

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE QUÍMICA



GRADO EN QUÍMICA

**SÍNTESIS ACELERADA DE DENDRÍMEROS
MEDIANTE CICLOADICIÓN TÉRMICA
AZIDA-ALQUINO**

Curso 2013/2014

Samuel Parcero Bouzas

Septiembre 2014

El presente trabajo se ha realizado en el **Centro Singular de Investigación en Química Biológica y Materiales Moleculares (CiQUS)**.

C/ Jenaro de la Fuente s/n (*esquina con Avda. Mestre Mateo*)

Campus Vida

Universidad de Santiago de Compostela

15782 Santiago de Compostela

España

D. RICARDO RIGUERA VEGA, Catedrático Titular del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela y D. EDUARDO FERNÁNDEZ MEGIA, Profesor Titular de Química Orgánica en la Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMAN: Que Don **Samuel Parcero Bouzas** realizó el trabajo titulado **“Síntesis Acelerada de Dendrímeros mediante Cicloadición Térmica Azida-Alquino”** bajo nuestra dirección en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela, dedicando a su ejecución un tiempo superior al mínimo legal requerido; autorizando, por lo tanto, a su presentación como Trabajo de Fin de Grado en Química.

Santiago de Compostela a de Septiembre de .

Fdo. Ricardo Riguera Vega

Fdo. Eduardo Fernández Megía

ABREVIATURAS

δ	Desplazamiento químico expresado en ppm
μL	Microlitros
AAC	<i>Azide-Alkyne Cycloaddition</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados
c	Cuartete
CuAAC	<i>Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition</i>
d	Doblete
Da	Dalton
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DD	<i>Drug Delivery</i>
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	<i>N,N'</i> -Disuccinimidyl carbonate
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
eq	Equivalentes
F.D.A.	Food and Drug Agency
g	Gramos
h	Horas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hz	Hertzios
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
M	Molar
m	Multiplete
mg	Miligramos
mmol	Milimoles
mL	Mililitros
PEG	Polietilenglicol

PIC	Polyion Complex
ppm	Partes por millón
Py	Piridina
PyBrop	<i>Bromotripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate</i>
q	Quintuplete
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singulete
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente

ÍNDICE

1. ABSTRACT	6
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	7
2.1. DENDRÍMEROS.....	7
2.2. SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS.....	8
2.3. COPOLÍMEROS DE BLOQUE PEG-DENDRÍMERO.....	10
2.4. SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS DENDRÍTICOS.....	13
2.5. APLICACIONES DE LOS COPOLÍMEROS DE BLOQUE PEG-DENDRÍMERO.....	14
2.6. QUÍMICA “CLICK”	16
3. OBJETIVOS	20
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
4.1. MATERIALES	21
4.2. PROCEDIMIENTO GENERAL	22
4.2.1. Síntesis de la unidad de repetición (3)	22
4.2.2. Síntesis del carbonato activo (5).....	22
4.2.3. Síntesis de 3-azidopropilamina (7).....	23
4.2.4. Síntesis PEG-linker (8).....	23
4.2.5. Síntesis PEG-[G1]-Cl (9).....	24
4.2.6. Síntesis PEG-[G1]-N ₃ (10).....	25
4.2.7. Síntesis PEG-[G2]-Cl (11).....	26
4.2.8. Síntesis PEG-[G2]-N ₃ (12).....	27
4.2.9. Síntesis PEG-[G3]-Cl (13).....	28
4.2.10. Síntesis PEG-[G3]-N ₃ (14).....	29
4.2.11. Procedimiento general para la síntesis de la unidad de repetición con enlace amida.....	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
5.1. CONSIDERACIONES.....	31
5.2. SÍNTESIS DE LA UNIDAD DE REPETICIÓN	32
5.3. ACTIVACIÓN DEL PEG	34
5.4. SÍNTESIS DE PEG-[G3]-N ₃	38
5.5. SÍNTESIS UNIDAD DE REPETICIÓN CON ENLACES AMIDA	47
6. CONCLUSIONS.....	49
7. BIBLIOGRAFÍA	50

1. ABSTRACT

Dendrimers are synthetic tree-like macromolecules composed of repetitive layers of branching units that emerge from a central core. They are prepared in a controlled iterative fashion, through generations with null dispersity, precise molecular weight, and discrete properties. Their globular architecture and size, in the nanometre scale, render dendrimers with applications in a plethora of fields from catalysis to material science.

The synthesis of dendrimers is however a slow process that requires extensive purification steps. The objective is the design of a synthetic strategy to obtain dendrimers through an accelerated process. This project covers the synthesis of three generations and the final azide functionalization of a new block copolymer (PEG-Dendrimer family). As linear block we used a polyethylene glycol (PEG) with average molecular mass 5000 Da. The construction of the dendritic block has been carried out through a divergent method in whereby we used subsequent [3+2] azide-alkyne cycloadditions.

Also, we studied several synthetic strategies for the construction of a repeating unit characterized by amide bonds to the subsequent formation of the dendritic block.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. DENDRÍMEROS

Los dendrímeros, descritos por primera vez por Newkome¹ y Tomalia² en 1985, son una clase de macromoléculas sintéticas con una organización tridimensional altamente ramificada y regular. Este tipo de arquitectura arborescente es muy común en la naturaleza, y podemos encontrar elementos naturales con arquitecturas dendríticas tales como pueden ser neuronas (Figura 1), también las observamos en rayos y en las propias raíces y copas de los árboles. De hecho, la palabra dendrímero deriva de los términos griegos “*dendron*” que significa “árbol” y “*meros*” que significa “parte”.

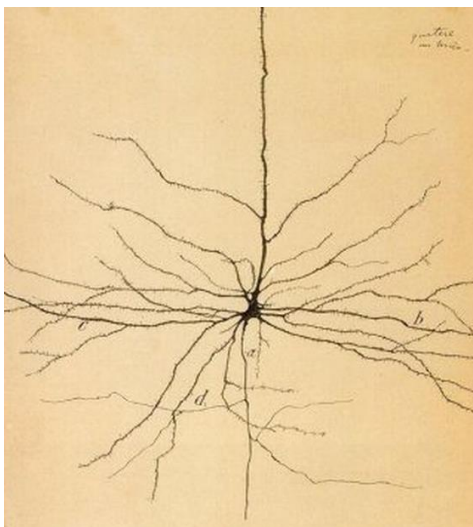


Figura 1. Arquitectura dendrítica de una neurona, dibujo de Santiago Ramón y Cajal.

En lo que refiere a su estructura, los dendrímeros están compuestos por subunidades de repetición más pequeñas. Estas subunidades crecen y se van ramificando, adquiriendo estructuras más complejas a medida que crece el dendrímero, de manera radial desde un núcleo central o “*core*”. En un dendrímero podemos distinguir 3 partes claramente diferenciadas: i) el **núcleo** o **core** es el responsable de la forma tridimensional del dendrímero, ii) el **interior**, es la parte ramificada, cuya estructura y naturaleza química afectará a la propiedades de encapsulación del dendrímero, ii) **periferia**, la periferia del dendrímero puede ser funcionalizada con un gran número y variedad de grupos funcionales, lo que definirá en gran medida las propiedades químicas y biológicas del dendrímero.

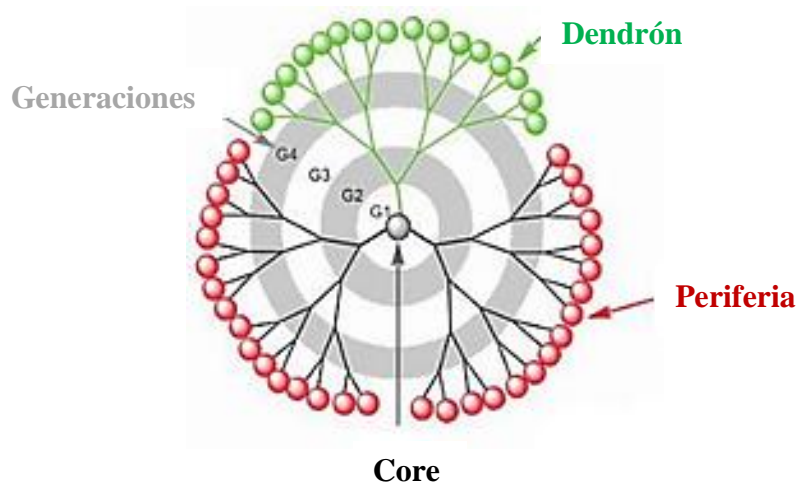


Figura 2. Representación de las partes de un dendrónimo.

Los sucesivos puntos de ramificación a partir de los cuales crece y se va ramificando el dendrónimo desde el *core* en las sucesivas etapas de crecimiento, son puntos focales ordenados concéntricamente que se definen como generaciones (G1, G2, G3, G4, etc.). Cabe destacar que el diámetro de los dendrónimos aumenta linealmente con la generación, mientras que el número de grupos de la periferia lo hace exponencialmente, lo que puede derivar en una gran congestión estérica en la superficie de dendrónimos de generaciones elevadas. Por ello los dendrónimos de generación baja son generalmente flexibles y abiertos, mientras que los dendrónimos de generaciones mayores forman estructuras tridimensionales más densas y complejas.

2.2. SÍNTESIS DE DENDRÓNIMOS

A diferencia de los polímeros tradicionales, que dependiendo de la técnica de polimerización tienen un mayor o menor grado de polidispersidad, los dendrónimos son macromoléculas completamente monodispersas que se sintetizan a través de una secuencia de pasos iterativa controlada, a través de etapas de crecimiento con dispersión nula, peso molecular preciso y en la que cada paso conduce a un material de generación superior.

Existen dos estrategias sintéticas complementarias para la preparación de dendrónimos: la síntesis **divergente**^{1,2,3} y la síntesis **convergente**⁴.

En el método **divergente** (Figura 3) la síntesis comienza con una molécula polifuncional que actúa de núcleo, sobre la cual se unen químicamente capas sucesivas de unidades monoméricas. Se utiliza la secuencia repetitiva de dos reacciones para añadir generaciones al núcleo, las cuales corresponden a la activación de los grupos funcionales y su posterior ensamblaje con los otros monómeros. La ventaja del método divergente es que pueden lograrse arquitecturas de alto peso molecular a escala nanométrica, con la facilidad de automatizar el proceso. La principal desventaja es que los grupos funcionales terminales no siempre pueden hacerse reaccionar estequiométricamente, dando pie a defectos estructurales. Adicionalmente, la separación de productos defectuosos es muy complicada debido a las casi idénticas propiedades con el producto deseado.

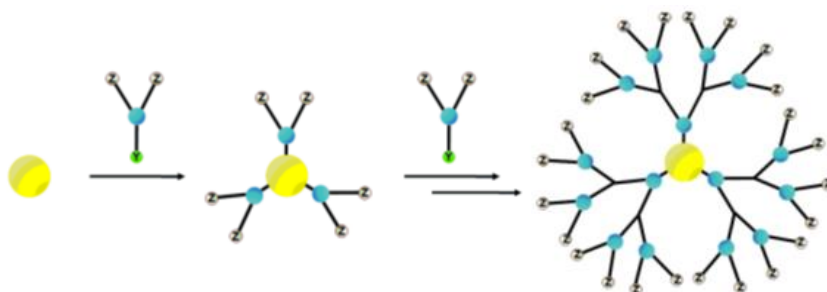


Figura 3. Representación del método divergente de síntesis de dendrímeros.

El método **convergente** (Figura 4) consiste en obtener fragmentos dendríticos llamados dendrones, por medio de reacciones repetitivas, los cuales se unen en una etapa posterior a un núcleo central consistente en una molécula polifuncional. La funcionalidad del núcleo determina la cantidad de dendrones que pueden ligarse. Debido al pequeño número de grupos funcionales terminales involucrados, este tipo de síntesis tiene la ventaja que no produce los defectos estructurales que comúnmente se observan en el método divergente. Sin embargo, la síntesis convergente se emplea normalmente sólo para formar estructuras dendríticas de generaciones bajas, ya que el impedimento estérico limita el acoplamiento de dendrones voluminosos a un *core* de dimensiones reducidas.

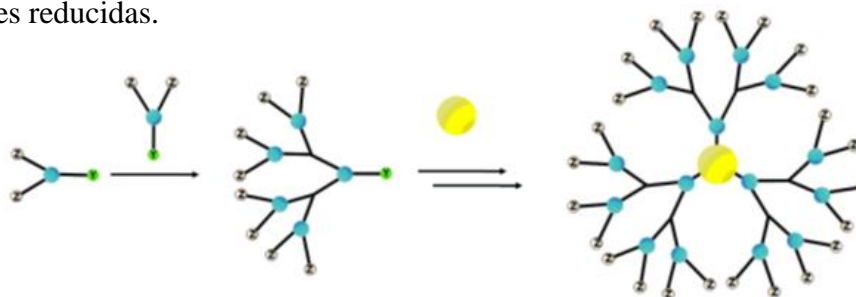


Figura 4. Representación del método convergente de síntesis de dendrímeros.

2.3. COPOLÍMEROS DE BLOQUE PEG-DENDRÍMERO

Los copolímeros de bloque dendríticos son estructuras híbridas que combinan 2 tipos diferentes de arquitecturas macromoleculares. Dada la relación entre la estructura molecular y propiedades, combinar en una misma macromolécula dos subunidades con organizaciones tridimensionales diferentes, como pueden ser uno o varios dendrímeros de estructuras ramificadas con una o varias cadenas poliméricas lineales, pueden tener un efecto muy importante en las propiedades finales del material híbrido resultante.

Estas propiedades no sólo se ven afectadas por la proporción relativa de los componentes, sino también por sus propiedades intrínsecas, por la posición que ocupen dentro de la macromolécula y por la presencia de grupos funcionales en lugares específicos de la entidad híbrida.

Los híbridos formados por polímeros lineales y macromoléculas dendríticas pueden dividirse en 4 grandes familias (Figura 5):

- Copolímeros dibloque AB.
- Copolímeros tribloque ABA, donde B es un polímero lineal.
- Copolímeros funcionalizados sobre la cadena del polímero lineal (“*dendronized copolymers*”).
- Copolímeros estrella (“*star copolymers*”).

En este trabajo la síntesis se centró en un copolímero dibloque AB.

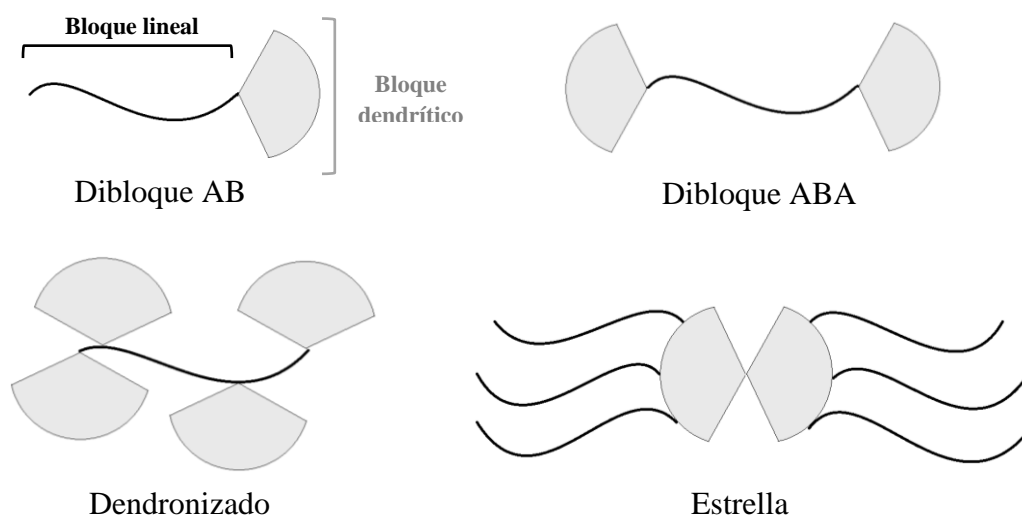


Figura 5. Estructuras de los diferentes copolímeros dendríticos.

Estos copolímeros de bloque han suscitado gran interés debido a su capacidad de formar nanoestructuras en disolución como consecuencia de la diferente solubilidad de los bloques. Esta propiedad ha sido explotada en el contexto de la encapsulación y liberación controlada de fármacos así como otras aplicaciones biomédicas⁵. Para ser viable desde el punto de vista clínico, el nanotransportador debe cumplir con las siguientes especificaciones:

- Estar compuesto de un material biocompatible, perfectamente caracterizado y que pueda ser obtenido de una manera reproducible.
- Presentar una capacidad de acumulación en determinados lugares del organismo específica.
- Ser soluble en condiciones acuosas o poderse presentar en forma coloidal.
- Poseer una elevada capacidad de incorporación del principio activo.
- Presentar tiempos de circulación prolongados, una baja cinética de agregación y ser estables frente al almacenamiento.

Para poder cumplir todos estos requerimientos, hay una serie de factores clave que han facilitado enormemente el éxito clínico de los nanotransportadores utilizados en la administración de fármacos, siendo la PEGuilación una técnica que, a día de hoy, es de uso general para aumentar la solubilidad y tiempo de vida medio en el torrente sanguíneo de proteínas, fármacos de bajo peso molecular y todo tipo de sistemas de DD (“*Drug Delivery*”)⁶.

En este contexto, los copolímeros de bloque dendríticos en los cuales el bloque lineal está formado a partir de PEG (polietilenglicol) han sido objeto de estudio en los últimos años, especialmente en los campos de la nanotecnología y biomedicina. En general, la solubilidad acuosa, baja toxicidad e inmunogenicidad de los dendrímeros puede verse sustancialmente mejorada mediante el acoplamiento de cadenas de PEG al bloque dendrítico.

A continuación veremos con más detalle porqué el PEG es una gran alternativa en la creación de copolímeros de bloque para formar nanotransportadores en la campo de la DD.

2.4. SÍNTESIS DE COPOLÍMEROS DENDRÍTICOS

Existen tres aproximaciones sintéticas para la preparación de copolímeros de bloque dendríticos (Figura 6)⁷:

I) **Estrategia sintética de acoplamiento directo (“direct-coupling strategy”)**⁸:

Esta estrategia se basa en el acoplamiento de los extremos reactivos de una cadena de un polímero lineal al punto focal de un dendrón o bloque dendrítico, previamente sintetizado mediante una estrategia convergente. Esta aproximación cuenta con varias ventajas: el copolímero se forma normalmente en un único paso a partir de los componentes lineales y dendríticos; el aislamiento y purificación del producto final puede llevarse a cabo fácilmente por precipitación/extracción selectiva o bien mediante técnicas cromatográficas, como puede ser la cromatografía de exclusión por tamaño y esta estrategia también nos permite caracterizar en detalle tanto el polímero lineal como el dendrítico antes del acoplamiento.

II) **Crecimiento del bloque dendrítico sobre el polímero lineal (“chain-first strategy”)**⁹:

Los copolímeros se preparan por síntesis divergente a partir de los grupos funcionales en los extremos de una cadena polimérica lineal previamente sintetizada. Hoy en día, esta es la estrategia empleada con mayor frecuencia en la síntesis de copolímeros de bloque dendríticos debido a su gran versatilidad frente a la naturaleza del grupo dendrítico. Otro factor determinante es el amplio número de familias de dendrímeros que pueden prepararse mediante una estrategia divergente. A pesar de ser la aproximación más comúnmente empleada, esta metodología presenta algunas limitaciones. Así, la síntesis divergente de dendrímeros de generaciones superiores a G3 se hace difícil, ya que es necesario emplear reacciones extremadamente eficientes para poder transformar químicamente un número elevado de grupos funcionales.

III) Polimerización sobre el bloque dendrítico (“*Dendron-first strategy*”)¹⁰:

En esta estrategia, los copolímeros dendríticos se obtienen mediante la polimerización de un polímero lineal iniciada en el punto focal de un dendrón. Cabe destacar que esta estrategia ha demostrado ser de gran utilidad para la preparación de copolímeros basados en poli(bencil éter), pero desafortunadamente, a día de hoy, no ha sido empleada con otras estructuras dendríticas.

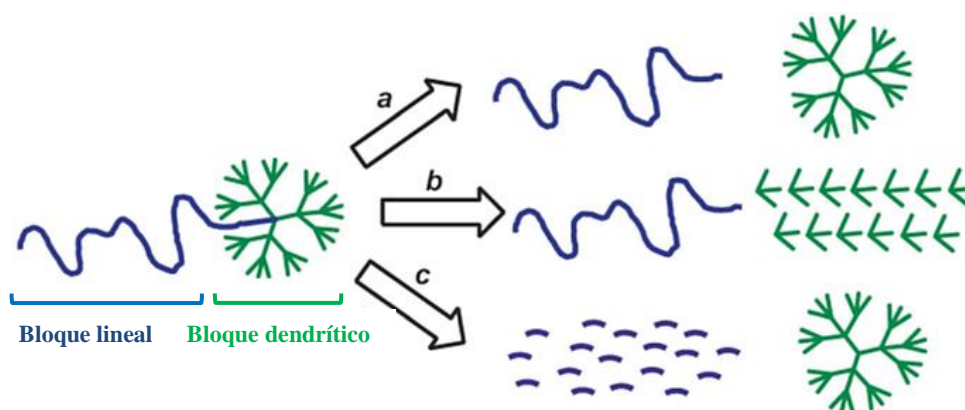


Figura 6. Estrategias para la síntesis de copolímeros de bloque dendríticos: (a) direct-coupling strategy, (b) chain-first, (c) dendron-first.

2.5. APLICACIONES DE LOS COPOLÍMEROS DE BLOQUE PEG-DENDRÍMERO

Como ya se ha comentado los copolímeros de bloque PEG-Dendrímico han adquirido gran relevancia en el campo de la administración y en el transporte de fármacos¹¹. Especialmente durante las últimas décadas, las proteínas bioactivas (macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos que regulan o desempeñan algún proceso biológico) han despertado un gran interés como agentes terapéuticos debido a su elevada y selectiva actividad en el tratamiento de enfermedades.

No obstante, el uso de proteínas como agentes terapéuticos presenta dos grandes inconvenientes: el transporte de estas proteínas es lento e inefectivo a través de las barreras biológicas y además presentan un corto tiempo de vida media in vivo

provocado por la metabolización y degradación enzimática. Por lo tanto, el estudio de sistemas que permitan transportar estas proteínas de una manera eficaz y efectiva ha adquirido una gran relevancia.

En este contexto, las micelas PIC (Polyion Complex)^{12, 13} se presentan como un prometedor vehículo de transporte para proteínas bioactivas, ya que permiten la incorporación de las mismas mediante uniones no covalentes y en condiciones fisiológicas, preservando así su actividad. Las micelas PIC son un tipo de micelas poliméricas que se caracterizan porque su formación se basa principalmente en interacciones electrostáticas entre polímeros o macromoléculas de carga opuesta, en las que una de las especies es un copolímero de bloque que incorpora un bloque hidrofílico y biocompatible, como es el caso de los PEG-Dendrimeros. Una ventaja fundamental con respecto a otros sistemas de transporte es que la propia proteína bioactiva es, junto con el polímero de bloque, la otra parte constituyente de la micela. De este modo, no es necesaria la preparación de un sistema en el que posteriormente se encapsule la proteína. Además la formación de las micelas PIC con proteínas bioactivas se realiza en medio acuoso, sin necesidad de formar enlaces covalentes, y bajo condiciones muy suaves, por lo que la actividad de la proteína no se ve afectada.

Sin embargo, el ámbito de aplicación de las micelas PIC no sólo se limita a su uso como transportadores de proteínas terapéuticas, sino que estas micelas también tienen una gran aplicación como vectores de material genético¹⁴ (ADN y ARN) no virales. La terapia génica es un procedimiento terapéutico mediante el cual un gen funcional es insertado en las células de un paciente para corregir un defecto genético o para dotar a las células de una nueva función. La terapia génica tiene un gran potencial, no sólo en el tratamiento de enfermedades hereditarias, sino también en el tratamiento de otras enfermedades adquiridas como el cáncer o enfermedades infecciosas. Complementariamente, en ciertas situaciones lo que se pretende es silenciar, inhibir o bloquear el funcionamiento de aquellos genes cuya intervención contribuye al desarrollo de la enfermedad. Esto último puede conseguirse específicamente mediante el uso de siRNA.

Por todos estos motivos los copolímeros de bloque PEG-Dendrimeros se han consolidado durante la última década como una gran opción para el diseño de nanotransportadores en el campo de la farmacología y la nanomedicina. Es por esto que

se necesitan desarrollar procedimientos acelerados y eficaces en la síntesis de PEG-Dendrimeros que permitan sustituir la costosa construcción intrínseca a este tipo de estructuras.

2.6. QUÍMICA “CLICK”

El concepto de “*click chemistry*” fue introducido por los profesores Kolb, Finn y Sharpless en 2001 en el campo del descubrimiento de fármacos¹⁵, como una serie de procesos altamente termodinámicos y ortogonales que permiten la obtención de nuevos compuestos de interés biológico a partir de reactivos altamente energéticos. Gracias a estas dos características, alta reactividad y ortogonalidad, las reacciones tipo “*click*” transcurren con rendimientos cuantitativos (o casi cuantitativos en la mayoría de los casos) y, por tanto, sólo se requieren purificaciones simples.

Con el objetivo de constituir un marco entorno al concepto de “*click chemistry*”, se establecieron una serie de parámetros o condiciones que, por definición, toda reacción debe cumplir para que sea considerada como una reacción “*click*”. Estas son: las reacciones deben de ser modulares y de amplio alcance, tener un rendimiento químico muy alto, generar subproductos y productos inofensivos que puedan ser aislados por métodos no cromatográficos, ser estereoespecífica (aunque no necesariamente enantioselectiva) y poseer una elevada economía atómica. Asimismo deben ser reacciones fáciles de llevar a cabo desde el punto de vista experimental, con condiciones de reacción sencillas y reactivos accesibles y usar disolventes “*green*” fácilmente eliminables.

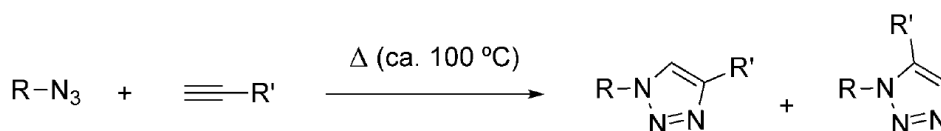
Si bien, existe una gama considerable de reacciones químicas que en un principio podrían reunir estos criterios, los ejemplos más destacados provienen a menudo de cuatro grandes clases de reacciones que encajan perfectamente dentro del marco de la química “*click*”:

- i) Reacciones de sustitución nucleófila: como por ejemplo reacciones de apertura de anillos de ciclos tensionados tales como epóxidos.
- ii) Adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono: como por ejemplo epoxidación, dihidroxilación y adiciones de Michael.

- iii) Cicloadiciones de especies insaturadas: como por ejemplo cicloadiciones 1,3-dipolares y reacciones Diels-Alder.
- iv) Reacciones de carbonilos: excluyendo las condensaciones aldólicas como por ejemplo formación de ureas, tioureas, heterociclos aromáticos, éteres de oxima, hidrazonas y amidas.

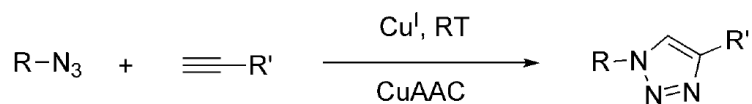
De entre toda la colección de reacciones “*click*”, la reacción de cicloadición [3+2] de compuestos 1,3-dipolares de Huisgen ha sido reconocida como el más grande exponente de esta particular química¹⁶. La formación de los heterociclos resultantes de estas cicloadiciones suele encontrarse muy favorecida termodinámicamente, sin embargo la elevada energía de activación de estos procesos hace que en muchas ocasiones tengan que llevarse a cabo mediante el empleo de calentamientos prolongados.

La reacción de cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos terminales de Huisgen, constituye la ruta más eficiente para sintetizar 1, 2,3-triazoles. Las azidas son derivados 1,3-dipolares cuya descomposición se encuentra muy favorecida termodinámicamente, aunque debido a su elevada estabilidad cinética pueden ser aisladas. La reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino (AAC), es una reacción que en su versión térmica clásica (Esquema 1), conduce a la formación de 1, 2, 3-triazoles de modo no regioselectivo.



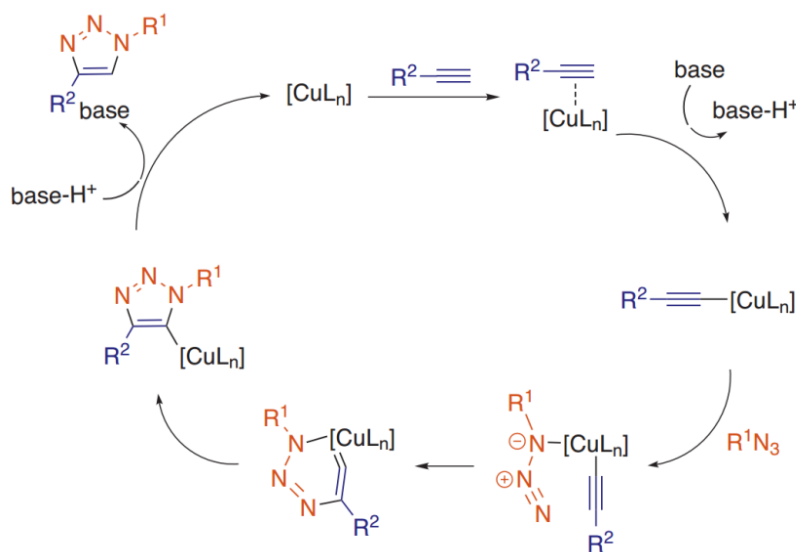
Esquema 1. Representación esquemática de la cicloadición térmica [3+2] azida-alquino.

Sin embargo en 2002, los grupos de Meldal¹⁷ en Dinamarca, y Sharpless y Fokin¹⁸ en EE.UU descubrieron que la adición de cantidades catalíticas de una sal de cobre produce un aumento significativo de la velocidad de reacción, que permite efectuar estas transformaciones a temperatura ambiente y en tiempos de reacción muy cortos (Esquema 2). La reacción catalizada por cobre es mucho más rápida, procediendo cuantitativamente en minutos u horas a temperatura ambiente frente a horas o días a temperatura elevada necesarios en la térmica clásica.



Esquema 2. Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] azida-alquino catalizada por cobre.

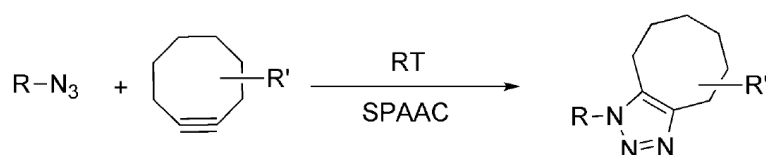
Asimismo, en presencia de cobre se obtienen regioselectivamente los triazoles 1,4-disustituídos. Estas reacciones pueden llevarse a cabo también en disolventes apróticos y próticos, e incluso en agua, en un rango amplio de valores de pH. Además, la reacción presenta una tolerancia elevada a la presencia de una amplia variedad de grupos funcionales. El mecanismo de la cicloadición azida-alquino catalizada por Cu (I) (“*Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*”, CuAAC) ha sido objeto de considerable atención. En relación a éste, cabe mencionar en primer lugar la participación de un intermedio de tipo acetiluro de cobre, por lo que la reacción se encuentra limitada a alquinos terminales (Esquema 3).



Esquema 3. Mecanismo de la cicloadición [3+2] azida-alquino catalizada por cobre.

Desde que se definió el concepto de química “*click*”, esta estrategia ha sido empleada en el desarrollo de numerosas áreas de investigación. En este sentido, muchas aplicaciones biomédicas requieren transformaciones químicas directas y sencillas (por ejemplo evitando pasos de protección-desprotección) bajo condiciones de reacción extremadamente suaves. Así, procesos que implican el uso de biomoléculas o sustratos lábiles se llevan a cabo normalmente a temperatura ambiente y/o en disolución acuosa, para no comprometer su integridad biológica y estructural.

A pesar de la demostrada fiabilidad de la CuAAC, la presencia de cobre ha limitado el uso de esta reacción para aplicaciones en sistemas vivos por sus posibles efectos citotóxicos, y además, el catalizador de Cu (I) puede inducir graves daños estructurales a las biomoléculas y en ocasiones puede ser muy lenta a las bajas concentraciones micromolares que típicamente se requieren para los propósitos de bioconjugación. Con el objetivo de superar esta limitación, el grupo de la profesora C. Bertozzi ha propuesto el uso de cicloalquinos tensionados (concretamente ciclooctinos) para disminuir la energía de activación del proceso (“*strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*”, SPAAC)¹⁹ (Esquema 4).



Esquema 4. Esquema de la reacción de cicloadición [3+2] SPAAC.

Como ya se ha comentado, el uso de cobre como catalizador en la AAC, aunque eficaz, puede ser un inconveniente potencial para posteriores aplicaciones biomédicas (debido a su citada citotoxicidad). En particular, este efecto se produce en grandes moléculas que contienen múltiples grupos funcionales capaces de unirse con los iones de cobre. Se ha demostrado que macromoléculas compuestas por bloques dendríticos con cadenas de polietilenglicol dieron lugar a dendrones contaminados por cantidades significativas de cobre, descartando así su uso en aplicaciones farmacéuticas.

Por lo tanto las estrategias sintéticas que combinen un uso práctico y ventajas de la CuAAC sin la necesidad de un catalizador metálico, serían de un gran valor en aplicaciones biológicas. En consecuencia, durante los últimos años se han estado estudiando alternativas al uso de catalizadores metálicos. Esta “*Metal-free Click Chemistry*” es un campo de investigación creciente y en desarrollo²⁰. Un ejemplo muy interesante es el descubrimiento de que, debido a efectos electrónicos, alquinos activados, deficientes en electrones, tales como los derivados del ácido acetilendicarboxílico reaccionan con azidas a bajas temperaturas sin la necesidad de uso de un catalizador de cobre, pudiendo incluso reaccionar a temperatura ambiente alquinos activados solamente con un grupo funcional ácido o éster.

3. OBJETIVOS

En el presente proyecto se pretende diseñar una estrategia sintética que permita la obtención acelerada de dendrímeros evitando el uso de catalizadores metálicos, esto es, dentro del marco de la “*Metal-free Click Chemistry*”. Nuestros principales objetivos son esencialmente tres:

- Síntesis acelerada de un nuevo copolímero de bloque PEG-dendrímero utilizando una “*chain-first strategy*”.
- Llevar a cabo la síntesis de la estructura dendrítica del copolímero de bloque mediante cicloadiciones [3+2] azida-alquino de una manera rápida y eficaz sin necesidad de utilizar catalizadores metálicos.
- Síntesis y desarrollo de una nueva unidad de repetición caracterizada por enlaces de tipo amida para la posterior construcción del bloque dendrítico.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIALES

Los espectros de RMN se registraron en espectrómetros Bruker DRX-500 (500 MHz resonancia de ^1H); Varian Mercury 300 (300 MHz resonancia ^1H). Para los espectros de RMN se empleó CDCl_3 . Los desplazamientos químicos están expresados en ppm (δ). Se utilizó el programa MestreNova (*Mestrelab Research*) para el procesado de espectros.

Para la cromatografía en capa fina (CCP) se empleó gel de sílice 60F₂₅₄ Merck y las manchas se visualizaron bajo luz UV (254nm) para compuestos que absorben a dicha longitud de onda, y cuando fue necesario se utilizó como agente revelador permanganato potásico.

Los espectros de infrarrojos usados para el seguimiento de las reacciones fueron registrados en un espectrómetro Perkin-Elmer SpectrumTwo.

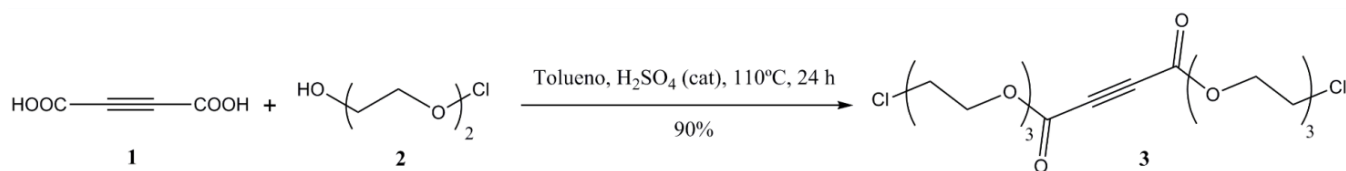
Para la síntesis de los compuestos se emplearon disolventes de grado HPLC y secos (cuando fue necesario), bajo atmosfera de Ar, inmediatamente antes de su uso.

El secado de las disoluciones obtenidas tras la elaboración de cada reacción se llevó a cabo sobre Na_2SO_4 anhidro. Estas disoluciones secas fueron concentradas a presión reducida mediante el uso de rotavapor y posterior tratamiento a alto vacío.

La purificación de los compuestos se realizó mediante cromatografía líquida de media presión en un equipo Teledyne ISCO CombiFlashRf con columnas de sílica RediSep Rf 4g fase normal.

4.2. PROCEDIMIENTO GENERAL

4.2.1. Síntesis de la unidad de repetición (3)

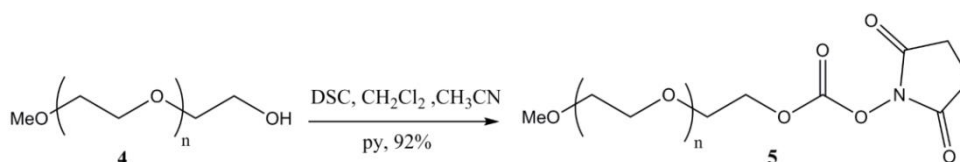


En un matraz de fondo redondo acoplado a un montaje Dean-Stark se disolvió el reactivo **1** (2.00 g, 17.5 mmol) en Tolueno (30mL) bajo Argón. Seguidamente se añadió **2** (6.5 g, 38.5 mmol). Por último se adicionó H₂SO₄ en cantidad catalítica (5 gotas). La disolución se agitó durante 24 h a una temperatura de 110°C. Posteriormente, la disolución se dejó venir a t.a. y se extrajo con EtOAc 3 x (200ml). La fase orgánica combinada se lavó con una disolución saturada de NaHCO₃, se secó y concentró. El crudo se purificó el producto mediante una columna cromatográfica (silica gel, y una mezcla de Hexano y EtOAc 1:1 como eluyente). Esto condujo al compuesto **3** (6.54g, 90%) como un aceite dorado.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.26 (s, 2H), 4.38 (dd, *J* = 5.5, 3.9 Hz, 4H), 3.78-3.61 (m, 20H).

¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ: 151.928, 75.169, 71.669, 70.971, 68.765, 66.054, 43.009.

4.2.2. Síntesis del carbonato activo (5)

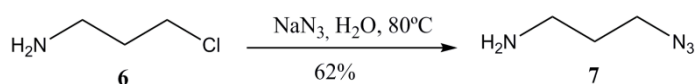


Se introdujo el reactivo **4** (2 g, 0.4 mmol) en un matraz de fondo redondo bajo atmósfera de Ar. Se añadió piridina seca (400 µL) y la suspensión resultante se disolvió

en una mezcla de CH₂Cl₂ (3.2 mL) y CH₃CN (800 μL). A continuación se añadió DSC (0.5164 g, 0.002 mmol). La reacción se dejó 12 h a t.a. con agitación magnética. Posteriormente se concentró la disolución en el rotavapor hasta que se observó la formación de un sólido. El crudo de reacción se purificó por precipitación disolviendo el sólido en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y añadiendo Et₂O (250mL). Tras dejarlo 4 h a -20°C, el precipitado obtenido se filtró y se lavó con Et₂O 3 x (25mL). Se obtuvo el compuesto **5** (1.907 g, 92%) como un sólido blanco.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.26 (s, 2H), 4.46 (t, *J* = 4.46 Hz, 2H), 3.89-3.40 (m, 464H), 3.37 (s, 3H), 2.83 (s, 4H).

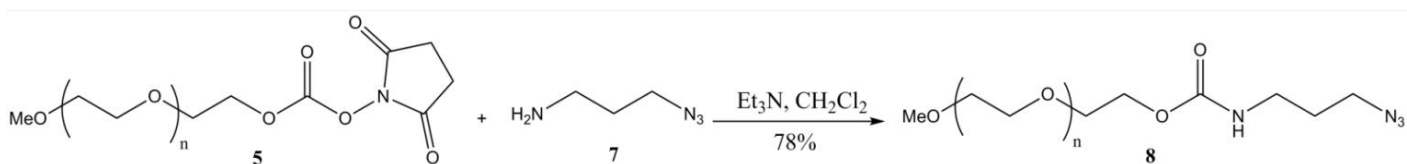
4.2.3. Síntesis de 3-azidopropilamina (7)



En un tubo sellado que contenía **6** (0.5 g, 3.846 mmol) y NaN₃ (0.750 g, 11.537mmol) se añadió H₂O (3.846 mL). Se dejó la reacción con agitación magnética a 80°C durante 15 h. A continuación se dejó venir la reacción a t.a. y se enfrió en un baño de agua-hielo. Después se añadieron 1.5 g de KOH en la disolución y se esperó a su completa disolución. Seguidamente realizamos tres extracciones en frío con Et₂O 3 x (10 ml). La fase orgánica combinada se secó y se concentró. Se obtuvo el compuesto **7** (0.2225 g, 62%) como un líquido verde claro.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.26 (s, 2H), 3.38 t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.81(t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.74 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H).

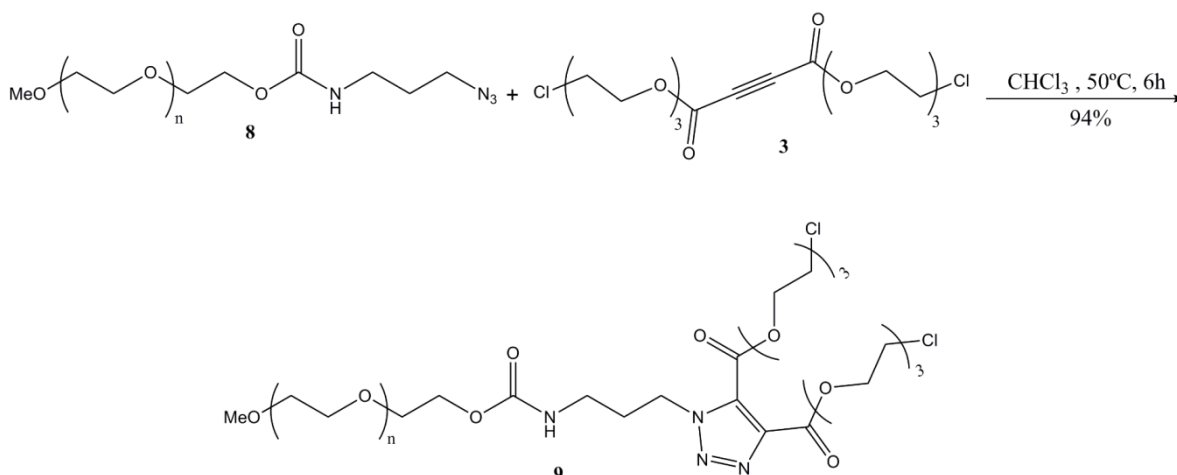
4.2.4. Síntesis PEG-linker (8)



Se introdujo el reactivo **5** (0.6 g, 0.115 mmol) en un matraz de fondo redondo y se añadió **7** (0.058 g, 0.577 mmol) bajo atmósfera de Ar. Posteriormente se adicionó Et₃N (10 µL, 0.346 mmol) y CH₂Cl₂ (2.52 mL). La reacción se dejó 12 h a t.a. con agitación magnética. Posteriormente el crudo de reacción se concentró y se purificó por precipitación disolviendo el sólido en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y añadiendo Et₂O (500 mL). Tras dejarlo a 4 h a -20°C, el precipitado obtenido se filtró y se lavó con Et₂O 3 x (30 mL). Se obtuvo **8** (0.465 g, 78%) como un sólido blanco.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.26 (s, 2H), 4.28-4.2 (m, 2H), 3.81-3.51 (m, 464H), 3.4 (m, 5H), 3.29 (c, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.82 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H).

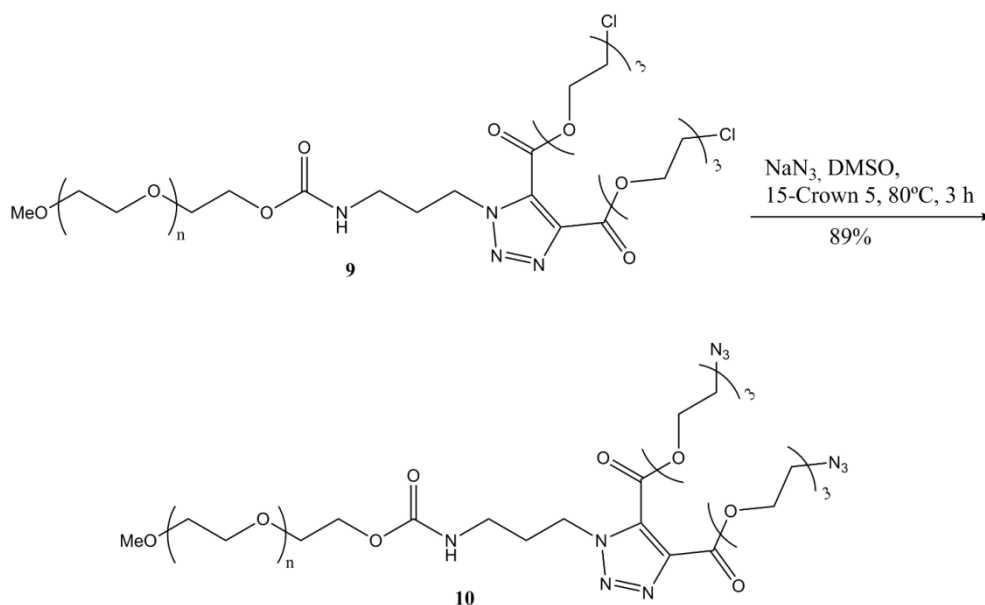
4.2.5. Síntesis PEG-[G1]-Cl (**9**)



En un tubo sellado se añadió el compuesto **8** (0.200g, 0.0385mmol) y **3** (0.032g, 0.0772mmol) disolviendo estos reactivos con CHCl₃ (385 µL). La reacción se dejó 6 horas a 50°C con agitación magnética. Posteriormente el crudo de reacción se concentró y se purificó por precipitación disolviendo el sólido en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y añadiendo Et₂O (500 mL). Tras dejarlo a 8 h a -20°C, el precipitado obtenido se filtró y se lavó con Et₂O 3 x (30mL). Se obtuvo **9** (0.203 g, 94%) como un sólido blanco.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.26 (s, 2H), 4.65 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.57-4.55 (m, 2H), 4.52-4.50 (m, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.90-3.48 (m, 502H), 3.38 (s, 3H), 3.2 (c, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.1 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H).

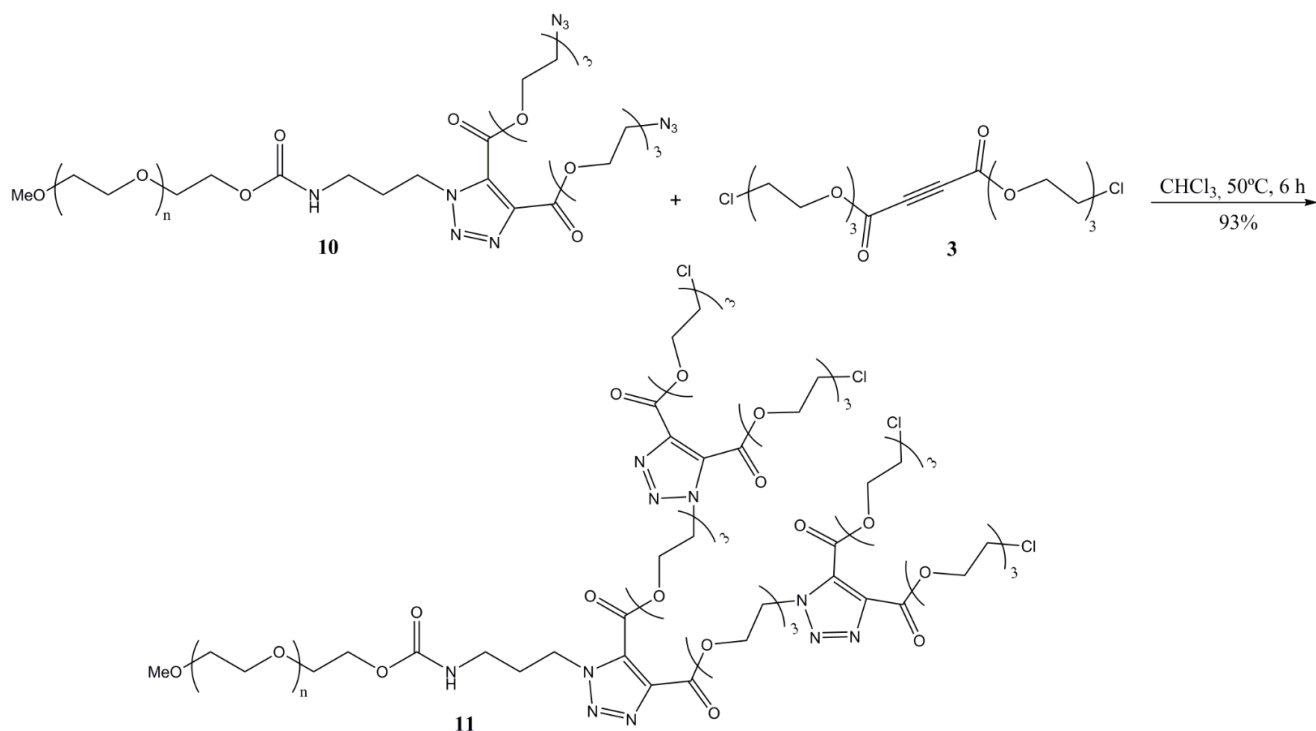
4.2.6. Síntesis PEG-[G1]-N₃ (10)



En un tubo sellado se añadió el compuesto **9** (0.0626 g, 0.0112 mmol), NaN₃ (2.9 mg, 0.0447 mmol) y éter 15-corona-5 en cantidad catalítica (1 gota). Se disolvieron todos estos reactivos en DMSO (224 μ L). La disolución se calentó en un baño de silicona a 80°C con agitación magnética durante 3 h. El crudo de reacción se purificó por precipitación disolviendo el sólido en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y añadiendo Et₂O (500 mL). Tras dejarlo a 6 h a -20°C, el precipitado obtenido se filtró y se lavó con Et₂O 3 x (30 mL). El sólido obtenido se disolvió en CH₂Cl₂ y se filtró nuevamente sobre celita. Posteriormente se concentró para obtener **10** (0.0559 g, 89%) como un sólido blanco.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.26 (s, 2H), 4.67 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 4.59-4.57 (m, 2H), 4.55-4.53 (m, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.89-3.49 (m, 502H), 3.40 (s, 7H), 3.21 (c, J = 6.7Hz, 2H), 2.1 (q, J = 6.7 Hz, 2H).

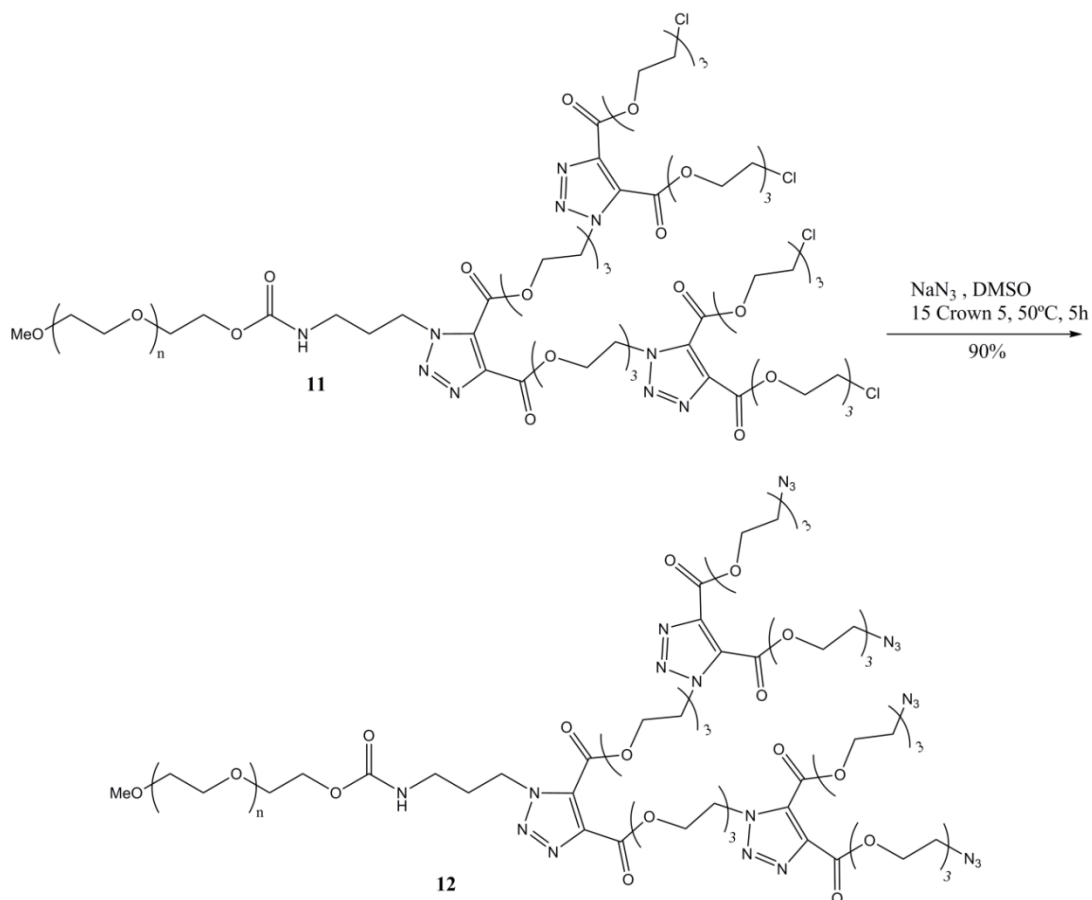
4.2.7. Síntesis PEG-[G2]-Cl (11)



Se introdujo el compuesto **10** (0.0559 g, 0.00989 mmol) en un tubo sellado junto con **3** (0.0205 g, 0.04947 mmol) y se disolvieron en CHCl_3 (197.8 μL). La reacción se dejó 6 horas a 50°C con agitación magnética. Posteriormente el crudo de reacción se concentró y se purificó por precipitación disolviendo el sólido en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 y añadiendo Et_2O (500 mL). Tras dejarlo a 12 h a -20°C , el precipitado obtenido se filtró y se lavó con Et_2O 3 x (30mL). Se obtuvo **11** (0.0596 g, 93%) como un sólido blanco.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.26 (s, 2H), 4.83-4.78 (m, 4H), 4.65 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 4.54-4.49 (m, 10H), 4.47-4.44 (m, 2H), 4.21 (s, 2H), 3.89-3.45 (m, 514H), 3.38 (s, 3H), 3.19 (c, $J = 6.7\text{Hz}$, 2H), 2.1 (q, $J = 6.7$ Hz, 2H).

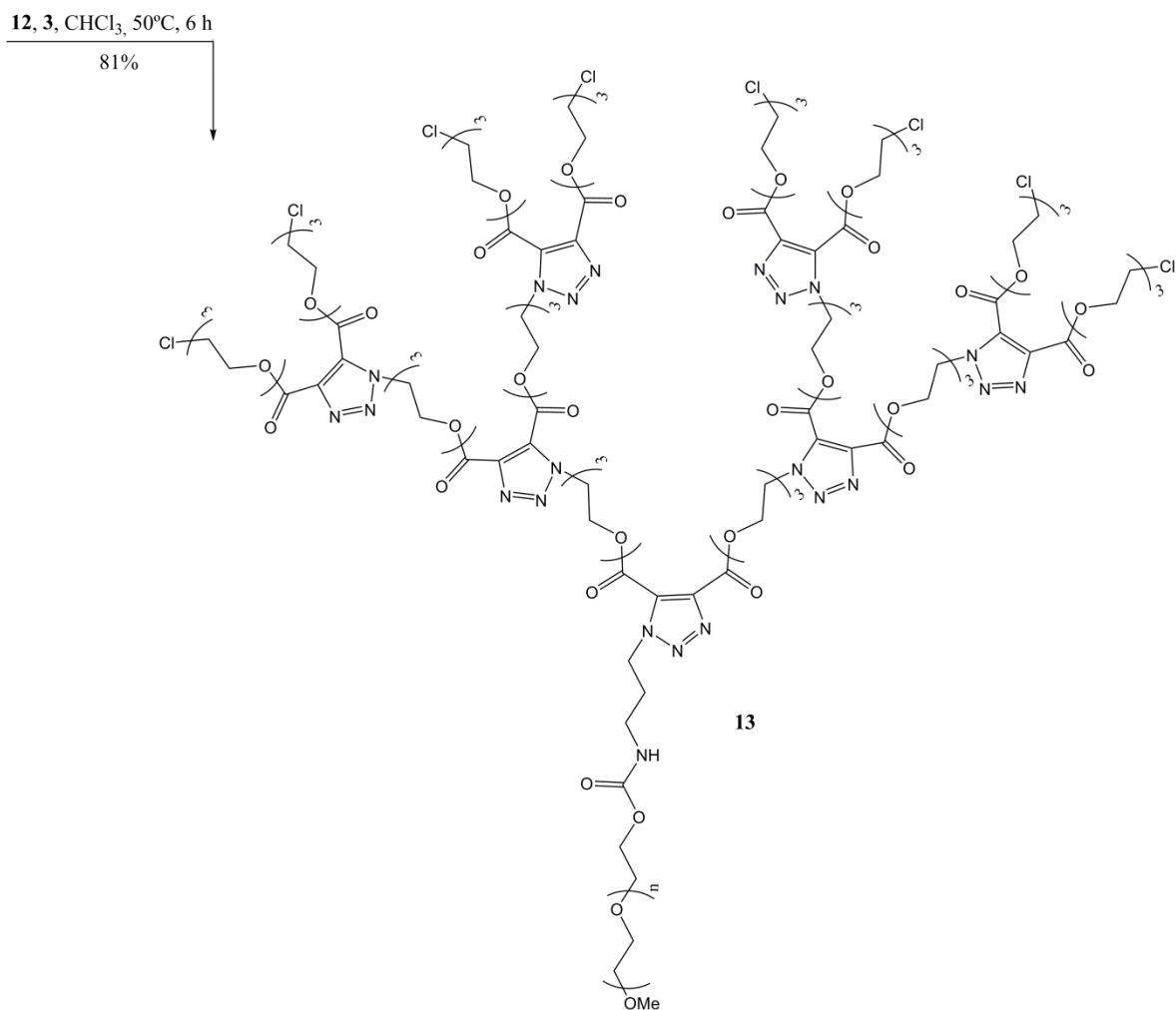
4.2.8. Síntesis PEG-[G2]-N₃ (**12**)



En un tubo sellado se añadieron **11** (0.0372 g, 0.00577mmol), NaN₃ (3 mg, 0.0462 mmol) y éter 15-corona-5 en cantidad catalítica (1 gota). Se disolvieron todos estos reactivos en DMSO (231 μ L). La disolución se calentó en un baño de silicona a 80°C con agitación magnética durante 5 h. El crudo de reacción se purificó por precipitación disolviendo el sólido en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y añadiendo Et₂O (500 mL). Tras dejarlo a 6 h a -20°C, el precipitado obtenido se filtró. El sólido obtenido se disolvió en CH₂Cl₂ y se filtró nuevamente sobre celita. Se concentró el disolvente y se obtuvo el compuesto **12** (0.0338 g, 90%) como un sólido blanco.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.26 (s, 2H), 4.82-4.78 (m, 4H), 4.64 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.54-4.49 (m, 10H), 4.47-4.44 (m, 2H), 4.21 (s, 2H), 3.87-3.47 (m, 573H), 3.37 (s, 11H), 3.19 (c, *J* = 6.7Hz, 2H), 2.1 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H).

4.2.9. Síntesis PEG-[G3]-Cl (13)



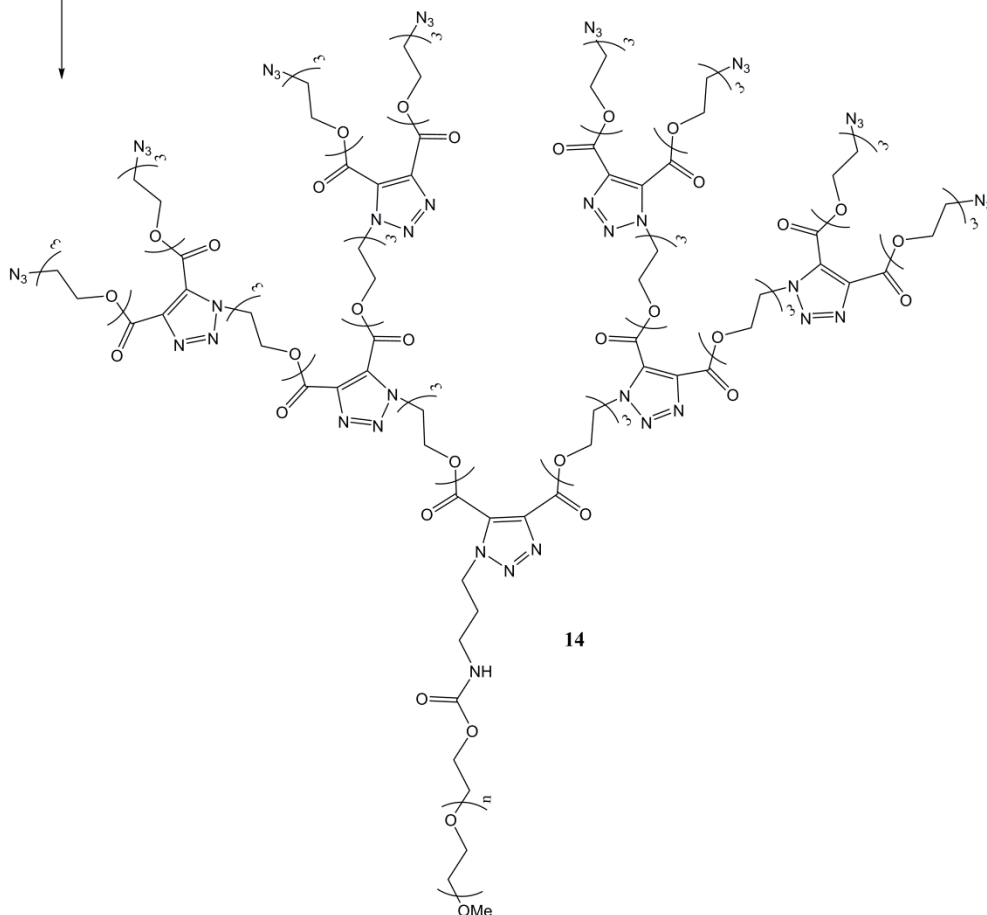
Se introdujo el compuesto **12** (0.0338 g, 0.00521 mmol) en un tubo sellado junto con la unidad de repetición **3** (0.0221 g, 0.0052 mmol) y se disolvieron en CHCl₃ (212 μ L). La reacción se dejó 6 horas a 50°C con agitación magnética. Posteriormente el crudo de reacción se concentró y se purificó mediante precipitación con éter. Tras dejarlo a 13 h a -20°C, el precipitado, muy fino, que se obtuvo se filtró y se lavó repetidas con Et₂O 3 x (30 mL). Se consiguió **13** (0.035 g, 81%) como un sólido blanco-amarillento.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.26 (s, 2H), 4.82-4.78 (m, 12H), 4.64 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 4.56-4.50 (m, 20H), 4.49-4.46 (m, 8H), 4.21 (s, 2H), 3.92-3.49 (m, 600H), 3.4 (s, 3H), 3.2 (c, J = 6.7 Hz, 2H), 2.1 (q, J = 6.7 Hz, 2H).

4.2.10. Síntesis PEG-[G3]-N₃ (14)

13, NaN₃, DMSO
15 Crown 5, 50°C, 5h

73%



En un tubo sellado se añadieron **13** (0.035 g, 0.00433mmol), NaN₃ (4.5 mg, 0.0462 mmol) y éter 15-corona-5 en cantidad catalítica (1 gota). Se disolvieron todos estos reactivos en DMSO (346 µL). La disolución se calentó en un baño de silicona a 80°C con agitación magnética durante 5 h. El crudo de reacción se purificó por precipitación disolvió el sólido en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y añadiendo Et₂O (500 mL). Tras dejarlo a 9 h a -20°C, el precipitado obtenido se filtró. El sólido obtenido se disolvió en CH₂Cl₂ y se filtró nuevamente sobre celita en una placa filtrante. Se concentró el disolvente y se obtuvo el compuesto **14** (0.0264 g, 73%) como un sólido blanco.

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.26 (s, 2H), 4.82-4.78 (m, 12H), 4.64 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.56-4.50 (m, 20H), 4.49-4.46 (m, 8H), 4.21 (s, 2H), 3.92-3.49 (m, 600H), 3.4 (s, 19H), 3.2 (c, *J* = 6.7Hz, 2H), 2.1 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H).

4.2.11. Procedimiento general para la síntesis de la unidad de repetición con enlace amida.

A) Mediante el uso de Agentes Acoplantes

En un matraz de fondo redondo provisto de barra magnética se introdujo el reactivo **1** bajo atmósfera de Ar. A continuación se añadió el disolvente, seco, específico de cada reacción y con agitación magnética se esperó hasta la completa disolución de **1**. Seguidamente se realizó una adición, a t.a o a 0°C, en el matraz de reacción de una cantidad estequiométrica del determinado agente acoplante (2-4eq.) utilizado en la reacción. Tras dejar que reaccionaran durante 10 min se adicionó gota a gota en el matraz de reacción una disolución de la amina de interés (4-6eq). Tras dejar reaccionar con agitación magnética el tiempo necesario se realizó la purificación del crudo mediante columna cromatográfica (sílica gel). Por último se realizó un análisis de ¹H RMN para comprobar la presencia de producto.

B) Mediante la previa formación del haluro de ácido

En un matraz de fondo redondo provisto de una barra magnética se añadió **1** bajo atmósfera de Ar. A continuación se adicionó SOCl₂ y se dejó reaccionar a reflujo durante 4 h a 65°C. Seguidamente se dejó venir la reacción a t.a. y se concentró convenientemente el exceso del disolvente. Disolvimos el sólido blanco obtenido y en éter etílico y sobre esta disolución se adicionó gota a gota otra disolución de la amina de interés (6 eq.). Se dejó reaccionar a t.a. con agitación magnética durante 14 h. Posteriormente se realizaron lavados con HCl 0.5 M 3 x (25 mL), con una disolución saturada de Na₂CO₃ 3 x (25 mL) y por último con agua Elix 3 x (25 mL). Se secó la fase orgánica y se concentró. Por último se realizó un análisis de ¹H RMN para comprobar la presencia de producto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. CONSIDERACIONES

Para el diseño sintético de este copolímero de dibloque AB mediante la “Metal-Free Click Chemistry” se tomaron en cuenta una serie de consideraciones.

En lo que respecta al bloque lineal de este copolímero se eligió una cadena de PEG de masa molecular media de 5000 Da. Se escogió este polímero por dos razones fundamentales:

En lo que concierne a sus aplicaciones, se escogió este polímero por las propiedades que su acoplamiento al bloque dendrítico aportará a nuestro futuro copolímero (la solubilidad acuosa, baja toxicidad e inmunogenicidad que, en rasgos generales, permitiría la futura aplicación de este copolímero en el campo de los nanotransportadores.

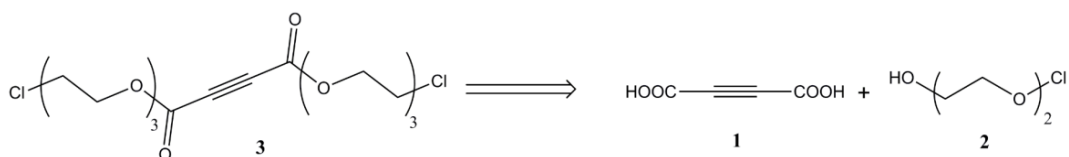
En lo que concierne a la propia síntesis del polímero, la cadena de PEG ofrece unas grandes ventajas en cuanto a las etapas de purificación del compuesto debido a que es un polímero insoluble en éter etílico y hexano.

El PEG del que se dispuso estaba funcionalizado en uno de sus extremos con un grupo alcohol, por lo tanto previo a su uso fue necesaria su activación, primero formando su carbonato activo y seguidamente acoplándole un linker funcionalizado en uno de sus extremos con un grupo azida, el cual se convertiría en el punto focal a partir del cual se realizarían las sucesivas cicloadiciones que permitirían el crecimiento del bloque dendrítico.

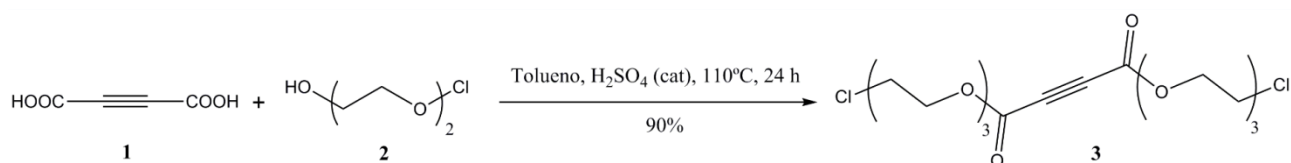
Por último, para realizar el crecimiento del bloque dendrítico se sintetizó una unidad de repetición, la cual dispusiera de un alquino que estuviera activado para favorecer las sucesivas reacciones de cicloadición y que tuviera sustituyentes derivados del etilenglicol para que hubiera una homogeneidad entre el bloque lineal y el bloque dendrítico de este copolímero de bloque. Además se necesitaba la síntesis de una unidad de repetición simétrica, pues de esta manera no afectaría la baja regioselectividad de las reacciones de cicloadición térmica.

5.2. SÍNTESIS DE LA UNIDAD DE REPETICIÓN

-Retrosíntesis



-Síntesis



Para la construcción del bloque dendrítico utilizando un método convergente se escogió un derivado del ácido acetilendicarboxílico formado por enlaces de tipo éster **3**. Éste se sintetizó a través de una reacción de esterificación entre el ácido acetilendicarboxílico **1** y el 1-cloro-8-hidroxi-3, 6-dioxaoctano **2**, comercialmente disponible, utilizando un montaje Dean-Stark y mediante tratamiento con H₂SO₄ catalítico en Tolueno, obteniéndose el producto deseado en un 90 % de rendimiento.

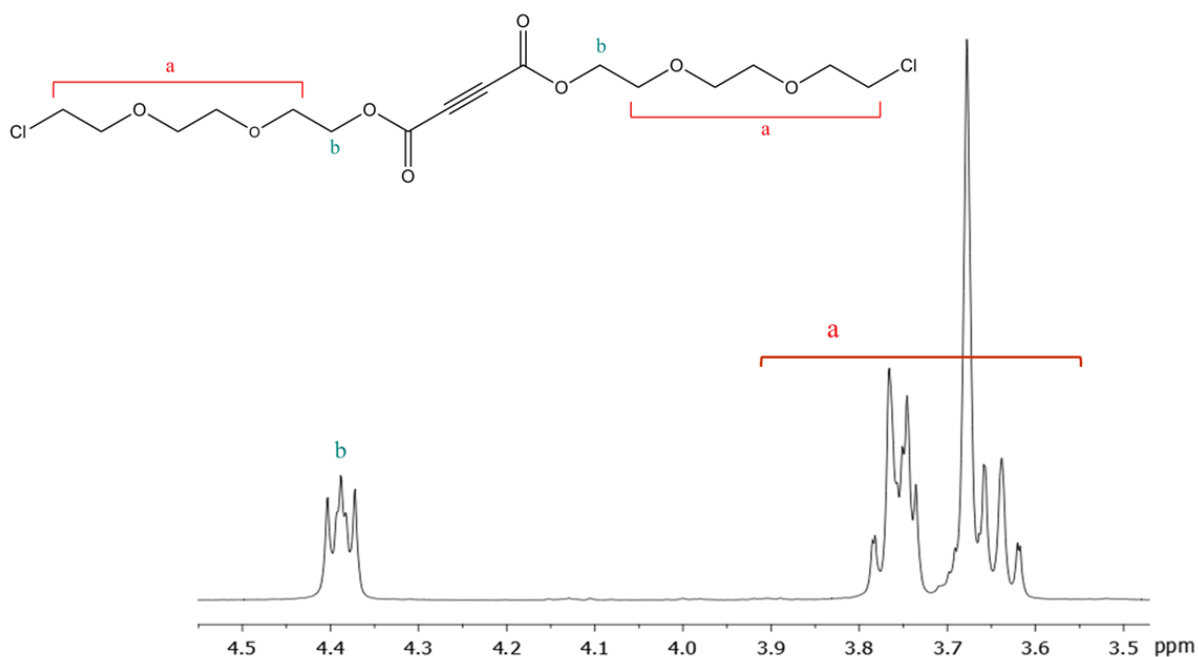


Figura 7. Espectro ¹H RMN del compuesto **3**.

En el espectro de ^1H RMN (figura 7) se observa a δ : 4.38 ppm un doble doblete propio de metilenos en α a grupos carboxilatos. Así mismo, entre δ : 3.88 y 3.63 ppm aparecen las señales del resto de protones de los fragmentos de trietilenglicol.

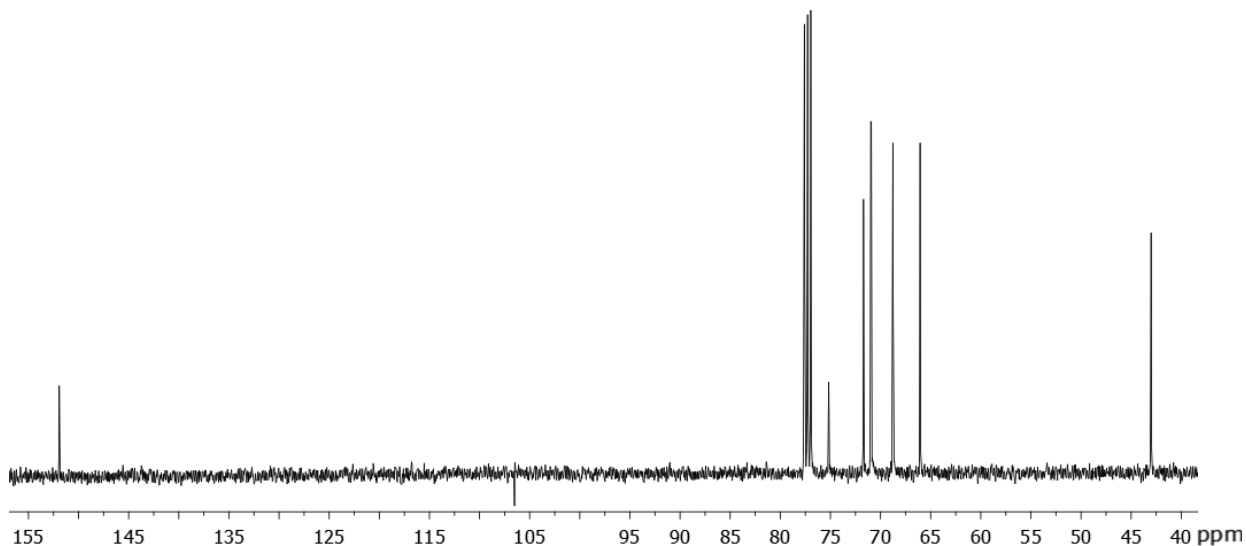
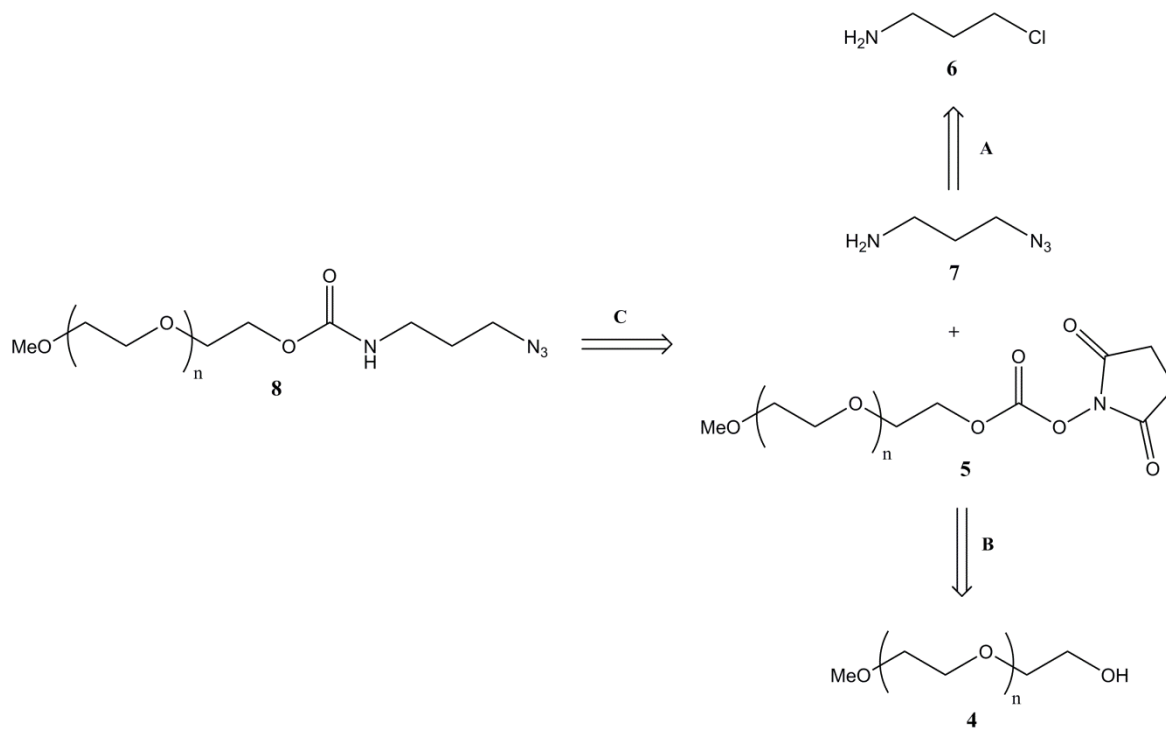


Figura 8. Espectro ^{13}C RMN del compuesto **3**.

La unidad de repetición también se caracterizó mediante la realización de un espectro de ^{13}C RMN pudiendo observarse una señal a δ : 151.928 ppm correspondiente al carbono de los grupos carbonilo, una señal a δ : 75.169 ppm que pertenece a los carbonos del alquino central, un grupo de señales entre 70.971 y 66.054 ppm correspondientes a los carbonos de los fragmentos de trietilenglicol y por último una señal a 43.009 ppm que se corresponde con los carbonos enlazados a los átomos de cloro.

5.3. ACTIVACIÓN DEL PEG

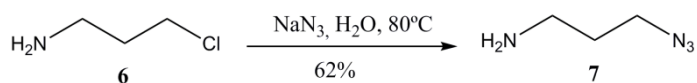
-Retrosíntesis



Para posteriormente poder llevar a cabo la construcción del bloque dendrítico sobre la cadena lineal de PEG fue necesaria su activación. Esta se realizó en tres etapas:

- En una primera etapa se sintetizó el linker **7** para posteriormente acoplarlo a la cadena lineal de PEG con el objetivo de convertir el grupo azida terminal del linker en el punto focal del crecimiento del bloque dendrítico.
- Para poder llevar el acoplamiento entre la cadena lineal de PEG y el linker se necesitó sintetizar el carbonato activo mediante la reacción del polietilenglicol con DSC
- Por último se realizó la reacción de acoplamiento entre el linker y el carbonato activo para dar lugar al correspondiente PEG-linker.

-Síntesis A



Se sintetizó el linker **7** para que permitiera el crecimiento del bloque dendrítico sobre la unidad lineal, un PEG5000 **4** comercialmente disponible. El linker 3-azidopropilamina **7** se preparó a partir de la 3-cloropropilamina **6**, tratándola con azida sódica en agua y obteniéndose el producto en un 62% de rendimiento.

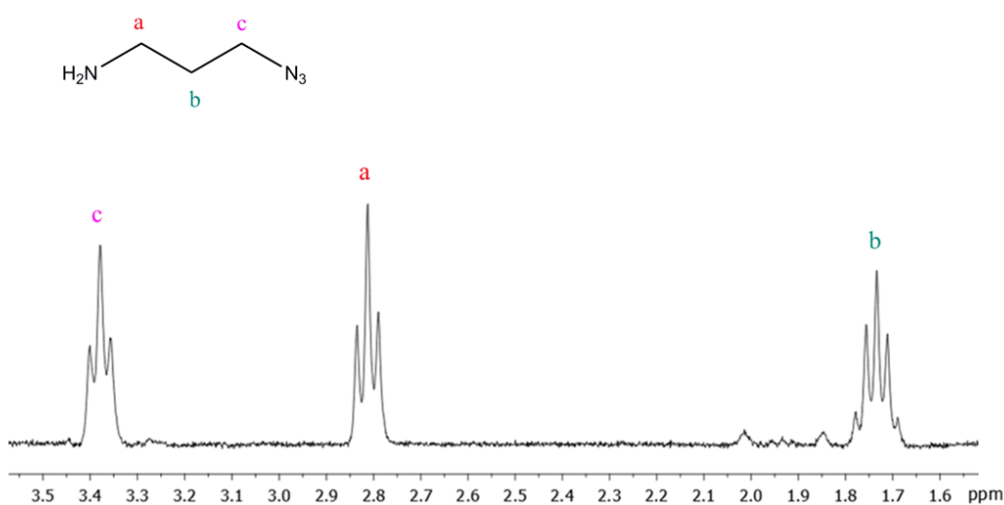
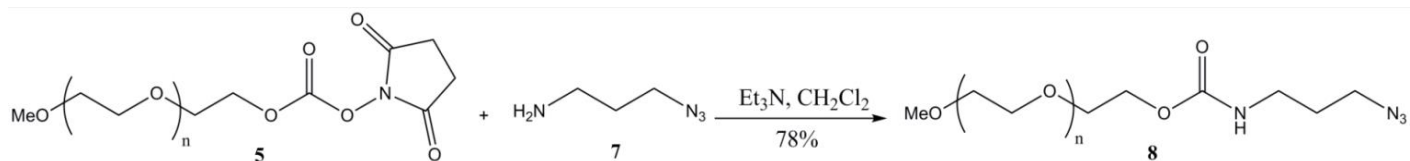


Figura 9. Espectro ¹H RMN del compuesto **7**.

En el espectro de ¹H RMN (figura 8) se observa a δ : 3.38 ppm la aparición de un triplete característico de los protones situados en α al grupo azida. Así mismo, a δ : 2.8 ppm se observa el triplete correspondiente a los protones en α al grupo amino y a δ : 1.83 ppm se puede observar el quintuplete de los protones situado en β a los grupos funcionales de los extremos de la molécula.

-Síntesis C



Una vez sintetizado el carbonato activo **5** éste se hizo reaccionar con el linker (3-azidopropilamina) **7**, en CH_2Cl_2 y Et_3N dejándolos con agitación magnética a t.a. durante toda la noche. Tras la correspondiente purificación por precipitación se obtuvo el producto deseado en un 78% de rendimiento.

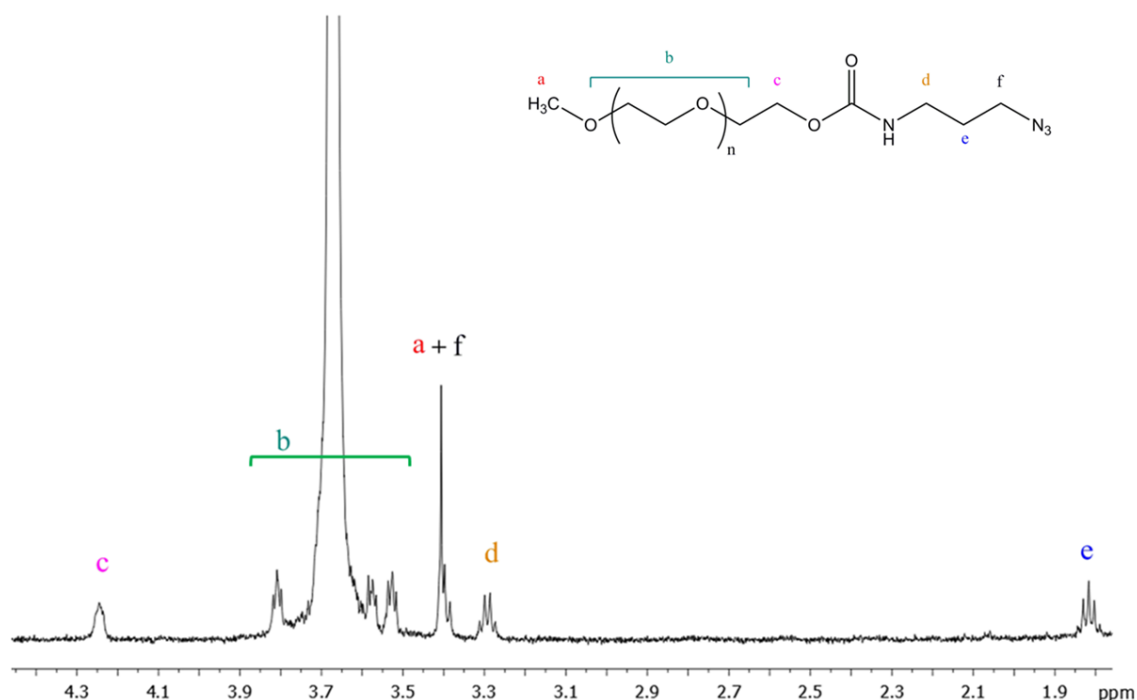
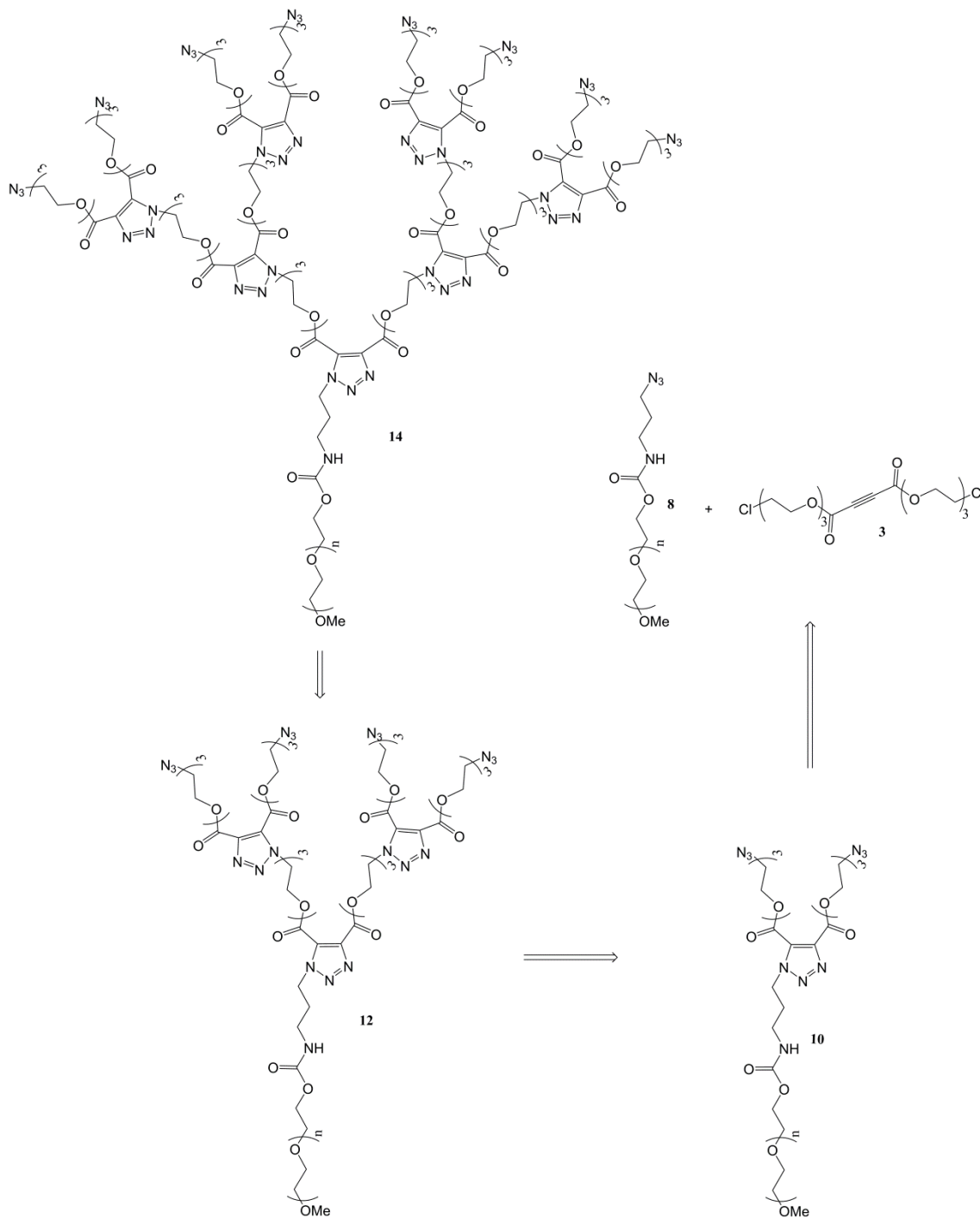


Figura 11. Espectro ^1H RMN del compuesto **8**.

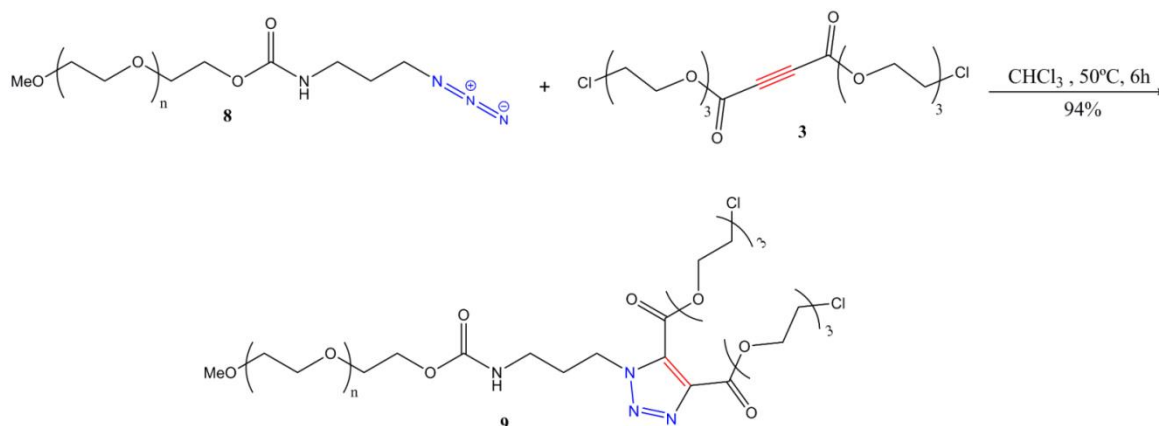
En el espectro de ^1H RMN (figura 10) se observa que la señal de los protones que estaban en α al grupo carbonato se desplazan a un campo más alto δ : 4.25 ppm a consecuencia de la formación del nuevo grupo carbamato. Asimismo a δ : 3.34 ppm aparece un singlete solapado con un triplete que integra por 5H y se corresponde al conjunto de los protones situados en α al grupo azida y a los 3 H del grupo metilo situado en el extremo de la cadena de polietilenglicol. Al desplazamiento δ : 3.3 ppm aparece un cuartete que se corresponde con los protones situados a la derecha del grupo carbamato y a δ : 1.87 se observa un quintuplete perteneciente a los protones en β al grupo carbamato y al grupo azida.

5.4. SÍNTESIS DE PEG-[G3]-N₃

-Retrosíntesis



-Síntesis del bloque dendrítico



Esquema 5. Representación esquemática de la cicloadición [3+2] para formar el anillo de triazol.

Una vez sintetizado el PEG-linker **8** ya se puede llevar a cabo el crecimiento de la primera generación mediante la reacción de cicloadición [3+2] entre el grupo **azida**, situado en el extremo del linker, con el grupo **alquino** perteneciente a la unidad de repetición dando lugar al correspondiente anillo de triazol. Obteniéndose el producto deseado en un 94%.

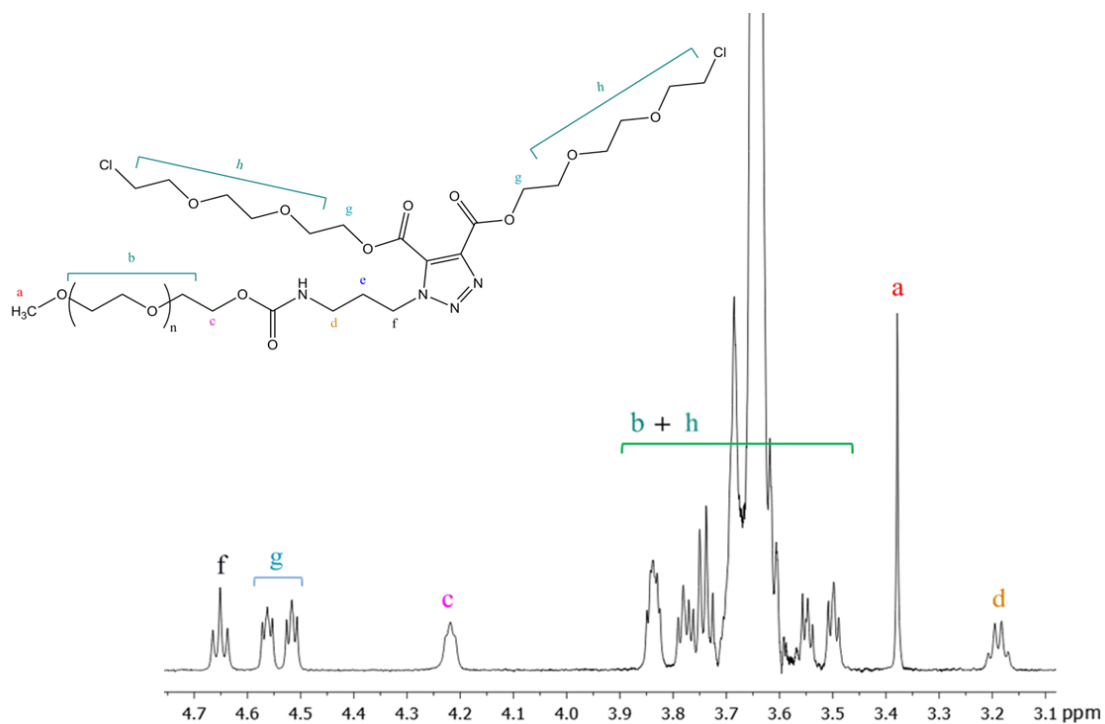


Figura 12. Espectro ^1H RMN del compuesto **9**.

En el espectro de ^1H RMN podemos observar la aparición de un triplete a δ : 4.65 ppm que integra por 2H perteneciente a los hidrógenos en α al anillo de triazol recién formado. También podemos observar dos nuevas señales entre δ : 4.57 y 4.50 ppm que se corresponden a los hidrógenos situados α a los grupos éster unidos al anillo de triazol. Este desdoblamiento en dos señales es debido a que la simetría que posee la unidad de repetición se pierde una vez que se forma el anillo de triazol.

El seguimiento de esta reacción, y en general todas las reacciones de crecimiento, se realizó principalmente a través de espectroscopía IR. Determinándose el avance completo de la reacción cuando se observó la desaparición del pico característico del grupo azida a 2100 cm^{-1} (Figura 13).

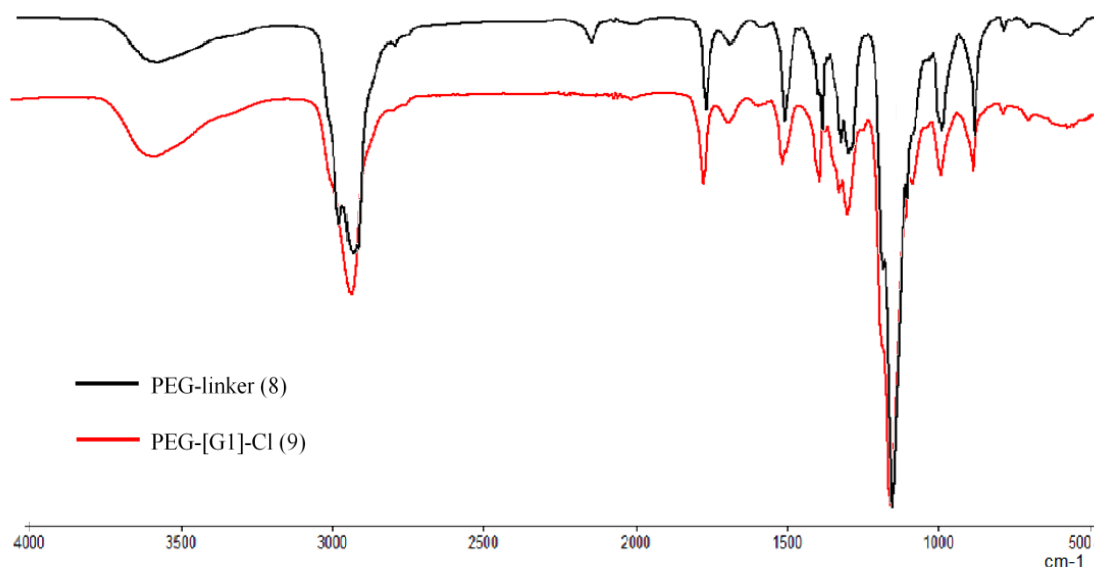
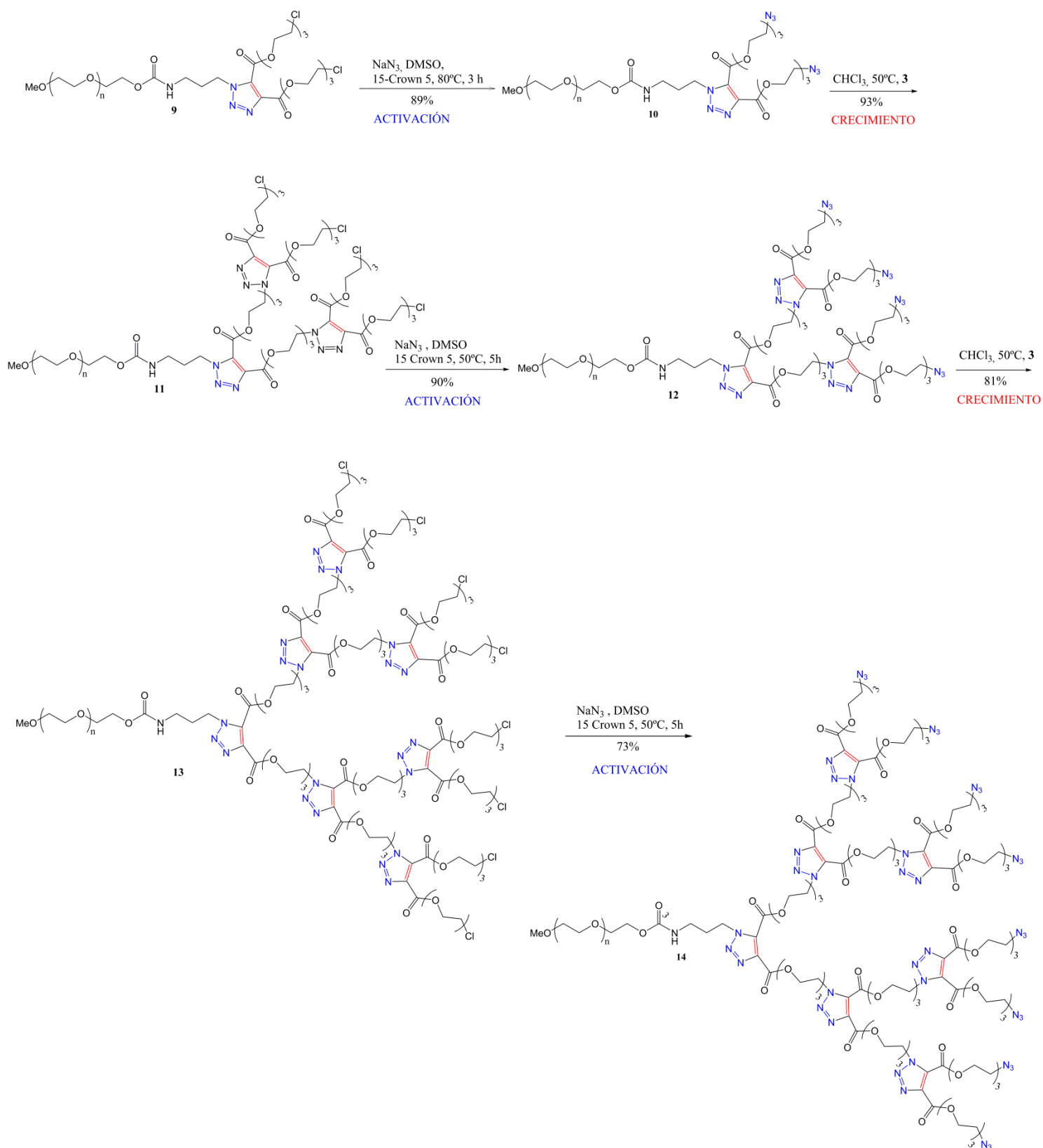


Figura 13. Espectro IR de la reacción de síntesis del compuesto **9**.

Una vez sintetizada la primera generación de este copolímero de bloque, las sucesivas etapas de crecimiento del bloque dendrítico estarán caracterizadas por dos fases claramente diferenciadas.

En las fases de **activación** se substituirá el Cloro terminal de las unidades de repetición por un grupo azida.

Las fases de **crecimiento** estarán caracterizadas por la reacción de cicloadición entre el grupo azida previamente funcionalizado y el grupo alquino de la unidad de repetición.



Esquema 6. Fases de activación y crecimiento del bloque dendrítico del copolímero de bloque.

En la primera etapa de activación se partió de PEG-[G1]-Cl **9** y se trató con NaN_3 y un éter corona (15-Corona-5) en DMSO calentándolos a 80°C durante 3 h y tras la correspondiente purificación por precipitación, se obtuvo **10** en un 89% de rendimiento (Figura 14). Es importantes señalar que la presencia del éter corona permite que la reacción vaya más rápido pues compleja el ión Na^+ favoreciendo el ataque del ión azida. La reacción en ausencia del éter corona es 5 veces más lenta.

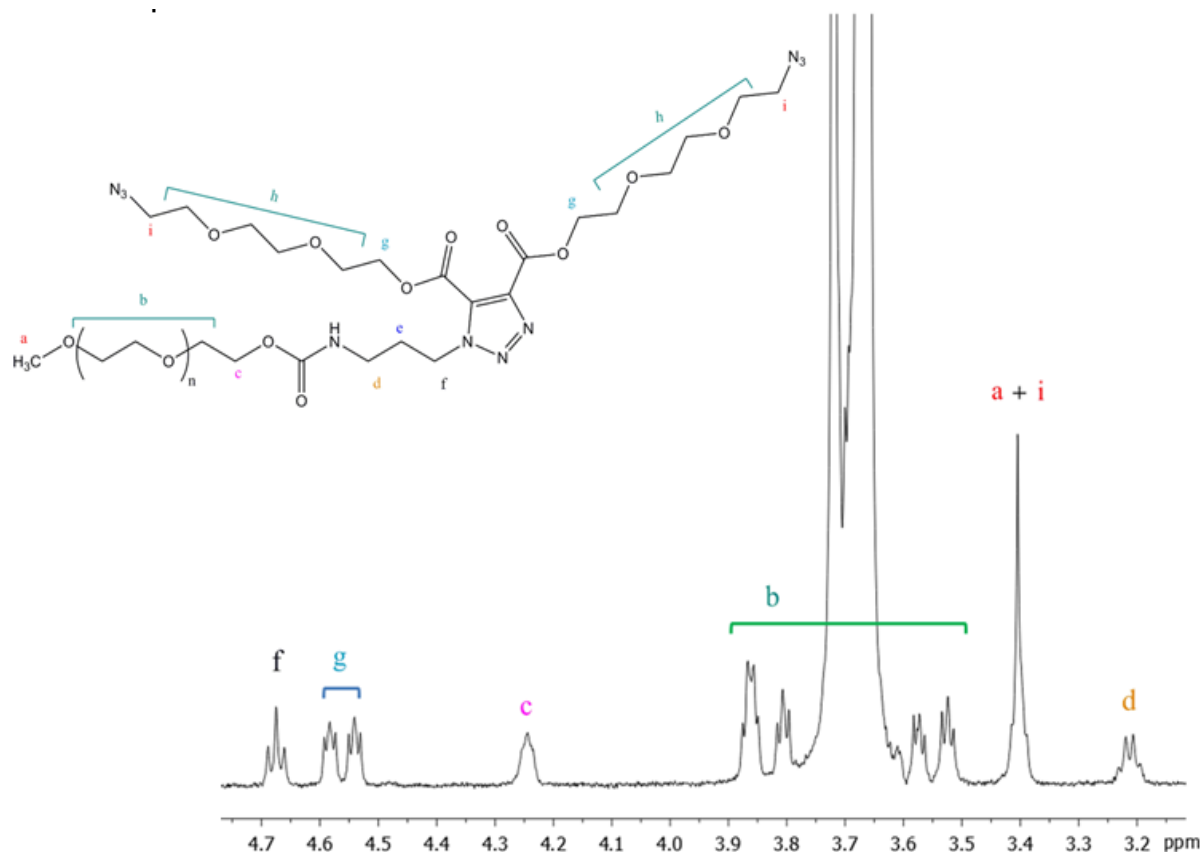


Figura 14. Espectro ^1H RMN del compuesto **10**.

En el espectro de ^1H RMN se puede observar la aparición de una señal entorno a δ : 3.4 ppm. Este señal integra por 7H y se corresponde al conjunto de los 4H situados en α a los grupos azida y a los 3 H del grupo metilo situado en el extremo de la cadena de polietilenglicol. El seguimiento de las reacciones de activación se realizará mediante ^1H RMN e integrando el singlete ancho a δ : 3.4 ppm.

Una vez funcionalizados con grupos azida los extremos de la unidad de repetición, se puede llevar a cabo la siguiente cicloadición correspondiente a la etapa de crecimiento del bloque dendrítico. Se hizo reaccionar el PEG-[G1]- N_3 con la unidad de repetición **3** en cloroformo y calentándola a 50°C durante 6 horas. Tras la

correspondiente purificación por precipitación se obtuvo el producto deseado **11**. En un 58% de rendimiento (Figura 15).

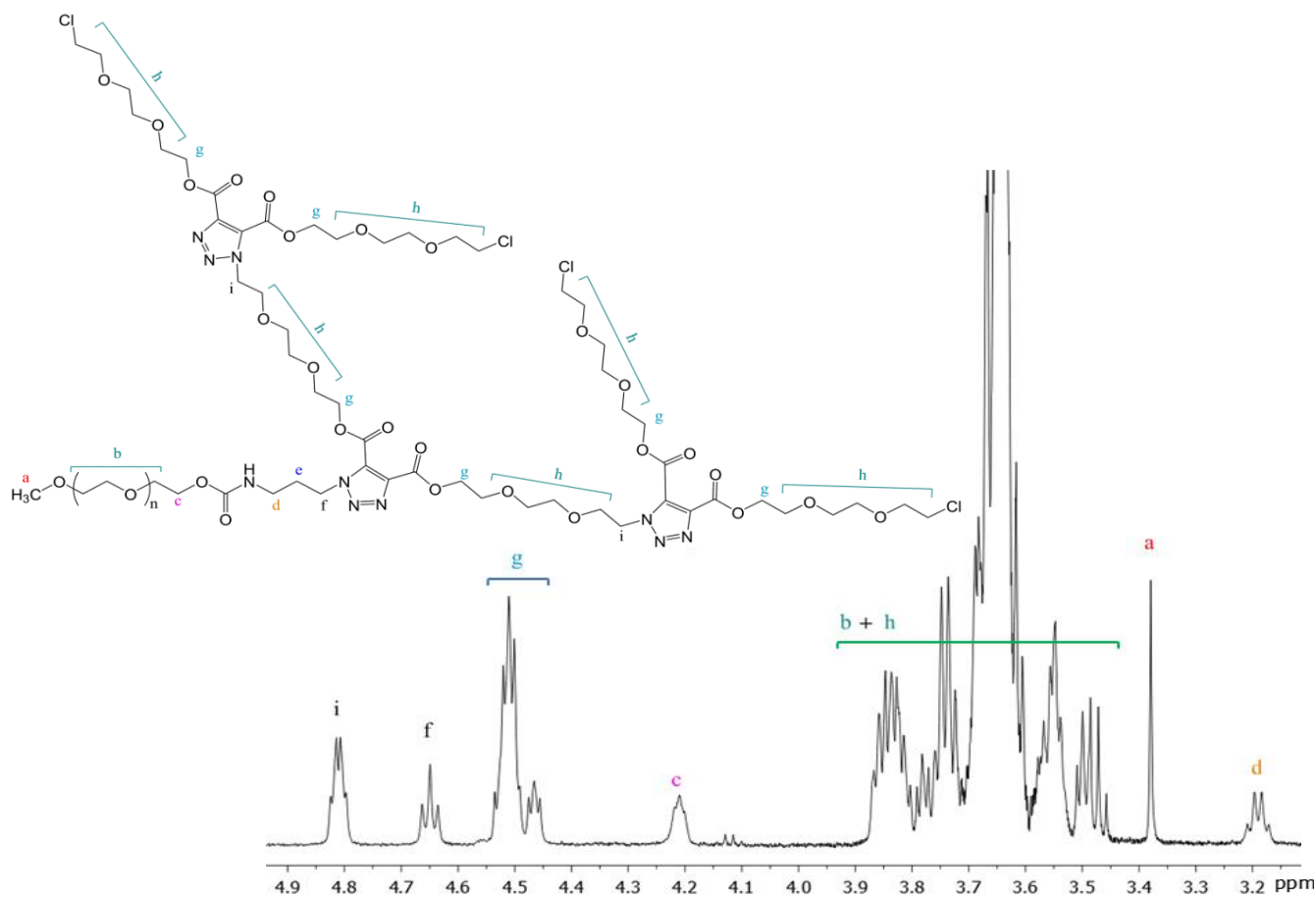


Figura 15. Espectro ^1H RMN del compuesto **11**.

En el espectro de ^1H RMN se observa una señal a δ : 4.8 ppm. Esta señal integra por 4H y se corresponde a los hidrógenos en α los nuevos anillos de triazol formados. El desplazamiento químico que sufren con respecto a los hidrógenos en α del anillo de triazol de la primera generación es debido a que las generaciones mayores experimentan una mayor movilidad, sus dendrones son más lábiles, que los correspondientes a generaciones inferiores, dando lugar a esta apreciable diferencia. Esta diferencia de movilidad también es visible en los hidrógenos que están en α a los grupos éster unidos a los anillos de triazol. Esta reacción se siguió mediante IR.

En la siguiente etapa de activación se trató PEG-[G2]-Cl con NaN_3 , el éter corona en DMSO calentando la reacción a 80°C durante 5 h y tras la purificación por precipitación se obtuvo **12** en un 89% de rendimiento (Figura 16).

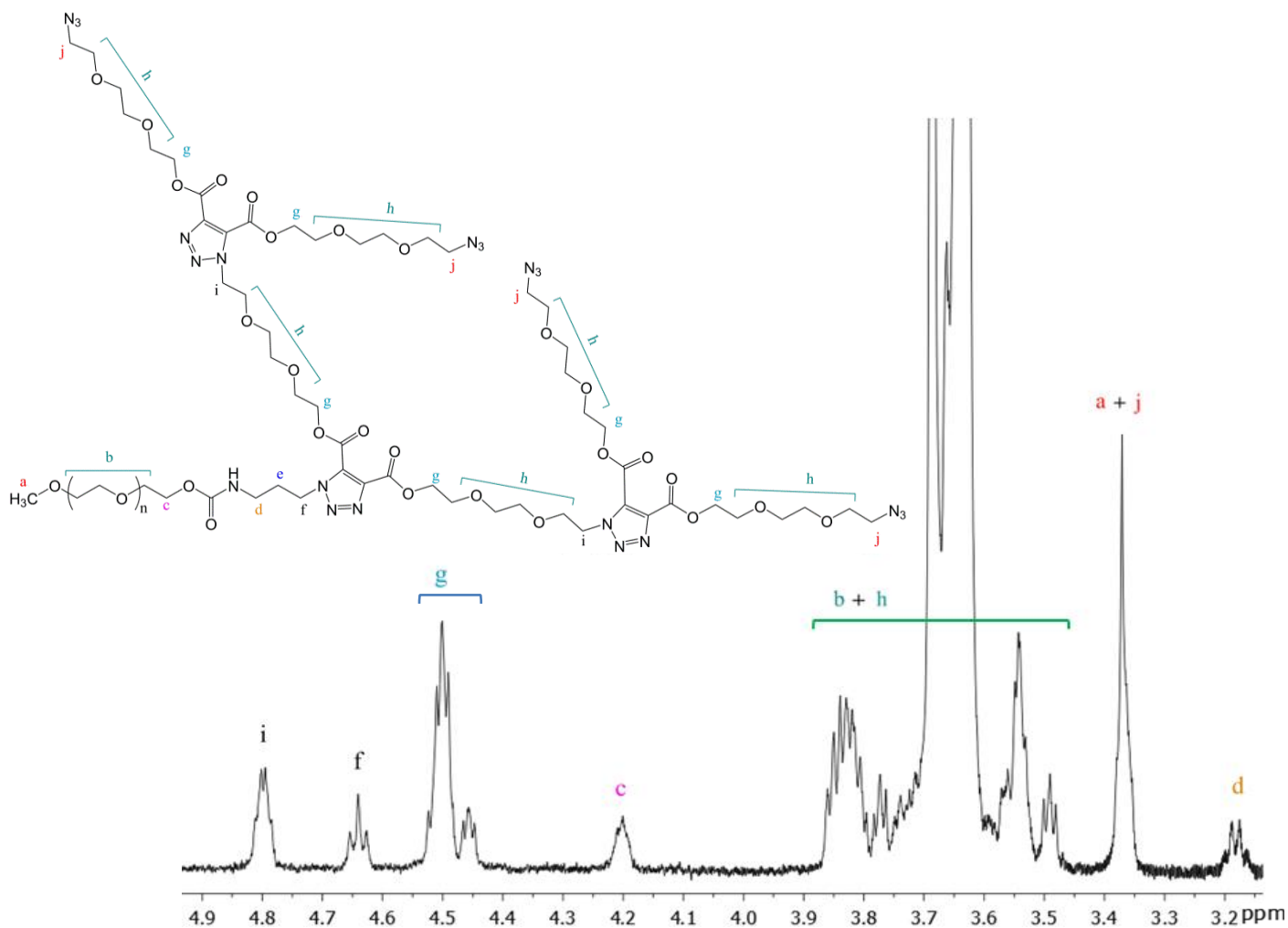


Figura 16. Espectro ^1H RMN del compuesto **12**.

A δ : 3.5 ppm se observa una señal que integra por 11H, correspondiente a los 8H y 3H en α a los grupos azida y al metilo de la cadena de polietilenglicol, respectivamente.

La siguiente etapa de crecimiento se hizo tratando el PEG-[G2]-N₃ con la unidad de repetición en CHCl₃ calentando la reacción a 50°C durante 6 horas. Se obtuvo el producto deseado **13** en un 81% de rendimiento. (Figura 17).

La funcionalización final con azida se realizó mediante la reacción del PEG-[G3]-Cl con azida sódica en DMSO calentando la reacción a 80°C durante 5h obteniendo el producto **14** en un 89%. (Figura 18).

Los espectros de los productos se adjuntan a continuación:

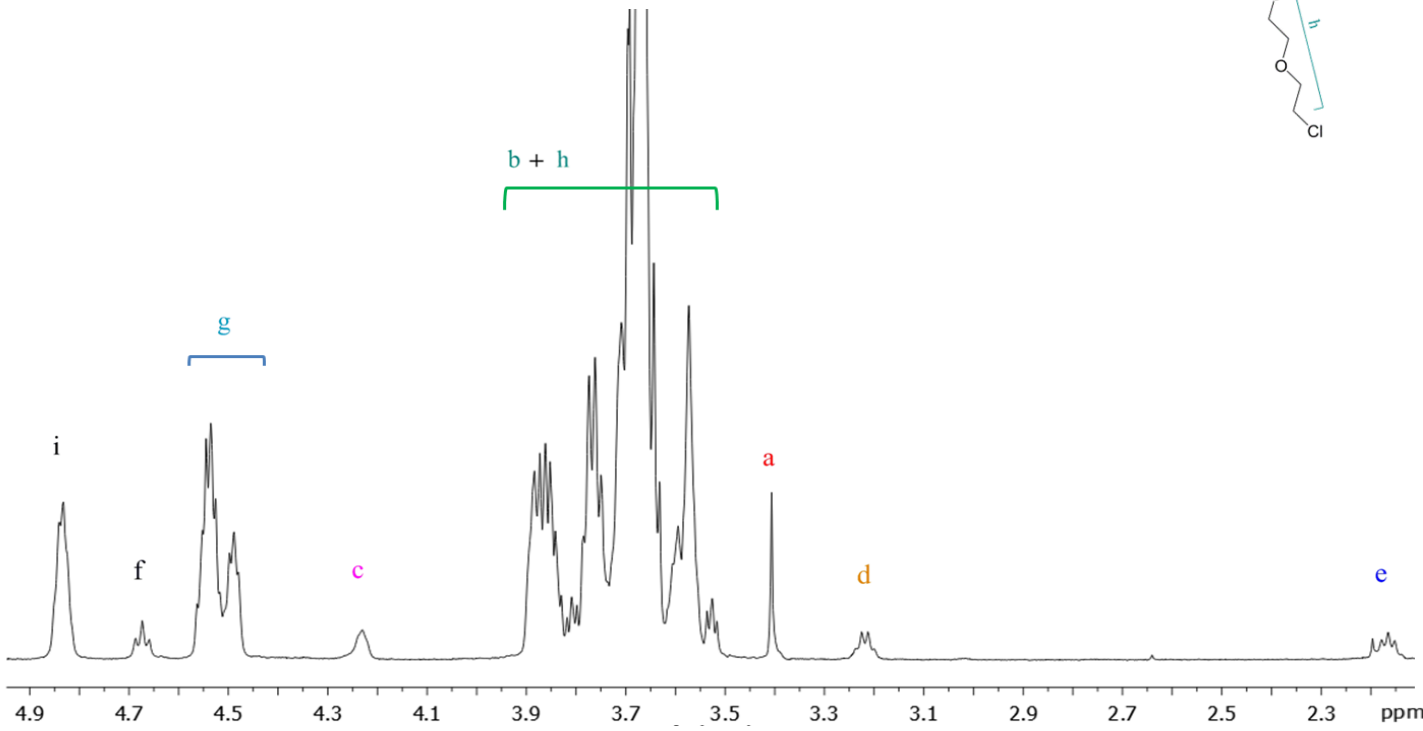
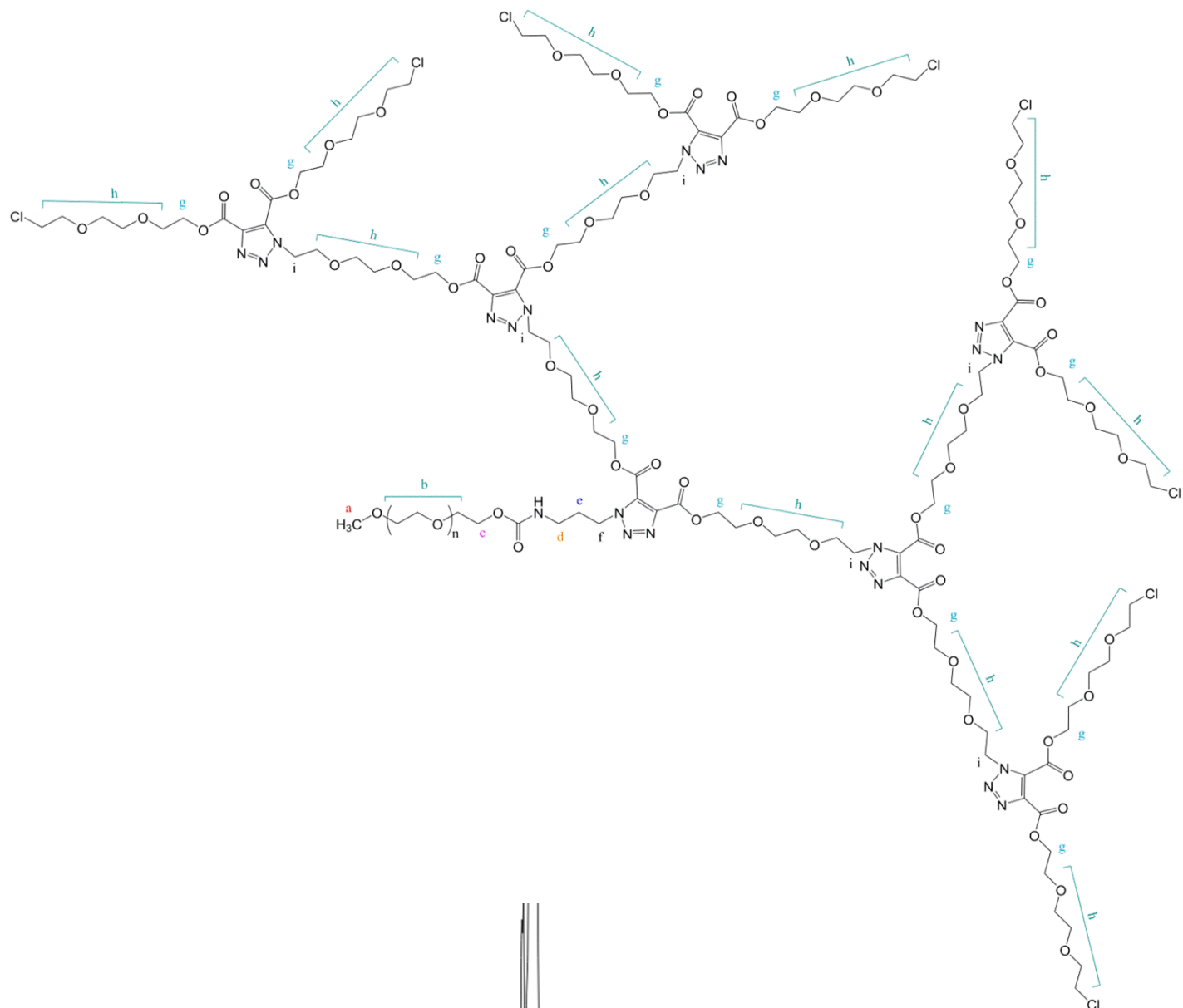


Figura 17. Espectro ^1H RMN del compuesto 13.

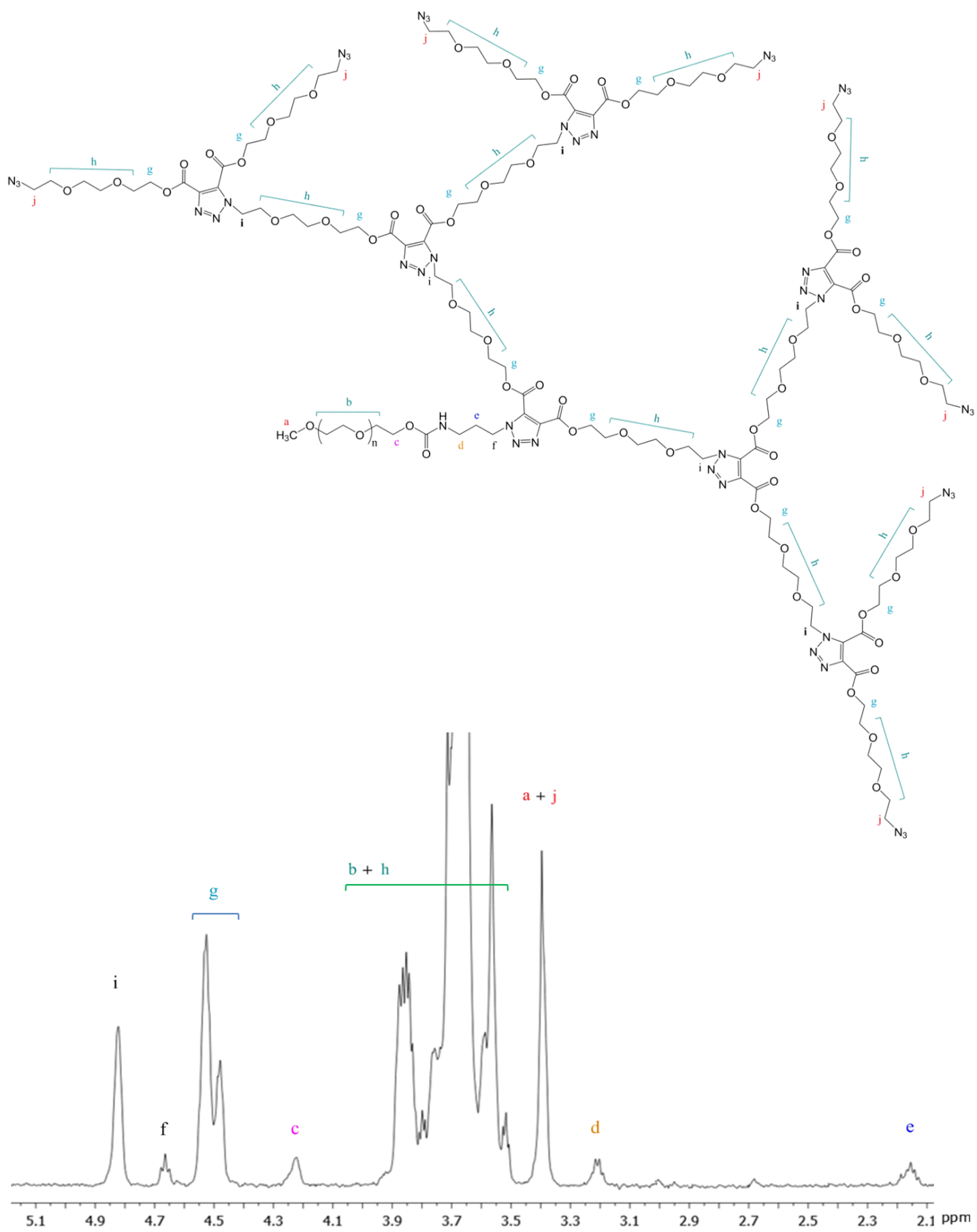
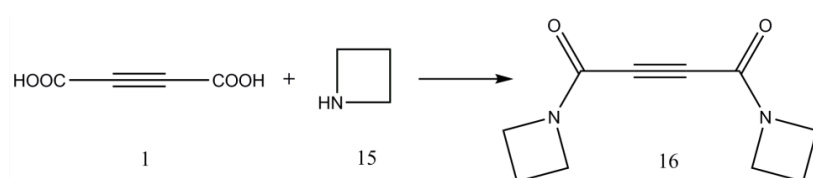


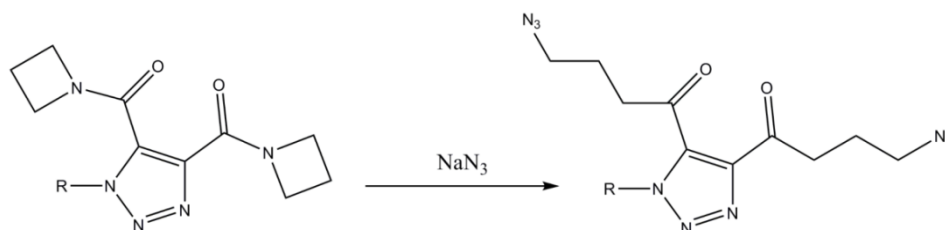
Figura 18. Espectro ¹H RMN del compuesto 14.

5.5. SÍNTESIS UNIDAD DE REPETICIÓN CON ENLACES AMIDA

Un objetivo secundario de este proyecto era la síntesis de una nueva unidad de repetición que poseyera enlaces de tipo amida para construir otro bloque dendrítico y así poder comparar sus efectos en cuanto a reactividad con respecto a la unidad de repetición con enlaces tipo éster. Para ello se pensó en la azetidina como un compuesto que fuera un posible candidato para la formación de esta unidad de repetición mediante la reacción con el ácido acetilendicarboxílico:



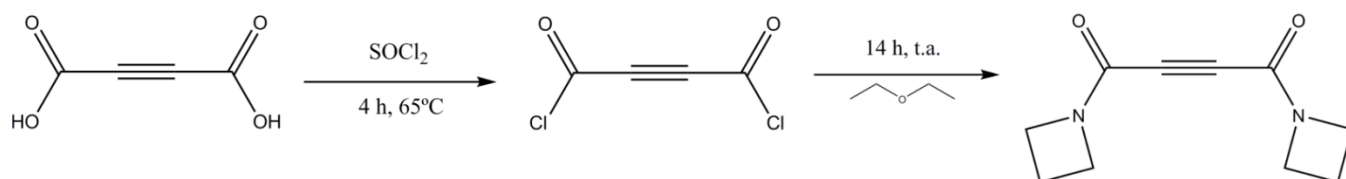
Con esta unidad se pretendía crecer el bloque dendrítico mediante la apertura del anillo de la azetidina con un nucleófilo, concretamente la azida, quedando así funcionalizada con este grupo en un extremo y posteriormente realizar una cicloadición con otra unidad de repetición del modo:



Para la síntesis de esta unidad de repetición utilizamos dos estrategias: la síntesis en dos pasos a través del haluro del ácido y la síntesis utilizando diversos agentes acoplantes, las cuales fueron descritas en el procedimiento general en la sección de experimental. Con ninguna de estas estrategias se consiguieron resultados satisfactorios. Se describirán a continuación.

-Mediante la previa formación del haluro del ácido

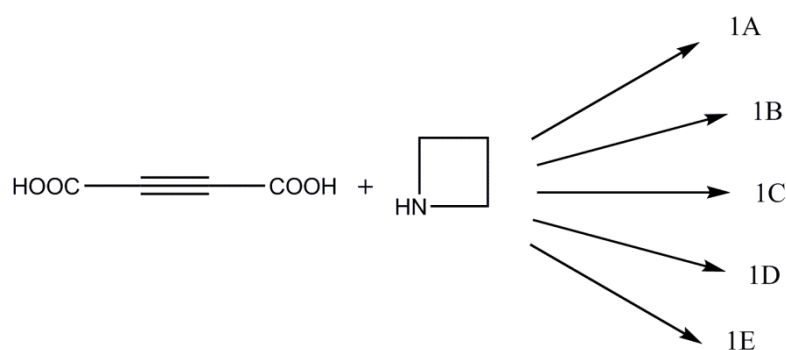
La secuencia de reacciones fue la siguiente:



Mediante esta estrategia no se consiguió sintetizar la unidad de repetición de interés, recuperándose el producto de partida. Por lo tanto se decidió probar mediante el uso de agentes acoplantes.

-Mediante el uso de agentes acoplantes

Se evaluaron diversos agentes acoplantes como posibles reactivos para llevar a cabo esta síntesis: En la tabla 1 se resume las condiciones experimentales empleadas para cada uno de los reactivos de acoplamiento. En todos los casos no se consiguió el compuesto deseado, obteniéndose mezclas complejas de reacción constituidas principalmente por los excesos de reactivos y productos de descomposición.



Reacción	Disolvente	A. Acoplante	Tª Adición	Condiciones de separación
1A	CH ₂ Cl ₂	DIC	t.a.	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80% : 20%)
1B	CH ₂ Cl ₂	EDC	t.a.	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80% : 20%)
1C	CH ₂ Cl ₂	DIC	0°C	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80% : 20%)
1D	CH ₂ Cl ₂	DCC	0°C	CH ₂ Cl ₂ : MeOH (80% : 20%)
1E	DMF	PyBrop	0°C	Hex : AcOEt (50% : 50%)

Tabla1. Condiciones de reacción.

6. CONCLUSIONS

- We have synthesized three generations, and the right end azide functionalization of a new PEG-Dendrimer block copolymer.
- We have synthesized block copolymer dendrimer by thermal [3+2] azide-alkyne cycloaddition reactions through a quick and efficiently strategy, without the need of metal catalysis.
- We have tried to synthesize a new repeating unit having amide bonds using azetidine like reactant, but not was not possible during the duration of this project.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2003.
- ² Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, *17*, 11.
- ³ Buhleier, E.; Wehner, W.; Vogtle, F. *Synthesis.* **1978**, *2*, 155.
- ⁴ Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638.
- ⁵ O. Rolland, C.-O.; Turrin, A.-M.; Caminade; J.-P. Majoral. *New J. Chem.* **2009**, *33*, 1809.
- ⁶ Monfardini, C.; Veronese, F. M. *Bioconjugate Chem.* **1998**, *9*, 418.
- ⁷ Wurm, F.; Frey, H. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 1.
- ⁸ Gitsov, I.; Wooley K. L.; Frechet, J. M. J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1992**, *31*, 1200.
- ⁹ Chapman T. M.; Hillyer G. L.; Mahan E. J.; Shaffer E. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 11195.
- ¹⁰ Gitsov, I.; Ivanova, P. T.; Frechet, J. M. J. *Macromolecules. Rapid Commun.*, **1994**, *15*, 387.
- ¹¹ Sousa-Herves, A.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E. *New J. Chem.* **2012**; *36*:205–10.
- ¹² Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1995**, *28*, 5294.
- ¹³ Kabanov, A. V.; Bronich, T. K.; Kabanov, V. A.; Yu, K.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1996**, *29*, 6797.
- ¹⁴ Osada, K.; Christie, R. J.; Kataoka, K. *Journal of The Royal Society Interface* **2009**, *6*, S325.
- ¹⁵ Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K.B.; *Angew. Chem.*, **2001**, *113*, 2056;
- ¹⁶ Huisgen, R. *Angew. Chem.*, **1963**, *75*, 604; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1963**, *2*, 565.
- ¹⁷ Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 3057.
- ¹⁸ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 2708; *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596.
- ¹⁹ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 15046.
- ²⁰ Gonzaga, F.; Sadowski, L.; Rambarran, T.; Grande, J.; Andronov, A.; Brook, M. *Polymer Chemistry*, **2013**, *51*, 1272–1277.