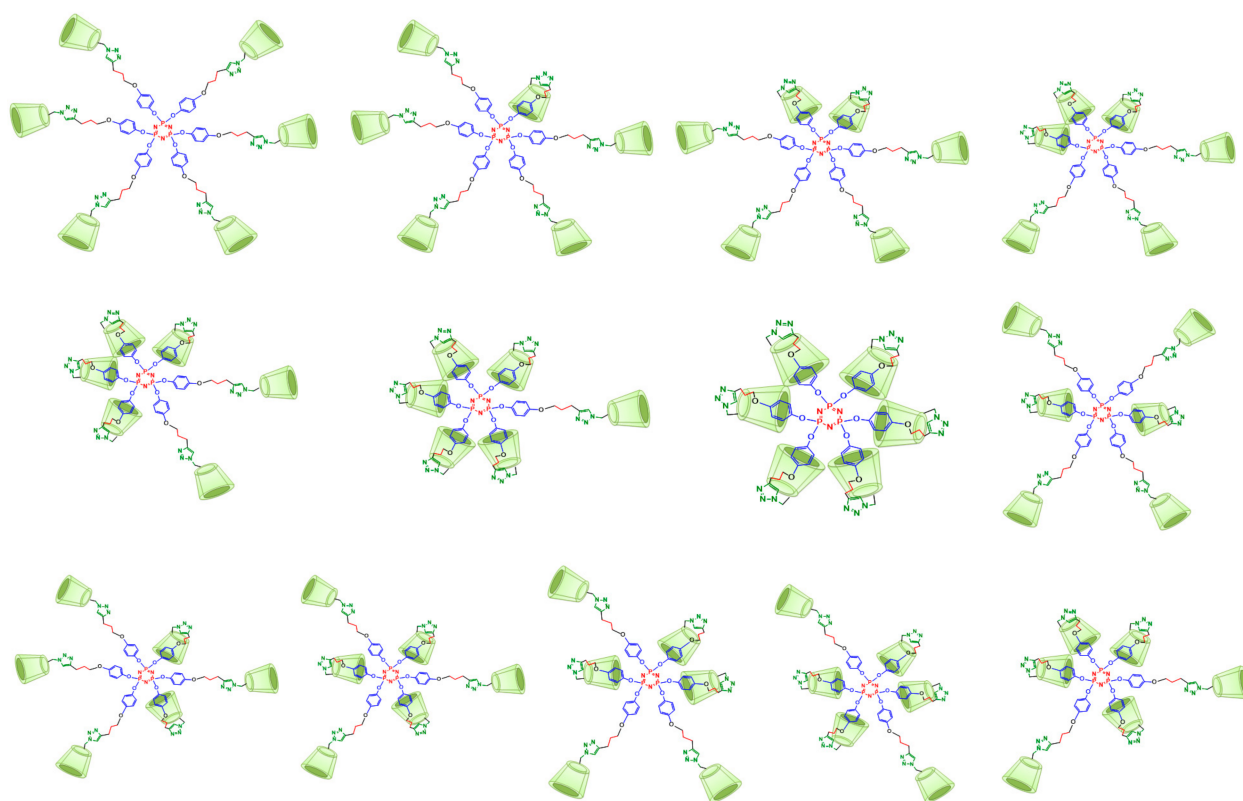


Figure 4. The 13 possible conformations for dendritic compound (I) with 0 to 6 inverted cavities. Similar conformations are expected for compound (II).

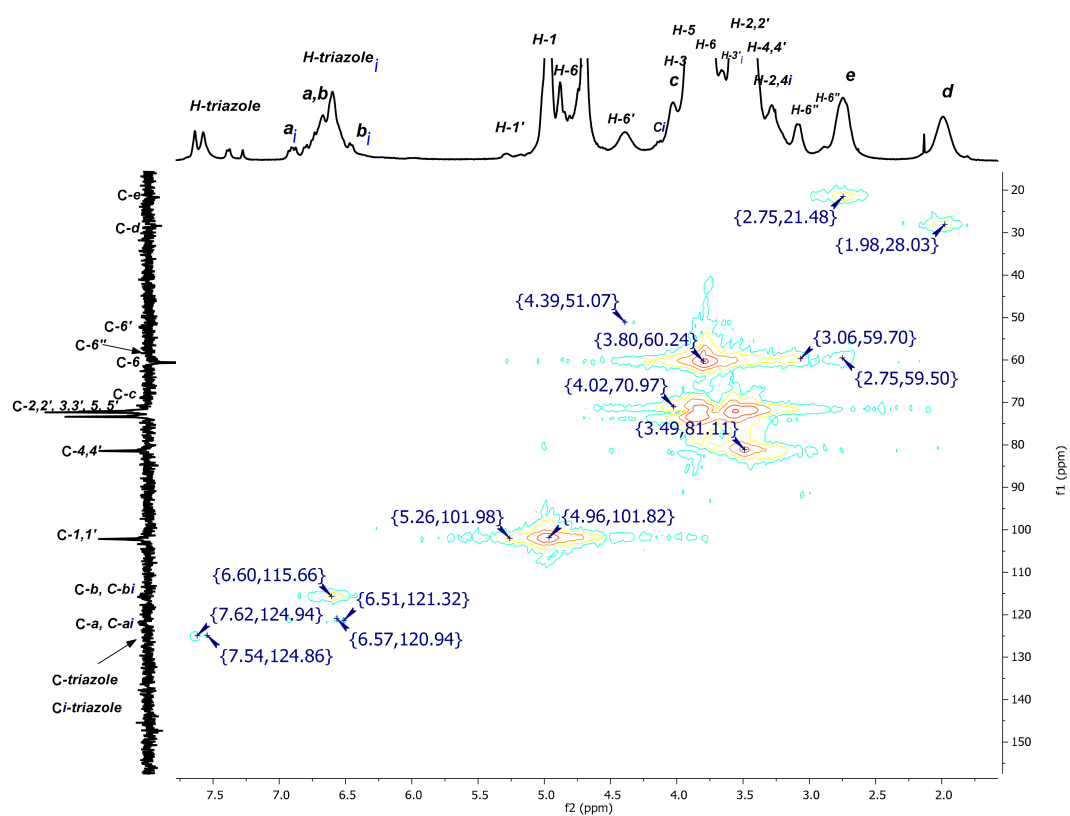


Figure 5. 2D NMR HMQC spectrum of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₃-βCD]₆ (I) in D₂O.

changes in the $^1\text{H-NMR}$ spectra of platforms (I) and (II) in D_2O (see Figure 8 and Figure S8 in SI).

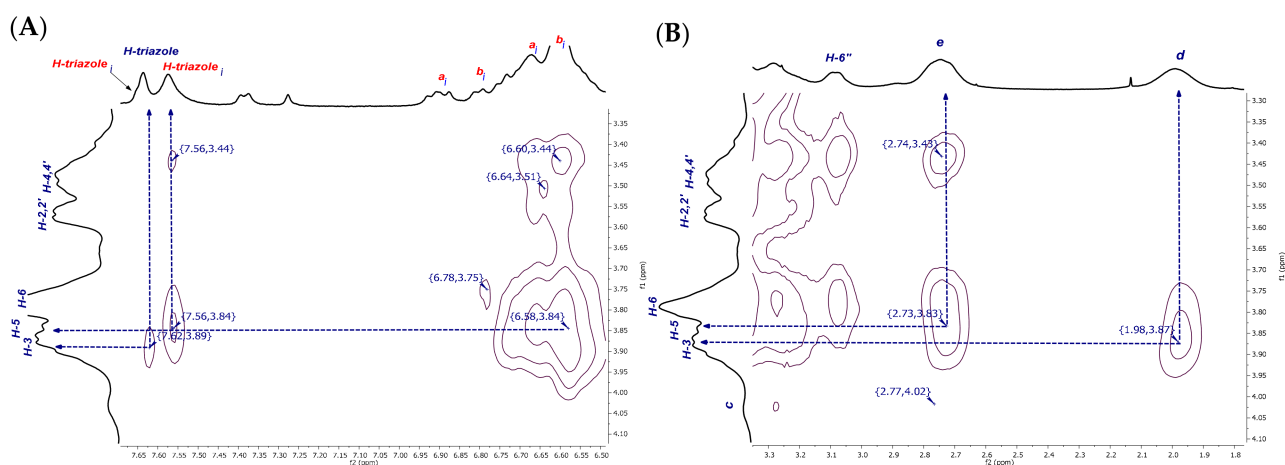


Figure 7. Amplification of (A) aromatic and (B) aliphatic zones in 2D NMR NOESY spectrum of $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-}\beta\text{CD]}_6$ (I) in D_2O .

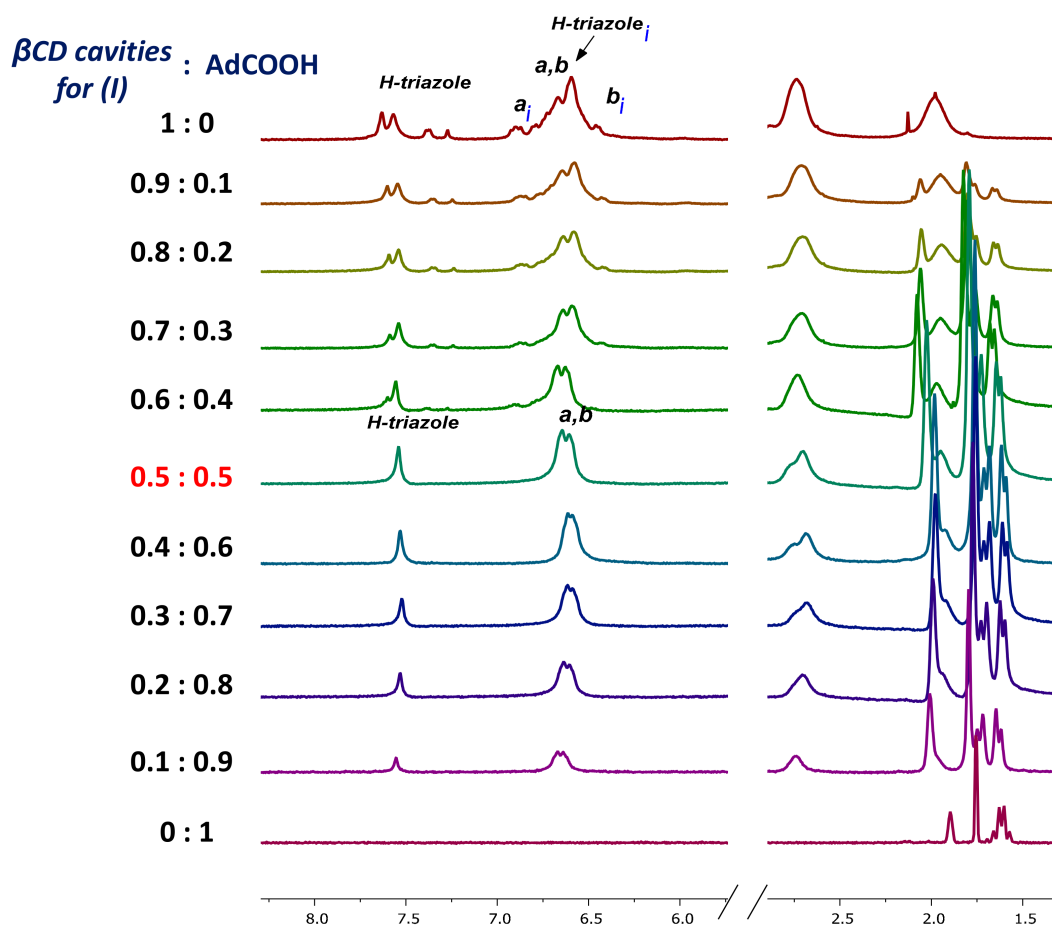


Figure 8. $^1\text{H-NMR}$ titration experiment of dendritic compound (I). The 5.5–8.5 ppm and 1.0–3.0 ppm regions are shown for the mixtures of dendritic compound (I) and AdCOOH in D_2O with decreasing molar fraction from top to bottom, expressed with respect to the concentration in βCD cavities for dendritic compound (I) ($\text{XCD} = [\beta\text{CD}] / ([\beta\text{CD}] + [\text{AdCOOH}])$). Total concentration $[\beta\text{CD}] + [\text{AdCOOH}] = 3 \text{ mM}$.

Each spectrum was numbered using the molar fraction $X_{CD} = [\beta CD]/([\beta CD] + [AdCOOH])$ for the sake of simplicity (see Figure 8 for molar ratios from 1 to 0). At a 0.9 X_{CD} molar ratio of dendritic compound (I), the spectrum showed similar signals to those obtained for pure compound (I) in D_2O . This behavior was maintained up to a 0.6:0.4 ratio (platform (I): AdCOOH). It is evident that as the X_{CD} ratio decreased, the spectrum shape became simpler with the concomitant appearance of the “normal” multiplicity for the H-triazole and H-a, H-b protons (see region from 6 ppm to 8 ppm for the 0.5:0.5 ratio in Figure 8). Additionally, the progressive disappearance of the Hci and H-2,2',4,4'*i* signals reflected the reversal of the tumbling process described above. Therefore, for the 1:1 stoichiometry (see Figure 9 and Figure S9 in SI), the signal of H-triazole appeared as a singlet at 7.54 ppm, and the phenyl protons H-a H-b appeared as two doublets ($J = 8.3, 8.1$ Hz) at 6.64 ppm and 6.61 ppm, respectively. These results revealed the extended spatial conformation for dendritic compound (I) when forming the host–guest inclusion complex with AdCOOH, and this matches the distribution observed for pure compound (I) in $DMSO-d_6$ (Scenario C, Figure 2). This analysis reinforces the total disappearance of the inverted form of CD units in the periphery of dendritic compounds (I) and (II).

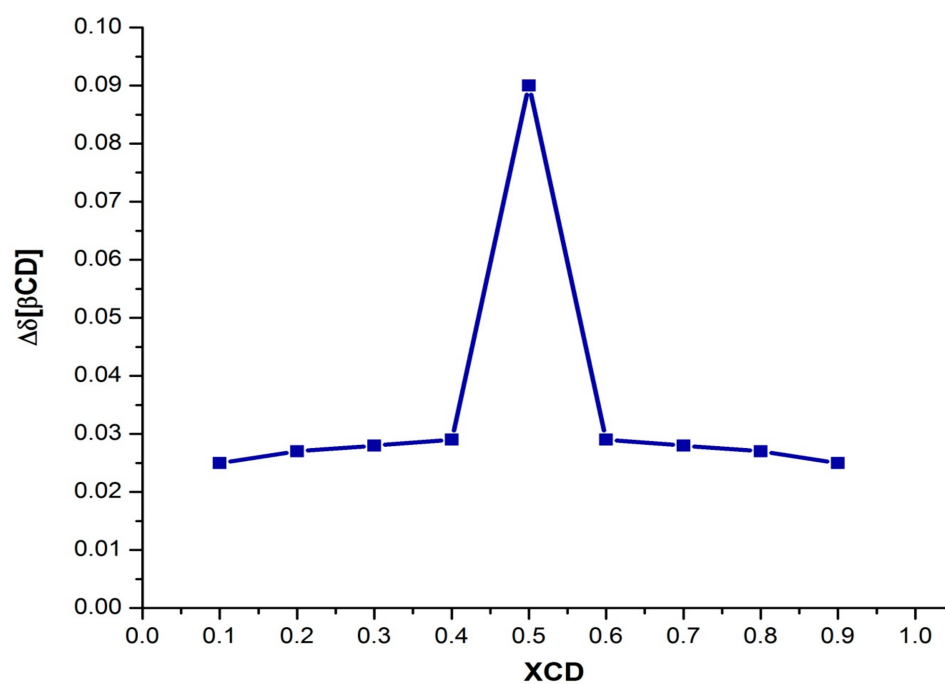


Figure 9. Job plot for the inclusion complex of AdCOOH with βCD cavities in the dendritic compound (I), $[\beta CD] + [AdCOOH] = 3$ mM at 298 K, in D_2O . (The inflection point was found to be at 0.5, which confirms the stoichiometry 1:1.)

Well-defined signals in the aromatic region can be observed in the 1H NMR spectrum of the inclusion complex of the dendritic compound (I) with AdCOOH in equimolar ratio (1:6, referred to compound (I):AdCOOH), as shown in Figure 10 (see Figure S10 for (II)). Long-range interactions were tracked through 2D NOESY NMR experiments (see Figure 11 and Figure S11 for (II)). Only cross-peaks between inner protons of the βCD cavity (H-3,3'; H5,5') and those corresponding to AdCOOH (H- α ; H- β ; H- γ) were observed, which indicates that the CD cavities hosted only the AdCOOH molecules (see region highlighted in blue in Figure 11). Additionally, only spatial correlations between H-b/H-c were present in the NOESY spectrum of compound (I), and no NOE effects between triazole or aromatic protons and βCD protons were observed (see Figure 12A). Therefore, it is possible to confirm that none of the βCD cavities remained in inverted conformation. Finally, exclusive cross-peak interactions between H- α , H- β , and H- γ signals

of AdCOOH and the inner protons of the CD cavity were present (see Figure 12B). The above observations confirmed the complete availability of the β CD host cavities for the AdCOOH guest, despite the initial reversed conformation in water.

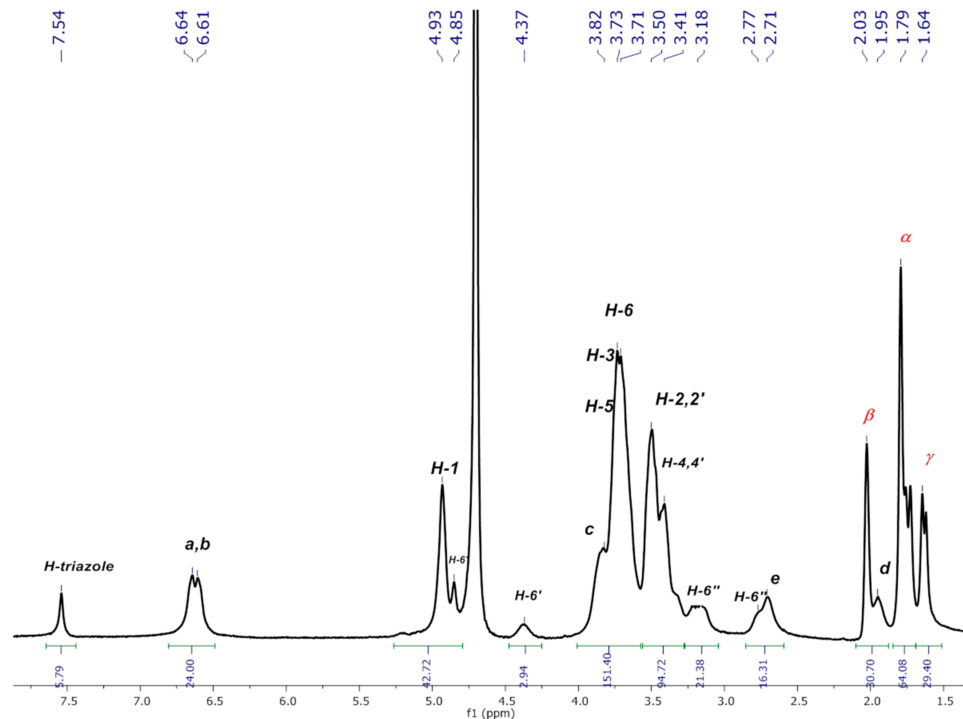


Figure 10. ^1H NMR spectrum of inclusion complex $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-}\beta\text{CD]}_6$ (I)/AdCOOH in D_2O .

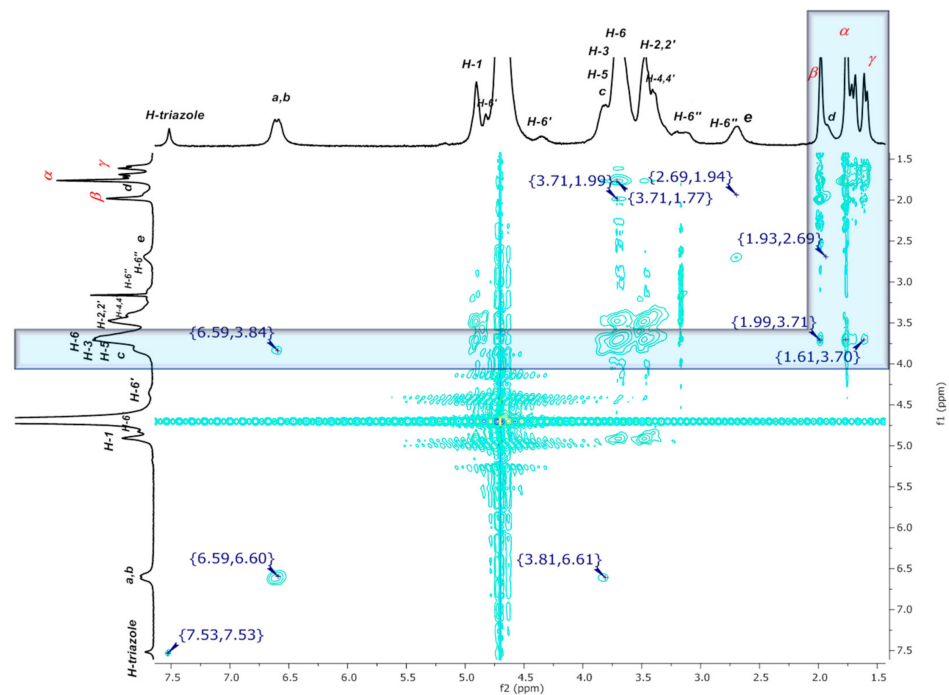


Figure 11. 2D NMR NOESY spectrum of inclusion complex $\text{P}_3\text{N}_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_3\text{-}\beta\text{CD]}_6$ (I)/AdCOOH in D_2O .

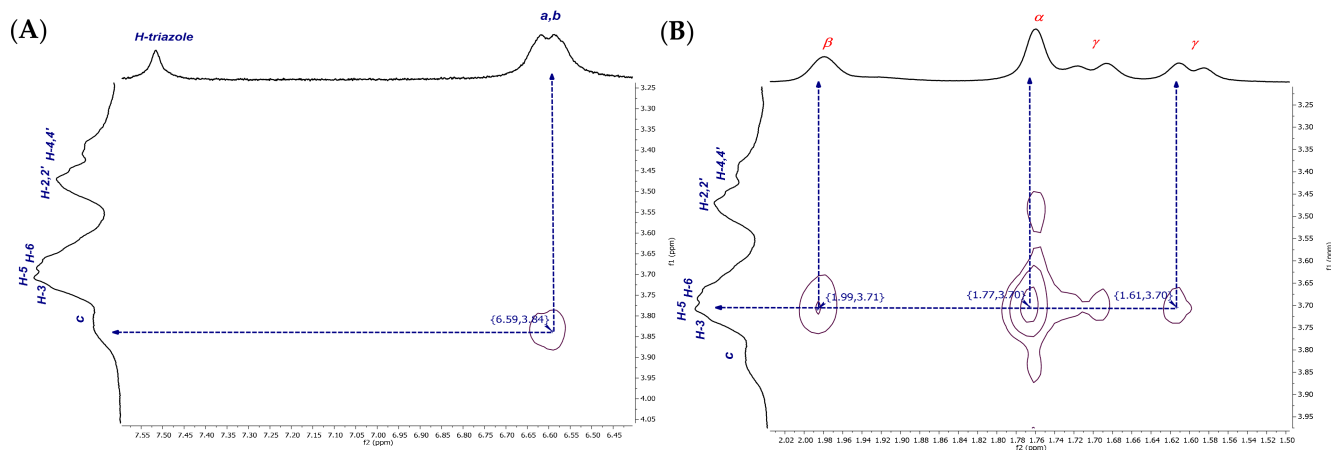


Figure 12. Amplification of (A) aromatic and (B) aliphatic zones in 2D NMR NOESY spectrum of inclusion complex P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₃-βCD]₆/AdCOOH in D₂O.

3. Materials and Methods

3.1. General Notes

All the employed reagents and solvents were purchased from Sigma Aldrich México and were used as received. The synthesis of the dendritic compounds P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₃-βCD]₆ and P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆ was carried out according to procedures previously published by our research group without modifications [14].

3.2. Characterization

3.2.1. NMR Experiments

Deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO-*d*₆) and deuterium oxide (D₂O) with an isotopic purity of 99.9% were obtained from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Cambridge, MA, USA) Tetramethylsilane (TMS), an internal NMR reference, was purchased from Sigma Aldrich Mexico. ¹H- and ¹³C-NMR, as well as 2D HMQC, COSY, and NOESY experiments, were performed at 298 K on a Bruker Avance 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per millions (ppm, δ) and coupling constants (*J*) in Hz. Multiplicities are reported using the following abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, br = broad, and m = multiplet. The suffix letter *i* refers to the signals identified in an inverted conformation of the dendritic compounds.

3.2.2. Characterization of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-βCD]₆ (*n* = 3 or 4) in D₂O

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, δ ppm): 7.63–7.27 (m, 5H, H-triazole), 6.92–6.46 (m, 25H, H-a, b, H-ai, bi, H-triazolei), 5.29 (s, 7H, H-1'), 4.97–4.87 (m, 46H, H-1; H-6'), 4.39 (m, 7H, H-6'), 4.14–3.09 (m, 302H, H-ci, H-c, H-5', H-5, H-3,3', H-6, H-2,2', H-4,4'), 3.09 (m, 7H, H-6''), 2.74 (m, 20H, H-6'', H-e), 1.98 (m, 12H, H-d); ¹³C-DEPTQ NMR (101 MHz, D₂O, δ ppm): 147.33, 145.43, 124.94, 124.86, 121.32, 120.94, 115.66, 101.82, 81.11, 70.97, 60.24, 59.70, 59.50, 51.07, 21.48, 28.03.

P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆

¹H-NMR (400 MHz, D₂O, δ ppm): (7.66–7.36 (m, 5H, H-triazole), 6.84–6.14 (m, 25H, H-a, b, H-ai, bi, H-triazolei), 5.29 (s, 7H, H-1'), 4.98–4.79 (m, 37H, H-1; H-6'), 4.36 (m, 7H, H-6'), 4.02–3.28 (m, 197H, H-c, H-5', H-5, H-3,3', H-6, H-2,2', H-4,4'), 3.09 (m, 7H, H-6''), 2.73–2.62 (m, 13H, H-6'', H-f), 1.64 (m, 24H, H-d,e); ¹³C-DEPTQ NMR (101 MHz, D₂O, δ ppm): 148.95, 146.05, 132.78, 127.77, 122.12, 115.28, 102.15, 81.50, 73.52, 72.39, 71.90, 60.56, 57.40, 28.52, 24.29.

3.2.3. Job Plot Method

For the Job plot method: two stock solutions, Solution Host (Sol. **H**) of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-βCD]₆ ($n = 3$ or 4) 3 mmol/L in βCD cavities, and Solution Guest (Sol. **G**) of AdCOOH 3 mmol/L, were prepared in D₂O. With these solutions, a series of nine samples in NMR tubes containing both P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-βCD]₆ ($n = 3$ or 4) and AdCOOH with a total concentration ($[AdCOOH] + [P_3N_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-}\beta\text{CD]}_6]$) fixed at 3 mmol/L were prepared. This was accomplished by introducing increasing portions of 50 up to 500 μL of Sol. **H** in the adequate NMR tube, and then in the corresponding tube, decreasing amounts were added starting from 500 up to 50 μL of Sol. **G**. Thus, solutions with constant volume and varying βCD molar fractions ($X_{CD} = [P_3N_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-}\beta\text{CD]}_6] / ([P_3N_3\text{-[O-C}_6\text{H}_4\text{-O-(CH}_2\text{)}_n\text{-}\beta\text{CD]}_6] + [AdCOOH])$) in a complete range ($0.1 < r < 0.9$) were obtained. The NMR measurements were performed using the signal of D₂O as an internal standard. The continuous variation in the ¹H NMR chemical shift change “ $\Delta\delta \times X_{CD}$ ” ($\Delta\delta$ taken for the adamantyl H-γ, see Figure 9 for (**I**) and Figure S9 in SI for (**II**)) was plotted against X_{CD} .

3.2.4. Formation of Inclusion Complexes between P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-βCD]₆ ($n = 3$ or 4) and AdCOOH

The host–guest inclusion complexes between P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-βCD]₆ ($n = 3$ or 4) and AdCOOH were prepared according to the procedures previously reported [42,43]. A MeOH solution of AdCOOH was added to the aqueous solution of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)_n-βCD]₆ ($n = 3$ or 4) with adequate stoichiometry under vigorous stirring. After 24 h, the resulting translucent solution was filtered using a 0.45 μm membrane and lyophilized to give the corresponding supramolecular assembly.

4. Conclusions

1D and 2D NMR spectroscopic studies were carried out to determine the real conformation of two dendritic compounds containing a cyclotriphosphazene core and six βCD units in the periphery in D₂O solution. We corroborated that a dynamic tumbling process takes place at the glucopyranose unit directly linked to the spacer that binds the βCD to the cyclotriphosphazene core. This implies that a dynamic process with at least one linker chain is completely included in at least one of the six βCD cavities, resulting in a significant limitation of these dendritic compounds to form inclusion complexes. We have investigated whether this tumbling phenomenon was reversible for both dendritic compounds by studying the association to a guest molecule with high-affinity to the inner βCD cavity such as AdCOOH. A titration experiment was carried out by increasing the guest concentration. The NOE interactions shown in the NOESY spectra demonstrated that the tumbling process can be completely reversed for all βCD units in both dendritic compounds (**I**) and (**II**) with 1:1 stoichiometry. This shows that the stability of the host–guest complexes, as indicated by their association constants, is important for the reversibility of the tumbled βCD units. Finally, we demonstrated that dendritic compounds (**I**) and (**II**) are potential carriers for drugs containing a linked adamantane ring.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph14060556/s1>. Figure S1: DEPTQ-NMR spectrum of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₃-βCD]₆ (**I**) in D₂O; Figure S2: 2D NMR COSY spectrum of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₃-βCD]₆ (**I**) in D₂O; Figure S3: ¹H NMR spectrum of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆ (**II**) in D₂O; Figure S4: DEPTQ-NMR spectrum of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆ (**II**) in D₂O; Figure S5: 2D NMR HMQC spectrum of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆ (**II**) in D₂O; Figure S6: 2D NMR NOESY spectrum of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆ (**II**) in D₂O; Figure S7: 2D NMR COSY spectrum of P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆ (**II**) in D₂O; Figure S8: ¹H-NMR titration experiment of dendritic compound (**II**); Figure S9: Job plot for the inclusion complex of AdCOOH with βCD cavities in the dendritic compound (**II**); Figure S10: ¹H NMR spectrum of inclusion complex P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆ (**II**)/AdCOOH in D₂O; Figure S11: 2D NMR NOESY spectrum of inclusion complex P_3N_3 -[O-C₆H₄-O-(CH₂)₄-βCD]₆ (**II**)/AdCOOH in D₂O.

Author Contributions: Conceptualization, E.R. and I.G.-M.; methodology, K.S.-M.; investigation, K.S.-M. and I.G.-M.; data curation, M.V., F.C.-G. and J.I.; writing—original draft preparation, K.S.-M., I.G.-M. and E.R.; writing—review and editing, M.V., F.C.-G., E.R. and X.X.Z.; supervision E.R., J.I. and X.X.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The financial support for a Quebec-Mexico Bilateral Research Program from FRQNT of Quebec and CONACYT (Project 279380) of Mexico is gratefully acknowledged. K.S.-M. (No. 604166) is very grateful to Posgrado en Ciencias Químicas UNAM and CONACYT for the granted fellowship.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are available within this article and in the associated Supplemental Materials.

Acknowledgments: We thank Gerardo Cedillo for his assistance in the acquisition of NMR experiments.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Caminade, A.M. Inorganic dendrimers: Recent advances for catalysis, nanomaterials, and nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 5174–5186. [[CrossRef](#)]
2. Caminade, A.M. Phosphorus dendrimers as nanotools against cancers. *Molecules* **2020**, *25*, 3333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Majoral, J.P.; Caminade, A.M. Dendrimers Containing Heteroatoms (Si, P, B, Ge, or Bi). *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 845–880. [[CrossRef](#)]
4. Caminade, A.M.; Moineau-Chane Ching, K.I.; Delavaux-Nicot, B. The Usefulness of Trivalent Phosphorus for the Synthesis of Dendrimers. *Molecules* **2021**, *26*, 269. [[CrossRef](#)]
5. Wang, L.; Yang, Y.X.; Shi, X.; Mignani, S.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P. Cyclotriphosphazene core-based dendrimers for biomedical applications: An update on recent advances. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 884–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. El Brahm, N.; Mignani, S.M.; Caron, J.; El Kazzouli, S.; Bousmina, M.M.; Caminade, A.M.; Cresteil, T.; Majoral, J.P. Investigations on dendrimer space reveal solid and liquid tumor growth-inhibition by original phosphorus-based dendrimers and the corresponding monomers and dendrons with ethacrynic acid motifs. *Nanoscale* **2015**, *7*, 3915–3922. [[CrossRef](#)]
7. Caminade, A.M.; Maraval, V.; Laurent, R.; Turrin, C.O.; Sutra, P.; Leclaire, J.; Griffe, L.; Marchand, P.; Baudoin-Dehoux, C.; Rebout, C.; et al. Phosphorus dendrimers: From synthesis to applications. *Comptes Rendus Chim.* **2003**, *6*, 791–801. [[CrossRef](#)]
8. Mela, I.; Kaminski, C.F. Nano-vehicles give new lease of life to existing antimicrobials. *Emerg. Top. Life Sci.* **2021**, *4*, 555–566. [[CrossRef](#)]
9. Mishra, V.; Gupta, U.; Jain, N.K. Surface-engineered dendrimers: A solution for toxicity issues. *J. Biomater. Sci. Polym.* **2009**, *20*, 141–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Pooresmaeil, M.; Namazi, H. Advances in development of the dendrimers having natural saccharides in their structure for efficient and controlled drug delivery applications. *Eur. Polym. J.* **2021**, *148*, 1–35. [[CrossRef](#)]
11. Arima, H.; Motoyama, K. Recent findings concerning PAMAM dendrimer conjugates with cyclodextrins as carriers of DNA and RNA. *Sensors* **2009**, *9*, 6346–6361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Arima, H.; Motoyama, K.; Higashi, T. Sugar-appended polyamidoamine dendrimer conjugates with cyclodextrins as cell-specific non-viral vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1204–1214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sorroza-Martínez, K.; González Méndez, I.; Martínez-Serrano, R.D.; Solano, J.D.; Ruiiu, A.; Illescas, J.; Zhu, X.X.; Rivera, E. Efficient modification of PAMAM G1 dendrimer surface with β -cyclodextrin units by CuAAC: Impact on the water solubility and cytotoxicity. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 25557–25566. [[CrossRef](#)]
14. Sorroza-Martínez, K.; González-Méndez, I.; Vonlanthen, M.; Moineau-Chane Ching, K.I.; Caminade, A.M.; Illescas, J.; Rivera, E. First class of phosphorus dendritic compounds containing β -cyclodextrin units in the periphery prepared by CuAAC. *Molecules* **2020**, *25*, 4034. [[CrossRef](#)]
15. González-Méndez, I.; Hameau, A.; Laurent, R.; Bijani, C.; Bourdon, V.; Caminade, A.M.; Rivera, E.; Moineau-Chane Ching, K.I. β -Cyclodextrin PAMAM Dendrimer: How to Overcome the Tumbling Process for Getting Fully Available Host Cavities. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 1114–1121. [[CrossRef](#)]
16. Liu, Y.; Lin, T.; Cheng, C.; Wang, Q.; Lin, S.; Liu, C.; Han, X. Research Progress on Synthesis and Application of Cyclodextrin polymers. *Molecules* **2021**, *26*, 1090. [[CrossRef](#)]
17. Legros, V.; Vanhaverbeke, C.; Souard, F.; Len, C.; Désiré, J. β -Cyclodextrin-glycerol dimers: Synthesis and NMR conformational analysis. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2583–2590. [[CrossRef](#)]
18. Menuel, S.; Azaroual, N.; Landy, D.; Six, N.; Hapiot, F.; Monflier, E. Unusual inversion phenomenon of β -cyclodextrin dimers in water. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 3949–3955. [[CrossRef](#)]
19. Takashima, Y.; Fukui, Y.; Otsubo, M.; Hamada, N.; Yamaguchi, H.; Yamamoto, H.; Harada, A. Emission properties of cyclodextrin dimers linked with perylene diimide - effect of cyclodextrin tumbling. *Polym. J.* **2012**, *44*, 278–285. [[CrossRef](#)]

20. Yamauchi, K.; Miyawaki, A.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. Switching from altro- α -Cyclodextrin dimer to pseudo[1]rotaxane dimer through tumbling. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1284–1286. [[CrossRef](#)]
21. Mourer, M.; Hapiot, F.; Monflier, E.; Menuel, S. Click chemistry as an efficient tool to access β -cyclodextrin dimers. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7159–7163. [[CrossRef](#)]
22. Mourer, M.; Hapiot, F.; Tilloy, S.; Monflier, E.; Menuel, S. Easily accessible mono- and polytopic β -cyclodextrin hosts by click chemistry. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *1*, 5723–5730. [[CrossRef](#)]
23. Liu, Y.; Ke, C.F.; Zhang, H.Y.; Cui, J.; Ding, F. Complexation-induced transition of nanorod to network aggregates: Alternate porphyrin and cyclodextrin arrays. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 600–605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Marinho Miranda, G.; Ramos e Santos, V.O.; Reis Bessa, J.; Teles, Y.C.F.; Yahouédéhou, S.C.M.A.; Souza Goncalves, M.; Ribeiro-Filho, J. Inclusion complexes of non-steroidal anti-inflammatory drugs with cyclodextrins: A systematic review. *Biomolecules* **2021**, *11*, 361. [[CrossRef](#)]
25. Duchêne, D.; Bochot, A. Thirty years with cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **2016**, *514*, 58–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Narayanan, G.; Boy, R.; Gupta, B.S.; Tonelli, A.E. Analytical techniques for characterizing cyclodextrins and their inclusion complexes with large and small molecular weight guest molecules. *Polym. Test.* **2017**, *62*, 402–439. [[CrossRef](#)]
27. Grzelczak, M.; Liz-Marzán, L.M.; Klajn, R. Stimuli-responsive self-assembly of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 1342–1361. [[CrossRef](#)]
28. Whitesides, G.M.; Grzybowski, B. Self-assembly at all scales. *Science* **2002**, *295*, 2418–2421. [[CrossRef](#)]
29. Szejtli, J. Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1825–1845. [[CrossRef](#)]
30. Paolino, M.; Ennen, F.; Lamponi, S.; Cernescu, M.; Voit, B.; Cappelli, A.; Appelhans, D.; Komber, H. Cyclodextrin-adamantane host-guest interactions on the surface of biocompatible adamantyl-modified glycodendrimers. *Macromolecules* **2013**, *46*, 3215–3227. [[CrossRef](#)]
31. Eftink, M.R.; Andy, M.L.; Bystrom, K.; Perlmutter, H.D.; Kristol, D.S. Cyclodextrin Inclusion Complexes: Studies of the Variation in the Size of Alicyclic Guests. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6765–6772. [[CrossRef](#)]
32. Lai, W.F.; Rogach, A.L.; Wong, W.T. Chemistry and engineering of cyclodextrins for molecular imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 6379–6419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yu, G.; Chen, X. Host–guest chemistry in supramolecular theranostics. *Theranostics* **2019**, *9*, 3041–3074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech* **2005**, *6*, 329–357. [[CrossRef](#)]
35. Belica, S.; Sadowska, M.; Stępnia, A.; Graca, A.; Pałecz, B. Enthalpy of solution of α - And β -cyclodextrin in water and in some organic solvents. *J. Chem. Thermodyn.* **2014**, *69*, 112–117. [[CrossRef](#)]
36. Shikata, T.; Takahashi, R.; Onji, T.; Satokawa, Y.; Harada, A. Solvation and dynamic behavior of cyclodextrins in dimethyl sulfoxide solution. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 18112–18114. [[CrossRef](#)]
37. Daschakraborty, S. How do glycerol and dimethyl sulphoxide affect local tetrahedral structure of water around a nonpolar solute at low temperature? Importance of preferential interaction. *J. Chem. Phys.* **2018**, *148*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Uria-Canseco, E.; Perez-Casas, S.; Navarrete-Vázquez, G. Thermodynamic characterization of the inclusion complexes formation between antidiabetic new drugs and cyclodextrins. *J. Chem. Thermodyn.* **2019**, *129*, 55–60. [[CrossRef](#)]
39. Potier, J.; Menuel, S.; Azaroual, N.; Monflier, E.; Hapiot, F. Limits of the inversion phenomenon in triazolyl-substituted β -cyclodextrin dimers. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 1547–1556. [[CrossRef](#)]
40. Harries, D.; Rau, D.C.; Parsegian, V.A. Solutes probe hydration in specific association of cyclodextrin and adamantane. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2184–2190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Rodell, C.B.; Mealy, J.E.; Burdick, J.A. Supramolecular Guest-Host Interactions for the Preparation of Biomedical Materials. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2279–2289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. González-Méndez, I.; Aguayo-Ortiz, R.; Sorroza-Martínez, K.; Solano, J.D.; Porcu, P.; Rivera, E.; Dominguez, L. Conformational analysis by NMR and molecular dynamics of adamantane-doxorubicin prodrugs and their assemblies with β -cyclodextrin: A focus on the design of platforms for controlled drug delivery. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28*, 115510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sheng, J.; Wang, Y.; Xiong, L.; Luo, Q.; Li, X.; Shen, Z.; Zhu, W. Injectable doxorubicin-loaded hydrogels based on dendron-like β -cyclodextrin–poly(ethylene glycol) conjugates. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 1680–1688. [[CrossRef](#)]