TESIS DE DOCTORADO

APLICACIONES DE LA QUÍMICA CLICK Y ÁCIDOS BORÓNICOS EN LA SÍNTESIS Y FUNCIONALIZACIÓN DE COPOLÍMEROS DE BLOQUE DENDRÍTICOS PARA LA ENCAPSULACIÓN-LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

Samuel Parcero Bouzas

ESCOLA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Aplicaciones de la Química Click y Ácidos Borónicos en la Síntesis y Funcionalización de Copolímeros de Bloque Dendríticos para la Encapsulación-Liberación Controlada de Fármacos

D. Samuel Parcero Bouzas

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
2) *En la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
4) *Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

En Santiago de Compostela., … de ….. de 2020

Fdo.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Aplicaciones de la Química Click y Ácidos Borónicos en la Síntesis y Funcionalización de Copolímeros de Bloque Dendríticos para la Encapsulación-Liberación Controlada de Fármacos

D. Eduardo Fernández Megía

INFORMA:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. ***Samuel Parcero Bouzas****, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, ... de ..... de 2020

Fdo

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Aplicaciones de la Química Click y Ácidos Borónicos en la Síntesis y Funcionalización de Copolímeros de Bloque Dendríticos para la Encapsulación-Liberación Controlada de Fármacos

D. Ricardo Riguera Vega

INFORMA:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. ***Samuel Parcero Bouzas****, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, ... de ..... de 2020

Fdo.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECEMENTOS

É imposible plasmar nuns poucos parágrafos o sentimento de gratitude, e o profundo aprecio, que lle faga xustiza a todas as persoas que forman parte da miña vida e me acompañaron durante estes anos. Non o farei ben, fareino o mellor que poida.

En primeiro lugar quería agradecer aos meus directores, en concreto a Eduardo, pola oportunidade de formar parte deste grupo. Agradezo a súa paciencia e consellos, e botarei de menos as sempre interesantes conversas planificando e discutindo os resultados experimentais, momentos que mais apreciei (non como os seminarios) e onde tanto aprendín. Todas esas horas invertidas non só serviron como formación académica, senón que tamén foron parte da miña formación persoal, axudándome a ser mais flexible nos meus razoamentos e ideas.

Aos meus pais. Porque non hai un porqué. Gracias ao seu traballo e esforzo estou escribindo estas liñas e non teño outro xeito e obrigación de agradecerlles o que fixeron por min que facelos sentir orgullosos. Aos meus avós, polo mesmo.

A Juan e Roi. Qué iba facer sen Juan no laboratorio. Por ser espectador e guía de todos e cada un dos experimentos que fixen dende a primeira reacción. Por ensinarme como se debe traballar, e se traballa ben nun laboratorio, aínda que as limitacións deste animal sexan as que son. Porque creo que é un ser de luz e toda a positividade que irradia enche o laboratorio, facéndoo unha segunda casa. A Roi, porque algún día me gustaría ter a súa capacidade de traballo e sacrificio. Pola sorte e a envexa que tería todo o mundo que o coñecese, de ter un compañeiro como él ao seu lado. Un referente, e un amigo fora e dentro do laboratorio. Que os rapaces que entren no grupo tomen o seu exemplo, e mais importante, non se asusten da súa mala hostia. A Marcos e Sandra. Marcos por aguantar as miñas ideas, que non foi pouco, e o seu profundo coñecemento sobre química e mangas. A Sandra, por pegarnos, e polas notas que me deixaba na vitrina, que alí seguen e non vou ser responsable de borralas. A Maun e Muna, por ser bos compañeiros e o seu apoio nos momentos nos que a química se fixo dura. Aos meus pupilos: Iago, Raquel, e especialmente a os estoicos de Bruno e Celia, por aceptar os meus consellos e decirlles que xa lles tocará a eles agradecerme algo nas súas teses. A todos os compañeiros

que coñecín na miña estancia: Iria, Luíz, Flonja, Emma, Judith, Rita, Lucia, Sorel, Seila, Tito, Esteban, Zule, Elena, Juanjo e Fran. A Rebeca polas células e porque entende de música. Aos servizos de apoio da RIAIDT, por ser profesionais e axudar con todos os problemas, especialmente a Ramón, porque os problemas co RMN eran menos problemas con él. A Scifinder e ao Sci que acaba en hub.

A Andrea, a Manu, e á princesa de Andrea. Porque hai cousas que non se ensinan na carreira, e clases mais importantes que as que se imparten nas aulas de química. Porque foi a nosa base de operacións e polas saudades que vou ter. A Pozo, José (AKA Cartas), Nuri, Cris, Martín, Beni, Núñez e Torres, por ser unha segunda familia, pero de químicos. Ao meu camarada Alf, polos bos momentos e porque non me imaxino ir a un concerto sen él. A Paula porque sabe de crucigramas e de moitos elementos que non son o carbono. A Luis, Su e Jose, porque non son químicos, pero esfórzanse por aguantarnos.

A Migui, Catalán, Pelu, Casais, Mika, Abe, Vazquez e Rafa, porque o meu afecto e cariño por eles mide mais que o espazo que nos separa.

A Pati, por ser a miña persoa favorita, e porque a admiro. A Jabba e Richard, porque non entenden, e sólo saben dar amor e compañía.

https://www.youtube.com/watch?v=ZXsQAXx_ao0&ab_channel=MotivaShian

RESUMO

Os dendrímeros, descritos por primeira vez por Vötgle, Newkome e Tomalia na década dos 80, son unha clase de macromoléculas sintéticas con unha organización tridimensional altamente ramificada e regular, sendo clasificados como a cuarta maior clase de arquitecturas poliméricas. Este tipo de macromoléculas son estruturas globulares ordenadas sintetizadas mediante un proceso iterativo, dando lugar a macromoléculas compostas por tres partes claramente diferenciadas: i) o núcleo, que se trata dunha molécula polifuncional a partir da cal crece e se ramifica o dendrímero, ii) as xeracións, que son as capas concéntricas interiores formadas por unidades de repetición (moléculas de baixo peso molecular que conforman a estrutura do dendrímero) e iii) a periferia, que é a parte externa do dendrímero e que pode ser funcionalizada con un gran número e variedade de grupos funcionais.

A síntese de dendrímeros, caracterizada por ser un proceso controlado, da lugar a macromoléculas con dispersión nula e morfoloxía globular en disolución, características que non posúen os polímeros tradicionais. Estas propiedades características dos dendrímeros, ofrecen unha vantaxe que se reflexa na multitude de aplicacións que teñen este tipo especial de macromoléculas, que cubre dende a ciencia de materiais, pasando pola catálise e con aplicación en campos como a biomedicina.

Os dendrímeros non son estruturas independentes, senón que poden asociarse quimicamente con outros polímeros, dando lugar a maromoléculas híbridas chamadas copolímeros de bloque dendríticos. Non obstante, a síntese destas estruturas está limitada en grande medida polo alto coste e esforzo sintético da preparación do bloque dendrítico, que require dun control rigoroso e reaccións químicas eficientes para alcanzar a perfección estrutural inherente de este tipo de maromoléculas. Esta limitación deu lugar a busca por parte da comunidade científica de novas reaccións e procedementos cada vez mais eficientes para a síntese de dendrímeros.

Tendo en conta as limitacións sintéticas deste tipo de macromoléculas, no primeiro capítulo de esta tese desenvolveuse a síntese dunha nova familia de copolímeros de bloque lineal-dendrítico seguindo os principios da química *click*.

Para a síntese desta nova familia de macromoléculas utilizouse unha estratexia "*chain-first*". Como bloque lineal empregouse unha cadea de polietilenglicol (PEG), un polímero neutro, flexible e hidrofílico. Ademais, este polímero aportaralle a estrutura híbrida unha baixa toxicidade e inmunoxenicidade, que facilitarán a aplicación do copolímero no campo dos transportadores de fármacos. No deseño do bloque dendrítico utilizouse unha síntese diverxente, utilizando os preceptos e metodoloxía enmarcados dentro da química *click*. En concreto utilizáronse reaccións tipo *metal-free* AAC entre azidas e unidades de repetición con alquinos activados mediante grupos éster. Este tipo de especies activadas non requiren das altas temperaturas e longos tempos de reacción que caracterizan as reaccións AAC clásicas, podendo realizarse as etapas de crecemento dendrítico mediante reaccións con temperaturas moderadas (50 ºC) e cortos tempos de reacción (5 h). Ademais, o uso de radiación MW nestas etapas de crecemento aporta enerxía á reacción dunha forma limpa e eficiente. Para as etapas de activación realizouse unha simple substitución nucleófila entre os grupos cloruro das xeracións previamente sintetizadas por grupos azida, os cales intervirán en novas etapas de crecemento. Deste xeito, lográronse sintetizar ata 5 xeracións dunha nova familia de copolímeros de bloque PEG-dendrímero (PEG-[Gn^{AAC}]) mediante un proceso iterativo de etapas de crecemento/activación e simples purificacións mediante precipitación selectiva que deron lugar a obtención dos produtos en elevado rendemento.

Non obstante, a obtención de alquinos activados é un proceso que limita moito a variedade de grupos funcionais que se poden introducir mediante metodoloxía AAC. Isto é debido á elevada electrofilia do alquino interno, que reacciona facilmente cunha ampla variedade de nucleófilos. Polo tanto, para poder introducir grupos como alcohois ou ácidos carboxílicos na periferia dendrítica desta nova familia de copolímeros de bloque, optouse pola utilización de reaccións TEC e TYC. Para poder cumplir cos preceptos da química *click* nestas reaccións de funcionalización, levouse a cabo unha introdución previa de grupos alqueno e alquino na periferia do dendrímero, seguindo a metodoloxía AAC *metal-free* previamente utilizada para o crecemento do bloque dendrítico, para posteriormente funcionalizar o copolímero con tiois comerciais mediante sinxelas reaccións TEC ou TYC levadas a cabo a temperatura ambiente en apenas 3 h de reacción. Mediante esta metodoloxía sintética logrouse funcionalizar a periferia do dendrímero

con monosacáridos como a galactosa e ácidos carboxílicos procedentes do ácido tiomálico, empregando purificacións sinxelas que comprenden precipitacións selectivas e procesos de ultrafiltración.

Tres dos copolímeros de bloque obtidos mediante estas metodoloxías: PEG-[G3^{AAC}]-Et, PEG-[G3^{AAC}]-Dod e PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph, foron estudados para a súa aplicación no campo dos transportadores de fármacos (DDS). Debido a gran carga hidrofóbica da súa periferia, só os copolímeros PEG-[G3^{AAC}]-Dod e PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph lograron formar micelas estables en disolución. Avaliouse a capacidade de encapsulación da doxorubicina (DOX), un fármaco antitumoral hidrofóbico para as estruturas derivadas de ámbolos dous copolímeros. Cando se incubaron as micelas obtidas co fármaco, observouse que nas estruturas derivadas do polímero PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph se comezaban a producir fenómenos de agregación, aparecendo poboacións irregulares de maior tamaño que as micelas orixinais. Porén, decidiuse utilizar unha concentración menor de fármaco na incubación coas micelas derivadas de este copolímero de bloque, puidendo conservarse deste xeito a súa distribución e tamaño orixinais, obténdose valores de EE=87.5% e DL=10%. Por outro lado, as micelas derivadas do copolímero PEG-[G3^{AAC}]-Dod conservaron o seu tamaño orixinal durante todo o proceso de encapsulación dando uns valores de EE=88.42% e DL=18.6%.

Para poder establecer unha comparación entre ámbolos dous sistemas micelares, realizouse un estudo de liberación do fármaco a diferente pH. O obxectivo deste estudo foi establecer se as diferentes funcionalizacións dos copolímeros de bloque xeraban un diferente perfil de liberación da DOX. Mediante unha diálise a pH 5 e pH 7.4, observouse que ambas micelas presentaban unha liberación dependente da acidez do medio, obténdose percentaxes de liberación sobre o 80% a pH 5, mentres que se obtiveron valores constantes de liberación a pH 7.4 sobre o 20% durante os tempos estudados. Ademais, no se observou unha diferencia significativa da liberación do fármaco comparando os dous sistemas, obténdose valores similares en cada un dos puntos do experimento.

Para explorar a versatilidade desta nova familia de copolímeros de bloque en canto as súas posibles aplicacións, decidiuse avaliar a capacidade do copolímero funcionalizado con ácidos carboxílicos PEG-[G3^{AAC}]-ATM para a formación de micelas PIC e *hybrid*-PIC.

Resumo

As micelas PIC son unha clase de micelas poliméricas que se forman por interacción electrostática entre polielectrolitos de carga oposta, e que se caracterizan por presentar unha carga nula e un tamaño de escala nanométrica que facilita a súa entrada en células diana. Este tipo de micelas demostraron o seu potencial en numerosas aplicacións, incluíndo o transporte de fármacos e outras especies de bioactivas de interese en nanomedicina. Mediante a interacción do copolímero PEG-[G3^{AAC}]-ATM con copolímeros de carga oposta como a PLL ou PLA, obtivéronse micelas PIC con un tamaño aproximado de 30 nm. Estas estruturas foron sometidas a diferentes probas de estabilidade, obténdose un mellor rendemento para as micelas formadas a partir de PLA, sistema que podería ser empregado en sistemas de transporte de fármacos.

Para explorar a capacidade de agregación do copolímero PEG-[G3^{AAC}]-ATM, decidiuse estudar o seu comportamento en disolución mediante a interacción con diferentes ións metálicos. Observouse que para os ións Ca^{2+}, Fe^{2+}, Cd^{2+}, e Ag^{+} se producían fenómenos de agregación, dando lugar a micelas tipo *hybrid*-PIC de diferente tamaño en disolución, acadando tamaños comprendidos entre os 87 e 191 nm. Tamén se avaliou a capacidade dos ións Ca^{2+} para servir como modelo na construción de micelas que puidesen albergar fármacos antitumorais.

Polo tanto, no primeiro capítulo da tese descríbese a síntese e funcionalización dunha nova familia de copolímeros de bloque PEG-dendrímero de tipo LD, mediante o uso dunha metodoloxía enmarcada dentro da química *click*. Así mesmo, demostrouse a versatilidade desta nova familia de copolímeros mediante a a realización dun estudo en profundidade das súas aplicacións para o seu uso como sistemas de transporte de fármacos, mediante o estudio de sistemas hidrofóbicos na encapsulación dun fármaco antitumoral como a DOX, e sistemas cargados para a formación de complexos mediante interaccións electrostáticas en disolución.

Concentrando os esforzos no desenvolvemento e deseño de novos sistemas poliméricos para o transporte de fármacos, no segundo capítulo desta tese estudáronse os ácidos borónicos e o seu potencial na funcionalización de sistemas poliméricos destinados a obtención de DDS.

Recentemente, no noso grupo de investigación desenvolveuse a síntese dunha nova familia de copolímeros de bloque dendríticos basados en PEG e dendrímeros GATG funcionalizados con ácidos borónicos (AB) "tipo Wulff" (PEG-[Gn]-BO_2H_2). Estas especies demostraron o seu potencial para a encapsulación de numerosos fármacos (dexametazona, amfotericina B, rifampicina, dexametasona) mediante a unión selectiva entre os AB e os diois das diferentes moléculas. A formación dos correspondentes ésteres borónicos produce unha hidrofobización do bloque dendrítico, que da lugar a unha autoensamblaxe e formación de micelas de tamaño nanométrico en disolución. Co obxectivo de coñecer os equilibrios implicados na formación de estas nanoestructuras, no segundo capítulo de esta tese realizouse un estudo en profundidade mediante ^{1}H e ^{11}B RMN da interacción entre diferentes diois e os ácidos borónicos empregados na funcionalización dos copolímeros de bloque.

Os AB tipo Wulff empregados no estudos de interacción, son derivados arilborónicos cun grupo -CH_2-N(R'R'') situado en orto ao ácido borónico. O grupo amino característico de estas especies da lugar a ésteres borónicos nos que se forma un enlace dativo N→B en medio orgánico. Este tipo de ácidos borónicos e a súa interacción con diois na formación de ésteres foron ampliamente estudados dende a súa introducción no campo de sensores fluorescentes. Ate o día de hoxe, os equilibrios en disolución que presentan estas especies xeran controversia e continúan sendo obxecto de investigación.

Para coñecer o tipo de interacción existente entre os AB tipo Wulff cos cales está funcionalizado o PEG-[G3]-BO_2H_2 e os diferentes diois, sintetizouse un AB modelo (2-PFB) que incorpora un grupo -CH_2-NH-$(CH_2)_2$- CH_3 en orto ao ácido borónico. Isto foi necesario xa que o elevado peso molecular e a complexidade estructural do copolímero dificultan a análise das diferentes valoracións plantexadas.

Mediante unha análise exhaustiva dos espectros de ^{1}H e ^{11}B RMN dos diferentes ésteres borónicos derivados da interacción entre 2-PFB e os diois estudados, estableceuse que en disolvente orgánico fórmase un enlace dativo tipo N→B que da lugar a dous enantiómeros en disolución. Ademais, observouse que os desprazamentos de ^{11}B RMN deste tipo de ésteres son dependentes da temperatura e disolvente, facendo imposible determinar a hibridación do átomo de boro mediante unha análise directa destes espectros, feito que establece unha diferencia cos estudos previamente publicados. Tamén se observou que en disolvente prótico, as afinidades dos diois polo 2-

PFB víanse reducidas considerablemente, formándose únicamente os ésteres borónicos derivados de catecois. Este feito indica que para a formación de micelas, na molécula obxecto de encapsulación sería necesaria a presencia de un diol de tipo catecol, ou, na súa ausencia, que esta molécula contivese un 1,2 ou 1,3 diol e que fose o suficientemente hidrofóbica como para promocionar unha autoensamblaxe e agregación dos copolímeros. Deste xeito actuaría como un nanorreactor para a formación de novos ésteres borónicos no interior do seu *core*.

Os coñecementos adquiridos aplicáronse para a encapsulación de DOX utilizando o copolímero PEG-[G3]-BO_2H_2. A doxorubicina presenta na súa estrutura varios grupos funcionais que son susceptibles de interactuar con ácidos borónicos, porén decidiuse determinar o tipo de interacción que se produce entre este fármaco e os AB do copolímero de bloque. Foi imposíbel realizar unha análise directa da interacción mediante ^{1}H e ^{11}B RMN entre a DOX e o 2-PFB, debido a unha completa desaparición da sinal en ^{11}B RMN sumado a un ampliamento e unha perda de resolución nais sinais do espectro de ^{1}H RMN. Debido a isto, decidiuse simplificar a valoración mediante o uso de tres moléculas modelo máis sinxelas que incorporan toda a funcionalidade presente na DOX. Os análogos estruturales seleccionados foron a quinizarina (o cal incorpora o bloque de antraciclina coas dúas hidroxicetonas), (1*R*, 2*S*)-*cis*-aminociclohexanol (que incorpora o 1,2-aminoalcohol presente no anel de daunosamina e a dexametasona (que presenta unha 1,3-dihidroxipropanona exocíclica idéntica a presente en DOX. Mediante a análise destas tres moléculas determinouse que a funcionalidade responsábel da interacción entre os AB e DOX se trata da 1,3-dihidroxipropanona.

Posteriormente, realizouse un estudo de encapsulación de DOX co polímero PEG-[G3]-BO_2H_2 en disolución. Realizando unha incubación de ámbalas dúas especies a pH 7.2 e 37 ºC durante 24 h, obtivéronse micelas dun tamaño aproximado de 45 nm e con uns valores de EE=96% e DL=49%. Realizouse unha caracterización destas nanoestructuras mediante espectroscopía de fluorescencia, obervándose unha diminución da fluorescencia das micelas comparadas co fármaco libre, indicativo de fenómenos de *quenching* entre as moléculas de DOX situadas no núcleo das micelas. Tamén se levaron a cabo estudos de AFM, mediante os cales se puido observar a morfoloxía esférica destas estruturas e un tamaño medio de 30 nm. Analizouse o perfil de liberación do fármaco mediante unha diálise a diferentes pH, observándose unha liberación dependente da acidez do medio, acadando valores do 60 % a pH 5, mentres que se observou unha liberación do 10 % sostida no tempo a pH fisiolóxico.

Por último, as micelas obtidas utilizáronse no estudo da citotoxicidade e internalización en células A549. Os estudos de MTT realizados a 24 e 48 h amosaron unha citoxicidade maior para as micelas de DOX que para o fármaco libre, demostrando o seu posible potencial terapéutico. Asimesmo, estudios de microscopía revelaron que estas micelas eran internalizadas intracelularmente mediante un mecanismo de endocitose, encontrándose en endosoma/lisosoma tras 1 h de incubación. Un seguemento deste tráfico celular, amosou que tras 2 h a DOX que se encontra no interior das micelas era capaz de difundir do lisosoma, colocando co núcleo celular.

Polo tanto, neste segundo capítulo realizouse un estudio exhaustivo mediante ^{1}H e ^{11}B RMN e da interacción entre os ácidos borónicos tipo Wulff do copolímero de bloque con diferentes diois. Este estudo serveu de referencia para entender os procesos de agregación de estas especies en disolución, podendo establecer unha serie de criterios para predecir a autoensamblaxe do sistema. Así mesmo, a información obtida serveu de referencia para a encapsulación do fármaco antitumoral DOX. Estas micelas foron caracterizadas mediante espectroscopía de fluorescencia e AFM. Por último, analizouse o seu perfil de liberación co pH e avaliouse a súa capacidade terapéutica coa liña celular A549.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1. DENDRÍMEROS 1
1.1.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES 1
1.1.2. HISTORIA 4
1.1.3. SÍNTESIS 10
1.1.3.1. SÍNTESIS CONVENCIONALES 10
1.1.3.2. SÍNTESIS ACELERADAS 12
1.1.3.3. QUÍMICA ORTOGONAL 14
1.2. QUÍMICA CLICK 16
1.2.1. DEFINICIÓN 16
1.2.2. AAC 18
1.2.2.1. CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR 18
1.2.2.2. AAC Y CuAAC 19
1.2.2.3. LIMITACIONES Y ALTERNATIVAS 21
1.3. QUÍMICA CLICK APLICADA A LA SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS 23
1.3.1. CuAAC 24
1.3.2. Metal-free AAC 25
1.3.3. TEC 27
1.3.4. TYC 30
1.3.5. DIELS-ALDER 31
1.3.6. CONTROL DE LAS REACCIONES CLICK 32
1.3.6.1. MICROONDAS (MW) 32
1.3.7. CLICK VS EFICIENCIA 34
1.4. COPOLÍMEROS DE BLOQUE 37
1.4.1. COPOLÍMEROS DE BLOQUE L-D 38
1.4.1.1. DEFINICIÓN 38

1.4.1.2. ESTRUCTURA 39
1.4.1.3. SÍNTESIS 40
1.4.2. PROPIEDADES DE LOS COPOLÍMEROS EN DISOLUCIÓN 42
1.4.2.1. AUTOENSAMBLAJE 42
1.4.2.2. MICELAS ANFIFÍLICAS 44
1.4.2.3. MICELAS PIC 45
1.5. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE DENDRÍMEROS Y COPOLÍMEROS DE BLOQUE L-D 48
1.5.1. TRANSPORTE DE FÁRMACOS (DD) 49
1.5.2. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS INTELIGENTES (SDDS) 50
1.5.3. DENDRÍMEROS COMO SDDS 55
1.5.3.1. DENDRÍMEROS GATG 60
1.5.4. COPOLÍMEROS DE BLOQUE COMO SDDS 63
1.6. ÁCIDOS BORÓNICOS 65
1.6.1. PROPIEDADES Y REACTIVIDAD 65
1.6.2. ÁCIDOS BORÓNICOS Y DIOLES 66
1.6.2.1. EQUILIBRIOS 67
1.6.2.2. MECANISMO 69
1.6.2.3. AFINIDAD 70
1.6.3. ÁCIDOS BORÓNICOS TIPO WULFF 74
1.6.4. APLICACIONES DE LOS ÁCIDOS BORÓNICOS EN SDDS 80
1.6.4.1. ESPECIES SENSIBLES A ROS 80
1.6.4.2. ESPECIES SENSIBLES A MEDIO ÁCIDO 82
1.6.4.3. ESPECIES SENSIBLES A DIOLES 84
2. OBJETIVOS 87
3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS CAP. I 90

3.1. SÍNTESIS ACELERADA DEL COPOLÍMERO DE BLOQUE PEG-[G5^{AAC}]-Cl 90
3.1.1. Plan retrosintético 90
3.1.2. Síntesis PEG-N_3 92
3.1.3. Síntesis del bloque dendrítico 93
3.2. FUNCIONALIZACIONES AAC 100
3.2.1. Plan retrosintético 100
3.2.2. Funcionalización de PEG-[G2^{AAC}]-N3 con Alk-Et / Alk-(Dod) y Alk-Bu-Ph 100
3.2.3. Pre-Funcionalización de PEG-[G2^{AAC}]-N_3 con Alk-All, Alk-Prop y Alk-Pr-Br 102
3.3. POST-FUNCIONALIZACIÓN 106
3.3.1. Post-Funcionalización TEC sobre el PEG-[G3^{AAC}]-All 107
3.3.2. Post-Funcionalización TYC de PEG-[G3^{AAC}]-Prop 111
3.4. ESTUDIOS DE AGREGACIÓN 114
3.4.1. Micelas anfifílicas 114
3.4.2. Micelas PIC 121
3.4.3. Complejos *hybrid*-PIC 126
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS CAP. II 137
4.1. AB EN LA ENCAPSULACIÓN DE DIOLES 137
4.2. TRABAJO REALIZADO 138
4.2.1. Síntesis y estudio del ácido borónico modelo (2-PFB) en disolución 138
4.2.2. Estudios estructurales de la interacción entre 2-PFB_B con 1,2-dihidroxibenceno, 1,2-etanodiol y 1,3-propanodiol. 148
4.2.2.1. 1,2-Dihidroxibenceno 149
4.2.2.2. 1,2-Etanodiol 159
4.2.2.3. 1,3-Propanodiol 165
4.2.3. Estudios de afinidad de 2-PFB_B con 1,2 y 1,3-dioles en DMSO-d_6 172

4.2.3.1. Catecoles 172
4.2.3.2. 1,2-dioles 176
4.2.3.3. 1,3-dioles 180
4.2.3.4. Análisis de las tendencias 185
4.2.4. Estudios de afinidad de 2-PFB_B con 1,2 y 1,3-dioles en DMSO-d_6/D_2O 185
4.2.4.1. 1,2-Dihidroxibenceno 187
4.2.4.2. 1,2-Etanodiol 189
4.2.4.3. (R)-(+)-1,2-Dodecanodiol 190
4.2.5. Estudio de la interacción de la DOX con 2-PFB_B 191
4.2.6. Estudios de agregación de DOX con el copolímero PEG-[G3]-BO_2H_2 202
4.2.6.1. Caracterización de las micelas con DOX 203
4.2.6.2. Estudios de liberación 206
4.2.6.3. Estudios celulares 207
5. CONCLUSIONES 211
6. PARTE EXPERIMENTAL 215
6.1. Materiales y métodos 215
6.1.1. Materiales 215
6.1.2. Métodos e instrumentación 215
6.1.3. Procedimientos generales empleados en las elaboraciones 219
6.2. CAP. I 220
6.2.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN 220
But-2-inodiato de bis[2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etilo) (Alk-TEG-Cl) 220
3-azidopropan-1-amina 221
PEG-NHS 222
PEG-N_3 223
PEG-[$G1^{AAC}$]-Cl 226

PEG-[G1^{AAC}]-N_3 228
PEG-[G2^{AAC}]-Cl 230
PEG-[G2^{AAC}]-N_3 233
PEG-[G3^{AAC}]-Cl 235
PEG-[G3^{AAC}]-N_3 237
PEG-[G4^{AAC}]-Cl 239
PEG-[G4^{AAC}]-N_3 241
PEG-[G5^{AAC}]-Cl 243
PEG-[G3^{AAC}]-Et 245
But-2-inodiato de didodecilo (Alk-Dod) 247
PEG-[G3^{AAC}]-Dod 248
But-2-inodiato de bis(4-fenilbutilo) (Alk-Bu-Ph) 250
PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph 251
But-2-inodioato de bis(3-bromopropilo) (Alk-Pr-Br) 254
PEG-[G3^{AAC}]-Pr-Br 255
But-2-inodiato de dialilo (Alk-All) 257
PEG-[G3^{AAC}]-All 258
But-2-inodiato de di(prop-2-in-1-ilo) (Alk-Prop) 260
PEG-[G3^{AAC}]-Prop 261
PEG-[G3^{AAC}]-ATM 264
PEG-[G3]-Gal 268
6.2.2. PREPARACIÓN DE MICELAS POLIMÉRICAS 272
6.2.2.1. Preparación de micelas anfifílicas 272
6.2.2.2. Estudios de encapsulación de doxorubicina 272
6.2.2.3. Preparación de micelas PIC 272
Micelas PIC con PLL 272

Micelas PIC con PLA..... 272
Estudios de estabilidad..... 273
6.2.2.4. Preparación de micelas Hybrid PIC 273
Micelas de Ca^{2+} 273
Micelas de Ag^{+} 273
Micelas de Cd^{2+} 273
Micelas de Fe^{2+} 274
6.3. CAP. II 274
6.3.1. Síntesis y Caracterización 274
Ácido (2-((propilamino)metil)fenil)borónico (2-PFB_{OH})..... 274
6.3.2. Procesado de los espectros de ^{11}B RMN 276
6.3.3. Datos cristalográficos de la boroxina 2-PFB_T 279
6.3.4. Realización de las valoraciones..... 284

ABREVIATURAS

Å	Armstrong
AAC	Cicloadición Azida-Alquino
AB	Ácidos Borónicos
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
All	Alilo
ARS	Alizarina Sulfonato
ATM	Ácido Tiomálico
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Reflectancia Total Atenuada
BIC	Complejos de Ionómeros de Bloque
Bu-Ph	Butilfenilo
c	cuartete
CAC	Concentración de Agregación Crítica
CDI	1,1'-carbonildiimidazol
CMC	Concentración Micelar Crítica
Co	Corporación
COSY	Espectroscopía de Correlación
CuAAC	Cicloadición Azida-Alquino catalizada con cobre
d	doblete
Da	Dalton
DA	Reacción Diels-Alder
DD	Transporte de Fármacos
DDS	Sistemas de Transporte de Fármacos
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
DMPA	2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona
DNQ	diazonaftoquinona
Dod	Dodecilo
DOSY	Espectroscopía de Difusión Ordenada
DOX	Doxorubicina
EDA	Etilendiamina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EMA	Agencia de Medicamentos Europea
EPR	Efecto de Permeabilidad y Retención Aumentada
eq	Equivalentes
Et	Etilo
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
Gal	Galactosa
GATG	Ácido Gálico Trietilenglicol
GFLG	Glicina-Fenilalanina-Leucina-Glicina
GHz	Gigahercios
GSH	Glutatión
h	hora
HSQC	Experimento de Coherencia Cuántica Única Heteronuclear
iEDDA	Diels-Alder con Demanda Inversa de Electrones
IR	Radiación Infrarroja
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
J	Constante de acoplamiento
Kcal	Kilocalorías
kDa	Kilodalton
LALLS	Dispersión de Luz Láser de Ángulo Bajo
LCST	Temperatura Mínima de Disolución Crítica

L-D	Lineal-Dendrítico
m	multiplete
M	Molar
MALLS	Dispersión de Luz Multiangular
MHz	Megahercios
MQ	Mili-Q
MW	Radiación Microondas
NIPAM	N-isopropilacrilamida
NIR	Radiación Infrarrojo Cercano
N-PEC	Complejos de Electrolitos No-Estequiométricos
ºC	Grado Celsius
ONB	Orto-nitro-benzoílo
PAMAM	poliamidoaminas
PB	Tampón Fostato
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de Hidrógeno
PIC	Complejos Poliiónicos
PLA	poli-L-arginina
PLL	poli-L-lisina
pNIPAM	poli(N-isopropilacrilamida)
PPI	propileniminas
ppm	Partes por Millón
Pr-Br	Bromopropilo
Prop	Propargilo
q	quintuplete
QELS	Dispersión de Luz Cuasi Elástica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROP	Polimerrización por Apertura de Anillo
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
s	singulete
SDDS	Sistemas de Transporte de Fármacos Inteligentes
SPAAC	Cicloadición Azida-Alquino Promovida por Tensión Anular
S-PEC	Complejos de Electrolitos Estequiométricos
t	triplete
ta	Temperatura Ambiente
TBTA	Tris((1-bencil-4-triazolil)metil)amina
TEC	Reacción Tiol-Eno
TEG	Trietilenglicol
THPA	Tris((1-hidroxipropil-4-triazolil)metil)amina
TYC	Reacción Tiol-Ino
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de Onda

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DENDRÍMEROS

1.1.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Las arquitecturas dendríticas están presentes en la naturaleza (Figura 1). Se pueden encontrar en estructuras macroscópicas como son los árboles, que adaptaron la morfología de sus copas a la forma dendrítica para captar de forma eficiente la luz solar y sus raíces para absorber nutrientes de la tierra. También en estructuras microscópicas como las neuronas, que utilizan prolongaciones ramificadas llamadas dendritas para la recepción de estímulos a través de una red de conexiones, que daría lugar a la teoría neuronal presentada por Santiago Ramón y Cajal a finales del siglo XIX. El ejemplo más notable del uso de este tipo de estructuras ramificadas por parte de la naturaleza es la propia selección natural y evolución biológica, que han ido adaptando las diversas especies a través de millones de años a partir de un ancestro común, y cómo estos caminos evolutivos adquieren forma arborescente pudiéndose representar gráficamente como un dendrograma.

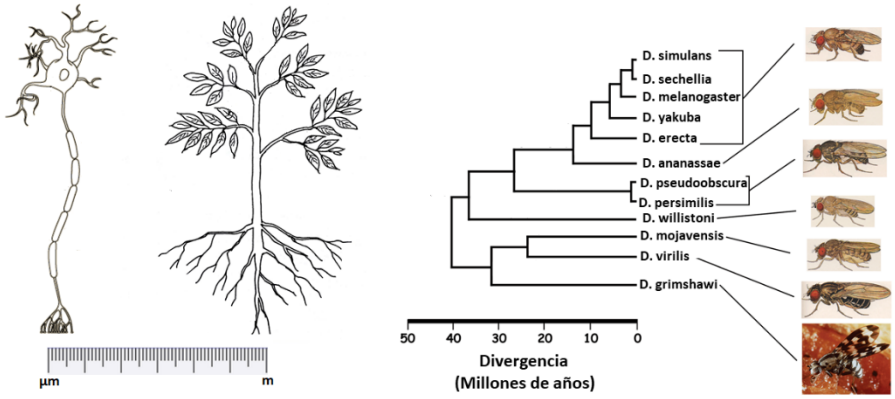


Figura 1. Estructuras dendríticas encontradas en la naturaleza. Imagen adaptada de Creative Commons.

Los dendrímeros, del griego *dendron* (árbol) y *meros* (parte), son una clase de macromoléculas sintéticas con una organización tridimensional altamente

ramificada y regular, que han sido clasificados como la cuarta mayor clase dentro de las arquitecturas poliméricas.[1]

Su estructura está formada por tres partes claramente diferenciadas (Figura 2): i) el núcleo o ***core***, que es el punto focal a partir del cual crece y se ramifica el dendrímero, ii) las capas interiores, compuestas de unidades de ramificación que crecen de forma controlada a partir del núcleo central, formando las **generaciones** del dendrímero, y iii) la **periferia**, la parte externa de la estructura del dendrímero que puede ser decorada con un gran número y variedad de grupos funcionales, que definirá en gran medida las propiedades fisicoquímicas y biológicas del dendrímero.

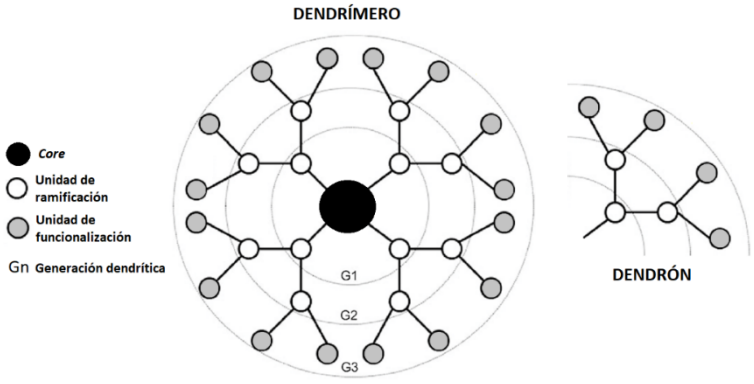


Figura 2. Arquitectura de un dendrímero. Imagen adaptada de Creative Commons.

Dentro de las arquitecturas dendríticas, existen dos grandes tipos de polímeros compuestos íntegramente de unidades ramificadas: los dendrímeros/dendrones y los polímeros hiperramificados (Figura 3).[2] Los polímeros hiperramificados, son producto de una polimerización aleatoria de monómeros,[3] que da lugar a arquitecturas altamente desordenadas y complejas.[4] Los dendrímeros, por otro lado, son macromoléculas globulares

[1] Tomalia, D. A. *Macromol. Symp.* **1996**, *101*, 243-255.

[2] **(a)** Mitsutoshi, J.; Kakimoto, M. A. *Prog. Poly. Sci.* **2001**, *26*, 1233-1285; **(b)** Kricheldorf, H. R.; Zang, Q. -Z.; Schwarz, G. *Polymer* **1982**, *23*, 1821-1829; **(c)** Kim, Y. H.; Webster, O. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4592-4593.

[3] Konkolewicz, D.; Gray-Weale, A.; Perrier, S. *Macromol. Theor. Simul.* **2010**, *19*, 219-227.

[4] **(a)** Tomalia D. A. *Aldrichim. Acta* **2004**, *37*, 39-57; **(b)** Grayson S. M.; Fréchet, J. M. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3819-3867.

altamente ordenadas y sintetizadas mediante un proceso iterativo. Si estos procesos sintéticos se realizan de forma controlada, en la construcción del dendrímero se seguirán progresiones geométricas, pudiéndose predecir el número de grupos de la periferia, el número de puntos de ramificación por generación e incluso el peso molecular del dendrímero.[5]

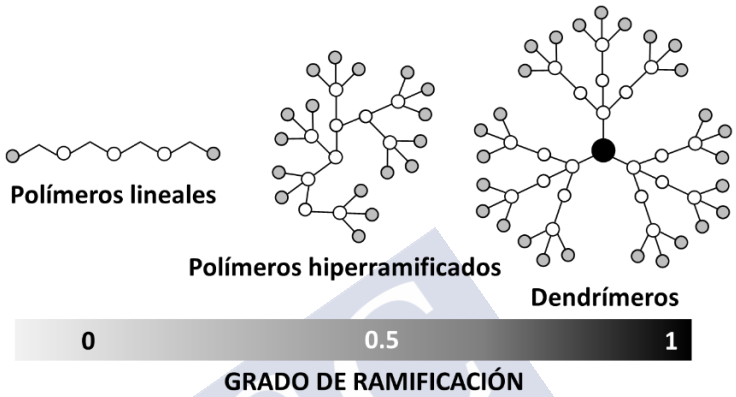


Figura 3. Comparación entre los grados de ramificación entre estructuras poliméricas.

Estas características únicas dotan a los dendrímeros de propiedades que difieren de los polímeros tradicionales: i) Los dendrímeros son completamente monodispersos, a diferencia de los polímeros lineales que se obtienen con un rango determinado de pesos moleculares. ii) A medida que su peso molecular se incrementa, las propiedades de los dendrímeros estarán ligadas a la naturaleza de los grupos funcionales de su periferia. Estas funcionalizaciones serán el principal contacto entre el dendrímero y su entorno químico. iii) Los polímeros lineales tradicionales pueden crecer virtualmente hasta el infinito, dependiendo de su solubilidad. Sin embargo, para los dendrímeros existe una limitación estérica, llamada empaquetamiento denso de De Gennes [6] que impide a estas macromoléculas puedan crecer de forma correcta a partir de una determinada generación. Aun así, el crecimiento puede continuarse a partir de este límite para dar lugar a dendrímeros irregulares que incorporarán defectos estructurales.

[5] Tomalia D. A; Uppuluri, S.;Swanson, D. R.; Brothers II, H. M.; Piehler, L. T.; Li, J.; Mijer, D. J.; Hagnauer, G. L.; Balogh, L. *Mat Res. Soc. Symp. Proc*. **1999**, *543*, 289-298.
[6] De Gennes, P. G.; Hervet, H. *J. Physique* **1983**, *44*, 351-360.

1.1.2. HISTORIA

En la década de 1940, Paul J. Flory (1910-1985), fue el primero en examinar de forma teórica el potencial de las estructuras ramificadas en las arquitecturas macromoleculares.[7] Precisamente, por sus avances en el campo de la fisicoquímica de las macromoléculas recibiría el Premio Nobel de Química en 1974. Sin embargo, no fue hasta mediados de la década de 1980, cuando la síntesis de esta clase de macromoléculas ramificadas se desarrolló lo suficiente como para permitir su estudio práctico. La primera referencia académica que existe sobre la síntesis de estructuras dendríticas data del año 1978. Con el objetivo de desarrollar grandes cavidades moleculares que permitiesen interacciones anfitrión-huésped, Vögtle et al. describieron la síntesis divergente del primer precursor dendrítico, un derivado de poliaminas al que denominaron conceptualmente "molécula en cascada".[8] Sin embargo, la obtención de este nuevo tipo de moléculas se llevaba a cabo de forma ineficiente debido a procesos sintéticos con bajos rendimientos y reacciones incompletas en la etapa de reducción, en que se utilizaba Co (II)/$NaBH_4$ para la conversión de grupos nitrilo a amina, que daban lugar a precursores de bajo peso molecular (1< kDa).

No fue hasta el año 1993, después de 15 años tras esta primera publicación, cuando, independientemente, los grupos de Mülhaupt [9] y Meijer [10] publicaron una metodología sintética que permitía la obtención de cantidades comerciales de dendrímeros derivados de propileniminas (PPI) de generación 5 y 5 kDa. El grupo de Meijer superó las limitaciones sintéticas que tenía Vötgle en su etapa de reducción, utilizando una hidrogenación catalítica con cobalto-Raney (40 atm, 70 ºC) que permitía realizar esta reacción entre 1 y 3 h dependiendo de la generación. Por otro lado, Mülhaupt utilizó una hidrogenación catalítica con níquel-Raney en unas condiciones más suaves (8 bar, 25 ºC), incrementando considerablemente los tiempos de reacción, que variaban entre 7 h para G1 y 4 días para G4. Hoy en día, estos procedimientos

[7] **(a)** Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc*. **1941**, *63*, 3083-3090; **(b)** Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc*. **1941**, *63*, 3091-3096; **(c)** Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc*. **1941**, *63*, 3096-3100; **(d)** Flory, P. J. *J. Am. Chem. Soc*. **1942**, *64*, 1712-1719.

[8] Buhleier, E.; Wehner, W.; Vötgle, F. *Synthesis* **1978**, *405*, 155-158.

[9] Wörner, C.; Mülhaupt, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1306–1308.

[10] Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1308-1311.

sintéticos para la obtención de macromoléculas con estructuras ramificadas reciben el nombre de proceso Vögtle/Mülhaupt/Meijer.[11]

Pese a que la investigación de Vögtle fue el primer trabajo publicado de este nuevo concepto de "moléculas en cascada", se estaba desarrollando un proyecto paralelo que daría lugar al término que hoy en día se utiliza en todo el mundo para definir a este tipo de macromoléculas, los dendrímeros. En el año 1979, en los Laboratorios para la Investigación Química de la Dow Chemical Company, se desarrolló la metodología que permite la obtención de macromoléculas con estructuras ramificadas simétricas derivadas de poliamidoaminas (PAMAM). El grupo original del Laboratorio de Polímeros Funcionales de la Dow Chemical Co., liderado por Donald Tomalia,[12] desarrolló entre los años 1979 y 1985 esta nueva metodología sintética, que no sufría los problemas de bajos rendimientos, pureza o purificaciones que describía Vögtle en su primer artículo.

Aunque la publicación de estos resultados debía tener la aprobación de la Dow, la empresa tenía curiosidad sobre la aplicación industrial que podrían tener este nuevo tipo de macromoléculas en su negocio comercial de polímeros. Fue esta la razón por la cual autorizó una primera difusión oral de estos resultados. Tomalia y sus colaboradores presentaron sus resultados sobre la síntesis divergente de macromoléculas con estructura ramificada simétrica en la Pauling-Flory Polymer, Gordon Conference [13] en enero del año 1983 (Santa Barbara, California). Asimismo, durante la celebración de esta conferencia, Denkewalter et al., mostraron resultados referentes a una patente concedida en el año 1981, que tenía como empresa cesionaria la Allied Chemical Corporation, y en la cual se describía una arquitectura macromolecular similar a la de Tomalia.[14] Los inventores de la patente, propusieron un protocolo sintético divergente utilizando secuencias de reacción de protección-desprotección de poli-L-lisina (PLL), que conducían a

[11] Tomalia, D. A.; Nixon, L. S.; Hedstrand, D. M. *Biomolecules* **2020**, *10*, 642.

[12] Tomalia, D. A.; Fréchet, J. M. J. *J. Polym. Sc. I Part A: Polym. Chem*. **2002**, *40*, 2719–2728.

[13] Tomalia, D. A. Starburst Macromolecules. In Proceedings of the Flory-Pauling Macromolecular Conference (Gordon Conference)-Frontiers in Synthetic Polymer Chemistry, Santa Barbara, CA, USA, 10–14 January **1983**.

[14] Denkewalter, R. G.; Kolc, J. F.; Lukasavage, W. J. Macromolecular Highly Branched Homogenous Compound Based on Lysine Units. U. S. Patent 4,289,872, 15 September **1981**.

macromoléculas con estructura ramificada asimétrica (a diferencia de las de Tomalia y su equipo) de generación 10 y pesos moleculares de hasta 300 kDa.

Cronológicamente, el primer documento que recoge el uso del término "dendrímero" para referirse a esta nueva clase de macromoléculas es un registro de patente, solicitada por Dow, que data del año 1983. En este documento, Tomalia et al., definían un dendrímero como "*un polímero que tiene un núcleo polivalente que está unido covalentemente a al menos dos ramas dendríticas ordenadas (en forma de árbol) que se extienden a lo largo de al menos dos generaciones*".[15]

Sin embargo, no fue hasta agosto del año 1984, cuando durante la celebración de la 1st International Polymer Conference, Society of Polymer Science Japan (Kyoto),[16] Tomalia y sus colaboradores utilizaron por primera vez el término "dendrímero" para referirse públicamente a este nuevo tipo de macromoléculas. En esas mismas fechas enviaron el primer manuscrito en el que se recogerían todos los avances en la síntesis de los nuevos dendrímeros desarrollados en la Dow. En el artículo, publicado el 1 de enero de 1985,[17] se describía la síntesis divergente de dos familias de dendrímeros PAMAM a partir de núcleos de amoníaco y etilendiamina (EDA). A través de un proceso iterativo de 12 pasos, consiguieron sintetizar dendrímeros PAMAM de generación 5 y 10 kDa de peso molecular a partir del núcleo de amoníaco. Por otro lado, partiendo del núcleo de EDA, llegaron a sintetizar dendrímeros de generación 7 y un peso molecular de 47 kDa. Además, describían su uso como *building blocks* para la formación de poli-dendrímeros, llamados "Starburst Polymers" en la publicación, y que hoy en día reciben el nombre de megámeros.[18]

En mayo de ese mismo año, Newkome et al. publicaron un artículo en el que describían la síntesis de una nueva clase de "moléculas en cascada", en

[15] Tomalia, D. A.; Dewald, J. R. Dense Star Polymer. U. S. Patent 4,558,120, 10 December **1985**.

[16] Tomalia, D. A.; Dewald, J. R.; Hall, M. J.; Martin, S. J.; Smith, P. B. Preprints: 1st SPSJ International Polymer Conference, Kyoto, Japan, 20–24 August **1984**; Society of Polymer Science: Kyoto, Japan, **1984**; p. 65.

[17] Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117–132.

[18] Fréchet, J. M. J.; Tomalia, D. A. Dendrimers and Other Polymers; Wiley: West Sussex, **2001**.

referencia al trabajo de Vögtle, que denominaron "arboroles".[19] En el trabajo se sintetizó de forma divergente una estructura dendrítica de generación 3 y con un peso molecular inferior a 2 kDa, siendo mucho menor que las estructuras sintetizadas por Tomalia y Denkewalter.

Hasta 1985 sólo los equipos de Tomalia y Denkewalter habían conseguido sintetizar de forma eficiente macromoléculas dendríticas de elevado peso molecular, pero la patente concedida a la Allied Chemical Co. se consideraba estado de la técnica y todas las patentes relacionadas con macromoléculas dendríticas presentadas por la Dow fueron rechazadas en un primer momento. Motivados por el dilema que representaba la patente de la Allied, Tomalia y su equipo debían demostrar de forma inequívoca que los dendrímeros de Denkewalter y los suyos presentaban características fisicoquímicas completamente diferentes.

Un estudio crítico de estas propiedades mostró que los índices de refracción de los dendrímeros de Denkewalter permanecían constantes en función de la generación, mientras que los dendrímeros de PAMAM tenían valores de refracción variables en función de la misma.[20] Estos hechos experimentales dieron lugar a la evidencia de que había "espacios vacíos" llenos de disolvente en el interior de los dendrímeros PAMAM, a diferencia de los de PLL. Estos estudios fueron posteriormente corroborados por Ahanori et al. mostrando que los dendrímeros de Denkewalter eran macromoléculas densas, esferoides que no mostraban evidencia de huecos en su topología independientemente de la generación o el peso molecular.[21] Asimismo, más tarde también se demostraría la habilidad de los dendrímeros PAMAM de encapsular pequeñas moléculas orgánicas como la aspirina.[22] Anecdóticamente, el principal carácter diferenciador entre las dos estructuras fueron las propiedades de los dendrímeros de Tomalia para dar lugar a interacciones anfitrión-huésped, campo en el que Vögtle desarrolló sus primeros precursores dendríticos.

Una vez demostrada la diferencia existente entre las dos clases de dendrímeros, la patente solicitada por Dow fue finalmente concedida en el año

---

[19] Newkome, G. R.; Yao, Z.-Q.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. *J. Org. Chem*. **1985**, *50*, 2003–2004.

[20] **(a)** Tomalia, D. A.; Hall, M.; Hedstrand, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 1601–1603; **(b)** Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard III, W. A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 138–175.

[21] Aharoni, S. M.; Crosby III, C. R.; Walsh, E. K. *Macromolecules* **1982**, *15*, 1093–1098.

[22] Naylor, A. M.; Goddard III, W. A.; Keifer, G. E.; Tomalia, D. A. *J. Am. Chem. Soc*. **1989**, *111*, 2339–2341.

1985. Esto obligó a las oficinas de patentes internacionales a definir dos categorías para la clasificación de dendrímeros (Figura 4).[11] Estas categorías estarían basadas en la topología de las unidades de ramificación de estas macromoléculas: la Categoría I comprendería los dendrímeros con unidades simétricas, conocidos también como dendrímeros tipo Tomalia, por otro lado, en la Categoría II se clasificarían los polímeros con unidades asimétricas, o dendrímeros tipo Denkewalter.

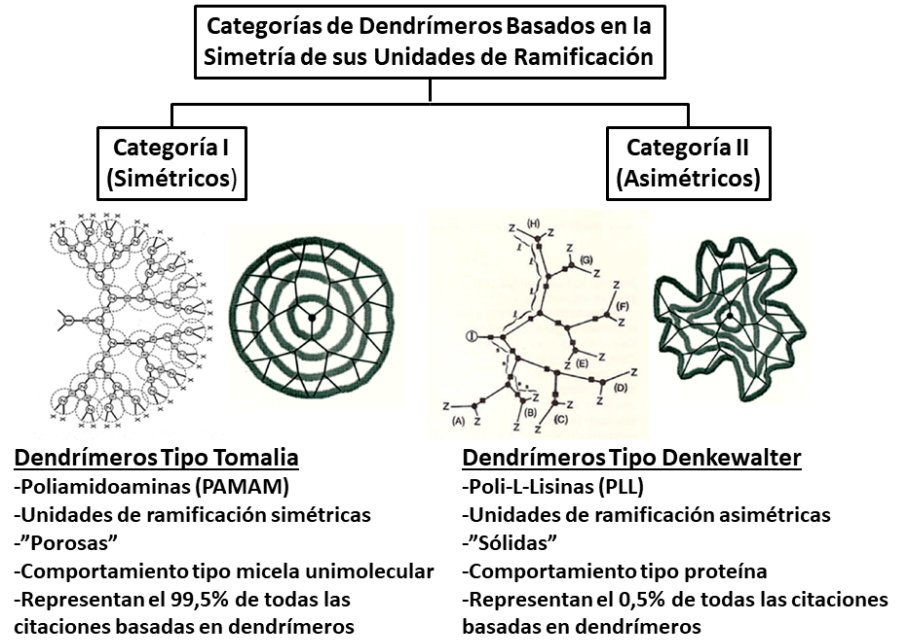


Figura 4. Diferencias entre los dendrímeros tipo Tomalia y tipo Denkewalter. Imagen adaptada de la referencia 11.

Los avances de Tomalia en el campo de la síntesis de macromoléculas dendríticas suscitó el interés de Jean M. J. Fréchet, que inició sus estudios en el campo en 1987 en la Universidad Cornell. Hasta esta fecha, la síntesis de dendrímeros se llevaba a cabo de forma exclusivamente divergente, pero fue después de que dos estudiantes postdoctorales, Craig Hawker y Athena Phillipides, se unieran al grupo de Fréchet, cuando aportaron el siguiente avance significativo a la ciencia de dendrímeros. La metodología convergente para la síntesis de dendrímeros fue desarrollada entre 1988 y 1989 por Fréchet et al., culminando en una presentación inicial de sus resultados en el Simposio

Internacional de Macromoléculas de la IUPAC en Seul (Korea).[23] En enero de 1990, Fréchet y Hawker enviaron su primera publicación en la que describían la síntesis de "fragmentos dendríticos" simétricos derivados de poliéteres bencílicos, de generación 6 y pesos de 40 kDa por LALLS, que unían en una última etapa a un *core* polifuncional.[24]

Paralelamente, Miller et al., publicaron en julio del mismo año la síntesis convergente de dendrímeros basados en 1,3,5-triarilbencenos (siendo los primeros ejemplos completamente aromáticos análogos a las estructuras de Tomalia) y 1,3,5-triarilamidas. El trabajo de Miller es el primero en referirse a los "fragmentos dendríticos", que citaba Fréchet en su trabajo, como dendrones.[25]

Fue en la década de los 90 cuando, el interés de la comunidad científica internacional en el campo de los dendrímeros comenzó a crecer de forma exponencial, culminando con la "First International Dendrimer Conference" que se celebró en Frankfurt (Alemania).[12] Desde entonces, y gracias a los esfuerzos de numerosos grupos en este campo, hoy en día los dendrímeros son reconocidos como la cuarta mayor clase de las estructuras poliméricas,[26] y son sintetizados a nivel mundial por diferentes empresas y grupos de investigación (Figura 5).[27] Así como las arquitecturas tradicionales de los polímeros sintéticos cumplieron con éxito las necesidades funcionales de los materiales del final del Siglo XX, el surgimiento de la nanotecnología abre un campo de oportunidades en las que los dendrímeros podrían desempeñar un papel clave en la nueva era de los materiales gracias a sus múltiples ventajas.

[23] Fréchet, J. M. J.; Jiang, Y.; Hawker, C. J.; Philippides, A. E. Proceedings of IUPAC International Symposium, Macromolecules, Seoul, Korea, **1989**; pp 19–20.

[24] **(a)** Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. **1990**, 1010–1013; **(b)** Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. J. Am. Chem. Soc. **1990**, *112*, 7638-7647; **(c)** Hawker, C.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules*, **1990**, *23*, 4726-4729.

[25] Miller, T. M.; Neenan, T. X. *Chem. Mater*. **1990**, *2*, 346–349.

[26] Tomalia, D. A.; Uppuluri, S.; Swanson, D. R.; Li J. *Pure. Appl. Chem.* **2000**, *72*, 2343-2358.

[27] Mintzer, M. A.; Grinstaff, M. W. Chem. Soc. Rev. **2011**, 40, 173-190.

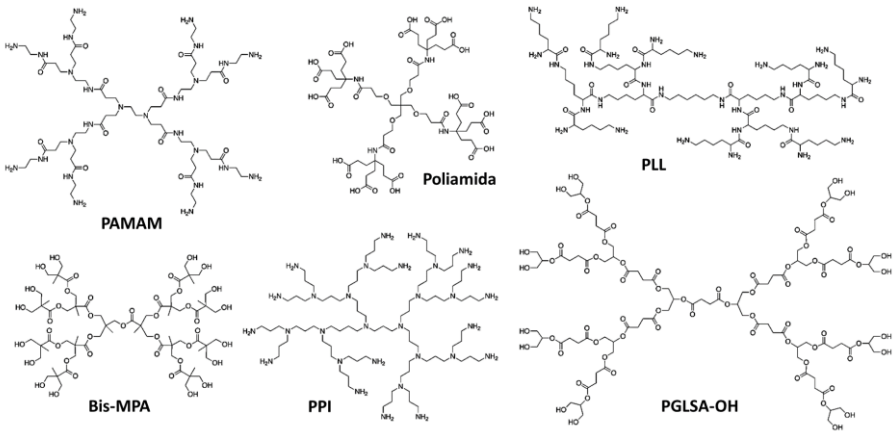


Figura 5. Clases más populares de dendrímeros. Imagen adaptada de la referencia 27.

1.1.3. SÍNTESIS

A diferencia de los polímeros tradicionales, cuya síntesis se realiza con un mayor o menor grado de polidispersidad despendiendo de la técnica de polimerización, los dendrímeros se caracterizan por ser macromoléculas completamente monodispersas que se sintetizan a través de una secuencia de pasos iterativa y controlada, caracterizada por etapas de crecimiento y activación. Las primeras estrategias sintéticas que se utilizaron para la obtención de macromoléculas dendríticas, también conocidas como síntesis convencionales, son la síntesis convergente y la síntesis divergente.

1.1.3.1. SÍNTESIS CONVENCIONALES

La síntesis divergente (Figura 6) [8,17,19] fue la primera aproximación empleada para la construcción de macromoléculas dendríticas. Esta síntesis se basa en el crecimiento del dendrímero desde el *core* hasta la periferia. El *core* es una molécula polifuncional a la cual se une covalentemente un monómero ramificado de tipo AB_n ($n \geq 2$) donde A es un grupo activado y B está desactivado o protegido para permitir un crecimiento controlado. Los grupos reactivos del *core* reaccionarán con un exceso de unidades A del monómero formando la primera generación dendrítica. Para continuar el crecimiento, los grupos B de esta primera generación se activarán o desprotegerán, dando lugar a un dendrímero reactivo de primera generación, que posteriormente reaccionará con más unidades del monómero AB_n. La repetición de estas etapas de crecimiento y activación conduce a un aumento de la generación del

dendrímero, así como de los grupos terminales funcionales. Al alcanzar la generación deseada, estos grupos periféricos se pueden emplear en una posterior etapa de funcionalización. El principal reto del método divergente es que los grupos funcionales terminales no siempre pueden reaccionar estequiométricamente; dando lugar a dendrímeros con defectos estructurales, que no se pueden separar de los dendrímeros estructuralmente perfectos, debido a las casi idénticas propiedades con el producto deseado. Aun así, esta estrategia es la más usada para la síntesis de la mayoría de dendrímeros comerciales.

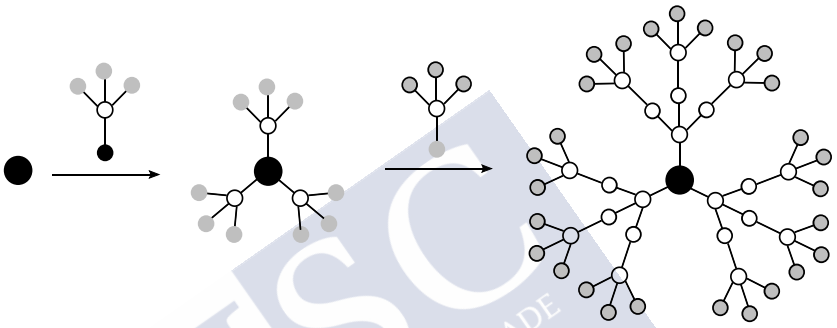


Figura 6. Representación esquemática de la síntesis divergente.

La síntesis convergente (Figura 7) [24] consiste en obtener fragmentos dendríticos, llamados dendrones, los cuales se unen en una etapa posterior a una molécula polifuncional, que se convertirá en el *core* del dendrímero. El número de extremos reactivos del núcleo determinará la cantidad de dendrones que podrán ligarse. Debido al pequeño número de grupos funcionales terminales involucrados, este tipo de síntesis tiene la ventaja de 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.

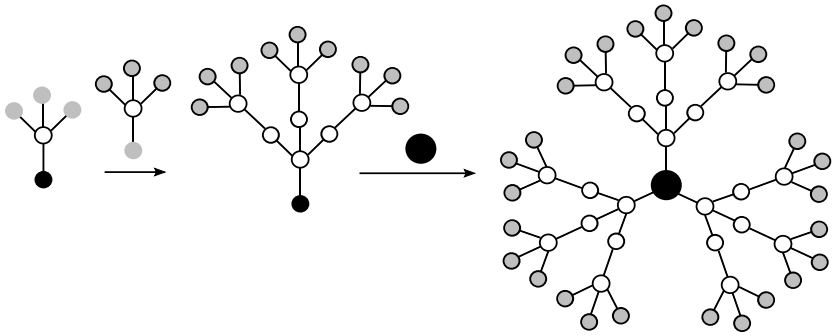


Figura 7. Representación esquemática de la síntesis convergente.

1.1.3.2. SÍNTESIS ACELERADAS

Los métodos convencionales de síntesis de dendrímeros suelen necesitar un elevado número de etapas para poder obtener estructuras dendríticas de elevada complejidad. Encontrar aproximaciones sintéticas más eficientes o rápidas provocaría una disminución en el número de pasos de reacción, lo que permitiría obtener dendrímeros de una forma más eficiente, aumentando su disponibilidad y reduciendo sus costes de producción.[28] Por ende, es de vital importancia identificar los parámetros que permitan acelerar la síntesis de dendrímeros: i) La selección de los monómeros es crucial. Si estos *building-blocks* se pueden sintetizar de una forma sencilla o son comerciales, se acelerarán las reacciones de crecimiento del dendrímero, pudiéndose utilizar un amplio exceso de estos reactivos en su síntesis. ii) En las estrategias tradicionales se necesitan etapas de desprotección y activación para sintetizar una generación de un dendrímero. Poder realizar una etapa de crecimiento sin la necesidad de una desprotección reduciría a la mitad los pasos en la síntesis. iii) La realización de químicas *one pot* reduciría drásticamente los procesos de purificación de los dendrímeros, acortando los tiempos en la obtención de estas estructuras.

[28] (a) Mintzer, M. A.; Grinstaff, M. W. Chem. Soc. Rev. 2011, 40, 173-190; (b) Walter, M. V.; Malkowch, M. Chem. Soc. Rev. 2012, 41, 4593-4609.

Como respuesta a estas necesidades, las primeras estrategias sintéticas aceleradas para la síntesis de dendrímeros surgieron a principios de los años 90.[29]

Estrategia del hipermonómero. Esta estrategia, planteada por Fréchet et al.,[30] se basa en utilizar dendrones de baja generación, denominados hipermonómeros, como unidades de repetición. Sin embargo, ya que en su preparación se utilizan las mismas reacciones de desprotección/activación tradicionales, la aceleración se basa en obtener dendrímeros en menos pasos sintéticos, pero el tiempo de reacción global sería virtualmente el mismo.

Crecimiento convergente de doble etapa. La estrategia empleada en esta metodología se basa en la síntesis de un dendrímero de baja generación, llamado hipernúcleo, e hipermonómeros, que se acoplan entre sí en una última etapa.[31] La ventaja de esta estrategia es que facilita el acceso a dendrímeros de mayor generación, superando las limitaciones estéricas de la síntesis convergente tradicional entre el acoplamiento de dendrones voluminosos a pequeños *cores*. Aun así, la preparación de estas especies es muy tediosa y el uso de este método está limitado a la preparación de dendrímeros de generaciones superiores que no pueden ser obtenidos mediante las metodologías tradicionales.

Doble crecimiento exponencial. En esta metodología, empleada por Moore et al.,[32] se sintetizan dendrones de baja generación inactivados o protegidos. Posteriormente, estos dendrones son activados selectivamente, ya sea en su punto focal o en la periferia, y luego se acoplan entre sí para dar un dendrón de mayor generación. En una última etapa, los puntos focales de los dendrones se activan y se acoplan a un *core* multifuncional. La principal desventaja de esta metodología es que, aunque se reduce el número de pasos con respecto a la síntesis convergente, conforme aumenta el número de generaciones,

---

[29] Dias, P. A.; Da Silva Santos, S.; Da Silva, J. V.; Parise-Filho, R.; Ferreira, E. I.; El Seoud, O.; Giarolla, J. *Int. J. Pharm*. **2020**, *573*, 118814.

[30] **(a)** Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1994**, *33*, 82-85; **(b)** Gilat, S. L.; Adronov, A.; Fréchet, J. M. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7474-7484.

[31] **(a)** Wooley, K. L; Hawker C. J; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4252–4261; **(b)** Miller, T. M.; Neenan, T. X.; Zayas, R.; Bair, H. E. *J. Am. Chem. Soc*., **1992**, *114*, 1018–1025; **(c)** Xu, Z. F.; Kahr, M.; Walker, K. L.; Wilkins, C. L; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc*. **1994**, *116*, 4537–4550.

[32] Kawaguchi, T.; Walker, K. L.; Wilkins, C. L.; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc*. **1995**, *117*, 2159–2165.

aumenta también la congestión estérica, reduciéndose el rendimiento de reacción. Por lo tanto, la aplicación de este tipo de síntesis queda restringida a generaciones bajas de dendrímeros.[33]

1.1.3.3. QUÍMICA ORTOGONAL

Aunque las primeras síntesis aceleradas de dendrímeros eran estrategias que permitían la obtención de macromoléculas dendríticas de una forma más directa, las síntesis de los hipermonómeros e hipercores (y su posterior acoplamiento) eran procesos tediosos que requerían de etapas iterativas de crecimiento y desprotección/activación. El siguiente avance significativo que se produjo en la síntesis de macromoléculas complejas como los dendrímeros, fue el uso de reacciones ortogonales.

Aunque el concepto de ortogonalidad se describió antes que la quimioselectividad, es importante introducir este último para entender los sistemas ortogonales.[34] La quimioselectividad fue definida por Trost en 1983 como la capacidad de un compuesto químico para discriminar entre distintos centros reactivos.[35] Esta quimioselectividad se puede lograr mediante mecanismos de reacción diferentes o bien utilizando un control preciso de las condiciones de reacción.

Barany y Merrifield introdujeron por primera vez el concepto de ortogonalidad en 1977. En su trabajo, definieron los sistemas ortogonales, de forma muy específica, como un conjunto de clases independientes de grupos protectores, donde cada clase de grupo protector puede desprotegerse en cualquier orden y en presencia de los otros grupos.[36] Los sistemas ortogonales desarrollados por Merrifield et al., se basan en el uso simultáneo de dos grupos protectores que se pueden eliminar con alta quimioselectividad, utilizando mecanismos o condiciones de reacción diferentes diseñados para la desprotección de un grupo de forma exclusiva. Por lo tanto, los sistemas ortogonales tienen la característica o propiedad de ser sistemas quimioselectivos. No obstante, estas terminologías se utilizan a menudo indistintamente en la literatura,[37] además de extenderse a otro tipo de

[33] **(a)** Ihre, H.; Hult, A.; Fréchet, J. M. J.; Gitsov, I. *Macromolecules* **1998**, *31*, 4061–4068; **(b)** Malkoch, M.; Malmstrom, E.; Hult, A. *Macromolecule. S*, **2002**, *35*, 8307–8314.
[34] Wong, C.; Zimmerman, S. C. Chem. Commun, **2013**, 49, 1679-1695.
[35] Trost, B. M. *Science*, **1983**, *219*, 245-250.
[36] G. Barany, G.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc*. **1977**, *99*, 7363–7365.
[37] **(a)** Kanie, O.; Ito, Y.; Ogawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12073-12074; **(b)** Zeng, F.; Zimmerman, S. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5326-5327.

químicas y conceptos, como la ortogonalidad cromática,[38] la catálisis ortogonal [39] o la bioortogonalidad.[40]

Aunque su uso de desarrolló fundamentalmente en el campo de la síntesis de péptidos, el empleo de las reacciones quimioselectivas para la construcción de estructuras dendríticas fue utilizado por primera vez por Spindler y Fréchet.[41] En su trabajo utilizaron como sistema ortogonal el cloruro de 3,5-diisocianato de bencilo, que permitía el empleo de reacciones quimioselectivas como la síntesis de éteres de Williamson, entre haluros bencílicos y fenoles, y la formación de uretanos, a partir de isocianatos y alcoholes, para la síntesis de un dendrón de tercera generación. En 1996 Zimmerman et al., propusieron el uso de la esterificación de Mitsunobu complementada con una reacción de Sonogashira para la síntesis de un dendrímero heterogéneo de sexta generación y un peso aproximado de 21 kDa.[42] Este nuevo tipo de química permitió lograr avances significativos en la síntesis de dendrímeros, usando reacciones de forma simultánea para poder construir arquitecturas dendríticas *one pot*. Cronológicamente, los pioneros en desarrollar estas metodologías para la síntesis de macromoléculas dendríticas fueron Asai et al., pero obtuvieron estructuras imperfectas con valores de polidispersidad muy elevados.[43] La primera síntesis eficaz *one pot* fue llevada a cabo por Davis y colaboradores en el 2000. En ella utilizaron un crecimiento convergente con adiciones secuenciales de reactivos para construir un dendrímero de tercera generación a gran escala y con altos rendimientos.[44] Otro ejemplo destacado del uso de sistemas ortogonales para la síntesis de dendrímeros y su combinación para usar una metodología *one pot* en la construcción de la misma macromolécula, fue el propuesto por Majoral et al., donde utilizaron una síntesis divergente, combinada con reacciones de Staudinger seguidas de formación de hidrazonas, para la construcción de un dendrímero heterogéneo de cuarta generación.[45] El máximo exponente de este tipo de química culmina con la síntesis descrita por

[38] Bochet, C. G. *Synlett*, **2004**, 2268-2274.
[39] Altman, R. A.; Hyde, v; Huang, X.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc*. **2008**, *130*, 9613-9620.
[40] Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 15046-15047.
[41] Spindler, R.; Fréchet, J. M. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 913–918.
[42] Zeng, F.; Zimmerman, S. C. *J. Am. Chem. Soc*. **1996**, *118*, 5326-5327.
[43] Yamakawa, Y.; Ueda, M.; Takeuchi, K.; Asai, M. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem*., **1999**, *37*, 3638–3645.
[44] Rannard, S. P.; Davis, N. J. *J. Am. Chem. Soc*., **2000**, *122*, 11729–11730.
[45] Brauge, L.; Magro, G.; Caminade, A. -M.; Majoral, J.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6698-6699.

Majoral et al. de un dendrímero de generación 4, a base de reacciones cuantitativas entre hidrazidas, fosfinas y aldehídos mediante un procedimiento sintético al que llamaron "química LEGO".[46]

El uso de la quimioselectividad en sistemas ortogonales, combinada con las estrategias de síntesis acelerada de dendrímeros empezó a hacer que los procesos de desprotección y activación de los monómeros quedaran obsoletos, reduciendo por consiguiente el número de reacciones empleada en la síntesis de estas macromoléculas. Derivada de la necesidad de encontrar procesos cada vez más eficientes para la síntesis de dendrímeros, el concepto de la "química *click*", introducido por Sharpless et al.,[47] se presentó como una nueva y potente herramienta para la construcción de macromoléculas dendríticas.

1.2. QUÍMICA CLICK

1.2.1. DEFINICIÓN

El concepto de la química *click* fue introducido por Kolb, Finn y Sharpless [47] en el área de la química farmacéutica. Este nuevo concepto serviría para englobar y definir una serie de procesos selectivos, con aplicabilidad a pequeña y gran escala, que deben cumplir una serie estricta de requerimientos.[48] Las exigencias de tipo químico que deben cumplir se enumeran en orden de importancia: i) Una ΔG de reacción (mayor de 20 Kcal mol^{-1}), que asegure transformaciones químicas cuantitativas. ii) Los grupos funcionales considerados *click* deben ser inertes a todas las demás condiciones de reacción. iii) Los grupos *click* deben acoplarse fácilmente, independientemente de la arquitectura molecular. iv) La reacción *click* debe ser quimioselectiva y ortogonal a temperatura ambiente. v) Este tipo de reacciones deben ser estereoselectivas e idealmente regioselectivas, así como biocompatibles. vi) Deben ser idealmente insensibles a H_2O y O_2. vii) Las reacciones deben activarse para mantener un control temporal y espacial. viii) La química *click* debería permitir la síntesis de estructuras y propiedades moleculares que de otro modo serían inaccesibles.

Además de cumplir los requerimientos químicos citados, la química *click* también puede cumplir, de forma menos estricta, otra serie de consideraciones

[46] Maraval, V.; Pyzowski, J.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. *J. Org. Chem*. **2003**, *68*, 15, 6043-6046.
[47] Kolb, H. C.; Finn M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021.
[48] Meldal, M.; Diness, F. *Trends. Chem*. **2020**, *2*, 569-584.

no tan específicas: i) Las reacciones deben ser entre bloques modulares y de gran alcance. ii) Deben generar solo subproductos inofensivos que deben purificarse mediante métodos no cromatográficos. iii) Los reactivos de partida deben ser fácilmente disponibles. iv) Los productos de reacción deben ser estables en condiciones fisiológicas.

Ninguna transformación química considerada *click* cumple con todos estos criterios, sin embargo, las reacciones de formación carbono-heteroátomo, en general, cumplen los requerimientos químicos más importantes para ser consideradas reacciones *click*. Los ejemplos más destacados de este tipo de reacciones son (Figura 8): i) Cicloadiciones de especies insaturadas, como las reacciones de cicloadición 1,3 dipolar o las transformaciones Diels-Alder. ii) Las reacciones de sustitución nucleófila, particularmente reacciones de aperturas de anillo de electrófilos heterocíclicos tensos como epóxidos o aziridinas. iii) La química de carbonilos del tipo no aldólica. Incluyendo ejemplos como la formación de tioureas, heterociclos aromáticos o hidrazonas. iv) Las adiciones a enlaces carbono-carbono, como epoxidaciones o adiciones de Michael.

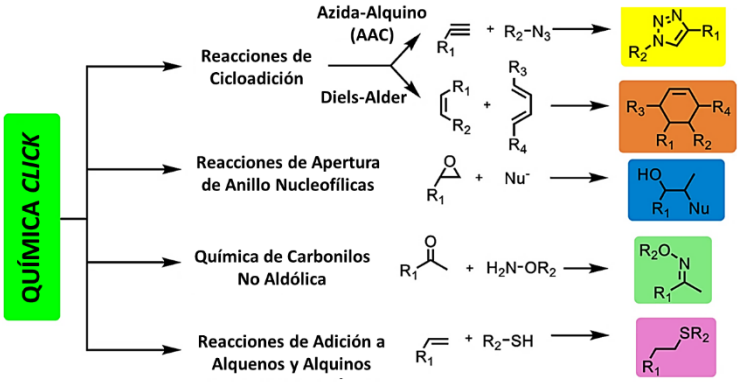


Figura 8. Procesos sintéticos generalmente considerados click. Imagen adaptada de la referencia 49.

Las reacciones que representan el mayor exponente de la química *click* son las reacciones de cicloadición que involucran heteroátomos, como las

[49] Tasdelen, M. A.; Kiskan, B.; Tagei, Y. *Prog. Polym. Sci.* **2016**, *52*, 19-78.

transformaciones tipo Diels-Alder,[50] y, de forma especial, las reacciones de cicloadición 1,3 dipolares, conocidas comúnmente como reacciones de cicloadición 1,3 dipolar de Huisgen.[51]

1.2.2. AAC

1.2.2.1. CICLOADICIÓN 1,3-DIPOLAR

Aunque el concepto de cicloadición 1,3 dipolar fue introducido por Lee I. Smith en 1938.[52], el alcance sintético y el estudio sistemático de esta reacción fueron explorados extensivamente por Rolf Huisgen en los años 60.[53] Huisgen definió las reacciones 1,3 dipolares que dan lugar a heterociclos de 5 miembros de la siguiente forma: "*Más bien, se debe definir un 1,3 dipolo tipo "abc" de modo que el átomo "a" posea un sexteto de electrones, es decir, una capa de valencia incompleta combinada con una carga formal positiva, y que el átomo "c" tenga un par de electrones libre. La combinación de tal 1,3-dipolo con un sistema de enlace múltiple "de", denominado dipolarófilo, se conoce como cicloadición 1,3-dipolar. Los dos componentes se fusionan mediante un desplazamiento cíclico de electrones con la extinción de las cargas formales para dar un anillo de 5 miembros"* (Figura 9). Por analogía con la reacción de Diels-Alder, un 1,3-dipolo reacciona como un sistema 4π (de fórmula general "abc") con un dipoloarófilo "de" (el cual entrega 2π electrones) en una cicloadición 3+2 para dar el producto de 5 miembros.[54] Huisgen et al. dividieron los 1,3 dipolos "abc" en dos clases generales. Los doce 1,3 dipolos de tipo alilo, el átomo central puede ser nitrógeno u oxígeno. Para los 1,3 dipolos de tipo alenil/propargilo el átomo central solo puede ser nitrógeno.[55] Este sistema de clasificación no sólo se utilizó para clasificar compuestos conocidos, sino que también

[50] **(a)** Tietze, L. F.; Kettschau, G. *Top. Curr. Chem*. **1997**, *189*, 1-120; **(b)** Waldmann, H. *Synthesis* **1994**, 535-551.
[51] **(a)** R. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry (Ed.: A. Padwa), Wiley, New York, **1984**, 1-176; **(b)** Gothelf, K. V.; Jorgensen, K. A. *Chem. Rev*. **1998**, *98*, 863-909; **(c)** Mulzer, J. *Org. Synth. Highlights* **1991**, 77-95.
[52] Smith, L. I. *Chem. Rev*. **1938**, *23*, 193-285.
[53] **(a)** Huisgen R., in Zehnjahresfeier des Fonds der Chemischen Industrie, Düsseldorf, 1960, pp. 73–102 - Reimpresión en *Naturwiss. Rundschau* **1961**, *1914*, 1963; **(b)** Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed*. **1963**, *2*, 565-632.
[54] Breugst, M.; Reissig, H.-U. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **2020**, *59*, 12293-12307.
[55] Singh, M.S.; Chowdhury, S.; Koley, S. *Tetrahedron*, **2016**, *72*, 1603-1644.

contribuyó al desarrollo de nuevas rutas hacia 1,3 dipolos desconocidos hasta la fecha.

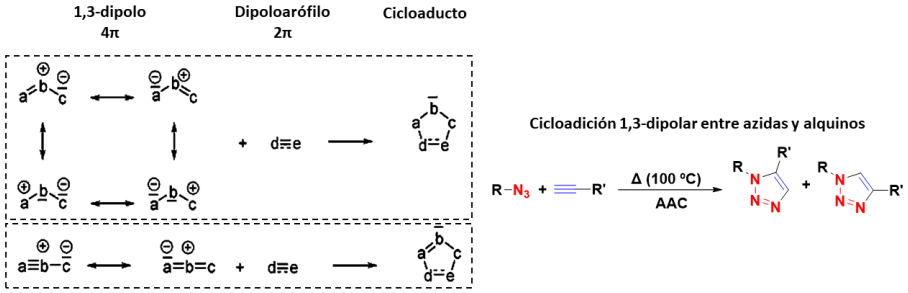


Figura 9. Cicloadiciones 3+2 entre dipolos "abc" y dipoloarófilos "de", y cicloadiciones tipo AAC.

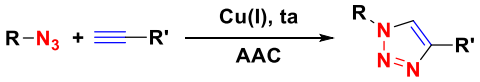
A pesar de que Huisgen reconoció las características de reacción comunes de este tipo particular de cicloadiciones, una de las más reconocidas en el ámbito de la química *click*, la reacción de cicloadición entre azidas y alquinos (AAC), fue reportada por primera vez en 1893. En esta reacción se describía la cicloadición entre una fenil azida y un derivado de un ácido acetilendicarboxílico para dar los regioisómeros 1,4 y 1,5 con sus respectivos anillos de triazol.[56]

1.2.2.2. AAC Y CuAAC

Las cicloadiciones 1,3 dipolares entre azidas y alquinos son procesos que requieren de elevadas temperaturas y largos tiempos de reacción, además, sufren de los problemas de regioselectividad anteriormente mencionados. En 2002, los grupos independientes de Meldal et al.[57] y Sharpless et al.,[58] describieron un nuevo tipo de catálisis con Cu^{I} para las cicloadiciones entre alquinos y azidas, convirtiéndose en el máximo exponente del nuevo concepto de la química *click*, la CuAAC (Esquema 1). Esta nueva metodología permitía realizar estas reacciones a temperatura ambiente o calentando moderadamente, obteniéndose exclusivamente el regiosiómero 1,4 del anillo

[56] Michael, A. *J. Prakt. Chem*. **1893**, *48*, 94-95.
[57] Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
[58] Rostovtsev, V. V.; Green, L.G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed*. **2002**, *41*, 2596-2599.

1,2,3 de triazol, acelerando la síntesis y simplificándose los procesos de purificación de las moléculas.



Esquema 1. Reacción CuAAC regioselectiva catalizada por Cu^{I}.

Se han estudiado extensivamente los mecanismos que implican las cicloadiciones AAC y CuAAC.[59] El proceso de cicloadición no catalizado tiene lugar en una única etapa y con unas altas energías de activación para la formación de ambos intermedios, con valores teóricos calculados mediante DFT de 18.44 Kcal mol^{-1} para el regioisómero 1,4 y 18.51 Kcal mol^{-1} para el regioisómero 1,5. Estos valores explicarían la baja reactividad y la falta de regioselectividad de la reacción. Por otro lado, el mecanismo de reacción de la CuAAC está catalizado por especies de Cu^{I}, siendo dependiente de la concentración de estos iones en el medio de reacción, dando lugar a cinéticas de segundo orden.[60] En una primera etapa del mecanismo, un alquino terminal se une a un ión de Cu^{I} como un ligando tipo π. Esta coordinación aumenta significativamente la acidez del protón terminal del alquino, formándose un complejo dinuclear de Cu^{I} tras la desprotonación. Posteriormente la organoazida puede unirse de forma reversible al átomo de cobre a través del nitrógeno próximo al carbono, formándose un complejo reactivo en un proceso exotérmico con una energía de 11.98 Kcal mol^{-1} (valor teórico calculado utilizando como disolvente agua). Seguidamente, el nitrógeno más alejado de la azida puede unirse al carbono marcado como C-4 del acetiluro, formando otro intermedio reactivo con una barrera calculada de 8.99 Kcal mol^{-1}, que es considerablemente más bajo que para la reacción no catalizada. Esto explica una aceleración de en torno a 8 órdenes de magnitud del proceso catalizado por Cu^{I} en comparación con el proceso térmico (Figura 10).

[59] El Ayouchia, H. B.; Bahsis, L.; Anane, H.; Domingo, L. R.; Stiriba, S.-E. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 7670-7678.

[60] Baxter, C. W.; Higgs, T. G.; Bailey, P. J.; Parsons, S.; McLachlan, F.; McPartlin, M.; Tasker, P. A. *Chem.–Eur. J.* **2006**, *12*, 6166-6174.

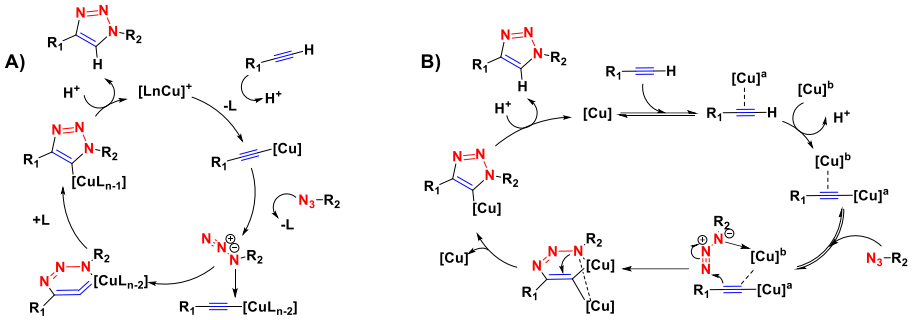


Figura 10. Mecanismos de reacción CuAAC propuestos por A) Sharpless y Fokin, B) Revisión de Fokin. Imagen adaptada de la referencia 59.

A pesar de que esta reacción se convirtió en un nuevo paradigma, una de las limitaciones químicas que caracteriza a la CuAAC es la restricción de esta reacción a alquinos terminales como dipoloarófilos, ya que la presencia de ese protón es mecanísticamente necesario para que tenga lugar la catálisis. La búsqueda de otros catalizadores metálicos que pudiesen resolver estas limitaciones sin conllevar una pérdida de reactividad llevó a explorar multitud de otras clases de iones como Ag,[61] Ru (pudiendo extender la química a alquinos internos),[62] Ir,[63] Ni,[64] o Au.[65]

1.2.2.3. LIMITACIONES Y ALTERNATIVAS

Desde la aparición de la CuAAC, esta ha servido como una herramienta que se ha utilizado en miles de publicaciones hasta la fecha para sintetizar biomoléculas y polímeros de toda clase. Sin embargo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) han limitado la aplicación de estas metodologías sintéticas en el campo de la biología. Las ROS incluyen H_2O_2, el radical hidroxilo y el anión superóxido que pueden producir daños severos al material biológico.

---

[61] McNulty, J.; Keskar, K.; Vemula, R. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14727–14730.

[62] **(a)** Zhang, L.; Chen, X.; Xue, P.; Sun, H. H. Y.; Williams, I. D.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V.; Jia, G. *J. Am. Chem. Soc*. **2005**, *127*, 15998–15999; **(b)** Yamamoto, Y. *Heterocycles* **2013**, *87*, 2459-2493.

[63] **(a)** Rasolofonjatovo, E.; Theeramunkong, S.; Bouriaud, A.; Kolodych, S.; Chaumontet, M.; Taran, F. *Org. Lett*. **2013**, *15*, 4698–4701; **(b)** S. Ding, S.; Jia, G.; Sun, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1877-1880.

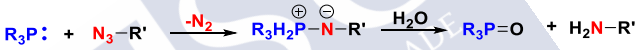
[64] Rao, H. S. P.; Chakibanda, G. *RSC Advances* **2014**, *4*, 46040-46048.

[65] Partyka, D. V.; Updegraff, J. B.; Zeller, M.; Hunter, A. D.; Gray, T. G. *Organometallics* **2007**, *26*, 183-186.

Estos daños incluyen desde la oxidación de cadenas laterales de aminoácidos, la oxidación de centros anoméricos e hidroxilos primarios de azúcares, hasta las reacciones de los radicales hidroxilo con los dobles enlaces de lípidos insaturados.[66]

Los inconvenientes mencionados anteriormente hicieron que los compuestos resultantes de esta reacción sólo se pudiesen aplicar en estudios *in vitro* o a sistemas *in vivo* después de una purificación extensiva.[67] La búsqueda de reacciones alternativas que pudiesen trasladarse a campos como la bioconjugación hizo que los químicos orgánicos buscasen reacciones libres de catalizadores metálicos, o que minimizasen su impacto.

Inicialmente se exploró la reacción de Staudinger entre fosfinas y alquinos por ser bioortogonal y poder llevarse a cabo en condiciones acuosas sin la necesidad de ningún catalizador metálico (Esquema 2).[68] Sin embargo, su aplicación para la funcionalización de superficies celulares y en sistemas *in vivo* demostró ser un proceso lento e ineficiente, con constantes de reacción bajas (7.7 x 10^{-3} M^{-1} s^{-1}),[69] que no podía considerarse química *click*.

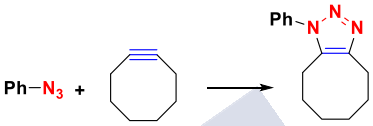


Esquema 2. Reacción de Staudinger entre alquinos y fosfinas. Imagen adaptada de la referencia 68.

Las constantes de reacción son un parámetro crucial en los procesos de bioconjugación, ya que reacciones muy lentas o condiciones drásticas de reacción podrían deteriorar el material biológico que está implicado en el proceso. Con el objetivo de minimizar el impacto de los catalizadores de cobre de la CuAAC en bioconjugación se han desarrollado ligandos que estabilizan las especies reactivas. Por ejemplo, Amo et al., han desarrollado ligandos basados en aminas que permiten el empleo de la CuAAC en células y el marcaje *in vivo* de peces cebra.[70]

[66] Srinivas, U. S.; Tan, B.W.Q.; Vallayappan, B. A.; Jeyasekharan, A.D *Redox. Biol*. **2019**, *25*, 101084] [Slimen, I. B.; Najar, T.; Ghram, A.; Dabbebi, H.; Mrad, M.B.; Abdrabbah, M. Int. J. Hyperther. **2014**, 30, 513-523.
[67] Kim, E.; Koo, H. Chem. Sci. 2019, 10, 7835-7851.
[68] E. Saxon, E.; Bertozzi, C.R. *Science*, **2000**, *287*, 2007–2010.
[69] Soellner, M. B.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T. *J. Am. Chem.Soc*. **2006**, *128*, 8820–8828.
[70] Soriano del Amo, D.; Wang, W.; Jiang, H.; Besanceney, C.; Yan, A. C.; Levy, M.; Liu, Y.; Marlow, F. L.; Wu, P. *J. Am. Chem. Soc*. **2010**, *132*, 16893–16899.

A pesar de los avances realizados en el campo de los catalizadores metálicos en la AAC, Bertozzi et al.,[71] presentaron una alternativa más interesante a las estrategias CuAAC. La cicloadición azida-alquino promovida por tensión anular (SPAAC) (Esquema 3), tiene la ventaja de usar alquinos cíclicos tensionados que, al reaccionar con azidas, logran aumentar la constante de rección (con valores de 0.1 M^{-1} s^{-1}) en medio acuoso y sin la necesidad de catalizadores.[72] No obstante, el principal inconveniente de este tipo de química radica en la obtención de los ciclooctinos activados, la cual requiere de numerosas etapas sintéticas.[73]



Esquema 3. Reacción SPAAC.

La búsqueda de reacciones cada vez más eficientes en el campo de la bioconjugación condujo al desarrollo de la reacción Diels-Alder con demanda inversa de electrones (iEDDA) entre tetrazinas y trans-ciclooctenos como una de las reacciones *click* más eficientes en este campo. Este tipo de química (libre de catalizadores metálicos) de tercera generación, tiene una constante de reacción de segundo orden (>10^{-3} M^{-1} s^{-1}) más rápida que la CuAAC o que la SPAAC.[74]

1.3. QUÍMICA CLICK APLICADA A LA SÍNTESIS DE DENDRÍMEROS

Desde sus inicios, la química de dendrímeros siempre ha estado experimentando constantes avances en su búsqueda por simplificar los procesos de obtención de estas complejas macromoléculas. Las tediosas

[71] **(a)** Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793–16797; **(b)** Baskin, J. M.; Bertozzi, C. R. *Aldrichimica Acta* **2010**, *43*, 15-23; **(c)** Gordon, C. G.; Mackey, J. L.; Jewett, J. C.; Sletten, E. M.; Houk, K. N.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9199–9208.

[72] Debets, M. F.; van Berkel, S. S.; Dommerholt, J.; Dirks, Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. *Acc. Chem. Res*. **2011**, *44*, 805–815.

[73] Cai, X. Y.; Li, N. N.; Chen, J. C.; Kang, E.-T.; Xu, L. Q. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 1663-1672.

[74] Devaraj, N.K.; Weissleder, R. *Acc. Chem. Res*. **2011**, *44*, 816–827.

etapas de protección y desprotección de grupos funcionales se vieron sustituidas con la introducción de los sistemas ortogonales y la aplicación de químicas quimioselectivas. Con la aparición de la química *click*, se comenzó una nueva etapa en la que se pudieron realizar este tipo de reacciones de una forma mucho más eficiente.

De todo el abanico de reacciones consideradas *click*, las que han tenido un mayor impacto en la síntesis de dendrímeros han sido la CuAAC, la tiol-eno (TEC), la tiol-ino (TYC) y la reacción de Diels-Alder (DA).

1.3.1. CuAAC

En 2004, Fokin et al.,[75] utilizaron la CuAAC para la síntesis convergente de un dendrímero basado en poli-triazoles de generación 4 y un peso molecular de 6 kDa. Poco tiempo después el grupo de Hawker, utilizó el mismo tipo de química para sintetizar un dendrímero de tercera generación y un peso aproximado de 4 kDa.[76] Esta estrategia ha sido ampliamente utilizada dando lugar a una extensa familia de dendrímeros basados en 1,2,3-triazoles (Figura 11).[77]

Sin embargo, la utilización de las reacciones catalizadas por cobre acarreaba los problemas de citotoxicidad previamente citados. Sumado a estos problemas, se encuentra el hecho de que los anillos de triazol generados en la reacción pueden ejercer como agentes quelantes de los átomos de cobre, haciendo más difícil su eliminación.[78]

---

[75] Wu, P.; Feldman, A. K.; Nugent, A. K.; Hawker, C. J.; Scheel, A.; Voit, B.; Pyun, J.; Frechet, J. M. J.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, ***43***, 3928-3932.

[76] Joralemon, M. J.; O'Reilly, R. K.; Matson, J. B.; Nugent, A. K.; Hawker C. J.; Wooley, K. L. *Macromolecules*, **2005**, *38*, 5436-5443.

[77] **(a)** Stangenberg, R.; Türp, D.; Müllen, K. *Tetrahedron*, **70**, *19*, 2014, 3178-3184; **(b)** Rajakumar, P.; Satheeshkumar, C.; Raja, S. *Tetrahedron Lett*. **2010**, *51*, 5167-5172; **(c)** Haridas, V.; Lal, K.; Sharma, Y. K. *Tetrahedron Lett*. **2007**, *48*, 4719-4722; (d) Malkoch, M.; Schleicher, K.; Drockenmuller, E.; Hawker, C. J.; Rusell, T. P.; Wu, P.; Fokin, V. V. *Macromolecules* **2005**, *38*, 9, 3663-3678; **(e)** Berg, R.; Straub, B. F. *Beilstein J. Org. Chem*. **2013**, *9*, 2715-2750.

[78] Berg, R.; Straub, B. F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, *9*, 2715–2750.

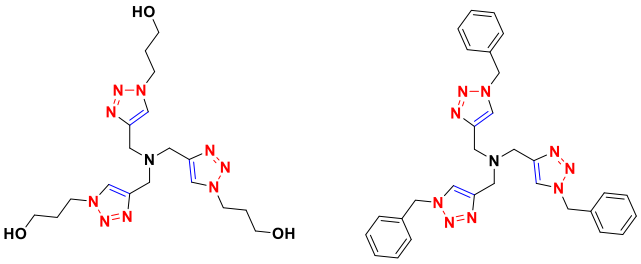


Figura 11. Ejemplos de dendrímeros sintetizados mediante CuAAC. Tris((1-hidroxipropil-4-triazolil)metil)amina (THPTA) (izquierda) y la Tris((1-bencil-4-triazolil)metil)amina (TBTA) (derecha).

1.3.2. Metal-free AAC

La tendencia a evitar esta clase de catalizadores metálicos,[79] hizo que se pusiera el foco en reacciones como la SPAAC para la síntesis de dendrímeros. No obstante, debido a que los alquinos tensionados tienen un gran tamaño e hidrofobia, la aplicación de este tipo de química quedó relegada a la decoración de estructuras dendríticas.[80] El siguiente avance significativo que se produjo en este tipo de reacciones, fue la introducción de grupos atractores de electrones conjugados con el alquino del anillo tensionado. Estudios teóricos llevados a cabo por Goddard III et al. demostraron que la introducción de este tipo de grupos (Figura 12) suponía una reducción de las barreras energéticas de reacción, y, por lo tanto, una activación de la SPAAC.[81] Posteriormente esta estrategia de grupos atractores de electrones fue utilizada por Baker et al., para la funcionalización mediante SPAAC de dendrímeros con derivados de cumarina.[82]

[79] Becer, C. R.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. *Angew. Chem. Int*. Ed. **2009**, *48*, 4900-4908.
[80] Ornelas, C.; Broichhagen, J.; Weck, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3923–3931.
[81] Chenoweth, K.; Chenoweth, D.; Goddard III, S. A. *Org. Biomol. Chem*. **2009**, *7*, 5255-5258.
[82] Zong, H.; Goonewardena, S. N.; Chang, H.-N.; Otis, J. B.; Baker, J. R. *Bioorg. Med. Chem*. **2014**, *22*, 6288-6296.

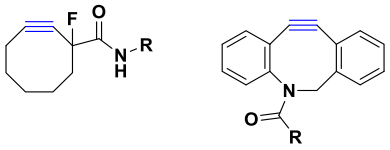


Figura 12. Ciclooctinos activados con grupos atractores de electrones.

La utilización de especies activadas (Figura 13) tuvo gran relevancia en la preparación de alquinos para la realización de reacciones AAC libres de catalizadores metálicos (*metal-free* AAC). En 2004 Ju et al. estudiaron de forma sistemática el efecto que producía la utilización de alquinos conjugados con al menos un grupo atractor de electrones sobre la reacción de cicloadición con azidas orgánicas. Aunque en este estudio se sentaron las bases para extender este tipo de reacciones a otras áreas de la química, los rendimientos y la modularidad de este tipo de reacciones debían ser mejoradas.[83]



Figura 13. Alquinos activados derivados usados en Metal-free AAC.

La aplicación de alquinos activados a la síntesis de dendrímeros tiene un desarrollo más reciente.[84] El primer uso de estas especies activadas fue por parte de Fessner et al. para la funcionalización de nanoclústeres utilizando derivados del ácido 2-butinodioico y 1,4-butinodiol. Fessner observó que los ésteres y éteres formados a partir del 1,4-butinodiol requerían temperaturas superiores a 100 ºC para poder realizar la reacción de cicloadición con las azidas de la periferia del nanoclúster. Sin embargo, cuando utilizó los ésteres derivados del ácido 2-butinodioico podía utilizar menores temperaturas, debido a que estos grupos estaban unidos directamente al alquino, retirando más carga y produciendo una mayor activación del mismo.[85] Posteriormente, los grupos de Brook [86] y Morin [87] emplearon una metodología similar para la construcción de estructuras dendríticas a partir de

[83] Li, Z.; Seo, T. S.; Ju, J. *Tetrahedron Lett*. **2004**, *45*, 3143-3146.
[84] Arseneault, M.; Wafer, C.; Morin, J.-P. *Molecules* **2015**, *20*, 9263-9264.
[85] Heyl, D.; Rikowski, E.; Hoffmann, R. C.; Schneider, J. J.; Fessner, W.-D. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5544–5548.
[86] Gonzaga, F.; Sadowski, L. P.; Rambarran, T.; Grande, J.; Adronov, A.; Brook, M. A. *J. Polym. Sci. Part. A: Polym. Chem.* **2013**, *51*, 1272–1277.
[87] Arseneault, M.; Levesque, I.; Morin, J.-F. *Macromolecules*, **2012**, *45*, 3687–3694.

cores que incorporan varias azidas y un monómero obtenido por esterificación tipo Fischer entre el ácido 2-butinodioico y una cadena de oligoetilenglicol modificado con un grupo iodo terminal (Figura 14). La presencia de dos ésteres conjugados con el alquino interno resulta en una tremenda activación frente a la reacción de cicloadición. Siguiendo esta metodología, estos autores han descrito etapas de crecimiento por cicloadición entre azidas dendríticas y monómeros diéster a temperaturas moderadas (60 ºC), que aún así requieren de largos tiempos de reacción (24 h). Las etapas de activación se realizaron por una sustitución nucleófila de los grupos iodo por grupos azida, para poder realizar la siguiente fase de crecimiento. La secuencia iterativa de estas dos etapas dio lugar a la síntesis de un dendrímero de generación 4 y un peso aproximado de 2 kDa. Aunque la estrategia de los alquinos activados ha permitido obtener estructuras dendríticas sin la necesidad de utilizar catalizadores metálicos, esta metodología requiere de largos tiempos de reacción, haciendo el proceso sintético global poco eficiente.

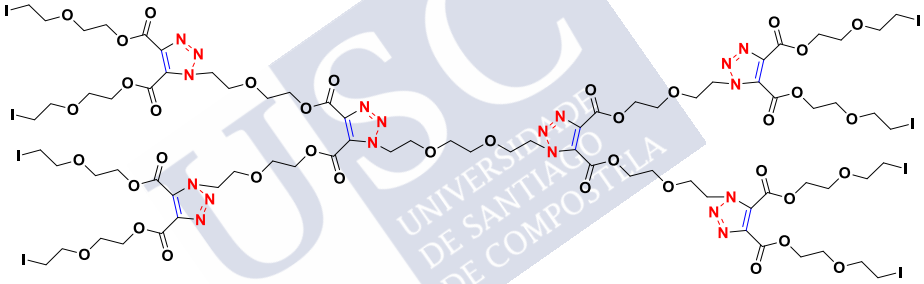


Figura 14. Dendrímero obtenido mediante la estrategia de alquinos activados. Imagen adaptada de la referencia 87.

1.3.3. TEC

Durante la última década, las reacciones de adición de tioles a alquenos (TEC) y alquinos (TYC) han generado mucho interés en el campo de la síntesis y modificación de estructuras dendríticas, y gracias a sus múltiples ventajas se espera que, a medio plazo, puedan llegar a sustituir a químicas *click* más asentadas actualmente.[79,88] La TEC consiste en la reacción entre un alqueno y un grupo funcional tiol.[89] Este tipo de reacciones, conocidas

[88] Lowe, A. B.; Harvison, M. A. *Aust. J. Chem.* **2010**, *63*, 1251–1266.
[89] Lowe, A. B. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17-36.

desde hace más de 100 años,[90] poseen unas características que las convierten en herramientas muy versátiles dentro de la química *click*: i) Estas reacciones pueden llevarse a cabo mediante mecanismos radicalarios o procesos catalíticos mediados por nucleófilos, ácidos, bases o sin necesidad alguna de catalizadores en multitud de disolventes. ii) El rango de alquenos que se pueden utilizar en este tipo de reacción es muy amplio, desde especies activadas a enlaces insaturados como los olefínicos. iii) La reacción es relativamente insensible a la naturaleza del tiol, iv) Las reacciones son extremadamente rápidas, pudiendo tener lugar en segundos, incluso a temperatura ambiente, tolerando la presencia de oxígeno y humedad, y procediendo generalmente de forma cuantitativa.

Usualmente, estas reacciones se llevan a cabo mediante un mecanismo radicalario, normalmente inducido fotoquímicamente (Figura 15). Este proceso tiene lugar a través de tres etapas: iniciación, propagación y terminación. En la etapa de iniciación, el tratamiento del tiol con el fotoiniciador produce la generación de un radical sobre el átomo de azufre. Seguidamente, en la etapa de propagación, este radical se adiciona en el extremo terminal del grupo alqueno, generando un intermedio radical sobre el átomo de carbono adyacente, seguido de una transferencia radicalaria sobre una segunda molécula de tiol. Este proceso genera el producto de adición tiol-alqueno, con una orientación anti-Markovnikov y un nuevo radical sobre el átomo de azufre de otra molécula. Por último, en la etapa de terminación se producen reacciones de acoplamiento radical-radical.

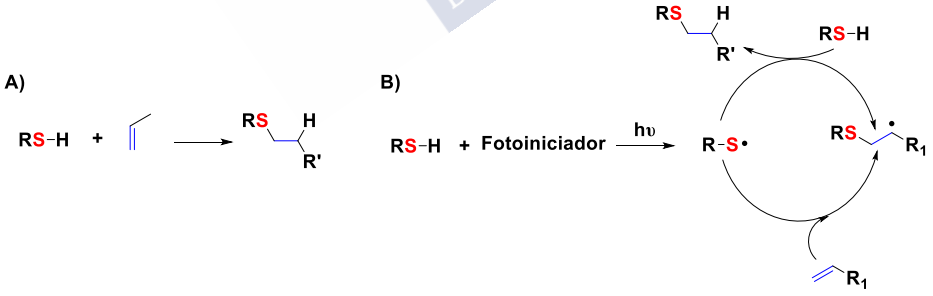


Figura 15. A) Reacción TEC, y B) mecanismo de la reacción fotocatalizada. Imagen adaptada de la referencia 89

[90] Posner, T.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.,* **1905**, *38*, 646–657.

Hawker et al., estudiaron ampliamente las reacciones TEC para la síntesis eficiente de dendrímeros.[91] Uno de los primeros ejemplos de este tipo de metodología, fue el empleo de reacciones entre alquenos y tioglicerol para sintetizar un dendrímero de generación 4 y un peso molecular de más de 6 kDa. Utilizando el propio tiol como disolvente y la 2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA) como iniciador de radicales, Hawker y colaboradores fueron capaces de sintetizar una generación dendrítica completa en menos de 30 minutos, a temperatura ambiente e irradiando con una lámpara de UV (λ=365 nm) (Figura 16).[92]

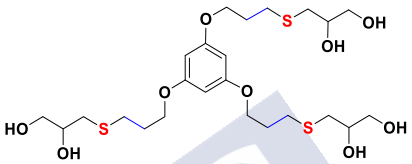


Figura 16. Primera generación de un dendrímero sintetizado mediante reacciones TEC. Imagen adaptada de la referencia 92.

Este tipo de reacciones demostraron ser compatibles en combinación con el uso de otras reacciones *click*. En 2010, Hawker et al. describieron la síntesis de un dendrímero de sexta generación combinando reacciones CuAAC y TEC.[93] En un estudio más reciente Hawker y su grupo han investigado el uso de reacciones TEC en combinación con reacciones de esterificación ortogonales usando 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) como agente acoplante para obtener un dendrímero de generación 4 y rendimientos superiores al 90%.[94]

---

[91] **(a)** Montanez, M. I.; Campos, L. M.; Antoni, P.; Hed, Y.; Walter, M. V.; Krull, B. T.; Khan, A.; Hult, A.; Hawker, C. J.; Malkoch, M. *Macromolecules* **2010**, *43*, 6004–6013; **(b)** Kang, T.; Amir, R. J.; Khan, A.; Ohshimizu, K.; Hunt, J.N.; Sivanandan, K.; Montanez, M. I.; Malkoch, M.; Ueda, M.; Hawker, C. J. Chem. Commun. 2010, 46, 1556–1558; (c) Lo Conte, M.; Robb, M. J.; Hed, Y.; Marra, A.; Malkoch, M.; Hawker, C. J.; Dondoni, A. J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 2011, 49, 4468–4475.

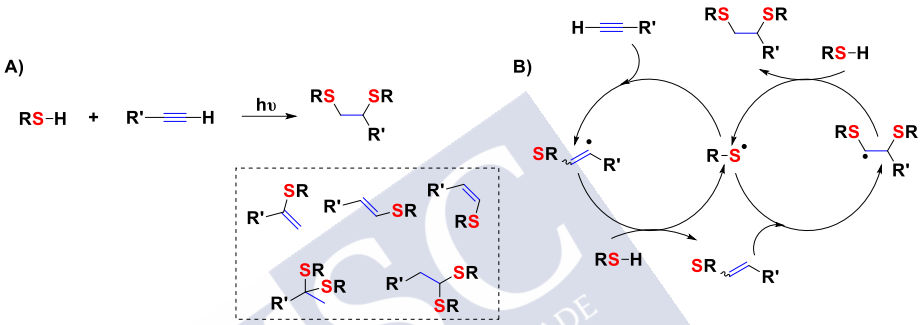
[92] Killops, K. L.; Campos, L. M.; Hawker, C. J. *J. Am. Chem. Soc*. **2008**, *130*, 5062-5064.

[93] Antoni, P.; Robb, M. J.; Campos, L.; Montanez, M.; Hult, A.; Malmström, E.; Malkoch, M.; Hawker, C. J. *Macromolecules* **2010**, *43*, 6625.

[94] García-Gallego, S.; Hult, D.; Olsson, J. V.; Malkoch, M. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2015**, *54*, 2416-2419.

1.3.4. TYC

Otro tipo de reacciones entre especies insaturadas y tioles lo conforman las reacciones TYC.[95] Este tipo de reacciones se llevan a cabo entre alquinos terminales y grupos tiol. (Esquema 4) Mecanísticamente, las reacciones TYC son muy similares a las TEC. La principal diferencia entre ambas es que el control de la regioselectividad de las TYC es más complejo, ya que se pueden producir reacciones de mono y di-adición sobre los intermedios, dando lugar hasta seis posibles productos de reacción.



Esquema 4. A) Reacción TYC, y B) mecanismo radicalario de la reacción. Imagen adaptada de la referencia 95.

La aplicación de esta reacción para la síntesis de dendrímeros fue demostrada por primera vez por Stenzel et al. Siguiendo una estrategia análoga a la de Hawker, emplearon reacciones de adición entre tioglicerol y alquinos para sintetizar un dendrímero de tercera generación con un peso molecular de 5 kDa.[96]Asimismo, este tipo de química puede emplearse con otras reacciones de forma ortogonal. Li et al. han descrito la síntesis de un dendrímero de generación 5 con alta pureza y rendimientos usando reacciones TYC combinadas con adiciones aza-Michael (Figura 17).[97]

[95] Lowe, A. B. *Polymer.* **2014**, *55*, 5517-5549.
[96] Chen, G. J.; Kumar, J.; Gregory, A.; Stenzel, M. H. *Chem. Commun*. **2009**, 6291–6293.
[97] Shen, Y.; Ma, Y.; Li, Z. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem*. **2013**, *51*, 708-715.

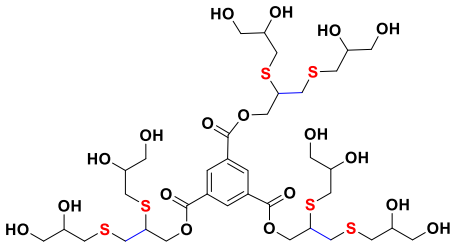
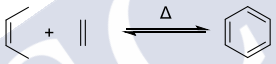


Figura 17. Primera generación de un dendrímero sintetizado mediante reacciones TYC. Imagen adaptada de la referencia 96.

1.3.5. DIELS-ALDER

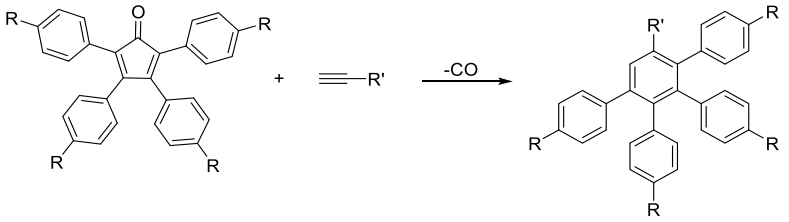
Un último tipo de reacciones consideradas *click* que ha tenido un impacto notable en la síntesis de dendrímeros son las cicloadiciones [4+2] Diels-Alder.



Esquema 5. Reacción Diels-Alder

Müllen et al. han popularizado este tipo de acoplamientos entre dienos y dienófilos para la síntesis de dendrímeros con estructuras aromáticas (Esquema 6).[98] Aunque estas reacciones suelen requerir altas temperaturas y el uso de sustratos activados como la maleimida,[99] el furano o antraceno, permiten sintetizar dendrímeros de elevadas generaciones.[100]

[98] Morgenroth, F.; Müllen, K. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15349–15366.
[99] Vieyres, A.; Lam, T.; Gillet, R.; Franc, G.; Castonguay, A.; Kakkar, A. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1875–1877.
[100] **(a)** Tasdelen, M. A. *Polym. Chem.* **2011**, *2*, 2133–2145; **(b)** Tang, W.; Becker, M. L. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7013–7039.



Esquema 6. Ciclopentadienona popularizada por el grupo de Mullen. Imagen adaptada de la referencia 84.

1.3.6. CONTROL DE LAS REACCIONES CLICK

Como se ha descrito, la aplicación de la química *click* supuso un gran avance en la síntesis de dendrímeros. Estas reacciones son rápidas, eficientes, versátiles y regioselectivas entre otras múltiples ventajas. Además, el diseño de este tipo de procesos químicos puede ser controlado por estímulos externos, como el uso de radiación microondas, ultrasonidos, radiación de luz o pulsos eléctricos.[49] Estos parámetros se pueden optimizar para aumentar el nivel de rendimiento de las reacciones *click*, desarrollando nuevas condiciones que permitan modular y eliminar las limitaciones de este tipo de química para adaptarlas a procesos químicos determinados.

1.3.6.1. MICROONDAS (MW)

De entre los diferentes estímulos mediante los cuales se pueden modular las reacciones *click*, la radiación microondas (MW) ofrece numerosas ventajas con respecto al calentamiento tradicional.[101] La radiación microondas es un tipo de radiación electromagnética que se sitúan en el espectro entre la radiación infrarroja (IR) y las ondas de radio. Las MW tienen longitudes de onda entre 1mm y 1m, con frecuencias de entre 0.3 y 300 gigahercios (GHz). De forma habitual, con el fin de evitar interferencias, la radiación microondas suele operar con longitudes de onda de 12.2 cm y frecuencias de 2.5 GHz (Figura 18). Las MW aportan energía a la reacción a través del calentamiento dieléctrico. Este efecto, derivado del componente eléctrico de la radiación

[101] **(a)** Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9225-9283; **(b)** De la Hoz, A.; Díaz-Ortiz, A.; Moreno, A. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 164-178.

MW, actúa a través de dos mecanismos principales, el mecanismo dipolar de polarización y el mecanismo de conductividad.[102]

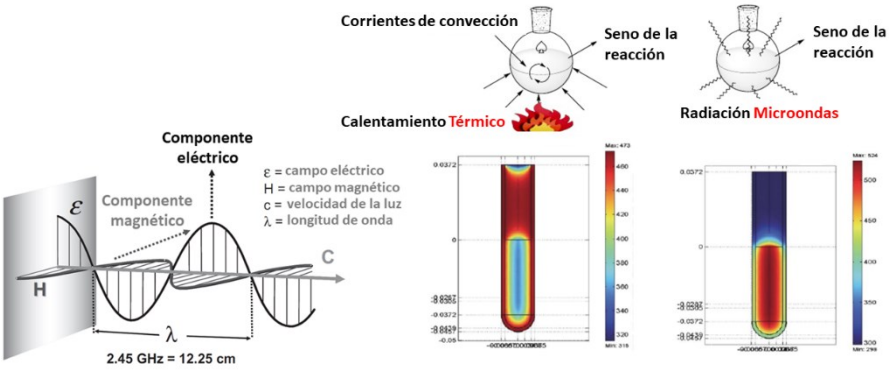


Figura 18. Radiación MW vs calentamiento convencional. Imagen adaptada de la referencia 101b.

Para que una substancia pueda generar calor cuando se vea sometida a un campo de radiación MW, es necesario que tenga momento dipolar. Según el mecanismo dipolar de polarización, un dipolo sensible a los campos eléctricos de las MW, intentará alinearse con la radiación incidente mediante rotaciones moleculares. Estos movimientos resultarán en colisiones y fricciones en la matriz, dando lugar a energía cinética que se disipará en forma de calor.

El otro mecanismo mediante el cual las radiaciones MW aportan energía es mediante el mecanismo de conductividad. Según este fenómeno, en una disolución que contenga iones, estas especies cargadas se moverán a través del seno de la matriz bajo la influencia del campo eléctrico, dando lugar a energía cinética que se volverá a perder en forma de calor, de una forma similar al mecanismo dipolar.

En general, las reacciones que se calientan mediante métodos tradicionales como baños de aceite o arena, son muy ineficientes energéticamente. En este tipo de sistemas, la energía se trasmite desde el exterior hacia el interior de la reacción, disipándose en diferentes puntos y pudiendo generarse gradientes de temperatura que pueden llevar a la descomposición de los productos y/o reactivos. Por otro lado, a través del calentamiento dieléctrico producido

[102] Kappe, C. O.; Stadler, A.; Dallinger, D. In *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **2012**, p 9.

mediante la radiación MW, la energía se genera directamente en el seno de la reacción, afectando únicamente a reactivos y disolvente. Esto genera un calentamiento simultáneo que evita los gradientes de temperatura, haciendo el proceso global mucho más eficiente energéticamente.

La síntesis de dendrímeros asistida por MW fue descrita por primera vez en el año 2005. Rijkers et al. utilizaron reacciones CuAAC asistidas por microondas para preparar o funcionalizar glicodendrímeros.[103] El empleo de esta técnica también se usó para la síntesis de dendrímeros PAMAM,[104] y más recientemente, en la preparación de un dendrímero de generación 9 basado en triazinas en sólo 24 h.[105]

1.3.7. CLICK VS EFICIENCIA

La química *click* ha tenido un gran impacto en la síntesis de polímeros. No obstante, muchos artículos incluyen el término *click* en sus síntesis como un sinónimo de "eficiente" o "exitoso". A pesar de que las reacciones *click* son eficientes por definición, no todas las reacciones eficientes son consideradas *click*. Por este motivo hay que establecer una serie de criterios para evitar que este término pierda su sentido en el campo de la síntesis de macromoléculas.[106] Es imposible establecer una definición de química *click* que cubra todas las áreas, desde la síntesis orgánica, pasando por la química de polímeros hasta las aplicaciones biomédicas, por lo tanto, deben establecerse una serie específica de criterios para cada campo.

Como se observa en la figura, una reacción *click* aplicada a la síntesis de polímeros debe cumplir de forma general los requerimientos de Sharpless, además de otras características específicas que pueden ser aplicadas en mayor o menor grado dependiendo de las características químicas de reactivos y productos (Figura 19). Por ejemplo, la equimolaridad es un requisito imprescindible en la síntesis de estructuras poliméricas, ya que un exceso de reactivos podría llevar a mezclas de polímeros similares, haciendo difícil su separación, violando por consiguiente uno de los principios fundamentales de

[103] Yoon, K.; Goyal, P.; Weck, M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2051-2054.
[104] **(a)** López-Andarias, J.; Guerra, J.; Castañeda, G.; Merino, S.; Ceña, V.; Sánchez-Verdú, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 2331-2337; **(b)** Ertük, A. S.; Tülü, M.; Bozdogan, A. E.; Parali, T. *Eur. Polym*. **2014**, *52*, 218-226.
[105] Enciso, A. E.; Ramirez-Crescencio, F.; Zeiser, M.; Redon, R.; Simanek, E. E. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 5219-5224.
[106] Barner-Kowollik, Du Prez, F. E.; Espeel, P.; Hawker, C. J.; Junkers, T.; Schlaad, H.; Van-Camp, W. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2011**, *50*, 60-62.

la química *click* definidos por Sharpless. Sin embargo, cuando la purificación se puede llevar a cabo a gran escala, como en el caso de las precipitaciones selectivas o ultrafiltración, un exceso de uno de los reactivos puede ser tolerable, incluso deseable si esta molécula es inerte y no da lugar a reacciones secundarias. Además, cuando se trata de reacciones *click* aplicadas a la síntesis de dendrímeros, es de vital importancia la síntesis de estructuras monodispersas. Las reacciones incompletas derivadas de un defecto de reactivos en las etapas de crecimiento, pueden dar lugar a productos con defectos estructurales. Por lo tanto, se deben establecer una serie de criterios que, en balance, permitan distinguir la síntesis *click* de un polímero de un simple proceso eficiente.



Figura 19. Características de la química click aplicada al campo de la síntesis de polímeros. Imagen adaptada de la referencia 106.

Otro ejemplo, es que el control preciso y estricto de las condiciones de reacción marcará en gran medida la definición de que un proceso sintético sea considerado como *click*. El uso de una reacción *click* en determinadas condiciones, puede hacer que esta pierda alguna de sus propiedades intrínsecas y, por lo tanto, su definición como tal. Morin y Tang [107] describieron la síntesis y funcionalización de 4 generaciones de una familia de dendrímeros mediante reacciones AAC entre azidas y alquinos activados. Sin embargo, en las reacciones de crecimiento necesitaban largos tiempos de

[107] Arseneault, M.; Leung, N. L. C.; Fung, L. T.; Hu, R.; Morin, J.-P. F.; Tang, B. Z. *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 6087-6096.

reacción (24 h) y, en las etapas de funcionalización, a pesar de que utilizaban en empleo de metodología CuAAC, estas reacciones requerían de 5 días para tener una conversión completa. Por lo tanto, a pesar de que basaron la síntesis de sus dendrímeros en reacciones *click*, este proceso no podría considerarse como tal, siendo, por el contrario, altamente ineficiente.

A diferencia de la metodología previamente descrita, el empleo de tecnología AAC con alquinos activados para la síntesis *click* de dendrímeros ha sido reportada recientemente por nuestro grupo de investigación.[108] Tomando como referencia los principios de la química *click*, la química verde (*green chemistry*) y el uso de radiación MW, nuestro grupo ha sido capaz de llevar a cabo la síntesis de un dendrímero de generación 5, a partir de un *core* derivado de fluoroglucinol y trietilenglicol, en un tiempo total de 12 h (Figura 20). La gran eficiencia del proceso se apoya en una aceleración en las etapas de crecimiento y activación de cada generación dendrítica, que se realizaron en tiempos cortos de 40 y 2 min respectivamente, y en la utilización de purificaciones sencillas a gran escala. Por lo tanto, esta síntesis representa un precedente sintético en la conjunción de diferentes tecnologías y preceptos químicos para realizar una síntesis *click* acelerada y sostenible de arquitecturas dendríticas mediante reacciones AAC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[108] Amaral, S.P. (**2017**). Dendrimers: Accelerated Synthesis, Control of Size and Biodistribution of Micelles, (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

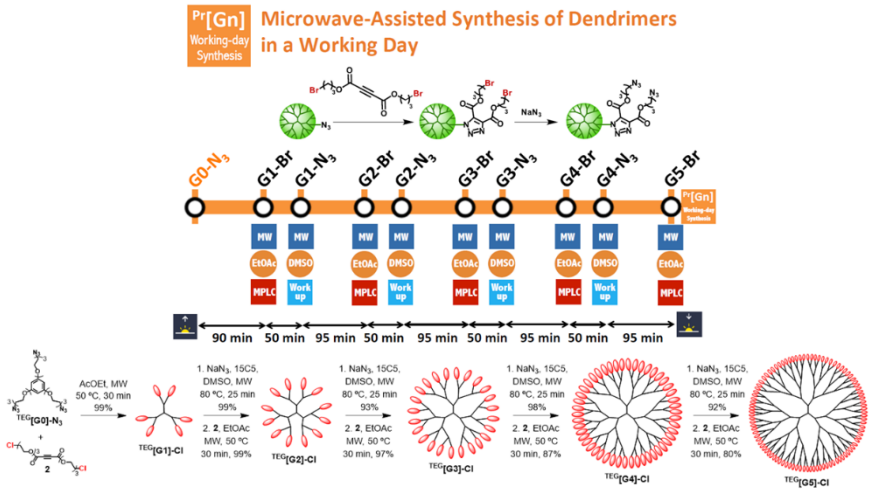


Figura 20. Síntesis acelerada de dendrímeros realizada mediante química metal-free AAC realizada en nuestro grupo de investigación.

1.4. COPOLÍMEROS DE BLOQUE

Los copolímeros de bloque son una clase de polímeros formados por dos o más fragmentos homopoliméricos unidos mediante enlaces de tipo covalente.[109] Desde el año 1952, donde aparece la primera publicación mencionando los copolímeros de bloque,[110] hasta el año 2019 se han publicado más de 45000 artículos en este campo.[111] Haciendo una revisión histórica de las publicaciones sobre copolímeros de bloque se pueden observar cuatro períodos o etapas que marcaron su evolución científica. En el período inicial (1952-1968) en número de publicaciones en este campo era residual, con un número máximo de 13 publicaciones en 1967. En la siguiente etapa, la de desarrollo temprano (1968-1992), se alcanzó un número máximo de 350 publicaciones por año, hasta que en la etapa de crecimiento rápido (1992-2012) se llegaron a publicar hasta 2300 artículos por año (Figura 21). En la

[109] **(a)** Jenkins. A. D.; Kratochvíl, P.; Stepto, R. F. T.; Suter, U. W. *Pure & Apl. Chem.* **1996**, *68*, 2287-2311; **(b)** Ring, W.; Mita, I.; Jenkins, A. D. *Pure & Appl. Chem*. **1985**, *57*, 1427-1440.
[110] Dunn, A.; Melville, H. *Nature* **1952**, *169*, 699–700.
[111] Lazzari, M.; Torneiro, M. *Polymers*, **2020**, *12*, 869-885.

actualidad, la tendencia de publicaciones se está estabilizando, sugiriendo que este campo se encuentra en una etapa de madurez científica.

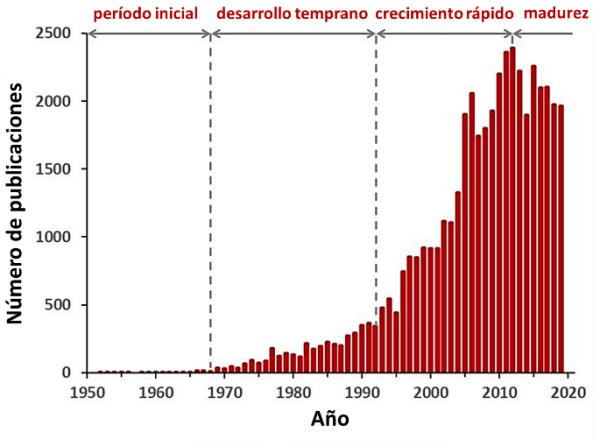


Figura 21. Número de publicaciones sobre copolímeros de bloque entre los años 1950 y 2019. Imagen adaptada de la referencia 111.

1.4.1. COPOLÍMEROS DE BLOQUE L-D

1.4.1.1. DEFINICIÓN

Los copolímeros de bloque de tipo linear-dendrítico (L-D) son una subclase de polímeros híbridos formados, como su nombre indica, por dos tipos de macromoléculas: una con topología lineal y otra con estructura ramificada dendrítica. Los primeros precursores de los copolímeros de bloque L-D se consideran los "arboroles" sintetizados por Newkome.[112] Estas macromoléculas se caracterizaban por poseer estructuras donde dos "moléculas en cascada" se situaban en los extremos de una cadena lineal alquílica corta, pero esta, al no ser de naturaleza polimérica, derivó en que estas macromoléculas no se consideraran copolímeros de bloque. Gitsov et al., fueron los primeros en sintetizar copolímeros de bloque L-D; utilizando los dendrones derivados de poliéteres bencílicos descritos por Fréchet [24] y

[112] Newkome, G.R.; Baker, G.R.; Saunders, M.J.; Gupta, V.K.; Yao, Z.; Miller, J.E.; Bouilliona, K. J. *Chem. Soc. Chem. Commun*. **1986**, 753-753.

uniéndolos covalentemente con un polímero lineal derivado de estireno con un rango de pesos moleculares de entre 474 Da y 800 kDa.[113]

1.4.1.2. ESTRUCTURA

Aunque esta clase de macromoléculas sólo están formadas por dos bloques constituyentes, estos pueden combinarse y adoptar diferentes configuraciones en función de sus posiciones en el polímero final. Se diferencian tres grupos principales de estructuras (Figura 22):[114] i) El primero está constituído por un único dendrímero al que están unidos uno (LD), dos (LDL) o múltiples bloques lineales (L_nD). ii) El segundo grupo lo caracterizan copolímeros en los que se incorpora un dendrímero en cada uno de los extremos de la cadena lineal (DLD) y copolímeros que incorporan diversos fragmentos dendríticos intercalando el polímero lineal $(LD)_nL$, también conocidos como copolímeros tipo "collar de perlas". iii) El último grupo lo conforman los copolímeros en los que varios fragmentos dendríticos se disponen longitudinalmente sobre la cadena lineal, unidos mediante enlaces cortos $L(D)_n$ o enlaces largos $L(L'D)_n$, también llamados copolímeros "dendronizados". Una subclase especial de copolímeros de bloque L-D de este grupo, es aquella en la que los fragmentos lineales crecen a partir de un mismo punto, y los dendrímeros se anclan a los extremos libres, conociéndose como dendrímeros "en estrella" $(LD)_3$.

[113] **(a)** Gitsov, I.; Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *Polym. Prep.* **1991**, *32*, 631-632; **(b)** Gitsov, I.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **1994**, *27*, 7309-7315.

[114] Gitsov, I. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem*. **2008**, *46*, 5295-5314.

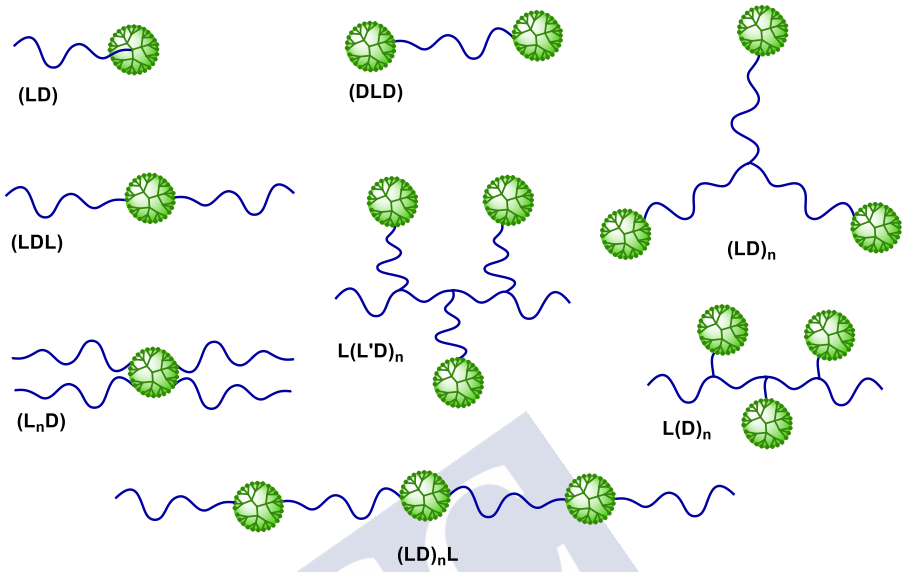


Figura 22. Diferentes estructuras de los copolímeros de bloque. Imagen adaptada de la referencia 114.

1.4.1.3. SÍNTESIS

Desde que Gitsov describió la primera síntesis de copolímeros de bloque L-D hasta la fecha, se han seguido fundamentalmente tres estrategias para la construcción de este tipo de arquitecturas macromoleculares: la "*coupling strategy*", la "*chain-first*" y la "*dendron-first*" (Figura 23).[115]

[115] Wurm, F.; Holger, F. *Prog. Polym. Sci*. **2011**, *36*, 1-52.

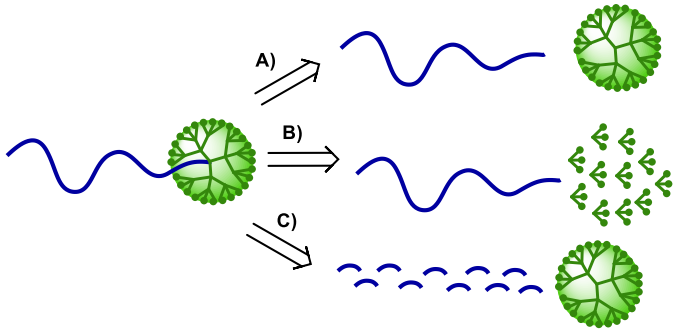


Figura 23. Estrategias para la síntesis de copolímeros de bloque tipo LD. A) Coupling strategy, B) chain-first, C) dendron-first. Imagen adaptada de la referencia 116.

La "*coupling-strategy*", usada por Gitsov en su primera síntesis de copolímeros, consiste en el acoplamiento entre el punto focal de un dendrímero o dendrón, con el extremo reactivo de un polímero lineal. Esta aproximación cuenta con varias ventajas: el copolímero se forma en un único paso a partir de los fragmentos poliméricos lineales y dendríticos; requiriendo usualmente técnicas de precipitación o extracción selectiva, además, esta metodología permite la caracterización individual de los dos bloques antes de su unión química. Las principales desventajas son que esta estrategia necesita de reacciones cuantitativas para conseguir el acoplamiento completo entre fragmentos. Esta estrategia fue usada para la síntesis de copolímeros con múltiples arquitecturas. Destaca la síntesis de copolímeros de bloque L-D de tipo DLD y LD en los que el bloque lineal estaba constituido por una cadena de polietilenglicol (PEG),[117] y copolímeros de bloque más complejos de tipo $L(D)_n$.[118]

La "*chain-first strategy*" consiste en la síntesis de un copolímero de bloque L-D partiendo de un punto focal en una cadena lineal polimérica, seguida de la construcción de un fragmento dendrítico desde ese extremo reactivo, mediante una síntesis divergente. Este tipo de metodología fue inicialmente aplicada por Chapman et al., para la construcción de un copolímero de bloque de tipo LD

[116] Tomalia, D. A.; *New J. Chem.* **2012**, *36*, 264-281.
[117] **(a)** Gitsov, I.; Wooley, K. L.; Fréchet, J. M. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1992**, *31*, 1200–1202; **(b)** Gitsov, I.; Wooley, K. L.; Hawker C. J.; Ivanova, P. T.; Fréchet, J. M. J. *Macromolecules* **1993**, *26*, 5621–5627.
[118] Karaya, B.; Claussen, W.; Gessler, K.; Saenger, W.; Schlüter, A.-D. *J. Am. Soc.* **1997**, *119*, 3296-3301.

al que denominaron como un "hidroanfífilo". Este copolímero estaba constituido por una cadena lineal de PEG, sobre el cual se sintetizó un dendrímero de tipo Denkewalter derivado de poli(L-lisina).[119] La "*chain-first strategy*" utiliza el modelo de síntesis divergente para la construcción del bloque dendrítico, que es el enfoque más adecuado para la síntesis a gran escala y de dendrímeros de alta generación. Gracias a su versatilidad, esta estrategia es la que se utiliza con mayor frecuencia para la prepación de copolímeros de bloque tipo lineal-dendrítico.

La "*dendron-first strategy*" es una aproximación que consiste en la síntesis convergente de un dendrímero, donde a partir de su punto focal se lleva a cabo la polimerización de la cadena lineal. Uno de los primeros ejemplos descritos del uso de esta metodología es la utilización de diferentes generaciones (G1-G4) de dendrímeros derivados de poliéteres bencílicos, que sirvieron de punto focal para una polimerización por apertura de anillo (ROP) de caprolactona, dando lugar a cadenas poliméricas lineales de entre 7 y 11 kDa.[120]

1.4.2. PROPIEDADES DE LOS COPOLÍMEROS EN DISOLUCIÓN

Hace casi 30 años, en los inicios de la síntesis de macromoléculas con estructuras híbridas de tipo L-D, se empezaron a combinar bloques dendríticos y lineales con propiedades químicas muy diferentes, provocando que estas nuevas estructuras exhibiesen interesantes comportamientos tanto en estado sólido como en disolución.

1.4.2.1. AUTOENSAMBLAJE

El autoensamblaje de moléculas anfifílicas en agua es el ejemplo más estudiado de los procesos de autoagregación. Los anfifilos son moléculas que contienen una parte estructural hidrofóbica (insoluble en agua) y una parte o región hidrófila (soluble en agua), siendo los ejemplos más simples y comunes los fosfolípidos que conforman las membranas celulares. Cuando estas estructuras se disuelven en medio acuoso, los segmentos hidrófobos se empaquetan entre sí formando estructuras ordenadas. Este efecto se conoce como efecto hidrófobo.[121] Por otro lado, existe una mayor compensación entálpica que evita que las partes hidrofílicas interactúen entre sí, haciendo

[119] Chapman, T. M.; Hillyer, G. L.; Mahan, E. J.; Shaffer, K. A. *J. Am. Chem. Soc*.**1994**, *116*, 11195-11196.
[120] Gitsov, I.; Ivanova. P. T.; Fréchet, J. M. J. *Macromol. Rapid. Comm*. **1994**, *15*, 387-393.
[121] Meyer, E. E.; Rosenberg, K. J.; Israelachvili, J. *PNAS*, **2006**, *103*, 15739-15746.

más favorable que formen enlaces hidrógeno con las moléculas de agua. El equilibrio de estas fuerzas impulsa la formación de multitud de nanoestructuras y mesofases. De forma similar a los fosfolípidos, un copolímero de bloque anfifílico también es susceptible a estos procesos de autoagregación. La geometría y el grado de orden de estas nanoestructuras son dependientes de la concentración y de la relación entre las partes solubles e insolubles de estas macromoléculas.[122] A concentraciones muy diluídas, la región hidrofílica (o compatible con el disolvente) es suficiente para mantener estas especies disueltas, sin embargo, a partir de un cierto punto, llamado concentración de agregación crítica (CAC), los copolímeros de bloque empiezan a sufrir procesos de autoagregación, ensamblándose para separar sus bloques insolubles del disolvente.

La morfología de los agregados supramoleculares vendrá determinada por el parámetro de empaquetamiento crítico ρ, propuesto por Israelachvilli,[123] que para sistemas sencillos en agua se expresa según la ecuación:

$$\rho = \frac{v}{\alpha_0 l}$$

Donde v representa el volumen que ocupa la cadena alquílica, α es el área transversal de la cabeza polar y l es la longitud de la cadena hidrofóbica. Generalmente, este modelo también puede adaptarse para su aplicación a moléculas más complejas como polímeros anfifílicos,[124] pudiendose predecir la morfología de los agregados supramoleculares en función del valor del parámetro ρ. Como norma general, se forman micelas esféricas cuando el valor de $\rho \leq 1/3$; micelas cilíndricas, también conocidas como *"rods"* o *"worm-like micelles"* se forman cuando $1/3 < \rho \leq 1/2$ y, por último, se forman polimersomas cuando $1/2 < \rho \leq 1$ (Figura 24).[125]

[122] Smart, T.; Lomas, H.; Massignani, M.; Flores-Merino, M. V.; Pérez, L. R.; Battaglia, G. *Nano Today*, **2008**, *3*, 38-46.

[123] Israelachvilli, J. N. Intermolecular & Surface Forces. 9th ed; Elsevier Science Imprint London, (**2002**) 405.

[124] **(a)** Kita-Tokarczyk, K.; Grumelard, J.; Haefele, T.; Meier, W. *Polymer*, **2005**, *46*, 3540-3563; **(b)** Bourov, G. K.; Bhattacharya, A. *J. Chem. Phys*. **2007**, *127*, 244905; **(c)** Mai, Y.; Eisenberg, A. *Chem. Soc. Rev*. **2012**, *41*, 5969-5985.

[125] Avsar, S. Y.; Kyropoulou, M.; Di Leone, S.; Schoenenberger, C.-A.; Meier, W. P.; Palivan, C. G. *Front. Chem*. **2019**, *6*, 645.

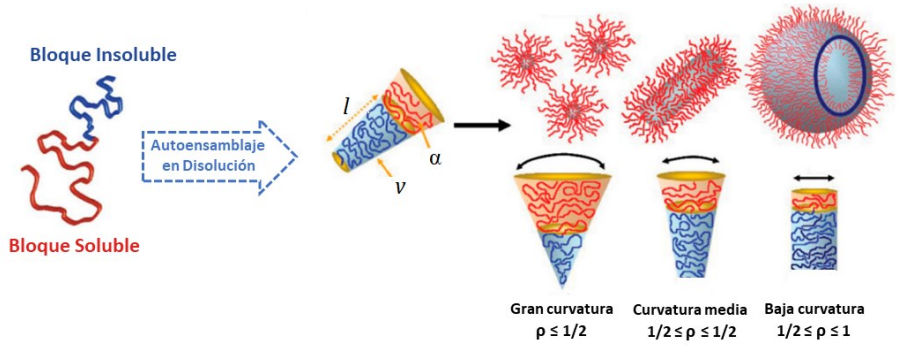


Figura 24. Autoensamblaje de anfifilos en agua. Imagen adaptada de la referencia 122.

Las estructuras anteriores las más comunes, sin embargo, también se pueden obtener agregados de diferentes morfologías como micelas tipo toroide,[126] o micelas tipo disco.[127] Además de la relación entre bloques solubles e insolubles y el factor de empaquetamiento crítico, factores externos como la temperatura, la fuerza iónica, o el pH también afectan a los procesos de autoagregación de estas macromoléculas.[128]

1.4.2.2. MICELAS ANFIFÍLICAS

De entre todas las morfologías que pueden adoptar los copolímeros de bloque en disolución acuosa, las micelas formadas por polímeros de bloque anfifílicos son uno de los ejemplos más comunes y estudiados en el campo. Las micelas poliméricas son un tipo de estructuras con tamaño nanométrico que se forman cuando la concentración del copolímero es superior a la concentración micelar crítica (CMC) y el parámetro de empaquetamiento crítico de las macromoléculas es menor a 1/3.[125] En disolución acuosa, el bloque o región hidrofóbica se orientará hacia el interior de la estructura, conformando el núcleo de la micela, mientras que las regiones hidrofílicas se encontrarán formando la parte externa de la nanopartícula, en contacto con el medio acuoso. Se ha demostrado que este tipo de micelas tienen la característica de ser más estables termodinámicamente que las micelas formadas por

[126] Qiu, H.; Oliver, A. M.; Gwyther, J.; Cai, J.; Harniman, R. L.; Hayward, D. W.; Manners, I. *Macromolecules* **2019**, *52*, 113-120.
[127] Lin, X.; He, X.; Hu, C.; Chen, Y.; Mai, Y.; Lin, S. *Polym. Chem*. **2016**, *7*, 2815-2820.
[128] Karg, M.; Pastoriza-Santos, I.; Rodríguez-González, B.; Von Klitzing, R.; Wellert, S.; Hellweg, T. *Langmuir* **2008**, *24*, 6300-6306.

compuestos de bajo peso molecular, con valores de CMC 1000 veces inferiores comparado a micelas formadas por moléculas sencillas como surfactantes.[129]

Van Hest et al. fueron los primeros en utilizar copolímeros de bloque lineal-dendrítico anfifílicos de tipo LD, formados por bloques dendríticos de PAMAM de diferentes generaciones unidos a cadenas lineales de poliestireno, para el estudio sistemático de la agregación en disolución acuosa de este tipo de sistemas.[130] Desde que Gitsov et al. publicaran sus primeros resultados sobre la síntesis de estructuras híbridas basadas en cadenas hidrofílicas lineales de PEG unidas a dendrones insolubles derivados de anillos bencénicos, decidieron estudiar la agregación de estas macromoléculas en medio acuoso.[113a] En un estudio pormenorizado, estos autores analizaron el comportamiento en disolución acuosa de un copolímero de bloque L-D de tipo LDL, constituido por dendrones hidrofóbicos de primera y segunda generación, derivados de poliéteres bencílicos, unidos a cadenas lineales de PEG de 5 kDa y 11 kDa. Observaron una autoagregación de estas macromoléculas para dar lugar a estructuras micelares en medio acuoso, de tamaños comprendidos entre 32 y 92 nm (MALLS y QELS).[131] Hoy en día, existen estudios teóricos que permiten predecir las morfologías de las nanoestructuras en disolución de copolímeros de bloque tipo L-D.[132]

1.4.2.3. MICELAS PIC

Los copolímeros de bloque anfifílicos no son los únicos que pueden dar lugar a agregados poliméricos en disolución acuosa. Las interacciones estequiométricas entre polianiones y policationes S-PEC (*stoichiometric poly-electrolyte complexes*) son conocidas desde hace varias décadas por dar lugar a precipitados y agregados insolubles en disolución debido a la neutralización de las cargas y a la consecuente pérdida de interacción con el medio acuoso por parte de los polímeros.[133] Estos procesos de precipitación fueron

[129] Mandavi, R.; Sar, S.K.; Rathore, N. *Orient. J. Chem*. **2008**, *24*, 559-564.
[130] Van Hest.; J. C. M.; Delnoye, D. A. P.; Baars, M. W. P. L.; Van Genderen, M. H. P.; Meijer, E. W. *Science*, **1995**, *268*, 1592-1595.
[131] Gitsov, I.; Lambrych, K.R.; Remnant, V.A.; Pracitto, R. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem*. **2000**, *38*, 2711-2727.
[132] Levedeva, I.O.; Zhylina, E:B.; Borisov, O.V. *Macromolecules* **2019**, *52*, 3655-3667.
[133] **(a)** Fuoss, R.M.; Sadek, H. *Science* **1949**, *110*, 552-554; **(b)** Michaels, A.S.; Miekka, R.G. *J. Phys. Chem*. **1961**, *65*, 1765-1773.

solucionados por Sanada [134] y Kabanov mediante el uso de interacciones no estequiométricas entre polianiones y policationes. Son los denominados N-PEC (*nonstoichiometric poly-electrolyte complexes*) en los que gracias al exceso de uno de los bloques iónicos se pueden formar estructuras supramoleculares solubles en disolución acuosa, dando lugar a "*aglomerados en disolución análogos a las micelas*".[135]

Posteriormente, Kataoka et al. propusieron una alternativa al uso de una relación no estequiométrica entre bloques cargados. Observaron que mediante la combinación de polianiones y policationes unidos covalentemente a una cadena lineal hidrófila neutra de PEG (PEG-b-polilisina y PEG-b-poliaspártico), se daba lugar a la formación de estructuras núcleo/corona similar a las micelas poliméricas anfifílicas, donde el PEG estabilizaba en disolución acuosa el núcleo hidrofóbico derivado de la neutralización de cargas. A este nuevo tipo de estructuras les dieron el nombre de micelas PIC (*PolyIon Complex*) (Figura 25).[136] De forma independiente, Kabanov et al. estudiaron la formación de agregados supramoleculares entre copolímeros catiónicos formados por cadenas de polietilenglicol y poliespermina (PS) junto con oligonucleótidos.[137] Posteriormente, estudiaron la formación de agregados a los que llamaron BIC (*Block Ionomer Complex*). Estas estructuras eran fruto de la interacción entre un copolímero de bloque constituído por una cadena lineal de PEG unido a un bloque lineal aniónico (PEG-b-polimetacrilato) y un polímero cargado positivamente (poli(*N*-etil-4-vinilpiridinio).[138]

[134] Tsuchida, E.; Yoshihito, O.; Sanda, K. *J. Polym. Sci, Part A: Polym. Chem.* **1972**, *10*, 3397-3404.
[135] Kabanov, V.A.; Zezin, A.B. *Makromol. Chem. Suppl*. **1984**, *6*, 259-276.
[136] Harada, A.; Kataoka, K. *Macromolecules* **1995**, *28*, 5294-5299.
[137] Kabanov, A.V.; Vinogradov, S.V.; Suzdaltseva, Y.G.; Alakhov, V.Y. Bioconjugate Chem. 1995, 6, 6, 639-643
[138] Bronich, T. K.; Kabanov, A. V. Kabanov, V. A.; Yu, K.; Eisenberg, A. *Macromolecules* **1997**, *30*, 3519-3525.

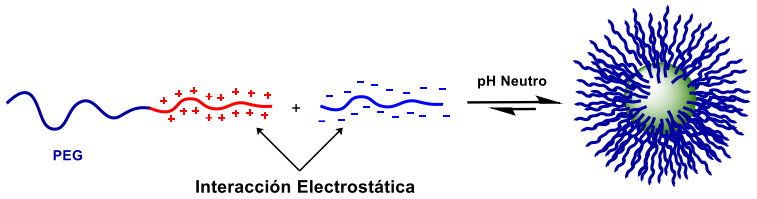


Figura 25. Formación de una micela PIC.

El control del tamaño en las micelas PIC viene dado por la "unidad PIC" (*u*PIC), donde la morfología de un único polianión/policatión tendrá una influencia crítica sobre la estructura del agregado, de forma análoga a cómo el factor de empaquetamiento crítico tiene influencia sobre los agregados formados por copolímeros de bloque anfifílicos. Kataoka et al. demostraron que el proceso de crecimiento de PIC (nano-PICsomas) estaba ligado a la adición de diferentes *u*PIC en el medio de formación.[139] Recientemente, Fernandez-Megia et al. demostraron una transferencia jerárquica de información desde dendrímeros a complejos supramoleculares tipo PIC. Mediante la combinación de un copolímero formado por PEG y un bloque aniónico con dendrímeros catiónicos derivados de GATG de diferentes generaciones, permitió un control sobre la estructura y el tamaño de los agregados en disolución, formando micelas a partir de *u*PIC con forma de cono, hasta PICsomas de gran tamaño a partir de *u*PIC con morfología tipo barra o "*rod*".[140]

La interacción electroestática entre bloques cargados es la principal fuerza promotora de las micelas PIC. Variaciones en la fuerza iónica, o medios donde existe una gran variedad y concentración de especies cargadas en disolución como los medios biológicos, pueden producir un apantallamiento de las cargas y una posterior disociación de los bloques constituyentes.[141] Estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación [142] demostraron que la utilización de un copolímero de bloque de tipo LD, donde las cargas se encontraban sobre una superficie dendrítica, lograba aumentar la estabilidad

[139] Anraku, Y.; Kishimura, A.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc*. **2013**, *135*, 1423-1429.
[140] Amaral, S. P.; Tawara, M. H.; Fernández-Villamarín, M.; Borrajo, E.; Martínez-Costas, J.; Vidal, A.; Riguera, R.; Fernández-Megía, E. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2018**, *57*, 5273-5277.
[141] Harada, A.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc*. **1999**, *121*, 9241-9242
[142] Fernández-Villamarín, M.; Sousa-Hervés, A.; Porto, S.; Guldriís, N.; Martínez-Costas, J.; Riguera, R.; Fernández-Megía, E. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 2528-2537.

de las micelas PIC obtenidas, resistiendo concentraciones mayores a 3 M de NaCl. El aumento de estabilidad que les proporciona la rigidez y estructura globular del dendrímero a las micelas PIC formadas a partir de copolímeros de bloque de tipo LD, también quedó demostrada en la preparación y en la mejora de la estabilización de micelas formadas con polisacáridos cargados (quitosano, alginato y ácido hialurónico) en comparación con copolímeros lineales.[143]

1.5. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE DENDRÍMEROS Y COPOLÍMEROS DE BLOQUE L-D

La capacidad de los dendrímeros y copolímeros de bloque de formar estructuras de tamaño nanométrico en disolución, atrajo la atención sobre este tipo especial de macromoléculas para su potencial aplicación en el campo de la nanotecnología, especialmente en aplicaciones biomédicas.[144]

Aunque el concepto de nanotecnología fue introducido por Feynman en 1959,[145] hoy en día la definición se extiende de forma general al estudio y manipulación de materiales en la escala de los nanómetros (10^{-9} m).[146] La nanotecnología es una ciencia transversal que se puede aplicar a multitud de campos desde la fabricación de nuevos materiales para vehículos eléctricos,[147] energías renovables,[148] conservación de alimentos,[149] hasta aplicaciones en la industria cosmética.[150] Sin embargo, uno de los usos más interesantes de la nanotecnología ha sido en el campo de la biomedicina, concretamente en el transporte de fármacos.

---

[143] López-Blanco, R.; Fernández-Villamarín, M.; Jatunov, S.; Novoa-Carballal, R.; Fernández-Megía, E. *Polym. Chem*. **2019**, *10*, 4709-4717.

[144] **(a)** Sousa-Hervés, A.; Riguera, R.; Fernández-Megía, E. *New J. Chem*. **2012**, *36*, 205-210; **(b)** Ramos, A. P.; Cruz, M. A. E.; Tovani, C. B.; Ciancaglini, P. *Biophys. Rev*. **2017**, *9*, 79-89.

[145] Feynman, R. P. California Institute of Technology, Engineering and Science magazine, **1960**.

[146] Bamrungsap, S.; Zhao, Z.; Chen, T.; Wang, L. *Nanomedicine* **2012**, *7*, 1253-1271.

[147] Lu, J.; Chen, Z.; Ma, Z. *Nature Nanotech* **2016**, *11*, 1031-1038.

[148] Ahmadi, M. H.; Ghazvini, M.; Nazari, M. A.; Ahmadi, M. A.; Pourfayaz, F.; Lorenzini, G.; Ming, T. *Int. J. Energy. Res*. **2019**, *43*, 1387-1410.

[149] Singh, T.; Shukla, S.; Kumar, P.; Wahla, V.; Bajpai, V. K.; Rather, I. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1501.

[150] Katz, L. M.; Dewan, K.; Bronaugh, R. L. *Food Chem. Toxicol*. **2015**, *85*, 127-137.

1.5.1. TRANSPORTE DE FÁRMACOS (DD)

Para producir una determinada respuesta terapéutica, es necesario que un fármaco llegue al sitio de acción en una dosis efectiva y con actividad inalterada. Sin embargo, uno de los principales problemas a los que se enfrenta la farmacología es la inexorable pérdida de actividad a la que se ven sometidas las moléculas terapéuticas una vez son administradas. Esta pérdida de actividad está estrechamente relacionada con las propiedades fisicoquímicas del compuesto. Para solventar estos posibles problemas, Lipinski describió una serie de reglas obtenidas de manera experimental,[151] sobre cómo afectan las propiedades estructurales de fármacos a la farmacocinética, incluyendo procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) en sistemas *in vivo*.[152] Según Lipinski, para que la administración por via oral de un fármaco sea posible, no debe violar más de una de las siguientes reglas: i) No debe contener más de cinco donadores de enlaces por puente de hidrógeno. ii) No debe tener más de diez grupos aceptores de enlaces por puente de hidrógeno. iii) La molécula debe tener un peso molecular inferior a 500 uma, y iv) debe poseer un coeficiente de reparto octanol-agua (log P) inferior a 5. Sin embargo, existen numerosas excepciones a estas reglas y, además, éstas no predecirán si un compuesto será farmacológicamente activo *in vivo*.

Gran parte de los fármacos antitumorales son moléculas con limitada solubilidad en medio fisiológico, que se distribuyen por todo el organismo tras su administración intravenosa, limitando su dosis debido al riesgo de efectos secundarios asociados a su uso.[153]

Para solucionar estos problemas, se desarrolló el concepto de transporte de fármacos, conociéndose por sus siglas en inglés como DD (*Drug Delivery*).[154] El transporte de fármacos es una ciencia que estudia el uso de micro- y nano-sistemas para la encapsulación de fármacos o agentes con actividad terapéutica, para mejorar, entre otros, sus parámetros de

---

[151] **(a)** Lipinski, C. A. *Drug Disc. Today: Tech*. **2004**, *1*, 337-341; **(b)** Lipinski, C.A.; Lombado, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *J. Adv. Drug Deliv. Rev*. **1997**, *23*, 3-25.

[152] Balani, S. K.; Miwa, G. T.; Gan, L. S.; Wu, J. T.; Lee, F. W. *Curr. Top Med. Chem*. **2005**, *5*, 1033-1038.

[153] **(a)** Huang, C.-Y.; Ju, D.-T.; Chang, C.-F.; Reddy, P. M.; Velmurugan, B. K. *Biomedicine* **2017**, *7*, 12-23; **(b)** Nurgali, K.; Jagoe, R. T.; Abalo, R. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 1-3; **(c)** Devlin, E. J.; Denson, L. A.; Whitford, H. S. *J. Pain Symptom. Manag*. **2017**, *54*, 245-258.

[154] Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. *J. Control Release* **2014**, *190*, 15-28.

biodistribución y absorción. Además, el uso de sistemas DD o DDS (*Drug Delivery Systems*) permitirían proteger al fármaco del medio externo, conservándolo en su forma activa y pudiendo liberarlo selectivamente en su diana biológica. Se han descrito numerosos tipos de sistemas de transporte de fármacos,[155] pero dentro de los sistemas más versátiles e interesantes se encuentran los nanosistemas formados por dendrímeros y copolímeros de bloque.

Existen diversos parámetros que, de forma general, se deben tener en consideración en el diseño de un micro- o nanosistema para su uso en sistemas *in vivo*: i) Los sistemas DD deben evitar ser reconocidos por el sistema inmune del organismo, de lo contrario serían retirados rápidamente de la circulación. ii) El sistema DD debe acumularse específicamente en la diana biológica, y iii) liberar el fármaco en la diana atendiendo a un tipo específico de estímulo, que puede ser externo o interno. El desarrollo de un nanosistema en base a estas especificaciones convertirá a un sistema DD en un transportador de fármacos "inteligente", conociéndose como SDDS *(Smart Drug Delivery System*).[156]

1.5.2. SISTEMAS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS INTELIGENTES (SDDS)

Evitar las interacciones con los macrófagos y diversas proteínas que conforman la sangre incrementará el tiempo de circulación de nanomedicinas y sus posibilidades de acumulación en la diana biológica. En el caso de los copolímeros de bloque, el uso de polímeros biocompatibles como el PEG es habitual desde 1977 [157] para disminuir la inmunogenicidad y aumentar la farmacocinética de los nanosistemas. El PEG es un polímero neutro, flexible e hidrofílico obtenido mediante procesos de polimerización a partir de óxido de etileno (Figura 26). Tiene la característica de ser soluble en agua y la mayoría de los disolventes orgánicos exceptuando éter etílico y hexano. Su uso en productos farmacéuticos está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA). Su aplicación en sistemas de transporte de fármacos está tan extendida, que la

[155] Sarwar, H.; Hossain, M.K.; Basher, M.K.; Mia, M.N.H.; Rahman, M.T.; Uddin, M.J. *J. Adv. Res*. **2019**, *15*, 1-18.

[156] **(a)** Cabral, H.; Miyata, K.; Osada, K.; Kataoka, K. *Chem. Rev*. **2018**, *118*, 6844-6892; **(b)** Fang-Yang, D. L.; Xiong, F.; Gu, N. *Theranostics* **2016**, *6*, 1306-1323.

[157] Abuchowski, A.; McCoy, J. R.; Palczuk, N. C.; Van Es, T.; Davis, F. F. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3582-3586.

modificación covalente de una molécula con PEG se conoce por el nombre de PEGuilación.[158] La conjugación de cadenas de PEG sobre la superficie de nanomedicinas incrementa su solubilidad, biocompatibilidad y propiedades de "sigilo" también conocidas como "*stealth behavior*". Esta cualidad radica en que al enmascarar los sistemas rodeándolos con una cubierta neutra de PEG, se reduce su adhesión a las opsoninas presentes en el suero sanguíneo. Esto hará "invisibles" a las nanopartículas PEGuiladas, evitando que sean reconocidas y secuestradas por macrófagos, que las eliminarían rápidamente a través del sistema reticuloendotelial (RES) presente en hígado y bazo.[159]



Figura 26. Estructura química del PEG.

No obstante, existen estudios que cuestionan el uso de la PEGuilación en sistemas de transporte de fármacos debido a diversas limitaciones, por ejemplo, interacciones especificas con determinadas proteínas séricas o una reducción en la transfección en sistemas de transporte de genes terapéuticos.[160] Además de la conjugación de polímeros compatibles tales como el PEG en la superficie de las nanomedicinas, también se pueden emplear otras estrategias para disminuir su inmunogenicidad, como el recubrimiento mediante una corona proteica [161] o secuencias peptídicas específicas que evitan su reconocimiento.[162]

Otro requerimiento que debe cumplir una nanomedicina es tener una acumulación selectiva en la diana biológica de interés, evitando, por consiguiente, la distribución inespecífica en otros tejidos u órganos. Existen dos estrategias para conseguirlo, el llamado transporte activo, y el transporte pasivo.[163]

---

[158] Mishra, P.; Nayak, B.; Dey, R. K. Asian *J. Pharm. Sci*. **2016**, *11*, 337-348.
[159] Li, S-D.; Huang, L. *J. Control. Relese* **2010**, *145*, 178-181.
[160] Verhoef, J. J.; Anchordoquy, T. *J. Drug Deliv. Transl. Res*. **2013**, *3*, 499-503.
[161] Del Pino, P.; Pelaz, B.; Zhang, Q.; Maffre, P.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J. *Mater. Horiz*. **2014**, *1*, 301-313.
[162] Rodríguez, P. L.; Harada, T.; Christian, D. A.; Pantano, D. A.; Tsai, R. K.; Discher, D.E.; *Science* **2013**, *339*, 971-975.
[163] **(a)** Attia, M. F.; Anton, N.; Wallyn, J.; Omram, Z.; Vandamme, T.F. *J. Pharm. Pharmacol*. **2019**, *71*, 1185-1198; **(b)** Torchilin, V.P. *Handb. Exp. Pharmacol*. **2010**, *197*, 3-53.

El transporte pasivo se basa en el llamado efecto de permeabilidad y retención acentuadas (EPR) (Figura 27), descrito en 1985 por Maeda et al.[164]

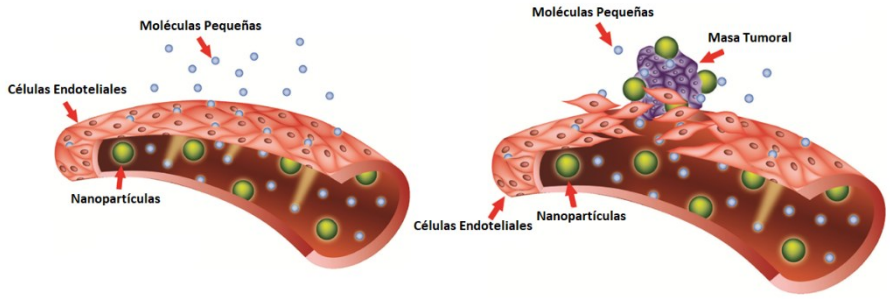


Figura 27. Nanopartículas atravesando una vasculatura sana (izquierda) y otra afectada por patología tumoral. Imagen adaptada de Creative Commons.

Cierto tipo de enfermedades, entre ellas el cáncer, produce una serie de alteraciones orgánicas como la inflamación de los tejidos, angiogénesis, la cual produce una alta vascularización alrededor del tejido tumoral, e hipoxia celular que puede derivar en necrosis. Se sabe que el endotelio de los vasos sanguíneos que rodea a los tejidos cancerosos es más permeable que el de los tejidos sanos. Este efecto, sumado al bajo drenaje linfático que se produce en este tipo de situaciones, conduce a que nanosistemas (o de forma general cualquier macromolécula de peso molecular superior a 40 kDa) con una farmacocinética adecuada, pueda tender a acumularse en estos tejidos de forma pasiva mediante el efecto EPR. Muchos sistemas de transporte de fármacos comerciales basan su eficacia en este efecto, entre ellos el Doxil ®, el primer nanosistema en ser aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer.[165] No obstante, esta estrategia presenta graves carencias. Los sistemas de transporte de fármacos con tamaños menores a 150 nm tienden a acumularse en el hígado, mientras que los de tamaño superior son retenidos en el bazo, provocando que el efecto EPR solo provoque una especificidad de entre un 20-30% mayor comparada al resto de órganos.[166]

A pesar de que la PEGuilación aumenta la farmacocinética de los sistemas de transporte de fármacos, ayudando por consiguiente a su acumulación en

[164] Matsumura, Y.; Maeda, H. *Cancer Res*. **1986**, *45*, 6384-6392.
[165] Barenholz, Y. *J. Control. Release* **2012**, *160*, 117-134.
[166] Kobayashi, H.; Watanabe, R.; Choyke, P. L. *Theranostics* **2014**, *4*, 81-89.

tejidos tumorales a través del efecto EPR; se sabe que esta habilidad de "sigilo" también puede representar un problema a la hora de la internalización de los nanosistemas en las células diana, es el conocido "*PEG dilemma*" [167]. Este problema puede ser solventado gracias al llamado transporte activo, que consiste en la modificación de la superficie de los nanosistemas con ligandos que permiten un reconocimiento especifico de las células diana, mejorando los procesos de endocitosis celular.[168] Estos ligandos comprenden desde proteínas, anticuerpos,[169] cadenas peptídicas,[170] determinados carbohidratos [171] y vitaminas, como por ejemplo el ácido fólico.[172]

Por último, otro parámetro a tener en cuenta a la hora de desarrollar un transportador de fármacos inteligente es diseñarlo para que sea sensible a ciertos estímulos y que pueda liberar el fármaco en su diana terapéutica eficientemente. Los estímulos a los que se puede hacer sensible un transportador de fármacos inteligente se clasifican en estímulos externos (exógenos) y estímulos internos (endógenos).

Los estímulos exógenos son aquellos que inducen la liberación del fármaco a través de una fuente externa al organismo, lo que permite un control espacio-temporal sobre el tratamiento con potenciales aplicaciones clínicas.[173] Esta liberación selectiva puede ser mediada por efecto de la temperatura, luz, ultrasonidos y campos eléctricos o magnéticos.

Los estímulos endógenos están directamente relacionados con las características patológicas que presente el área o enfermedad que se quiera tratar. En el caso del cáncer, los estímulos intrínsecos que se pueden usar para una liberación efectiva incluyen la actividad redox, la acción enzimática o uno de los más interesantes, el pH.

En presencia de oxígeno, un tejido no proliferativo (sano) metaboliza la glucosa en piruvato mediante glicólisis, que luego oxida a CO_2 en la mitocondria, siendo necesaria la presencia de O_2 como aceptor final de

[167] Fang, J.; Nakamura, H.; Maeda, H. *Adv. Drug Deliv. Rev*. **2011**, *63*, 136-151.
[168] Noble, G. T.; Stefanick, J. F.; Ashley, J. D.; Kiziltepe, T.; Bilgicer, B. *Trends Biotechnol*. **2014**, *32*, 32-45.
[169] Juan, A.; Cimas, F. J.; Bravo, I.; Pandiella, A.; Ocaña, A.; Alonso-Moreno, C. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 802.
[170] Worm, D. J.; Els-Heindl, S.; Beck-Sickinger, A. *Peptide Science* **2020**, *112*, 3.
[171] Hossain, R.; Andreana, P. R. *Pharmaceuticals* **2019**, *12*, 84.
[172] Xu, L.; Bai, Q.; Zhang, X.; Yang, H. *J. Control. Release* **2017**, *252*, 73-82.
[173] Yao, J.; Feng, J.; Chen, J. *Asian J. Pharm. Sci*. **2016**, *11*, 585-595.

electrones. Cuando existe una limitación de oxígeno (condiciones anaerobias) las células pueden redireccionar el piruvato, que acabaría formando parte del proceso de fosforilación oxidativa que tiene lugar en la mitocondria, mediante la generación de lactato. Este proceso es conocido como glicólisis anaerobia. En 1924, Otto Warburg observó que las células tumorales tendían a metabolizar la glucosa de una forma diferente a la de los tejidos sanos.[174] El denominado "Efecto Warburg" consiste en que las células tumorales producen energía a través de una ineficiente conversión de glucosa a piruvato, independientemente de los niveles de oxígeno, en la cual se produce un gran exceso de ácido láctico que es bombeado al citosol.[175] Este efecto, sumado a una gran producción de CO_2 (producido por una descontrolada glicólisis en tejido tumoral) el cual es transformado a HCO_3^- por anhidrasas carbónicas, produce una acidificación del entorno extracelular tumoral creando un gradiente de pH que puede variar de 6.6-6.9 unidades (Figura 28).[176]

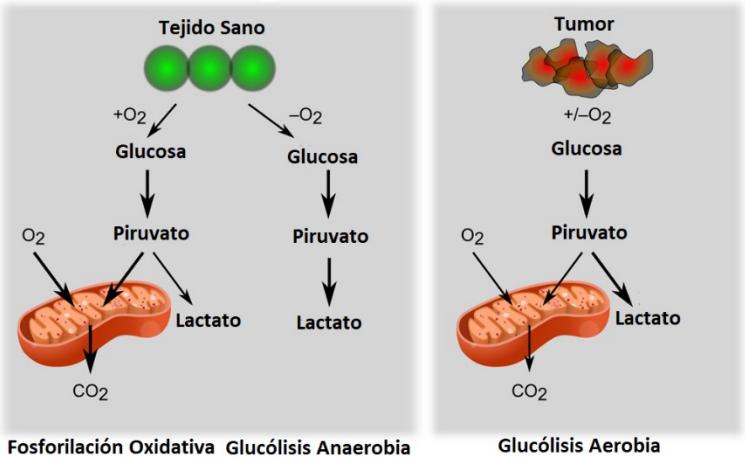


Figura 28. Rutas metabólicas en tejido sano (izquierda) y tejido tumoral (derecha). Imagen adaptada de Creative Commons.

[174] Warburg, O.; Posener, K.; Negelein, E. *Biochem. Z* **1924**, *152*, 310-344.
[175] Heiden, M. C. V.; Cantley, L. C.; Thompson, C. B. *Science* **2009** *324*, 1029-1033.
[176] **(a)** Marchiq, I.; Pouysségur, J. *J. Mol. Med*. **2016**, *94*, 155-171; **(b)** Ziebart, T.; Walenta, S.; Kunkel, M.; Reichert, T. E.; Wagner, W. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. **2011**, *137*, 193-199; **(c)** Liberti, M. V.; Locasale, J. W. *Trends Biochem. Sci*. **2016**, *41*, 211-217; **(d)** Hirschhaeuser, F.; Sattler, U. G. A.; Mueller-Klieser, W. *Cancer Res*. **2011**, *71*, 22, 6921-6925.

1.5.3. DENDRÍMEROS COMO SDDS

El uso de dendrímeros ofrece numerosas ventajas que convierten a estas macromoléculas en prometedores sistemas DD para su aplicación en el campo de la biomedicina.[177] De entre ellas, destacan: i) Su monodispersidad permite obtener buenos perfiles de farmacocinética, a diferencia de los polímeros polidispersos tradicionales.[178] ii) La precisa relación entre tamaño, estructura y propiedades de los dendrímeros, permite escoger la generación adecuada para una determinada aplicación.[179] iii) La elevada densidad de grupos funcionales en su periferia permite un elevado reconocimiento ligando/receptor.[180] iv) Su estructura globular permite hacer miméticos de proteínas con elevada inmunogenicidad,[181] v) como se ha descrito anteriormente, la aplicación de química click en su síntesis permite la obtención de estas estructuras de una forma rápida y precisa, siendo una plataforma versátil para su aplicación como DDS.[182]

En el campo de los DDS, la versatilidad de los dendrímeros de tipo Tomalia radica en que el interior de su estructura dendrítica puede ser utilizado para la encapsulación de fármacos mediante interacciones no covalentes, como interacciones hidrofóbicas, electroestáticas o por enlaces de hidrógeno (Figura 29); mientras que su superficie puede ser empleada en la unión covalente de moléculas terapéuticas. Además, dendrímeros catiónicos o aniónicos pueden formar dendriplexos con moléculas de carga opuesta, como proteínas o ácidos nucleicos, con aplicación en terapia génica.[183]

[177] Wang, H.; Huang, Q.; Chang, H.; Xiao, J.; Cheng, Y. *Biomater. Sci*. **2016**, *4*, 375-390.
[178] Cheng, Y.; Xu, T. *Eur. J. Med. Chem*. **2008**, *43*, 2291-2297.
[179] Svenson, S., Tomalia, D. A. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **2005**, *57*, 2106-2129.
[180] Vukojicic, P.; Béhar, G.; Tawara, M. H.; Fernández-Villamarín, M.; Pecorari, F.; Fernández-Megía, E.; Mouratou, B. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 21391-21398.
[181] Cañas-Arranz, R.; De León, P.; Forner, M.; Defaus, S.; Bustos, M. J.; Torres, E.; Andreu, D.; Blanco, E.; Sobrino, F. *Front. Vet. Sci*. **2020**, *7*, 498.
[182] Lallana, E.; Fernández-Trillo, F.; Sousa-Hervés, A.; Riguera, R.; Fernández-Megía, E. *Pharm. Res*. **2012**, *29*, 902-921.
[183] Abedi-Gaballu, F.; Dehghan, G.; Ghaffari, M.; Yekta, R.; Abbaspour-Ravasjani, S.; Baradaran, B.; Dolatabadi, J. E. N.; Hamblin, M. R. *Appl. Mater. Today* **2018**, *12*, 177-190.

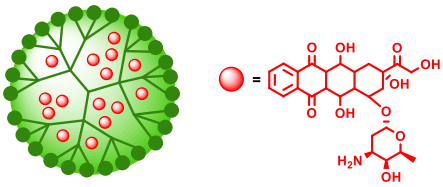


Figura 29. Dendrímero con moléculas de doxorubicina encapsuladas entre sus ramificaciones interiores.

Aunque los dendrímeros pueden ser modificados con tamaños y ligandos específicos para acumularse en sus dianas biológicas, la principal limitación de estos sistemas es que la liberación no específica de los fármacos o genes deriva en una limitada respuesta terapéutica o en la aparición de diversos efectos adversos.[184] Para solucionar estos problemas, se pueden diseñar DDS con uniones covalentes dendrímero-fármaco que respondan a diferentes estímulos, exógenos o endógenos, y que liberen fármacos, proteínas o material genético de una forma más eficaz y selectiva.

De los estímulos exógenos, los más utilizados para la síntesis de SDDS dendríticos son la luz y la temperatura. Dependiendo de la longitud de onda que se utilice, los estímulos que radican en fuentes de luz se clasifican en ultravioleta (UV), visible e infrarrojo cercano (NIR). Una de las estrategias es la formación de conjugados dendrímero-fármaco unidos mediante un grupo orto-nitro-benzoílo (ONB).[185] Baker et al. utilizaron dendrímeros PAMAM conjugados con doxorubicina (DOX) mediante enlaces con grupos ONB (Figura 30). Bajo exposición a luz UV (254-365 nm) este grupo funcional puede romperse liberando eficientemente la doxorubicina.[186] Otra estrategia es la utilización de dendrímeros que incorporan grupos sensibles a la luz en el rango visible. La exposición a luz azul (460 nm) puede provocar una despolimerización de estos dendrímeros haciendo accesible el fármaco de interés.[187] A pesar de que la utilización de luz en el rango UV y visible puede lograr una liberación selectiva del fármaco, la aplicación de estas longitudes de onda en sistemas *in vivo* no es factible, debido a la alta absorción

[184] Wang, X.; Cai, X.; Hu, J.; Shao, N.; Wang, F.; Zhang, Q.; Xiao, J.; Cheng, Y. *J. Am. Chem. Soc*. **2013**, *135*, 9805-9810.
[185] Wong, P. T.; Choi, S. K. *Chem. Rev*. **2015**, *115*, 3388-3432.
[186] Choi, S. K.; Thomas, T.; Li, M.-H.; Kotlyar, A.; Desai, A.; Baker Jr, J. R. *Chem.Commun*. **2010**, *46*, 2632-2634.
[187] Liu, G.; Zhang, G.; Hu, J.; Wang, X.; Zhu, M.; Liu, S.; *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *137*, 11645-11655.

[188] y poca penetración que tiene en tejidos.[189] Esta limitación se puede eliminar mediante el uso de radiación NIR, ya que posee un nivel de penetración mayor que las dos anteriores.[190] Zhu et al. han diseñado un sistema formado por dendrímeros PAMAM tipo Janus [191] y grupos hidrofóbicos diazonaftoquinona (DNQ) para su autoensamblaje con un fármaco hidrofóbico como la doxorubicina.[192] Bajo radiación NIR los grupos DNQ se transforman en grupos hidrofílicos a través de una transposición de Wolff,[193] provocando la solubilización de todo el nanosistema y la liberación del fármaco.

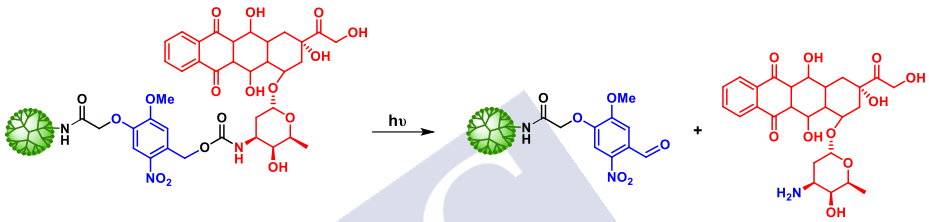


Figura 30. *Dendrímero modificado con grupos ONB (marcado en azul) para la liberación de DOX. Imagen adaptada de la referencia 177.*

En los dendrímeros sensibles a la temperatura, se explota su insolubilidad por encima de una temperatura mínima de disolución crítica (LCST),[194] a partir de la cual la solubilidad desciende dramáticamente, permitiendo desarrollar SDDS sensibles a este estímulo (Figura 31). Este tipo de transportadores se pueden sintetizar mediante dos estrategias: i) utilizando dendrímeros formados a partir de polímeros sensibles a la temperatura como la poli(N-isopropilacrilamida) (pNIPAM),[195] y ii) conjugando moléculas pequeñas

[188] Quek, C.-H.; Leong, K. W. *Nanomaterials*, **2012**, *2*, 92-112.
[189] Wu, S.; Butt, H.-J. *Phys. Chem. Chem. Phys*. **2017**, *19*, 23585-23596.
[190] Timko, B. P.; Whitehead, K.; Gao, W.; Kohane, D. S.; Farokhzad, O.; Anderson, D.; Langer, R. *Annu. Rev. Mater. Res*. **2011**, *41*, 1-20.
[191] Caminade, A.-M.; Laurent, R.; Delavaux-Nicot, B.; Majoral, J.-P. *New J. Chem*. **2012**, *36*, 217-226.
[192] Sun, L.; Ma, X.; Dong, C.-M.; Zhu, B.; Zhu, X. *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 3581-3591.
[193] Cui, G.; Thiel, W. *Angew. Chem*. **2013**, *125*, 451-454.
[194] Roy, D.; Brooks, W.L.A.; Sumerlin, B.S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7214-7243.
[195] Bhattacharjee, S.; Frank, D. S.; Cannon, J.; Baker, Jr, J. R. *Eur. Polym. J.* **2020**, *124*, 109464, 1-8.

en la superficie dendrítica como isobutilamidas, NIPAM, oligo etilenglicol (OEG), fenilalaninas o péptidos.

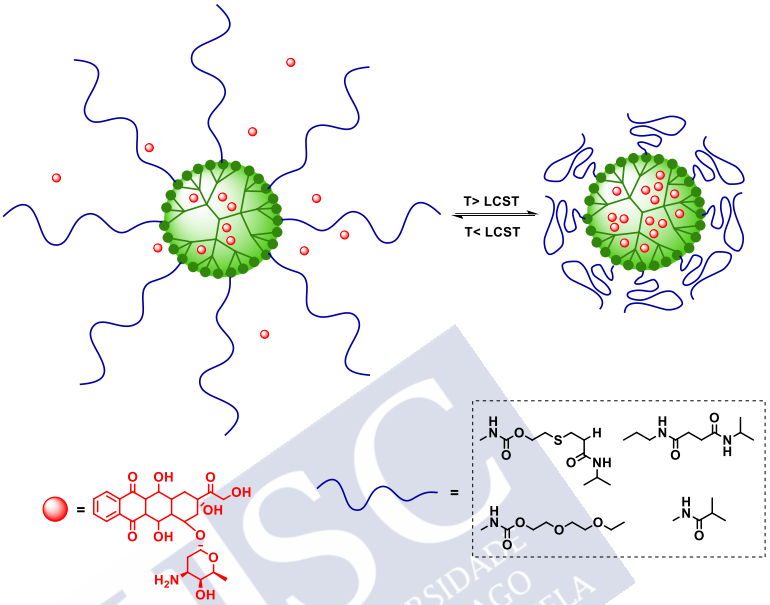


Figura 31. Dendrímeros sensibles a temperatura para la liberación de DOX. Imagen adaptada de la referencia 177.

Para construir SDDS dendríticos sensibles a estímulos endógenos se pueden usar varias estrategias. En el caso de una liberación selectiva promovida por estímulos enzimáticos, (Figura 32) se pueden usar conjugados dendrímero-fármaco en los cuales la unión entre ambos puede ser un espaciador peptídico como la secuencia Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG),[196] o grupos azoderivados [197] que, mediante la acción de una determinada enzima presente en la diana biológica, liberan el fármaco en su forma activa.

[196] Zhang, C.; Pan, D.; Luo, K.; Li, N.; Guo, C.; Zheng, X.; Gu, Z. *Polym. Chem*. **2014**, *5*, 5227-5235.

[197] Wiwattanapatapee, R.; Lomlim, L.; Saramunee, K. *J. Controlled Release* **2003**, *88*, 1-9.



Figura 32. Dendrímeros sensibles a estímulos enzimáticos. Imagen adaptada de la referencia 177.

En el caso de estímulos redox, el más utilizado para construir SDDS dendríticos es el glutatión (GSH).[198] Es conocido que la concentración intracelular de glutatión (0.5-10 mM) es en torno a 2-3 órdenes de magnitud superior al entorno extracelular (2-10 µM).[199] En células tumorales este efecto se ve acentuado, ya que compensan el efecto producido por el estrés oxidativo derivado de las ROS aumentando los niveles de GSH.[200] Los puentes disulfuro representan la estrategia más usada en SDDS dendrímero-fármaco sensibles a actividad redox, ya que estos grupos pueden ser reducidos en presencia de glutatión, liberando el fármaco del conjugado (Figura 33).[201]

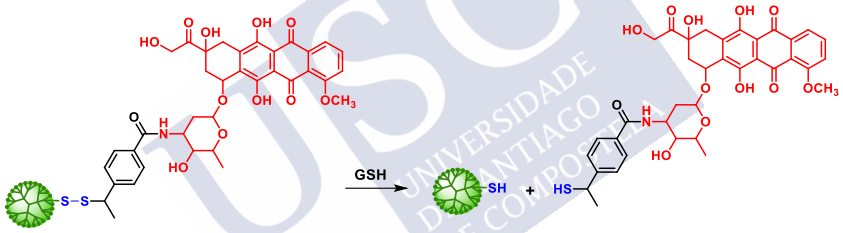


Figura 33. Dendrímeros sensibles a estímulos redox. Imagen adaptada de la referencia 177.

Por último, uno de los estímulos endógenos más ampliamente estudiados en SDDS es el de la sensibilidad a pH (Figura 34). Como se ha descrito, medios con un pH ligeramente ácido, como el que presentan entornos tumorales, o determinados orgánulos celulares como son los lisosomas, pueden servir para liberar los fármacos de una forma selectiva. Existen varios grupos funcionales sensibles a pH ácido mediante los cuales se pueden formar enlaces

[198] Quinn, J. F.; Whittaker, M. R.; Davis, T. P. *Polym. Chem*. **2017**, *8*, 97-126.
[199] Kojima, C.; *Expert Opin. Drug Delivery* **2010**, *7*, 307-319.
[200] Noh, J.; Kwon, B.; Han, E.; Park, M.; Yang, W.; Cho, W.; Yoo, W.; Khang, G.; Lee, D. *Nat. Commun*. **2015**, *6*, 6907, 1-9.
[201] Navath, R. S.; Kurtoglu, Y.E.; Wang, B.; Kannan, S.; Romero, R.; Kannan, R. *Bioconjug. Chem*. **2008**, *12*, 2446-2455.

dendrímero-fármaco, como por ejemplo las hidrazonas,[202] o ácidos borónicos.[203]

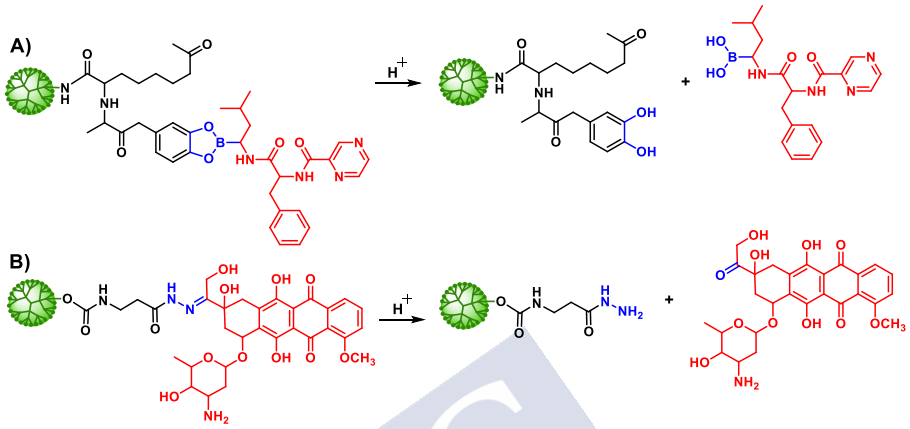


Figura 34. Dendrímeros sensibles a pH. A) Enlaces tipo éster borónico (marcados en azul). B) Enlaces tipo hidrazona (marcadas en azul). Imagen adaptada de la referencia 177.

1.5.3.1. DENDRÍMEROS GATG

Los dendrímeros GATG, descritos por Roy et al. en 1995,[204] (Figura 35) están formados por unidades de repetición derivadas de ácido gálico unido a cadenas hidrofílicas de trietilenglicol (TEG), funcionalizadas a su vez con azidas en sus extremos. Estos grupos hacen que estas unidades sean una plataforma muy versátil para la construcción de estructuras dendríticas, ya que permiten el uso de reacciones ortogonales para su síntesis y su funcionalización con numerosos grupos de interés biológico. Sin embargo, reacciones ineficientes de síntesis en la construcción de dendrímeros y en la unidad de repetición GATG, suponían una limitación de su uso en potenciales aplicaciones biomédicas.[205]

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA USC

[202] Zhong, Q.; Bielski, E. R.; Rodrigues, L. S.; Brown, M. R.; Reineke, J. J.; Da Rocha, S. R. P. *Mol. Pharm*. **2016**, *7*, 2363-2375
[203] Wang, M.; Wang, Y.; Hu, K.; Shao, N.; Cheng, Y. *Biomater. Sci*. **2015**, *3*, 480-489.
[204] Roy, R.; Park, W. K. C.; Wu, Q.; Wang, S.-N. *Tetrahedron Lett*. **1995**, *36*, 4377-4380.
[205] Meunier, S. J.; Wu, Q.; Wang, S.-N.; Roy, R. *Can. J. Chem*. **1997**, *75*, 1472-1482.

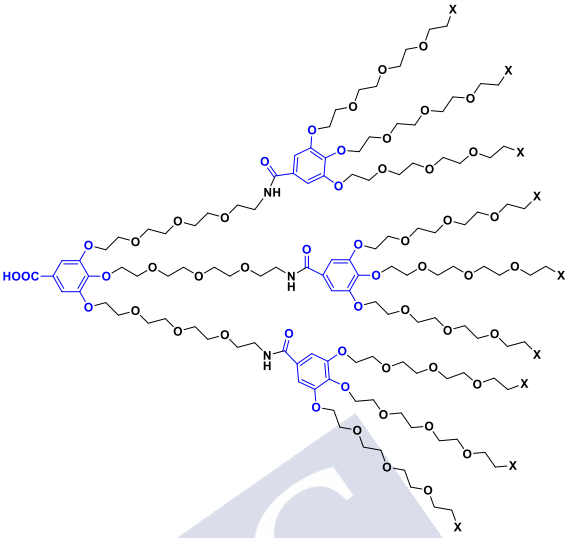


Figura 35. Dendrímero GATG. Unidades derivadas de ácido gálico resaltadas en azul. Imagen adaptada de la referencia 204.

Con el objetivo de hacer más accesible estas unidades de repetición, nuestro grupo de investigación mejoró la metodología sintética de los derivados de GATG, para su uso en la obtención de derivados dendríticos funcionalizados con diferentes carbohidratos, obteniendo rendimientos totales del 77 %; [206] mejorando la síntesis previamente reportada por Roy que describía rendimientos de entorno al 23%. En un intento por seguir perfeccionando la síntesis de las unidades GATG, el grupo reportó una metodología basada en los principios de la química verde para obtener estas unidades a gran escala (100 g) y elevados rendimientos (86%).[207]

La síntesis eficiente y a gran escala de estas unidades de repetición GATG, permitieron su uso en la construcción de estructuras dendríticas y copolímeros de bloque L-D [208] con aplicaciones en el campo de la biomedicina. Para

[206] Fernández-Megía, E.; Correa, J.; Rodríguez-Meizoso, I.; Riguera, R. *Macromolecules* **2006**, *39*, 2113-2120.

[207] Amaral, S. P.; Fernández-Villamarín, M.; Correa, J.; Riguera, R.; Fernández-Megía, E. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4522-4525.

[208] **(a)** Fernández-Megía, E.; Correa, J.; Riguera, R. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3104-3111; **(b)** Fernández-Villamarín, M.; Sousa-Hervés, A.; Correa, J.; Muñoz, E. M.; Taboada, P.; Riguera, R.; Fernández-Megía, E. *ChemNanoMat* **2016**, *2*, 437-446.

explorar su versatilidad en este campo, el grupo sintetizó de copolímeros de bloque PEG-GATG funcionalizados con diferentes grupos, y mediante un marcaje con fluoresceína isotiocianato (FITC) analizaron la internalización y tráfico celular de estas especies. Basado en los resultados, diseñaron un prototipo polimérico basado en copolímeros PEG-[GATG]-NH_3^+ para su uso como sistemas DD.[209]

La presencia de grupos azida en la periferia dendrítica de los dendrímeros y copolímeros de bloque PEG-GATG, permiten una funcionalización eficiente con una gran variedad de ligandos de interés y relevancia biológicos, como grupos catiónicos y aniónicos, carbohidratos, péptidos, agentes de contraste para bioimagen y material genético entre otros, que demuestran la robustez y versatilidad de este tipo de macromoléculas en su aplicación en el campo de la nanotecnología y biomedicina (Figura 36).

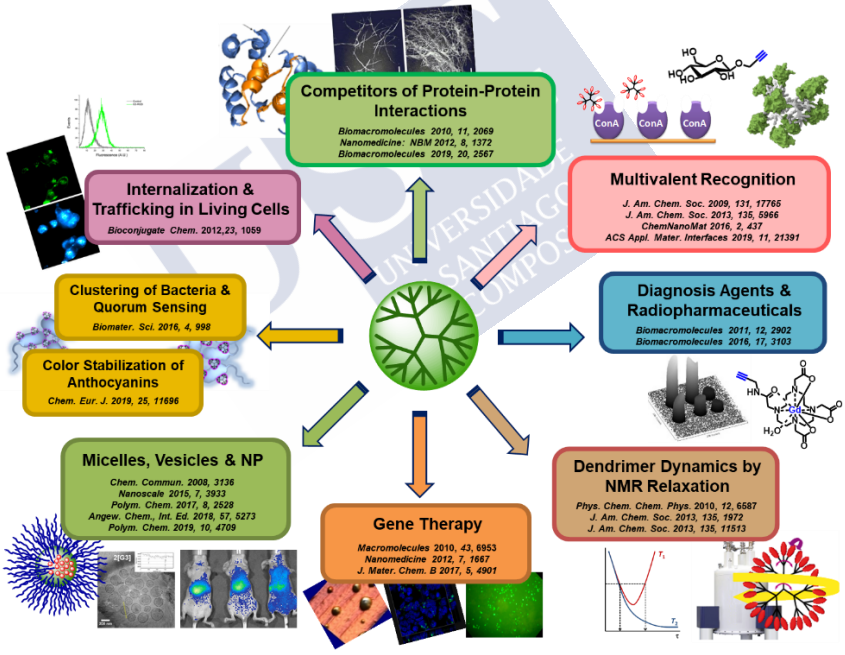


Figura 36. Aplicaciones de los dendrímeros GATG desarrolladas por nuestro grupo de investigación.

[209] Albertazzi, L.; Fernández-Villamarín, M.; Riguera, R.; Fernández-Megía, E. *Bioconjugate Chem*. **2012**, *23*, 5, 1059-1068.

1.5.4. COPOLÍMEROS DE BLOQUE COMO SDDS

Como se ha descrito anteriormente, los copolímeros de bloque de tipo L-D, ya sean macromoléculas anfifílicas o con una determinada carga, tienen la propiedad de formar agregados supramoleculares en agua; pudiendo albergar en su interior fármacos o moléculas con un determinado efecto terapéutico. En el caso particular de estos copolímeros, la creación de SDDS copolímero-fármaco unidos mediante enlaces covalentes, sigue unas estrategias similares a las utilizadas en los dendrímeros. Sin embargo, existen limitaciones una vez los copolímeros se han ensamblado en agua. Por ejemplo, en el caso de copolímeros de bloque SDDS sensibles a estímulos enzimáticos, considerando que los espaciadores sensibles a estas especies se encuentran, habitualmente, en la región dendrítica hidrofóbica que conformará el núcleo de las micelas/agregados supramoleculares, se necesita que haya un equilibrio entre la nanoestructura y los copolímeros de bloque individuales que la forman, ya que las enzimas son demasiado voluminosas como para penetrar en estos ensamblados poliméricos.[210]

En el caso del diseño de SDDS mediante interacciones no covalentes copolímero-fármaco, se pueden sintetizar copolímeros de bloque que presenten sensibilidad a alguno de los estímulos previamente citados, y utilizarlos para la encapsulación de fármacos en agregados poliméricos (Figura 37). Atendiendo a las características fisicoquímicas del copolímero de bloque, existen fundamentalmente dos estrategias de encapsulación.[211] La primera, denominada disolución directa, es usada para copolímeros de bloque solubles o moderadamente solubles en agua, como los polímeros iónicos. Esta técnica consiste en disolver los copolímeros y el fármaco directamente en agua, para que se produzcan los procesos de agregación y encapsulación.

La segunda estrategia de encapsulación se aplica mayoritariamente a copolímeros de bloque anfifílicos y fármacos que non son directamente solubles en agua, necesitándose disolventes orgánicos para su solubilización.[212] En el caso de disolventes orgánicos miscibles con agua, se pueden usar las técnicas de diálisis o evaporación, donde la lenta eliminación de la fase orgánica induce la agregación y encapsulación del

---

[210] Raghupathi, K. R.; Guo, J.; Munkhbat, O.; Rangadurai, P.; Thayumanavan, S. *Acc. Chem. Res*. **2014**, *47*, 2200-2211.

[211] Gaucher, G.; Dufresne, M.-H.; Sant, V. P. Kang, N.; Maysinger, D.; Leroux, J.-C. *J. Control. Release* **2005**, *109*, 169-188.

[212] Liu, J.; Lee, H.; Allen, C. *Curr. Pharm. Des*. **2006**, *12*, 4685-4701.

fármaco. Otra metodología empleada incluye la formación de agregados tras disolver el copolímero y fármaco en una mezcla de terbutanol/agua, seguida de liofilización y posterior reconstitución en agua Para disolventes orgánicos inmiscibles en agua, se utilizan mayoritariamente las metodologías de emulsión en agua-aceite (O/W por sus siglas en inglés) y la preparación de *films*. Mediante la técnica de emulsión O/W, las moléculas del fármaco se encuentran disueltas en microgotas de disolvente orgánico, que a su vez se encuentran estabilizadas por las cadenas poliméricas, conservándose esta estructura durante el proceso de evaporación del disolvente orgánico. En la técnica de formación de *films*, el copolímero de bloque y el fármaco se solubilizan en un disolvente orgánico y este se evapora lentamente, obteniéndose una fina película donde el fármaco se encuentra interaccionando con el polímero. La posterior rehidratación de esta película dará lugar a los agregados poliméricos cargados con el fármaco.

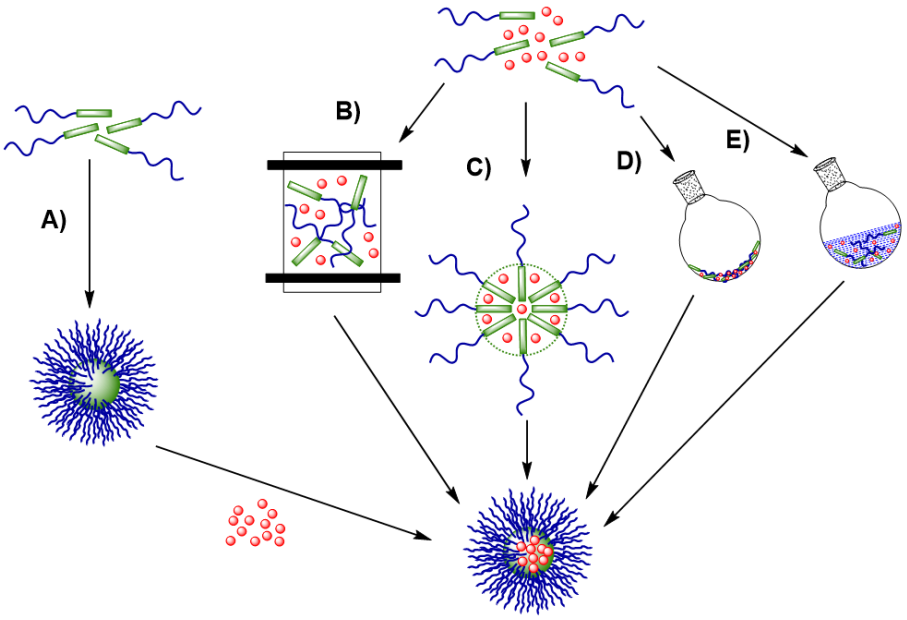


Figura 37. Métodos comunes de encapsulación de fármacos en estructuras poliméricas. A) Disolución directa. B) Diálisis. C) Emulsión O/W. D) Preparación de films. D) Liofilización/resuspensión. Imagen adaptada de la referencia 211.

1.6. ÁCIDOS BORÓNICOS

1.6.1. PROPIEDADES Y REACTIVIDAD

Los ácidos borónicos (AB), sintetizados por primera vez por Frankland en 1860,[213] son compuestos químicos orgánicos que contienen en su estructura un boro trivalente unido a un sustituyente alquilo o arilo (enlace C-B) y a dos grupos hidroxilo (Figura 38). A diferencia de los ácidos carboxílicos, estos compuestos no se encuentran en la naturaleza, sólo pudiendo ser obtenidos de forma sintética. Como reactivos, los AB se caracterizan por tener una gran estabilidad. Además, su baja toxicidad y los procesos de oxidación a los que se ven sometidos, hacen que sean vistos como compuestos respetuosos con el medio ambiente o "*green*".[214]

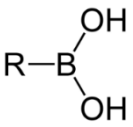


Figura 38. Estructura de un ácido borónico.

La reactividad y las propiedades de estas especies están determinadas fundamentalmente por la naturaleza electrónica del átomo de boro, que adopta una geometría trigonal plana con hibridación sp^2, en la que un orbital p vacío se sitúa perpendicularmente a los tres sustituyentes. Este orbital es responsable de que los AB actúen como ácidos de Lewis, formando complejos con bases de Lewis (como aniones fluoruro o hidróxido) o con grupos electrodonadores, como el nitrógeno o el oxígeno.[215] Esta complejación, realizada a través del orbital p vacante, provoca un cambio de hibridación sobre el átomo de boro, pasando de ser una especie trigonal plana a otra aniónica con hibridación tetraédrica sp^3. Otra característica de los AB es que, en estado sólido, estas especies tienden a formar trímeros cíclicos, denominados boroxinas, derivados de procesos de deshidratación.[216] Estas estructuras tienen un

[213] **(a)** Frankland, E.; Duppa, B. F. *Justus Liebigs Ann. Chem*. **1860**, *115*, 319; **(b)** Frankland, E.; Duppa, B. *Proc. Royal. Soc. (London)* **1860**, *10*, 568; **(c)** Frankland, E. *J. Chem. Soc.* **1862**, *15*, 363.

[214] Dennis G. Hall. (**2005**) Boronic Acids. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

[215] Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1375-1397.

[216] Korich, A. L.; Iovine, P. M. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 1423-1431.

carácter semi-aromático debido a la deslocalización de los pares electrónicos del oxígeno sobre el sextete cíclico formado por los heteroátomos.[217] Además, las boroxinas comparten con los AB la característica de formar aductos ácido-base de Lewis con ligandos con átomos de nitrógeno.[218]

Los ácidos arilborónicos son la clase más popular y estudiada de AB. El ácido fenilborónico (PBA), el derivado arílico más simple, se conoce desde 1880.[219] Su estructura cristalográfica se describió por primera vez en 1977.[220] Su popularidad en química médica viene dada por su presencia en la estructura de diversos fármacos y su amplia utilización en la funcionalización de macromoléculas para la formación de complejos supramoleculares. Es en este campo donde los ácidos borónicos tienen su aplicación más interesante.

1.6.2. ÁCIDOS BORÓNICOS Y DIOLES

Se sabe que el ácido bórico es capaz de reaccionar con polioles, como el glicerol, desde la década de 1870. Mediante medidas del cambio de conductividad de las disoluciones, Magnanini apuntó que sería posible la formación de compuestos fácilmente disociables en medio acuoso y estudios realizados por Van't Hoff mostraron que el ácido bórico podía reaccionar con polioles, que contuviesen grupos hidroxilo adyacentes, para formar ésteres cíclicos con anillos de cinco y seis miembros.[221] La prueba de que la formación de complejos está involucrada en los cambios de conductividad fue proporcionada por Hermans,[222] que determinó que la combinación de catecol, ácido bórico y potasio tenía una estructura en la que el átomo de boro se unía a dos moléculas de catecol, con la conformación de un espirano, siendo el boro el átomo central.[221]

Lorand y Edwards elucidaron estructura del ion borato en disolución acuosa en 1955.[223] Posteriormente, completando los trabajos iniciados por

[217] Snyder, H. R.; Kuck, J. A.; Johnson, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60*, 105-111.
[218] **(a)** Wu, Q.G.; Wu, G.; Brancaleon, L.; Wang, S. *Organometallics*, **1999**, *18*, 2553-2556; **(b)** Matteson, D.S. *J. Org. Chem*. **1962**, *27*, 3712.
[219] **(a)** Michaelis, A.; Becker, P. *Ber. Dtsch. Chem. Ges*. **1880**, *13*, 58; **(b)** Michaelis, A.; Becker, P. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1882**, *15*, 180.
[220] Rettig, S. J.; Trotter*, J. Can. J. Chem*. **1977**, *55*, 3071-3075.
[221] Böeseken, Adv. *Carbohydr. Chem.* **1949**, *4*, 189-210.
[222] Hermans, P. H.; *Z. Anorg. Allgem. Chem*. **1925**, *142*, 83-110.
[223] Edwards, J. O.; Morrison, G. C.; Ross, V.; Schultz, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 266-268.

Soboczenski [224] y Bowman.[225], también fueron los primeros en evidenciar que la reacción entre PBA y polioles implicaba la formación ésteres que contenían un anión boronato.[226] Además, en su estudio describían que "*sólo la forma tetraédrica del ión benzeno-boronato tiene suficientes grupos hidroxilo para formar el complejo*", afirmación sobre la que se basarían para hacer medidas de afinidad entre el PBA y dioles, pero que sería desmentida en estudios posteriores. A partir de estas publicaciones, surgieron numerosos estudios dedicados a analizar el equilibrio entre ácidos borónicos y dioles.

1.6.2.1. EQUILIBRIOS

Los AB pueden reaccionar con 1,2 y 1,3 dioles para formar ésteres cíclicos de cinco y seis miembros, respectivamente, a través de equilibrios en disolución habitualmente complejos (Figura 39). Hay diversos parámetros que tienen un papel fundamental en el control de estos equilibrios para dar lugar a la formación de ésteres borónicos, los cuales son considerados estructuras dinámicas covalentes.[227].

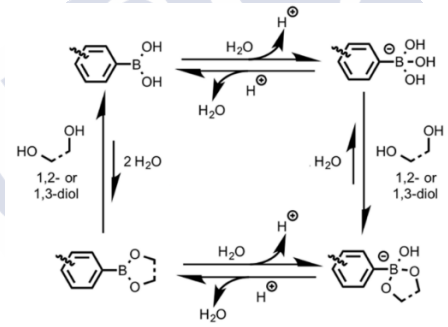


Figura 39. Equilibrios de los ácidos borónicos en disolución. Imagen adaptada de Creative Commons.

Los parámetros más importantes que influyen en estos equilibrios están relacionados con el pK_a del ácido borónico, del diol enlazante y el pH del medio donde tiene lugar la reacción. Según su pK_a, y dependiendo del pH de la disolución acuosa, los ácidos borónicos se encuentran en equilibrio entre su

[224] Kuivila, H. G.; Keough, A. H.; Soboczenski, E. J. *J. Org. Chem*. **1954**, *19*, 5, 780-783.
[225] Sugihara, J. M.; Bowman, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 10, 2443-2446.
[226] Lorand, J. P.; Edwards, J. O. *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 769-774.
[227] Cash, J. J.; Kubo, T.; Bapat, A. P.; Sumerlin, B. S. *Macromolecules* **2015**, *48*, 2098-2106.

forma neutra $RB(OH)_2$ (especie trigonal plana, hibridación sp^2) y su forma aniónica de hidroxiboronato $RB(OH)_3^-$ (especie tetraédrica, hibridación sp^3). En el caso del PBA, el derivado arilborónico más simple, el valor de pK_a se sitúa entre 8.7-8.9 unidades.[228] Sin embargo, una vez se produce la unión con un determinado diol, los valores de pK_a no son los mismos para los AB y sus correspondientes ésteres derivados. Estudios experimentales han demostrado que en la formación de los ésteres borónicos, generalmente, se produce un aumento de la acidez, es decir, una disminución del pK_a de estas especies de hasta tres unidades con respecto al AB de partida.[229] Lopalco et al.[230] demostraron que en la formación del éster borónico entre el manitol y el ácido 4-metoxifenilborónico, se producía una diferencia del pK_a de 9.41 unidades del AB libre, a 6.53 correspondiente a la especie complejada.

Junto con el pK_a del propio AB, la acidez del diol juega un papel importante en la determinación del pH óptimo para la formación del éster borónico.[231] Los grupos de Roberts [232] y Van Duin [233] estudiaron independientemente la dependencia del pH en la formación de ésteres borónicos. Estos grupos propusieron que el valor óptimo de pH debería encontrarse en un término medio entre los valores de pK_a de los ácidos borónicos y los dioles, simplificándose según la ecuación propuesta por Van Duin:[234]

$$pH_{óptimo} = \frac{pK_{a-ácido} + pk_{a-diol}}{2}$$

Según esta ecuación, dado que los dioles, por norma general, son menos ácidos que los AB, llevó a la creencia de que para encontrar un par diol-AB estable para su uso a pH fisiológico, el pK_a del ácido borónico debía ser igual o inferior a 7.4.

Recientemente, estudios realizados por Martínez-Aguirre et al. sobre las relaciones de correlación de tipo Hammett y Brönsted entre ácidos borónicos y dioles, dieron lugar al desarrollo de una ecuación más completa que permite

[228] Springsteen, G.; Wang, B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5291-5300.
[229] Lopalco, A.; Stella, V. J.; Thompson, W. H. *Eur. J. Pharm. Sci*. **2018**, *124*, 10-16.
[230] Lopalco, A.; Marinaro, W. A.; Day, V. W.; Stella, V. J. *J. Pharm. Sci*. **2017**, *106*, 601-610.
[231] Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1375-1397.
[232] Sienkiewicz, P. A.; Roberts, D. C. *J. Inorg. Nucl. Chem*. **1980**, *42*, 1559-1575.
[233] Van Duin, M.; Peters, J. A.; Kieboom, A. P. G.; Van Bekkum, H. *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 2901-2911.
[234] Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11205-11209.

estudiar las constantes de estabilidad a partir de los valores de pK_a de ambas especies. La comparación de medidas experimentales con los valores obtenidos a través de esta ecuación, que sólo tiene en cuenta las propiedades ácido-base de los componentes, permiten establecer una idea de las posibles contribuciones de otros factores como efectos estéricos o de carga en la formación de ésteres borónicos.[235]

1.6.2.2. MECANISMO

Ha existido mucha controversia alrededor del mecanismo y los equilibrios implicados en la reacción de formación de ésteres borónicos.[236] Desde los primeros estudios llevados a cabo por Lorand y Edwards, hasta publicaciones posteriores por parte de Pizer, se pensaba que el anión boronato $RB(OH)_3^-$ era mucho más reactivo que la especie trigonal plana, con cinéticas de hasta 10^4 mayores en la formación de los ésteres borónicos.[237] Posteriormente, estudios del mecanismo de estas reacciones llevados a cabo por Ishihara et al.,[238] demostraron que la especie trigonal plana del ácido borónico $RB(OH)_2$ es cinéticamente más reactiva que su especie boronato tetraédrica $RB(OH)_3^-$,[239] aunque ambas reaccionan con dioles (H_2L) en disolución (Figura 40). Sin embargo, mediante estudios de ^{11}B RMN determinaron que las especies mayoritarias eran los quelatos tetraédricos tipo $RB(L)(OH)^-$. Esto se justificaría por el bajo pK_a de estas especies, sumado a que la hibridación del átomo de boro en los ésteres borónicos daría lugar a una estructura más estable en la que se liberaría tensión de anillo.[240] Por último, Ishihara et al. también estudiaron el orden de reactividad de los dioles enlazantes, concluyendo que su cinética disminuía en orden $H_2L>HL>L^{2-}$.

[235] Martínez-Aguirre, M. A.; Villamil-Ramos, R.; Guerrero-Álvarez, J.A.; Yatsimirsky, A. K. *J. Org. Chem*. **2013**, *78*, 10, 4674-4684.
[236] Dufort, B. M.; Tibbitt, M. W. Mater. *Today. Chem.* **2019**, *12*, 16-33.
[237] Babcock, L.; Pizer, R. *Inorg. Chem*. **1980**, *19*, 56-61.
[238] **(a)** Iwatsuki, S.; Nakajimà, S.; Inamo, M.; Takagi, H. D.; Ishihara, K. *Inorg. Chem*. **2007**, *46*, 2, 354-356; **(b)** Furikaido, Y.; Nagahata, R.; Okamoto, T.; Sugaya, T.; Iwatsuki, S.; Inamo, M.; Takagi, H. D.; Odani, A.; Ishihara, K. *Chem. Eur. J*. **2014**, *20*, 41, 13194-13202.
[239] Peters, J. A. *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *268*, 1-22.
[240] Hubert, A. J.; Hargitay, B.; Dale, J. *J. Chem. Soc*. **1961**, 931-936.

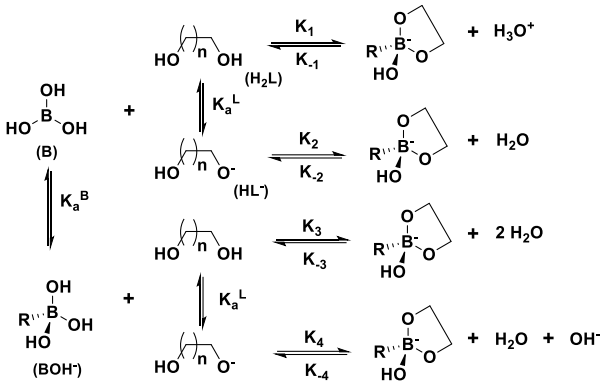


Figura 40. Diferentes equilibrios implicados en la formación de ésteres borónicos con la especie trigonal plana $RB(OH)_2$ y la especie tetraédrica $RB(OH)_3^-$. Imagen adaptada de la referencia 238b.

1.6.2.3. AFINIDAD

Conocer las afinidades entre AB y 1,2 y 1,3 dioles es imprescindible para poder diseñar aplicaciones derivadas de estas interacciones. Existen varios métodos para poder calcular las constantes de afinidad en la formación de ésteres borónicos. Como se ha descrito, en 1959 Lorand y Edwards llevaron a cabo la primera investigación sobre la medida de constantes de afinidad entre ésteres borónicos y dioles. Su método se basaba en asignar una constante de afinidad directamente proporcional a la bajada de pH asociada a la formación del éster borónico.[226] Desde esa primera publicación aparecieron diversas investigaciones que basaban sus datos de afinidad en valoraciones ácido-base.[241] Sin embargo, estudios posteriores demostraron que este método no reflejaba los complicados equilibrios entre especies en disolución, asumiendo que sólo los iones borato $RB(OH)_3^-$ eran las especies reactivas y, en muchos casos, planteando equilibrios erróneos de protonación y desprotonación de las especies implicadas.

En estudios posteriores, Wang y Springsteen [228] desarrollaron una nueva metodología para calcular constantes de afinidad entre ácidos borónicos y dioles basada en la espectroscopía de fluorescencia, que carecía de las

[241] **(a)** Bosch, L. I.; Fyles, T. M.; James, T. D. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11175-11190; **(b)** Bromba, C.; Carrie, P.; Chui, J. L. W.; Fyles, T. M. *Supramolecular Chemistry* **2009**, *21*, 81-88; **(c)** Friedman, S.; Pizer, R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 21, 6059-6062.

limitaciones de las valoraciones ácido-base de Lorand y Edwards. Esta nueva metodología hace uso de la alizarina sulfonato (ARS), una especie que en disolución apenas presenta fluorescencia, ya que la transferencia del protón en el estado excitado del grupo -OH fenólico al oxígeno de la cetona adyacente resulta en un *quenching* de la misma.[242] Cuando se produce la unión de la ARS con el AB, la consecuente formación del éster borónico impide que haya esta transferencia, aumentado la fluorescencia del aducto.[243] El desplazamiento en mayor o menor medida del éster borónico de la ARS por parte de dioles problema, producirá una reducción de la fluorescencia de la muestra, mostrando un determinado perfil de afinidad. Comparando las constantes de afinidad proporcionadas por los métodos de Edwards y Springsteen, métodos se pueden observar importantes diferencias entre ambas metodologías (Figura 41).

NOMBRE	K_{tet} (M^{-1}) [223]	K_{eq} (M^{-1}) [226]
Etilenglicol	2.76	-
Glicerol	19.7	-
Manitol	2275	120
Catecol	17500	830
Rojo de Alizarina	-	1300
D-glucosa	110	4.6
D-galactosa	276	15
D-fructosa	4370	160
Lactosa	-	1.6

Figura 41. Diferencias entre las constantes de equilibrio calculadas por el método de Edwards vs Springsteen. Imagen adaptada de la referencia 236.

Posteriormente, Wang et al. demostraron la inconsistencia de la ecuación propuesta por Van Duin utilizando su método basado en la espectroscopía de fluorescencia de ARS.[234] En este trabajo hicieron un estudio sistemático de la relación entre pK_a, pH y las constantes de afinidad en el que usaron seis ácidos fenilborónicos substituídos y diferentes dioles, comparando los pH

[242] Palit, D. K.; Pal, H.; Mukherjee, T.; Mittal, J. P. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1990**, *86*, 3861-3869.
[243] Tomsho, J. W.; Benkovic, S. J. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 2098-2106.

óptimos de afinidad predichos por la ecuación de Van Duin con sus resultados experimentales (Figura 42). Observaron que los valores propuestos por la ecuación no pueden predecir de una forma precisa el valor óptimo de pH, ya que ésta se basa sólo en los pK_a del ácido y del diol, sin tener en consideración otros factores de igual importancia como el tipo de tampón, su concentración y otras interacciones de tipo supramolecular como enlaces de hidrógeno.

Ácidos Borónicos (pK_a)	PBA (8.8)	4-Br-PBA (8.3)	4-Cl-4-F-PBA (7.8)	2,5-DifluoroPBA (7.6)	3,4,5-TrifluoroPBA (6.8)	2-F-5-NitroPBA (6.0)
Glucosa (12.5)						
pH 6.5	0.84	5.6	7.6	33	17	25
pH 7.5	4.6	20	26	47	41	47
pH 8.5	11	2.4[e]	48	7.3[e]	52	56
pH Óptimo predicho	10.6	10.3	10.1	10.0	9.6	9.2
Fructosa (12.3)						
pH 6.5	29	123	562	237	545	1398
pH 7.5	210	495	1003	2136	2523	2062
pH 8.5	560	1194	1853	120	4443	378[e]
pH Óptimo predicho	10.4	10.2	9.9	9.8	9.4	9.0
Catecol (9.2)						
pH 6.5	150	715	1646	8841	2137	3027
pH 7.5	830	1557	6100	4703	2896	4359
pH 8.5	3300	1966	7487	418[e]	5376	3792
pH Óptimo predicho	9.0	8.8	8.5	8.4	8.0	7.6

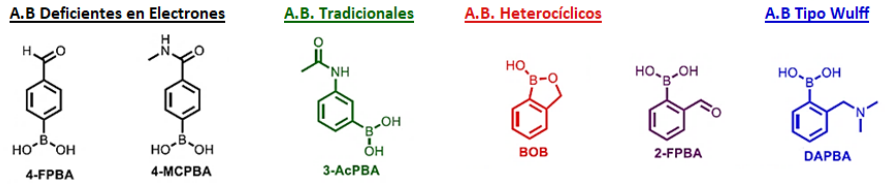
Figura 42. Constantes de afinidad (M^{-1}) entre ácidos borónicos y dioles a diferentes pH. Imagen adaptada de la referencia 234.

Además del pH de la disolución, el pK_a de los ácidos borónicos y los dioles, otro parámetro que afecta a la afinidad entre AB y dioles es el ángulo diedro del diol enlazante. Cis-dioles cíclicos tienden a tener mayores constantes de afinidad que acíclicas. Böeseken ya apuntó que 1,2-dioles no cíclicos tenían un menor cambio de conductividad cuando se mezclaban con ácido bórico en disolución. Esto se traducía en una menor afinidad, ya que la posición entre estos grupos no era favorable debida a su propia repulsión, que situaría ambos a 180º.[221] Por otro lado, moléculas con un gran número de dioles adyacentes, o dioles en estructuras cíclicas aumentará la afinidad entre especies, ya que la conformación espacial de estos grupos es más favorable para la formación del éster borónico.[241b]

Como la gran mayoría de los ácidos borónicos empleados en biomedicina son derivados arilborónicos, se han desarrollado numerosas modificaciones sobre el anillo aromático para modificar el pKa del AB y hacer que el proceso de formación del éster sea más eficiente.[231] Por ejemplo, las modificaciones con grupos atractores de electrones sobre el anillo aromático puede reducir el pK_a del AB, mientras que la adición de grupos electrodonadores incrementa

su valor. Otro tipo especial de derivados fenilborónicos son los benzoxaboroles [244] y los AB tipo Wulff [245].

En un estudio más reciente, Summerlin et al. han determinado las constantes de afinidad de ácidos arilborónicos (Figura 43), que incluyen grupos atractores de electrones, AB heterocíclicos como los benzoxaboroles, y ácidos borónicos tipo Wulff, con dioles de relevancia biológica como el sorbitol la fructosa y la glucosa.[246]



Ácido borónico (pK_a)	Diol	3-AcPBA (8.5)	4-MCPBA (7.9)	4-FPBA (7.8)	BOB (7.5)	2-FPBA (7.5)	DAPBA (5.3)
pH 5.2	ARS	1220 (110)	1720 (140)	2580 (130)	620 (32)	820 (55)	17 400 (680)
pH 7.4		2200 (73)	2490 (82)	4850 (85)	940 (54)	760 (5)	600 (34)
pH 8.7		490 (38)	470 (30)	720 (17)	100 (1.6)	89 (4)	43 (1.2)
pH 5.2	Sorbitol	6.5 (0.2)	13 (0.1)	22 (1.4)	5.5 (0.2)	9.7 (0.2)	130 (5.6)
pH 7.4		610 (13)	980 (8)	2100 (90)	420 (16)	440 (20)	380 (20)
pH 8.7		3200 (190)	4200 (320)	3000 (220)	1200 (7)	1200 (50)	230 (1.4)
pH 5.2	Fuctosa	n/d	n/d	3.1 (0.1)	n/d	1.9 (0.1)	4 (0.2)
pH 7.4		350 (11)	470 (17)	1260 (31)	290 (21)	360 (30)	64 (2.0)
pH 8.7		1400 (50)	1600 (98)	2000 (120)	770 (14)	790 (60)	9.6 (0.3)
pH 5.2	Glucosa	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d
pH 7.4		8.1 (0.7)	8.8 (0.6)	21 (0.8)	13 (0.6)	22 (0.2)	n/d
pH 8.7		30 (0.9)	38 (2)	52 (3)	42 (2)	42 (1)	n/d

Figura 43. Afinidades en disolución acuosa de diferentes ácidos borónicos. Imagen adaptada de referencia 246.

Observaron que los derivados fenilborónicos con grupos situados en orto- al grupo ácido, presentaban menores constantes de estabilidad a un pH cercano al fisiológico, resultado que atribuyeron a un impedimento estérico. También observaron que los ácidos borónicos tipo Wulff aumentaban las constantes de

[244] Tomsho, J. W.; Pal, A.; Hall, D. G.; Benkovic, S. J. *ACS Med. Chem. Lett*. **2012**, *3*, 48-52.
[245] Lauer, M.; Wulff, G. *J. Organomet. Chem*. **1983**, *256*, 1-9.
[246] Brooks, W. L. A.; Deng, C. C.; Sumerlin, B. S. *ACS Omega* **2018**, *3*, 17863-17870.

afinidad a un pH más bajo que el resto de derivados, hecho que justificaron mediante una estabilización electroestática del ión amonio con el boronato (Figura 44).[234]

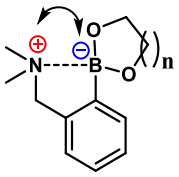


Figura 44. Interacción electrostática entre el anión amonio y boronato presente en los ésteres borónicos tipo Wulff.

Estos estudios demuestran que, en el diseño de materiales basados en ácidos borónicos, se necesita un conocimiento profundo de las relaciones fundamentales entre estructura-propiedades y estructura-reactividad de estas especies, incluyendo factores como el $pK_{a\text{-diol}}$, $pK_{a\text{-acido}}$, el ángulo diedro del diol, el impedimento estérico y la estabilización del boronato.

1.6.3. ÁCIDOS BORÓNICOS TIPO WULFF

Los estudios pioneros de la química boro-nitrógeno datan de la década de 1950.[247] Paralelamente se desarrolló la síntesis de compuestos que presentan enlaces dativos N→B.[248]

Pese a que los primeros derivados de ácidos arilborónicos con un residuo -CH_2-N(CH_3)$_2$ en orto al ácido borónico fueron sintetizados por Stroup y Hawkins a finales de los 60s,[249] no fue hasta 1980 [250] cuando Wulff puso en relieve la importancia de estas especies en la formación de ésteres borónicos. La relevancia de los estudios de afinidad con dioles realizados por

[247] Niedezu, K.; Dawson, J. W. (***1965***) Heterocyclic σ-Bonded Systems containing oron and Nitrogen. En: Boron-Nitrogen Compounds. Anorganische und Allgemeine Chemie in Einzeldarstellungen, vol 6. Springer, Berlin, Heidelberg.

[248] **(a)** Maitlis, P. M. *Chem. Rev*. **1962**, *62*, 3, 223-245; **(b)** Letsinger, R. L.; Skoog, I. *J. Am. Chem. Soc*. **1955**, *77*, 9, 2491-2494; **(c)** Hawkins, R. T.; Snyder, H. R: *J. Am. Chem. Soc*. **1960**, *82*, 15, 3863-3866; **(d)** Hawkins, R.T.; Blackham, A. U. *J. Org. Chem*. **1967**, *32*, 3, 597-600; **(e)** Dunn, H. E.; Catlin, J. C.; Snyder, H. R. *J. Org. Chem.* **1968**, *33*, 12, 4483-4486.

[249] Hawkins, R. T.; Stroup, D. B. *J. Org. Chem*. **1969**, *34*, 4, 1173-1174.

[250] Burgemeister, T.; Grobe-Einster, R.; Grotsollen, R.; Mannschreck, A.; Wulff, G. *Chem. Ber*. **1981**, *114*, 3403-3411.

Wulff hicieron que esta clase de estructuras sean comúnmente conocidas como ácidos borónicos "tipo Wulff".

Con el objetivo de crear métodos de cromatografía HPLC que permitiesen establecer equilibrios rápidos entre ácidos borónicos y dioles, Wulff et al. estudiaron la formación de ésteres borónicos entre derivados arilborónicos y dioles en disolvente orgánico.[251] Observaron que los compuestos que contenían un nitrógeno localizado en una posición favorable, como el ácido 2-(dimetilaminometil) fenilborónico, daban lugar a ésteres en los que se formaba un enlace dativo N→B en disolución. También establecieron que estos derivados tenían cinéticas de hasta 14 órdenes de magnitud mayores en comparación con el PBA, el ácido arilborónico más simple.[252]

Sin embargo, no fue hasta 1994, con la publicación de un estudio por James et al.,[253] cuando comenzaron las investigaciones sobre el papel de la interacción N→B en el equilibrio de formación de ésteres borónicos en disolución. Estos autores sintetizaron un sensor fluorescente de carbohidratos basado en un derivado tipo Wulff, con un grupo -CH_2-N(R'R'') situado en orto al ácido borónico. Postularon que en presencia de dioles, se formaba un éster borónico en disolución acuosa en el que se producía una coordinación N→B. Esta coordinación detenía el proceso de transferencia electrónica fotoinducida (PET) [254] del grupo amino al residuo de antraceno del sensor, conllevando un consiguiente aumento de la fluorescencia (Figura 45).[255]

[251] Wulff, G. *Pure & Appl. Chem*. **1982**, *54*, 11, 2093-2102.
[252] Wulff, G.; Lauer, M.; Böhnke, H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *9*, 23, 741-742.
[253] James, T. D.; Sandanayake, K. R. A. S.; Shinkai, S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 447-478.
[254] Beeson, J. C.; Huston, M. E.; Pollard, D. A.; Venkatachalam, T. K.; Czarnik, A. W. *J. Fluoresc.* **1993**, *3*, 2, 65-68.
[255] James, T. D.; Linnane, P.; Shinkai, S. *Chemm. Commun*. **1996**, 281-288.

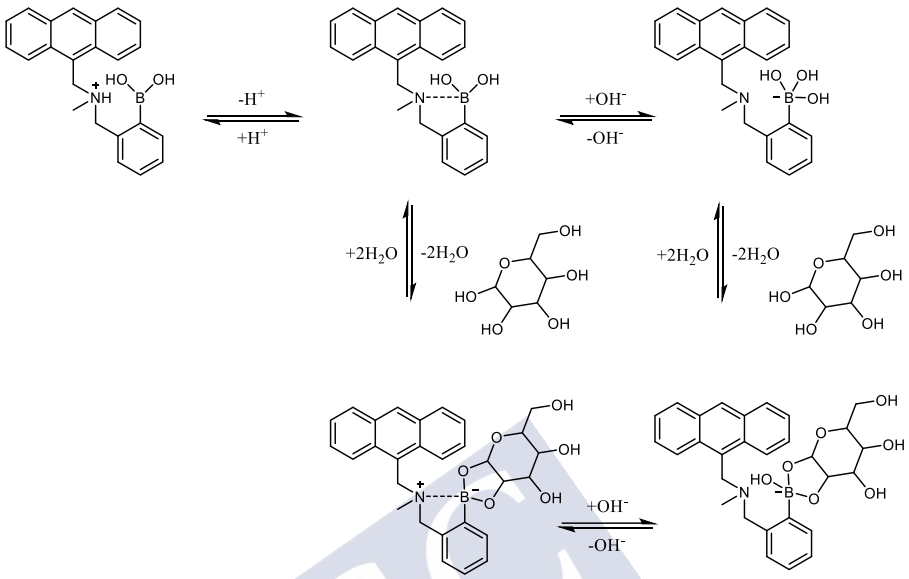


Figura 45. Equilibrios implicados en los mecanismos de activación de la fluorescencia de los sensores de sacáridos propuestos por el grupo de James. Imagen adaptada de la referencia 253.

Desde ese primer estudio, la naturaleza de la interacción N→B en disolución acuosa ha sido ampliamente debatido. Desde 1994, se han propuestos varios mecanismos sobre el papel que juegan el átomo de nitrógeno y boro en el aumento de la fluorescencia de sensores de dioles formados por ácidos borónicos tipo Wulff y fluoróforos.[256]

Nueve años más tarde de que James publicara su propuesta de mecanismo, Wang et al. propusieron una alternativa al enlace dativo N→B para justificar el aumento de fluorescencia (Figura 46). Mediante estudios teóricos, describieron que el enlace N→B, formado en el éster borónico, no era lo suficientemente fuerte como para producir un efecto significativo sobre el PET.[257] Propusieron como alternativa un mecanismo de *quenching* mediante un "pK_a *switch*", por el que, en presencia de un diol, el enlace dativo N→B se rompe mediante una hidroxilación del átomo de boro y una protonación del átomo de nitrógeno, provocando que el nitrógeno pierda su

[256] Sun, X.; Chapin, B. M.; Metola, P.; Collins, B.; Wang, B.; James, T. D.; Anslyn. E. V. *Nat. Chem*. **2019**, *11*, 768-778.
[257] Franzen, S.; Ni, W.; Wang, B.; *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12942-12948.

par electrónico libre. De esta forma justificaban el consiguiente aumento de fluorescencia del aducto.[258]

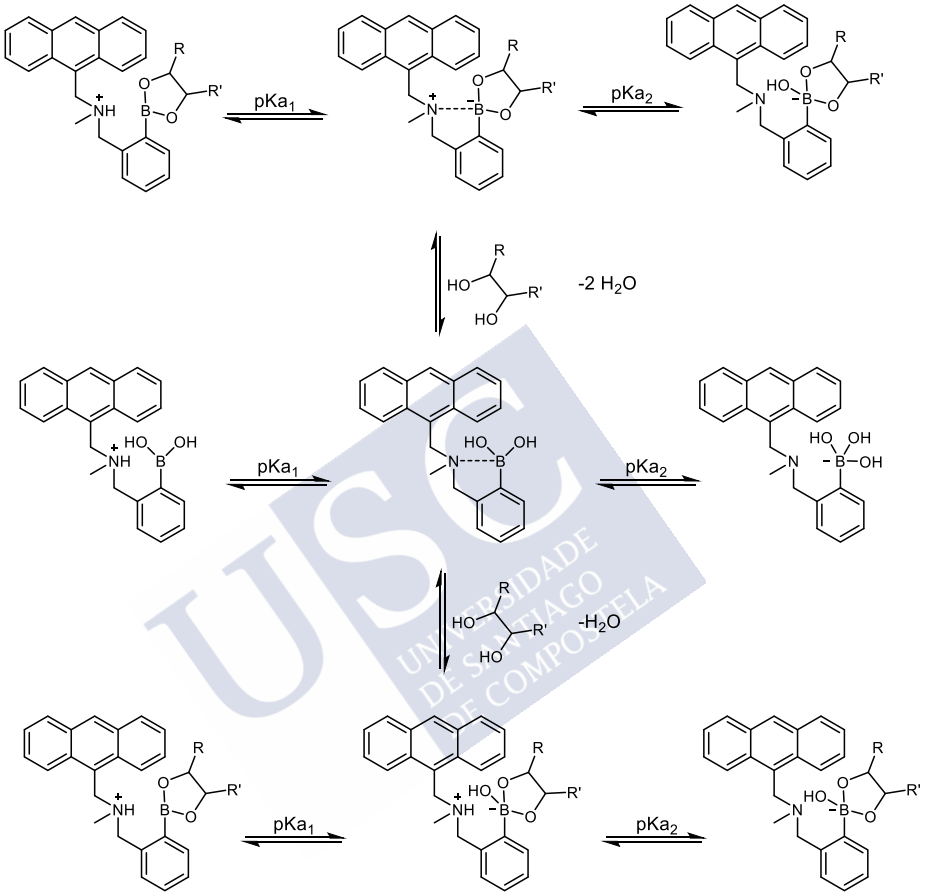


Figura 46. Equilibrios implicados en el mecanismo de cambio de fluorescencia propuestos por el grupo de Wang. Imagen adaptada de la referencia 258.

A pesar de que ambos estudios explicaban el aumento de la fluorescencia mediante mecanismos diferentes, tenían una particularidad en común. Ambos tenían en consideración que el pK_{a1} del derivado arilborónico se correspondía con la desprotonación del amonio, para dar lugar a una interacción N→B, y el

[258] Ni, W.; Kaur, G.; Springsteen, G.; Wang, B.; Franzen, S. *Bioorg. Chem*. **2004**, *32*, 571-581.

"pK_{a2}" se correspondía con la hidroxilación del átomo de boro y consiguiente rotura del enlace. Wang basaba sus interpretaciones de pK_a en estudios previos realizados por Anslyn, en los que llegaba a esa conclusión mediante valoraciones de ^{11}B RMN.[259]

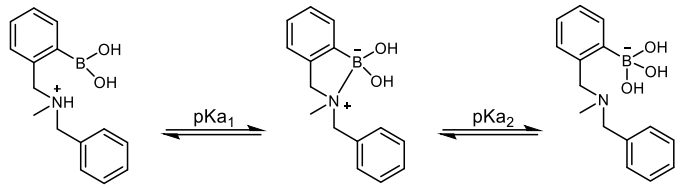


Figura 47. Asignación de pKa de los derivados arilborónicos mediante valoración por ^{11}B NMR. Imagen adaptada de la referencia 259.

Sin embargo, ^{11}B NMR, al no permitir discriminar especies que contienen enlaces N→B de otras estructuras con átomos de boro con hibridación sp^3, condujo también a una mala interpretación de los resultados.[256] Posteriormente, Anslyn et al. realizaron un estudio pormenorizado de las interacciones entre ácidos borónicos tipo Wulff con diferentes dioles en medios próticos y no próticos. Mediante valoraciones de ^{11}B RMN, observaron que en medios próticos (CD_3OD) el átomo de boro es muy propenso a la inserción de una molécula de disolvente. Por el contrario, el enlace N→B sólo es mayoritario en disolventes apróticos ($CDCl_3$). Con estos nuevos datos, reinterpretaron la valoración del ácido borónico tipo Wulff en medio acuoso, y postularon que, al contrario de lo previamente establecido, el pK_{a1} (6.5) se correspondía con la hidroxilación del boro, dando lugar al boronato sp^3 $RB(OH)_3^-$, y que el segundo pK_{a2} (9-10) era responsable de la desprotonación del ión amonio.[260] Además, establecieron rangos de desplazamiento químico en ^{11}B RMN para las especies tetrahédricas sp^3 N→B (12-16 ppm) y las especies tetraédricas sp^3 derivadas de una inserción de disolvente (8-12 ppm).

[259] Wiskur, S. L.; Lavigne, J. J.; Ait-Haddou, H.; Lynch, V.; Chiu, Y. H.; Canary, J. W.; Anslyn, E. V. *Org. Lett*. **2001**, *3*, 9, 1311-1314.

[260] Zhu, L.; Shabbir, S. H.; Gray, M.; Lynch, V. M.; Sorey, S.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1222-1232.

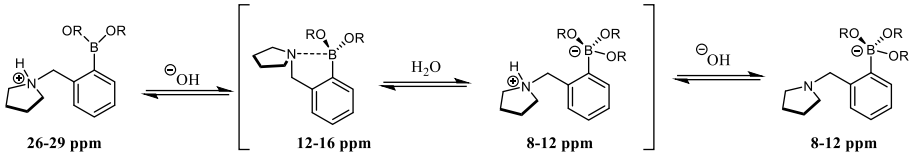


Figura 48. Desplazamientos químicos de boro de las diferentes especies que conforman los equilibrios de protonación y desprotonación de los diferentes derivados arilborónicos propuestos por Anslyn, Imagen adaptada de la referencia 260.

Posteriormente, estudios computacionales llevados a cabo por Larkin y James apoyaron la hipótesis de Anslyn, estableciendo valores de pK_{a1} y pK_{a2} muy similares de 5.3 y 12.07 unidades, respectivamente.[261] Curiosamente, la asignación de los valores de pK_a ya fuera realizada por Wulff de una forma correcta 20 años antes *"Además, los valores del ácido 2-(dimetilaminometil) fenilborónico muestran un pK_1=5.2 y pK_2=11.8. Un ácido borónico con un pK=5.2 representa el ácido borónico más ácido utilizado para este propósito.*" [251]

Finalmente, y con la ayuda de las evidencias experimentales previas que demostraban que los mecanismos propuestos por James y Wang no eran correctos, Anslyn et al. describieron recientemente el mecanismo que lleva al aumento de fluorescencia. Para sensores con una reducida solubilidad en agua, descubrieron que el mecanismo involucra una desagregación de las moléculas tras su unión a los dioles.[262] Por otro lado, en el mecanismo principal que explica el proceso pasa por el denominado "*loose bolt effect*".[263] Mediante este efecto, los grupos -OH del $-B(OH)_2$ funcionan como aceptores de energía del fluoróforo (antraceno, pireno, etc) una vez excitado, produciéndose un *quenching* de la fluorescencia. Si estos hidroxilos son reemplazados por un diol como fructosa (o azúcares en general), grupos metilo procedentes del metanol, o incluso por grupos -OD, y por lo tanto eliminando los estados vibracionales del -OH, esta transferencia energética interna es suprimida, llevando a un aumento de la fluorescencia del aducto.

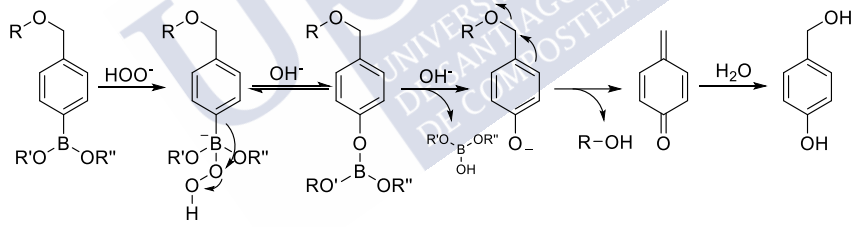
[261] Larkin, J. D.; Fossey, J. S.; James, T. D.; Brooks, B. R.; Bock, C. W. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 12531-12539.
[262] Chapin, B. M.; Metola, P.; Vankayala, S. L.; Woodcock, H. L.; Mooibroek, T. J.; Lynch, V. M.; Larkin, J. D.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc*. **2017**, *139*, 15, 5568-5578.
[263] Sun, X.; James, T. D.; Anslyn, E. V. *J. Am. Chem. Soc*. **2018**, *140*, 6, 2348-2354.

1.6.4. APLICACIONES DE LOS ÁCIDOS BORÓNICOS EN SDDS

Los transportadores de fármacos inteligentes se pueden diseñar para ser estables en condiciones fisiológicas y usar diversos estímulos para provocar una liberación selectiva del fármaco. Esto se puede lograr utilizando diferentes aproximaciones, pero una de las más interesantes es la introducción en estos nanosistemas de grupos funcionales como los ácidos borónicos. Además de como sensores,[264] aplicación que llevó a un estudio profundo de sus equilibrios en disolución, los ácidos borónicos tienen una gran aplicación en SDDS, gracias a ser especies químicas muy versátiles y ofrecer una respuesta a diversos estímulos endógenos.[265]

1.6.4.1. ESPECIES SENSIBLES A ROS

Los tejidos tumorales producen elevados niveles de ROS,[266] especies como el radical hidroxilo ($\cdot OH^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical superóxido ($\cdot O^-$), que pueden ser utilizados para crear SDDS sensibles a estas especies. Los ácidos borónicos, al ser incorporados en sistemas DDS, pueden producir una respuesta específica en ambientes con altas concentraciones de estas especies, ya que reaccionan según el siguiente mecanismo:



Esquema 7. Sensibilidad a ROS de los ácidos borónicos

La reactividad de ésteres borónicos frente a ROS puede ser explotada de varias formas en el diseño de SDDS. Por ejemplo, la estabilidad de un polímero frente a ROS puede ser útil para producir una desagregación selectiva y liberación controlada de un fármaco. Fréchet et al.[267] modificaron cadenas

[264] Fang, G.; Wang, H.; Bian, Z.; Sun, J.; Liu, A.; Fang, H.; Yao, Q.; Wu, Z. *RSC Adv*. **2018**, *8*, 29400-29427.
[265] Stubelius, A.; Lee, S.; Alutairi, A. *Acc. Chem. Res*. **2019**, *52*, 11, 3108-3119.
[266] **(a)** Weinberg, F.; Ramnath, N.; Deepak, N. *Cancers*, **2019**, *11*, 1191, 1-20; **(b)** Szatrowski, T.P.; Nathan, C.F. *Cancer Res*. **1991**, *51*, 794-798.
[267] Broaders, J. E.; Grandhe, S.; Fréchet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 756-758.

de dextrano con ácidos borónicos protegidos por grupos pinacol. Demostraron que las partículas formadas a partir de este polímero eran capaces de desensamblarse en presencia de H_2O_2, dando lugar a cadenas de dextrano libre. De forma similar, las matrices poliméricas se pueden diseñar de tal forma que incorporen grupos que desencadenen la degradación del polímero. Almutairi et al. diseñaron una matriz polimérica capaz de degradarse en presencia de H_2O_2 dando lugar a fenoles y ácido adípico.[268] Otro diseño que tiene actividad a ROS está basado en una combinación de los dos anteriores. Se pueden utilizar los ácidos borónicos como ligandos que unan un polímero y un fármaco hidrobófico. Almutairi et al. modificaron una cadena de dextrano con ácidos borónicos unidos covalentemente a una molécula de naproxeno. En presencia de ROS, el polímero era capaz de desensamblarse dando lugar a la cadena hidrofílica de dextrano y liberando el fármaco en su forma activa.[269]

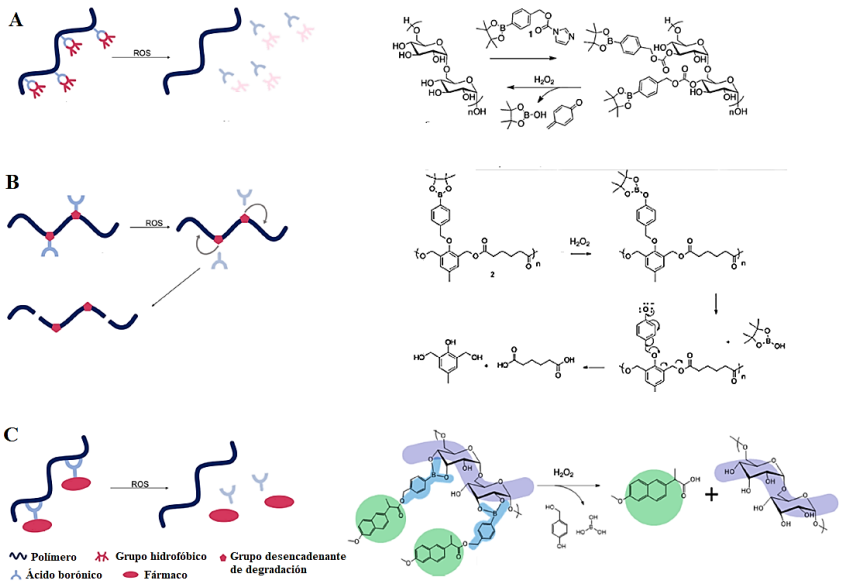


Figura 49. Estrategias sensibles a ROS. Imagen adaptada de la referencia 265.

[268] De Gracia Lux, C.; Joshi-Barr, S.; Nguyen, T.; Mahmoud, E.; Schopf, E.; Fomina, N.; Almutairi, A. *J. Am. Chem. Soc*. **2012**, *134*, 15758-15764.

[269] Lee, S.; Stubelius, A.; Hamelamnn, N.; Tran, C.; Almutairi, A. *ACS Appl. Mater Interfaces* **2018**, *10*, 40378-40387.

1.6.4.2. ESPECIES SENSIBLES A MEDIO ÁCIDO

Como se ha comentado anteriormente, tejidos con ciertas patologías, como los tejidos tumorales, suelen presentar entornos ligeramente más ácidos en comparación con los tejidos sanos. Además, los mecanismos de internalización celular, como la endocitosis, generan medios con un pH 5 que se puede explotar para diseñar SDDS. Alguna de las estrategias para diseñar SDDS sensibles a medio ácido que contienen ácidos borónicos se indican a continuación. Li et al. usaron dos copolímeros de bloque anfifílicos de tipo LD formados por PEG y un dendrímero funcionalizado en la periferia con ácido cólico, una molécula insoluble en agua. La principal característica es que uno de ellos contenía ácidos borónicos, mientras que el otro estaba unido covalentemente a residuos de catecol. En disolución, estos copolímeros pueden agregarse formando micelas, que además se encontraban estabilizadas por la formación de ésteres borónicos entre los residuos poliméricos. En presencia de medio ácido, los ésteres borónicos pueden hidrolizarse, desestabilizando la estructura y liberando un fármaco encapsulado.[270]

Otro diseño sensible a este estímulo es la formación de hidrogeles de ésteres borónicos. Hall et al. han preparado polímeros basados en benzaboroxoles y nopoldiol para formar hidrogeles con la habilidad de encapsular un fármaco antitumoral como la doxorubicina. En presencia de ROS o medio ácido, se demostró que este gel podía liberar el fármaco de forma selectiva.[271]

Por último, otra forma de crear sistemas sensibles a medio ácido, consiste en unir fármacos que contengan dioles directamente al ácido borónico. Esta estrategia fue utilizada por Herrera-Alonso et al. para unir un fármaco con un diol, como la capecitabina, a un copolímero de bloque anfifílico funcionalizado con ácidos borónicos, el cual, en presencia de medio ácido podía liberar el fármaco en su forma activa al producirse una hidrólisis del éster borónico.[272] Una estrategia de encapsulación similar fue utilizada por Shi et al. para encapsular el mismo fármaco utilizando iminoboronatos.[273]

---

[270] Li, Y. P.; Xiao, W. W.; Xiao, K.; Berti, L.; Luo, J. T.; Tseng, H. P.; Fung, G.; Lam, K. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 2864-2869.

[271] Wu. D.; Wang, W.; Díaz-Dussan, D.; Peng, Y.-Y.; Chen, Y.; Narain, R.; Hall, D. G. *Chem. Mater*. **2019**, *31*, 4092-4102.

[272] Aguirre-Chagala, Y. E.; Santos, J. L.; Huang, Y.; Herrera-Alonso, M. *ACS Macro Lett*. **2014**, *3*, 12, 1249-1253.

[273] Ma, R.; Zhang, C.; Liu, Y.; Li, C.; Xu, Y.; Li, B.; Zhang, Y.; An, Y.; Shi, L. *RSC Adv*. **2017**, *7*, 21328-21335.

Esta estrategia de unión covalente es la más versátil, ya que un gran número de moléculas terapéuticas contienen grupos diol en su estructura, evitando por consiguiente tener que someterlas a alteraciones químicas y pudiendo utilizar polímeros sin complicadas modificaciones sintéticas. Este tipo de diseño se ha utilizado para encapsular numerosos fármacos como anfotericina B,[274] andrografólido,[275] apomorfina,[276] doxorubicina,[277] emodina,[278] y diversas catequinas.[279]

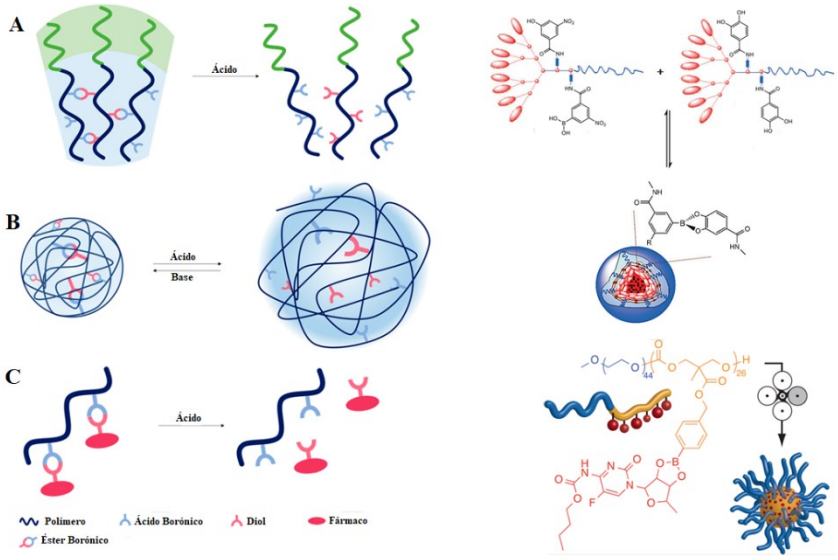


Figura 50. Estrategias sensibles a medio ácido. Imagen adaptada de la referencia 265.

[274] Wang, Y.; Ke, X.; Voo, Z. X.; Yap, S. S. L.; Yang, C.; Gao, S.; Liu, S.; Venkataraman, S.; Obuobi, S. A. O.; Khara, J. S.; Yang, Y. Y.; Ee, P. L. R. *Acta Biomater.* **2016**, *46*, 211-220.

[275] Kim, J.; Lee, J.; Lee, Y. M.; Pramanick, S.; Im, S.; Kim, W. J. *J. Control. Release* **2017**, *259*, 203-211.

[276] Tan, J. P. K.; Voo, Z. X.; Lim, S.; Venkataraman, S.; Ng, K. M.; Gao, S.; Hedrick, J. L.; Yang, Y. Y. *Nanomedicine* **2019**, *17*, 236-245.

[277] **(a)** Lv, S.; Wu, Y.; Cai, K.; He, H.; Li, Y.; Lan, M.; Chen, X.; Cheng, J.; Yin, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4, 1235-1238; **(b)** Lee, J.; Kim, J.; Lee, Y. M.; Park, D.; Im, S.; Song, E. H.; Park, H.; Kim, W. J. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, *38*, 848-858.

[278] Wang, B.; Chen, L.; Sun, Y.; Zhu, Y.; Sun, Z.; An, T.; Li, Y.; Lin, Y.; Fan, D.; Wang, Q. *J. Mater. Chem. B*. **2015**, *3*, 3840-3847.

[279] Cheng, T.; Liu, J.; Ren, J.; Huang, F.; Ou, H.; Ding, Y.; Zhang, Y.; Ma, R.; An, Y.; Liu, J.; Shi, L. *Theranostics*, **2016**, *6*, 9, 1277-1292.

1.6.4.3. ESPECIES SENSIBLES A DIOLES

Una última estrategia a tener en cuenta en el diseño de SDDS, es la habilidad de los ácidos borónicos de unirse a dioles biológicamente disponibles, como la glucosa o el ATP. Se ha demostrado que en tejidos tumorales hay una elevada concentración de ATP (>100 μM) con respecto a tejido sano (1-10 nM),[280] diferencia que puede ser utilizada para desarrollar nuevos sistemas de transporte de fármacos basados en AB. Gu et al. desarrollaron un SDDS basado en un derivado fluoro-arilborónico, que al interactuar con altas concentraciones de ATP dio lugar a especies solubles en medio acuoso, produciendo la liberación de un fármaco antitumoral y una etiqueta fluorescente, lo que permitió desarrollar un nuevo sistema teranóstico.[281]

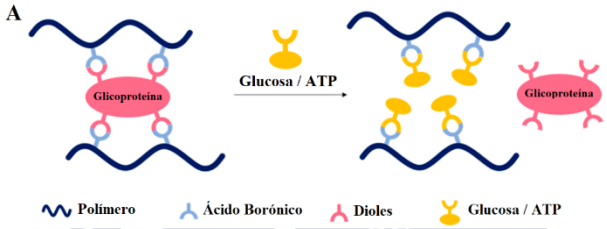


Figura 51. Estrategias sensibles a dioles. Imagen adaptada de la referencia 265.

[280] Okuro, K.; Sasaki, M.; Aida, T. *J. Am. Chem. Soc*. **2016**, *138*, 17, 5527-5530.
[281] Qian, C.; Chen, Y.; Zhu, S.; Yu, J.; Zhang, L.; Feng, P.; Tang, X.; Hu, Q.; Sun, W.; Lu, Y.; Xiao, X.; Shen, Q.-D.; Gu, Z. *Theranostics* **2016**, *6*, 7, 1053-1064.

OBJETIVOS



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

Cap. I: La síntesis y la funcionalización de una nueva familia de copolímeros de bloque lineal-dendrítico de tipo LD. La construcción de esta nueva familia de macromoléculas se realizará utilizando una metodología "*chain-first"* y mediante el uso de la química *click*, tanto para la síntesis del bloque dendrítico como para su posterior funcionalización. Asimismo, se realizará un estudio de las propiedades de autoensamblaje en disolución acuosa de los nuevos copolímeros sintetizados y su habilidad para encapsular fármacos antitumorales, con el objetivo de crear nuevos SDDS.

Cap. II: Estudiar la interacción entre ácidos borónicos tipo Wulff y diferentes dioles en disolución. Los conocimientos adquiridos sobre las afinidades y la estructura de los ésteres borónicos formados se utilizarán para estudiar la habilidad de un copolímero de bloque LD PEG-GATG para formar micelas ordenadas de tamaño nanométrico *via* unión covalente a doxorubicina, un fármaco antitumoral que contiene un diol en su estructura nativa. Se caracterizará este nuevo nanosistema y evaluará su internalización celular y perfil de citotoxicidad como un prototipo de SDDS de este tipo de micelas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I. Química Click Aplicada a la Síntesis y Funcionalización de una Nueva Familia de Copolímeros de Bloque L-D. Estudios de Agregación y Diseño de SDDS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS CAP. I

En este capítulo se describirá la síntesis y funcionalización de una nueva familia de copolímeros de bloque lineal-dendrítico de tipo LD hasta G5 (Esquema 8). Asimismo, se estudiarán sus propiedades de agregación y autoensamblaje en disolución acuosa para la creación de nuevos SDDS. En el diseño de esta nueva familia de copolímeros de bloque se han tenido en cuenta una serie de consideraciones.

En lo que respecta al bloque lineal se eligió una cadena de PEG de masa molecular media 5 kDa. Se escogió este polímero por dos razones fundamentales: i) La cadena lineal de PEG aportará al copolímero solubilidad acuosa, baja toxicidad e inmunogenicidad, que facilitarán su aplicación en el campo de los transportadores de fármacos *in vivo*. ii) Además, la cadena de PEG tiene una serie de características químicas, como su insolubilidad en éter etílico o hexano, que facilitarán las etapas de purificación de los productos.

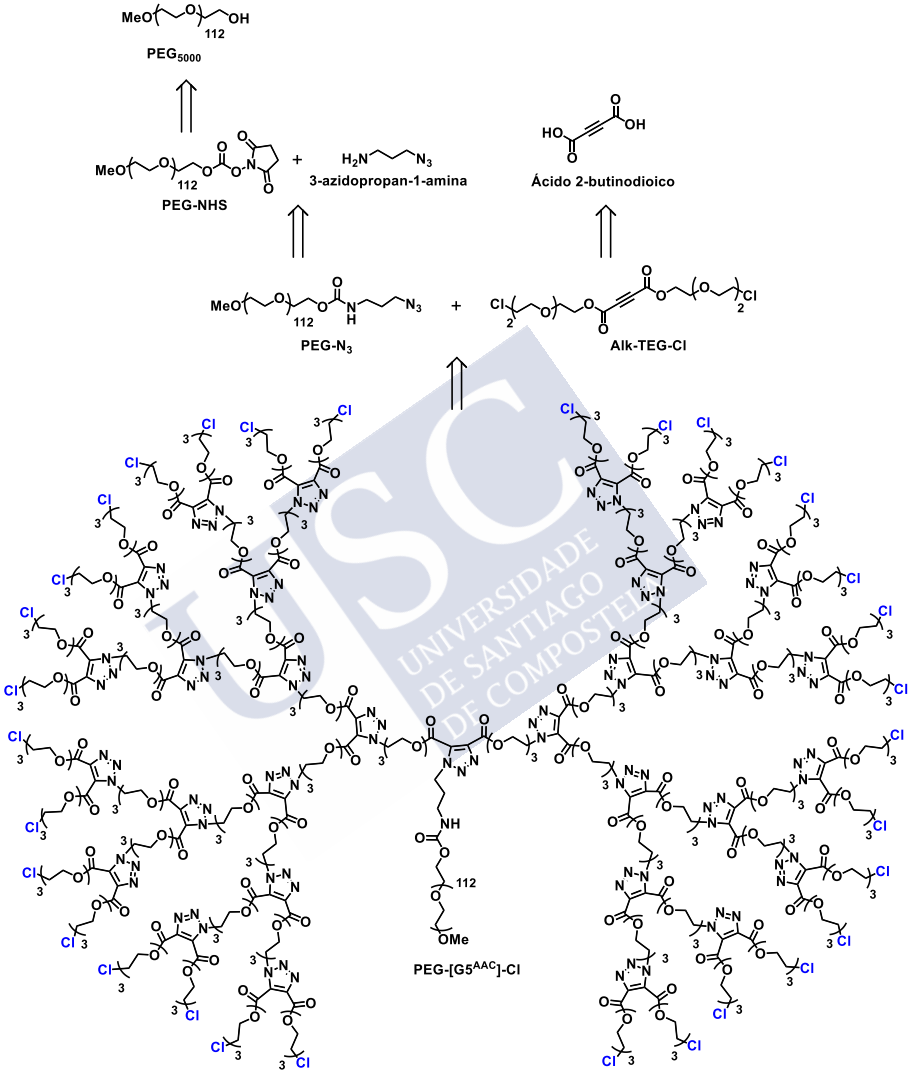
Para el diseño y síntesis del bloque dendrítico, se han utilizado los preceptos y metodología enmarcados dentro de la química *click*. Este tipo de reacciones permitirán llevar a cabo la síntesis de este bloque de una forma acelerada y con gran eficiencia. En concreto, para la síntesis del bloque dendrítico, se han utilizado reacciones tipo *metal-free* AAC entre azidas y unidades de repetición (UR) con alquinos activados mediante ésteres. Éstos conferirán al copolímero biodegradabilidad y sensibilidad al pH. Además, la presencia de cadenas de trietilenglicol en la UR, aportarán solubilidad en disolución acuosa y homogeneidad estructural a ambos bloques.

3.1. SÍNTESIS ACELERADA DEL COPOLÍMERO DE BLOQUE PEG-[G5^{AAC}]-Cl

3.1.1. Plan retrosintético

La síntesis del copolímero de bloque lineal-dendrítico de tipo LD PEG-[G5^{AAC}]-Cl se basó en una estrategia "*chain-first*". Como bloque lineal, se utilizó una cadena de PEG_{5000} comercial que se modificó para dar lugar al derivado PEG-N_3, con un grupo azida en uno de sus extremos, que serviría como punto focal para el crecimiento del bloque dendrítico. La unidad de repetición Alk-TEG-Cl se sintetizaría a partir del ácido 2-butinodioico comercial a través de una esterificación tipo Fischer. Mediante un proceso

iterativo de etapas de crecimiento y activación se sintetizarían cinco generaciones dendríticas del copolímero de bloque.



Esquema 8. Análisis retrosintético del PEG-[G5^{AAC}]-Cl.

3.1.2. Síntesis PEG-N_3

En una primera etapa de la síntesis, se realizó una modificación estructural sobre la cadena de PEG_{5000} comercial que permitiese funcionalizar uno de sus extremos con un grupo azida, el cual serviría como punto focal para el posterior crecimiento divergente del bloque dendrítico.

Para obtener PEG-N_3 se llevó a cabo, en primer lugar, la síntesis de 3-azidopropan-1-amina, un *linker* que posee un grupo amino, que se utilizaría para realizar un acoplamiento con la cadena de PEG, y una azida sobre la que se construiría el dendrón. La síntesis de este *linker* se realizó siguiendo un procedimiento descrito en bibliografía,[282] por tratamiento de 3-cloropropilamina comercial con azida sódica en agua, obteniendose el compuesto 3-azidopropan-1-amina en un elevado rendimiento (85%).

Antes de acoplar este *linker* con el PEG, fue necesario realizar una activación sobre el extremo hidroxilo del producto comercial. En este paso se siguió el procedimiento experimental descrito por nuestro grupo,[208b] realizando un tratamiento del PEG_{5000} con DSC en presencia de piridina, para dar lugar al carbonato activo PEG-NHS en un 92% de rendimiento.

Posteriormente, se realizó el acoplamiento entre el carbonato activo PEG-NHS y 3-azidopropan-1-amina para dar lugar al bloque lineal PEG-N_3. En el espectro de ^{1}H RMN se pueden observar los protones H3 y H5 a δ: 4.22 y 3.27 ppm respectivamente, situados en alfa a el grupo carbamato recién formado (Figura 52). Asimismo, también se pueden apreciar los protones H7 en alfa al grupo azida como un triplete situado a 3.37 ppm, señal que aparece solapada con los protones H1 del grupo -OMe.

[282] Carboni, B.; Benalil, A.; Vaultier, M. *J. Org. Chem*. **1993**, *58*, 14, 3736-3741.

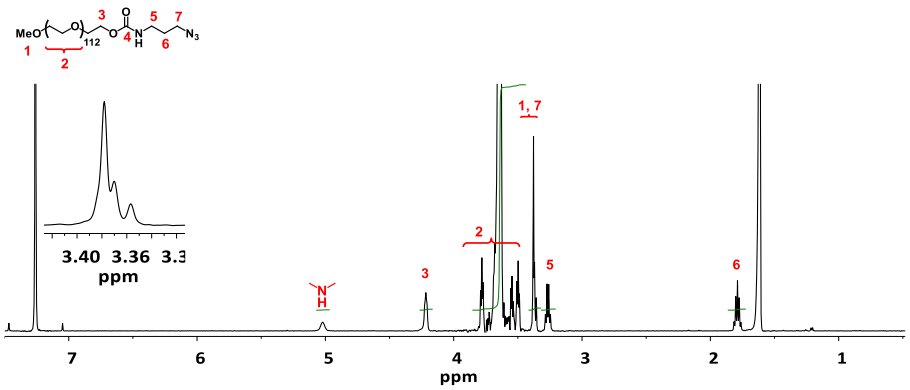


Figura 52. *^{1}H-RMN de PEG-N_3 ($CDCl_3$).*

3.1.3. Síntesis del bloque dendrítico

La construcción del bloque dendrítico se llevó a cabo mediante una síntesis divergente, siguiendo los principios de la química *click y* evitando el uso de catalizadores metálicos, elemento que podría limitar sus aplicaciones *in vivo*.

La utilización de alquinos activados substituye al uso de catalizadores metálicos, siendo la alternativa más eficiente para poder realizar cicloadiciones 1,3 dipolares AAC. El empleo de esta metodología para la síntesis y funcionalización de dendrímeros fue descrita por primera vez en 2010.[283] Sin embargo, el proceso sintético descrito en estas primeras publicaciones dista mucho de poder considerarse un proceso click, debido a sus largos tiempos de reacción (24 h para reacciones AAC de crecimiento y hasta 5 días para funcionalizaciones CuAAC). Nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente un conjunto de condiciones experimentales para reacciones *Metal-free* AAC que, combinado con el uso de radiación microondas, permiten la preparación de dendrímeros en cortos tiempos de síntesis, con etapas de crecimiento y activación, de tan sólo 40 y 2 minutos, respectivamente (Figura 53). Mediante este proceso se ha descrito la síntesis de cinco generaciones dendríticas en una única jornada laboral.[108]

[283] **(a)** Heyl, D.; Rikowski, E.; Hoffmann, R. C.; Schneider, J. J.; Fessner, W.-D. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 5544–5548; **(b)** Gonzaga, F.; Sadowski, L. P.; Rambarran, T.; Grande, J.; Adronov, A.; Brook, M. A. *J. Polym. Sci. Part. A: Polym. Chem.* **2013**, *51*, 1272–1277; **(c)** Arseneault, M.; Levesque, I.; Morin, J.-F. **2012**, *45*, 3687–3694.

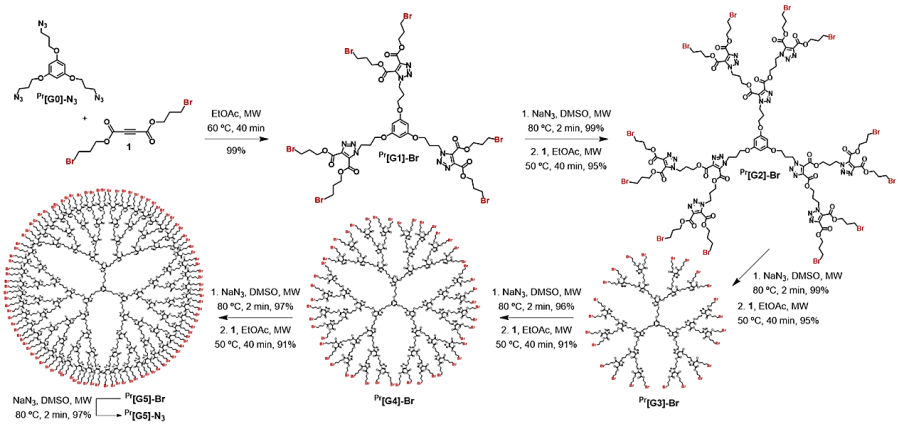


Figura 53. Síntesis de ^{Pr}[G5]-N_3.

Para la construcción del bloque dendrítico se utilizó el alquino activado Alk-TEG-Cl, sintetizado a través de una esterificación tipo Fischer [284] a partir del ácido 2-butinodioico comercial, siguiendo el procedimiento experimental descrito en nuestro grupo de investigación.[108] Esta unidad de repetición tiene la ventaja de tener un alquino conjugado a dos grupos atractores de electrones, que lo convierten en una especie muy reactiva. Además, es una molécula simétrica, lo que evitará problemas de regioselectivdad en las reacciones AAC, y está constituido por grupos ésteres, que facilitarán su biodegradabilidad en aplicaciones *in vivo*. Este tipo de esterificaciones permitirá la obtención de numerosos alquinos activados a gran escala, con H_2O como principal subproducto de la reacción.

Una vez sintetizada la unidad de repetición Alk-TEG-Cl y el bloque lineal PEG-N_3, se explotó la azida terminal como punto focal para el crecimiento de las sucesivas generaciones dendríticas. Dicho proceso se realizó a través de dos etapas diferenciadas, crecimiento AAC y activación, que se fueron alternando de forma iterativa durante el proceso sintético. La etapa de activación involucra una sustitución nucleófila de los grupos cloruro terminales de las generaciones dendríticas recién formadas por grupos azida, que participan posteriormente en una nueva etapa de crecimiento.

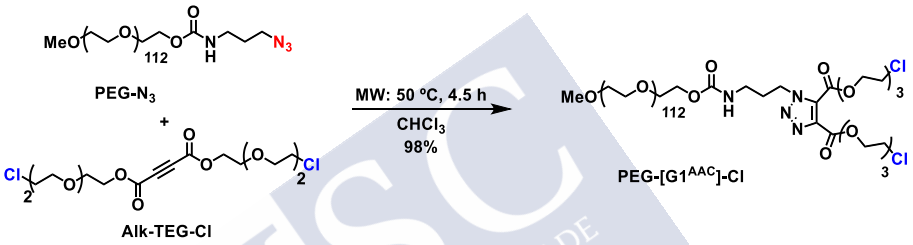
El avance de las reacciones AAC se siguió mediante espectroscopía de IR, gracias a la intensa banda de azida a 2100 cm^{-1}. Para las reacciones de

[284] Fischer, E.; Speier, A. *Chem. Ber*. **1895**, *25*, 3252-3258.

activación se utilizó la espectroscopía de ^{1}H RMN, integrando las señales situadas entre δ: 3.42 y 3.31 ppm, correspondientes a las señales de los protones situados en α a los grupos azida y la señal del -OMe terminal de la cadena de PEG.

Etapa crecimiento

El crecimiento de la primera generación del copolímero de bloque se llevó a cabo mediante una reacción de cicloadición [3+2] entre la azida terminal de PEG-N_3 y el alquino activado de la unidad de repetición. Este proceso se realizó aportando energía al sistema mediante radiación microondas, observándose una conversión completa tras 4.5 h de reacción.



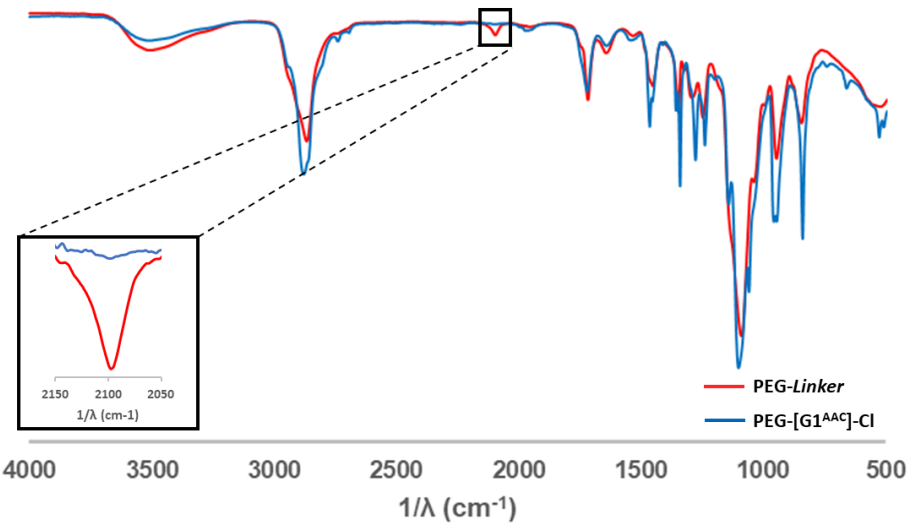
Esquema 9. Síntesis de PEG-[G1^{AAC}]-Cl.

Para este proceso se han necesitado tiempos de reacción más largos que para los dendrímeros (no PEGuilados) previamente descritos por nuestro grupo de investigación siguiendo la misma metodología AAC. Esto es debido principalmente a dos factores. Para mantener una solubilidad óptima tanto de productos como reactivos, en las reacciones de crecimiento de los copolímeros de bloque se ha tenido que aplicar un factor de dilución de 20 respecto a los dendrímeros, pasando de realizar las reacciones de crecimiento de una concentración 2 M por grupo azida, a 0.1 M en el copolímero de bloque. Otro factor fundamental fue mantener condiciones suaves de reacción durante el proceso de crecimiento. Los dendrímeros se prepararon a una temperatura de 60 ºC con 100 W de potencia de radiación microondas. Aplicando estas condiciones sobre el copolímero de bloque se ha observado la descomposición de los productos. Esto puede ser debido a la naturaleza higroscópica de la cadena de PEG, ya que una mayor presencia de agua en el medio de reacción puede dar lugar a procesos de hidrólisis de los grupos éster. Para solucionar estos problemas se optó por disminuir la temperatura de reacción a 50 ºC y utilizar una menor potencia de 50 W. Las nuevas condiciones de reacción, junto con una simple etapa de purificación por precipitación selectiva en éter

dietílico, dieron lugar a la obtención de la primera generación dendrítica PEG-[G1^{AAC}]-Cl en un 98% de rendimiento.

Tanto en los procesos de crecimiento como en los de activación, fue necesario un seguimiento para determinar el completo avance de estas reacciones. Esto constituye una fase fundamental del proceso, debido a que una reacción incompleta daría lugar a errores estructurales irreversibles del bloque dendrítico.

Como se ha comentado anteriormente, las reacciones de crecimiento se monitorizaron a través de espectroscopía de IR. Se utilizó esta técnica debido a su sencillez, ya que el grupo azida presenta una banda muy característica y fácil de identificar, situada a 2100 cm^{-1}. Durante el proceso de síntesis se determinará el avance completo de reacción observándose una desaparición completa de esta banda.

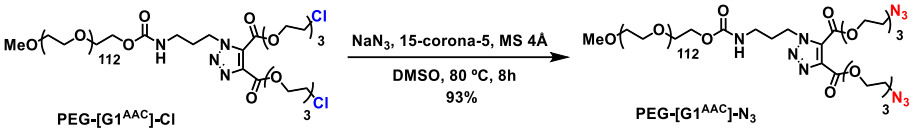


Esquema 10. Seguimiento de la síntesis de PEG-[G1^{AAC}]-Cl mediante IR.

Etapa activación

Una vez sintetizada la primera generación dendrítica, se llevó a cabo una etapa de activación, en la cual se sustituyeron los grupos cloruro de la generación recién formada por grupos azida, que intervendrían en la posterior etapa de crecimiento. PEG-[G1^{AAC}]-Cl se trató con NaN_3 en DMSO a 80 ºC, en presencia del éter 15-corona-5 para acelerar la reacción. Tras una simple etapa

de purificación mediante elaboración acuosa y una posterior precipitación selectiva en éter dietílico, se obtuvo el producto PEG-[G1^{AAC}]-N_3 en un 93 % de rendimiento.



Esquema 11. Síntesis de PEG-[G1^{AAC}]-N_3.

Se observó que las etapas de activación en presencia de microondas eran incluso más susceptibles a los procesos de hidrólisis que las etapas de crecimiento, lo que impidió su uso en este tipo de reacciones. Se optó por utilizar calentamiento convencional y llevar a cabo estos procesos en condiciones anhidras, llevando a cabo la reacción en atmósfera inerte y agitando tamices moleculares en el seno de la reacción durante 4 h antes de proceder al calentamiento de la reacción.

Las etapas de activación se siguieron mediante espectroscopía de ^{1}H RMN, determinándose el grado de sustitución por integración de las señales situadas entre δ: 3.42 y 3.31 ppm, correspondiente al sumatorio de los protones H1 del -OMe terminal de la cadena de PEG y los protones H8 situados en alfa a los grupos azida recién incorporados.

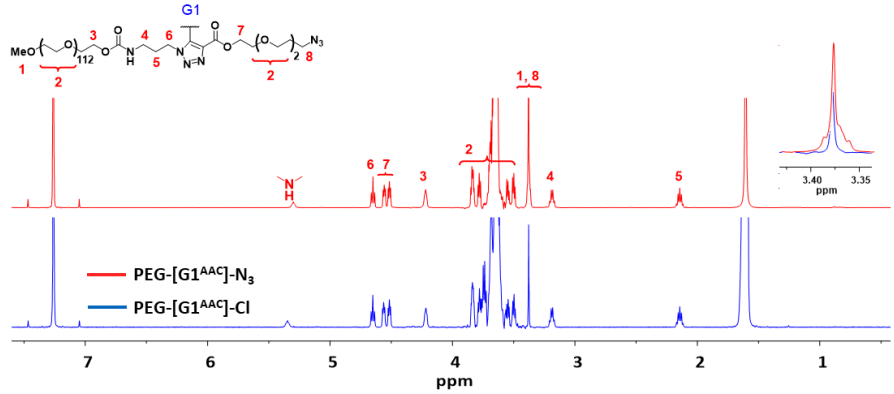


Figura 54. Seguimiento de reacción de PEG-[G1^{AAC}]-N_3 mediante ^{1}H-RMN.

Crecimiento del bloque dendrítico

Aplicando estas estas dos etapas de forma iterativa en la síntesis y activación de cada generación dendrítica, se lograron sintetizar cinco generaciones de un copolímero de bloque tipo L-D siguiendo los preceptos de la química *click*.

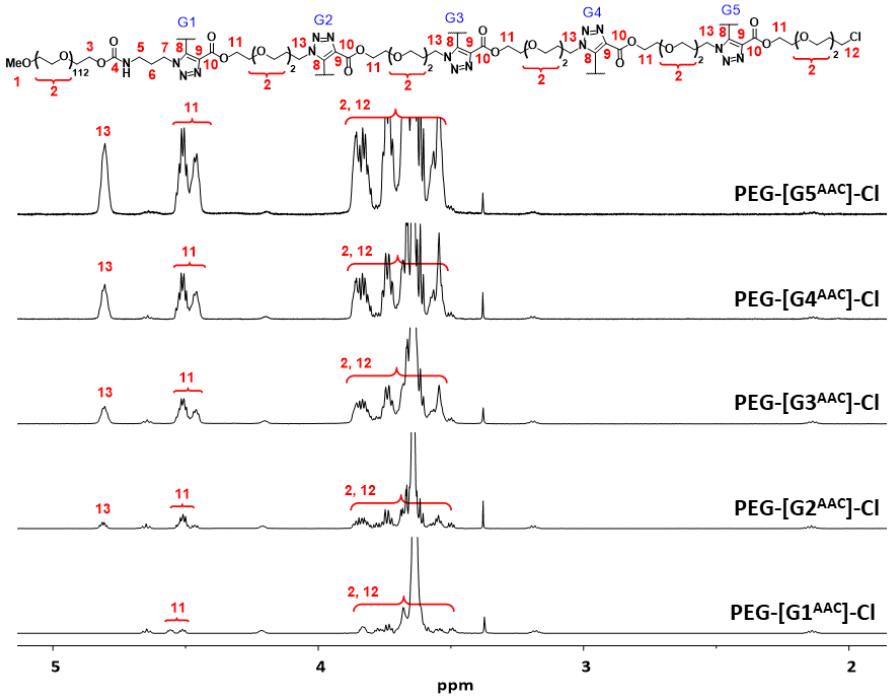
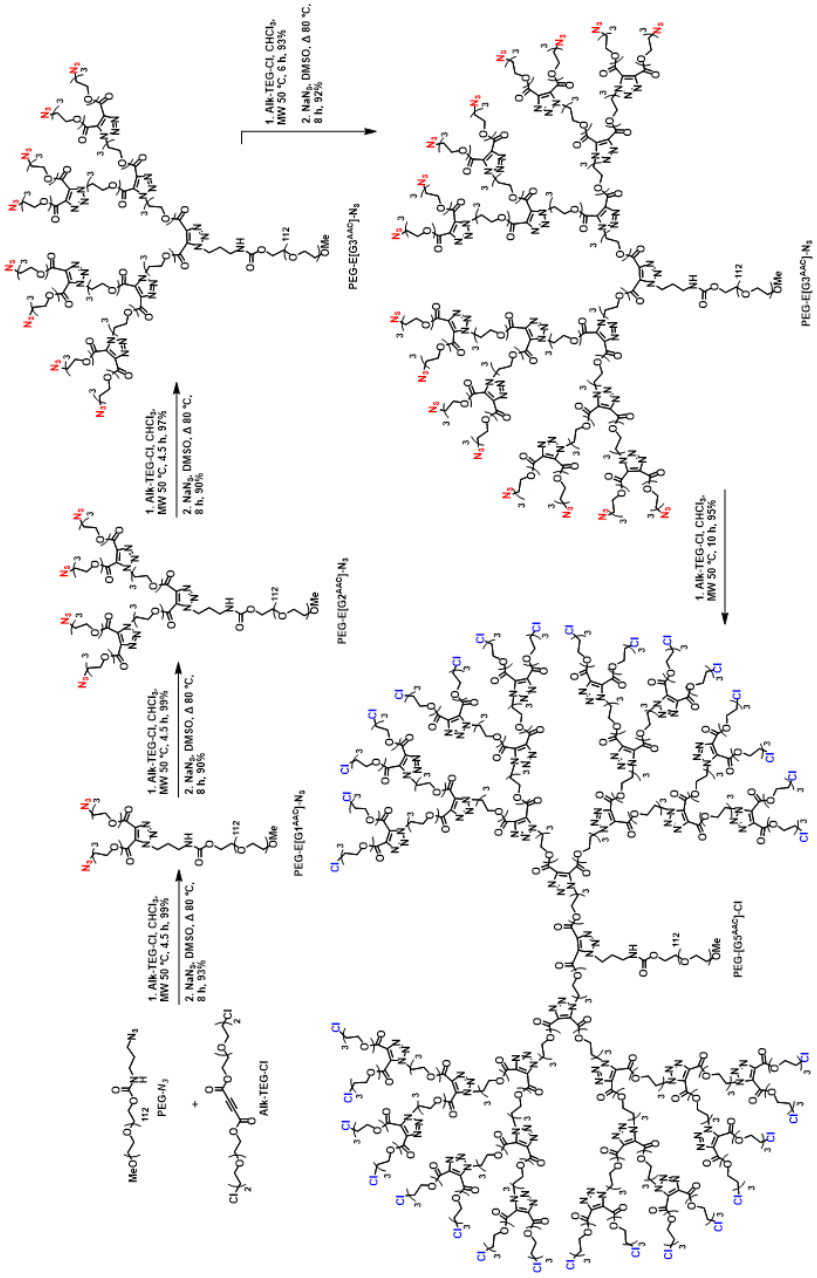


Figura 55. Superposición de los espectros de ^{1}H RMN de los compuestos PEG-[Gn^{AAC}]-Cl.

Como se observa en la superposición de espectros, a medida que va creciendo el bloque dendrítico las señales de los protones H11, situados en alfa a los grupos éster, y los protones H13, situados en alfa a los grupos triazol derivados de la reacción de cicloadición, van incrementando su intensidad de forma proporcional a la generación dendrítica.

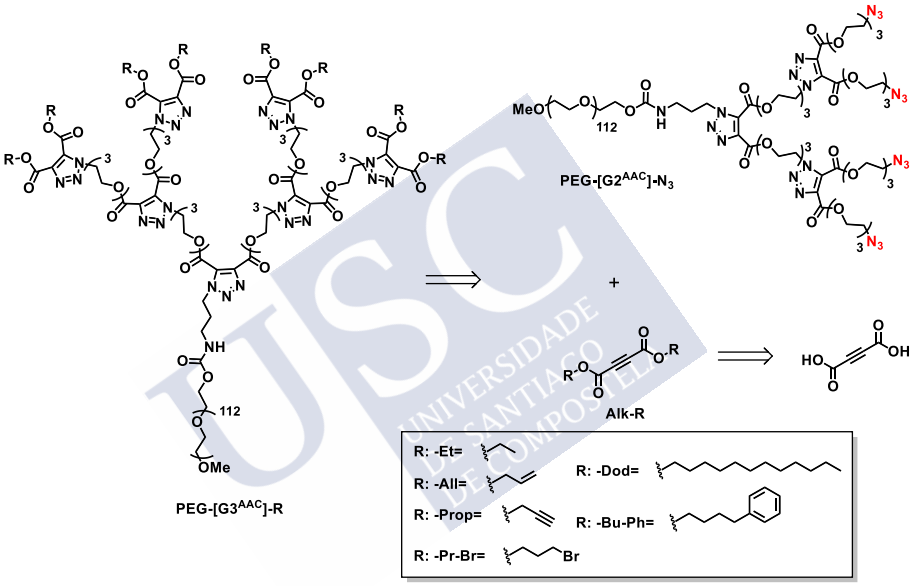


Esquema 12. Síntesis de las cinco generaciones dendríticas.

3.2. FUNCIONALIZACIONES AAC

3.2.1. Plan retrosintético

La utilidad de la reacción AAC para la funcionalización de la superficie del bloque dendrítico de los copolímeros PEG-[Gn^{AAC}]-N_3 se probó con el G2 y seis diferentes alquinos activados mostrados en el Esquema 13, que fueron sintetizados mediante esterificación de Fischer a partir del ácido 2-butinodioico y otros tantos alcoholes comerciales.



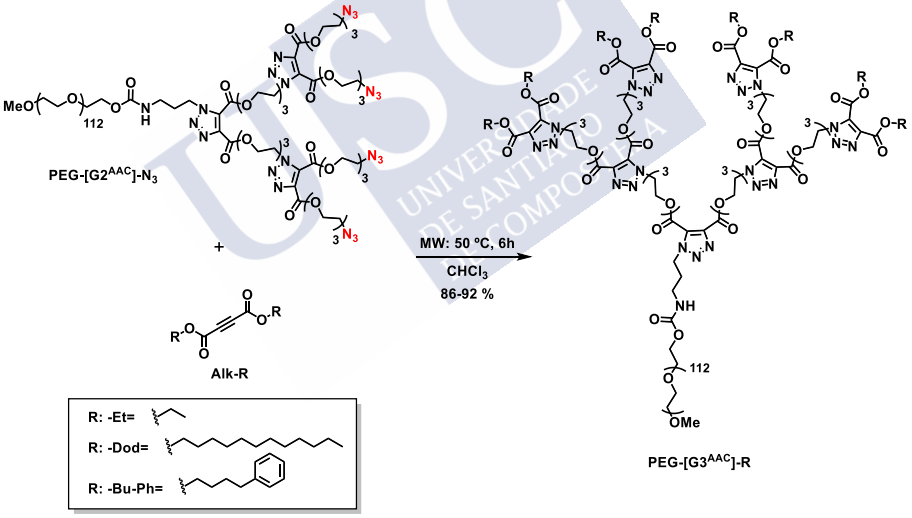
Esquema 13. Análisis retrosintético de las funcionalizaciones AAC de PEG-[$G2^{AAC}$]-N_3.

3.2.2. Funcionalización de PEG-[$G2^{AAC}$]-N3 con Alk-Et / Alk-(Dod) y Alk-Bu-Ph

Dentro de estos seis alquinos activados, los derivados Alk-Et, Alk-Dod y Alk-Bu-Ph incorporan grupos hidrofóbicos que tras AAC sobre el bloque dendrítico serán evaluados en la formación de micelas con potencial aplicación como DDS. Por otro lado, los reactivos Alk-All, Alk-Prop y Alk-Pr-Br se consideran unidades de pre-funcionalización, ya que permitirán realizar modificaciones químicas *a posteriori* sobre los copolímeros de bloque (post-funcionalización).

Para la síntesis de Alk-Dod [285] y Alk-Bu-Ph,[108] se siguieron procedimientos experimentales descritos en bibliografía, mientras que la unidad Alk-Et se usó como producto comercial.

La simplicidad de estas funcionalizaciones radica en que se utiliza la misma metodología que para construir el bloque dendrítico, por lo que requirieron de una optimización mínima de las condiciones de reacción. La conversión completa de las reacciones AAC entre PEG-[$G2^{AAC}$]-N_3 y estas unidades de funcionalización requirió tiempos ligeramente superiores (6 h) en comparación con las reacciones de síntesis del bloque dendrítico (4.5 h). Este hecho puede ser debido a la naturaleza alquílica de los sustituyentes de los grupos éster, que producirán una menor activación sobre el alquino central. Así, se espera que los grupos etilenglicol (-O-CH_2-CH_2) ejerzan una mayor activación de la unidad de repetición por efecto inductivo. Las condiciones optimizadas de reacción permitieron a la obtención de los productos esperados en elevados rendimientos tras purificación por precipitación (86-92%).



Esquema 14. Funcionalización de PEG-[$G2^{AAC}$]-N_3 con Alk-Et, Alk-Prop y Alk-Bu-Ph.

La monitorización de estas reacciones se realizó mediante espectroscopía de IR (Figura 56), de forma análoga a las reacciones del bloque dendrítico, observándose la desaparición completa de la banda de azida del PEG-[$G3^{AAC}$]-

[285] Forrest, W. P.; Wis, J. G.; John, J. M.; Axtell, J. C.; Simpson, J. H.; Swager, T. M.; Schrock, R. R. *J. Am. Chem. Soc*. **2014**, *136*, 31, 10910-10913.

N_3 en los tres ejemplos y un aumento considerable de la banda del carbonilo de los ésteres.

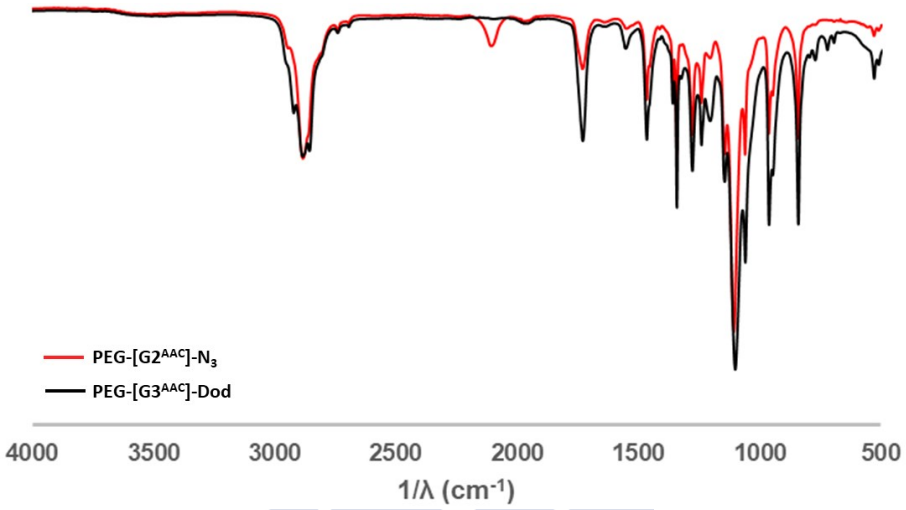
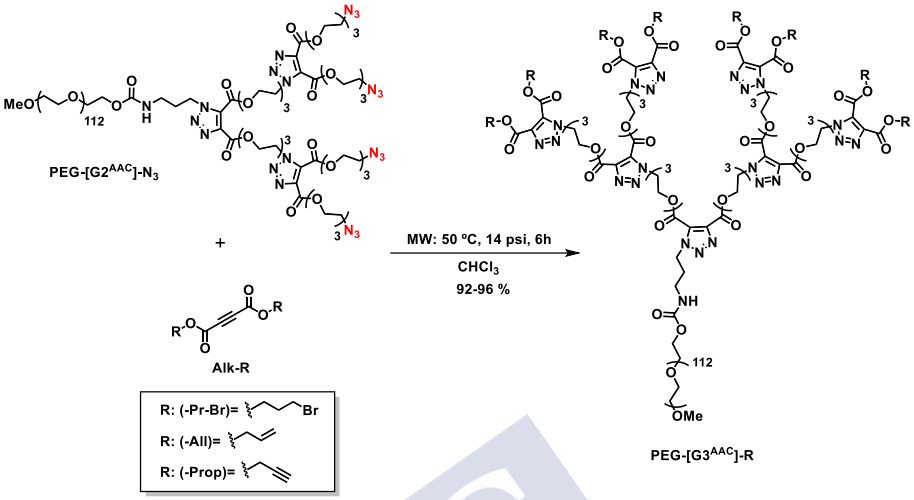


Figura 56. Seguimiento de la funcionalización del PEG-[G2^{AAC}]-N_3 con Alk-Dod mediante IR.

3.2.3. Pre-Funcionalización de PEG-[G2^{AAC}]-N_3 con Alk-All, Alk-Prop y Alk-Pr-Br

Para la síntesis de las tres unidades de pre-funcionalización Alk-Pr-Br,[108] Alk-Prop y Alk-All [286] se siguieron procedimientos experimentales descritos en bibliografía. Las reacciones AAC con estas unidades se llevaron a cabo utilizando las mismas condiciones experimentales que para las unidades de funcionalización, observándose cinéticas similares y conversiones completas tras 6 h de reacción (Esquema 15). Asimismo, los productos se obtuvieron con rendimientos elevados tras sencillas purificaciones por precipitación (92-96%).

[286] Zhang, W.; Sprakfe, J. K.; Ma, M.; Tsui, E. Y.; Sydlik, S. A.; Rutledge, G. C.; Swager, T. M. *J. Am. Chem. Soc*. **2009**, *131*, 24, 8446-8454.



Esquema 15. Pre-funcionalización de PEG-[G2^{AAC}]-N$_3$ con Alk-Pr-Br, Al-All y Alk-Prop.

El seguimiento de estas reacciones también se realizó mediante espectroscopía de IR, con la excepción del compuesto PEG-[G3^{AAC}]-Prop. En este producto se observa una pequeña banda situada a 2130 cm^{-1}, correspondiente con la banda de tensión (–C≡C–) típica de alquinos terminales asimétricos (Figura 57). Para el seguimiento de esta reacción se optó por utilizar espectroscopía de ^{1}H RMN. El avance completo de esta reacción se determinó por disminución de la integración de la señal situada a δ: 3.37 ppm, correspondiente al -OMe terminal de la cadena de PEG y los protones en alfa a los grupos azida en PEG-[G3^{AAC}]-Prop (Figura 58).

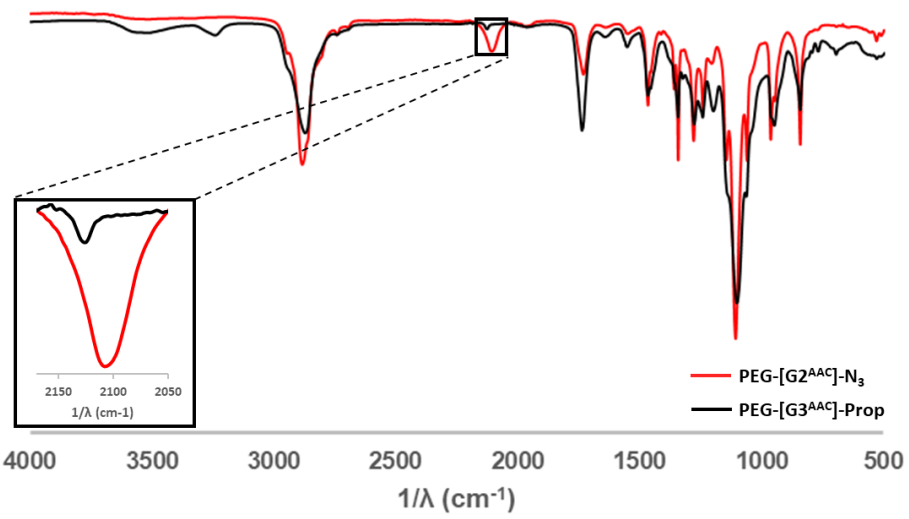


Figura 57. Seguimiento la Pre-Funcionalización del PEG-[G2^{AAC}]-N_3 con Alk-Prop mediante IR.

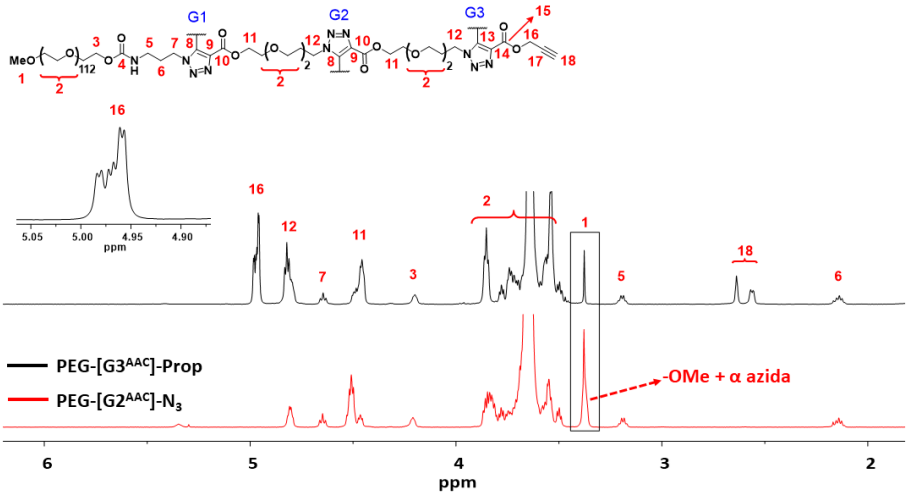


Figura 58. Seguimiento de la preparación de PEG[G3^{AAC}]-Prop mediante 1H RMN ($CDCl_3$).

Es importante destacar que el copolímero de bloque no es una estructura simétrica, ya que los diferentes puntos de ramificación del copolímero se basan en anillos de 1,2,3-triazol. Esto deriva en un desdoblamiento de señales,

que se ve reflejado en la mayoría de los espectros de ^{1}H RMN y ^{13}C RMN de todos los copolímeros de bloque sintetizados mediante AAC (ver parte experimental). Este efecto es especialmente significativo en el copolímero PEG-[G3^{AAC}]-Prop. Como se puede ver en el espectro, los protones H16 y H18 se desdoblan en varias señales, como resultado de esta asimetría estructural.

Este desdoblamiento de señales se puede observar también en el espectro de ^{13}C RMN, por ejemplo, en los carbonos C16. Debido a que un carbono C16 está unido a un sistema C17/C18, si hay dos carbonos C16 se esperarían dos sistemas C17/C18 diferentes, con un total de cuatro señales, tal y como puede verse en el espectro de ^{13}C RMN. Asimismo, también puede observarse que las señales de los carbonos de los alquinos aparecen desdobladas, esto puede ser debido a que, en combinación con la asimetría de la molécula, los ésteres funcionalizados con alquinos son grupos rígidos con una movilidad reducida en disolución, pudiendo dar lugar a confórmeros y dificultando aún más su análisis.

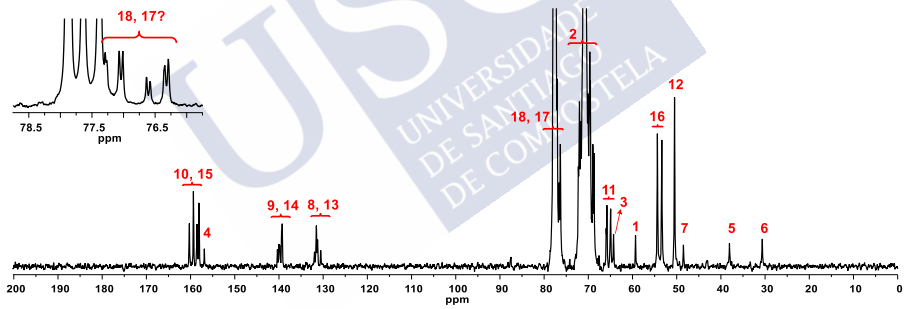


Figura 59. ^{13}C-RMN de PEG[G3^{AAC}]-Prop ($CDCl_3$).

Para poder realizar la asignación de señales, al tratarse de un alquino terminal, se optó por realizar un HSQC. Mediante este experimento se pueden distinguir claramente los grupos (-CH), los cuales presentarán una correlación con el espectro de ^{1}H RMN, de los carbonos cuaternarios. Mediante un simple análisis del espectro de HSQC se pueden discernir claramente los carbonos terminales del alquino (C18) de los carbonos cuaternarios (C17), los cuales no presentan ninguna correlación con el espectro de ^{1}H RMN.

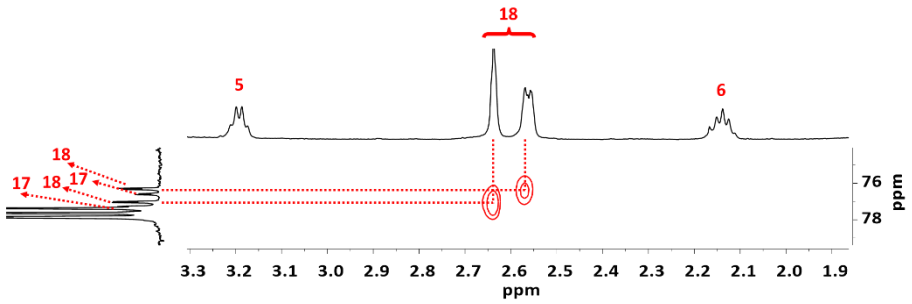


Figura 60. HSQC de PEG[G3^{AAC}]-Prop ($CDCl_3$).

3.3. POST-FUNCIONALIZACIÓN

La síntesis de alquinos activados para la funcionalización de estos copolímeros de bloque mediante estrategias *metal-free* AAC generalmente son procesos simples en los cuales se pueden obtener gramos de estos compuestos mediante esterificación de Fischer.

Sin embargo, en ocasiones la preparación de los ésteres derivados del ácido 2-butinodioico se vuelve complicada, ya que el alquino central es muy reactivo, sufriendo ataques incluso por parte de nucleófilos débiles como fenoles.[287] Este hecho limita mucho el tipo de ésteres que se pueden sintetizar, restringiendo las cadenas de los alcoholes a estructuras que no contengan grupos nucleófilos. A pesar de que estos grupos se podrían modificar con diferentes grupos protectores, esto implicaría etapas de protección/desprotección, o reacciones bajo condiciones demasiado agresivas para la síntesis de estos alquinos activados,[288] violando los preceptos de la química *click* usada en la síntesis de estos copolímeros de bloque.

Para la incorporación de grupos funcionales complejo sobre el bloque dendrítico se aprovechó la reactividad de las unidades de pre-funcionalización Alk-All y Alk-Prop. La introducción de estas estructuras permitió decorar la macromolécula con grupos de diversa naturaleza (polioles y ácidos carboxílicos) mediante química *click*, como reacciones tipo TEC y TYC.[289]

---

[287] Winterfeldt. E. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **1967**, *6*, 423-434.
[288] Charlton, J.; Chee, G.; *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 34, 6243-6246.
[289] Ramapanicker, R.; Chauhan, P. (**2016**). Click Chemistry: Mechanistic and Synthetic Perspectives en *Click Rreactions in Organic Synthesis*, First Edition. Editado por Srinivasan Chandrasekaran. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

3.3.1. Post-Funcionalización TEC sobre el PEG-[G3^{AAC}]-All

La introducción de polioles en macromoléculas puede tener aplicaciones muy interesantes en el campo de las enfermedades infecciosas.[290] Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la utilización de dendrímeros funcionalizados con polioles puede tener un efecto germinicida sobre diferentes colonias bacterianas.[291] No obstante, la metodología empleada en la funcionalización de estas estructuras dendríticas se basa en reacciones *metal-free* ACC en las que se usan alquinos activados mediante carbamatos, los cuales necesitan tediosas etapas de síntesis y condiciones de reacción en las que se emplean elevadas temperaturas de hasta 120 ºC (Figura 61).[292] La aplicación de estas condiciones de reacción sobre el copolímero de bloque PEG-[Gn^{AAC}]-N_3, podrían hidrolizar los ésteres de la estructura dendrítica. Alternativamente, la incorporación de azúcares desprotegidos mediante CuAAC también fue descrita por nuestro grupo, pero conlleva el uso de catálisis de Cu que ahora pretendemos evitar.[206] [208]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

[290] Whiteley, M.; Diggle, S. P.; Greenberg, E. P. *Nature* **2017**, *551*, 7680, 313-320.

[291] Leire, E. (**2016**). Multifunctional Dendrimers for Antibacgerial Applications, (Tesis Doctoral Publicada). University of Nottingham, Nottingham, England.

[292] Tawara, M. H. (**2019**). Thermal Azide-Alkyne Cycloaddition (TAAC) as Efficient Clicked Chemistry Tool for the Functionalization of Dendrimers and Polymers, (Tesis Doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

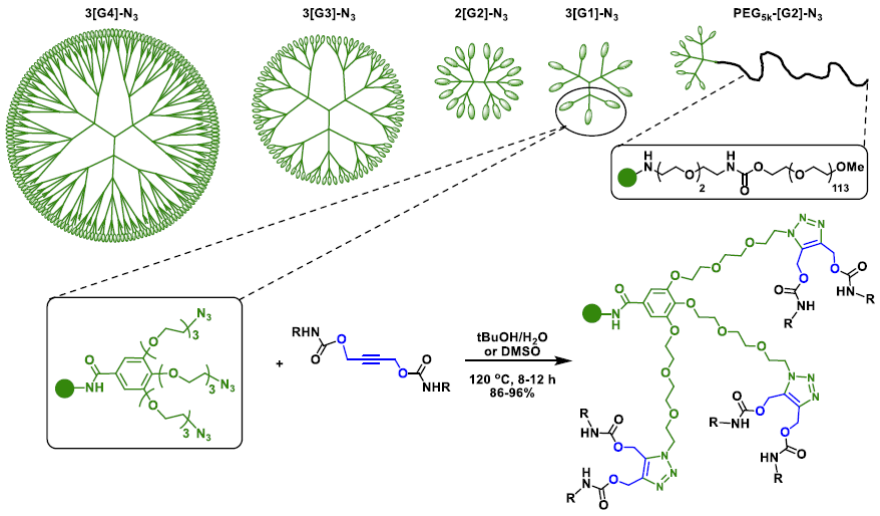
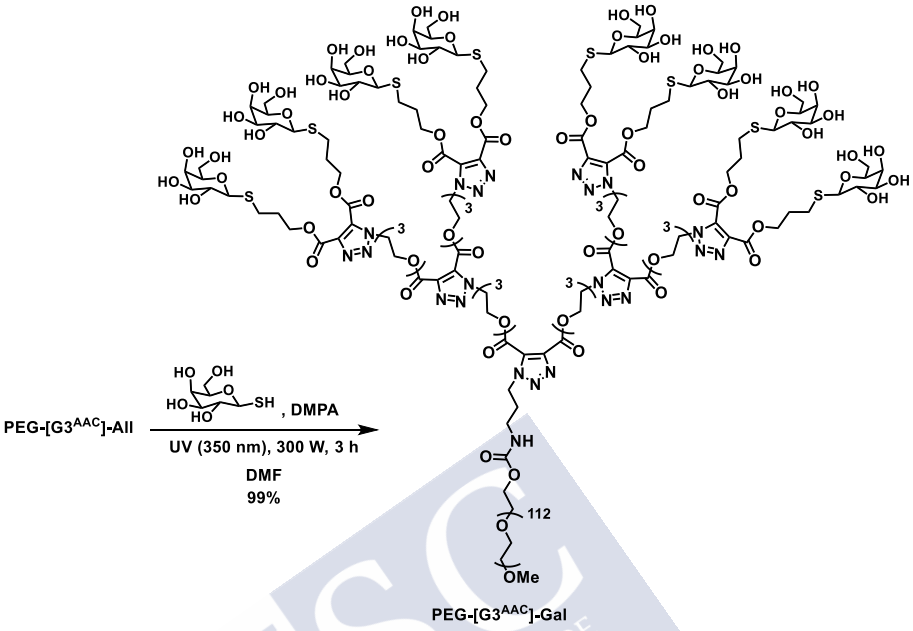


Figura 61. Estrategia de funcionalización de dendrímeros mediante AAC basada en carbamatos.

Las reacciones TEC y TYC son grandes candidatas para la funcionalización de dendrímeros, ya que permiten el empleo directo de multitud de tioles comercialmente disponibles, a través de sencillas reacciones catalizadas fotoquímicamente que tienen lugar a temperatura ambiente. La glicosilación de dendrímeros mediante la utilización de reacciones TEC fue descrita satisfactoriamente por Hawker et al.[91b] para la funcionalización de 48 grupos alqueno en un dendrímero con tioles derivados de glucosa, manosa y lactosa mediante reacciones fotocatalizadas con DMPA en 1h.

Para ilustrar la utilidad de la TEC y la presencia de grupos alqueno en la funcionalización de los copolímeros LD preparados en las secciones anteriores, se seleccionaron PEG-[G3^{AAC}]-All y el tiol comercial 1-tio-β-D-galactosa (Esquema 16). Mediante el uso de un exceso de tiol de 3 eq por grupo alqueno y cantidades catalíticas del iniciador (0.1 eq por grupo alqueno) se obtuvo el producto de reacción esperado en un 99% tras 3 h de reacción bajo irradiación de luz UV (350 nm).



Esquema 16. Post-Funcionalización TEC con 1-tio-β-D-galactosa de PEG-[G3]-All.

El seguimiento de esta reacción se realizó mediante espectroscopía de ^{1}H RMN (Figura 62), observándose la desaparición de las señales características de los grupos alqueno situadas entre δ: 6 y 5.24 ppm.

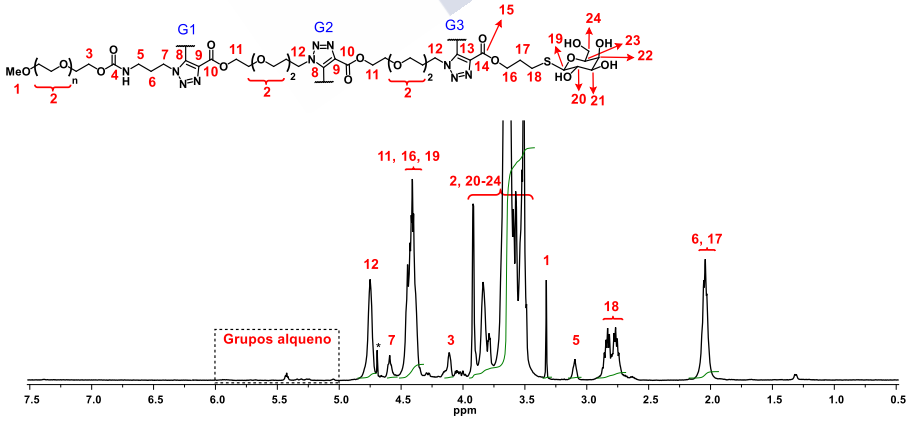


Figura 62. Seguimiento de la síntesis de PEG-[G3^{AAC}]-Gal mediante ^{1}H RMN (MeOD).

Los valores de las integrales en el espectro de ^{1}H RMN presentan los valores de integración esperados para esta especie. En el espectro del producto se observa una particularidad. A un desplazamiento de δ: 5.42 ppm aparece una pequeña señal, la cual, mediante un análisis del espectro de HSQC (Figura 63), reveló una correlación con el carbono anomérico del anillo de galactosa. Este desplazamiento tiene un valor muy similar al protón anomérico descrito para el azúcar α-D-galactosa (δ: 5.22 ppm) y que ya se observa en el tiol comercial.[293] Por lo tanto, aproximadamente un 5% de los copolímeros de bloque presenten grupos de α-D-galactosa. Este fenómeno también puede observarse en los dendrímeros funcionalizados con glucosas realizados por Hawker. [91b]

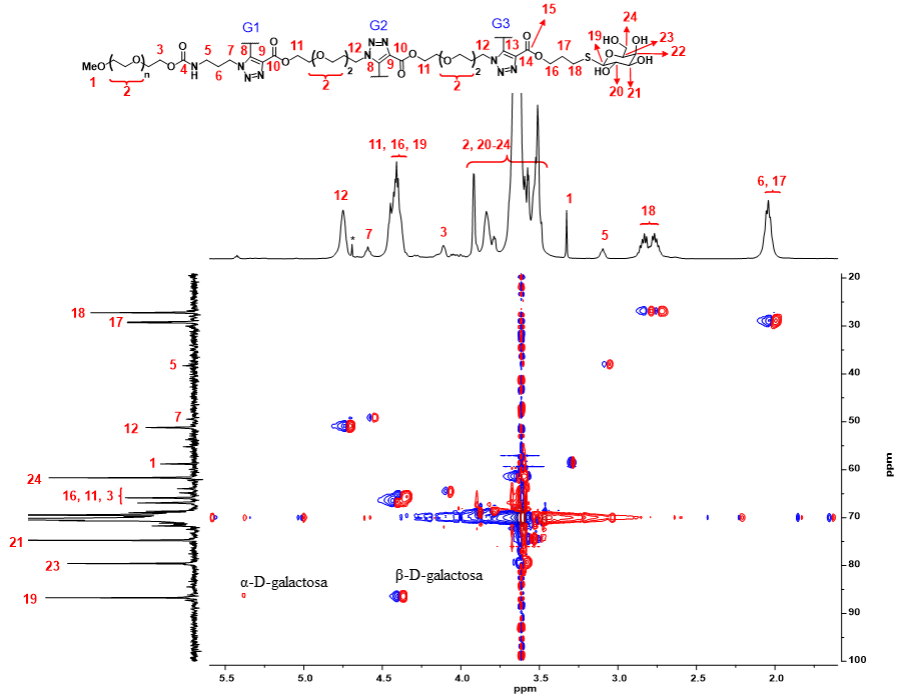


Figura 63. HSQC del PEG-[G3^{AAC}]-Gal.

[293] Agrawal, P. K. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 10, 3307-3330.

Por último, se comprobó la solubilidad del producto PEG-[G3AAC]-Gal en medio acuoso. Mediante medidas de DLS, se observó una población de polímero por debajo de 10 nm, indicativo de que este producto no forma agregados y está completamente disuelto en medio acuoso, requisito imprescindible para sus posibles aplicaciones *in vitro.*

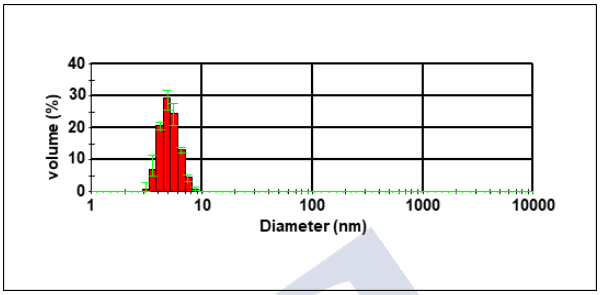


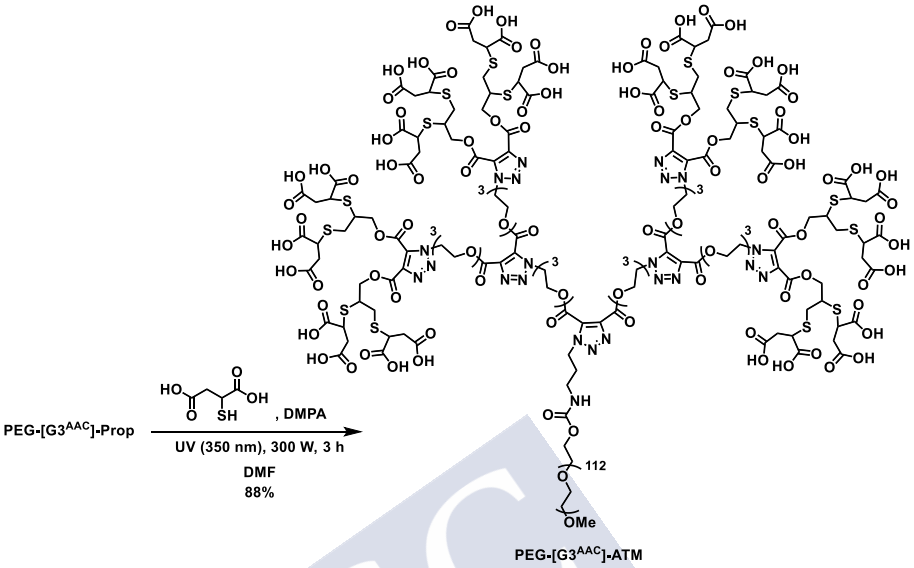
Figura 64. Histograma de DLS de las micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Gal a 1mg/mL en D_2O

3.3.2. Post-Funcionalización TYC de PEG-[G3^{AAC}]-Prop

Los dendrímeros y copolímeros de bloque funcionalizados con ácidos carboxílicos son sistemas muy versátiles a la hora de crear SDDS.[294] También pueden actuar como plataforma para la creación de micelas PIC,[295] o actuar como puntos de anclaje para fármacos mediante interacciones electroestáticas,[296] o enlaces tipo éster o amida.[297]

Para la funcionalización de PEG-[G3^{AAC}]-Prop mediante química TYC, se escogió el ácido tiomálico (ATM) (Esquema 17). La utilización de un exceso de tiol de 6 eq por grupo alquino y cantidades catalíticas de DMPA (0.1 eq por grupo alquino) [294a,298] permitió la síntesis del compuesto PEG-[G3^{AAC}]-ATM en un tiempo total de tres horas y tras una simple purificación selectiva en isopropanol, con un 88% de rendimiento.

[294] **(a)** Huynh, V.T.; Chen, G.; Souza, P.; Stenzel, M. H. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 1738-1751; **(b)** Chen G.; Kumar, J.; Gregory, A.; Stenzel, M. H. *Chem. Commun.* **2009**, 6291-6293.
[295] Wang, J.; Lei, L.; Voets, I. K.; Stuart, M.A.C.; Velders, A.H. *Soft Matter*. **2020**, *16*, 7893-7897.
[296] Spataro, F.; Malecaze, F.; Turrin, C.-O.; Soler, V.; Duhayon, C.; Elena, P.-P.; Majoral, J.-P.; Caminade, A.-M. *Eur. J. Med. Chem*. **2010**, *45*, 326-334.
[297] Twibanire, J.-D. A. K.; Grindley, T. B. *Polymers* **2014**, *6*, 179-213.
[298] Shen, Y.; Ma, Y.; Li, Z. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2013**, *51*, 708-715.



Esquema 17. Post-Funcionalización TYC con ácido tiomálico de PEG-[G3^{AAC}]-Prop.

El seguimiento de esta reacción se realizó mediante espectroscopía de ^{1}H RMN (Figura 65). A diferencia del seguimiento de la reacción TEC, en este caso no se ha podido monitorizar la reacción mediante la desaparición de los protones del grupo alquino, debido a la aparición de nuevas señales del producto al mismo desplazamiento químico. Sin embargo, este seguimiento se pudo realizar observando la desaparición de los protones de los ésteres situados en alfa a los grupos alquino a δ: 5.05 y 5.0 ppm.

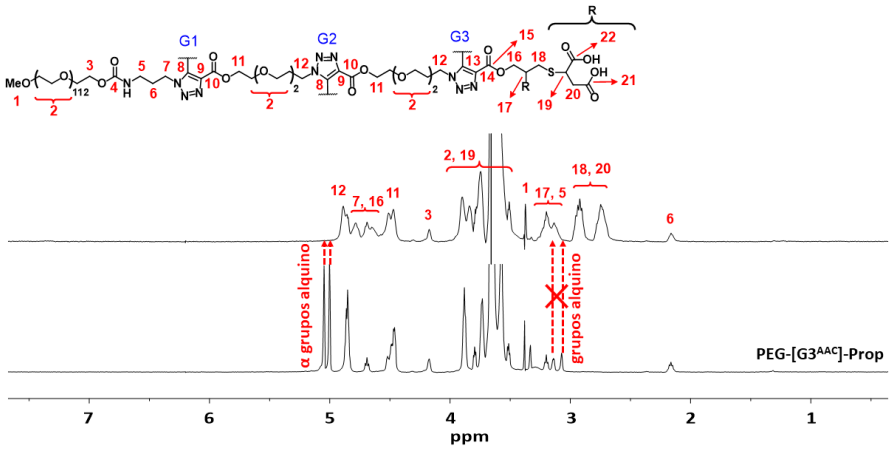


Figura 65. Seguimiento de la síntesis de PEG-[G3^{AAC}]-ATM mediante ^{1}H RMN (MeOD).

En la realización del espectro de protón se ha utilizado un filtro de difusión de 100 ms para eliminar las señales de disolvente en la región de 4.8 ppm, ya que imposibilitaban la caracterización de las señales del producto a ese desplazamiento químico. También hay que destacar, la relación de integrales por ^{1}H RMN en el PEG-[G3^{AAC}]-ATM no ha sido la esperada bajo todas las condiciones experimentales de disolvente y temperaturas probadas, posiblemente debido a pequeños agregados poliméricos en disolución.

Por último, este copolímero demostró ser soluble en condiciones acuosas, como el derivado PEG-[G3^{AAC}]-Gal.

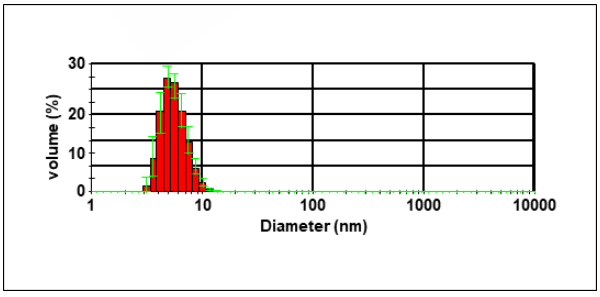


Figura 66. Histograma de DLS de PEG-[G3^{AAC}]-ATM a 1mg/mL en D_2O.

3.4. ESTUDIOS DE AGREGACIÓN

Una vez sintetizados los copolímeros de bloque anfifílicos, se estudiaron sus propiedades de agregación para la formación de nanosistemas en medio acuoso. Se escogieron los productos PEG-[G3^{AAC}]-(Et), (Dod) y (Bu-Ph) para la formación de micelas, y se estudiaron las propiedades de agregación del copolímero PEG-[G3^{AAC}]-ATM en la formación de micelas tipo PIC.

3.4.1. Micelas anfifílicas

Se estudió la habilidad de los copolímeros de bloque anfifílicos PEG-[G3^{AAC}]-Et, -Dod y -Bu-Ph (Figura 67) para formar micelas de tamaño nanométrico en disolución acuosa. Las funcionalizaciones del copolímero seleccionadas para estudiar el efecto de la hidrofobia sobre la agregación y encapsulación de moléculas fueron las siguientes: etilo por ser un grupo pequeño y que apenas aporta hidrofobia a la estructura, ii) dodecilo, por ser una cadena alquílica larga con la suficiente carga hidrofóbica y habilidad para formar interacciones débiles tipo Van der Waals, y iii) bencilo, por su hidrofobia y capacidad para formar interacciones π-*stacking*. Debido a estas características químicas, se esperaba que el copolímero PEG-[G3^{AAC}]-Et formase las nanoestructuras menos estables o definidas, mientras que los copolímeros PEG-[G3^{AAC}]-Dod y Bu-Ph pudieran ensamblarse de forma ordenada en disolución.

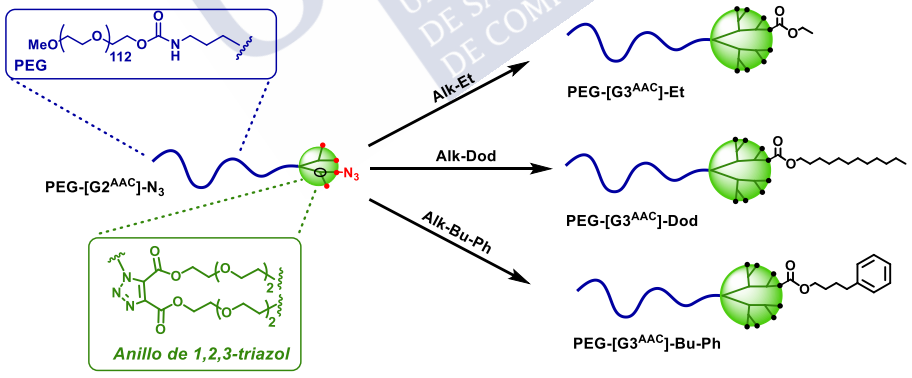


Figura 67. Síntesis de los copolímeros de bloque anfifílicos.

Para la formación de nanoestructuras se escogió el método de evaporación de disolvente, por su simplicidad y rapidez. Se disolvieron los tres copolímeros en un disolvente orgánico miscible con agua (MeOH) a diferentes concentraciones y, a continuación, se adicionó lentamente tampón 10 mM PB

pH 7.4, 150 mM NaCl para evitar la precipitación de los copolímeros. Seguidamente se evaporó el disolvente en un rotavapor y se realizaron medidas de DLS de las muestras.

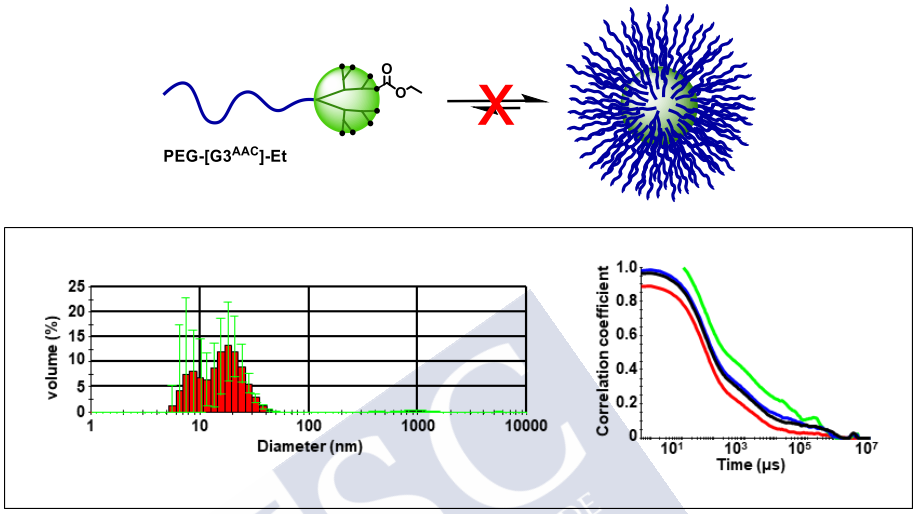


Figura 68. Histograma de DLS del PEG-[G3^{AAC}]-Et a 8 mg/mL.

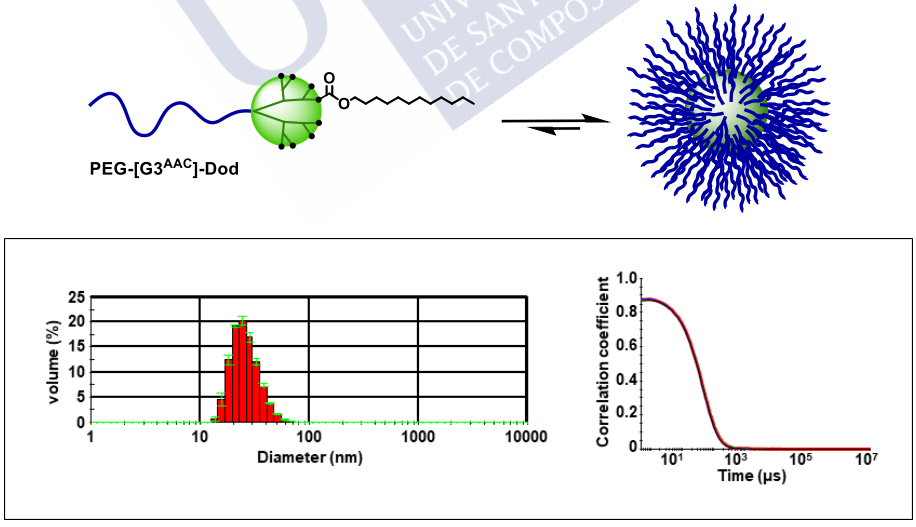


Figura 69. Histograma de DLS de la formación de micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Dod a 8 mg/mL.

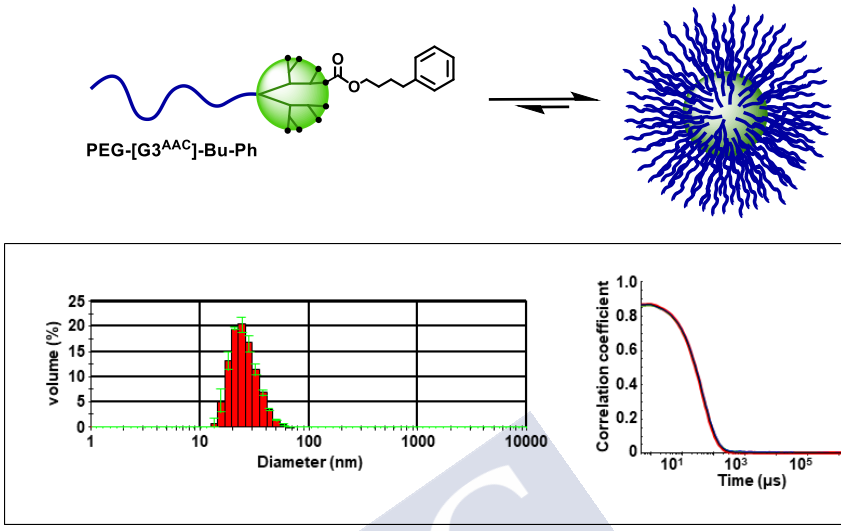


Figura 70. Histograma de DLS de la formación de micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph 8 mg/mL.

Como se podía esperar, para el PEG-[G3^{AAC}]-Et no se observó la aparición de micelas uniformes, con poblaciones incluso por debajo de 10 nm que podrían implicar polímero libre en disolución (Figura 68). Por el contrario, para PEG-[G3^{AAC}]-Dod y -Bu-Ph se obtuvieron estructuras ordenadas en medio acuoso, con mejores resultados a medida que aumentaba la concentración de polímero en disolución, hasta llegar a la formación de micelas de un tamaño similar, 33 ±0.3 nm (Figura 69) y 31.73±0.43 (Figura 70) respectivamente.

La capacidad de estas micelas para actuar como SDDS se estudió mediante encapsulación del fármaco antitumoral DOX.

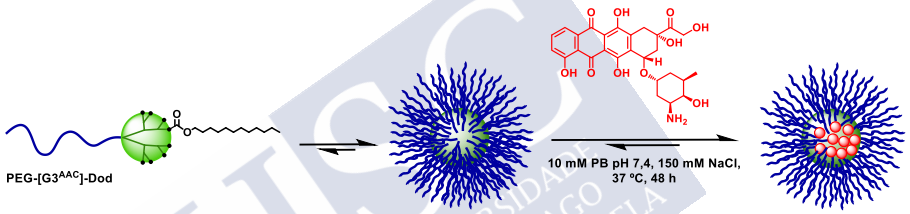
Este compuesto que pertenece a la familia de las antraciclinas y que se usa en el tratamiento en diversos tipos de tumores sólidos desde 1969.[299] Su mecanismo de acción se basa en el intercalado de los anillos de antraquinona entre las cadenas de ADN, preferentemente entre los pares de guanina-citosina. Esta interacción se ve reforzada por enlaces de hidrógeno de los grupos hidroxilo y daunosamina.[300] El proceso de intercalado altera la

[299] Damiani, R. M.; Moura, D. J.; Viau, C. M.; Cáceres, R. A.; Henriques, J. A. P.; Stafi, J. *Arch. Toxicol*. **2016**, *90*, 2063-2076.

[300] **(a)** Jawad, B.; Poudel, L.; Podgornik, R.; Steinmetz, N.F.; Ching, W.Y. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2019**, *21*, 3877-3893; **(b)** Pérez-Arnaiz, C.; Busto, N.; Leal, J. M.; García, B. *J. Phys. Chem. B.* **2014**, *118*, 5, 1288-1295.

replicación celular. Cuando la topoisomerasa II se une a un fragmento de ADN que contenga doxorubicina entre los pares de bases, ésta inhibe su acción por estabilización del complejo con ADN impidiendo que la enzima actúe y desencadenando los mecanismos de muerte celular. Sin embargo, su elevada actividad antitumoral está limitada por su baja solubilidad a pH fisiológico, así como por su elevada cardiotoxicidad derivada del estrés oxidativo provocado por ROS.[301] Por estos motivos resulta muy interesante la creación de SDDS que puedan liberar de este fármaco de forma selectiva.

Para la encapsulación de la DOX se añadió una concentración de fármaco de 3.2 mM sobre las micelas preformadas de PEG-[G3AAC]-Dod y -Bu-Ph. Posteriormente, se dejó agitar durante 48 h. Al tener DOX una baja solubilidad a pH 7.4, el fármaco tiende a incorporarse en el core hidrofóbico de las micelas.



[301] **(a)** Remu, K.; Abilash, V. G.; Pichiah, T.; Arunachalam, S. *Eur. J. Pharmacol*. **2018**, *818*, 241-253; **(b)** McGowan, J. V.; Chung, R.; Maulik, A.; Piotrowska, I., Walker, J. M.; Yellon, D. K. *Cardiovasc. Drugs Ther*. **2017**, *31*, 1, 63-75.

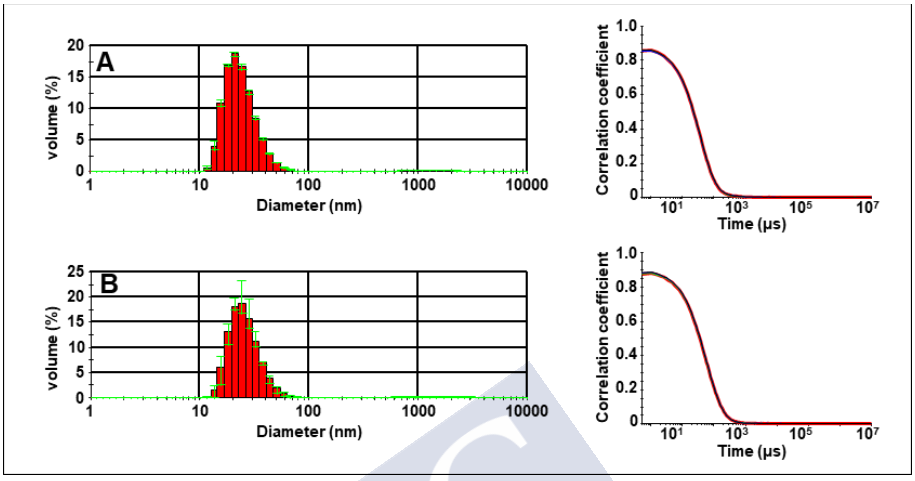


Figura 71. Histograma de DLS de la encapsulación de DOX (3.2 mM) en micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Dod. A) 24 h. B) 48 h.

Las micelas del PEG[G3^{AAC}]-Dod conservaron un tamaño estable a lo largo de toda la incubación (Figura 71), sin cambios significativos en el tamaño entre las 24 y las 48 horas. A continuación, las micelas se sometieron a una purificación por diálisis durante 6 h para determinar la concentración de doxorubicina encapsulada (Figura 72). Se determinó un EE= 80.42% y un DL=18.6%.

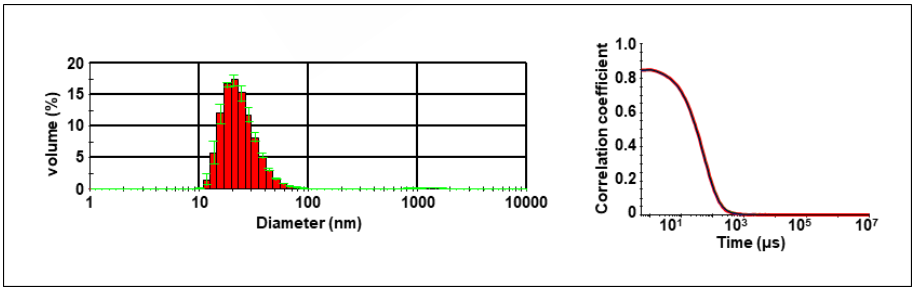


Figura 72. Histograma de DLS de las micelas de DOX/PEG-[G3^{AAC}]-Dod tras la purificación.

Se aplicó el mismo procedimiento para la encapsulación de DOX en las micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph. Sin embargo, éstas no conservaron su

tamaño original, observándose una población de agregados de tamaños desde los 10 nm hasta los 300 nm (Figura 73).

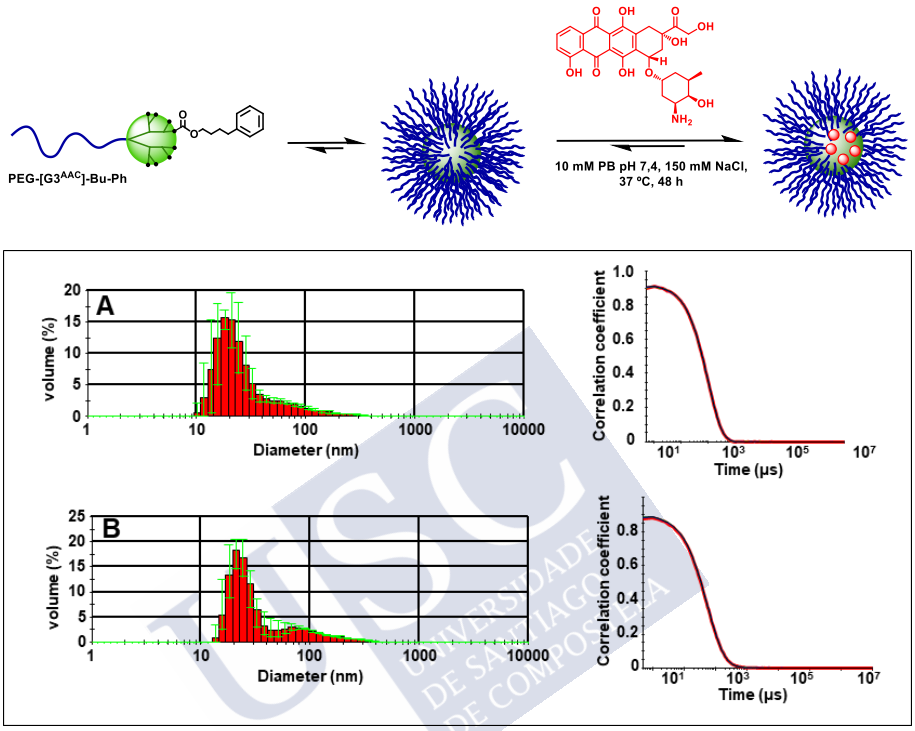


Figura 73. Histograma de DLS de la encapsulación de DOX (3.2 mM) en micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph. A) 24 h. B) 48 h.

Se decidió reducir la concentración de doxorubicina a la mitad para ver su efecto sobre la encapsulación con este polímero. A una concentración 1.6 mM de DOX se observó que las micelas sí conservaban su tamaño original (Figura 74), sin que se produjeran los fenómenos de agregación previamente observados.

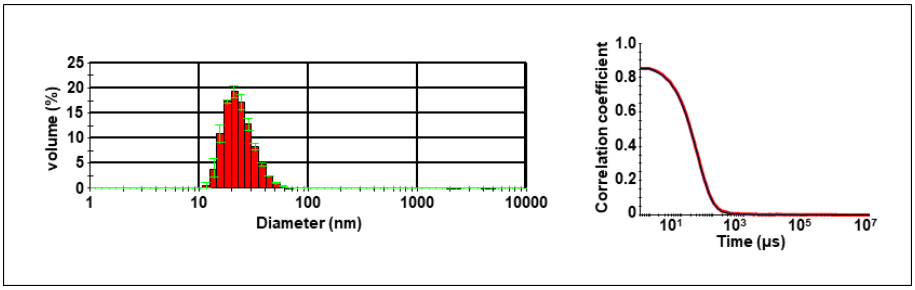


Figura 74. Histograma de DLS de la encapsulación de DOX (1.6 mM) en micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph a 48 h.

Para determinar el porcentaje de encapsulación del fármaco, se sometieron a las micelas al mismo proceso de purificación mediante diálisis (Figura 75), obteniéndose valores de EE=87.5% y DL= 10%.

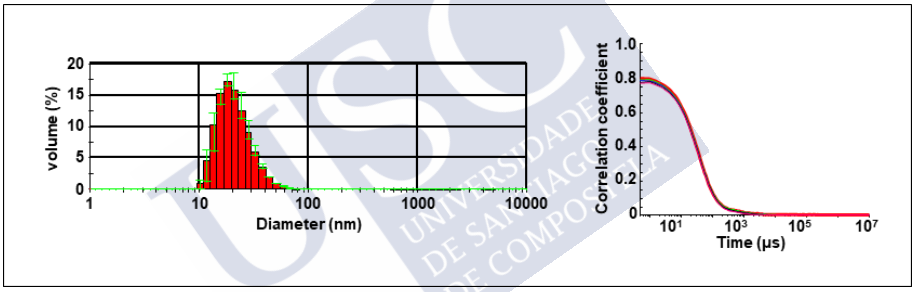


Figura 75. Histograma de DLS de las micelas DOX/PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph tras la purificación.

Las diferencias de encapsulación de ambos polímeros pueden ser explicadas por el efecto de las funcionalizaciones. En las micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Dod, las moléculas de dodecilo forman un interior menos compacto, permitiendo adaptar sus cadenas alquílicas para acomodar la DOX en su interior. Por el contrario, las micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph tienen un *core* hidrofóbico rígido y compacto, estabilizado por interacciones π-*stacking* entre los anillos bencénicos, resultando más difícil para la doxorubicina poder incorporarse en las micelas.

Por último, las micelas se sometieron a una diálisis a dos pH diferentes (pH 7.4 y 5), para comprobar si la diferencia entre funcionalizaciones tiene un efecto relevante en el perfil de liberación del fármaco (Figura 76).

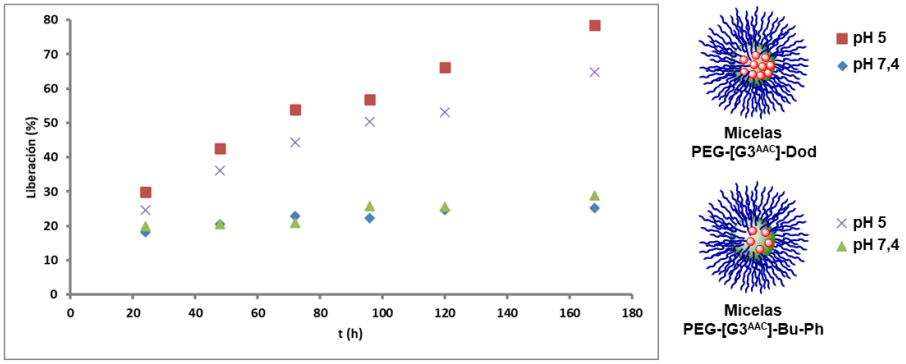


Figura 76. Perfil de liberación de DOX a diferentes pH de las micelas de DOX/PEG-[G3^{AAC}]-Dod y DOX/PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph.

El perfil de liberación a pH 7.4 es el mismo para ambas micelas. Después de 24 h se mantiene entre valores de un 20-30% de liberación. Sin embargo, a pH 5 se observa un aumento de la liberación de la doxorubicina a medida que pasa el tiempo. Este incremento es ligeramente mayor para las micelas de PEG-[G3^{AAC}]-Dod que para las de PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph. Esto puede ser debido a que la doxorubicina que se encuentra en el *core* de PEG-[G3]-Bu-Ph puede encontrarse más estabilizada por interacciones tipo *π-stacking*. Como resultado de este estudio, se concluyó que las micelas formadas a partir del PEG-[G3^{AAC}]-Dod son las mejores candidatas para sistemas SDDS, con un tamaño de 33 ±0.3 nm, EE= 80.42%, DL=18.6%. Además, estas micelas presentan sensibilidad a medio ácido y elevada estabilidad a pH fisiológico, lo que las hace potenciales candidatas para la liberación de DOX en endosoma-lisosoma tras internalización celular.

3.4.2. Micelas PIC

En investigaciones previas realizadas por nuestro grupo, se ha comparado la formación de micelas PIC entre copolímeros de bloque PEG-dendrítico (GATG) y PEG-lineal con cadenas poliméricas lineales de carga opuesta, como los poli-aminoácidos poli-L-lisina (PLL) y poli-arginina (PLA). Estos estudios demostraron que los copolímeros de bloque dendríticos son capaces de estabilizar estas micelas en condiciones de fuerza iónica extrema, en las que las micelas que incorporan sólo polímeros lineales se desestabilizan.[142] Esta estabilización debida a la naturaleza globular y rígida de los dendrímeros, también ha demostrado ser eficaz en la preparación de micelas PIC con diversos polisacáridos como quitosano, alginato y ácido hialurónico.[143]

Para demostrar la capacidad de los copolímeros de bloque PEG-dendríticos basados en triazoles en la formación de sistemas PIC, se ha estudiado y comparado la agregación del producto PEG-[G3^{AAC}]-ATM con dos polímeros de carga opuesta, PLL y poli-L-arginina (PLA) (Figura 77). En la formación de este tipo de sistemas es muy importante mantener una relación de cargas estequiométrica entre los polímeros. Además, es de vital importancia disolver las especies a un pH en el que todos los grupos estén en su forma aniónica o catiónica. Para el ácido málico, los dos ácidos carboxílicos se encontrarán como aniones carboxilato a pH 8,[302] mientras que la poli-L-lisina y la poli-L-arginina se encontrarán en su forma catiónica por debajo de un pH 10 y 12 respectivamente.

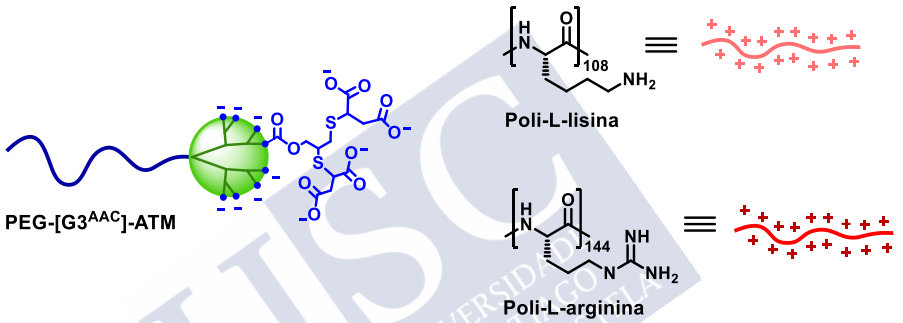


Figura 77. Sistemas empleados en la formación de micelas PIC.

Para la formación de las micelas PIC se utilizó una relación de cargas estequiométrica entre el copolímero aniónico PEG-[G3AAC]-ATM y los poli-aminoácidos catiónicos. La neutralización de cargas entre ambos componentes conduce a la formación de un *core* rodeado por las cadenas de PEG.

La medida de las mezclas en DLS tras 1 h reveló la aparición de micelas de un tamaño de 37.78±0.3 nm para las de PLL y de 29.57±0.4 nm para las de PLA (Figura 78). Se estableció este tiempo como un estándar para la formación de micelas PIC, pero, al tratarse de un proceso cinético la formación de micelas es muy rápido, observándose incluso a los 10 min tras la mezcla de componentes. Tras la mezcla de las disoluciones el pH de formación de las micelas fue de 6.5.

[302] Zekarias, M. T.; Rao, G. N. *J. Chil. Chem. Soc*. **2012**, *57*, 1054-1057.

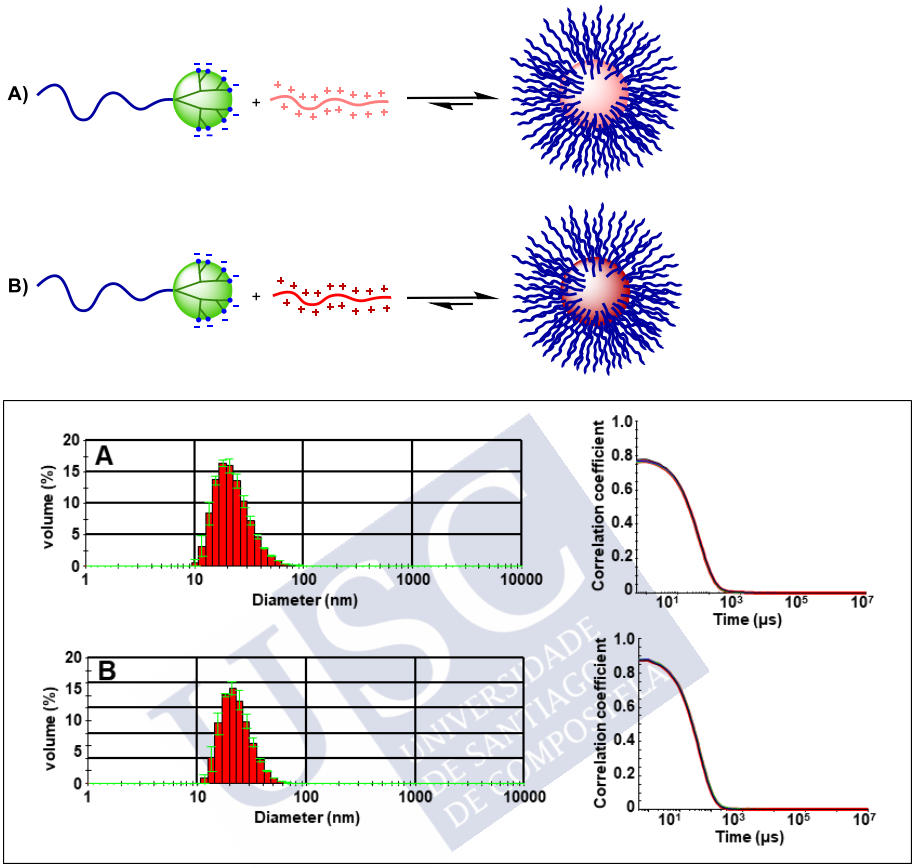


Figura 78. Histogramas de DLS de la formación a 1 h de micelas PIC PEG-[G3AAC]-ATM y: A) PLL y B) PLA.

Para estudiar la aplicabilidad de estas micelas en sistemas *in vivo*, se sometieron a diversos cambios en los que se midió su estabilidad frente a pH fisiológico de 7.4, fuerza iónica de 150 mM y temperatura de 37 ºC. Primero se estudió su estabilidad frente a un cambio de pH (Figura 79). Mediante una diálisis se cambió el pH del medio de formación de las micelas de 6.5 a 7.4. Se observó que, tanto las micelas de PLL como de PLA son estables.

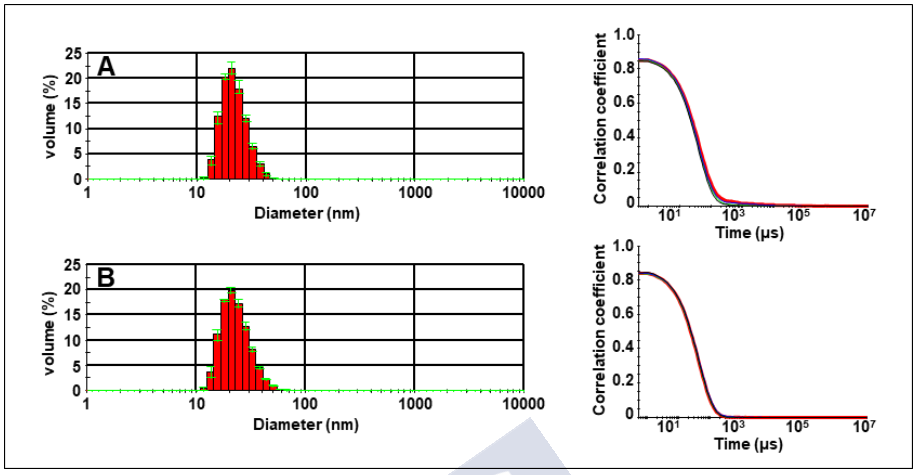


Figura 79. Histogramas de DLS de las micelas PIC entre PEG-[G3AAC]-ATM y A) PLL o B) PLA frente a pH 7.4 (10 mM fosfato).

A continuación, se estudió la estabilidad de estas micelas mediante diálisis a un cambio en la fuerza iónica del medio (Figura 80), incrementando la concentración hasta condiciones fisiológicas de 150 mM con NaCl. En estas condiciones se observó que ambas micelas conservaban su estabilidad.

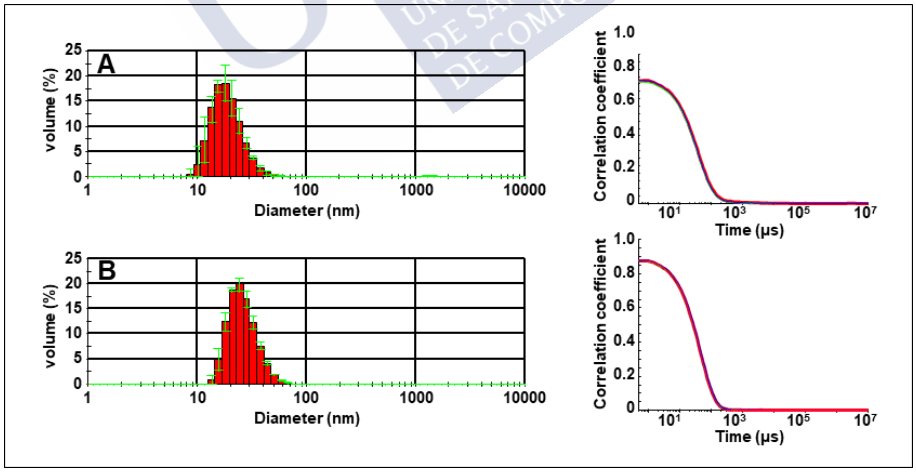


Figura 80. Histogramas de DLS de las micelas PIC entre PEG-[G3AAC]-ATM y A) PLL o B) PLA frente a pH 7.4 (10 mM fosfato) 150 mM NaCl.

Por último, se comprobó la estabilidad de las micelas frente a una temperatura de 37 ºC, la temperatura corporal media. Esto se realizó mediante la incubación de las disoluciones a esta temperatura con agitación magnética. Como era de esperar, en las micelas de PLL se observaron procesos de disrupción/agregación tras sólo 2 h de incubación, con una desagregación total tras 24 h. Por otro lado, las micelas formadas con PLA mostraron ser estables en todas las condiciones probadas, demostrando ser potenciales candidatas para su aplicación como sistemas SDDS en aplicaciones *in vivo* (Figura 81).

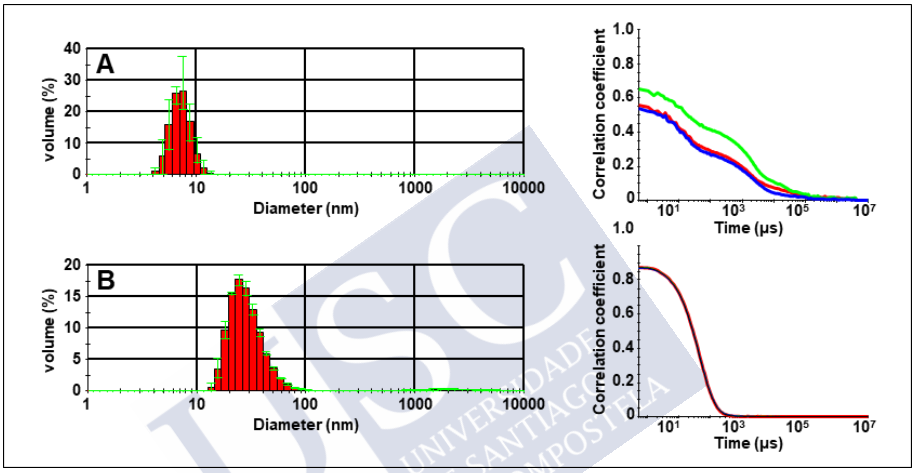


Figura 81. Histogramas de DLS de las micelas PIC entre PEG-[G3AAC]-ATM y A) PLL o B) PLA frente a pH 7.4 (10 mM fosfato) 150 mM NaCl tras 24 h de incubación a 37 ºC.

La mayor estabilidad de las micelas de PLA frente a las de PLL puede ser explicada debido a que el grupo guanidino de la cadena de PLA posee una doble coordinación con los ácidos carboxílicos, mientras que el grupo amino de las cadenas de PLL sólo ofrece una coordinación monodentada con los carboxilatos, dando lugar a micelas con una estructura más inestable.[303]

[303] **(a)** Shi, J.; Zhang, J.; Shen, Y.; Tang, L.; Zhao, J.; Tu, J.; Tian, Y.; Feng, Y. *Drug Deliv.* **2013**, *7544*, 1-14; **(b)** Meloni, B.P.; Mastaglia, F.L.; Knuckey, N.W. *Front. Neurol.* **2020**, *11*, 18, 1-28.

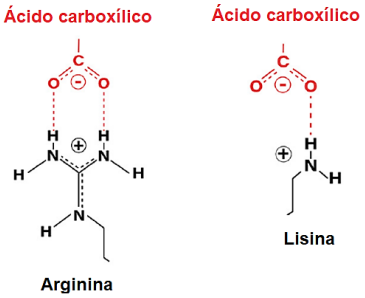


Figura 82. Coordinaciones de los grupos guanidino y amino de las cadenas de PLA y PLL con los grupos carboxilato.

3.4.3. Complejos *hybrid*-PIC

Los complejos *hybrid*-PIC son nanoestructuras formadas por la interacción de matrices poliméricas solubles en agua con diferentes iones metálicos.[304] Estas estructuras tienen especial relevancia en la síntesis de nanopartículas metálicas,[305] sin embargo, una de sus aplicaciones más interesantes se usa en el campo del transporte de fármacos. Kataoka et al. usaron un copolímero funcionalizado con ácidos poli-glutámicos en la formación de metalosomas para la encapsulación del fármaco antitumoral (1,2-diaminociclohexano) platino (II).[306] Enfocados a la encapsulación de este tipo de fármacos, Stenzel et al. utilizaron un copolímero modificado con ácido málico para la creación de un SDDS *hybrid*-PIC.[294] Otra de las estrategias usadas en la encapsulación de fármacos basados en platino, fue la empleada por Bronich et al., donde usaron iones Ca^{2+} para la creación de micelas mediante interacción

[304] **(a)** Layrac, G.; Gérerdin, C.; Tichit, D.; Harrisson, S.; Destarac, M. *Polymer*, **2015**, *72*, 292-300; **(b)** Roma-Luciow, R.; Sarraf, L.; Morcellet, M. *Eur. Polym. J*. **2001**, *37*, 1741-1745; **(c)** Sanson, N.; Bouyer, F.; Destarac, M.; In, M.; Gérardin, C. *Langmuir*, **2012**, *28*, 3773-3782.

[305] **(a)** Li, B.; Hu, T.; Ma, N.; Hu, Z.; Gong, X.; Wu, C.; Hara, M. *Colloid Poly. Sci*. **2017**, *295*, 583-599; **(b)** Gérardin, C.; Sanson, N.; Bouyer, F.; Fajula, F.; Putaux, J.-L.; Joanicot, M.; Chopin, T. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2003**, *42*, 3681-3685; **(c)** Sidorov, S. N.; Bronstein, L. M.; Kabachii, Y. A.; Valetsky, P. M.; Soo, P. L.; Maysinger, D.; Eisenberg, A. *Langmuir* **2004**, *20*, 3543-3550.

[306] Osada, K.; Cabral, H.; Mochida, Y.; Lee, S.; Nagata, K.; Matsuura, T.; Yamamoto, M.; Anraku, Y.; Kishimura, A.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13172-13175.

con un copolímero PEG-metacrilato, que sirvió como "plantilla" para la posterior incorporación de cis-platino.[307]

Con la intención de generar nuevos complejos *hybrid*-PIC a partir de los copolímeros LD descritos anteriormente, se estudió la agregación del copolímero de bloque PEG-[G3^{AAC}]-ATM con diferentes iones metálicos mono- y divalentes.

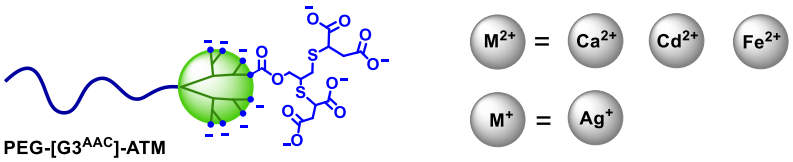


Figura 83. Especies usadas para la formación de micelas hybrid-PIC.

El proceso de formación de complejos *hybrid-PIC* es muy similar a la formación de micelas PIC. En este caso se utiliza una relación estequiométrica de cargas entre los carboxilatos y los cationes metálicos. Idealmente, un catión metálico divalente neutralizará dos carboxilatos, mientras que uno monovalente interaccionará de forma individual (Figura 84). La neutralización de cargas del bloque dendrítico conducirá a la hidrofobización del mismo, llevando a la formación de nanoestructuras que contienen cationes metálicos en el interior y manteniendo las cadenas de PEG en contacto con el disolvente.

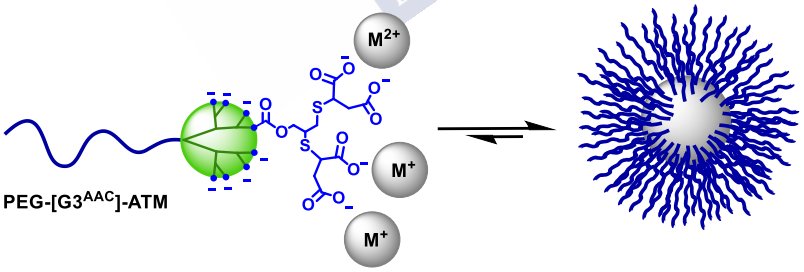


Figura 84. Idealización de las interacciones entre los ácidos carboxílicos del bloque dendrítico y diferentes iones metálicos.

[307] Bontha, S.; Kabanov, A. V.; Bronich, T. K. *J. Control. Release* **2006**, *114*, 163-174.

Iones Ca^{2+}

La interacción entre iones Ca^{2+} y el copolímero de bloque PEG-[$G3^{AAC}$]-ATM fue la primera en ser estudiada. Tras añadir una cantidad estequiométrica de iones metálicos sobre el copolímero en disolución, se realizaron medidas de DLS tras 1 y 24 h de incubación. Tras 1 h, se observaron nanoestructuras ordenadas de 86.57±0.45 nm, que tras 24 h incrementaron su tamaño hasta 170.3±1.29 nm. Posteriormente, se siguió la evolución de estas estructuras, confirmándose su estabilidad, incluso 3 días después de la formación (164±1.85 nm) (Figura 85).

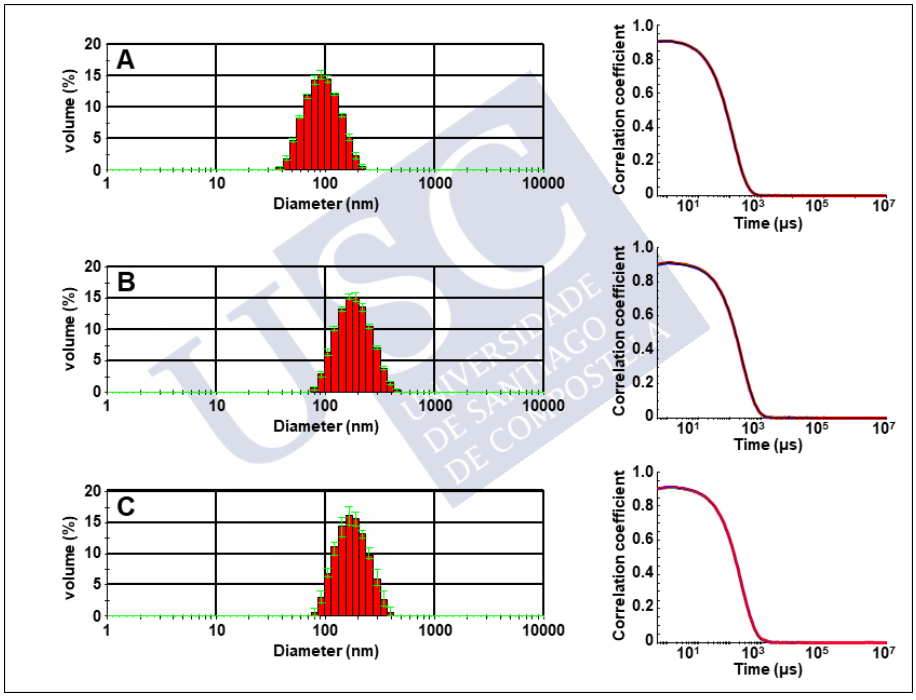


Figura 85. Formación de micelas hybrid-PIC entre PEG-[$G3^{AAC}$]-ATM con iones Ca^{2+} a A) 1 h, B) 24 h, C) 72 h.

Para comprobar si estas estructuras pudieran servir como *"*plantilla*"* para la incorporación de fármacos tipo cis platino, en una estrategia similar a la seguida por Bronich et al.[307] se decidió someter estas micelas a un *crosslinking* con etilendiamina, uniendo los ácidos carboxílicos del interior del *core* mediante grupos amida. Para ello, las estructuras formadas tras 24 h se purificaron mediante diálisis y, posteriormente, se trataron con

etilendiamina y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) durante 14 h. Tras estos procesos no se observa una variación apreciable en el tamaño de las estructuras, con un valor de 191.9±0.50 nm tras la purificación y 185.1±0.47 nm tras el *crosslinking* (Figura 86).

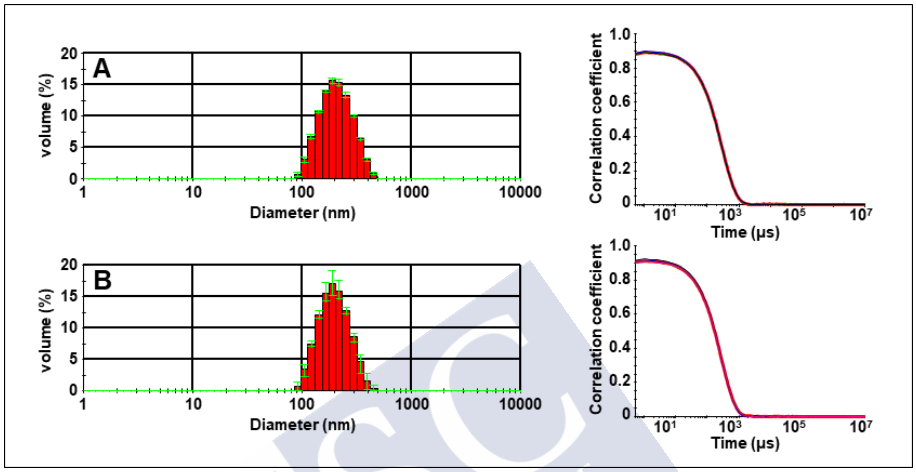


Figura 86. DLS de micelas hybrid-PIC entre PEG-[G3AAC]-ATM e iones Ca^{2+} tras A) purificación por diálisis, B) crosslinking.

Por último, para comprobar la efectividad de este *crosslinking*, se adicionó una disolución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a las micelas tratadas con etilendiamina/EDC y se comparó su comportamiento con el de micelas control tras 24 h de formación. El EDTA es una molécula quelante que forma complejos con metales que tengan una estructura de coordinación octaédrica.[308]

Tras el tratamiento de ambos nanosistemas con el agente quelante, se observó que las "*crosslinkeadas"* permanecieron estables. Por el contrario, en las micelas control se observó polímero libre en disolución, resultado de haber eliminado los iones Ca^{2+} como elemento estabilizador del *core* (Figura 87).

Como resultado, se ha demostrado la capacidad del polímero PEG-[$G3^{AAC}$]-ATM en la formación de micelas *hybrid-PIC* con iones de Ca^{2+}, los cuales fueron utilizados para crear una nanoestructura que puede servir como

[308] Flora, S. J. S.; Pachauri, V. *Int. J. Res. Public Health*, **2010**, *7*, 2745-2788.

"plantilla" para la incorporación de fármacos antitumorales derivados de platino.

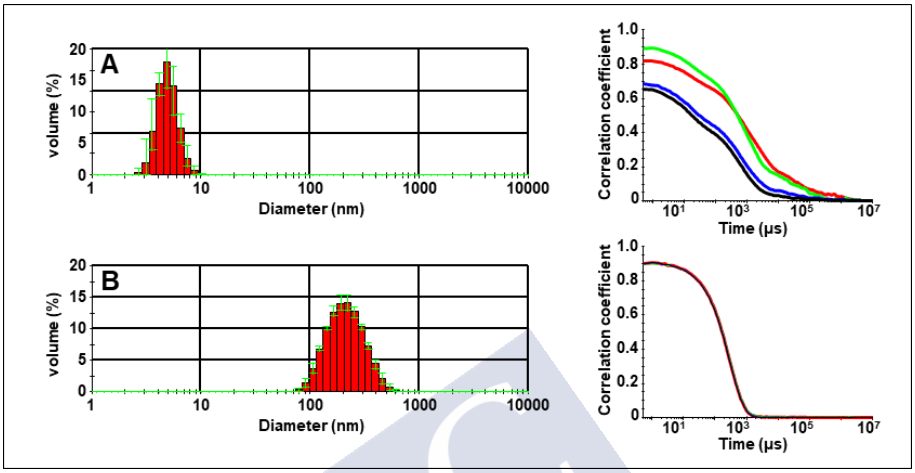


Figura 87. Estabilidad de micelas hybrid-PIC entre PEG-[G3AAC]-ATM e iones Ca2+ tras tratamiento con EDTA. A) micelas control, B) micelas "crosslinkeadas".

Iones Cd^{2+}

Para demostrar la versatilidad del copolímero de bloque PEG-[$G3^{AAC}$]-ATM en la formación de Hybrid PIC con diferentes iones metálicos, se estudió su capacidad de agregación en presencia de iones Cd^{2+}. En un estudio similar al anterior, se midió la mezcla del polímero y los iones metálicos tras 1 y 24 h de incubación. Tras 1 h, se observó que las micelas resultantes tenían un tamaño similar a las formadas a partir de los iones de Ca^{2+}, con un valor de 83.81±0.32 nm. Tras 24 h de incubación, estas nanopartículas conservaron su tamaño original 83.72±0.44 nm, que mantuvieron incluso 3 días después de la formación. (Figura 88).

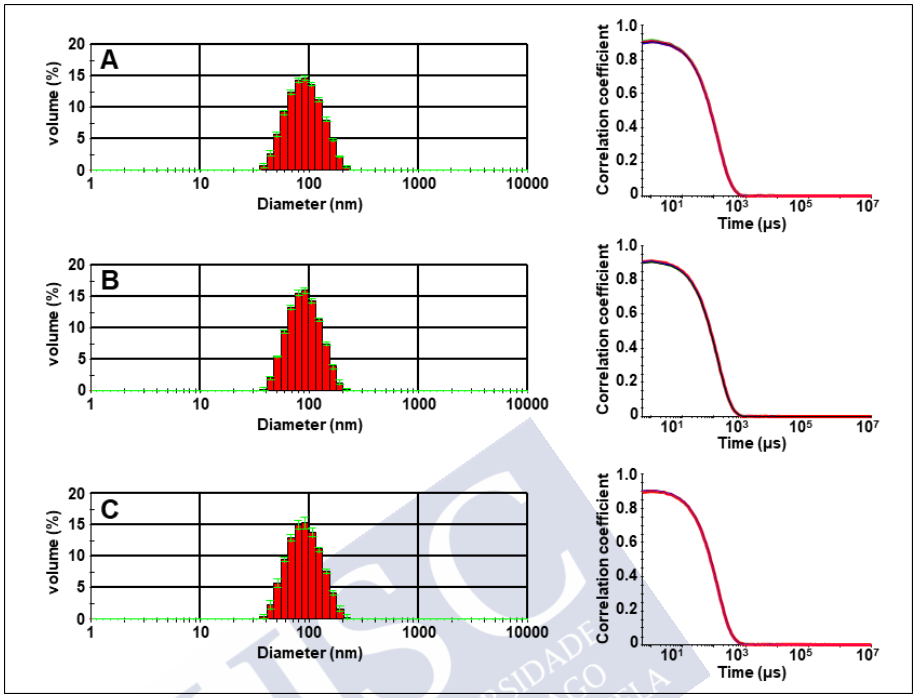


Figura 88. Formación de micelas hybrid-PIC entre PEG-[G3^{AAC}]-ATM con iones Cd^{2+} a A) 1 h, B) 24 h, C) 72 h.

Iones Fe^{2+}

El último proceso de complejación estudiado con iones divalentes fue con el Fe^{2+}. Tas 1 h de incubación se observaron estructuras ordenadas con un tamaño de 93.90±0.74 nm, similar a las micelas de Cd^{2+}, valor que se conservó tras 24 h (94.75±0.41 nm). Asimismo, estas micelas aumentaron ligeramente su tamaño tras 3 días después de su formación (118.8±0.14 nm) (Figura 89).

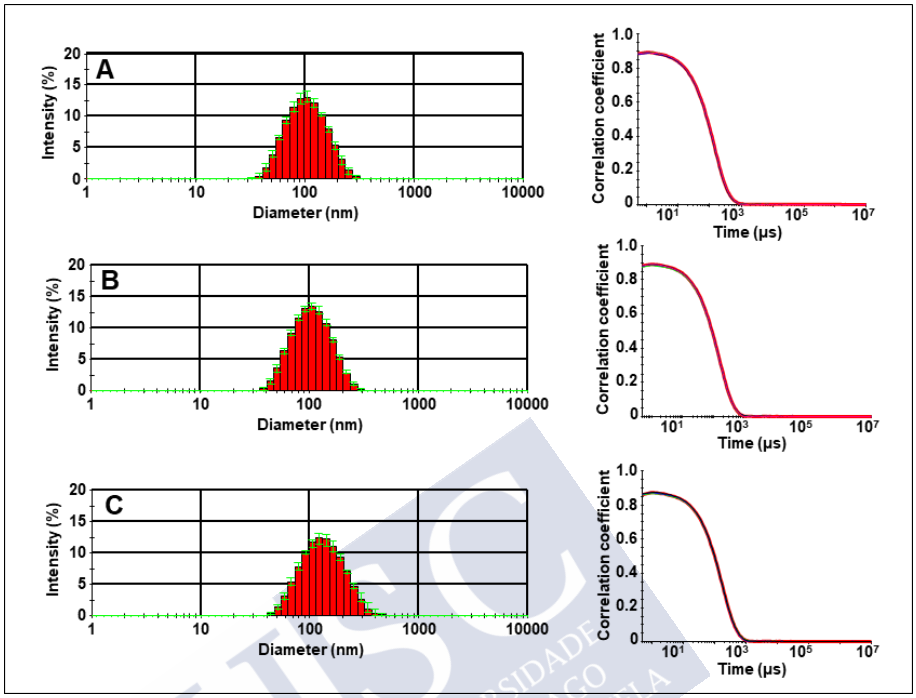


Figura 89. Formación de micelas hybrid-PIC entre PEG-[G3^{AAC}]-ATM e iones Fe^{2+} a A) 1 h, B) 24 h, C) 3 días.

Iones Ag^{+}

Las nanopartículas de plata son nanoestructuras muy versátiles, con aplicaciones en multitud de campos, desde el tratamiento de aguas residuales,[309] aplicaciones textiles [310] hasta aplicaciones en catálisis.[311] Además, las propiedades antibacterianas de estas

[309] Moutafa, M. T. *Water Sci*. **2017**, *31*, 2, 164-176.
[310] Ballottin, D.; Fulaz, S.; Cabrini, F.; Tsukamoto, J.; Durán, N.; Alves, O. L.; Tasic, L. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *75*, 1, 582-589.
[311] Dong, X.-Y.; Gao, Z.-W.; Yang, K.-F.; Zhang, W.-Q.; Xu, L.-W. *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 2554-2574.

nanopartículas,[312] ofrecen una solución alternativa a la resistencia a antibióticos, [313] uno de los problemas más acuciantes en la actualidad.

De forma análoga a la obtención de *hybrid-PIC* con metales divalentes, se estudió la interacción de los cationes Ag^{+} con el copolímero de bloque PEG-[$G3^{AAC}$]-ATM. Pasada 1 h tras la mezcla de ambos componentes en relación estequiométrica se observaron por DLS nanoestructuras ordenadas de tamaño 171.3±2.35 nm, que se mantuvieron sin apenas variación tras 24h (165.1±1.74 nm) y 3 días (Figura 90).

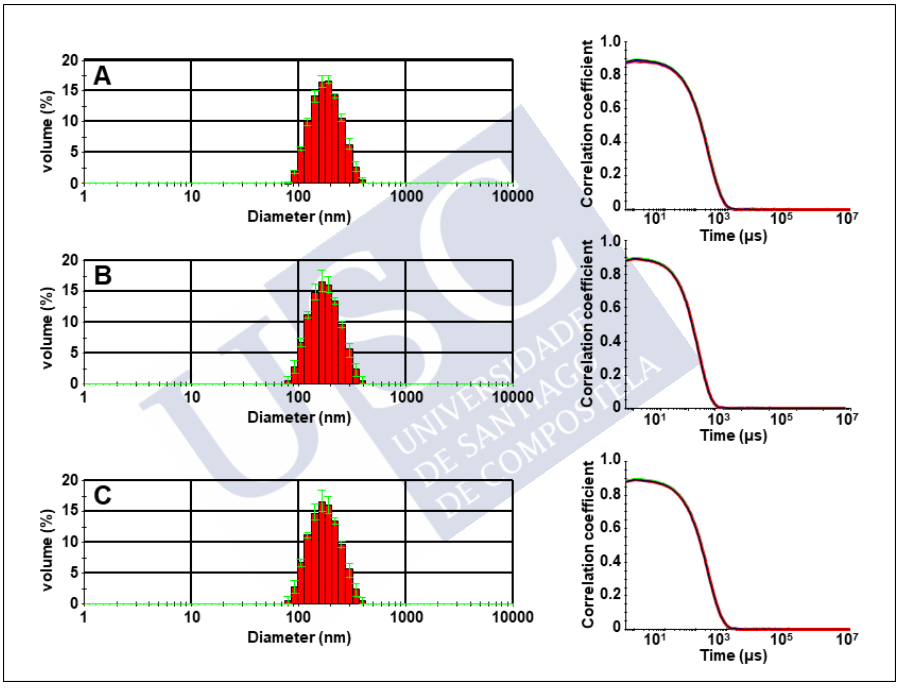


Figura 90. Formación de micelas hybrid-PIC entre PEG-[$G3^{AAC}$]-ATM e iones Ag^{+} a A) 1 h, B) 24 h, C) 3 días.

[312] **(a)** Qing, Y.; Cheng, L.; Li, R.; Liu, G.; Zhag, Y.; Tang, X.; Wang, J.; Liu, H.; Qin, Y. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 3311-3327; **(b)** Ahmad, S. A.; Das, S. S.; Khatoon, A.; Ansari, M. T.; Afzal, M.; Hasnain, M. S.; Nayak, A.K. *Mater. Sci. Technol.* **2020**, *3*, 756-769.

[313] Aslam, B.; Wang, W.; Arshad, M. I.; Khurshid, M.; Muzammmil, S.; Rasool, M. H.; Nisar, M. A.; Alvi, R. F.; Aslam, M. A.; Qamar, M. U.; Salamat, M. K. F.; Baloch, Z. *Infect. Drug Resist* **2018**, *11*, 1645-1658.

Este estudio representa el primer ejemplo en utilizar copolímeros de bloque dendríticos con iones metálicos en la formación de complejos *hybrid-PIC*. Además, se ha demostrado un control del tamaño de estas estructuras mediante la complejación con diferentes iones, en un rango de tamaños desde los 83 hasta los 191 nm.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

II. Interacciones entre ácidos borónicos y dioles en el diseño de nuevos SDDS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS CAP. II

4.1. AB EN LA ENCAPSULACIÓN DE DIOLES

La versatilidad de los AB ha propiciado su aplicación en el desarrollo de numerosos sistemas de transporte de fármacos. En concreto, la afinidad de los AB con dioles constituye la aproximación más interesante para la incorporación de fármacos que contengan dioles en nuevos SDDS.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado la síntesis de un nuevo copolímero de bloque dendrítico funcionalizado con ácidos borónicos tipo Wulff (Figura 91) para encapsulación de moléculas y fármacos que contengan 1,2 y 1,3-dioles en su estructura.[314]

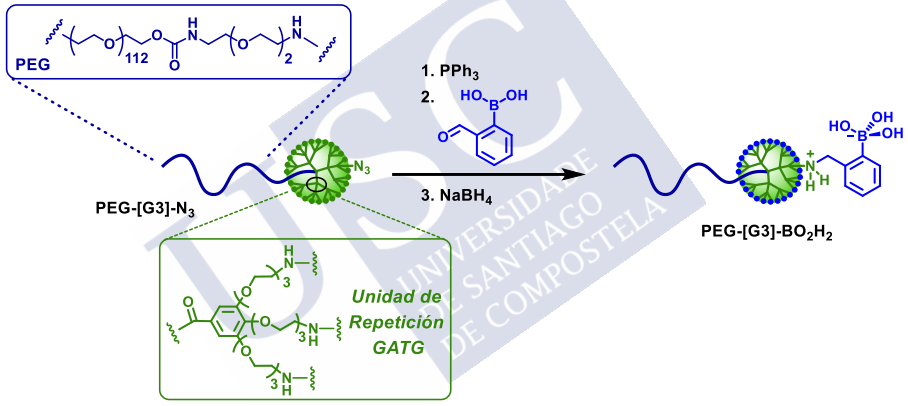


Figura 91. Funcionalización del copolímero de bloque PEG-GATG con ácidos borónicos.

El copolímero funcionalizado con ácidos borónicos PEG-[G3]-BO_2H_2 es soluble en disolución acuosa en todo el rango de pH. Sin embargo, en presencia de 1,2 y 1,3 dioles, se produce la formación de ésteres borónicos, lo que provoca una hidrofobización del bloque dendrítico y agregación ordenada dando lugar a la formación de micelas (Figura 92). De esta forma, se han desarrollado micelas que incorporan fármacos tan interesantes y con

[314] Al-Ni'mat, M. A. (2020). Dendritic Boronic Acids for the Delivery of Diol-Containing Drugs, (Tesis Doctoral No Publicada) Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

actividades tan dispares como tetraciclina (antibiótico), anfotericina B (antifúngico) o dexametasona (antiinflamatorio).

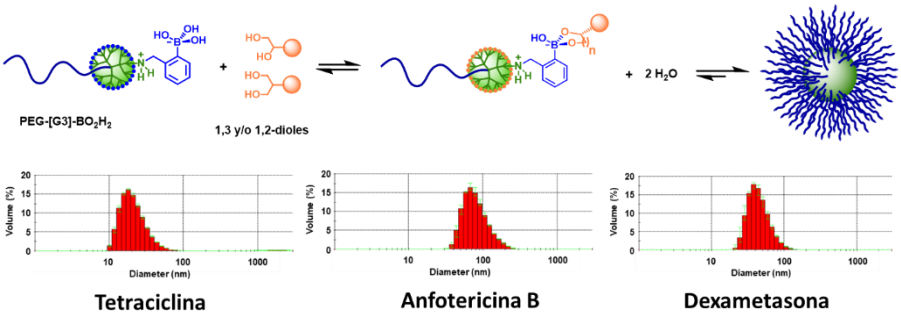


Figura 92. Formación de micelas poliméricas por interacción de PEG-[G3]-BO_2H_2 con 1,2 y 1,3 dioles.

La interacción entre el copolímero de bloque y los diferentes dioles es un proceso que se puede seguir mediante DLS, observándose la aparición de agregados nanométricos. Sin embargo, tan importante como saber el efecto que produce el diol sobre la agregación del copolímero, es conocer el tipo de interacción química entre las moléculas y los ácidos borónicos tanto en disolución como en el interior de las micelas.

En este capítulo se realizará un estudio sistemático mediante ^{1}H y ^{11}B RMN de las interacciones que se producen entre los ácidos borónicos tipo Wulff y diferentes dioles que se estudiaron en la agregación del copolímero PEG-[G3]-BO_2H_2. Asimismo, se aplicarán estos conocimientos a la encapsulación de un fármaco antitumoral, la doxorubicina.

4.2. TRABAJO REALIZADO

4.2.1. Síntesis y estudio del ácido borónico modelo (2-PFB) en disolución

Debido a la complejidad estructural del copolímero de bloque dendrítico, para hacer un análisis preciso mediante RMN de la interacción entre los ácidos borónicos tipo Wulff y los diferentes dioles, se optó por realizar una simplificación del sistema. Para ello se sintetizó el ácido ((2-

((propilamino)metil)fenil)borónico) (2-PFB), modificando un procedimiento experimental descrito en bibliografía (ver abajo).[315]

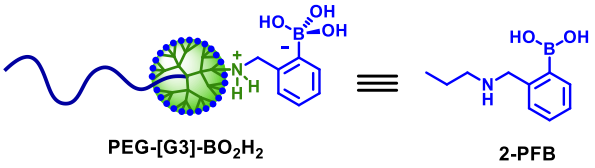


Figura 93. Sistema modelo empleado para el estudio de las interacciones entre ácidos borónicos tipo Wulff y dioles.

Los estudios estructurales y de los equilibrios de interacción entre los ácidos borónicos y los dioles se llevaron a cabo en dos tipos de condiciones. Para simular las condiciones de formación de las micelas en el disolvente acuoso, se empleó una mezcla 30% D_2O en DMSO-d_6, necesaria para mantener solubles tanto reactivos como productos. Para simular el interior hidrofóbico de las micelas se escogió DMSO-d6, un disolvente aprótico en el que son solubles tanto dioles sencillos como los fármacos que se utilizaron en el estudio (Figura 94).

[315] Park, N. H.; Voo, Z. X.; Yang, Y. Y.; Hedrick, J. L. *ACS Macro Lett*. **2017**, *6*, 3, 252-256.

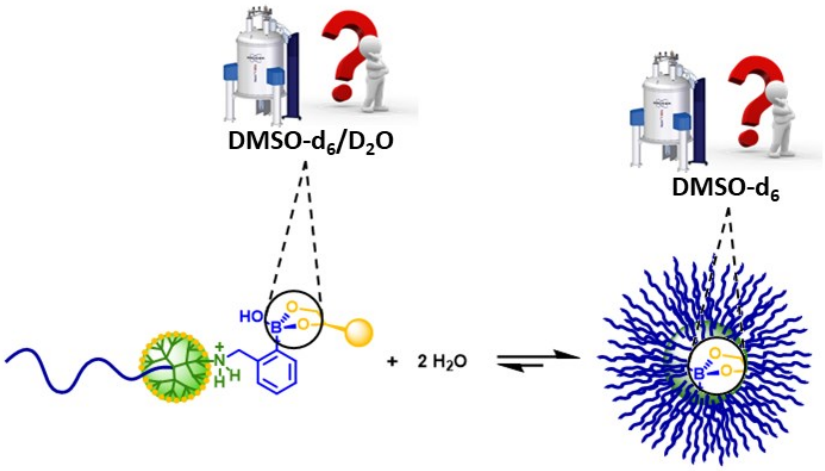


Figura 94. Condiciones donde se llevaron a cabo los estudios estructurales y de equilibrio entre especies.

Previo a la realización de los estudios en disolución se describirá el proceso sintético utilizado para la obtención de 2-PFB, pues es fundamental a la hora de analizar su estructura y equilibrios en disolución. Estudios realizados por el grupo de Anslyn, concluyeron que disolventes próticos como el D_2O o el CD_3OD dan lugar a inserciones de disolvente sobre el átomo de boro, obteniéndose los correspondientes aniones boronato sp^3 tetraédricos. Este proceso es muy fácil de identificar mediante ^{11}B RMN, ya que estas especies presentan un desplazamiento químico característico en torno a δ: 10 ppm.[260] Por lo tanto, en presencia de MeOH, utilizado durante la purificación por cromatografía en columna de 2-PFB, se obtendrá el correspondiente boronato tetraédrico por inserción de MeOH (Figura 95), impidiendo que esta especie pueda ser utilizada en los estudios de interacción con dioles. Para eliminar las moléculas de MeOH insertado, se disolvió el producto en H_2O MQ y liofilizó. Este proceso de purificación dio lugar a la boroxina 2-PFB_T, de la que pudo obtenerse su estructura cristalográfica.

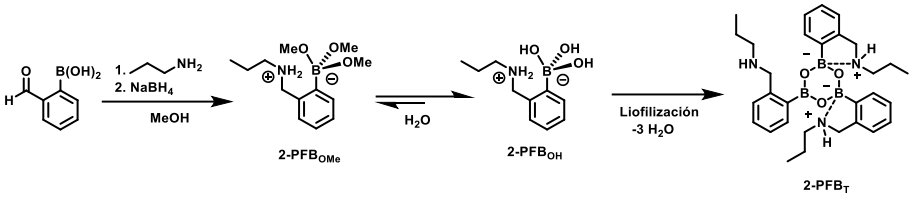


Figura 95. Síntesis de 2-PFB y obtención de la boroxina 2-PFB$_T$.

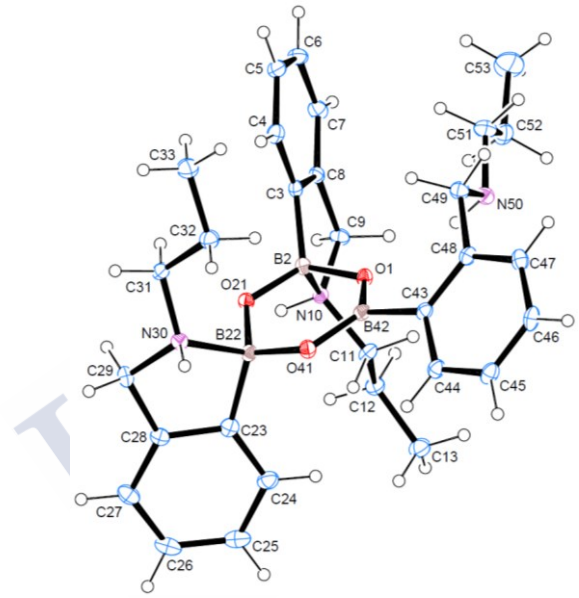


Figura 96. Estructura cristalográfica de 2-PFB$_T$.

Inicialmente, se realizó una caracterización del producto 2-PFB$_T$ en varios disolventes, próticos y apróticos, para posteriormente realizar las valoraciones con diferentes dioles. Los disolventes empleados con los ácidos borónicos tipo Wulff tienen un efecto crítico sobre los equilibrios de estas especies en disolución.

La disolución de 2-PFB$_T$ en disolventes próticos como CD_3OD o una mezcla 30% D_2O/DMSO-d_6 dio lugar a la hidrólisis de la boroxina y la formación de los productos 2-PFB$_{OMe}$ y 2-PFB$_{OH}$, respectivamente (Figura 97). Esto se pudo comprobar mediante la observación de sus desplazamientos por ^{1}H RMN y la aparición de señales características de boronato por ^{11}B RMN a δ: 10.81 y 10.37 ppm respectivamente (Figura 98).

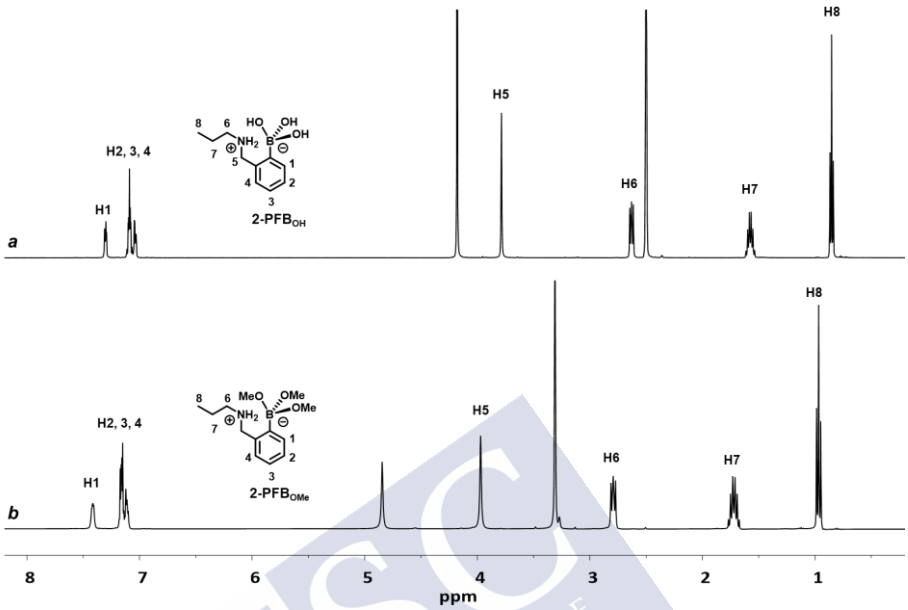


Figura 97. Espectros de ^{1}H RMN tras disolución de 2-PFB$_T$ en a) 30% D_2O/DMSO-d_6 y b) CD_3OD.

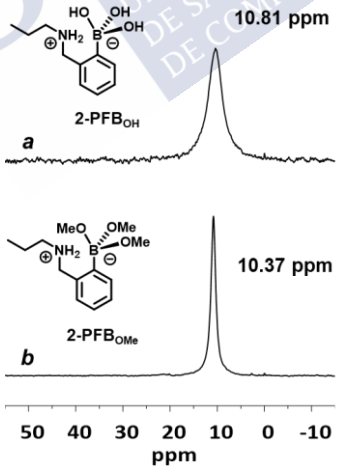


Figura 98. Espectros de ^{11}B RMN tras disolución de 2-PFB$_T$ en a) CD_3OD y b) 30% D_2O/DMSO-d_6.

La caracterización de 2-PFB_T en disolventes apróticos resultó ser más compleja. La adquisición de un espectro de ^1H RMN tras la inmediata disolución de 2-PFB_T en DMSO-d_6 y su posterior seguimiento con el tiempo, revelaron la existencia de un equilibrio (Figura 99). La especie mayoritaria inicialmente reduce su intensidad a medida que transcurre el tiempo, observándose la aparición de un segundo grupo de señales (marcadas en azul), que pasan a ser mayoritarias tras 1 h.

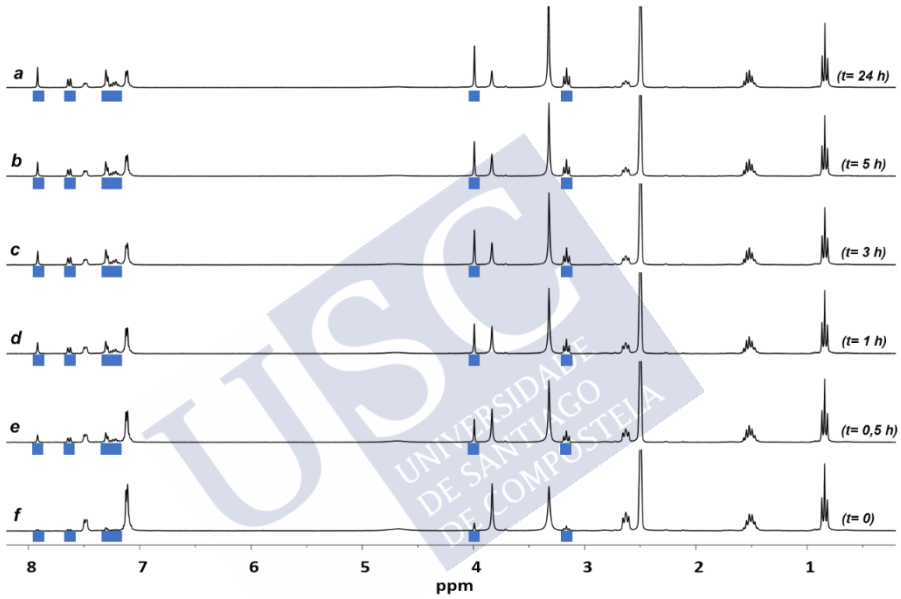


Figura 99. Espectros de ^1H RMN de 2-PFB_T [21.5 mM] en DMSO-d_6 diferentes tiempos.

Para elucidar la estructura de las especies en equilibrio, se decidió realizar un experimento de ^{11}B RMN para determinar la hibridación del átomo de boro en ambas especies. Debido al prolongado tiempo de la adquisición de los espectros de boro, el primer punto se realizó a t=0.5 h. A tiempos cortos se observa la presencia de dos clases de boro, uno de geometría tetraédrica con hibridación sp^3 y desplazamiento δ: 15.6 ppm, y otro con geometría trigonal plana de hibridación sp^2 y desplazamiento δ: 32.0 ppm (Figura 100).

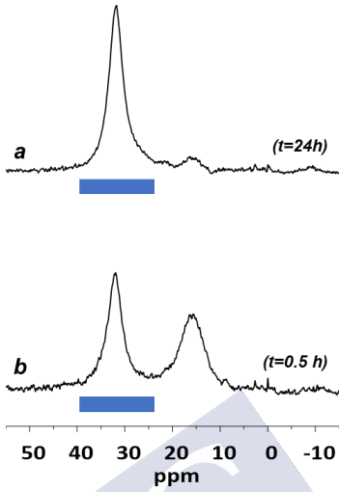


Figura 100. Espectros de ^{11}B RMN de 2-PFB$_T$ [21.5 mM] en DMSO-d$_6$ tras a) 24 h y b) 0.5 h.

Es conocido que la boroxina del ácido fenilborónico (PBA) se encuentra en equilibrio con el ácido en $CDCl_3$.[316] Chaudhari demostró mediante experimentos de DOSY que es posible discriminar las señales de ^{1}H RMN y realizar una asignación precisa de los protones pertenecientes a la boroxina, el dímero y monómero del PBA debido al diferente peso molecular entre especies que provocará diferencias en sus respectivas difusiones.[317] Mediante un análisis de DOSY realizado 12 h tras la disolución del 2-PFB$_T$ en DMSO-d$_6$, se observa que las señales de la nueva especie (asignados en azul) tienen una difusión más rápida que los de la especie original 2-PFB$_T$ (asignados en rojo). También se observa cómo estas especies comparten el mismo desplazamiento químico de los protones 12 y 13, ya que presentan valores de difusión media.

Correlacionando los datos de ^{11}B RMN y DOSY se concluyó que la nueva especie es más pequeña (tiene una difusión más rápida que la original) y posee un boro sp^2. Debido a que las especies diméricas de los ácidos borónicos no son tan comunes en disolución,[318] la nueva especie se asignó inicialmente

[316] Diemer, S. L.; Kristensen, M.; Rasmussen, B.; Beeren, S. B.; Pittelkow, M. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 21858-21872.
[317] Chaudhari, S. R. *Chem. Phys. Lett.* **2015**, *634*, 95-97.
[318] Chaudhari, S. R. *Chem. Phys. Lett.* **2015**, *634*, 95-97.

al ácido borónico 2-PFB o el benzazaborol 2-PFB$_B$ (Figura 101). Posteriormente, en base a sus desplazamientos químicos por ^{1}H a campo bajo respecto a 2-PFB$_T$, se decidió asignar al compuesto 2-PFB$_B$, en el que la contribución de la forma resonante zwitteriónica justificaría esos desplazamientos. Además, mediante una estimación de los pesos moleculares de los compuestos a partir de los datos de DOSY [319] se confirma que la estructura con una difusión más lenta en disolución tiene un MW aproximadamente 3 veces superior a la especie con la difusión más rápida y un radio hidrodinámico 1.73 veces superior.

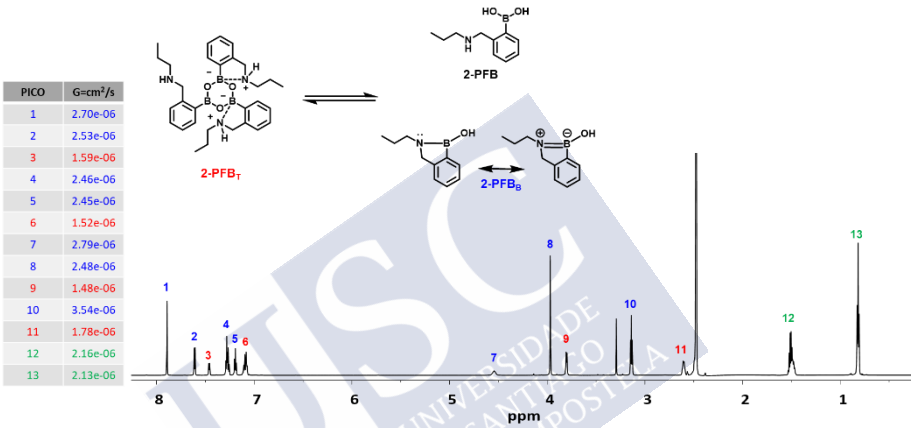


Figura 101. Análisis del experimento DOSY de 2-PFB$_T$ en DMSO-d_6 tras 12h de equilibrado en disolución.

Se observó que el equilibrio monómero-trímero, además de ser dependiente del tiempo, también es dependiente de la concentración de 2-PFB$_T$, obteniéndose mayor proporción de monómero a medida que decrece la concentración de boroxina en disolución. Este efecto se puede observar tanto en los espectros de ^{1}H RMN (Figura 102) como en los de ^{11}B RMN (Figura 103), donde a concentración 4.3 mM, no se observan señales de trímero. A medida que la concentración aumenta, se puede observar la aparición de señales a los desplazamientos característicos de 2-PFB$_T$ en ^{1}H y ^{11}B RMN (señal a δ: 15.6 ppm, característica de los boros tetraédricos de la boroxina).

[319] Evans, R.; Dal Poggetto, Nilsson, M.; Morris, G.A. *Anal. Chem*. **2018**, *90*, 3987-3994.

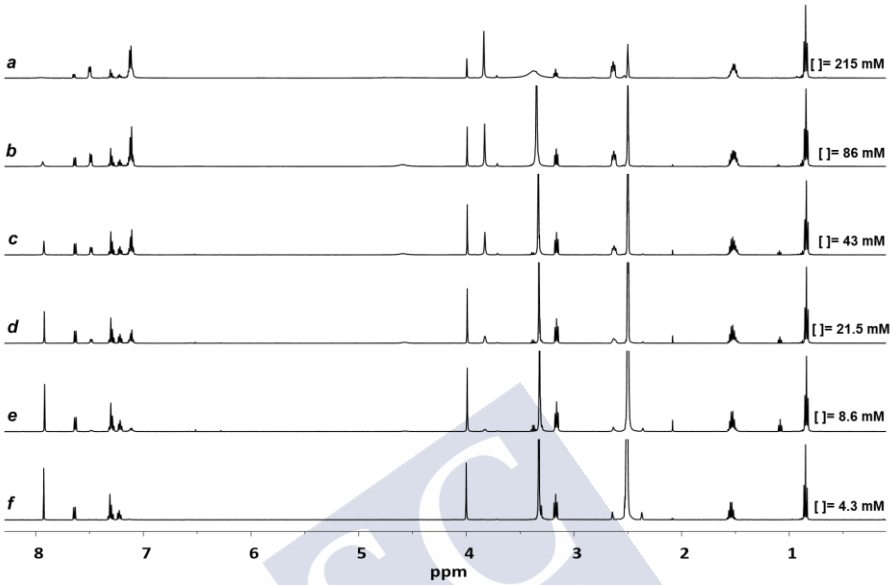


Figura 102. Espectros de ^{1}H RMN de 2-PFB$_T$ en DMSO-d_6 a diferentes concentraciones.

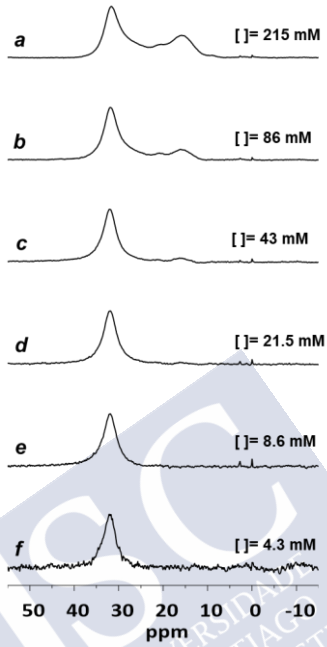
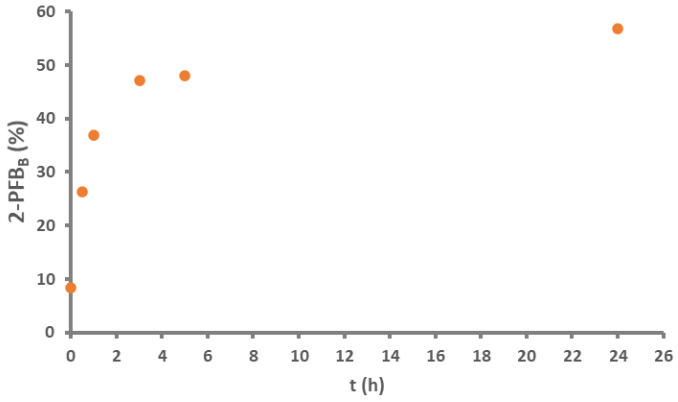


Figura 103. Espectros de ^{11}B RMN de 2-PFB_T en DMSO-d_6 a diferentes concentraciones.

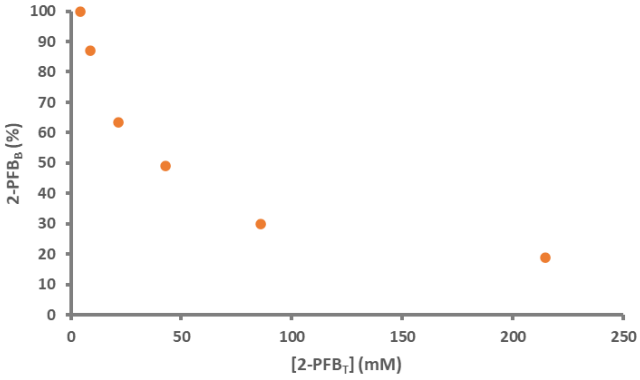
Los equilibrios entre la boroxina 2-PFB_T y el benzazaborol 2-PFB_B se pueden representar gráficamente como funciones dependientes del tiempo (Gráfica 1) o de la concentración (Gráfica 2), mediante integración de sus señales características en ^{1}H RMN y ^{11}B RMN.

Para la determinación del porcentaje de 2-PFB_B en disolución dependiente del tiempo, se trabajó a una concentración fija de 21.5 mM de 2-PFB_T en DMSO-d_6, donde se puede observar una conversión rápida de la boroxina en monómero por ^{1}H RMN, llegando prácticamente a un 50% en apenas 3 h. Tras 24 h en disolución se alcanza una proporción de 56% benzazaborol y 44% boroxina.



Gráfica 1. Porcentaje de 2-PFB$_B$ en disolución en función del tiempo. Análisis por ^{1}H RMN.

Para la determinación del porcentaje de benzazaborol dependiendo de la concentración de 2-PFB$_T$ en disolución, se trabajó a un tiempo fijo de 12 h y se integraron las señales de ^{1}H RMN.



Gráfica 2. Porcentaje de 2-PFB$_B$ en función de la concentración de 2-PFB$_T$ en disolución. Análisis por ^{1}H RMN.

4.2.2. Estudios estructurales de la interacción entre 2-PFB$_B$ con 1,2-dihidroxibenceno, 1,2-etanodiol y 1,3-propanodiol.

Anslyn et al. han descrito un estudio estructural en profundidad mediante análisis de ^{11}B RMN de las interacciones entre ácidos borónicos tipo Wulff (con aminas terciarias) y diferentes dioles. Concluyeron que en disolventes apróticos, se produce mayoritariamente un enlace dativo N→B en los ésteres

borónicos resultantes. Por otro lado, en disolventes próticos la inserción de disolvente es dominante. Ambos mecanismos son consecuencia de un incremento en la acidez del boronato. Además, en su estudio, Anslyn proporcionó un rango de desplazamientos de boro en los que se podrían encontrar estas especies, situando las especies con enlace N→B entre δ: 12-16 ppm y las que presentan inserción de disolvente entre δ: 8-12 ppm.[260]

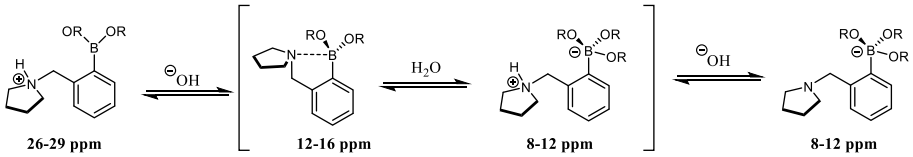


Figura 104. Diferentes especies de ácidos y ésteres borónicos y sus respectivos desplazamientos en ^{11}B RMN.

Aunque el equilibrio entre ácidos borónicos tipo Wulff y dioles se ha analizado ampliamente por espectroscopía de ^{11}B RMN,[320] apenas existen precedentes bibliográficos donde se haga un estudio sistemático de experimentos conjuntos de ^{11}B y ^{1}H RMN. Estos estudios podrían ofrecer información sobre las especies involucradas mucho más relevante que la obtenida en base a los desplazamientos químicos de ^{11}B RMN. Por este motivo, y para conocer mejor la estructura de los ésteres borónicos derivados de aminas secundarias formados entre los copolímeros de bloque descritos por nuestro grupo y los diferentes dioles estudiados en su agregación, se realizó un análisis en profundidad de estas interacciones mediante RMN de ambos núcleos en tres disolventes deuterados diferentes, DMSO-d_6, CD_3OD y $CDCl_3$. Para analizar de forma precisa los cambios que se producen en los desplazamientos químicos de las especies y, a la vez obtener información sobre las afinidades relativas de los dioles, se realizaron valoraciones por adición de cantidades incrementales de diol sobre una cantidad fija de 2-PFB_T.

4.2.2.1. 1,2-Dihidroxibenceno

La primera molécula estudiada fue el 1,2-dihidroxibenceno (catecol). Esta molécula presenta una de las afinidades más elevadas frente a ácidos borónicos, y en presencia del copolímero de bloque PEG-[G3]-BO_2H_2 es capaz de formar micelas estables en disolución.

---

[320] Chapin, B. M.; Metola, P.; Lynch, V. M.; Stanton, J. F.; James, T. D.; Anslyn, E. V. *J. Org. Chem*. **2016**, *81*, 18, 8319-8330.

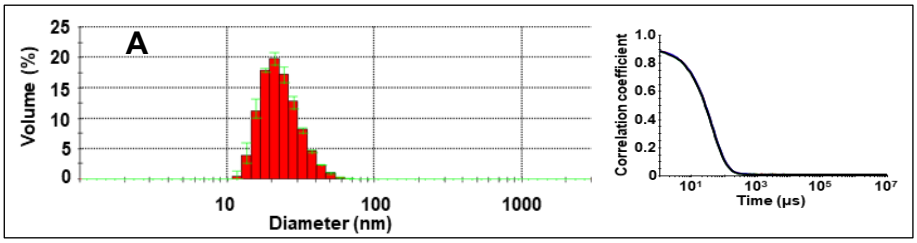


Figura 105. Micelas formadas por interacción del copolímero de bloque PEG-G3]-BO_2H_2 y 1,2-dihidroxibenceno.

La primera valoración llevada a cabo entre 2-PFB_T y 1,2-dihidroxibenceno fue realizada en DMSO-d_6. Para simplificar el análisis de las figuras, en las siguientes valoraciones se mostrará la estructura del benzazaborol 2-PFB_B, ya que se trata de la especie mayoritaria a la concentración en la que se realizan las valoraciones. Además, se ha determinado que, durante las valoraciones, las señales correspondientes a 2-PFB_T se consumen más rápidamente que las de 2-PFB_B, de tal forma que ya en el primer espectro de todas las valoraciones, la cantidad de 2-PFB_T es residual.

Como se puede observar en la valoración de ^{11}B MRN, el éster borónico de 1,2-dihidroxibenceno tiene un desplazamiento de δ: 15.0 ppm (Figura 107), que coincide dentro del rango de enlace N→B descrito por Anslyn (12-16 ppm). Asimismo, mediante el análisis de ^{1}H RMN (Figura 106) se obtiene información estructural imposible de acceder a través del espectro de boro. Cuando se produce el enlace N→B entre la amina secundaria y el átomo de boro, el nitrógeno se convierte en un centro quiral, resultando en la formación de dos enantiómeros en disolución y el desdoblamiento de los protones H2 y H3 más cercanos a este átomo, que pasan a ser diastereotópicos. Además, se observa cómo la señal bencílica situada a δ: 4 ppm cambia su multiplicidad de singlete a dos dobles dobletes, ya que estos portones no solo pasan a ser diastereotópicos y a acoplar entre sí, sino también con el protón del NH.

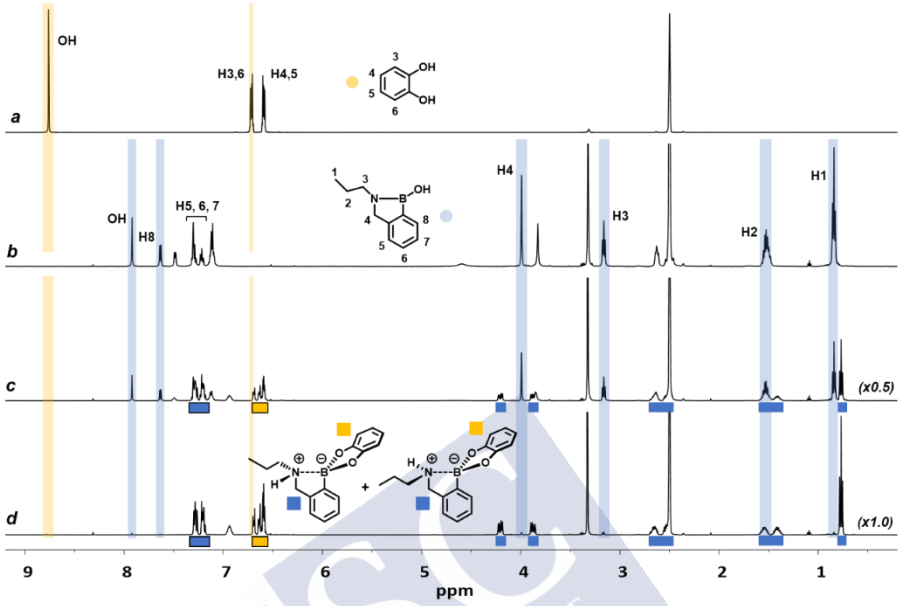


Figura 106. Valoración de ^{1}H RMN de 2-PFB con 0.5 y 1.0 equiv de 1,2-dihidroxibenceno a en DMSO-d_6.

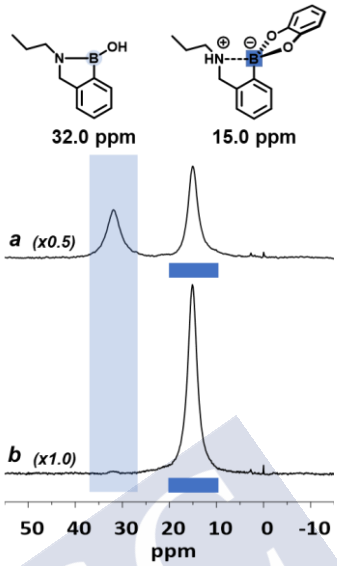


Figura 107. Valoración de ^{11}B RMN de 2-PFB con 0.5 y 1.0 equiv 1,2-dihidroxibenceno en DMSO-d_6.

Mediante un experimento de RMN TOCSY (Figura 108) sobre la valoración a 1 eq se pudieron confirmar las asignaciones en el espectro de ^{1}H RMN. Para simplificar el análisis y señalar las conectividades se ha representado la estructura de sólo uno de los enantiómeros. En el espectro se puede observar la correlación de H4 (NH) con los protones de la cadena de propilo y con los protones bencílicos H5, confirmándose así las multiplicidades observadas en protón. Como es de esperar, se observa una mayor intensidad para las correlaciones H4-H3 y H4-H5. También se puede observar como las señales desdobladas H3 y H2 correlacionan con el protón H1, formando parte del mismo sistema químico.

Mediante este ejemplo se demuestra cómo al análisis conjunto de los espectros de ^{1}H y ^{11}B RMN permiten obtener una información estructural precisa de los ésteres borónicos (presencia de dos enantiómeros y ^{1}H diastereotópicos como resultado del enlace N→B por ^{1}H RMN, B con hibridación sp^3 por ^{11}B RMN).

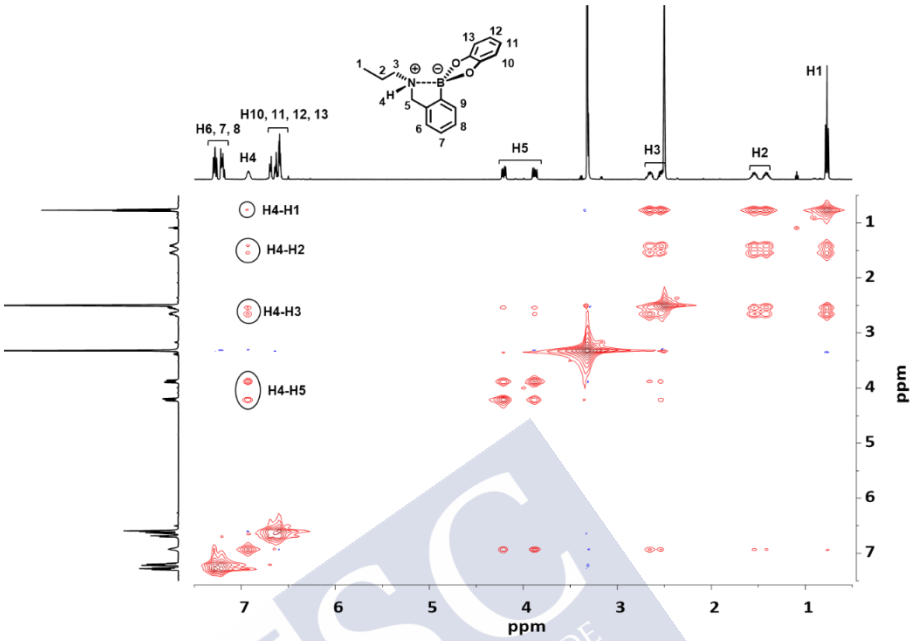


Figura 108. Espectro TOCSY de la valoración de 2-PFB$_B$ con 1,2-dihidroxibenceno a 1eq en DMSO-d$_6$.

Se procedió a continuación a estudiar el mismo equilibrio en CD_3OD. Mediante el análisis de ^1H RMN se puede ver que el espectro de protón es más simple que el obtenido en DMSO-d_6 (Figura 109). Esto es debido a que en disolventes próticos como el CD_3OD, en vez de producirse el enlace dativo N→B, se produce la inserción de disolvente sobre el átomo de boro, lo que provoca que la amina adquiera libre giro en disolución, hecho que simplifica por consiguiente las señales del éster borónico. En el espectro de ^{11}B RMN (Figura 110) se puede observar un pequeño desplazamiento desde δ: 10.8 ppm, correspondiente a la molécula 2-PFB$_{OMe}$, hasta δ: 11.6 ppm, debido al éster borónico de 1,2-dihidroxibenceno, que coincide también dentro del rango de desplazamientos descrito por Anslyn.

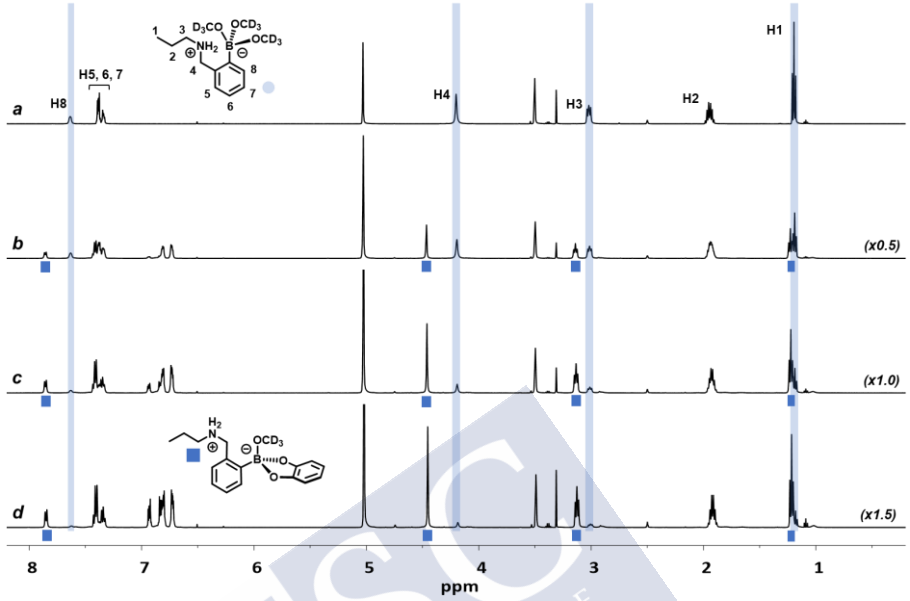


Figura 109. Valoración de ^{1}H RMN de 2-PFB con 0.5, 1.0 y 1.5 equiv de 1,2-dihidroxibenceno en CD_3OD.

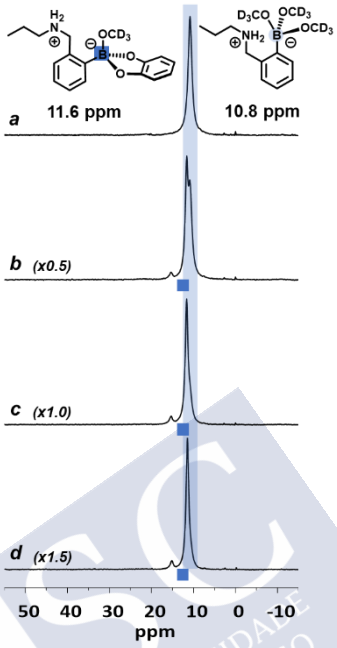


Figura 110. Valoración de ^{11}B RMN de 2-PFB$_B$ con 1,2-dihidroxibenceno a b) 0.5 eq, c)1 eq y d) 1.5 eq en CD_3OD.

Debido a que los experimentos de ^{11}B RMN en disolvente aprótico llevados a cabo por Anslyn se realizaron en $CDCl_3$, no se puede establecer una correlación directa entre los desplazamientos químicos obtenidos en DMSO-d_6 y los proporcionados en bibliografía. Por este motivo se decidió llevar a cabo una valoración también en $CDCl_3$.

Tras la adición de 1 eq de 1,2-dihidroxibenceno sobre una disolución de 2-PFB, se observa una señal situada a δ:15.07 ppm en el espectro de ^{11}B RMN, idéntica a la obtenida en DMSO-d_6, característica de especies con enlace dativo N→B y B sp^3 (Figura 111). Sin embargo, se puede observar que el espectro de ^1H RMN es muy similar al obtenido en CD_3OD, no se observa el desdoblamiento de señales como consecuencia de la formación de enantiómeros debido al enlace N→B.

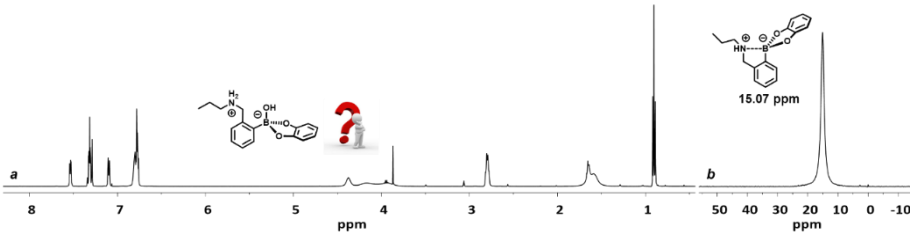


Figura 111. a) ^{1}H RMN y b) ^{11}B RMN de 2-PFB$_B$ de una mezcla de 2-PFB 1 equiv de con 1,2-dihidroxibenceno en $CDCl_3$.

Esta discrepancia entre los experimentos de ^{1}H RMN y ^{11}B RMN planteó la posibilidad de que en la valoración realizada en $CDCl_3$ se pudiera estar produciendo un fenómeno de conversión entre los dos enantiómeros a través de una estructura intermedia abierta.[250] Es decir, que debido a la menor polaridad de $CDCl_3$, la barrera energética que separa estas dos especies pudiera ser menor que en el caso del DMSO-d_6, facilitando su interconversión en la escala de RMN. Este equilibrio rápido entre especies daría lugar a un efecto de coalescencia en las señales de protón. Para comprobar esta hipótesis se realizaron experimentos de ^{1}H y ^{11}B RMN en $CDCl_3$ a diferentes temperaturas.

Mediante un análisis de esta valoración se puede confirmar la existencia de un fenómeno de coalescencia en $CDCl_3$ a temperatura ambiente, con un colapso de los protones situados a δ: 1.5, 2.6 y 4.4 ppm (Figura 112). A medida que desciende la temperatura se produce una separación de las señales debida a la existencia de los dos enantiómeros observados por ^{11}B RMN a 25 ºC. Efectivamente, los espectros de protón obtenidos a baja temperatura en $CDCl_3$ son similares a los obtenidos en DMSO-d_6 a temperatura ambiente. Por otro lado, en los espectros de ^{11}B RMN se aprecia un desplazamiento de la señal en torno a 0.8 ppm.

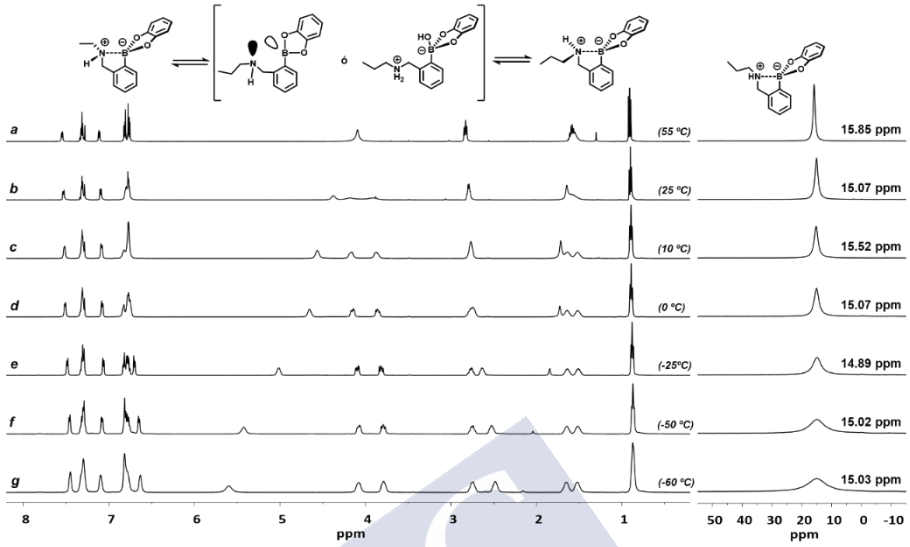


Figura 112. ^{1}H y ^{11}B RMN de 2-PFB con 1,2-dihidroxibenceno (1 equiv) a diferentes temperaturas en $CDCl_3$.

Ya que este fenómeno de coalescencia también debiera de ser observable también en DMSO-d_6, se decidió comprobar esta hipótesis mediante la realización de experimentos de ^{1}H y ^{11}B RMN a altas temperaturas en este disolvente.

Efectivamente, en el espectro de protón, a medida que se aumenta la temperatura, se produce el mismo fenómeno de coalescencia observado en $CDCl_3$, mediante el colapso de las señales de δ: 1.5, 2.6 y en torno a 4 ppm (Figura 113). En DMSO-d_6, no se produce un desplazamiento significativo de las señales en el espectro de boro, a diferencia de $CDCl_3$.

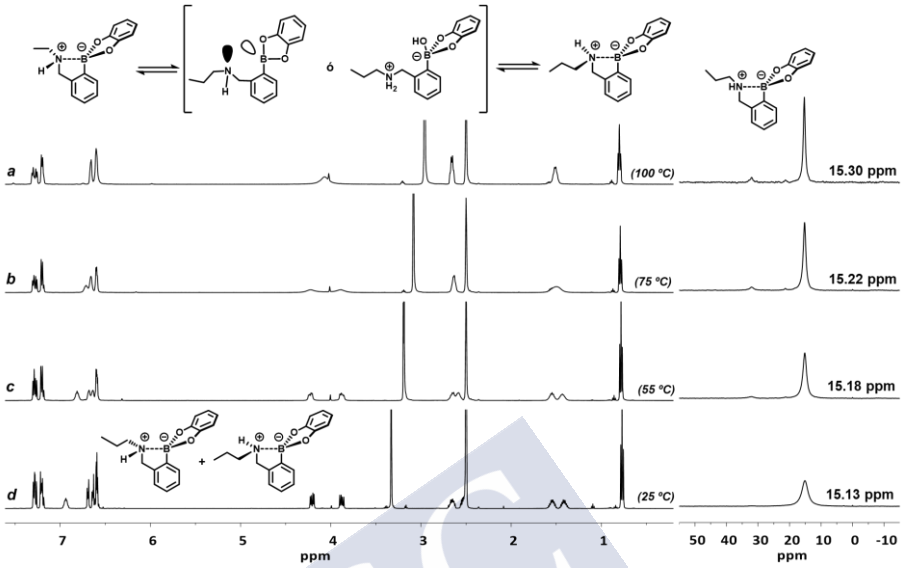


Figura 113. ^{1}H y de ^{11}B RMN de 2-PFB con 1,2-dihidroxibenceno (1eqiv) a diferentes temperaturas en DMSO-d_6.

Por último, se decidió comprobar el efecto de la temperatura sobre el éster borónico con inserción de disolvente en CD_3OD (Figura 114). Mediante la realización de espectros a baja temperatura, el análisis de ^{1}H RMN reveló que en el éster borónico con inserción de disolvente no se producen desdoblamientos de señales, indicativo de la inexistencia de enantiómeros. Además, en los espectros de ^{11}B RMN no se observa ningún desplazamiento de la señal.

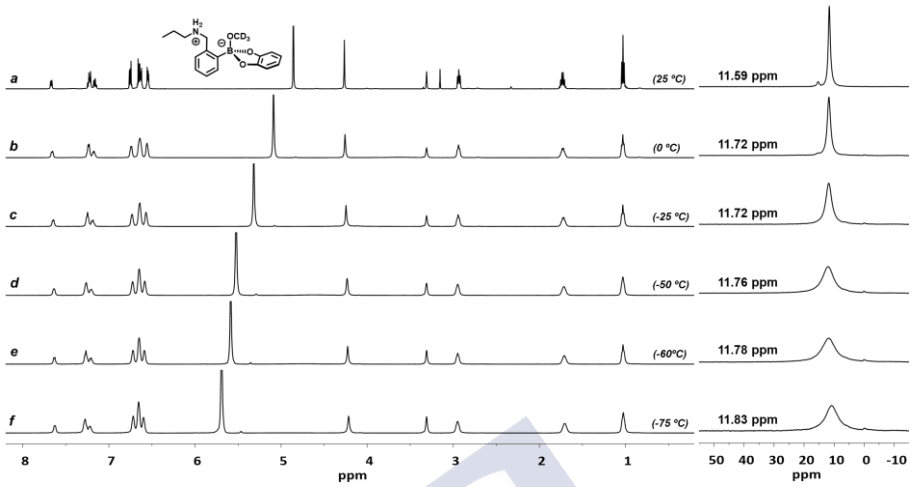


Figura 114. ^{1}H y ^{11}B RMN 2-PFB con 1,2-dihidroxibenceno (1 equiv) a diferentes temperaturas en CD_3OD.

Para investigar el efecto del fenómeno de coalescencia sobre las señales de protón y de boro en los ésteres borónicos derivados de 2-PFB, se decidió continuar el estudio con dos dioles modelo simples, el 1,2-etanodiol (1,2-diol) y el 1,3-propanodiol (1,3-diol).

4.2.2.2. 1,2-Etanodiol

El siguiente diol estudiado fue el 1,2-etanodiol. De un modo análogo al 1,2-dihidroxibenceno, se llevó a cabo su estudio mediante ^{1}H y ^{11}B RMN en DMSO-d_6 a temperatura ambiente. En el espectro de boro se observa una señal a 13.6 ppm (Figura 116), dentro del rango de especies con un enlace N→B descritas por Anslyn. Sin embargo, sorprendentemente, en el éster borónico del 1,2-etanodiol las señales de protón no sufren un desdoblamiento a temperatura ambiente en DMSO-d_6 (Figura 115), a diferencia de 1,2-dihidroxibenceno. Este hecho puede indicar que con este tipo de diol, las señales se pudiesen encontrar en coalescencia a esta temperatura.

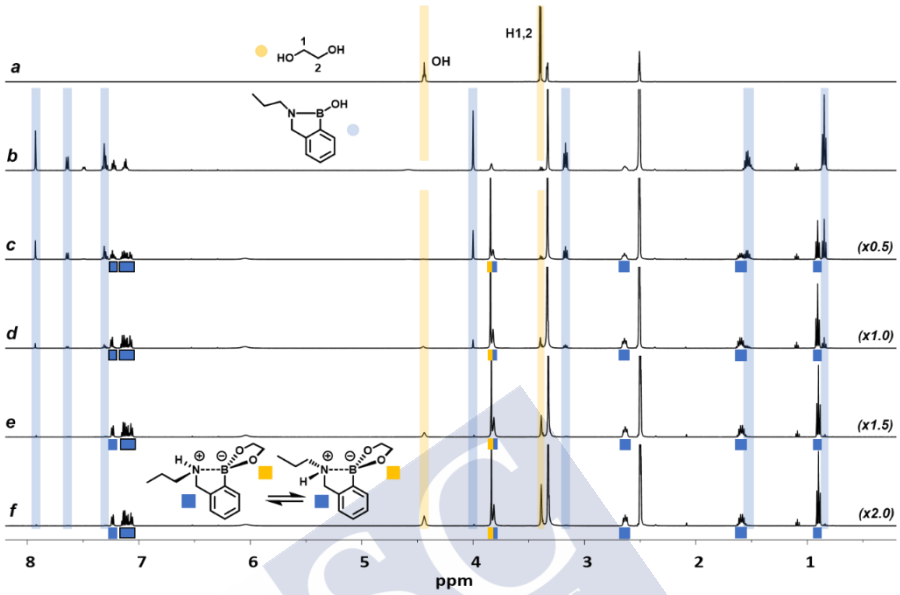


Figura 115. Valoración de ^{1}H RMN de 2-PFB a 25 ˚C con 1,2-etanodiol a c) 0.5 eq, d) 1 eq, e) 1.5 eq y f) 2 eq en DMSO-d_6.

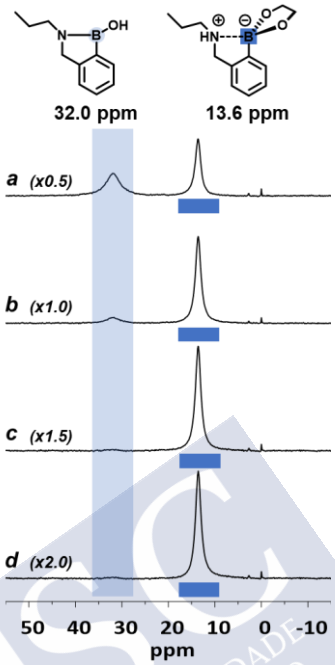


Figura 116. Valoración de ^{11}B RMN de 2-PFB$_B$ con 1,2-etanodiol a a) 0.5 eq, b)1 eq, c) 1.5 eq y d) 2 eq en DMSO-d$_6$.

La posibilidad de que se esté produciendo un efecto de coalescencia a temperatura ambiente en DMSO-d$_6$ no puede ser explorado en este disolvente mediante experimentos a baja temperatura debido al elevado punto de fusión de este disolvente (19 ºC). No obstante, se decidió investigar el efecto de mayores temperaturas sobre el equilibrio de reacción.

Como era previsto, no se produjo ninguna variación significativa en las multiplicidades de las señales de protón, observándose sólo una pequeña variación de 0.6 ppm en los espectros de boro (Figura 117). Sin embargo, a temperaturas elevadas, se observa la aparición de señales correspondientes a del producto 2-PFB$_B$, tanto en ^{1}H y ^{11}B RMN lo que indica que, en estas condiciones, el equilibrio de formación de los ésteres borónicos no se encuentra completamente desplazado hacia los productos de reacción.

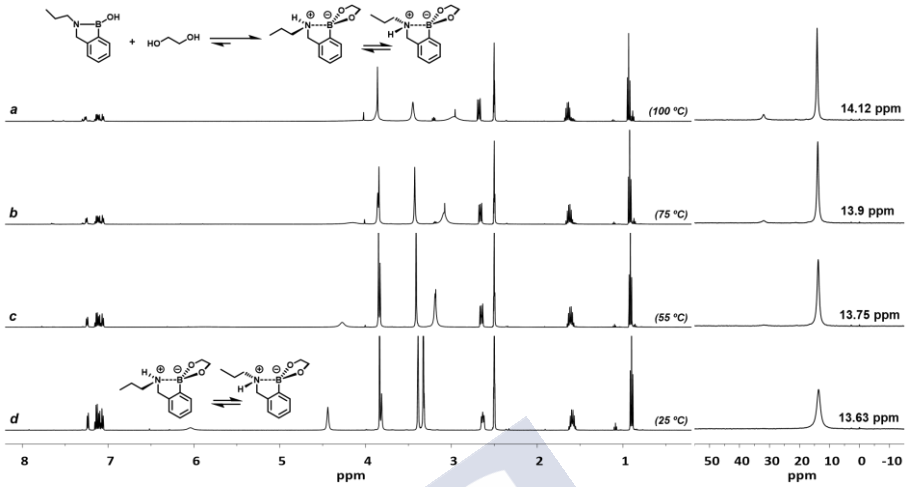


Figura 117. ^{1}H y de ^{11}B RMN de 2-PFB con 1,2-etanodiol (1 equiv) a diferentes temperaturas en DMSO-d_6.

La siguiente valoración realizada fue en CD_3OD. Como en el caso del 1,2-dihidroxibenceno, se produce la inserción de disolvente sobre el éster borónico del 1,2-etanodiol, con un desplazamiento químico característico en ^{11}B RMN de δ: 11.4 ppm (Figura 119). Asimismo, las señales de ^{1}H RMN tampoco presentan multiplicidad debido al libre giro de la amina en disolución (Figura 118). Hay que destacar que, en este disolvente, para que se produzca la reacción se necesitan un mayor número de equivalentes que en DMSO-d_6, llegando hasta los 100 equivalentes de 1,2-etanodiol por cada uno de 2-PFB_B.

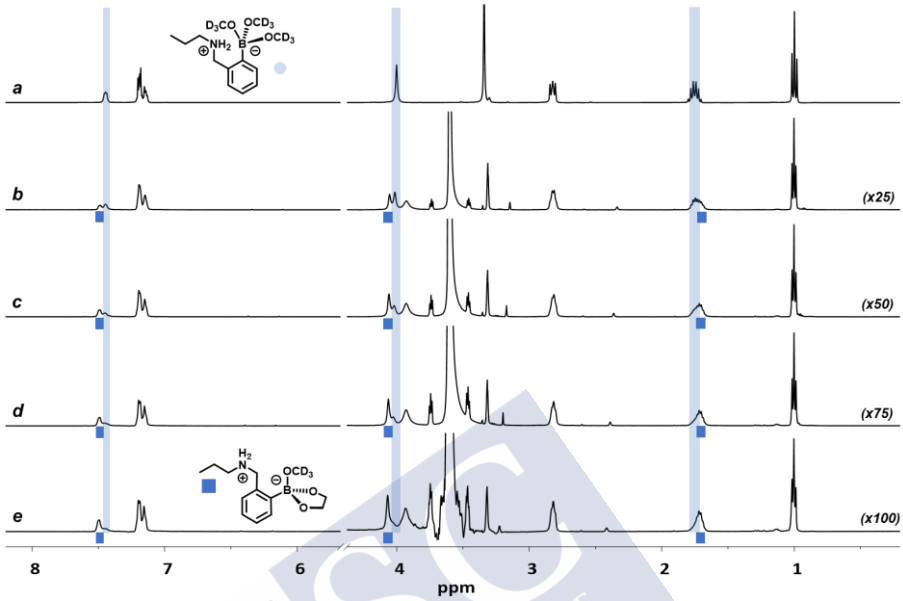


Figura 118. Valoración de ^{1}H RMN de 2-PFB a 25 ˚C con 1,2-etanodiol a b) 25 eq, c)50 eq, d)75 eq y d) 100 eq en CD_3OD.

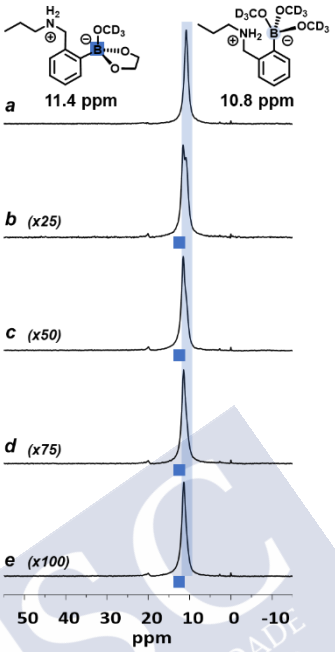


Figura 119. Valoración de ^{11}B RMN de 2-PFB a 25 ˚C con 1,2-etanodiol a b) 25 eq, c) 50 eq, d)75 eq y d) 100 eq en CD_3OD.

Debido a que el DMSO-d_6 impide comprobar la existencia del equilibrio entre enantiómeros en disolución, se decidió llevar a cabo un experimento a baja temperatura en $CDCl_3$. Se observó que a -50 ºC, se comienza a producir el fenómeno de coalescencia, observándose un desdoblamiento claro de las señales situadas a δ: 1.5 y 2.6 ppm a temperaturas más bajas. En los espectros de ^{11}B RMN se observó un mayor desplazamiento de las señales con la temperatura, con una variación cercana a 2 ppm entre -60 y 55 ºC. El hecho de que a mayor temperatura se esté produciendo un equilibrio rápido entre enantiómeros es compatible con una mayor contribución de la especie intermedia abierta en el desplazamiento químico de ^{11}B RMN. Como este desplazamiento se produce a campo bajo, es probable que el intermedio contenga un boro trigonal plano sp^2, en detrimento del intermedio boronato con hibridación sp^3 resultado de hidrólisis.

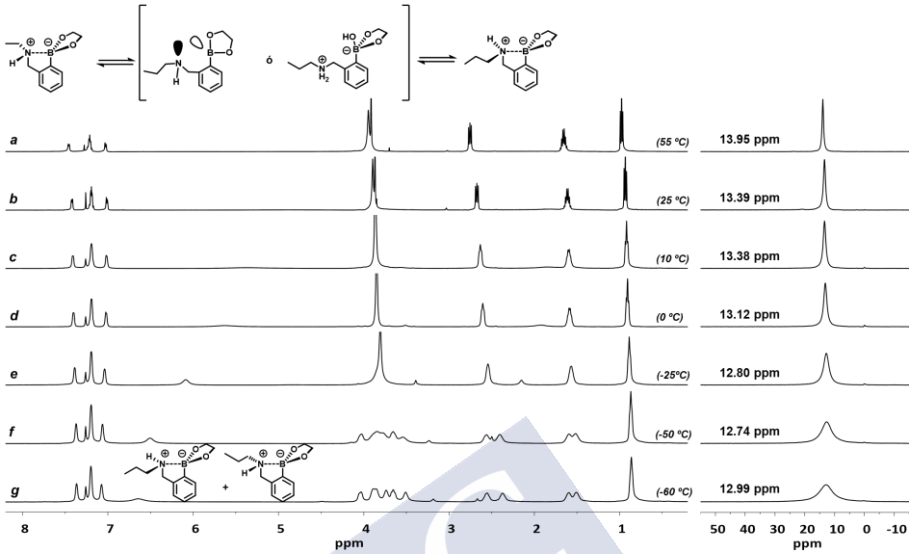


Figura 120. ^{1}H y ^{11}B RMN de 2-PFB con 1,2-etanodiol (1 equiv) a diferentes temperaturas en $CDCl_3$.

4.2.2.3. 1,3-Propanodiol

Por último, se analizó el diol con la interacción más débil de este conjunto, el 1,3-propanodiol. En este caso, el análisis de boro mostró un desplazamiento de δ: 10 ppm (Figura 122), que según los experimentos realizados por Anslyn se encuentra en el rango de las estructuras con inserción de disolvente (8-12 ppm) es decir, ésteres sin enlace dativo N→B. Este hecho es inusual para ésteres en un disolvente aprótico. Por este motivo, se decidió realizar una valoración en CD_3OD para estudiar los desplazamientos químicos de las especies de boro con inserción de disolvente.

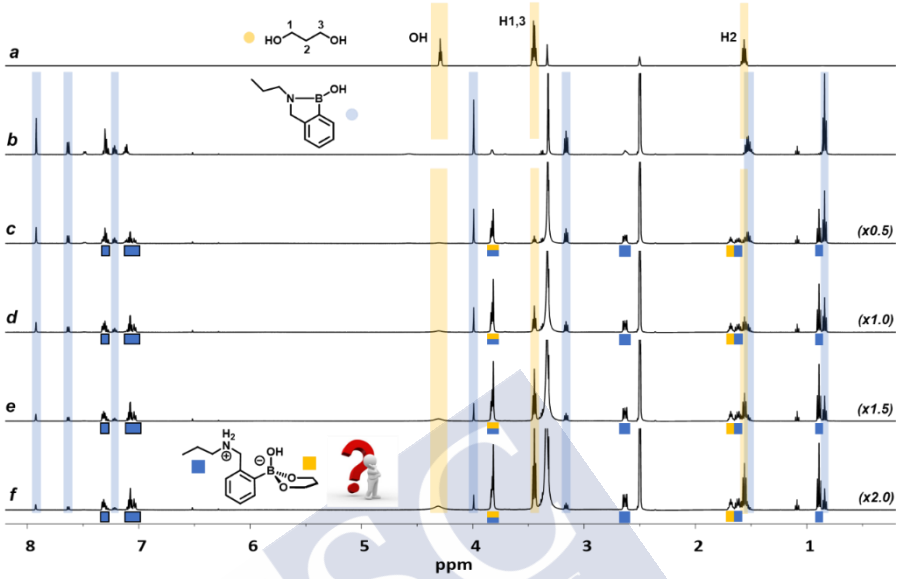


Figura 121. Valoración de ^{1}H RMN de 2-PFB a 25 ˚C con 1,3-propanodiol a c) 0.5 eq, d) 1 eq, e) 1.5 eq y f) 2 eq en DMSO-d_6.

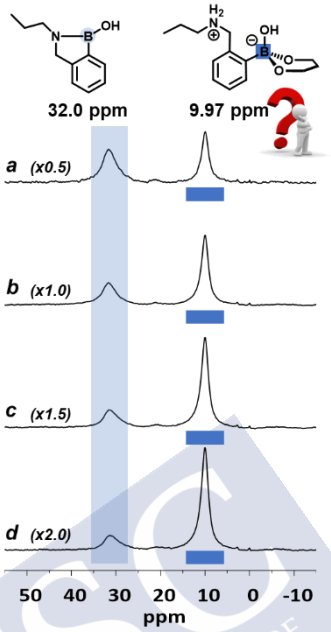


Figura 122. Valoración de ^{11}B RMN de 2-PFB$_B$ con 1,3-propanodiol a a) 0.5 eq, b)1 eq, c)1.5 eq y d) 2 eq en DMSO-d$_6$.

El experimento en CD_3OD reveló que el éster borónico con inserción de disolvente tenía un desplazamiento químico de boro todavía más bajo que el observado en DMSO-d$_6$, a δ: 8 ppm (Figura 124). Esta diferencia de más de 2 ppm entre espectros no podría justificarse fácilmente por el hecho de que el grupo insertado sea un -OMe o un -OH, ya que las diferencias entre los desplazamientos químicos de boro de las especies 2-PFB$_{OMe}$ y 2-PFB$_{OH}$ son inferiores a 0.5 ppm.

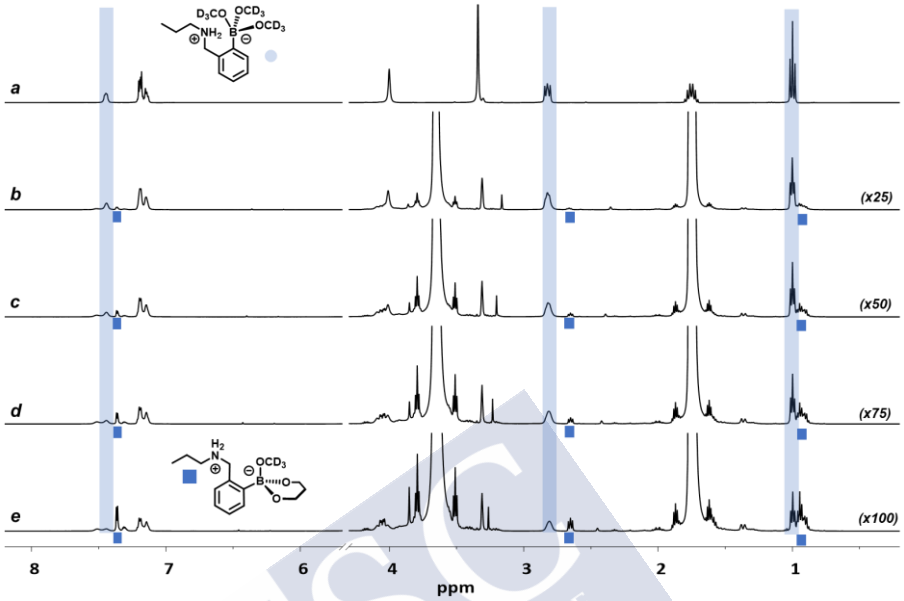


Figura 123. Valoración de ^{1}H RMN de 2-PFB$_B$ a 25 ˚C con 1,3 propanodiol a b) 25 eq, c) 50 eq, d) 75 eq y d) 100 eq en CD_3OD.

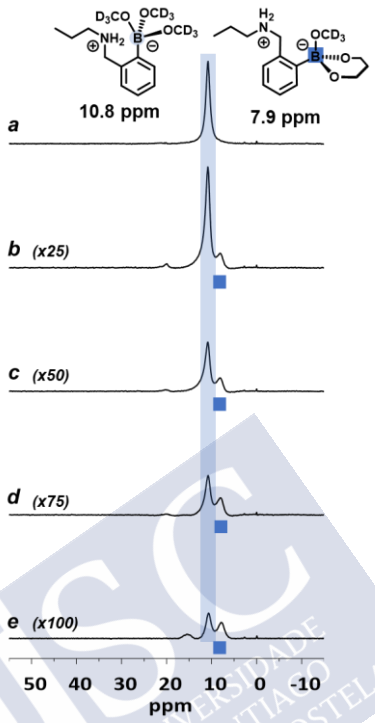


Figura 124. Valoración de ^{11}B RMN de 2-PFB a 25 ˚C con 1,3 propanodiol a b) 25 eq, c) 50 eq, d) 75 eq y d) 100 eq en CD_3OD.

Como se ha demostrado para el caso del 1,2-dihidroxibenceno, las especies derivadas de inserción de disolvente no presentan un cambio en el desplazamiento químico de boro que sea dependiente de la temperatura, ya que no existe un equilibrio entre enantiómeros que influya en el desplazamiento químico de la señal. Por lo tanto, se decidieron realizar experimentos en $CDCl_3$ y DMSO-d_6 con 1,3-propanodiol a diferentes temperaturas para comprobar su efecto sobre los desplazamientos químicos en protón y boro.

Como se puede observar en los experimentos realizados en DMSO-d_6, la temperatura no tuvo ningún efecto significativo sobre la multiplicidad o los desplazamientos de las señales en el espectro de ^1H RMN. No obstante, al igual que con 1,2-etanodiol, al aumentar la temperatura se pueden ver las señales del reactivo 2-PFB_B tanto en ^1H RMN como en el espectro de ^{11}B RMN.

Fue interesante comprobar la existencia de un desplazamiento de más de 2 ppm en la señal de boro (Figura 125), similar al caso del 1,2-etanodiol. Este cambio en el desplazamiento va desde δ: 10 ppm a δ: 12.25 ppm, situándose en el rango descrito por Anslyn para las especies con enlace N→B. Este hecho indica que las especies que se encuentran en DMSO-d_6 son los enantiómeros del éster borónico de 1,3-propanodiol en interconversión rápida, como en el caso del 1,2-etanodiol.

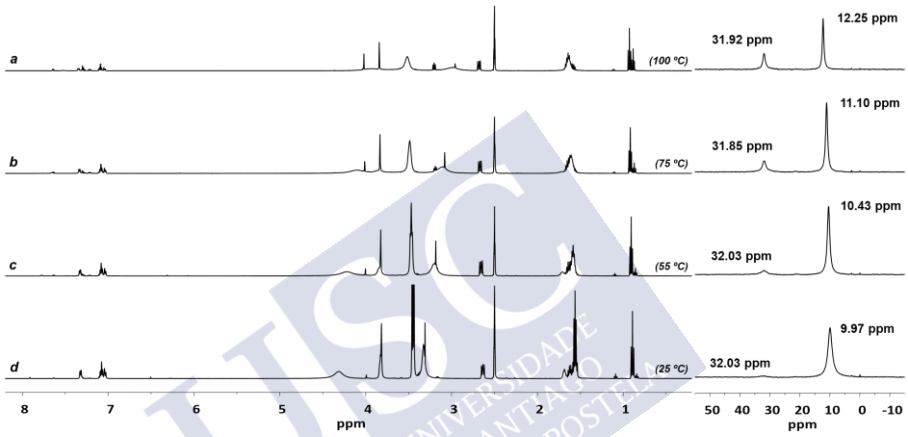


Figura 125. ^{1}H y ^{11}B RMN de 2-PFB con 1,3-propanodiol (1 equiv) a diferentes temperaturas en DMSO-d_6.

Para confirmar los datos obtenidos en DMSO-d_6, se realizó una valoración a baja temperatura en $CDCl_3$.

Como puede observarse, a temperatura ambiente en $CDCl_3$, el desplazamiento químico de boro coincide en el rango descrito por Anslyn para las especies con enlace dativo N→B y típica de disolventes apróticos. Sin embargo, al bajar la temperatura, esta señal sufre un desplazamiento químico muy pronunciado de más de 5 ppm, que va desde δ:14.52 ppm a 55 ºC hasta δ:9.22 ppm a -60 ºC. Por lo tanto, los desplazamientos descritos a temperatura ambiente en $CDCl_3$ no pueden considerarse absolutos, ya que describen un estado determinado de un equilibrio complejo entre dos enantiómeros que es dependiente del diol, disolvente y temperatura.

En el espectro de ^{1}H RMN a baja temperatura no se llega a observar un desdoblamiento de señales. Esto es debido a que la temperatura de

coalescencia es más baja que las correspondientes a 1,2-dihidroxibenceno y 1,2-etanodiol, por la menor afinidad de 1,3-propanodiol por 2-PFB.

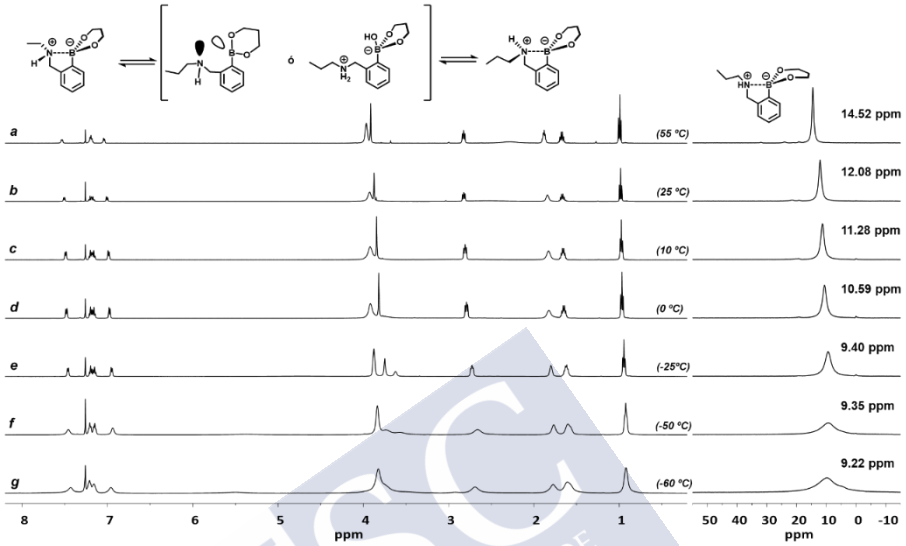


Figura 126. ^{1}H y ^{11}B RMN de 2-PFB con 1,3-propanodiol (1 equiv) a diferentes temperaturas en $CDCl_3$.

Haciendo un análisis conjunto de los datos, se establece: i) En disolventes apróticos (DMSO-d_6 y $CDCl_3$) se producen ésteres borónicos con un enlace dativo N→B, mientras que en disolventes próticos (CD_3OD) son mayoritarias las especies con inserción de disolvente, en concordancia con los estudios descritos en bibliografía. ii) En disolventes apróticos, para los ésteres borónicos derivados de 2-PFB se producen dos enantiómeros resultado de la formación del enlace N→B, los cuales se encuentran en un equilibrio dependiente del disolvente, la temperatura y el tipo de diol utilizado. iii) Para los ésteres borónicos estudiados, se observa en $CDCl_3$ un mayor efecto de la temperatura sobre el equilibrio entre enantiómeros que en DMSO-d_6. iv) Para los ésteres borónicos derivados de 2-PFB, es imposible establecer un rango absoluto de desplazamientos mediante espectroscopía de ^{11}B RMN que discrimine las especies de boro sp^3 tetraédricas con enlace N→B de las especies de boro sp^3 tetraédricas que contengan una inserción de disolvente, ya que dependiendo del tipo de diol y los equilibrios en disolución, el desplazamiento de las señales de boro puede llegar a solaparse. vi) La formación de ésteres borónicos derivados de 2-PFB_B es dependiente del

disolvente orgánico, observándose una conversión en orden decreciente: $CDCl_3$>DMSO-d_6>>>MeOD.

4.2.3. Estudios de afinidad de 2-PFB_B con 1,2 y 1,3-dioles en DMSO-d_6

El cálculo de afinidades entre ácidos borónicos y dioles se puede llevar a cabo utilizando diversas aproximaciones. Para el estudio de las constantes de afinidad en disolución acuosa destaca la metodología de fluorescencia basada en el ARS implementada por Wang y Springsteen.[228] Por otro lado, en 2016 Anslyn et al. utilizaron la espectroscopía de ^{11}B RMN para calcular las constantes de afinidad en disolvente orgánico (CD_3OD).[320]

En este apartado se realizará un estudio cualitativo por ^{1}H y ^{11}B RMN (DMSO-d_6) de la afinidad entre el 2-PFB y diversos tipos de 1,2 y 1,3 dioles empleados en los estudios de agregación del copolímero PEG-[G3]-BO_2H_2. El estudio de afinidades en DMSO-d_6 pretende servir de modelo de la interacción en el interior del *core* hidrofóbico de las micelas.

4.2.3.1. Catecoles

Las dos clases catecoles estudiados fueron el 1,2-dihidroxibenceno y la (-)-epicatequina.

- 1,2-Dihidroxibenceno

En el caso del 1,2-dihidroxibenceno se realizó una integración de los grupos -CH_3 de la cadena de propilo, ya que presentan un cambio claro del desplazamiento químico entre la especie 2-PFB_B y el éster borónico derivado. En la Gráfica 3 puede observarse que la valoración procede de forma casi cuantitativa.

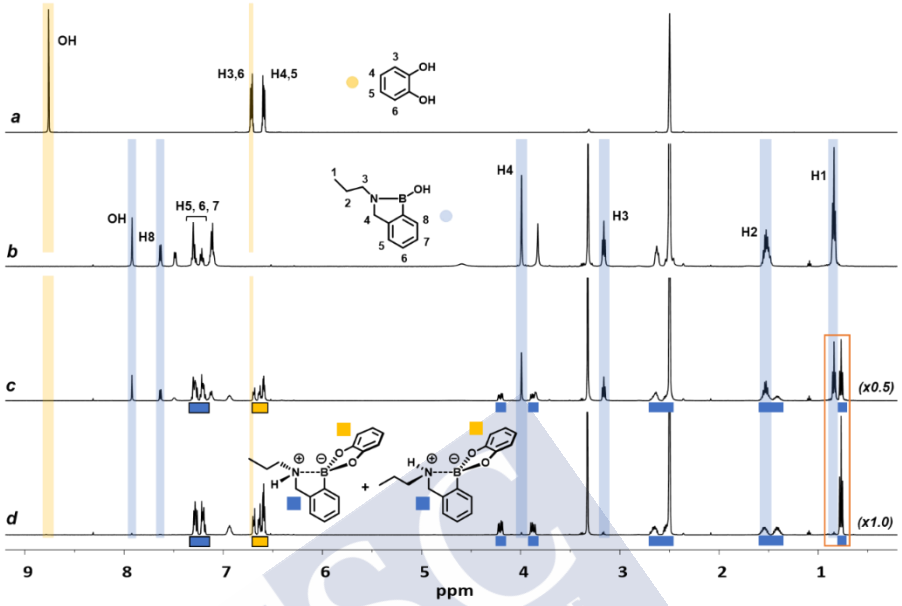


Figura 127. Señales utilizadas para la determinación de la formación del éster borónico con 1,2-dihidroxibenceno (marcadas en naranja).

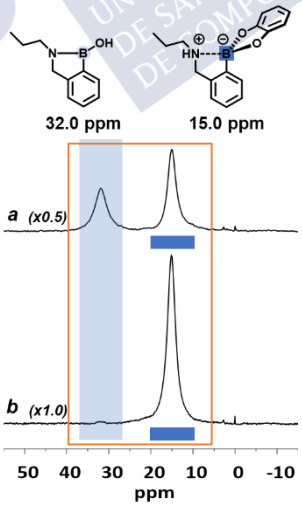
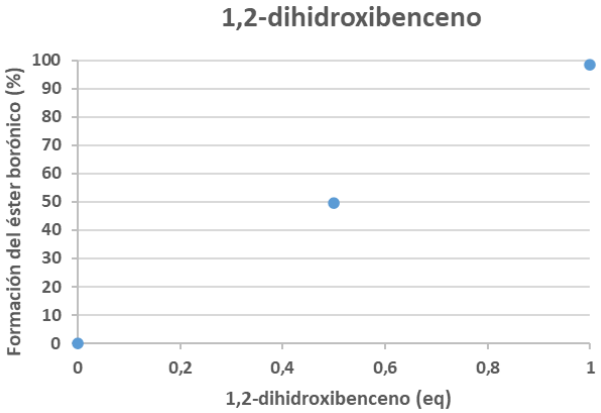


Figura 128. Señales utilizadas para la determinación de la formación del éster borónico (marcadas en naranja).

Como puede observarse en la gráfica, mediante la integración de las señales de ^{1}H RMN, se obtiene información precisa sobre el avance de la reacción.



Gráfica 3. Formación del éster borónico derivado de 2-PFB y catecol. Análisis mediante ^{1}H RMN.

- (-)-epicatequina

En la valoración de 2-PFB$_B$ con la (-)-epicatequina, en el espectro de ^{1}H RMN se utilizaron las señales de los protones aromáticos situados en α al grupo boro del 2-PFB$_B$ y el 2PFB$_T$. Se observó una desaparición de estas señales derivada de la formación del éster borónico. En el espectro de ^{11}B RMN los desplazamientos químicos están de acuerdo con lo esperado δ: 15.3 ppm (Figura 130).

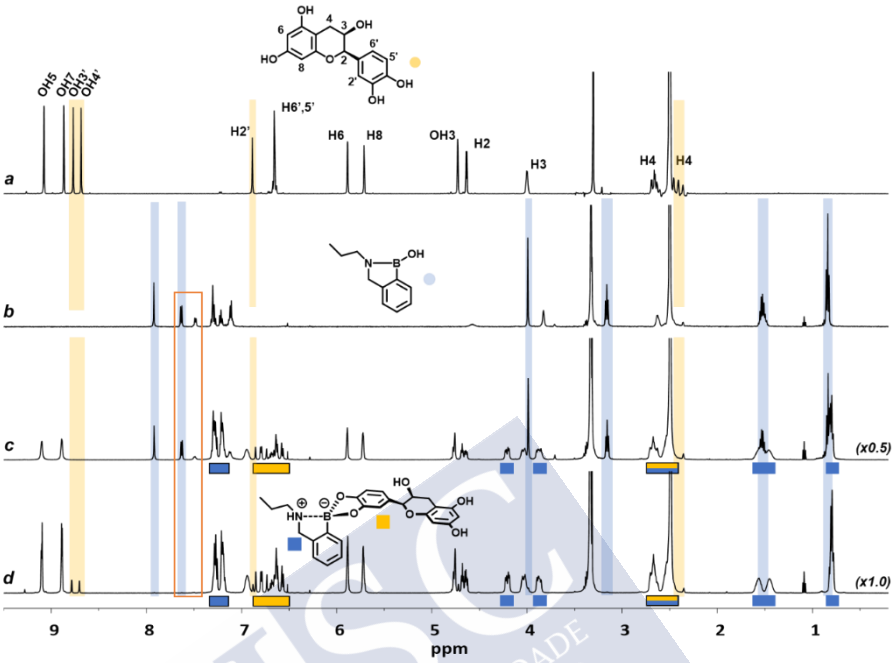


Figura 129. Señales utilizadas para la determinación de la formación del éster borónico (marcadas en naranja).

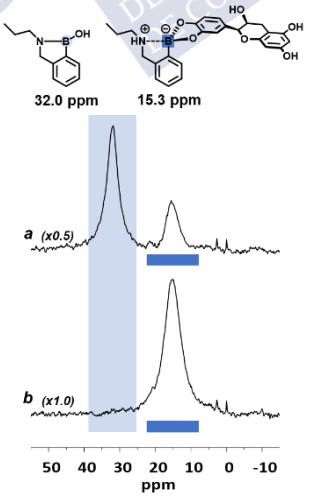
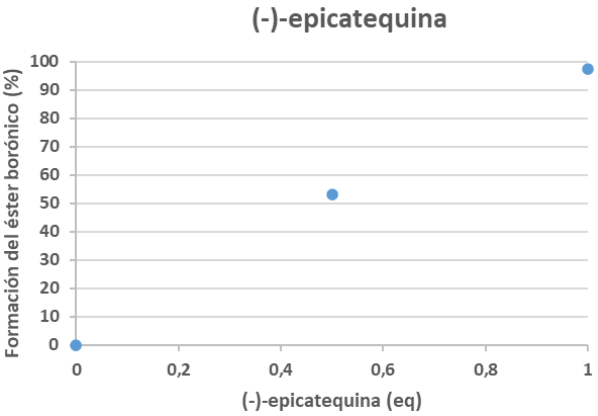


Figura 130. Valoración de ^{11}B RMN de la formación del éster borónico de la (-)-epicatequina.



Gráfica 4. Formación del éster borónico derivado de 2-PFB y (-)-epicatequina. Análisis mediante ^{1}H RMN.

4.2.3.2. 1,2-dioles

Los 1,2-dioles empleados en el estudio de la afinidad fueron el 1,2-etanodiol y el (R)-(+)-1,2-dodecanodiol.

- 1,2-etanodiol

El análisis de ^{1}H RMN y ^{11}B RMN del 1,2-etanodiol se realizó de una forma análoga al de la molécula de catecol, mediante integración de los grupos -CH_3 de la cadena de propilo.

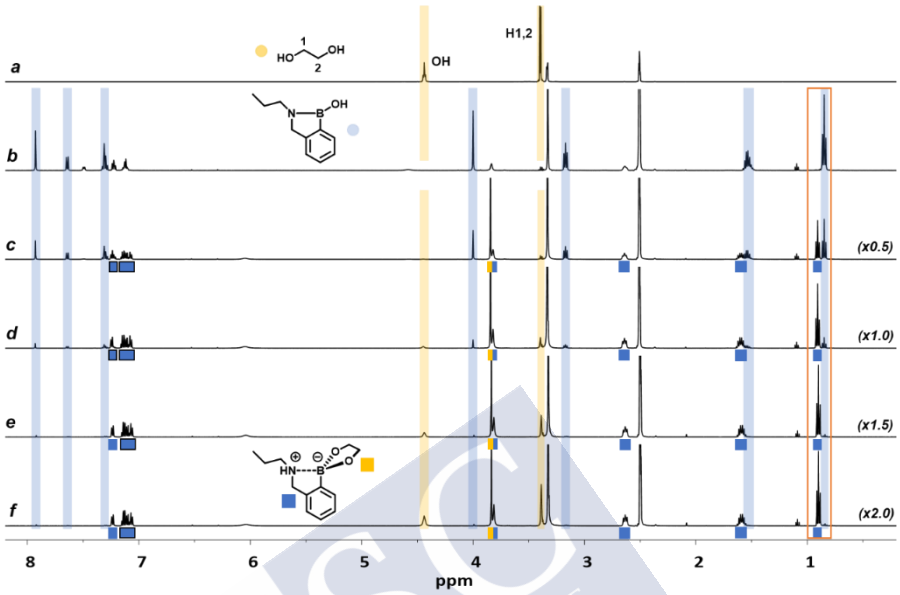


Figura 131. Señales utilizadas para la determinación de la formación del éster borónico (marcadas en naranja).

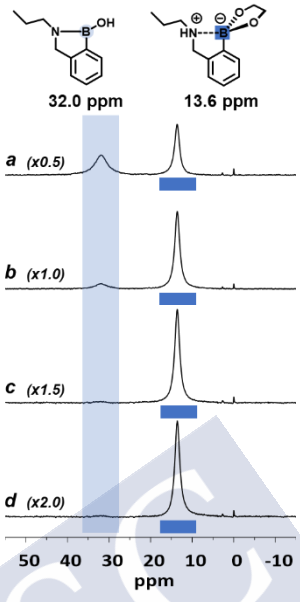
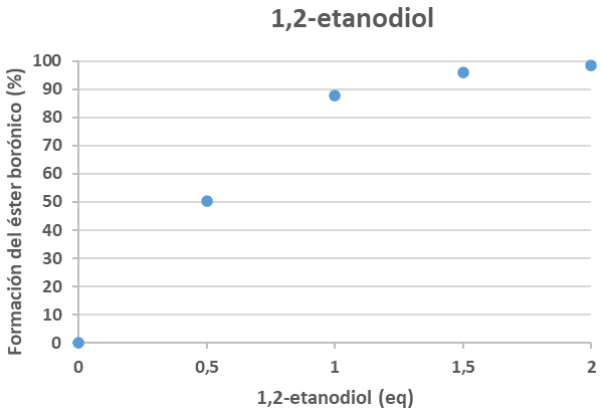


Figura 132. Valoración de ^{11}B RMN de la formación del éster borónico del 1,2-etanodiol.



Gráfica 5. Formación del éster borónico derivado de 2-PFB y 1,2-etanodiol. Análisis mediante ^{1}H RMN.

- (R)-(+)-dodecanodiol

El estudio de la afinidad mediante ^{1}H RMN del (R)-(+)-dodecanodiol se realizó de una forma análoga al de la (-)-epicatequina, realizando una integración de los protones aromáticos en α al grupo boro.

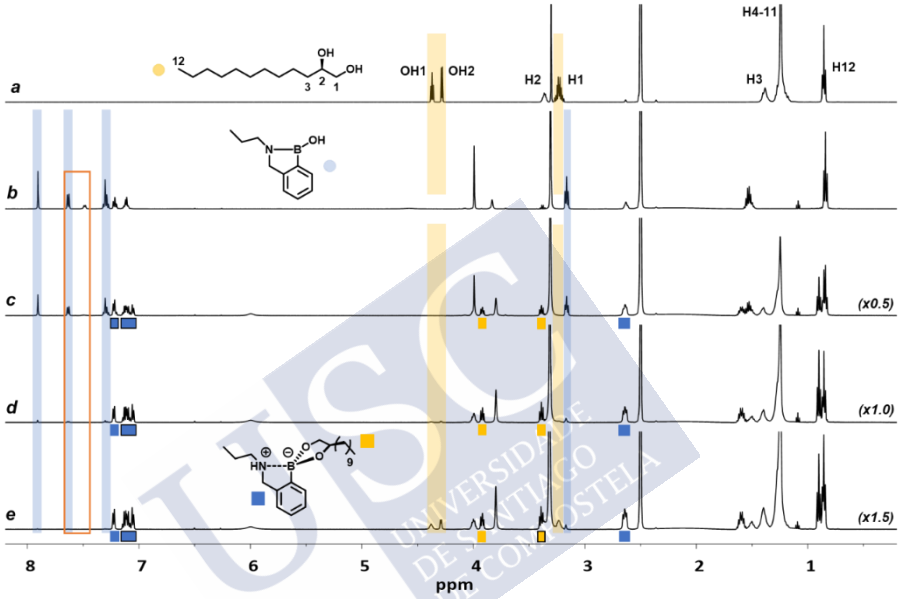


Figura 133. Señales utilizadas para la determinación de la formación del éster borónico (marcadas en naranja).

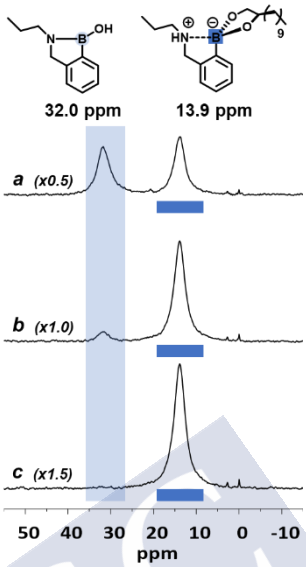
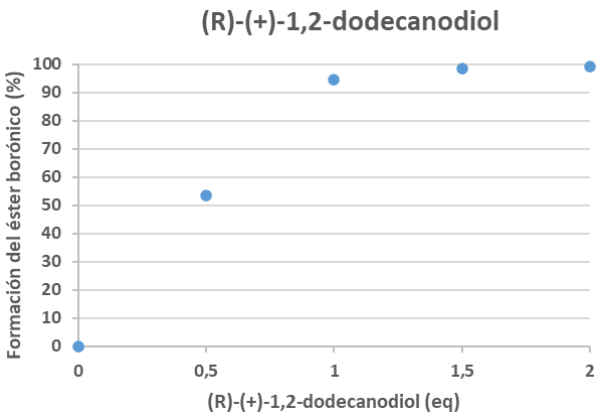


Figura 134. Valoración de ^{11}B RMN de la formación del éster borónico del (R)-(+)-1,2-dodecanodiol.



Gráfica 6. Formación del éster borónico derivado de 2-PFB y (R)-(+)-1,2-dodecanodiol. Análisis mediante ^{1}H RMN.

4.2.3.3. 1,3-dioles

Los 1,3-dioles empleados en el estudio de la afinidad con 2-PFB_B fueron el 1,3-propanodiol y el penciclovir.

- 1,3-propanodiol

El análisis de las señales en el espectro de ^{1}H RMN del 1,3-propanodiol se realizaron de una forma análoga a del catecol y 1,2-etanodiol, mediante integración de los grupos -CH_3.

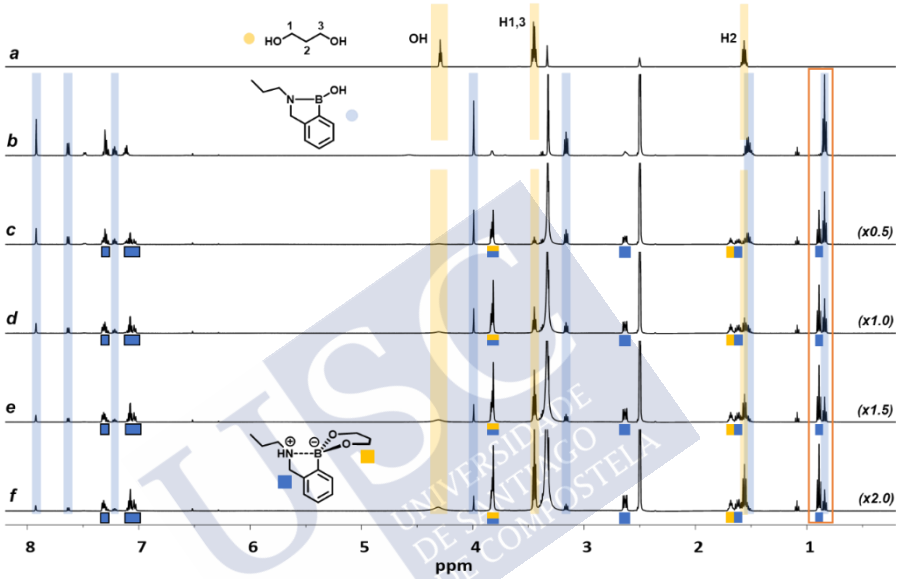


Figura 135. Señales utilizadas para la determinación de la formación del éster borónico (marcadas en naranja).

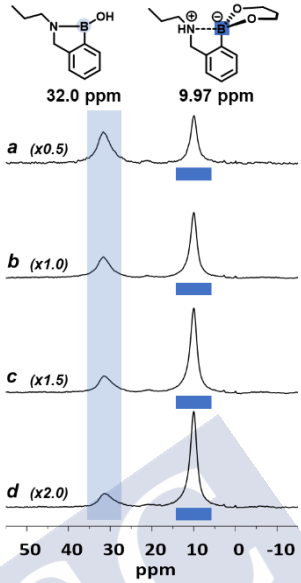
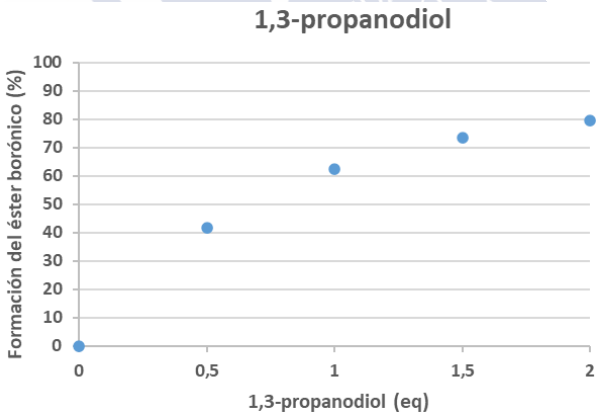


Figura 136. Valoración de ^{11}B RMN de la formación del éster borónico del 1,3-propanodiol.



Gráfica 7. Formación del éster borónico derivado de 2-PFB y 1,3-propanodiol. Análisis mediante ^{1}H RMN.

- Penciclovir

Para el estudio de la interacción entre el 2-PFB_B con el penciclovir, debido a la proximidad de las señales, se realizó una desconvolución de los picos correspondientes a los grupos -CH_3 de los reactivos y productos.

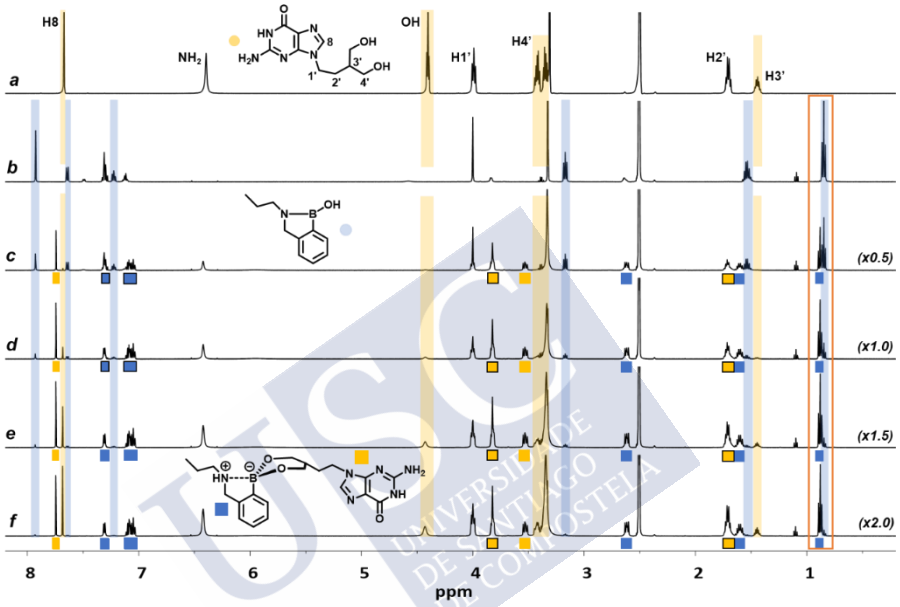


Figura 137. Señales utilizadas para la determinación de la formación del éster borónico (marcadas en naranja).

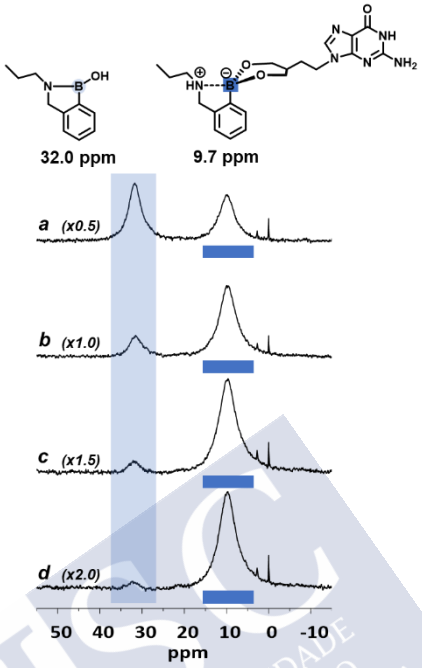
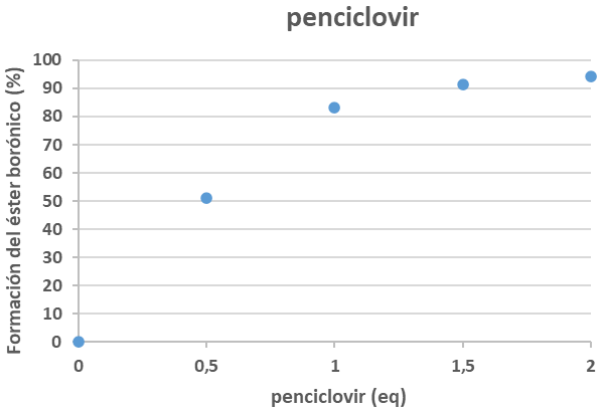


Figura 138. Valoración de ^{11}B RMN de la formación del éster borónico del penciclovir.

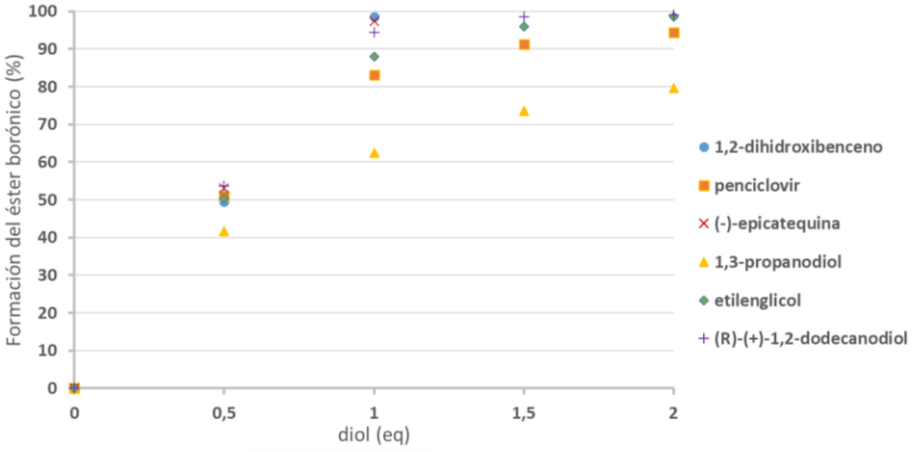


Gráfica 8. Formación del éster borónico derivado de 2-PFB y penciclovir. Análisis mediante ^{1}H RMN.

4.2.3.4. Análisis de las tendencias

Realizando un análisis conjunto de los datos, en general, se observan las tendencias de reactividad esperadas. El orden de afinidad se establece según: 1,2-dihidroxibenceno = (-)-epicatequina > (R)-(+)-1,2-dodecanodiol ≈ 1,2-etanodiol > penciclovir > 1,3-propanodiol.

Lo más destacado de la reactividad de los dioles estudiados con 2-PFB_B, es que el penciclovir presenta una afinidad muy superior a la de 1,3-propanodiol, aun siendo ambos 1,3-dioles. Este hecho puede ser debido a una mayor rigidez conformacional del diol de penciclovir, que puede provocar un aumento de la afinidad frente a 1,3-propanodiol.



Gráfica 9. Comparación de las afinidades relativas de los diferentes dioles con 2-PFB datos ^1H RMN.

4.2.4. Estudios de afinidad de 2-PFB_B con 1,2 y 1,3-dioles en DMSO-d_6/D_2O

Aunque la mayoría de los 1,2 y 1,3 dioles estudiados presentan afinidades elevadas por el sistema modelo 2-PFB en DMSO-d_6, no todas estas moléculas producen una agregación del copolímero de bloque PEG-[G3]-BO_2H_2 en disolución acuosa. Por ejemplo, 1,2-dihidroxibenceno, (R)-(+)-1,2-dodecanodiol y 1,2-etanodiol, a una relación estequiométrica 1:1 con 2-PFB en DMSO-d_6, presentan un porcentaje de formación de éster borónico del 98%, 94% y 87% respectivamente. Sin embargo, sólo 1,2-dihidroxibenceno y (R)-(+)-1,2-dodecanodiol conducen a la formación de micelas en disolución

acuosa. Es decir, las afinidades obtenidas en DMSO-d_6 no pueden ser utilizadas para justificar la formación de estas nanoestructuras.

En realidad, el proceso de formación de micelas ocurre a través de dos equilibrios (Figura 139). En primer lugar, se produce una interacción entre el copolímero de bloque y los dioles en disolución acuosa que produce una hidrofobización del bloque dendrítico y convierte al copolímero de bloque en un anfífilo. En segundo lugar, se produce el autoensamblaje del copolímero en disolución y la formación de micelas in situ. Los bloques dendríticos y ésteres borónicos se sitúan en el *core* hidrofóbico de las micelas y las cadenas de PEG forman la corona. Los estudios de afinidad realizados en disolvente orgánico describen los enlaces en el interior de la micela, pero no reflejan el primer equilibrio en disolución acuosa. En el proceso de formación de los ésteres se liberan dos moléculas de H_2O. Por tanto, es esperable que, en medio acuoso, los equilibrios de formación de ésteres se desplacen hacia la izquierda en función de la afinidad de cada diol. Este equilibrio menos favorecido en H_2O se ve compensado, sin embargo, por la formación de micelas que las que el *core* hidrofóbico actúa a modo de nanorreactor bombeando H_2O hacia el exterior y desplazando los equilibrios hacia la derecha. La formación de micelas es por tanto el resultado combinado de dos equilibrios. Ni una afinidad elevada, ni una hidrofobia elevada aseguran per se la formación de micelas; es la combinación de ambas propiedades las que determina el resultado final. Por este motivo se decidió realizar estudios de interacción entre 1,2-dihidroxibenceno, (R)-(+)-1,2-dodecanodiol y 1,2-etanodiol en DMSO-d_6/D_2O.

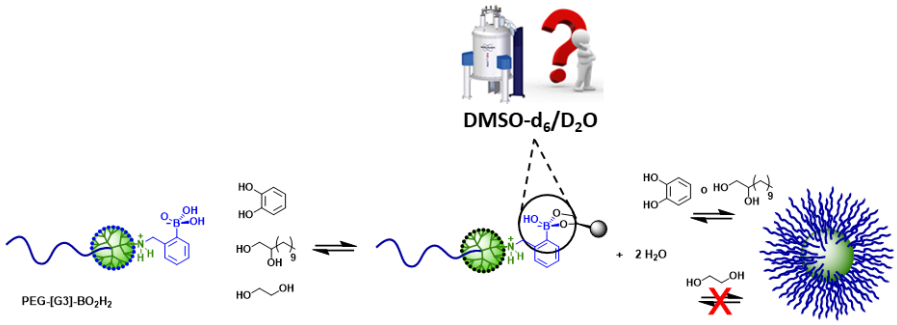


Figura 139. Estudio de la formación de los ésteres borónicos en disolución acuosa.

4.2.4.1. 1,2-Dihidroxibenceno

En esta valoración se llevó a cabo la adición de una cantidad estequiométrica de 1,2-dihidroxibenceno sobre una disolución de 2-PFB en DMSO-d_6 con un 30% de D_2O.

Mediante el análisis de ^{1}H RMN se puede observar que la afinidad relativa entre 2-PFB y el 1,2-dihidroxibenceno es menor de la que se produce en disolvente orgánico. A 1 eq de catecol se produce la formación de un 73% de éster borónico, en comparación con el 98% en DMSO-d_6. Se observa que el éster borónico está representado por tres especies en disolución, una con inserción de disolvente y los dos enantiómeros con enlace dativo N→B. Esto se ve reflejado en la aparición de los desdoblamientos característicos de estas estructuras en las señales situadas a δ: 1.5 ppm y el triplete situado a δ: 0.6 ppm.

Mediante la integración de las señales características de cada grupo de ésteres, se puede establecer que del 73% total, un 54% lo aporta la especie con inserción de disolvente, mientras que sólo en 29% corresponde a los ésteres con enlace N→B.

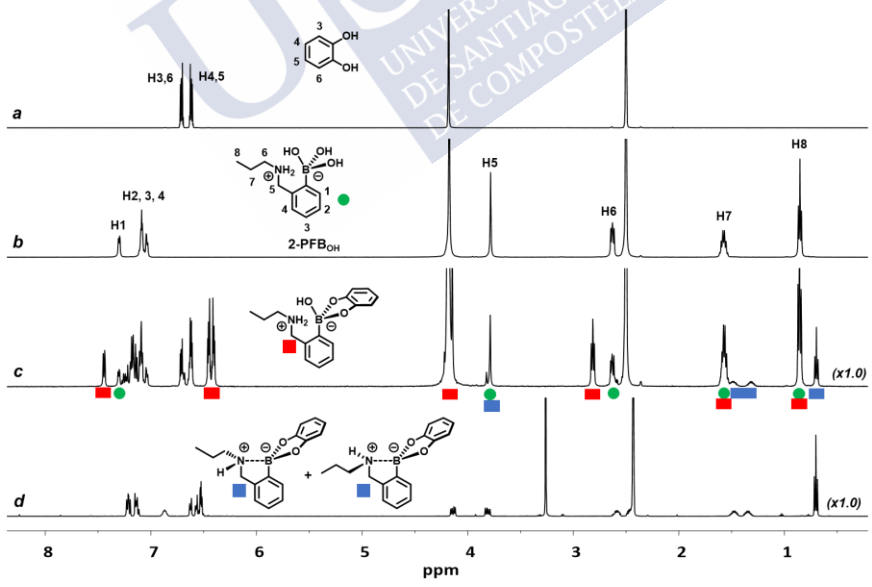


Figura 140. Valoración por ^{1}H RMN de 1,2-dihidroxibenceno (1 equiv) con 2-PFB en: c) 30% D_2O/DMSO-d_6, d) DMSO-d_6.

En el espectro de ^{11}B RMN se observa un ligero desplazamiento de la señal original de 2-PFB$_{OH}$ situado a δ: 10.37 ppm hasta δ: 10.74 ppm, que se asocia al éster borónico con inserción de agua. Además, se puede apreciar una ligera distorsión de la parte izquierda de la señal, resultado de la especie con enlace dativo N→B que en DMSO-d_6 presenta un δ: 15.0 ppm.

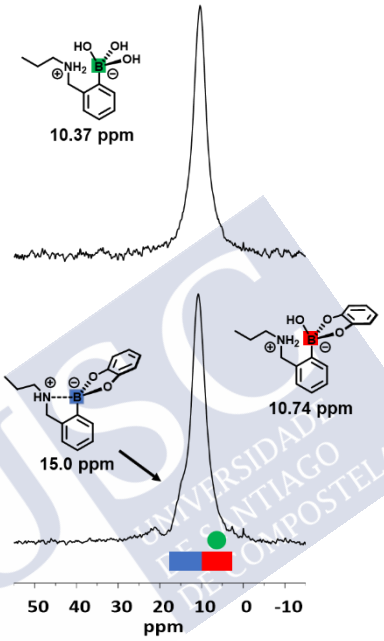


Figura 141. Valoración por ^{11}B RMN de 1,2-dihidroxibenceno (1 equiv) con 2-PFB (30% D_2O en DMSO-d_6).

El hecho de que exista la formación de un 73% de éster borónico entre 1,2-dihidroxibenceno y 2-PFB en disolución acuosa, confirma el hecho de que se produzcan las micelas debido a la formación del enlace y consecuente hidrofobización del bloque dendrítico. Haciendo una interpretación conjunta de las valoraciones llevadas a cabo en disolvente orgánico y en DMSO-d_6, también se demuestra que el éster borónico mayoritario implicado en el equilibrio en disolución acuosa es la especie con inserción de disolvente. No obstante, una vez formada la micela, en el interior del *core* hidrofóbico de esta estructura es más probable que se encuentre el éster borónico con enlace N→B.

4.2.4.2. 1,2-Etanodiol

Esta valoración se realizó de una forma análoga a la de 1,2-dihidroxibenceno.

En estas condiciones no se observó ninguna interacción entre el 2-PFB y el 1,2-etanodiol. El análisis de la valoración mediante ^{1}H RMN muestra ambas especies de forma independiente en disolución, sin observarse ningún desplazamiento de señales que indique la formación del éster borónico. Asimismo, en el espectro de ^{11}B RMN, la señal original asignada a 2-PFB$_{OH}$ conservó el desplazamiento químico a δ: 10.37 ppm. Este hecho indica que en disolución acuosa no existe una interacción entre las moléculas, justificando el hecho de que no se produzcan micelas en disolución.

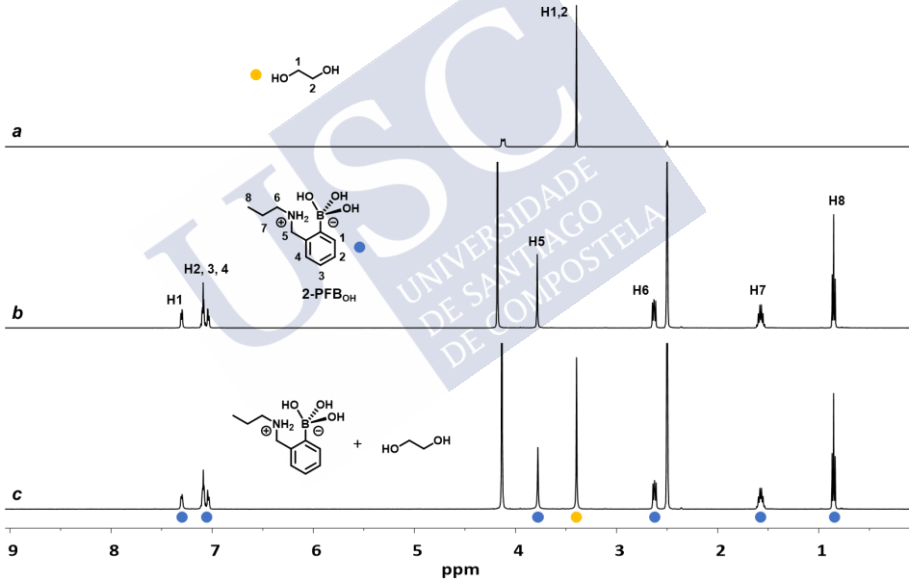


Figura 142. Valoración por ^{1}H RMN de 1,2-etanodiol (1equiv) con 2-PFB (30% D_2O en DMSO-d_6).

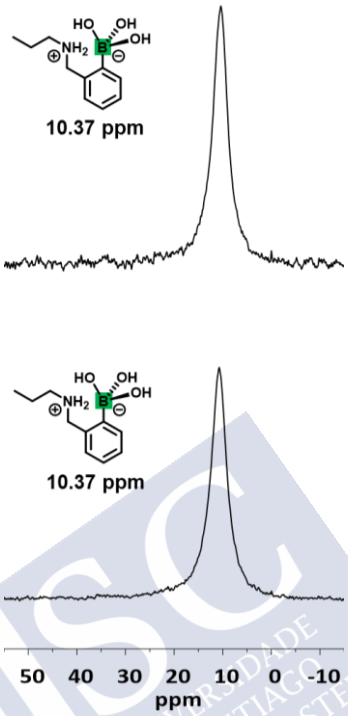


Figura 143. Valoración por ^{11}B RMN de 1,2-etanodiol (1 equiv) con 2-PFB (30% D_2O en DMSO-d_6).

4.2.4.3. (R)-(+)-1,2-Dodecanodiol

De una forma análoga a las valoraciones anteriores, se realizó el estudio de la interacción entre 2-PFB y (R)-(+)-1,2-dodecanodiol. Como para 1,2-etanodiol, tampoco se observó ningún tipo de interacción mediante análisis de ^{1}H RMN.

Sin embargo, a diferencia del 1,2-etanodiol, este diol sí es capaz de formar micelas en disolución. El hecho de que no se observe una unión covalente con 2-PFB mediante ^{1}H RMN, indica que la larga carga hidrofóbica de esta molécula suficientemente elevada como para favorecer la agregación del copolímero. En este caso, se produciría un efecto sinérgico entre el diol y el copolímero de bloque, que actuaría como un nanorreactor proporcionando el ambiente adecuado para que más moléculas de (R)-(+)-1,2-dodecanodiol se

uniesen a la superficie dendrítica y estas se agregasen ordenadamente en disolución formando las estructuras micelares.

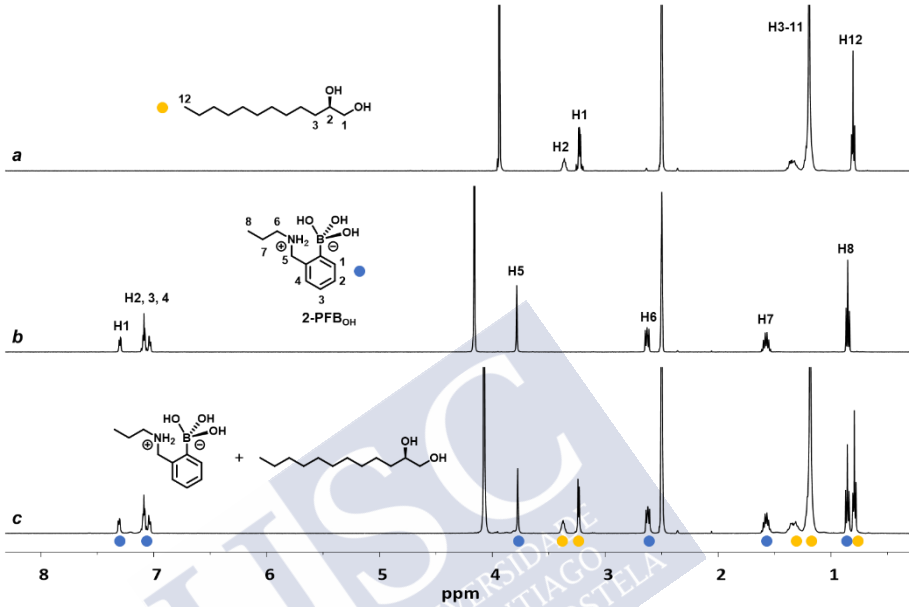


Figura 144. Valoración por ^{1}H RMN de (R)-(+)-1,2-dodecanodiol (1 equiv) con 2-PFB (30% D_2O en DMSO-d_6).

A la vista de las afinidades en DMSO-d_6/D_2O, para que se produzca una agregación del PEG-[G3]-BO_2H_2 en disolución acuosa y la formación de micelas, los dioles deben de cumplir uno de los siguientes requisitos: i) ser un derivado de catecol con elevada afinidad e hidrofobia, ii) en el caso de 1,2 o 1,3-dioles, que estos tengan una carga hidrofóbica suficientemente elevada para compensar su baja afinidad en disolución acuosa. Este hecho favorecería que el copolímero actúe como un nanorreactor que daría lugar a la formación de estructuras micelares.

4.2.5. Estudio de la interacción de la DOX con 2-PFB$_B$

Tras haber estudiado la interacción entre los ácidos borónicos tipo Wulff del copolímero PEG-[G3]-BO_2H_2 y diferentes 1,2 y 1,3-dioles, se decidió realizar

un estudio estructural de interacción entre 2-PFB y DOX, un fármaco antitumoral que posee un sistema 1,3-diol.

Mediante ^{1}H RMN fue imposible determinar las señales del éster borónico o hacer una asignación precisa de los cambios en los desplazamientos químicos de las señales, debido a la complejidad del espectro. Se observa la aparición de muchas señales anchas. En ^{11}B RMN se observó que, tras la adición de la DOX, la señal de boro desaparecía casi por completo (Figura 146). Este comportamiento experimental impidió confirmar de forma directa la formación de un éster borónico entre el diol de DOX y 2-PFB, apuntando por el contrario a la formación de algún tipo de agregado intermolecular o incluso, a la posibilidad de que DOX interaccionase con 2-PFB a través de varios centros de interacción.

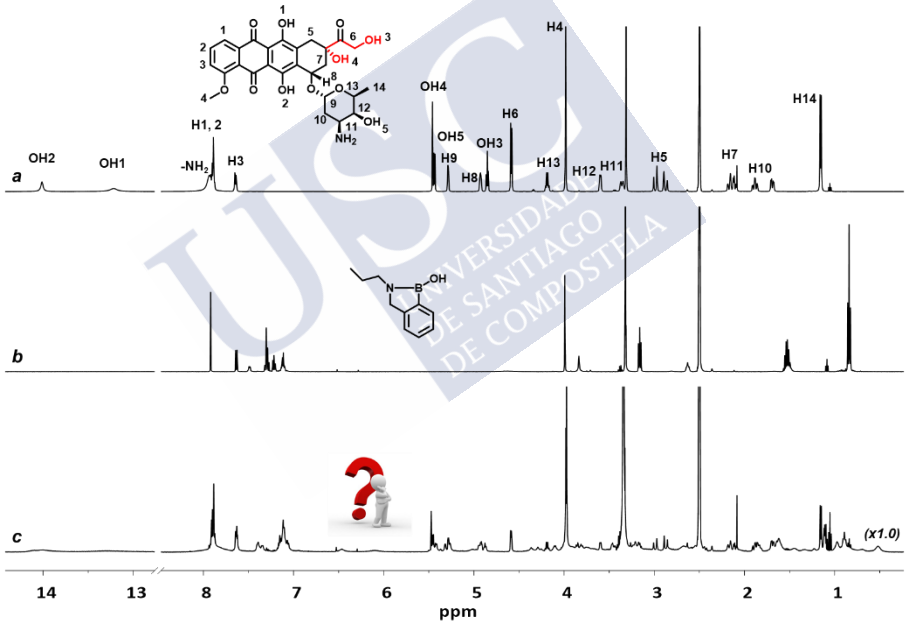


Figura 145. Valoración por ^{1}H RMN de DOX (1 equiv) con 2-PFB (DMSO-d_6).

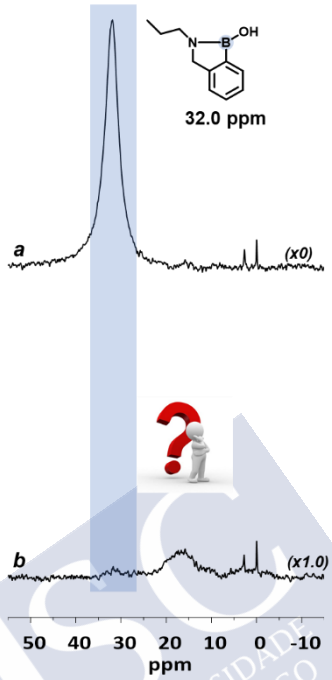


Figura 146. Valoración por ^{11}B RMN de 1 equiv de DOX con 2-PFB (DMSO-d_6).

Para simplificar el análisis por RMN de la interacción de DOX con 2-PFB, se decidió realizar primero un estudio con tres moléculas modelo más sencillas que incorporan toda la funcionalidad presente en DOX. Los análogos estructurales seleccionados son quinizarina (que incorpora el bloque de antraciclina con dos hidroxicetonas), (1*R*, 2*S*)-*cis*-aminociclohexanol (que incorpora el 1,2-aminoalcohol presente en el anillo de daunosamina) y dexametasona (que presenta una 1,3-dihidroxipropanona exocíclica idéntica a la presente en DOX).

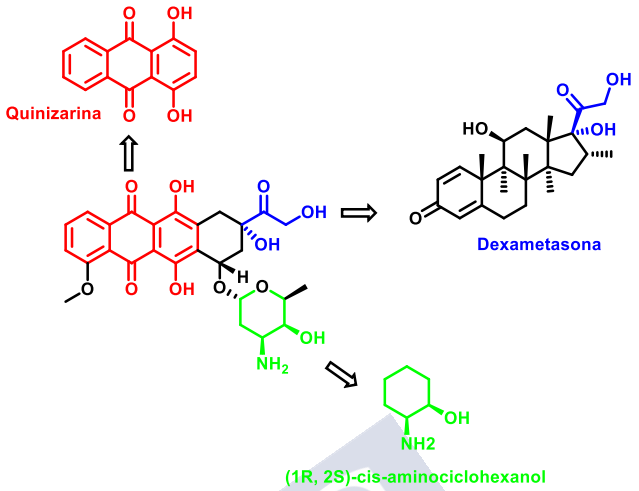


Figura 147. División estructural de la molécula de doxorubicina para la simplificación de su estudio en RMN.

La primera interacción analizada con 2-PFB_B fue la del (1R, 2S)-cis-aminociclohexanol. Se realizó una valoración en DMSO-d_6. Mediante el análisis de ^{1}H RMN y ^{11}B RMN no se observó ningún tipo de interacción; no se observaron desplazamientos de las señales en el espectro de protón ni en el espectro de boro, conservándose la señal a δ: 32 ppm durante toda la valoración (Figura 149).

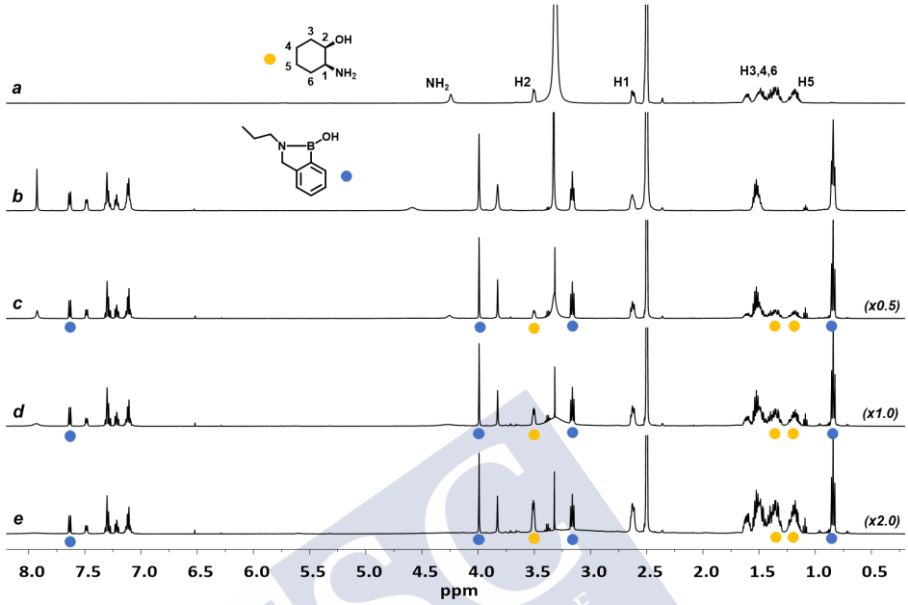


Figura 148. Valoración por ^{1}H RMN del (1R, 2S)-cis-aminociclohexanol (0.5, 1.0, 2.0 equiv) con 2-PFB_B (DMSO-d_6).

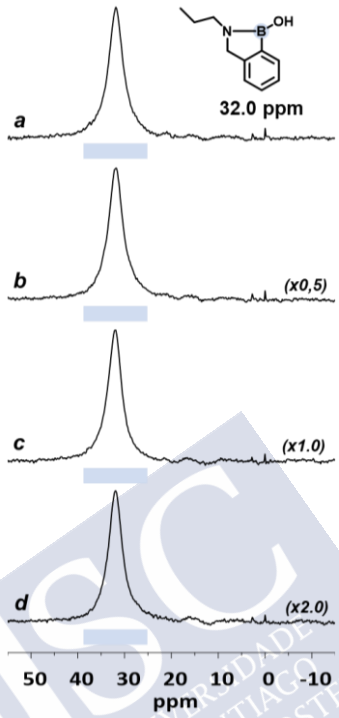


Figura 149. Valoración por ^{11}B RMN del (1R, 2S)-cis-aminociclohexanol (0.5, 1.0, 2.0 equiv) con 2-PFB (DMSO-d_6).

Posteriormente se analizó la interacción de quinizarina con 2-PFB en DMSO-d_6. En el espectro de ^{1}H RMN apenas se observan cambios perceptibles en los desplazamientos químicos de las señales que indiquen una interacción covalente entre ambas especies. Por otro lado, en el espectro de ^{11}B RMN, a 1eq se observa un pequeño pico en torno a δ: 9 ppm (Figura 151). Sin embargo, éste no es significativo, indicando que la interacción covalente entre las hidroxicetonas de quinizarina (y por tanto DOX) y 2-PFB es de muy baja afinidad y por tanto no es responsable de la interacción observada con DOX en las Figuras 145 y 146.

No obstante, en los espectros de protón se observa un gran ensanchamiento de las señales de la quinizarina, así como un cambio en las multiplicidades de las señales de protón correspondientes a la molécula 2-PFB_T. Además, durante la valoración se produjo un cambio de color instantáneo de la quinizarina tras la adición con 2-PFB_T. Es conocido que las boroxinas tienen un carácter semi-

aromático [217] y son estructuras deficientes en electrones, por lo tanto, es posible que en disolución se produzca una interacción supramolecular de tipo π *stacking* entre la quinizarina y el 2-PFB_T. Este factor, sumado a la posible interacción mediante enlaces de hidrógeno entre $2PFB_B$ y el (1*R*, 2*S*)-*cis*-aminociclohexanol pueden ser parcialmente responsables de la gran complejidad de la valoración original con DOX.

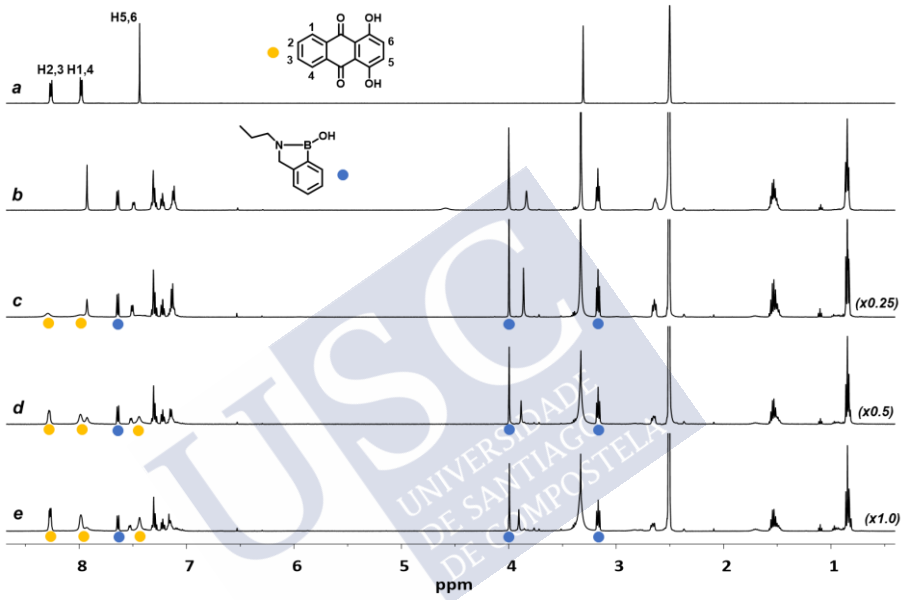


Figura 150. Valoración por ^{1}H RMN de la quinizarina (0.25, 0.5 y 1.0 equiv) con 2-PFB_B (DMSO-d_6).

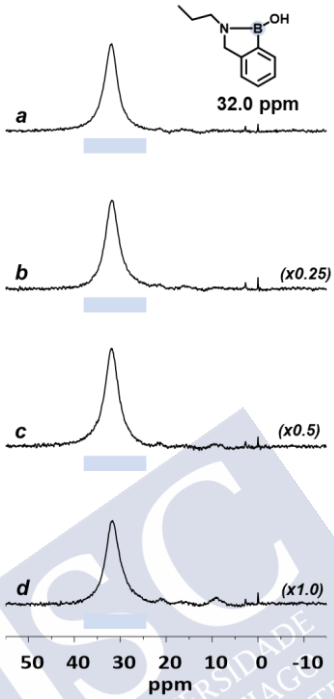


Figura 151. Valoración por ^{11}B RMN de la quinizarina (0.25, 0.5 y 1.0 equiv) con 2-PFB (DMSO-d_6).

La última valoración se realizó con la dexametasona, una molécula que contiene la misma 1,3-dihidroxipropanona presente en DOX. Aunque el análisis del espectro de ^{1}H RMN es complejo, se puede observar una clara desaparición de las señales correspondientes a 2-PFB$_B$ y 2-PFB$_T$, junto con movimientos en los desplazamientos químicos derivados de la formación del éster borónico.

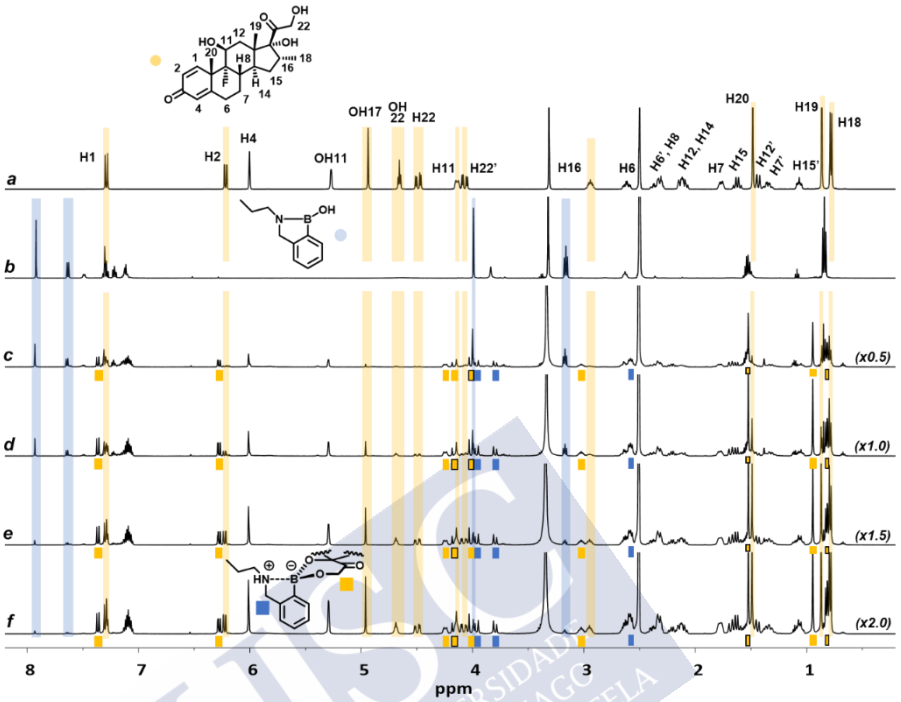


Figura 152. Valoración por ^{1}H RMN de dexametasona (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 equiv) con 2-PFB (DMSO-d_6).

La formación del éster borónico es muy evidente por ^{11}B RMN, ya que se produce un cambio en el desplazamiento químico de la señal original a δ: 32 ppm hasta δ: 10.0 ppm (Figura 153), cambio que no se observó con ninguna de las otras dos moléculas modelo. Esta valoración confirma que el sistema 1,3-diol es el responsable de la formación del éster borónico entre DOX y 2-PFB, interacción que puede ser explotada para la formación de micelas poliméricas con el copolímero de bloque dendrítico PEG-[G3]-BO_2H_2.

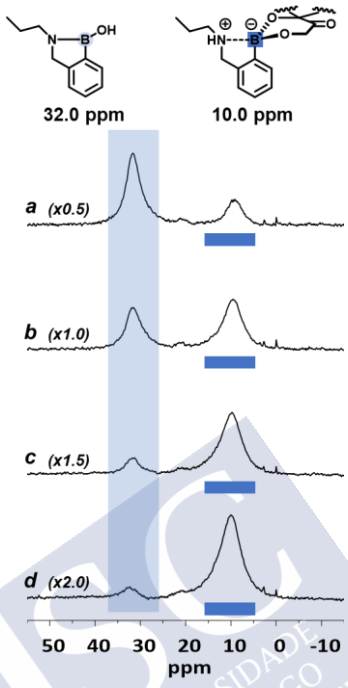
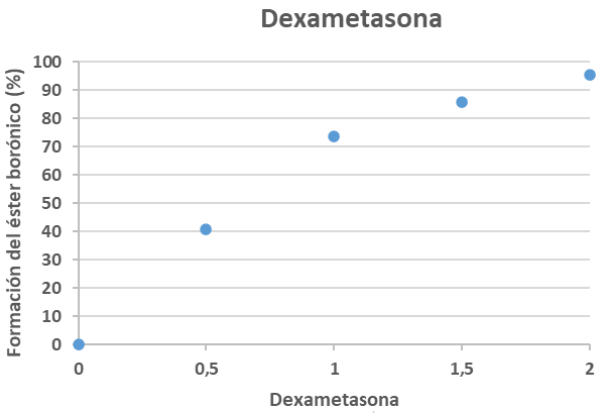
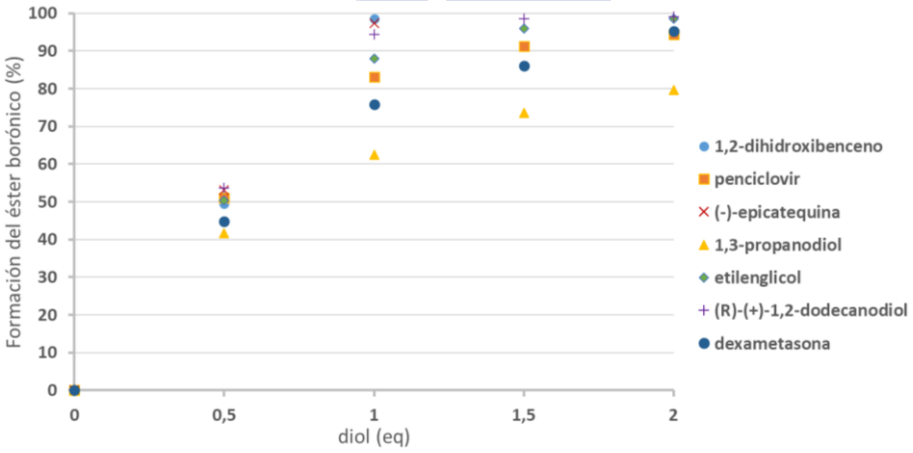


Figura 153. Valoración por ^{11}B RMN de dexametasona (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 equiv) con 2-PFB (DMSO-d_6).

A través de esta valoración también se pudo determinar la afinidad relativa entre dexametasona y 2-PFB por integración de los protones aromáticos en α al boro a lo largo de la valoración. De esta forma se pudo determinar un porcentaje de formación de éster borónico del 74 % a 1 eq. Esto sitúa a este tipo especial de 1,3-diol con una afinidad relativa por encima de 1,3-propanodiol y por debajo de 1,2-etanodiol, que probablemente refleje la mayor acidez de sus alcoholes.



Gráfica 10. Correlación entre las integrales de ^{1}H RMN y ^{11}B RMN de la formación del éster borónico la dexametasona



Gráfica 11. Comparación de las afinidades relativas de los diferentes dioles con 2-PFB_B (datos ^{1}H RMN).

Existen estudios donde se funcionalizan polímeros y copolímeros de bloque con ácidos borónicos para la encapsulación de DOX. Sin embargo, estas investigaciones no proporcionan una evidencia sólida del tipo de interacción

entre el fármaco y los grupos funcionales [321] o describen que el tipo de interacción que se produce es de tipo dador-aceptor entre los átomos de boro y el nitrógeno del anillo de daunosamina.[322]

4.2.6. Estudios de agregación de DOX con el copolímero PEG-[G3]-BO_2H_2

Se decidió estudiar el efecto de DOX sobre la agregación del copolímero PEG-[G3]-BO_2H_2. Esta molécula, a pesar de presentar una afinidad inferior a 1,2-dioles por el 2-PFB, presenta una solubilidad muy limitada a pH fisiológico, que podría compensar su baja afinidad y favorecer la agregación del copolímero de bloque.

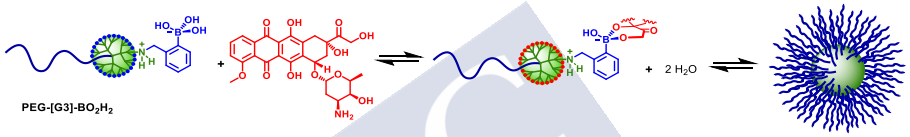


Figura 154. Representación de la formación de las micelas entre el copolímero de bloque PEG-[G3]-BO_2H_2 y DOX.

Se estudió la agregación del sistema mediante la incubación del copolímero de bloque en presencia de la doxorubicina a 37 ºC, en una disolución 50 mM PB pH 7.2. Posteriormente, se realizaron medidas de DLS de la disolución resultante a diferentes tiempos, estableciéndose un tiempo de formación óptimo de 24 h. Por DLS se observó la formación de micelas con un tamaño de 45.93±0.4 nm. Se realizó una purificación de las micelas mediante diálisis para eliminar la DOX no encapsulada, determinándose un EE= 96% con un elevado DL= 49%. Tras el proceso de purificación de las micelas se observó una ligera disminución de su tamaño, con un valor de 38.30±0.27 nm.

321 **(a)** Lee, J.; Kim, J.; Lee, Y.M.; Park, D.; Im, S.; Song, E.H.; Park, H.; Kim, W.J. *Acta Pharmacol. Sin*. **2017**, *38*, 848-858; **(b)**Wang, X.; Zhen, X.; Wang, J.; Zhang, J.; Wu, W.; Jiang, X. *Biomaterials*, **2013**, *34*, 4667-4679.

322 Lv, S.; Wu, Y.; Cai, K.; He, H.; Li, Y.; Lan, M.; Chen, X.; Cheng, J.; Yin, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 4, 1235-1238.

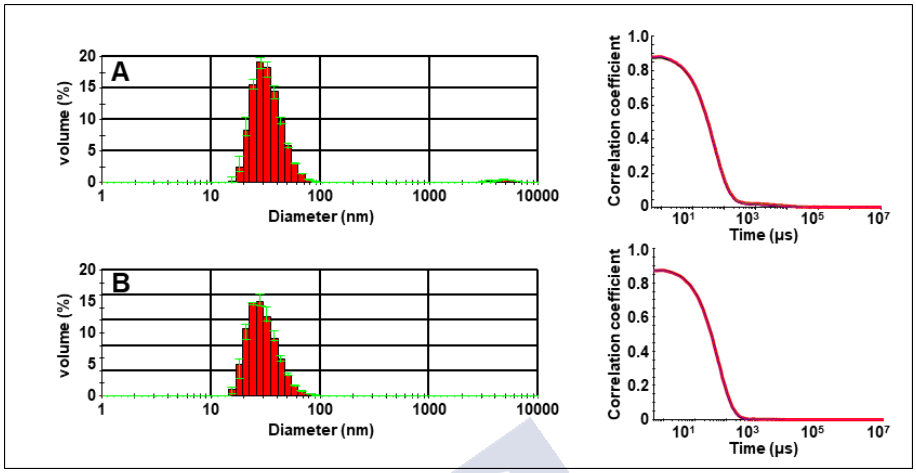


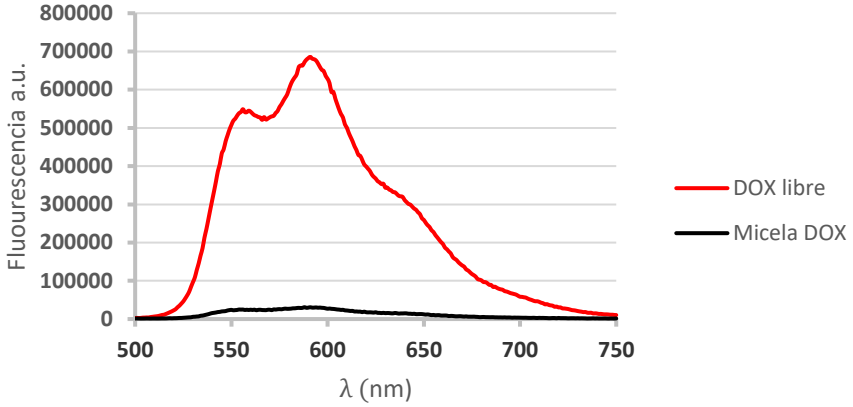
Figura 155. Histogramas de DLS de las micelas de PEG-[G3]-BO_2H_2 y DOX a A)24 h de incubación B) tras 6h de diálisis.

Asimismo, también se realizó un seguimiento de la estabilidad de estas micelas a ta y a 4 ºC. Mediante medidas de DLS se determinó que estas estructuras permanecen estables en ambas temperaturas por un período prolongado de al menos 10 semanas.

4.2.6.1. Caracterización de las micelas con DOX

Para confirmar que la doxorubicina se encuentra encapsulada en el interior de las micelas, se realizó una caracterización mediante fluorescencia del nanosistema. Primero se determinó el rango de concentraciones en el cual la doxorubicina es soluble en tampón 50 mM PB pH 7.2, ya que si esta molécula se encuentra agregada podría afectar a las medidas de fluorescencia. Se determinó que el umbral de solubilidad se encontraba por debajo de 5.38×10^{-5} M. Se compararon los espectros de fluorescencia de DOX y de las micelas a una concentración fija de DOX de 1×10^{-5} M.

Se pudo observar que la disolución de micelas apenas presenta fluorescencia en comparación con DOX libre, un efecto derivado del mecanismo de *quenching* producido por un fenómeno FRET, debido a la proximidad entre las moléculas de DOX que se produce en el interior del *core* compacto de las micelas.

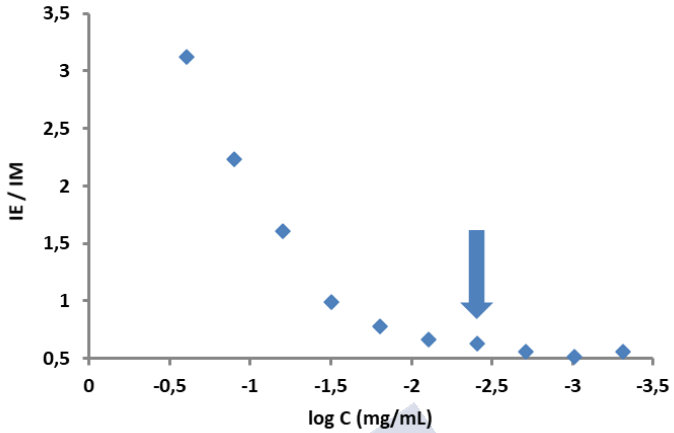


Gráfica 12. Espectros de fluorescencia de DOX libre frente al de la disolución de micelas.

Conocer la CMC de un nanosistema es fundamental para desarrollar potenciales aplicaciones *in vivo*. Este parámetro refleja la estabilidad termodinámica de sistemas micelares. Micelas con valores bajos de CMC tienen más posibilidades de conservar su estructura tras la dilución producida en condiciones de circulación sanguínea.

Para la micela de DOX se ha determinado el valor de CMC usando pireno como sonda fluorescente, analizando la ratio entre los picos correspondientes al monómero y excímero en el espectro de emisión.[323] Como se indica en la figura, se ha calculado que el valor de la CMC de las micelas de DOX corresponde a una concentración de 3.9 x 10^{-3} mg/mL. Este valor es lo suficientemente bajo como para permitir una estabilidad en el torrente sanguíneo, pudiendo facilitar su bioacumulación en la diana biológica de interés.

[323] **(a)** Winnik, F. M.; Ringsdorf, H.; Venzmer, J. *Langmuir* **1991**, *7*, 5, 912-917; **(b)** Novoa-Carballal, R.; Riguera, R.; Fernández-Megía, E. *Polymer* **2013**, *54*, 2081-2087.



Gráfica 13. Análisis de la CMC de las micelas de DOX, datos obtenidos a través de la relación monómero/excímero en el espectro de emisión de pireno.

Por último, se realizó un estudio de la morfología de las micelas mediante AFM por el que se pudo confirmar que poseen forma esférica. A través del análisis de 50 partículas tomadas en zonas diferentes de la muestra, se obtuvieron tamaños comprendidos entre 12 y 60 nm, con un tamaño medio de 30 nm.

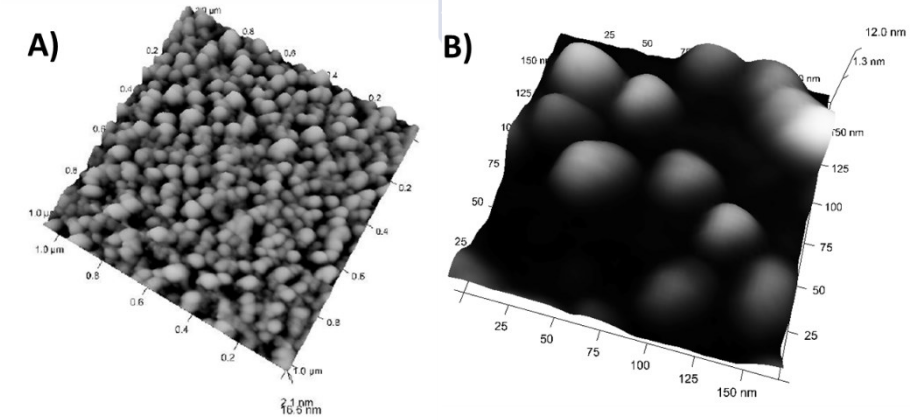
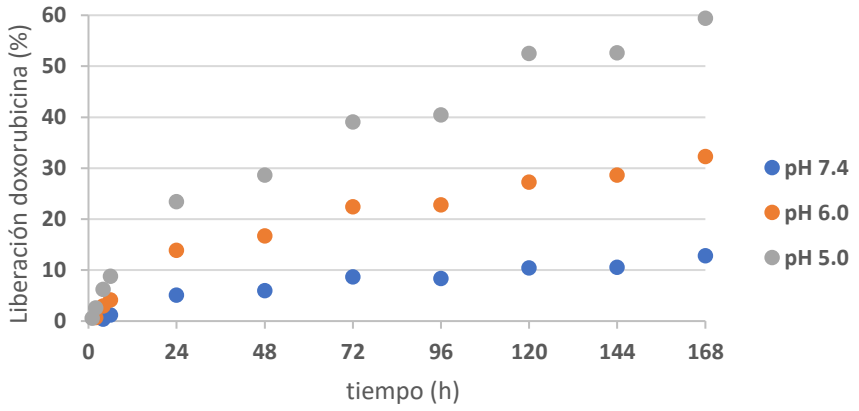


Figura 156. Imágenes de AFM de las micelas de DOX.

4.2.6.2. Estudios de liberación

Un SDDS, además de encapsular de forma eficiente el fármaco, debe ser capaz de transportarlo hasta su diana biológica y liberarlo de forma selectiva. Los ésteres borónicos son especies que presentan sensibilidad a medio ácido, sufriendo procesos de hidrólisis que derivan en la formación de los ácidos borónicos y dioles constituyentes. Este comportamiento puede ser explotado en el diseño de SDDS para el tratamiento de cierto tipo de patologías como el cáncer, ya que presentan entornos extracelulares con un medio ligeramente más ácido que el de tejidos sanos. Además, los mecanismos de internalización en células tumorales mediante endocitosis favorecerían los procesos de hidrólisis de los ésteres borónicos, debido al bajo pH en el interior de los endosomas y lisosomas (pH 5).

Para analizar el perfil de liberación de las micelas de doxorubicina, se realizó un seguimiento temporal mediante diálisis a diferentes pH. Como puede observarse en la gráfica, la liberación de la DOX presenta un perfil dependiente del pH. A medida que aumenta el medio ácido se produce una liberación mayor del fármaco, manteniéndose prácticamente estable en condiciones fisiológicas de pH.



Gráfica 14. Estudios de liberación de DOX dependientes de pH.

4.2.6.3. Estudios celulares

Para evaluar el potencial farmacológico de las micelas, se realizaron estudios de internalización en células A549, un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Estudios llevados a cabo por la Dr. Sandra P. Amaral, demostraron un diferente tráfico intracelular de DOX libre frente a la encapsulada en las micelas. Tras 1 h de incubación, la doxorubicina libre presenta una colocalización con el núcleo celular (Hoechst 33342), mientras que la DOX encapsulada en micelas colocaliza con endosomas/lisosomas marcados con *Lysotracker Green*. La DOX, al tratarse de una molécula hidrofóbica pequeña, sufre un proceso de difusión hasta el núcleo celular, mientras que las micelas participan de un proceso de internalización mediado por endocitosis.

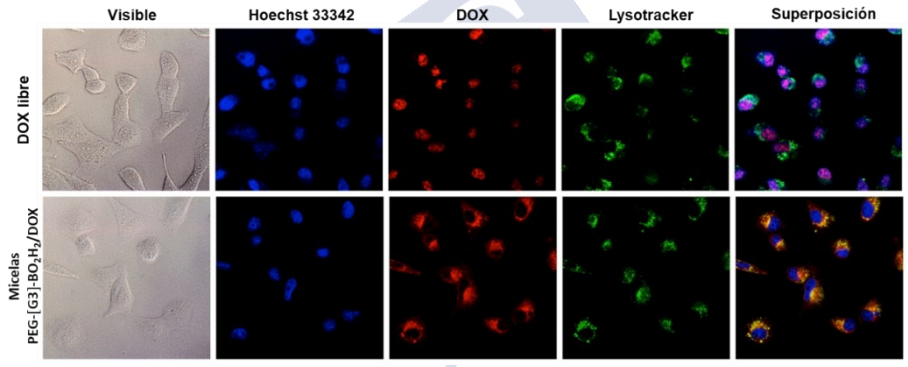


Figura 157. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células A549 incubadas con DOX libre y micelas durante 1 h.

Haciendo un seguimiento de las micelas mediante microscopía confocal, se observó una colocalización de la DOX con el núcleo celular tras 2 h de desarrollo, demostrando la liberación efectiva del fármaco dentro de las células tumorales, su salida de endosoma/lisosoma y posterior migración a núcleo.

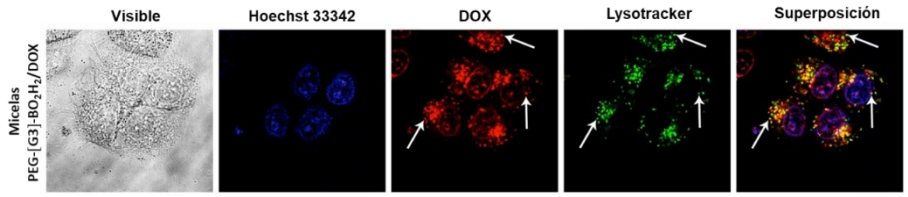
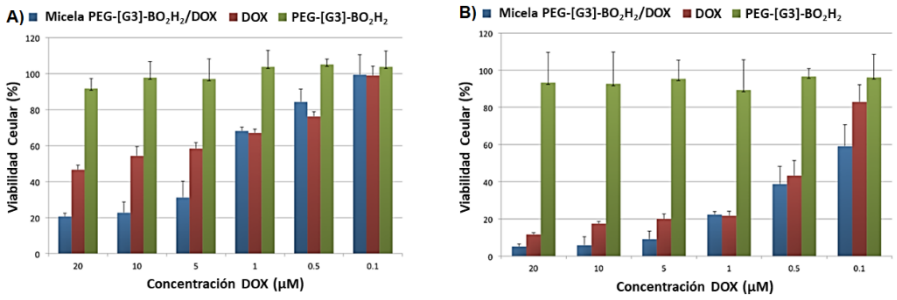


Figura 158. Imágenes de microscopía confocal de células A549 incubadas con micelas durante 3 h.

Por último, se evaluó el perfil de citotoxicidad de las micelas de doxorubicina frente a células A549. Junto con el control del copolímero de bloque PEG-[G3]-BO_2H_2, se analizó la citotoxicidad de DOX libre y de las micelas mediante un estudio de MTT a 24 y 48 h. El copolímero de bloque demostró ser completamente viable en los tiempos estudiados. Por otro lado, tanto tras 24 h como 48 h, las micelas demostraron tener una citotoxicidad mayor que el de la DOX libre, probablemente debido a una mayor liberación efectiva de fármaco tras el proceso de endocitosis.



Gráfica 15. Viabilidad celular de las micelas de DOX y fármaco libre A) 24 h, B) 48 h.

CONCLUSIONES



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. CONCLUSIONES

Durante el transcurso de esta tesis doctoral se sintetizaron cinco generaciones de una nueva familia de copolímeros de bloque lineal-dendrítico de tipo LD. Para su síntesis se siguieron los principios de la química *click*, utilizando reacciones de tipo *metal-free* AAC entre azidas y alquinos activados. Se seleccionó el copolímero de bloque PEG-[$G2^{AAC}$]-N_3 para realizar funcionalizaciones con alquinos activados con sustituyentes de diferente naturaleza.

La capacidad de agregación de tres de estos sistemas con diferentes grupos hidrofóbicos se estudió en medio acuoso: PEG-[$G3^{AAC}$]-Dod, PEG-[$G3^{AAC}$]-Et y PEG-[$G3^{AAC}$]-Bu-Ph. Se observó que sólo los copolímeros de bloque dendríticos con mayor carga hidrofóbica (PEG-[$G3^{AAC}$]-Dod y PEG-[$G3^{AAC}$]-Bu-Ph) agregaban ordenadamente en disolución, dando lugar a micelas de un tamaño aproximado de 30 nm. Se estudió la capacidad de estas micelas como SDDS para encapsular un fármaco antitumoral hidrofóbico (DOX) en su interior. Las micelas formadas a partir del copolímero PEG-[$G3^{AAC}$]-Dod demostraron tener un EE (80%) y DL (19%), superiores al de las micelas formadas a partir de PEG-[$G3^{AAC}$]-Bu-Ph. Por último, se demostró la sensibilidad al pH de los sistemas formados a partir de estos copolímeros de bloque, que liberan una mayor cantidad de fármaco a pH 5 que a pH fisiológico (7.4).

Los copolímeros de bloqeu también pudieron ser funcionalizados mediante el empleo de reacciones fotocatalizadas TEC y TYC, que demostraron ser tan competitivas y eficaces como la reacción AAC. Este tipo de química permitió la funcionalización del copolímero PEG-[$G3^{AAC}$]-All con un monosacárido (1-tio-β-D-galactosa) y de PEG-[$G3^{AAC}$]-Prop con un diácido carboxílico (tiomálico), mediante TEC y TYC, respectivamente. El copolímero resultante la reacción TYC (PEG-[$G3^{AAC}$]-ATM) se utilizó en la formación de micelas tipo PIC con los polímeros de carga opuesta PLL y PLA. Mediante estudios de estabilidad realizados por DLS, se demostró que las micelas formadas a partir de PGA presentaban una mayor estabilidad en condiciones fisiológicas que las formadas a partir de PLL, debido a la interacción más fuerte entre las argininas y los ácidos carboxílicos del copolímero de bloque.

Por su parte, el copolímero de bloque PEG-[$G3^{AAC}$]-ATM demostró ser capaz de formar micelas *hybrid*-PIC con diferentes iones metálicos (Ca^{2+}, Cd^{2+}, Fe^{2+}, Ag^{+}). Las micelas formadas a partir de iones Ca^{2+} sirvieron como “plantilla”

para realizar un *crosslinking* covalente. Tras la posterior eliminación de los iones metálicos, las micelas conservaron su tamaño. Los grupos carboxilato libres en el interior de estas micelas se esper puedan ser utilizados para complejar fármacos antitumorales derivados de Pt, haciendo del nanosistema un potencial candidato a SDDS. Además, las micelas *hybrid*-PIC formadas demostraron ser estables durante días, siendo los primeros ejemplos formados a partir de copolímeros de bloque dendríticos.

En la segunda parte de la tesis se ha desarrollado un SDDS para la encapsulación covalente de DOX mediante el empleo de un copolímero de bloque PEG-dendrímero funcionalizado con ácidos borónicos tipo Wulff. El diol presente en DIX permie la formación de un enlace éster borónico entre el fármaco y el bloque dendrítico que finalmente conduce a la formación de micelas (ver más abajo). Para estudiar en detalle cómo la naturalea del éster borónico (hibridación del átomo de B, coordinación N→B y afinidad en función del tipo de diol y disolvente) afecta a la formación de las micelas. Se sintetizó la molécula 2-PFB y se estudió su comportamiento en disolución mediante ^{1}H RMN y ^{11}B RMN. Se determinó que la molécula sintetizada trimeriza a la boroxina 2-PFB$_T$ y que en DMSO-d$_6$, esta especie mantenía un equilibrio lento con el monómero benzazaborol 2-PFB$_B$. Esta molécula sirvió como modelo para estudiar el tipo de enlace entre ácidos borónicos tipo Wulff con aminas secundarias y diferentes 1,2 y 1,3-dioles. Se determinó que en disolventes apróticos (DMSO-d$_6$ y $CDCl_3$) se producen ésteres borónicos con un enlace dativo N→B, mientras que en disolventes próticos (CD_3OD) son mayoritarias las especies con inserción de disolvente. Se observó que en disolventes apróticos, los ésteres borónicos derivados de 2-PFB producen dos enantiómeros, resultado de la formación del enlace N→B, que se encuentran en un equilibrio dependiente del disolvente, la temperatura y el tipo de diol utilizado. Para los ésteres borónicos derivados de 2-PFB, es imposible establecer un rango absoluto de desplazamientos mediante espectroscopía de ^{11}B RMN que discrimine las especies de boro sp^3 tetraédricas con enlace N→B de las especies de boro sp^3 tetraédricas que contengan una inserción de disolvente, ya que dependiendo del tipo de diol y los equilibrios en disolución, el desplazamiento de las señales de boro puede llegar a solaparse entre ambas especies. Los estudios de RMN permitieron establecer que para la formación de micelas entre PEG-[G3]-BO_2H_2 y diferentes dioles se tienen que dar una de estas dos condiciones: i) que el 1,2-diol utilizado sea un catecol (hidrofóbico, elevada afinidad) y ii) para el resto de 1,2 y 1,3-dioles, que éstos posean grupos lo suficientemente hidrofóbicos que compensen su menor afinidad por ácido borónico en disolución acuosa. En este caso, el

autoensamblado del copolímero en agua actuaría como un nanorreactor que favorece la formación de estructuras micelares.

Se estudio la interacción entre DOX y 2-PFB mediante ^{1}H RMN y ^{11}B RMN. Debido a la complejidad del espectro experimental se decidió subdividir la DOX en tres moléculas modelo más sencillas que presentan toda la funcionalidad presente en DOX. Se estudió la interacción de quinizarina, (1*R*, 2*S*)-*cis*-aminociclohexanol y dexametasona con 2-PFB mediante ^{1}H RMN y ^{11}B RMN, y se estableció que el punto de unión entre el fármaco y el ácido borónico se producía a través de la 1,3-dihidroxipropanona. Esta interacción covalente y la propia hidrofobicidad de DOX a pH fisiológico, se explotaron en la formación de micelas con PEG-[G3]-BO_2H_2. La optimización de las condiciones de agregación dio lugar a micelas ordenadas de tamaño 38 nm, con un EE= 96% y DL=49%. Estas micelas demostraron ser estables durante semanas y fueron caracterizadas con éxito mediante espectroscopía de fluorescencia y TEM. Se determinó el valor de su CMC, que resultó ser lo suficientemente bajo como para permitir su estabilidad en el torrente sanguíneo y posterior bioacumulación. Estas micelas demostraron tener sensibilidad al pH, liberando una mayor cantidad de fármaco a pH ácidos. Mediante estudios de microscopía de fluorescencia se observó que estas micelas sufren una internalización mediante endocitosis, localizándose en orgánulos ácidos a tiempos cortos, que tras un desarrollo celular de 2 h da lugar a la liberación del fármaco. Estudios de MTT demostraron que las micelas presentan una mayor citotoxicidad que el fármaco libre a las mismas concentraciones.

PARTE EXPERIMENTAL

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Materiales

Los reactivos empleados en esta tesis fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: sal sódica de 1-tio-β-D-galactosa (GLYCON Biochemicals, Ref. S96094), DMSO-d_6 (VWR, Ref. 87154.0011P), doxorubicina hidrocloruro (Apollo Scientific, Ref. BID0120), gemcitabina (Fluorochem), LysoTracker® Green DND-26 (Invitrogen Molecular Probes, Ref. L7526), patrón de calcio (1000 mg/L) para cromatografía iónica (VWR, Ref. 84958.180), pentóxido de fósforo (Fluorochem, Ref. 044747). El resto de los reactivos fueron comprados en Sigma Aldrich (Merck) o Acros Organics y fueron utilizados sin ninguna purificación previa.

En la síntesis de los compuestos descritos se utilizaron disolventes grado HPLC, subministrados por las casas comerciales Scharlab y Fischer Chemical, que fueron utilizados sin ninguna purificación previa.

Las unidades de repetición GATG, copolímeros de bloque PEG-GATG y los copolímeros de bloque PEG-GATG-B$(OH)_2$ fueron sintetizados siguiendo la metodología previamente descrita por nuestro grupo de investigación.[314]

6.1.2. Métodos e instrumentación

Durante los procesos de síntesis, las reacciones sensibles a oxígeno y/o humedad se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón. Los disolventes DMF, CH_2Cl_2 y CH_3CN se secaron en un sistema SPS800 Solvent Purification System de MBRAUN; $CHCl_3$, DMSO y piridina fueron secados sobre tamices moleculares de 4Å previamente activados en una mufla a 500ºC. MeOH, DIPEA y Et_3N se destilaron sobre CaH_2 y almacenaron sobre tamices moleculares de 4Å previamente activados.

Las reacciones, salvo que se indique lo contrario, fueron realizadas a ta.

Las fases orgánicas obtenidas tras las elaboraciones acuosas de las reacciones fueron secadas con Na_2SO_4 anhidro y posteriormente el disolvente fue evaporado en un rotavapor. Las muestras se concentraron a alto vacío para eliminar las trazas de disolvente.

Las reacciones catalizadas con foto-iniciadores se realizaron en una lámpara de xenón Asahi Spectra Max-303. Previa irradiación, las reacciones fueron desoxigenadas burbujeando Ar en el seno de la disolución durante 15 min. Se irradiaron a una longitud de onda de 350 nm y una potencia de 300 W durante los tiempos indicados.

Para la purificación y obtención de agua MilliQ se utilizó un sistema Millipore/Integral 5.

El secado de NaN_3 y del éter 15-corona-5 empleados en las reacciones de activación de los copolímeros de bloque fueron secados a alto vacío en presencia de P_2O_5 a 60 ºC durante 24 h.

Para la cromatografía en capa fina se empleó gel de sílice $60F_{254}$ (Merck) sobre soporte de aluminio. Tras observar la fluorescencia bajo una lámpara UV irradiando a 254 nm se reveló empleando una disolución de $KMnO_4$. La cromatografía en MPLC se realizó en un equipo Teledyne ISCO CombiFlash RF 200 psi. En la purificación se utilizaron columnas RediSep Rf rellenadas manualmente con SiO_2 (40 μm de VWR). Las muestras fueron sembradas en cartuchos sólidos rellenados con SiO_2 (40 μm de VWR).

Las reacciones asistidas por microondas fueron realizadas en un equipo Discover SP Microwave Synthesizer (CEM, USA), usando un método *power fix* y enfriando la reacción simultáneamente con aire comprimido. La temperatura fue controlada mediante un sensor de IR integrado en el aparato. El disolvente empleado en estas reacciones ($CHCl_3$) fue previamente filtrado a través de alúmina básica.

Las purificaciones mediante ultrafiltración fueron realizadas en sistemas Millipore Amicon™ dotadas con discos de ultrafiltración Ultracel de celulosa regenerada (YM1, YM3 o YM5) y aplicando una presión de 5 psi mediante un flujo de N_2.

Las purificaciones mediante diálisis fueron realizadas en membranas de diálisis de celulosa regenerada Spectrum™ Labs Spectra/Por® 6, MWCO 1 kDa o 10 kDa. La liofilización de las muestras se realizó en un liofilizador Telstar Cryodos.

Los espectros de MALDI-TOF se registraron en un espectrómetro 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se empleó el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) como matriz. Las muestras de copolímeros de bloque fueron disueltas en MeOH y 1 μL de disolución fue

mezclada con 20µL o 30 µL de una disolución de DHB (10 mg/mL en MeOH). Los espectros de MS fueron adquiridos en modo *linear ion mode*, con un promedio de 100 disparos con láser de longitud de onda 355 nm. La masa de los copolímeros se determinó por referencia a un estándar de péptidos *Peptide Standard I* (Bruker-Daltonics): Insulina (m/z =5734.51), Ubiquitina I (m/z=8565.76), Citocromo C (m/z =12360.97), Mioglobina (m/z =16952.30), Citocromo C (m/z=6180.99), Mioglobina (m/2z =8476.65) como estándares internos.

Las medidas de DLS se llevaron a cabo en un Malvern Nano ZS (Malvern Instruments, U.K.) operando a 633 nm con un ángulo de dispersión de 170º a 25 o 37 ºC.

Los espectros de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro Horiba Jobin-Yvon FluoroMax®-3 (DataMax 2.20) o en un NanoDrop™ Thermo Scientific 3300, atendiendo a la sensibilidad de los equipos y límites de detección de las muestras. Los espectros de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-630. Los espectros de IR se adquirieron depositando la muestra pura en un espectrómetro ATR Perkin-Elmer SpectrumTwo.

Las cuantificaciones que implicaron estudios de liberación de fármacos o estudios de viabilidad celular, se realizaron mediante estudios de emisión de fluorescencia y absorbancia respectivamente, en un lector de placas Tecan Infinite® F200 PRO dotado con filtros UV/Fluorescencia.

Los espectros de ^{1}H-RMN y ^{13}C-RMN se registraron en espectrómetros Bruker AVIII-500, Bruker DRX-500 y Varian Mercury 300. Los desplazamientos químicos se describen en unidades δ (ppm) y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz. Como referencia se usó la señal residual del disolvente o la señal del TMS. Para el procesado de espectros se utilizó el software MestreNova versión 6.0.2-5475 (Mestrelab Research).

Los espectros de las valoraciones de ^{1}H RMN y ^{11}B RMN se registraron en un espectrómetro Bruker DRX-500 con un ancho de barrido de 56818 Hz y 2 segundos de tiempo de adquisición, utilizando $BF_3 \cdot Et_2O$ como referencia interna. Se usaron tubos de cuarzo sintético (Wilmad®, Ref: Z562262) para evitar interferencias del borosilicato. Para el procesado de los espectros se realizó una predicción lineal hacia atrás de los 24 primeros puntos de la FID para eliminar los artefactos provocados por la sonda del espectrómetro.

En los estudios de liberación de fármacos, las micelas se dializaron utilizando membranas de diálisis Spectra/Por® 6 MWCO 1 kDa, frente a 250 mL de

buffer fosfato pH 7.4, 37 ºC, 6 h protegiendo las disoluciones de la luz solar. A continuación, las bolsas de diálisis fueron transferidas a nuevas disoluciones tampón (250 mL) a 37 ºC con los pH y condiciones de interés, protegidas de la luz solar. A tiempos fijados, se cogieron alícuotas de las disoluciones (3 x 100 µL) y se depositaron en microplacas de 96 pocillos (Thermo Scientific™ Nunc™ F96 MicroWell™ flat black). El pH de todas las alícuotas fue ajustado utilizando un tampón acetato 500 mM pH 4 (100 µL) y medidas en un lector de placas (exc. 560, em. 610). El porcentaje de fármaco liberado se calculó mediante una comparación con una curva de calibrado a partir de los datos de emisión de fluorescencia de disoluciones de los fármacos de interés preparados en idénticas condiciones.

La línea celular de carcinoma humano procedente de epitelio alveolar basal (A549) fue incubada a 37 ºC en una atmósfera con un 5% de CO_2 (incubador Memmert) en medio celular *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) con glucosa, conteniendo un 10% de FBS y suplementado con una disolución a un 1% de mezcla de antibióticos (10000 µg/mL penicilina, 10000 µg/mL estreptomicina y 29.2 mg/mL de glutamina).

Para los estudios de citotoxicidad las células A549 fueron incubadas en placas de 96 pocillos (Corning™ Costar™ *Flat Bottom Transparent Cell*), conteniendo 4000 células por pocillo, en 100 µL de DMEM suplementado con 10% de FBS durante 24 h a 37 ºC en una atmósfera con un 5% de CO_2. Seguidamente, el medio de crecimiento fue reemplazado con medio fresco conteniendo diferentes concentraciones de micela y sus respectivos controles, siendo incubados por diferentes períodos de tiempo. Posteriormente, 10 µL de una disolución (5 mg/mL) de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) en PBS fue añadida a cada pocillo e incubada durante 4h, seguidamente se adicionaron 100 µL de una disolución solubilizadora (10 % SDS en 0.01 M HCl) y las muestras fueron incubadas durante toda la noche. La absorbancia de cada pocillo fue medida a 570 nm en un lector de placas (Tecan Infinite® F200 PRO) y la viabilidad celular relativa fue calculada de acuerdo con la fórmula:

$$Viabilidad\ celular\ relativa = (A_{muestra} - A_{blanco} - \frac{A_{blanco}}{A_{control}})\ x\ 100$$

$A_{muestra}$ = absorbancia de los pocillos tratados con las muestras problema

A_{blanco} = absorbancia de los pocillos sin células

$A_{control}$ = absorbancia de los pocillos con células que no recibieron tratamiento

Los estudios de internalización celular se realizaron sembrando 500 µL de una suspensión de células A549 (medio celular DMEM suplementado con 10% de FBS) en placas habilitadas para microscopía (Cellvis 4-Chamber 35mm *Glass Bottom Dish with 20 mm microwell, #1.5 cover glass*, D35C4-20-1.5-N). Tras un período de incubación de 14 h el medio celular fue reemplazado por soluciones micelares (30 µL de micela o disolución control de fármaco en 470 µL de medio celular) e incubadas por períodos determinados de tiempo. Seguidamente, el medio celular fue retirado y las células lavadas con PBS (3 x 500 µL), se adicionó más medio celular fresco y las células se incubaron durante los períodos de tiempo de interés. Antes de realizar las observaciones de microscopía, se adicionaron e incubaron las muestras durante 30 min con diferentes agentes de tinción celular: los núcleos celulares adicionando a la muestra 10 µL de una disolución 2 µM de Hoechst 33258 y los orgánulos ácidos añadiendo 5 µL de una disolución 50 µM de LysoTracker® Green DND-26. Inmediatamente antes de la observación, los pocillos fueron lavados con PBS (3 x 500 µL) y una vez adicionado el medio fresco, la distribución intracelular fue observada en un sistema *spinning disk* Andor Dragonfly montado en un microscopio Nikon TiE equipado con una cámara Zyla 4.2 PLUS (Andor). Las imágenes fueron procesadas con el software Imaris (Oxford Instruments) o el software ImageJ (versión 1.51j8).

6.1.3. Procedimientos generales empleados en las elaboraciones

*Procedimiento **A***: La mezcla de reacción se concentró a vacío y el crudo de reacción se purificó mediante precipitación en CH_2Cl_2 / Et_2O. Tras 4 h a -20 ºC, el sólido obtenido se filtró y se lavó con Et_2O (3 x 50 mL).

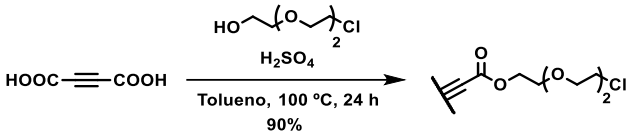
*Procedimiento **B***: La mezcla de reacción se concentró a vacío y el crudo de reacción se purificó mediante precipitación en MeOH / *i*-PrOH. Tras 4 h a -20 ºC, el sólido obtenido se filtró y se lavó con *i*-PrOH (3 x 50 mL).

*Procedimiento **C**:* La suspensión se diluyó con $CHCl_3$hasta el doble del volumen original y se filtró. La fase orgánica resultante se diluyó con $CHCl_3$ hasta100 mL, se lavó sucesivamente con H_2O MilliQ (3 x 100mL) y salmuera (1 x 100 mL), se secó y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó mediante precipitación en MeOH / *i*-PrOH. Tras 4h a -20 ºC, el sólido se filtró y se lavó con *i*-PrOH (3 x 50 mL).

6.2. CAP. I

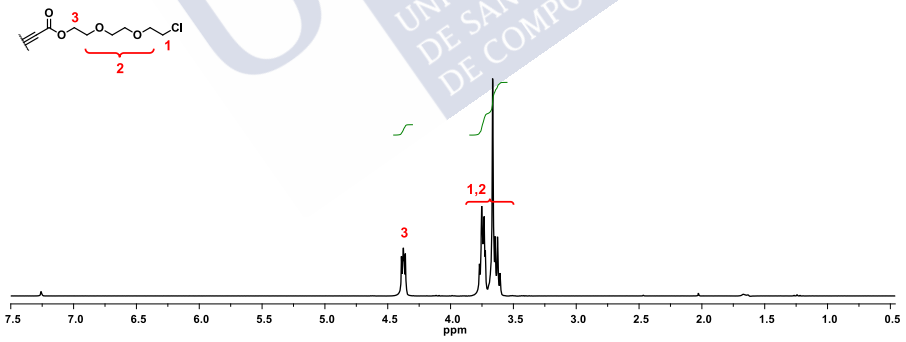
6.2.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

But-2-inodiato de bis[2-(2-(2-cloroetoxi)etoxi)etilo) (Alk-TEG-Cl)



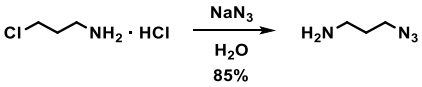
A una suspensión ácido 2-butinodioico (2.00 g, 17.5 mmol) y bis[2-(2-cloroetoxi)etil] éter (6.5 g, 38.5 mmol) en tolueno (30 mL) se le adicionó H_2SO_4 (2 mL) y se calentó a 110 ºC incorporando un cabezal de destilación Dean-Stark durante 24 h. La disolución se diluyó con Et_2O y se lavó con una disolución saturada de $NaHCO_3$ (3 x 100 mL) y salmuera (100 mL), se secó y se concentró a vacío. El crudo de reacción se purificó por MPLC (gradiente de hexano a AcOEt, 20 min) obteniéndose Alk-TEG-Cl (6.54 g, 90%) como un aceite transparente.

^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.44 – 4.31 (m, 4H), 3.87 – 3.55 (m, 20H).



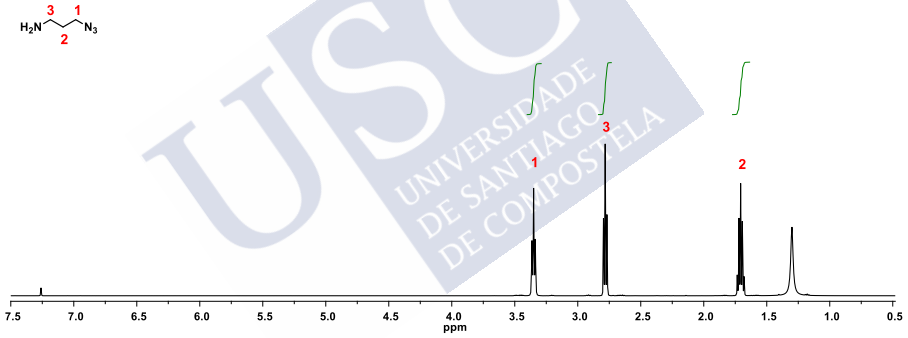
^{1}H RMN de Alk-TEG-Cl.

3-azidopropan-1-amina



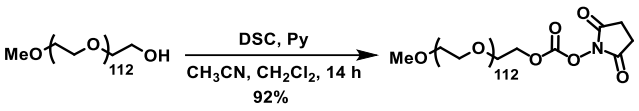
3-cloropropan-1amina (0.5 g, 3.8 mmol) y NaN_3 (0.750 g, 11.5 mmol) se disolvieron en H_2O (3.8 mL). Se agitó la disolución a 80 ºC durante 15 h. Seguidamente la disolución se enfrió en un baño de agua-hielo y se disolvió KOH (1.5 g) manteniendo la temperatura por debajo de 10 ºC. Se realizaron extracciones con Et_2O (5x50 ml) y la fase orgánica combinada se secó y concentró. Se obtuvo la 3-azidopropan-1-amina (0.327 g, 85%) como un aceite verdoso.

^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 3.35 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.71 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H).



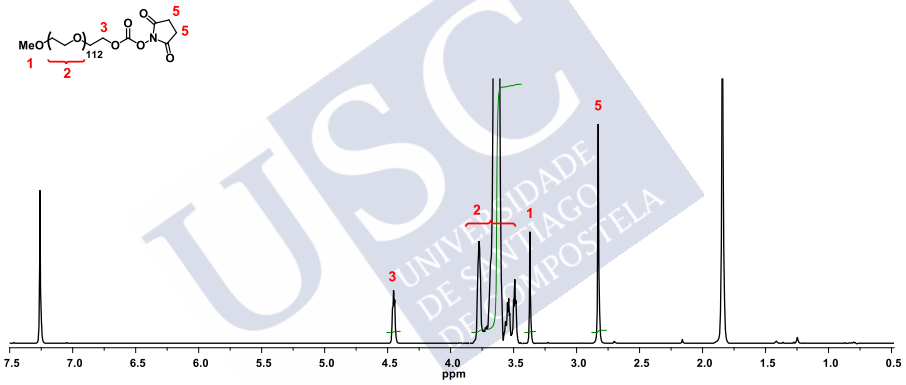
^{1}H RMN de 3-azidopropan-1-amina.

PEG-NHS



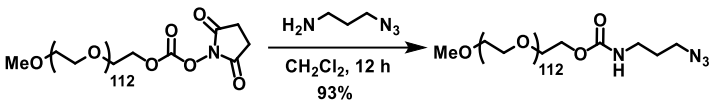
DSC (0.500 g, 0.002 mmol) y Py (400 µL) se añadieron sobre una disolución bajo argón de PEG_{5000} (2 g, 0.4 mmol) en CH_2Cl_2 (3.2 mL) y CH_3CN (800 µL). La mezcla se agitó a ta durante 14 h y se elaboró según el *Procedimiento **A*** para dar el compuesto PEG-NHS (1.907 g, 92%) como un sólido blanco.

^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.49 – 4.38 (m, 2H), 3.83 – 3.44 (m, ~440H), 3.37 (s, 3H), 2.83 (s, 4H).



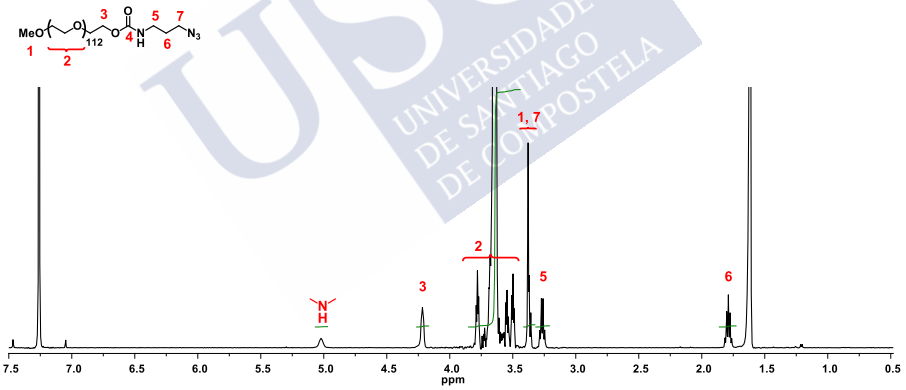
^{1}H RMN de PEG-NHS.

PEG-N_3

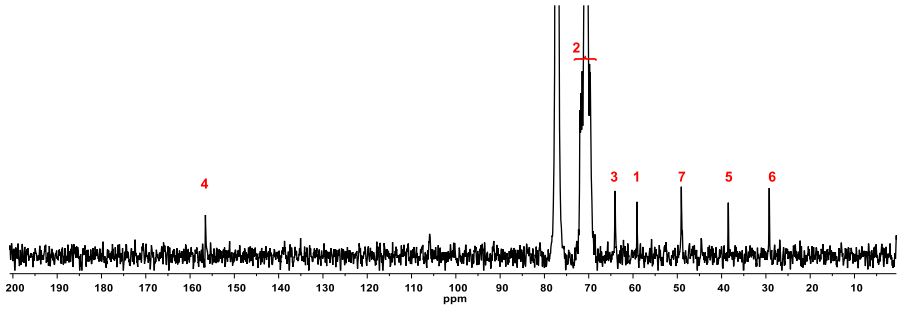


Et_3N (150.3 µL, 1.08 mmol) se añadió sobre una disolución bajo argón de PEG-NHS (1.87 g, 0.359 mmol) y 3-azidopropan-1-amina (0.180 g, 1.79 mmol) en CH_2Cl_2 (7.98 mL). La mezcla se agitó a ta durante 12 h y se elaboró según el *Procedimiento **A*** para dar el compuesto PEG-N_3 (1.73 g, 93%) como un sólido blanco.

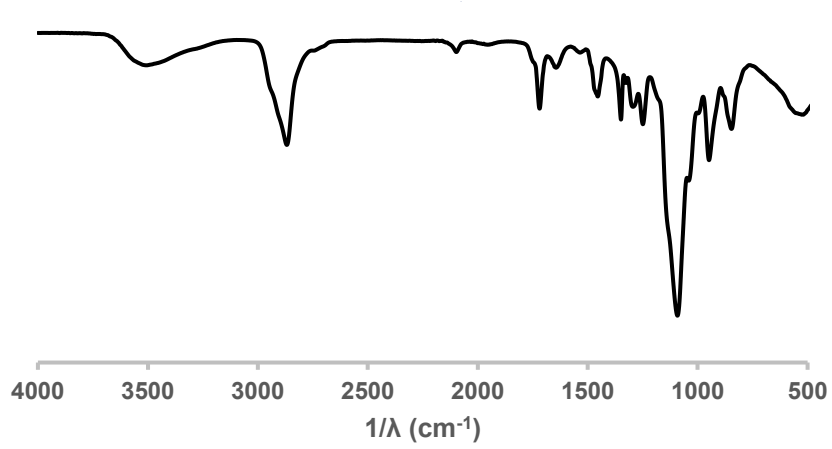
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.02 (bs, 0.66H), 4.22 (s, 2H), 3.86 – 3.43 (m, ~486H), 3.42 – 3.33 (m, 5H), 3.27 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 1.79 (q, J = 6.6 Hz, 2H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 156.5, 72.0, 71.7, 71.4, 70.6, 69.8, 69.6, 64.0, 59.0, 49.0, 38.4, 29.2. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2866, 2095, 1722, 1094. **MALDI-TOF MS** (DHB, *Linear ion mode*, *m/z*): M_z: 5300.66, M_n: 5392.78, M_w: 5347.03. Calculado para ($[M+H]^+$): 5182.12.



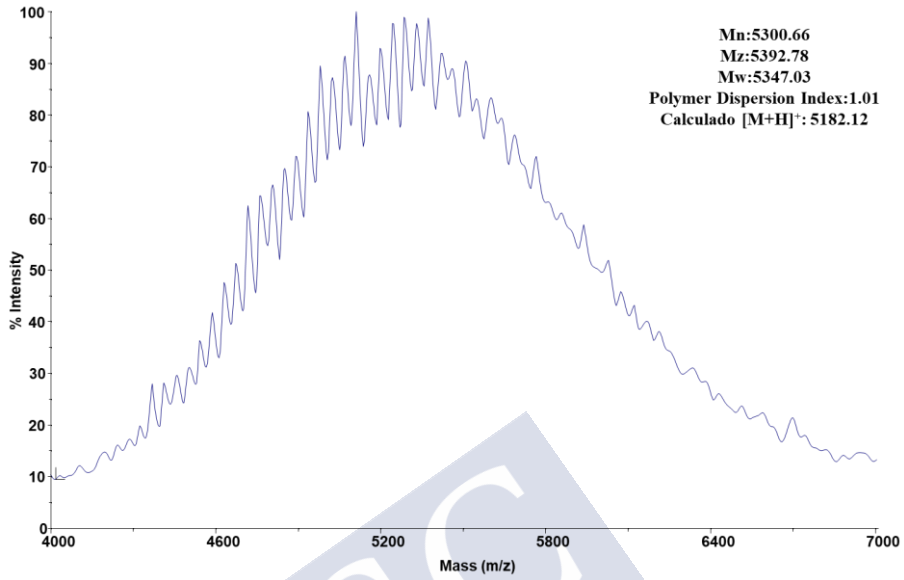
^{1}H RMN de PEG-N_3.



^{13}C RMN de PEG-N_3.



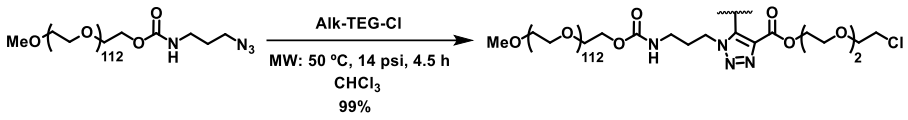
IR de PEG-N_3.



MALDI-TOF de PEG-N_3.

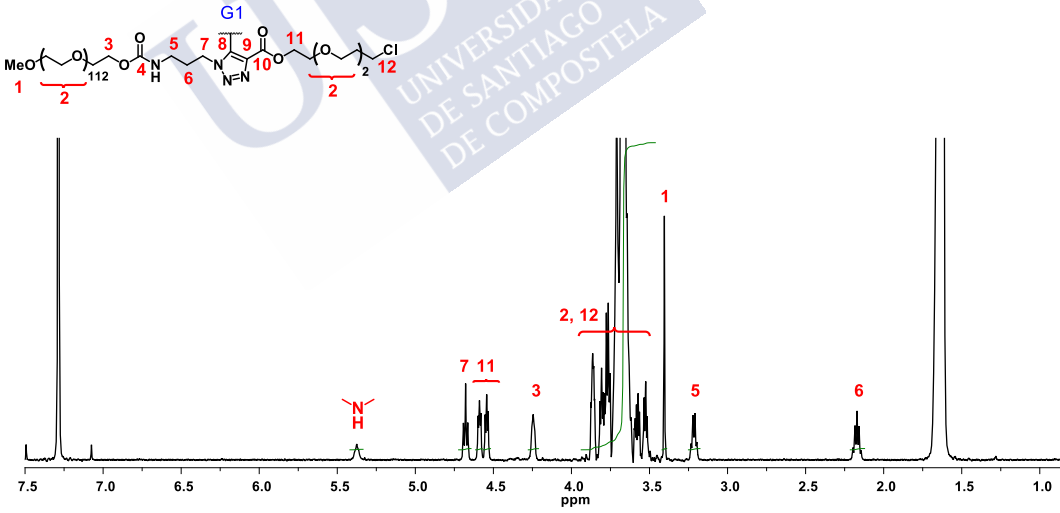
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PEG-[G1^{AAC}]-Cl

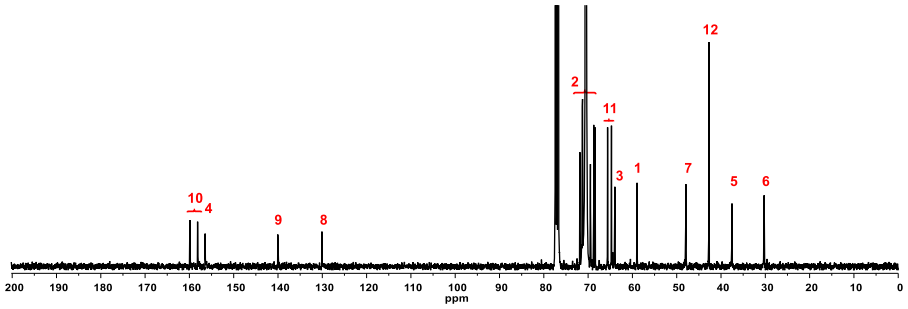


Una disolución de Alk-TEG-Cl (0.1 g, 0.241 mmol) y PEG-N_3 (0.5 g, 0.096 mmol) en $CHCl_3$ (0.965 µL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 4.5 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***A***, obteniéndose el compuesto PEG-[G1^{AAC}]-Cl (0.539 g, 99%) como un sólido blanco.

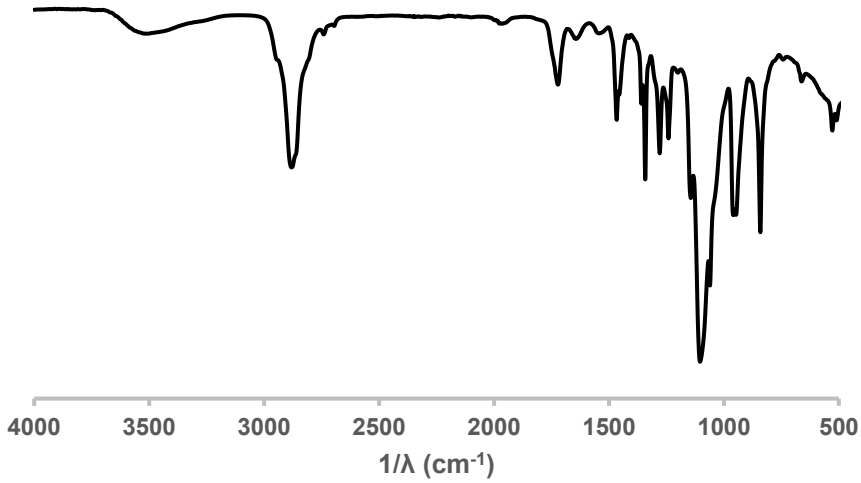
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.38 (bs, 0.91H), 4.68 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.63 – 4.57 (m, 2H), 4.57 – 4.51 (m, 2H), 4.25 (s, 2H), 3.91 – 3.43 (m, ~487H), 3.40 (s, 3H), 3.22 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.17 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H). **^{13}C-RMN** (101 MHz, $CDCl_3$) δ: 159.9, 158.1, 156.4, 140.0, 130.0, 71.8, 71.2, 70.4, 69.4, 68.7, 68.4, 65.6, 64.7, 63.9, 58.9, 47.9, 42.7, 37.5, 30.2. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2885, 1722, 1105. **MALDI-TOF MS (**DHB, *Linear ion mode*, *m/z***)**: M_z: 5563, M_n: 5470, M_w: 5517. Calculado para ([M+H]$^+$): 5596.



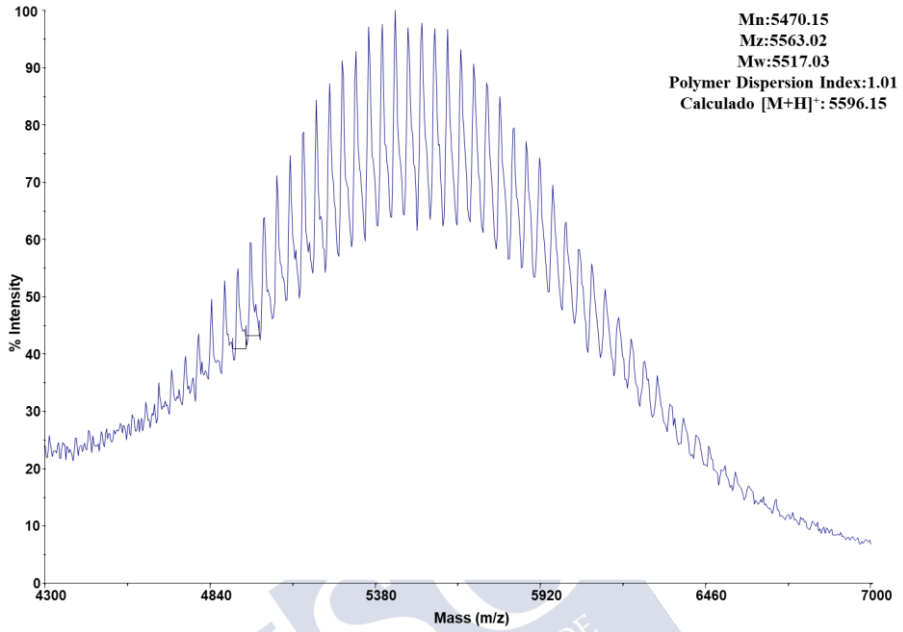
^{1}H-RMN de PEG-[G1^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).



^{13}C-RMN de PEG[G1^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).

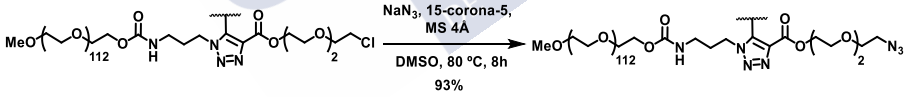


IR de PEG-[G1^{AAC}]-Cl.



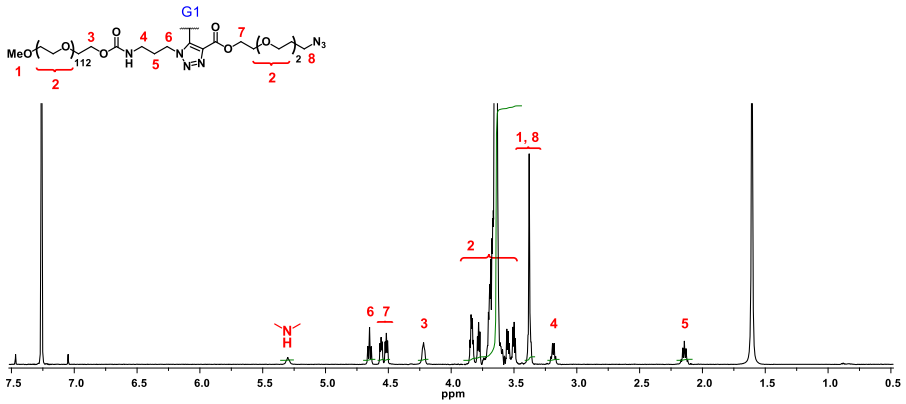
MALDI-TOF de PEG-[G1^{AAC}]-Cl.

PEG-[G1^{AAC}]-N_3

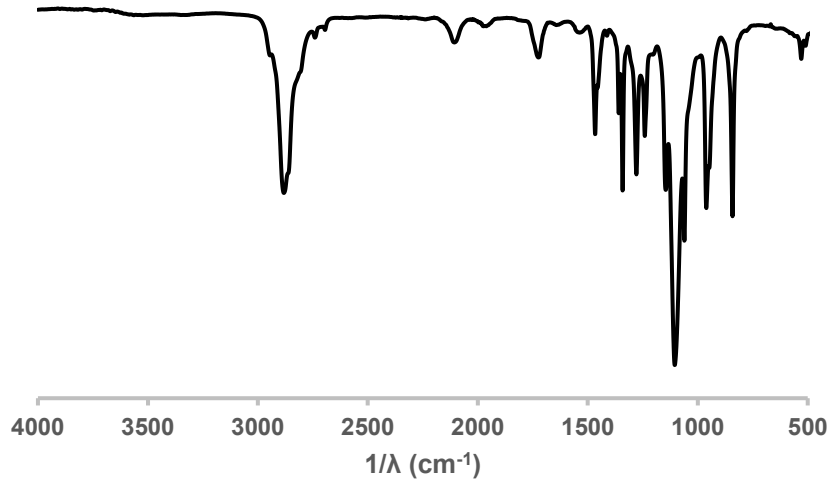


Una suspensión de NaN_3 (0.069 g, 1.07 mmol), PEG-[G1^{AAC}]-Cl (0.5 g, 0.089 mmol), éter 15-corona-5 (0.0039 g, 0.018 mmol) y tamices moleculares (4Å, 0.1 g) en DMSO seco (1.78 mL), se agitó durante 5 h a ta bajo atmósfera de argón. A continuación, se calentó a 80 ºC durante 8 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***C***, obteniéndose el compuesto PEG-[G1]-N_3 (0.467 g, 93%) como un sólido amarillo pálido.

^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.30 (bs, 0.77H), 4.65 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.59 – 4.54 (m, 2H), 4.54 – 4.47 (m, 2H), 4.22 (s, 2H), 3.91 – 3.43 (m, ~565H), 3.42 – 3.31 (m, 7H), 3.19 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.14 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H). **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2885, 2102, 1724, 1105.

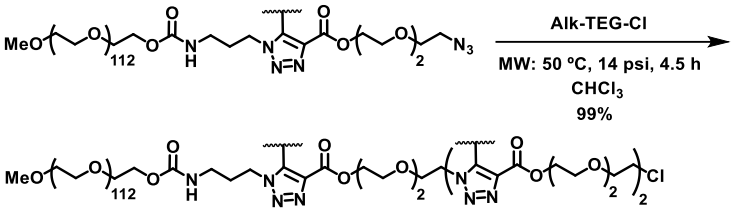


^{1}H-RMN de PEG-[G1^{AAC}]-N_3 ($CDCl_3$).



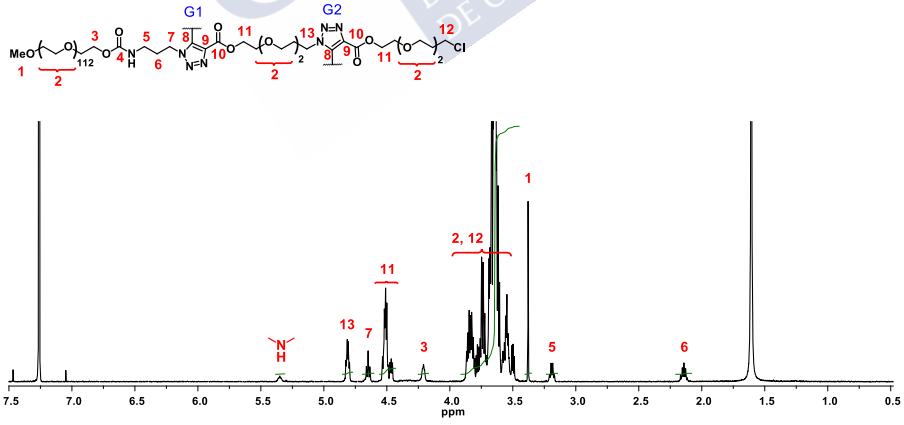
IR de PEG-[G1AAC]-N3.

PEG-[G2^{AAC}]-Cl

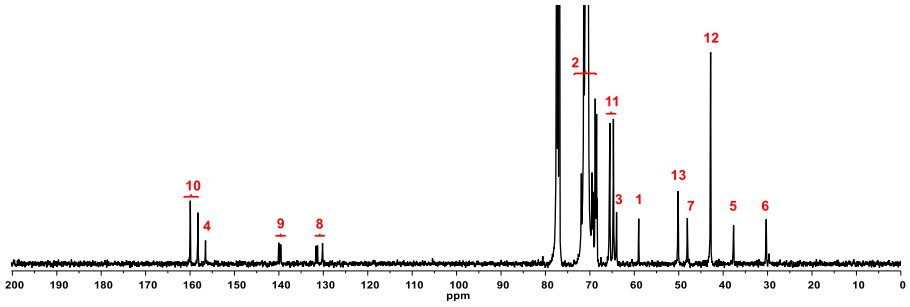


Una disolución de Alk-TEG-Cl (0.173 g, 0.42 mmol) y PEG-[G1^{AAC}]-N_3 (0.468 g, 0.083 mmol) en $CHCl_3$ (1.7 mL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 4.5 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***A***, obteniéndose el compuesto PEG-[G2^{AAC}]-Cl (0.533 g, 99%) como un sólido amarillo pálido.

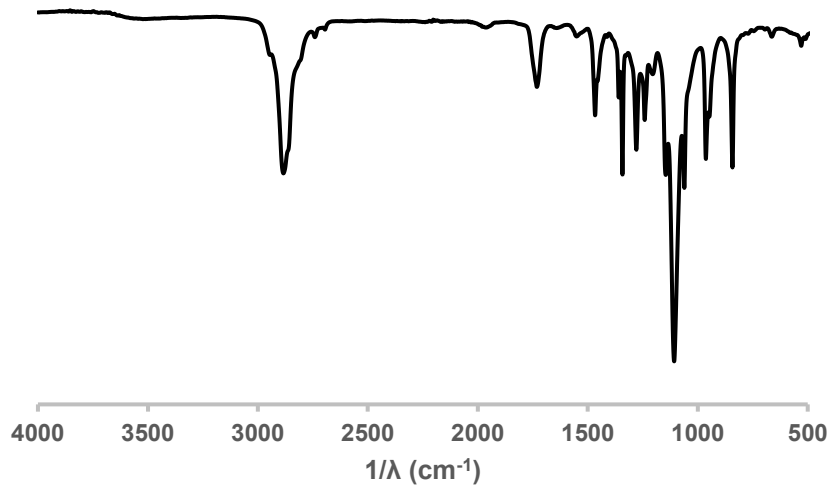
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.35 (bs, 0.79H), 4.86 – 4.76 (m, 4H), 4.65 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.56 – 4.42 (m, 12H), 4.21 (s, 2H), 3.94 – 3.43 (m, ~550H), 3.38 (s, 3H), 3.19 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.18 – 2.10 (m, 2H). **^{13}C-RMN** (101 MHz, $CDCl_3$) δ: 159.9, 158.2, 156.5, 140.0, 139.6, 139.5, 131.6, 131.3, 130.2, 71.7, 71.6, 71.0, 70.5, 69.5, 69.4, 69.2, 68.7, 68.6, 68.5, 68.4, 65.6, 65.5, 64.7, 64.6, 63.9, 59.0, 50.2, 50.1, 48.0, 42.8, 37.6, 30.2. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2885, 1732, 1109. **MALDI-TOF MS (**DHB, *Linear ion mode*, *m/z***)**: M_z: 6235, M_n: 6118, M_w: 6178. Calculado para ([M+H]$^+$): 6438.



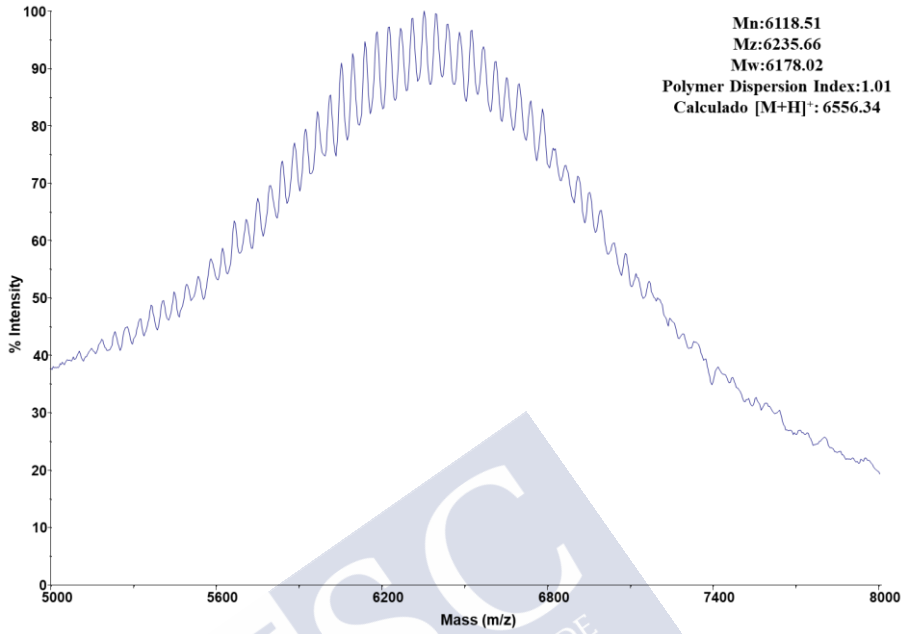
^{1}H-RMN de PEG-[G2^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).



^{13}C-RMN de PEG-[G2^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).

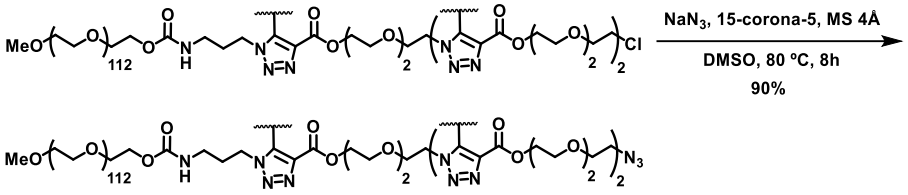


IR de PEG-[G2^{AAC}]-Cl.



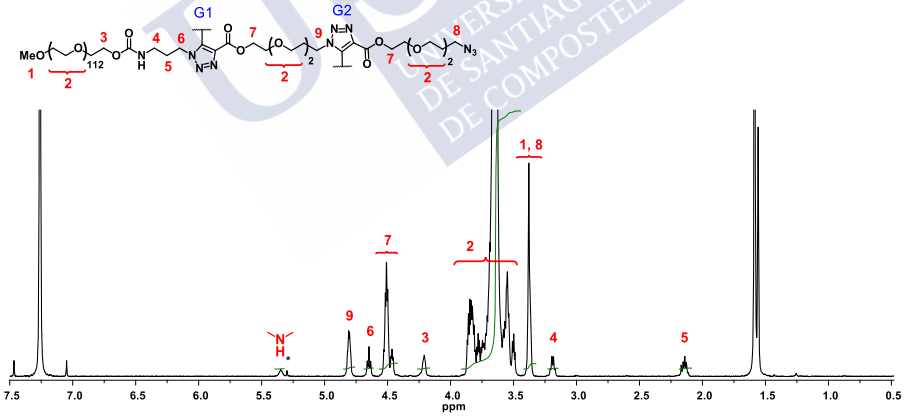
MALDI-TOF de PEG-[G2^{AAC}]-Cl.

PEG-[G2^{AAC}]-N_3

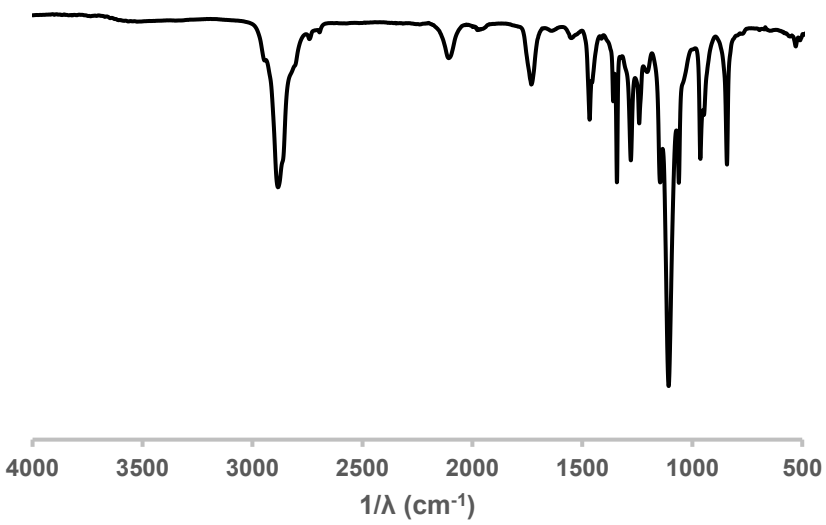


Una suspensión de NaN_3 (0.121 g, 1.86 mmol), PEG-[G2^{AAC}]-Cl (0.5 g, 0.078 mmol), éter 15-corona-5 (0.006 g, 0.03 mmol) y tamices moleculares (4Å, 0.1 g) en DMSO seco (3.1 mL), se agitó durante 5 h a ta bajo atmósfera de argón. A continuación, se calentó a 80 ºC durante 8 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***C***, obteniéndose el compuesto PEG-[G2^{AAC}]-N_3 (0.473 g, 94%) como un sólido amarillo pálido.

^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.35 (bs, 0.70H), 4.86 – 4.76 (m, 4H), 4.65 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.56 – 4.42 (m, 12H), 4.21 (s, 2H), 3.94 – 3.43 (m, ~523H), 3.38 (s, 11H), 3.19 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.18 – 2.10 (m, 2H). **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2885, 2110, 1732, 1108.



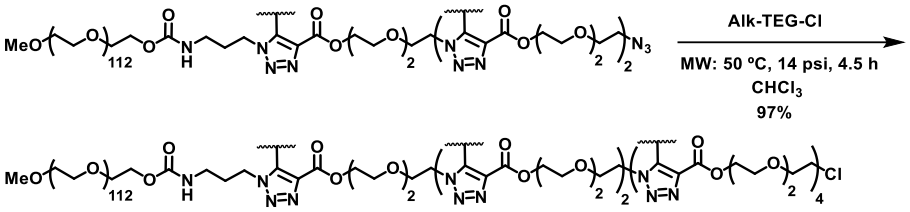
^{1}H-RMN de PEG-[G2^{AAC}]-N_3 ($CDCl_3$).



IR de PEG-[G2AAC]-N3.

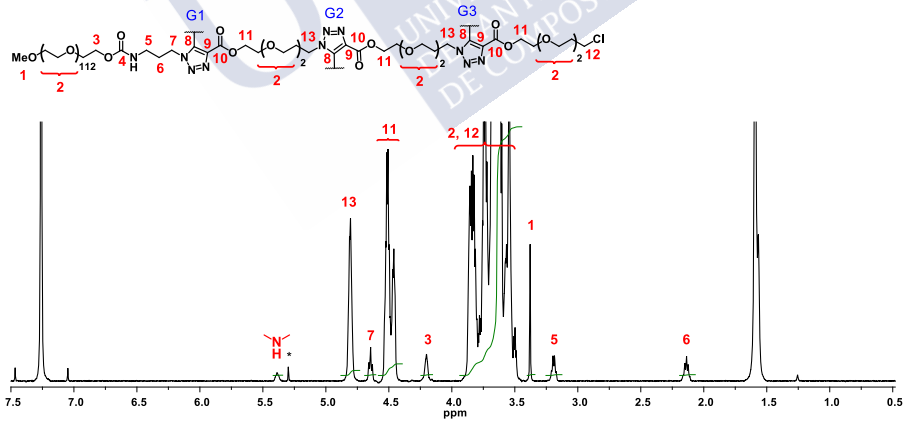
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PEG-[G3^{AAC}]-Cl

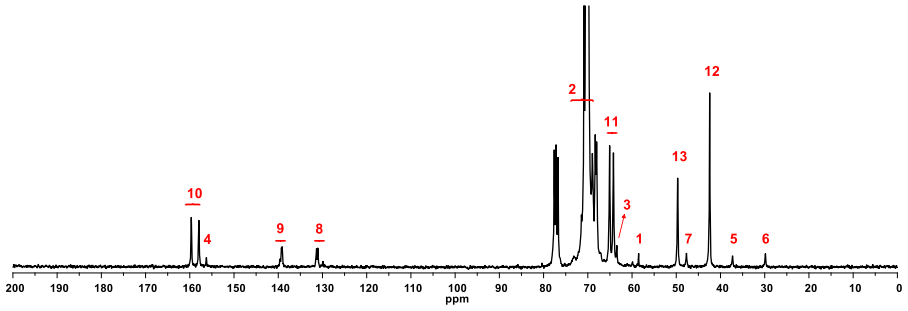


Una disolución de Alk-TEG-Cl (0.290 g, 0.70 mmol) y PEG-[G2^{AAC}]-N_3 (0.452 g, 0.070 mmol) en $CHCl_3$ (2.79 mL). se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 4.5 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento **A***, obteniéndose el compuesto PEG-[G3^{AAC}]-Cl (0.550 g, 97%) como un sólido amarillo.

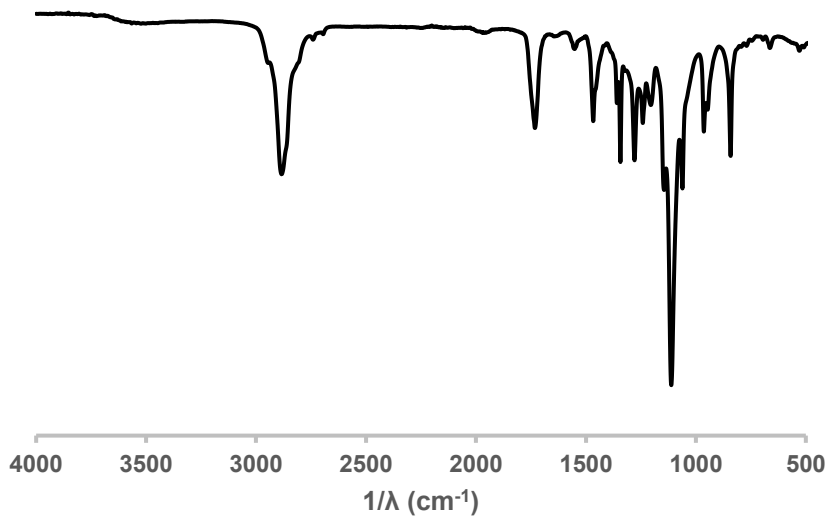
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.35 (bs, 0.71H), 4.80 (s, 12H), 4.64 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.57 – 4.40 (m, 28H), 4.20 (s, 2H), 3.95 – 3.45 (m, ~680H), 3.38 (s, 3H), 3.19 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.21 – 2.06 (m, 2H). **^{13}C-RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 159.6, 157.9, 155.8, 139.8, 139.4, 139.3, 138.9, 131.3, 130.9, 129.8, 71.3, 70.8, 70.1, 68.9, 68.3, 68.1, 65.1, 64.2, 63.3, 58.3, 49.5, 47.5, 41.8, 36.6, 29.2. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2885, 1732, 1113.



^{1}H-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).

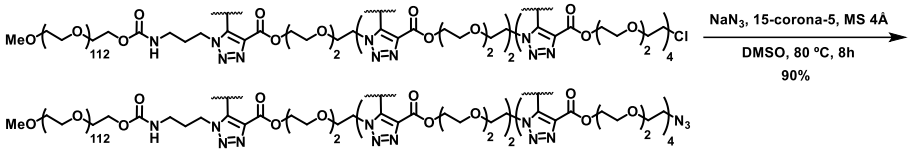


^{13}C-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).



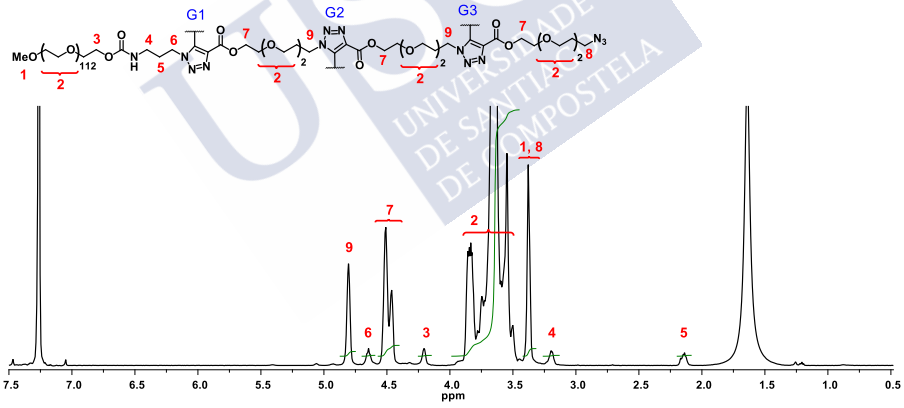
IR de PEG-[G3^{AAC}]-Cl.

PEG-[G3^{AAC}]-N_3

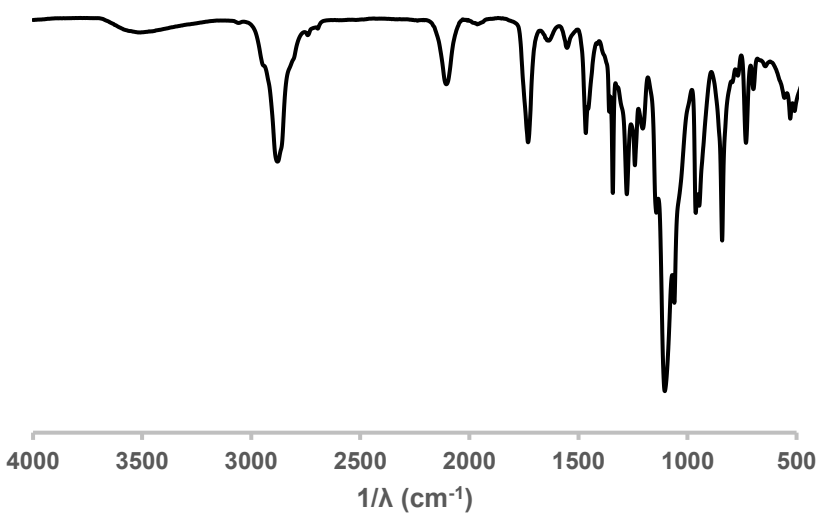


Una suspensión de NaN_3 (0.192 g, 2.95 mmol), PEG-[G3^{AAC}]-Cl (0.5 g, 0.062 mmol), éter 15-corona-5 (0.011 g, 0.049 mmol) y tamices moleculares (4Å, 0.1 g) en DMSO seco (4.92 mL), se agitó durante 5 h a ta bajo atmósfera de argón. A continuación, se calentó a 80 ºC durante 8 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***C***, obteniéndose el compuesto PEG-[G3]-N_3 (0.452 g, 90%) como un sólido amarillo.

^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.80 (s, 12H), 4.64 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.57 – 4.40 (m, 28H), 4.20 (s, 2H), 3.95 – 3.45 (m, 578H), 3.38 (s, 19H), 3.19 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 2.21 – 2.06 (m, 2H). **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2881, 2102, 1729, 1104.



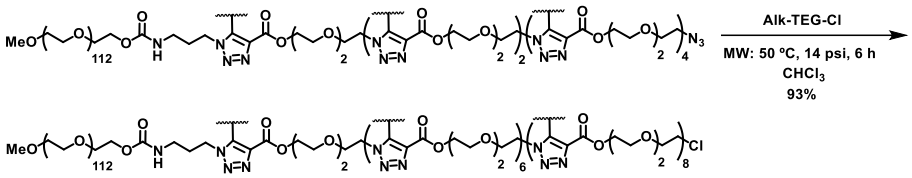
^{1}H-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-N_3 ($CDCl_3$).



IR de PEG-[G3^{AAC}]-N_3.

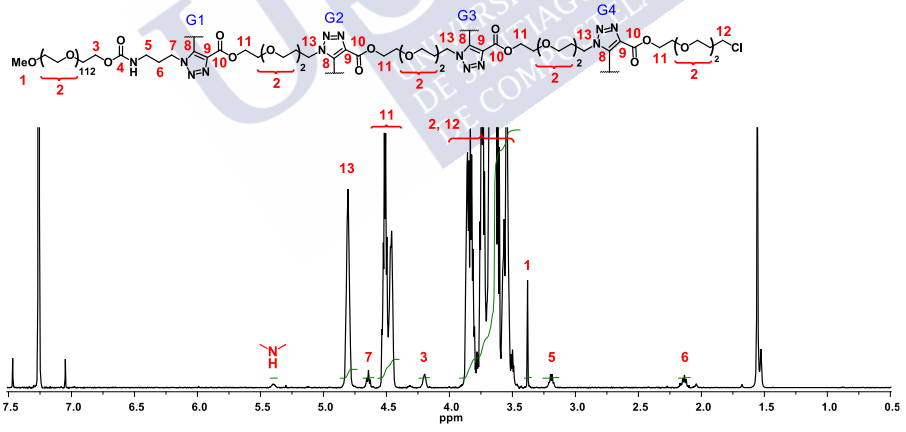
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PEG-[G4^{AAC}]-Cl

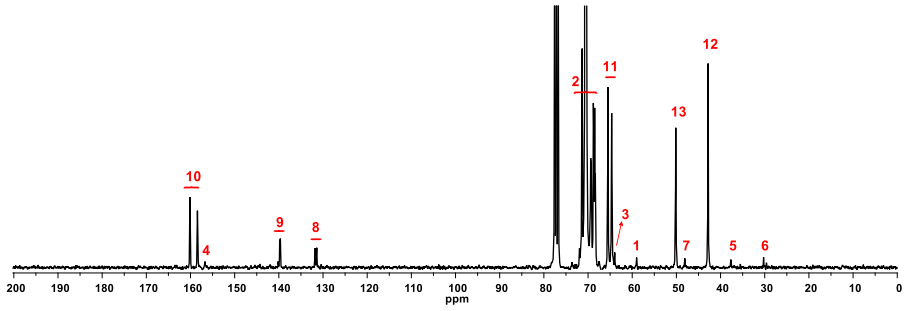


Una disolución de Alk-TEG-Cl (0.460 g, 1.11 mmol) y PEG-[G3^{AAC}]-N_3 (0.452 g, 0.055 mmol) en $CHCl_3$ (4.43 mL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 6 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento **A***, obteniéndose el compuesto PEG-[G4^{AAC}]-Cl (0.606 g, 93%) como un sólido amarillo.

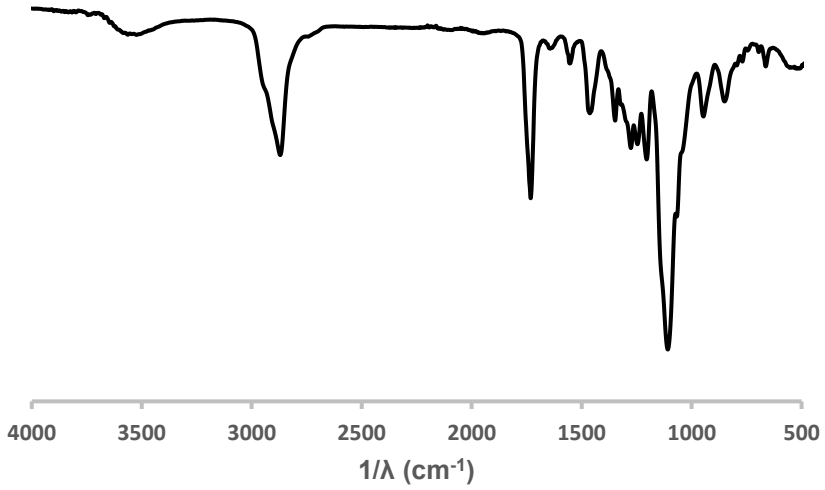
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.40 (bs, 0.46H), 4.80 (s, 28H), 4.64 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.56 – 4.41 (m, 60H), 4.18 (s, 2H), 3.95 – 3.45 (m, ~774H), 3.38 (s, 3H), 3.23 – 3.15 (m, 2H), 2.19 – 2.10 (m, 2H). **^{13}C-RMN** (75 MHz, $CDCl_3$) δ: 160.1, 158.4, 156.7, 140.2, 139.8, 139.6, 131.7, 131.4, 71.9, 71.3, 70.5, 69.4, 69.2, 68.8, 68.6, 68.5, 68.4, 65.5, 64.6, 63.9, 59.0, 50.1, 48.1, 42.8, 37.6, 30.2, 29.6. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2868, 1732, 1105.



^{1}H-RMN de PEG-[G4^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).

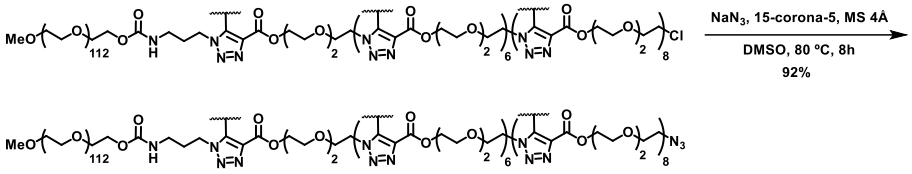


^{13}C-RMN de PEG-[G4^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).



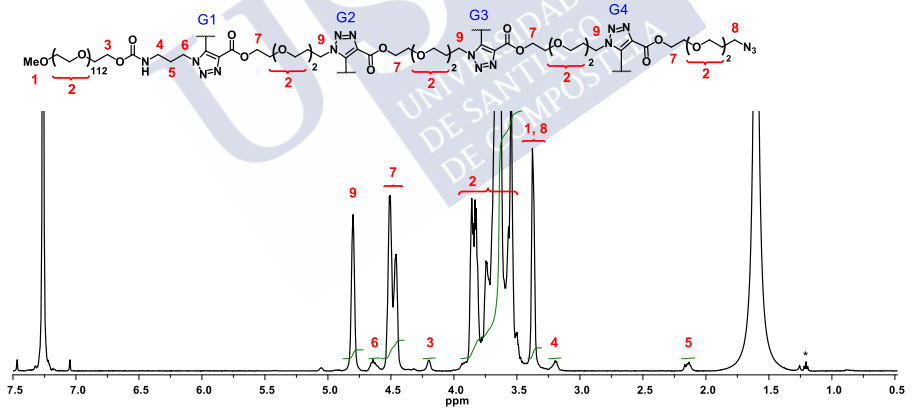
IR de PEG-[G4^{AAC}]-Cl.

PEG-[G4^{AAC}]-N_3

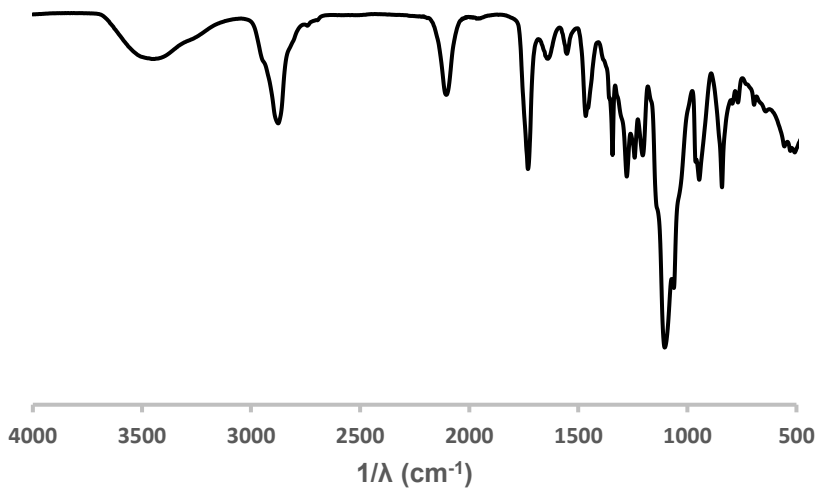


Una suspensión de NaN_3 (0.265 g, 4.07 mmol), PEG-[G4^{AAC}]-Cl (0.5 g, 0.042 mmol), éter 15-corona-5 (0.015 g, 0.068 mmol) y tamices moleculares (4Å, 0.1 g) en DMSO seco (6.78 mL), se agitó durante 5 h a ta bajo atmósfera de argón. A continuación, se calentó a 80 ºC durante 8 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***C***, obteniéndose el compuesto PEG-[G4^{AAC}]-N_3 (0.463 g, 92%) como un sólido amarillo.

^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.80 (s, 28H), 4.64 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.56 – 4.41 (m, 60H), 4.18 (s, 2H), 3.95 – 3.45 (m, ~694H), 3.38 (s, 35H), 3.23 – 3.15 (m, 2H), 2.19 – 2.10 (m, 2H). **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2874, 2106, 1729, 1105.



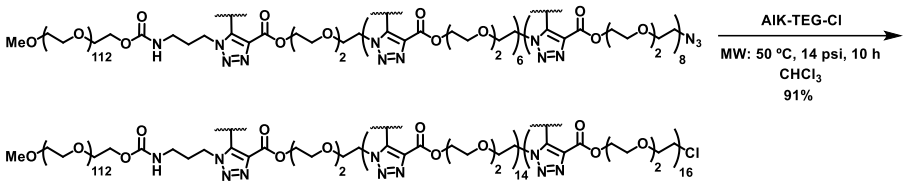
^{1}H-RMN de PEG-[G4^{AAC}]-N_3 ($CDCl_3$).



IR de PEG-[G4^{AAC}]-N_3.

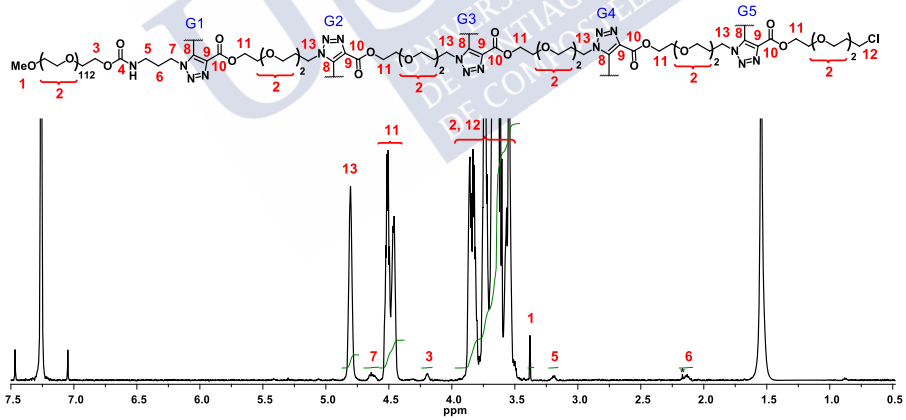
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PEG-[G5^{AAC}]-Cl

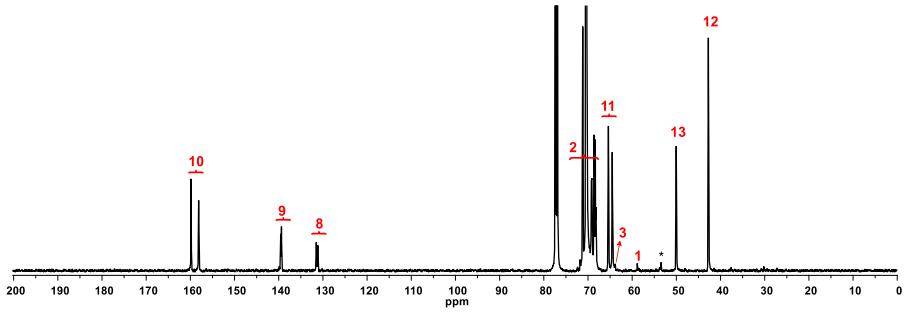


Una disolución de Alk-TEG-Cl (0.64 g, 1.54 mmol) y PEG-[G4^{AAC}]-N_3 (0.457 g, 0.038 mmol) en $CHCl_3$ (6.14 mL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 10 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento **A***, obteniéndose el compuesto PEG-[G5^{AAC}]-Cl (0.645 g, 91%) como un sólido amarillo.

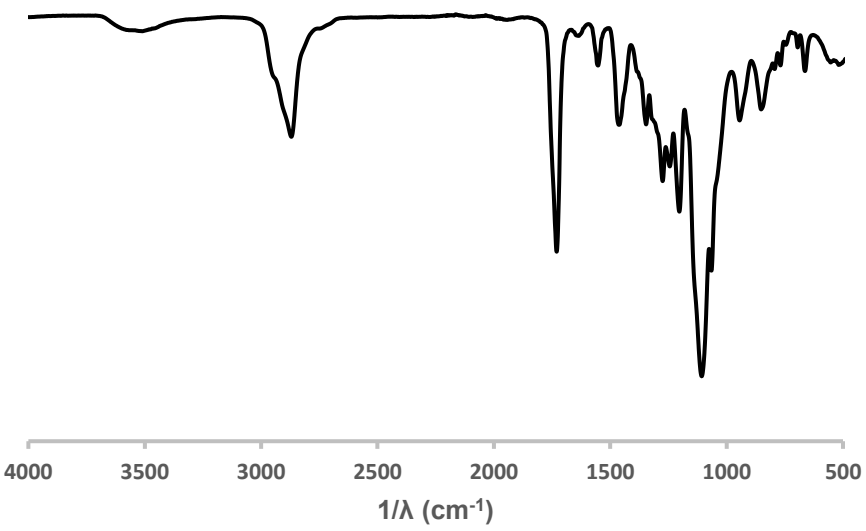
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.80 (s, 60H), 4.69 – 4.58 (m, 2H), 4.56 – 4.41 (m, 124H), 4.18 (s, 2H), 3.95 – 3.45 (m, ~1082H), 3.38 (s, 3H), 3.23 – 3.15 (m, 2H), 2.19 – 2.10 (m, 2H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 159.8, 158.1, 139.5, 139.4, 131.5, 131.2, 71.2, 70.4, 702, 69.2, 69.1, 68.6, 68.5, 68.3, 68.2, 65.4, 64.5, 58.8, 53.5, 50.0, 42.7. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2872, 1731, 1105.



^{1}H-RMN de PEG-[G5^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).

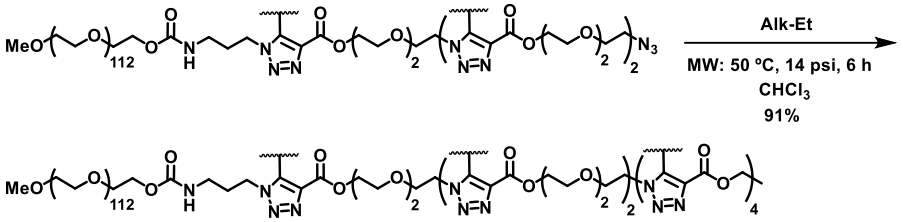


^{13}C-RMN de PEG-[G5^{AAC}]-Cl ($CDCl_3$).



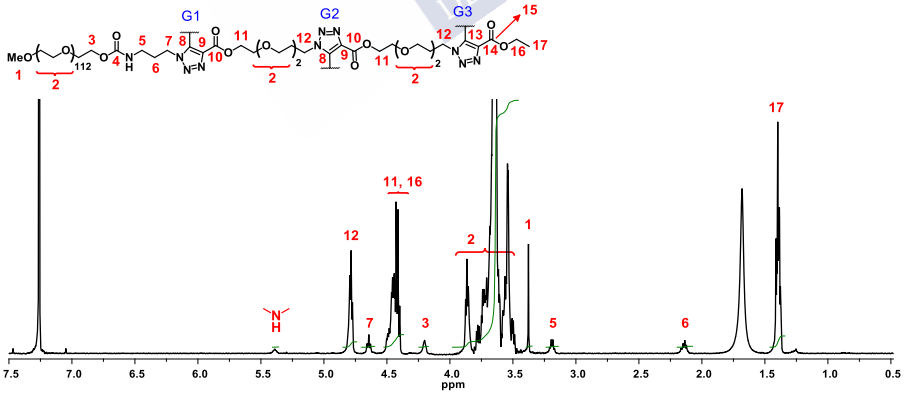
IR de PEG-[G5^{AAC}]-Cl.

PEG-[G3^{AAC}]-Et

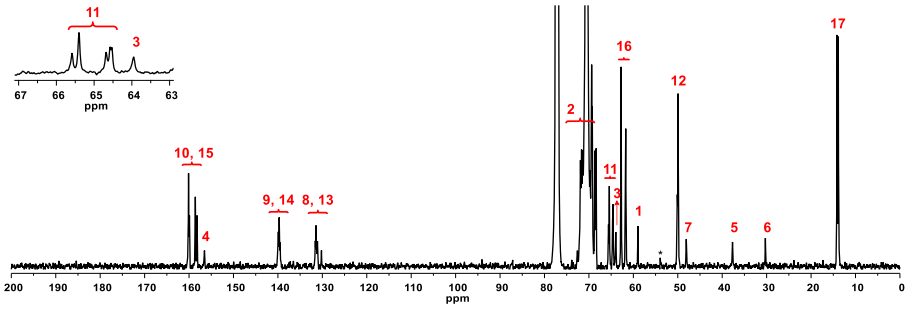


Una disolución de acetilendicarboxilato de dietilo (Alk-Et) (0.029 g, 0.17 mmol) y PEG-[G2^{AAC}]-N_3 (0.110 g, 0.017 mmol) en $CHCl_3$ (679 µL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 7 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***B***, obteniéndose el compuesto PEG-[G3^{AAC}]-Et (0.111 g, 91%) como un sólido blanco.

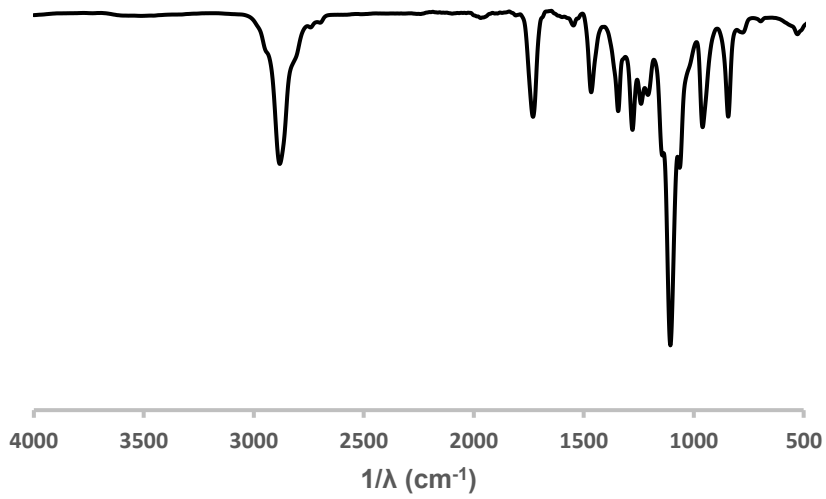
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.39 (bs, 0.44H), 4.78 (t, *J* = 5.2 Hz, 12H), 4.64 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.57 – 4.35 (m, 28H), 4.20 (s, 2H), 3.98 – 3.44 (m, ~563H), 3.38 (s, 3H), 3.27 – 3.13 (m, 2H), 2.21 – 2.06 (m, 2H), 1.49 – 1.33 (m, 24H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 160.1, 159.8, 158.5, 158.1, 156.4, 140.0, 139.8, 139.7, 139.5, 131.5, 131.4, 131.2, 131.1, 131.0, 130.1, 71.9, 71.6, 71.2, 70.4, 69.7, 69.3, 69.2, 68.6, 68.2, 65.5, 65.4, 64.6, 64.5, 63.9, 62.7, 61.7, 61.7, 58.9, 50.1, 49.9, 48.0, 37.6, 30.6, 29.9, 14.1, 13.8. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2884, 1732, 1106.



^{1}H-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Et ($CDCl_3$).

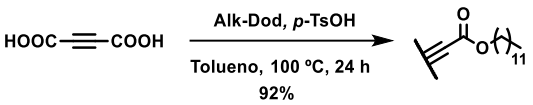


^{13}C-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Et ($CDCl_3$).



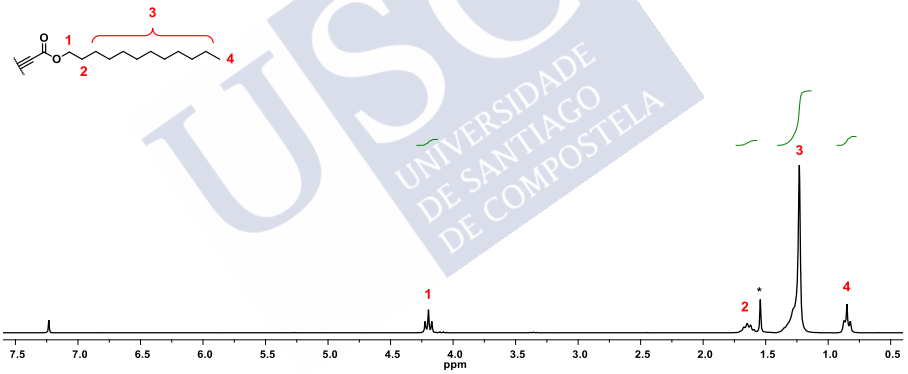
IR de PEG-[G3^{AAC}]-Et.

But-2-inodiato de didodecilo (Alk-Dod)



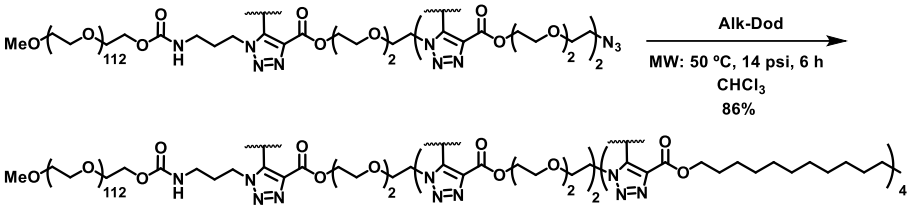
A una suspensión de ácido 2-butinodioico (1 g, 8.76 mmol) y 1-dodecanol (3.91 g, 0.021 mol) en tolueno (17 mL) se le añadió H_2SO_4 (0.047 g, 0.48 mmol) y se calentó a 110 ºC, incorporando un cabezal de destilación Dean-Stark, durante 24 h. La disolución se distribuyó entre Et_2O (50 mL) y una disolución saturada de $NaHCO_3$ (50 mL). La fase orgánica se lavó sucesivamente con H_2O (4 x 50 mL), se secó y concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por MPLC (gradiente de hexano:AcOEt (80:20), 30 min) obteniéndose Alk-Dod (4.57 g, 99%) como un sólido blanco.

^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.20 (t, J = 6.7 Hz, 4H), 1.65 (quint, J = 6.6 Hz, 4H), 1.43 – 1.12 (m, 36H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 6H)



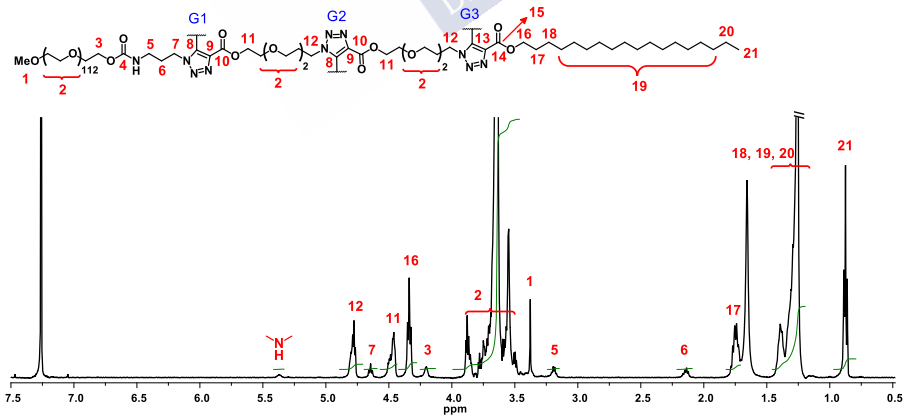
^{1}H-RMN de Alk-Dod ($CDCl_3$).

PEG-[G3^{AAC}]-Dod

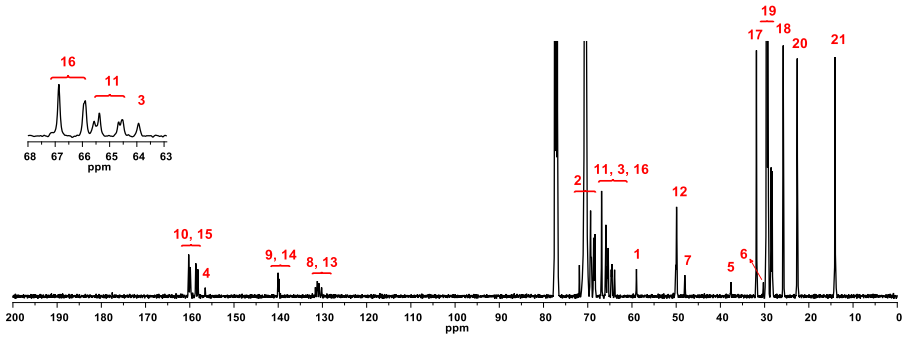


Una disolución de Alk-Dod (0.69 g, 0.15 mmol) y PEG-[G2^{AAC}]-N_3 (0.100 g, 0.015 mmol) en $CHCl_3$ (619 µL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 7 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***B***, obteniéndose el compuesto PEG-[G3^{AAC}]-Et (0.110 g, 86%) como un sólido blanco.

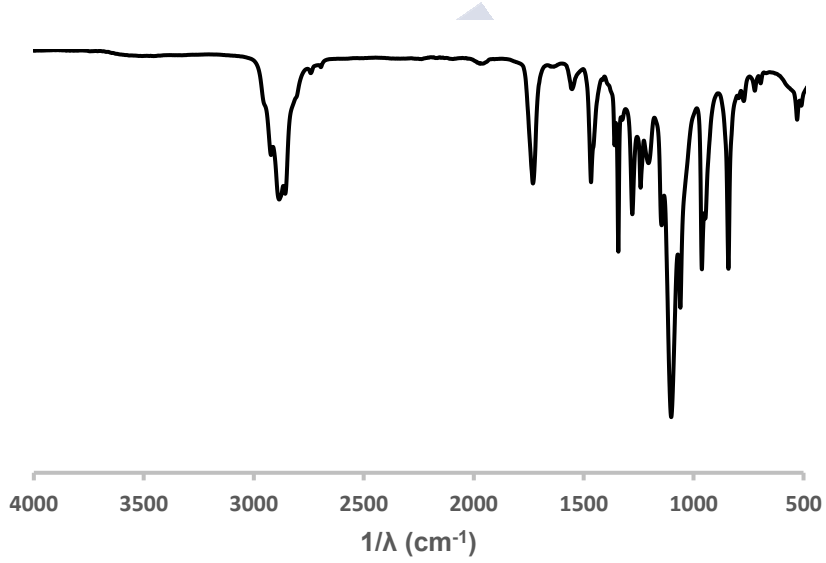
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.37 (bs, 0.48H), 4.88 – 4.70 (m, 12H), 4.64 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.57 – 4.42 (m, 12H), 4.34 (t, *J* = 7.0 Hz, 16H), 4.21 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 3.94 – 3.43 (m, 710H), 3.38 (s, 3H), 3.19 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.14 (q, *J* = 7.5, 6.7 Hz, 2H), 1.75 (q, *J* = 7.9 Hz, 16H), 1.48 – 1.17 (m, 240H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 24H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 160.3, 159.9, 158.6, 158.2, 156.5, 140.0, 139.9, 131.6, 131.1, 130.8, 130.2, 77.4, 77.4, 77.2, 76.9, 71.9, 70.5, 69.4, 69.2, 68.7, 68.4, 66.9, 66.0, 6599, 65.6, 65.4, 64.7, 64.5, 63.9, 59.0, 49.9, 48.1, 37.6, 31.9, 30.3, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 28.5, 28.3, 25.8, 22.6, 14.1. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2885, 1732, 1103.



^{1}H-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Dod ($CDCl_3$).

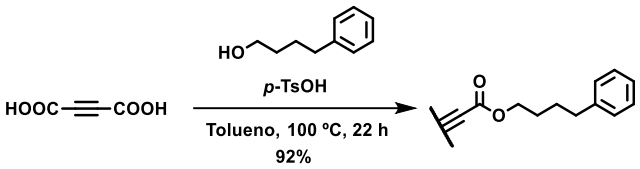


^{13}C-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Dod ($CDCl_3$).



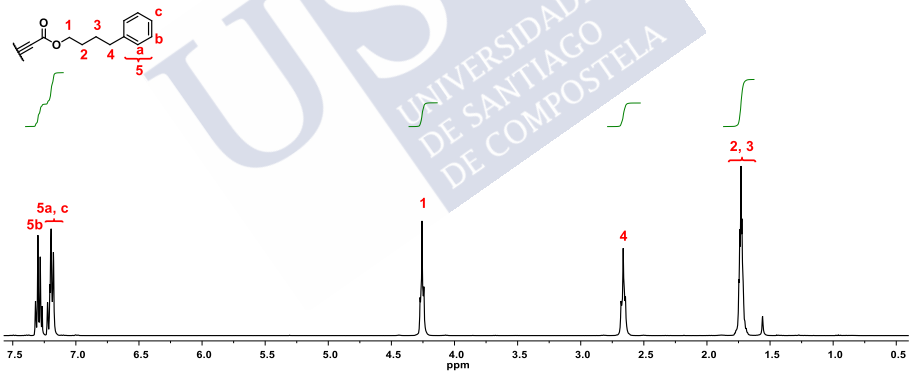
IR de PEG-[G3^{AAC}]-Dod.

But-2-inodiato de bis(4-fenilbutilo) (Alk-Bu-Ph)



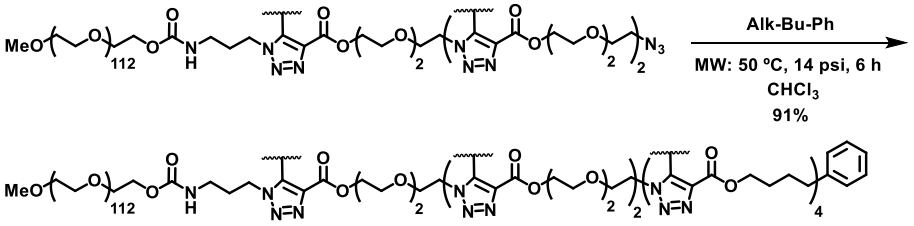
A una suspensión de ácido 2-butinodioico (0.326 g, 2.88 mmol) y 4-fenil-1-butanol (1.3 g, 8.64 mmol) en tolueno (4 mL) se le añadió *p*-TsOH (0.046 g, 0.24 mmol) y se calentó a 110 ºC, incorporando un cabezal de destilación Dean-Stark, durante 22 h. La disolución se distribuyó entre Et_2O (15 mL) y una disolución saturada de $NaHCO_3$ (25 mL). La fase orgánica se lavó sucesivamente con H_2O (4 x 25 mL), se secó y concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por MPLC (gradiente de heptano a AcOEt, 30 min) obteniéndose Alk-Bu-Ph (1 g, 92%) como un aceite incoloro.

^{1}**H-NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.36 – 7.23 (m, 4H), 7.24 – 7.12 (m, 6H), 4.30 – 4.22 (m, 4H), 2.74 – 2.54 (m, 4H), 1.80 – 1.65 (m, 8H).



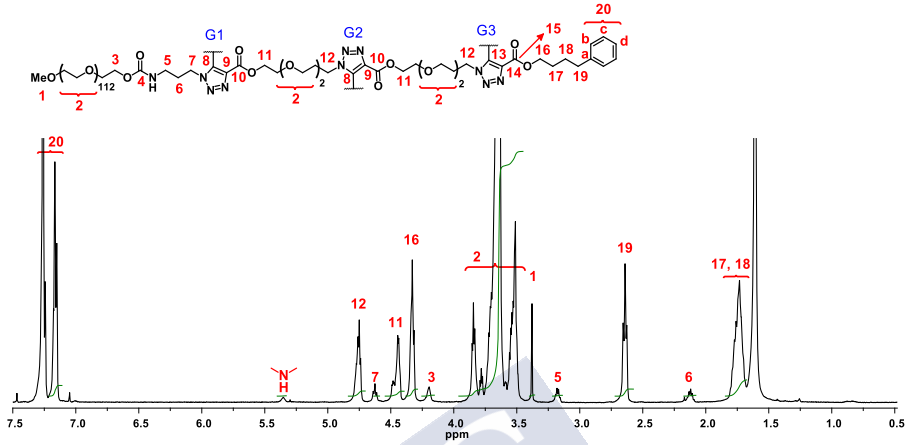
^{1}H-RMN de Alk-Bu-Ph ($CDCl_3$).

PEG-[G3^{AAC}]-Bu-Ph

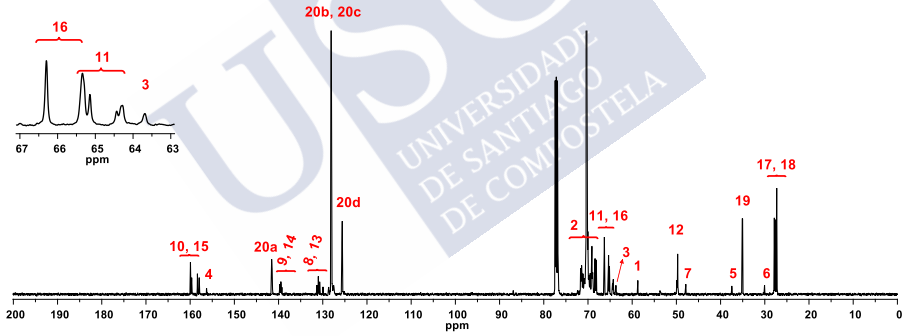


Una disolución de Alk-Bu-Ph (0.087 g, 0.23 mmol) y PEG-[G2^{AAC}]-N_3 (0.150 g, 0.023 mmol) en $CHCl_3$ (930 µL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 7 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***B***, obteniéndose el compuesto PEG-[G3^{AAC}]-Ph (0.169 g, 91%) como un sólido blanco.

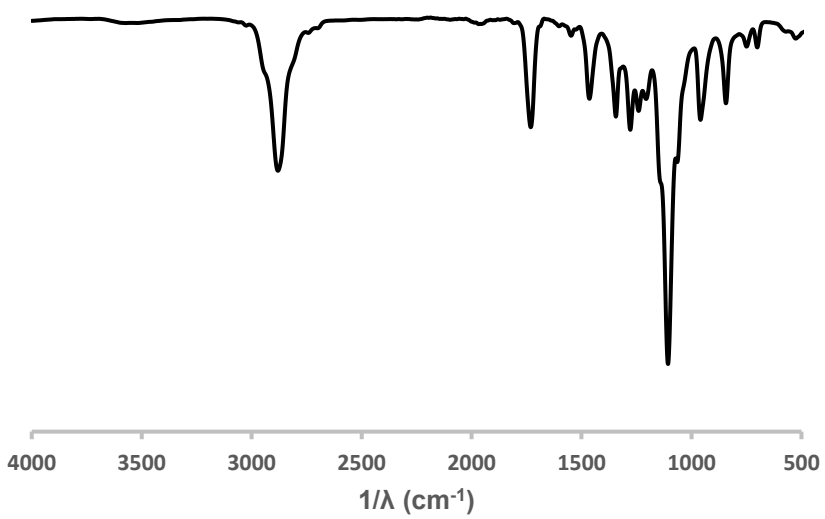
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 7.24 (s, 8H), 7.16 (t, *J* = 6.5 Hz, 24H), 5.35 (bs, 0.56H), 4.84 – 4.70 (m, 12H), 4.63 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.53 – 4.39 (m, 12H), 4.39 – 4.28 (m, 16H), 4.20 (s, 2H), 3.92 – 3.45 (s, ~570H), 3.38 (s, 3H), 3.21 – 3.13 (m, 2H), 2.64 (t, *J* = 7.1 Hz, 16H), 2.16 – 2.08 (m, 2H), 1.84 – 1.65 (m, 32H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 159.9, 159.7, 159.6, 158.3, 157.9, 156.2, 141.5, 141.4, 141.3, 139.6, 139.4, 139.2, 131.3, 131.0, 130.7, 130.6, 129.9, 129.7, 128.7, 128.5, 128.1, 127.5, 125.6, 125.5, 71.6, 71.4, 71.1, 70.8, 70.3, 70.0, 69.9, 69.7, 69.5, 69.2, 69.1, 68.9, 68.4, 68.1, 66.2, 65.3, 65.1, 64.4, 64.2, 63.6, 58.7, 49.8, 49.7, 49.5, 37.4, 35.0, 30.0, 27.8, 27.6, 27.3, 27.2. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2876, 1732, 1106.



^{1}H-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Ph ($CDCl_3$).



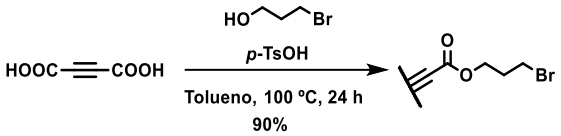
^{13}C-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Ph ($CDCl_3$).



IR de PEG-[G3^{AAC}]-Ph.

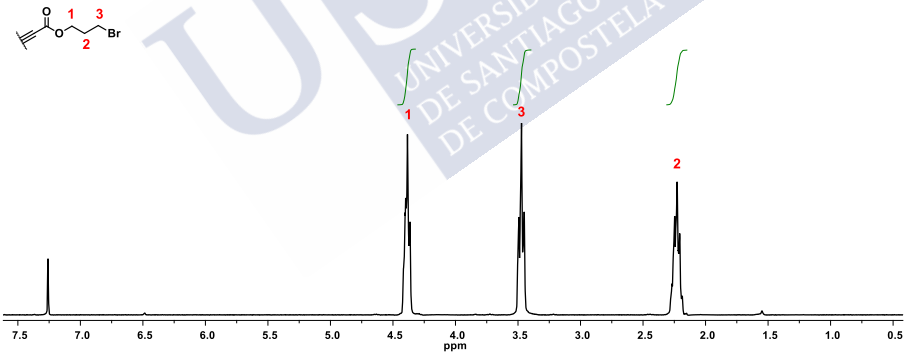
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

But-2-inodioato de bis(3-bromopropilo) (Alk-Pr-Br)



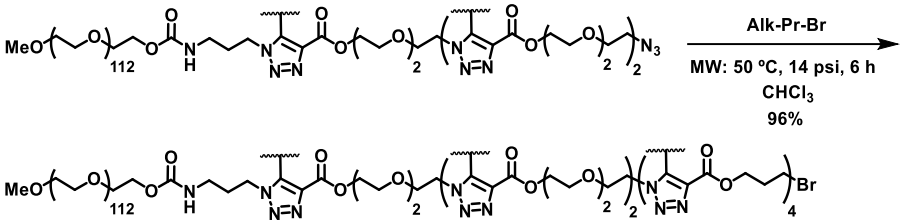
A una suspensión de ácido 2-butinodioico (1.6 g, 14.0 mmol) y 3-bromo-1-propanol (5.8 g, 42.1 mmol) en tolueno (24 mL) se le añadió *p*-TsOH (0.227 g, 1.2 mmol) y se calentó a 110 ºC incorporando un cabezal de destilación Dean-Stark durante 24 h. La disolución se distribuyó entre AcOEt (30 mL) y H_2O (30 mL). Se extrajo la fase acuosa con AcOEt (30 mL), y las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de $NaHCO_3$ (2 x 30 mL), H_2O (3 x 30mL) y salmuera (30 mL), se secó y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por MPLC (gradiente de heptano a un gradiente de heptano:AcOEt (85:15), 30 min) obteniéndose Alk-Pr-Br (4.5 g, 90%) como un aceite incoloro.

^{1}H-RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ: 4.40 (t, *J* = 6.0 Hz, 4H), 3.48 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H), 2.24 (quint, *J* = 6.2 Hz, 4H).



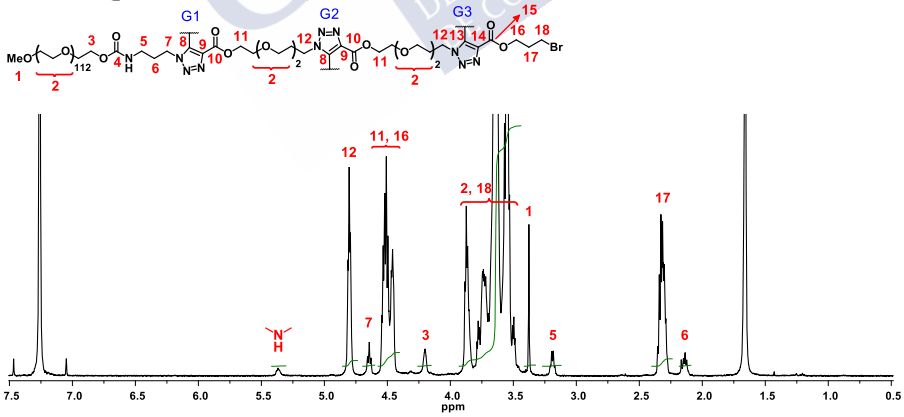
^{1}H-RMN de Alk-Pr-Br ($CDCl_3$).

PEG-[G3^{AAC}]-Pr-Br

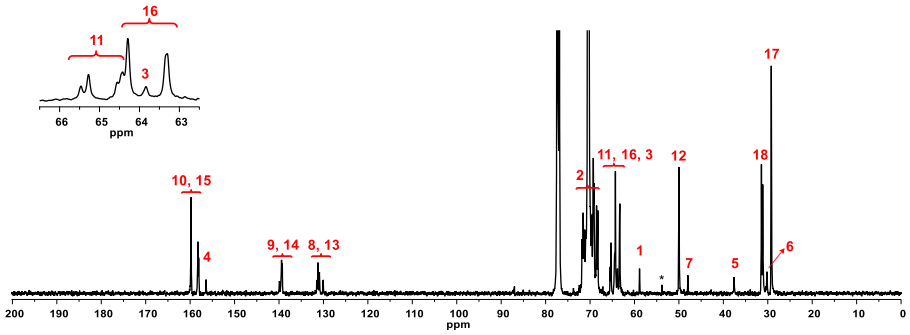


Una disolución de Alk-Pr-Br (0.082 g, 0.23 mmol) y PEG-[G2^{AAC}]-N_3 (0.150 g, 0.023 mmol) en $CHCl_3$ (930 µL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 7 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***B***, obteniéndose el compuesto PEG-[G3]-Br (0.174 g, 96%) como un sólido blanco.

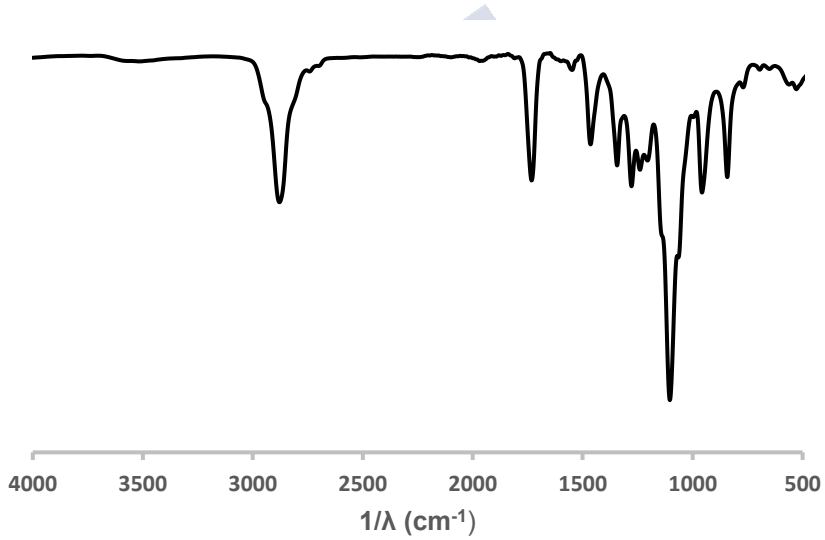
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.37 (bs, 0.75H), 4.80 (t, *J* = 4.7 Hz, 12H), 4.64 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.62 – 4.38 (m, 28H), 4.20 (s, 2H), 3.98 – 3.45 (m, ~553H), 3.38 (s, 3H), 3.22 – 3.15 (m, 2H), 2.41 – 2.23 (m, 16H), 2.18 – 2.09 (m, 2H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 159.7, 158.2, 158.0, 156.4, 140.0, 139.7, 139.4, 139.2, 131.5, 131.3, 131.2, 131.1, 131.0, 130.9, 130.4, 129.7, 71.7, 71.5, 71.2, 70.9, 70.4, 69.6, 69.2, 69.1, 68.5, 68.2, 65.4, 65.2, 64.4, 64.2, 63.8, 63.3, 63.1, 58.8, 53.9, 53.6, 49.9, 47.9, 37.5, 31.4, 31.1, 31.1, 31.0, 30.1, 29.2. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2876, 1732, 1104.



^{1}H-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Br ($CDCl_3$).

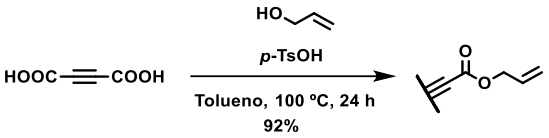


^{13}C-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Br ($CDCl_3$).



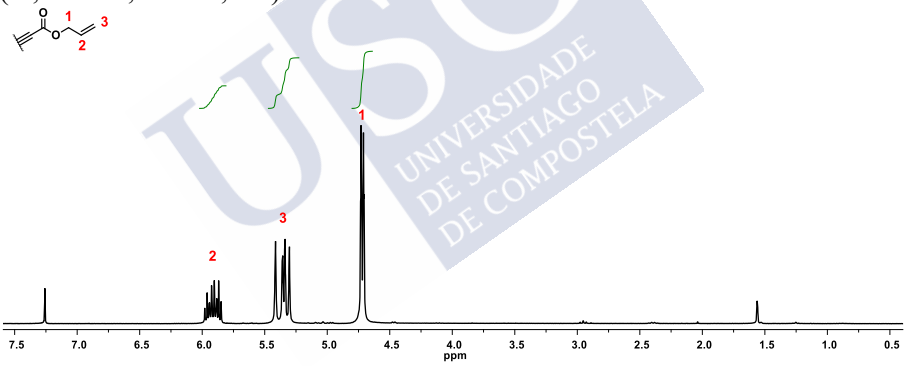
IR de PEG-[G3^{AAC}]-Br.

But-2-inodiato de dialilo (Alk-All)



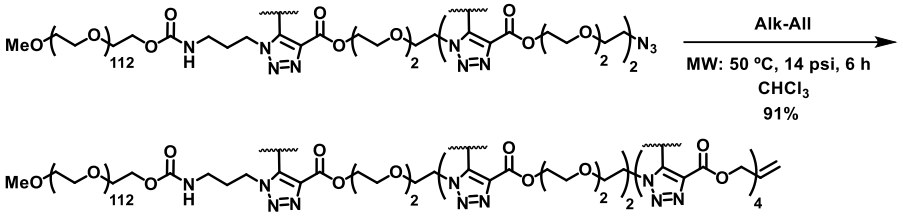
A una suspensión de ácido 2-butinodioico (2 g, 0.017 mol) y alcohol alílico (2.2 g, 0.038 mol) en tolueno (17 mL) se le añadió *p*-TsOH (0.19 g, 0.06 mmol) y se calentó a 110 ºC, incorporando un cabezal de destilación Dean-Stark, durante 24 h. La disolución se distribuyó entre Et_2O (50 mL) y una disolución saturada de $NaHCO_3$ (50 mL). La fase orgánica se lavó sucesivamente con H_2O (4 x 50 mL), se secó y concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por MPLC (gradiente de hexano:AcOEt (90:10), 30 min) obteniéndose Alk-All (1.54 g, 45%) como un aceite incoloro.

^{1}H-NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.91-5.70 (m, 2H), 5.51 – 5.19 (m, 4H), 4.72 (dt, J = 6.0, 1.4 Hz, 4H).



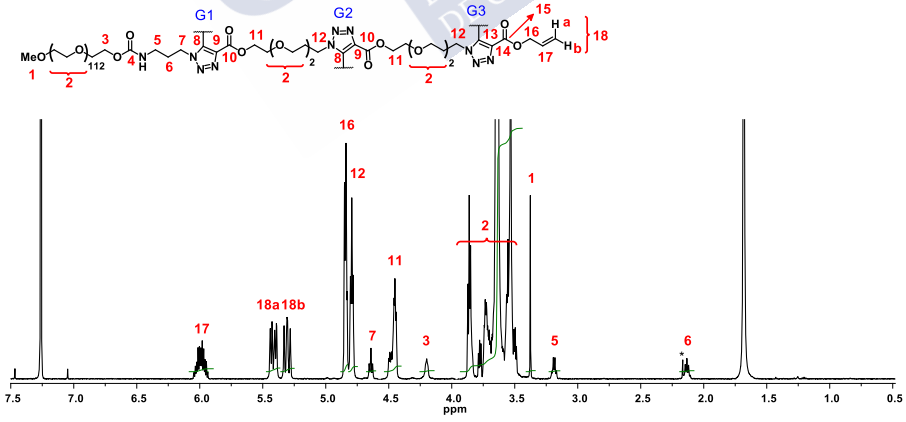
^{1}H-RMN de Alk-All ($CDCl_3$).

PEG-[G3^{AAC}]-All

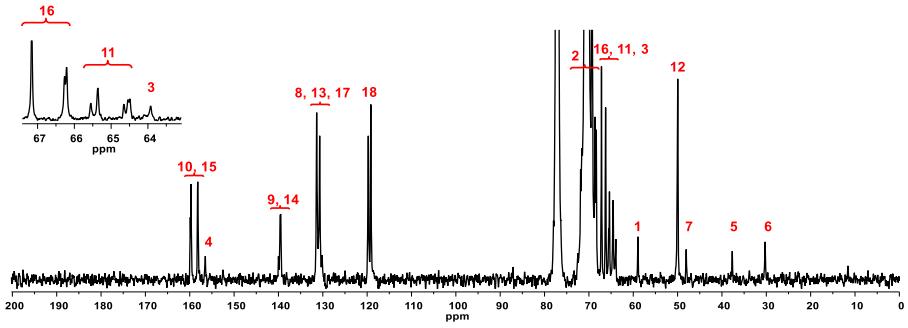


Una disolución de Alk-All (0.161 g, 0.83 mmol) y PEG-[G2^{AAC}]-N_3 (0.537 g, 0.083 mmol) en $CHCl_3$ (3.32 mL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 7 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento* ***B***, obteniéndose el compuesto PEG-[G3^{AAC}]-All (0.548 g, 91%) como un sólido amarillo.

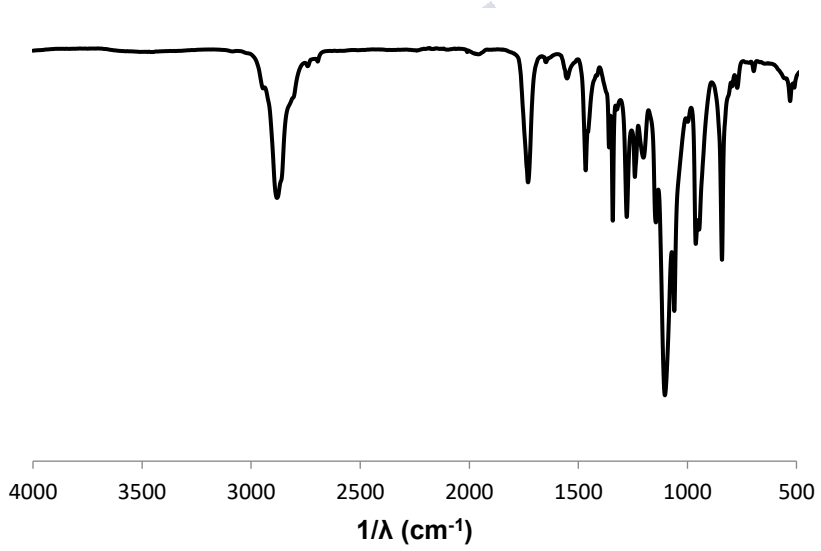
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 6.08 – 5.90 (m, 8H), 5.46 – 5.36 (m, 8H), 5.35 – 5.24 (m, 16H), 4.90 – 4.75 (m, 12H), 4.64 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.53 – 4.40 (m, 28H), 4.20 (s, 2H), 3.89 – 3.44 (m, ~557H), 3.38 (s, 3H), 3.19 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.13 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 159.8, 159.7, 158.2, 156.6, 156.2, 140.2, 139.7, 139.6, 139.5, 139.1, 131.6, 131.5, 131.4, 131.3, 131.1, 130.7, 130.6, 119.8, 119.7, 119.2, 119.1, 71.8, 71.1, 70.5, 69.9, 69.3, 69.2, 68.6, 68.3, 67.2, 66.2, 65.5, 65.3, 64.6, 64.5, 63.9, 58.9, 49.9, 48.2, 47.8, 37.8, 37.3, 30.3, 29.8. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2882, 1729, 1104.



^{1}H-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-All ($CDCl_3$).

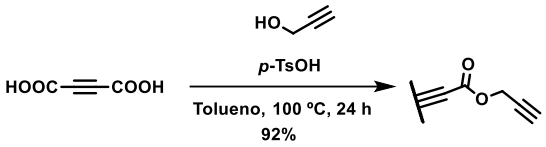


^{13}C-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-All ($CDCl_3$).



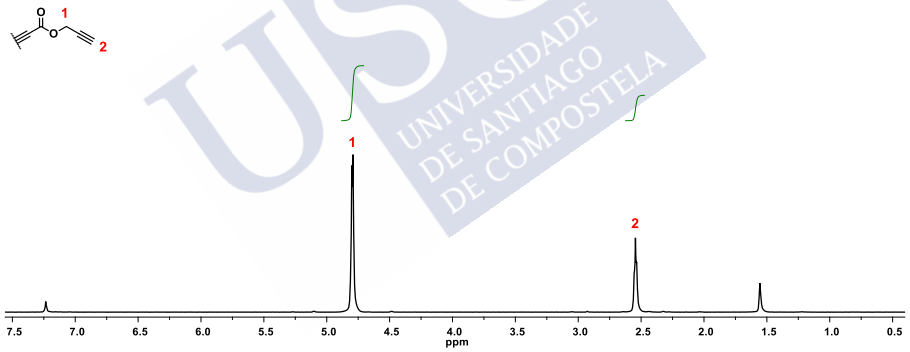
IR de PEG-[G3^{AAC}]-All.

But-2-inodiato de di(prop-2-in-1-ilo) (Alk-Prop)



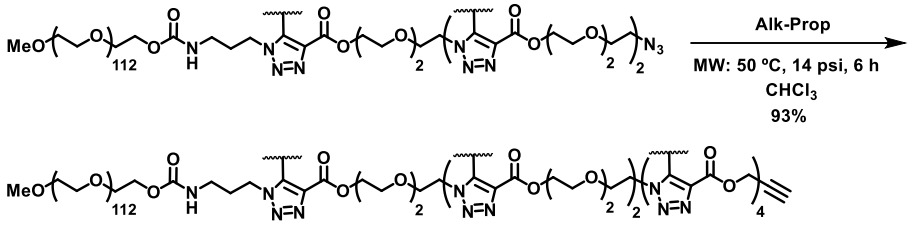
A una suspensión de ácido 2-butinodioico (2.4 g, 0.021 mol) y alcohol propargílico (2.6 g, 0.047 mol) en tolueno (21 mL) se le añadió *p*-TsOH (0.243 g, 1.27 mmol) y se calentó a 110 ºC, incorporando un cabezal de destilación Dean-Stark, durante 20 h. La disolución se distribuyó entre Et_2O (50 mL) y una disolución saturada de $NaHCO_3$ (50 mL). La fase orgánica se lavó sucesivamente con H_2O (4 x 50 mL), se secó y concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por MPLC (gradiente de CH_2Cl_2 a MeOH, 30 min) obteniéndose Alk-Prop (3.55 g, 89%) como un aceite incoloro.

^{1}H-NMR (250 MHz, CDCl3) δ: 4.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 4H), 2.54 (q, *J* = 2.3 Hz, 2H).



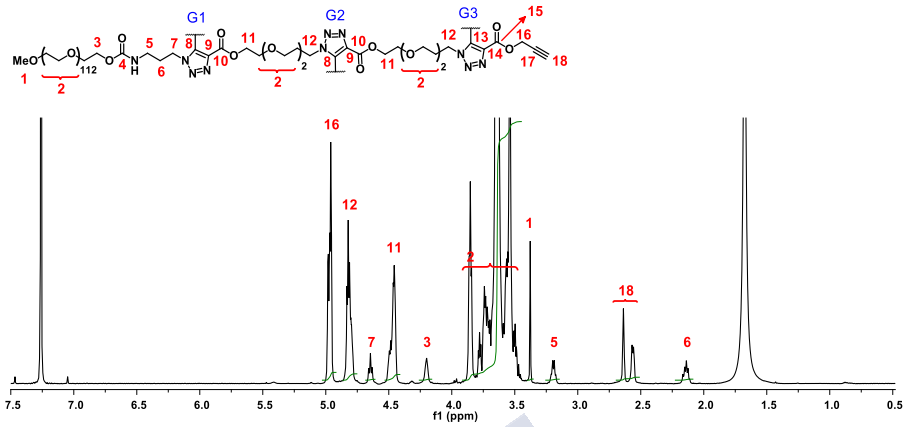
^{1}H-RMN de Alk-Prop ($CDCl_3$).

PEG-[G3^{AAC}]-Prop

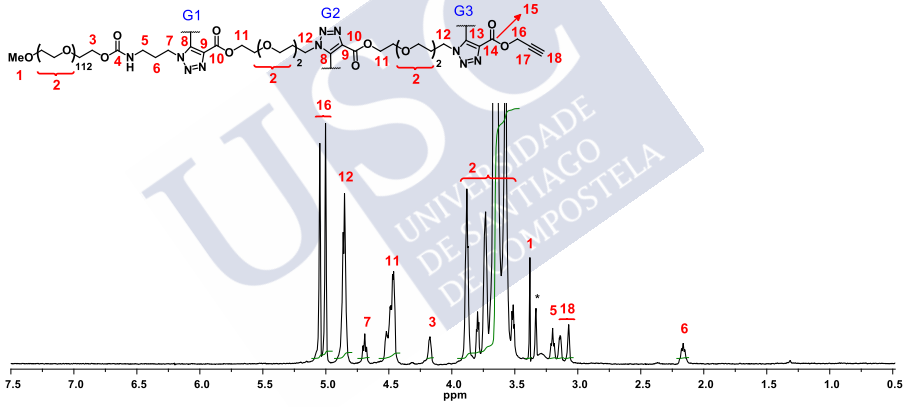


Una disolución de Alk-Prop (0.094 g, 0.49 mmol) y PEG-[G2^{AAC}]-N_3 (0.321 g, 0.049 mmol) en $CHCl_3$ (1.98 mL) se calentó mediante radiación microondas (50 ºC, 20W, 14 psi de flujo de aire) durante 7 h. La mezcla de reacción se elaboró según el *Procedimiento **B***, obteniéndose el compuesto PEG-[G3^{AAC}]-Prop (0.333 g, 93%) como un sólido amarillo.

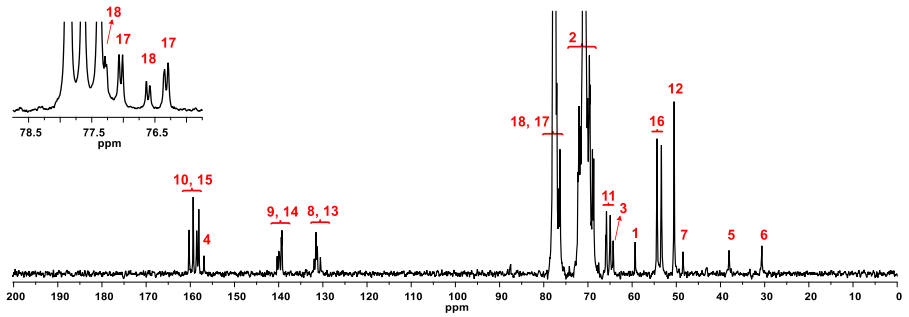
^{1}H-RMN (500 MHz, $CDCl_3$) δ: 5.05 – 4.91 (m, 16H), 4.88 – 4.76 (m, 12H), 4.65 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.54 – 4.41 (m, 12H), 4.20 (s, 2H), 3.91 – 3.44 (m, ~535H), 3.38 (s, 3H), 3.25 – 3.16 (m, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.60 – 2.50 (m, 3H), 2.23 – 2.08 (m, 2H). **^{1}H-RMN** (500 MHz, CD_3OD) δ: 5.05 (s, 8H), 5.00 (s, 8H), 4.94 – 4.80 (m, 12H), 4.69 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 4.56 – 4.40 (m, 12H), 4.17 (s, 2H), 3.97 – 3.49 (m, 600H), 3.38 (s, 3H), 3.20 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.17 – 3.12 (m), 3.07 (s), 2.21 – 2.13 (m, 2H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, $CDCl_3$) δ: 160.3, 159.4, 158.6, 158.5, 158.4, 158.1, 158.0, 156.9, 140.3, 139.9, 139.8, 139.5, 139.4, 139.3, 139.2, 131.9, 131.6, 131.5, 131.4, 131.2, 130.5, 88.1, 86.9, 77.0, 76.6, 76.5, 76.3, 76.2, 72.2, 72.0, 71.7, 71.4, 70.8, 70.5, 70.3, 70.0, 69.8, 69.6, 69.5, 68.9, 68.6, 65.9, 65.8, 64.9, 64.2, 59.3, 54.4, 54.3, 53.4, 53.3, 50.5, 50.0, 48.4, 38.1, 37.8, 30.6, 30.0. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2868, 2128, 1737, 1104.



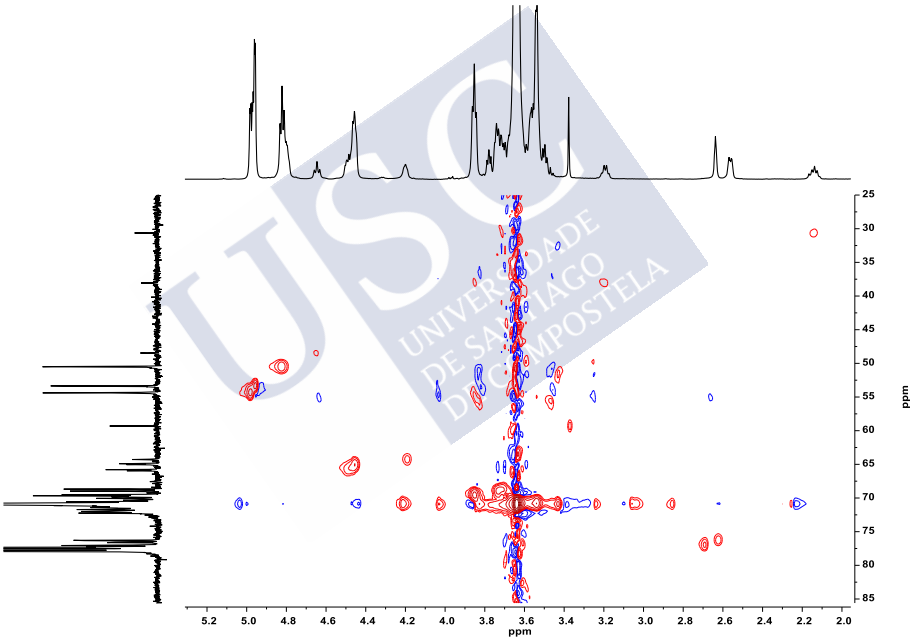
^{1}H-RMN de PEG[G3^{AAC}]-Prop ($CDCl_3$).



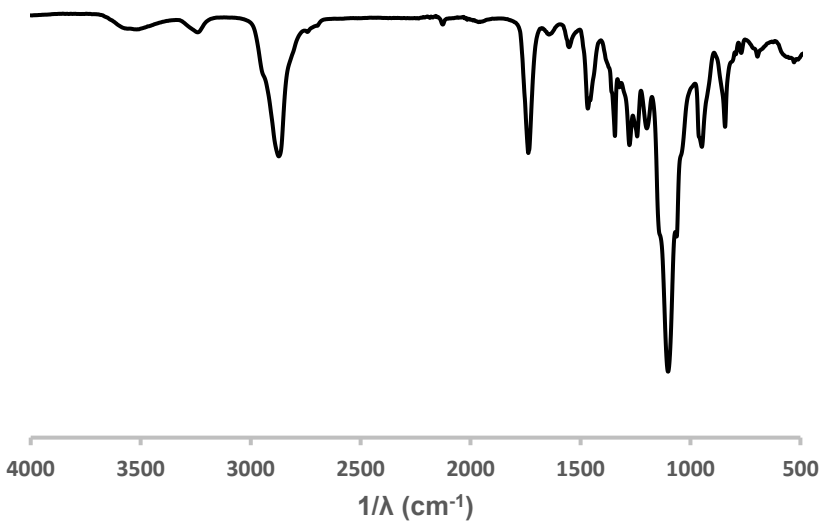
^{1}H-RMN de PEG[G3^{AAC}]-Prop (CD_3OD) (Filtro difusión 50 ms).



^{13}C-RMN de PEG[G3^{AAC}]-Prop ($CDCl_3$).

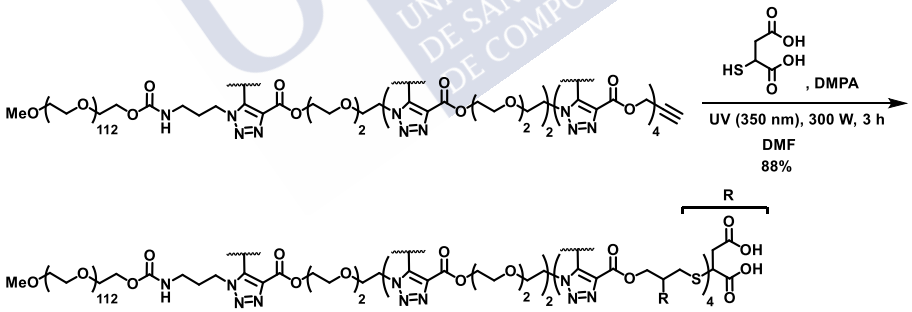


HSQC de PEG[G3^{AAC}]-Prop ($CDCl_3$).



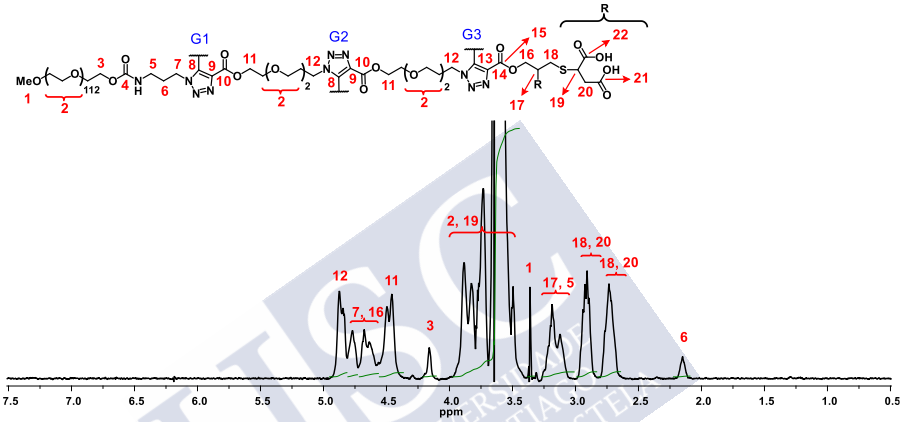
IR de PEG[G3^{AAC}]-Prop.

PEG-[G3^{AAC}]-ATM

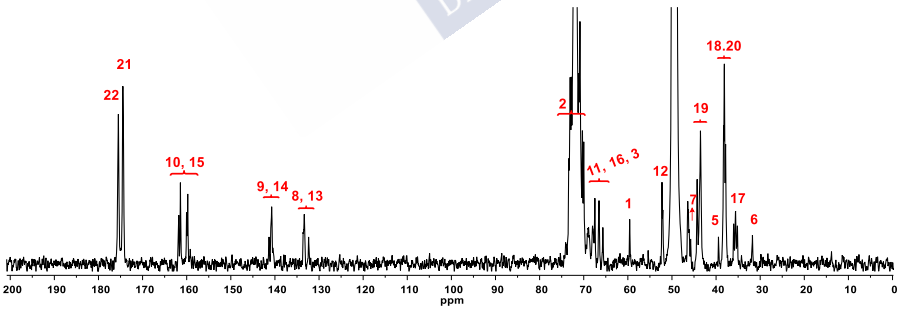


Una disolución de PEG-[G3^{AAC}]-Prop (0.217 g, 0.03 mmol), ácido tiomálico (0.216 g, 1.44 mmol) y DMPA (0.006 g, 0.02 mmol) en DMF seca (697 µL) se irradió con una lámpara de xenón durante 3h. La disolución fue concentrada a vacío y el crudo de reacción se purificó mediante precipitación en MeOH / *i*-PrOH. Tras 24 h a ta, el precipitado obtenido se filtró y se lavó con *i*-PrOH (3 x 50 mL). Se obtuvo el compuesto PEG-[G3]-ATS (0.254 g, 88%) como un sólido semitransparente.

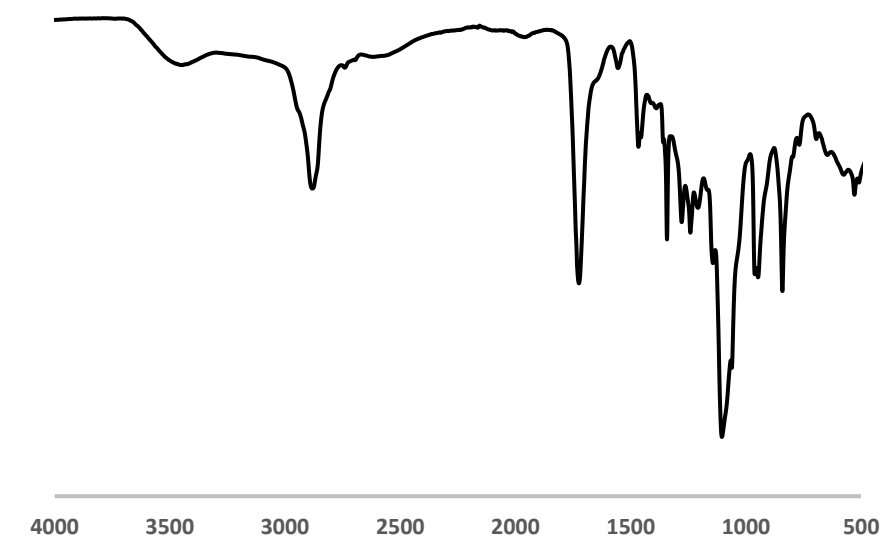
^{1}H-RMN (500 MHz, MeOD) δ: 4.94 – 4.81 (m, 12H), 4.81 – 4.72 (m, 8H), 4.72 – 4.58 (m, 10H), 4.57 – 4.36 (m, 12H), 4.16 (s, 2H), 3.99 – 3.44 (m, 792H), 3.37 (s, 3H), 3.29 – 3.03 (m, 10H), 3.01 – 2.85 (m, 12H), 2.83 – 2.64 (m, 12H), 2.15 (s, 2H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, CD_3OD) δ: 175.5, 174.5, 161.9, 161.8, 161.4, 160.0, 159.7, 141.3, 140.9, 140.7, 133.6, 133.4, 133.3, 132.4, 73.6, 73.1, 72.0, 71.2, 70.9, 70.3, 70.0, 69.0, 68.0, 67.5, 66.5, 65.7, 59.6, 52.3, 46.1, 44.3, 43.5, 39.5, 38.1, 37.8, 36.0, 35.6, 35.2, 31.8. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2877, 1725, 1104.



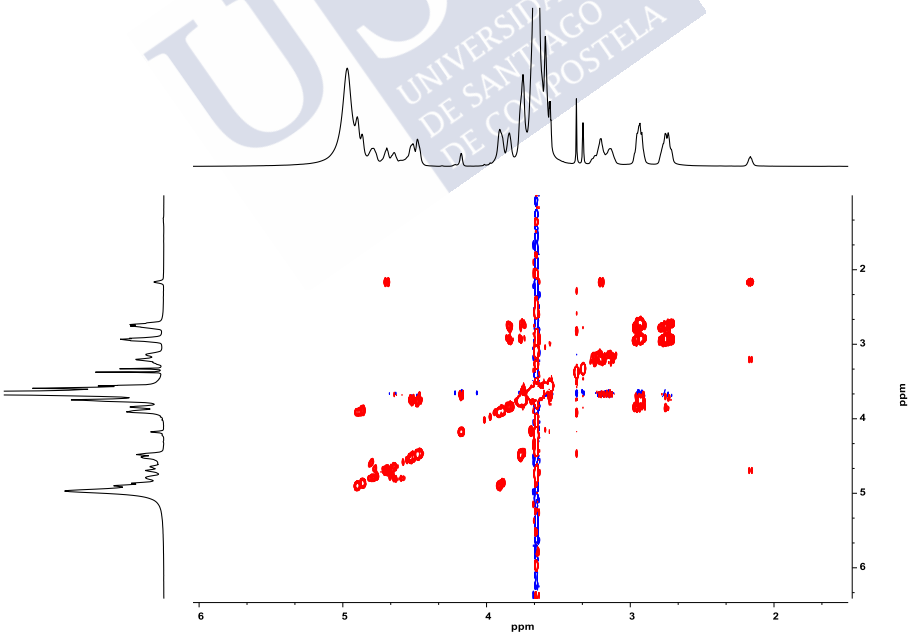
^{1}H-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-ATM (CD_3OD) (Filtro difusión 100 ms).



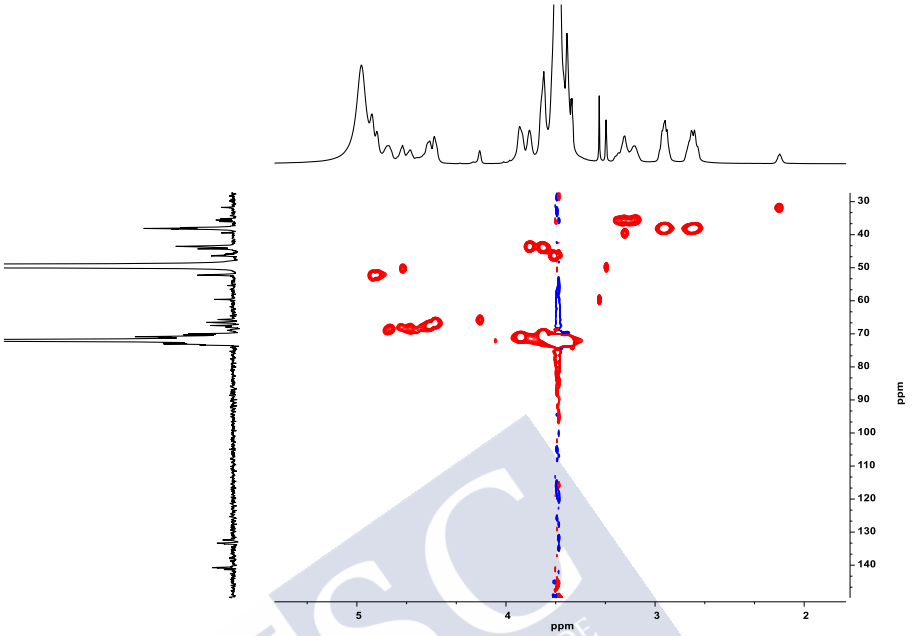
^{13}C-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-ATM (CD_3OD).



IR de PEG-[G3^{AAC}]-ATM.

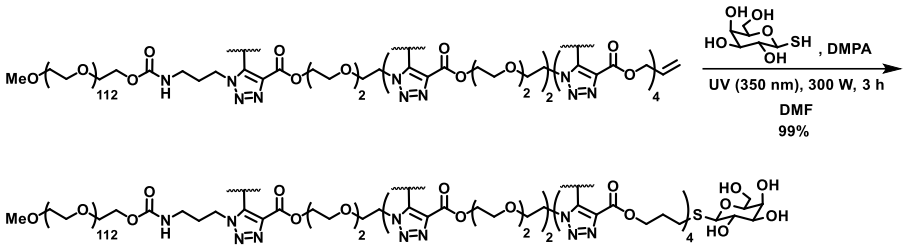


COSY de PEG-[G3^{AAC}]-ATM (CD_3OD).



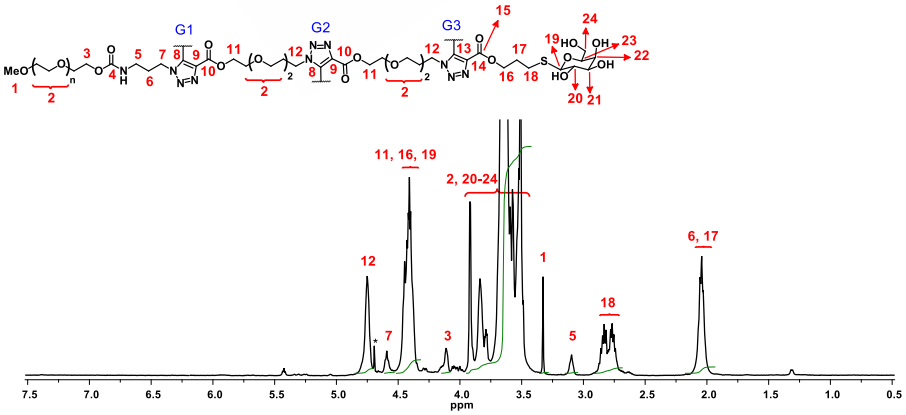
HSQC de PEG-[G3^{AAC}]-ATM (CD_3OD).

PEG-[G3]-Gal

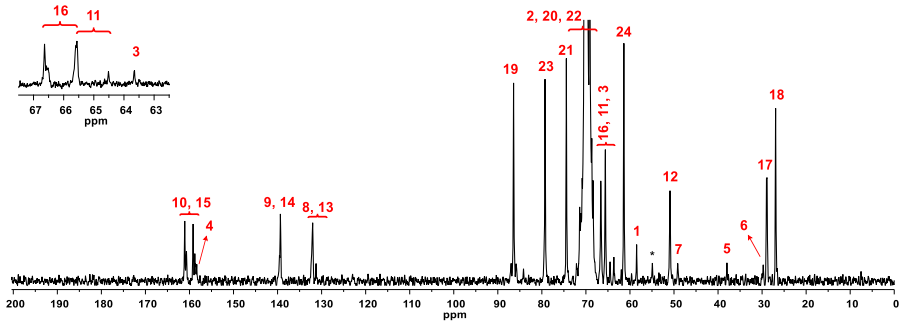


Una disolución de PEG-[G3^{AAC}]-All (0.100 g, 0.014 mmol), 1-thio-β-galactosa (0.065 g, 0.33 mmol) y DMPA (0.003 g, 0.011 mmol) en DMF seca (321 µL) se irradió con una lámpara de xenón durante 3h. Se diluyó la disolución con H_2O MilliQ y se purificó mediante una ultrafiltración utilizando una membrana YM3, realizando lavados con H_2O MilliQ (5 x 50 mL). A continuación, se filtró el contenido del ultrafiltrador a través de un algodón y se liofilizó la disolución. Se obtuvo el compuesto PEG-[G3^{AAC}]-Gal (0.106 g, 99%) como una espuma blanca.

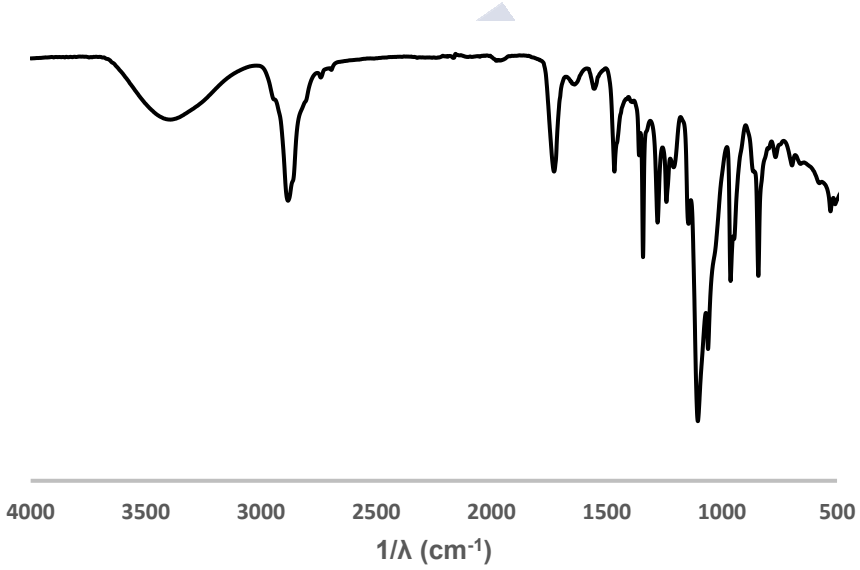
^{1}H-RMN (500 MHz, D_2O) δ: 4.75 (s, 12H), 4.59 (s, 2H), 4.51 – 4.33 (m, 36H), 4.11 (s, 2H), 3.94 – 3.41 (m, 654H), 3.33 (s, 3H), 3.10 (s, 2H), 2.91 – 2.67 (m, 16H), 2.16 – 1.94 (m, 18H). **^{13}C-RMN** (126 MHz, D_2O) δ: 161.1, 160.7, 159.2, 158.8, 158.6, 158.3, 139.6, 139.3, 131.9, 131.3, 86.4, 79.3, 74.4, 71.4, 71.2, 71.1, 70.8, 70.0, 69.3, 68.6, 68.4, 66.6, 65.6, 65.2, 64.3, 63.6, 61.4, 58.5, 50.9, 49.2, 37.9, 29.7, 28.9, 26.9. **IR** (puro, ATR, cm^{-1}): 2885, 1726, 1105.



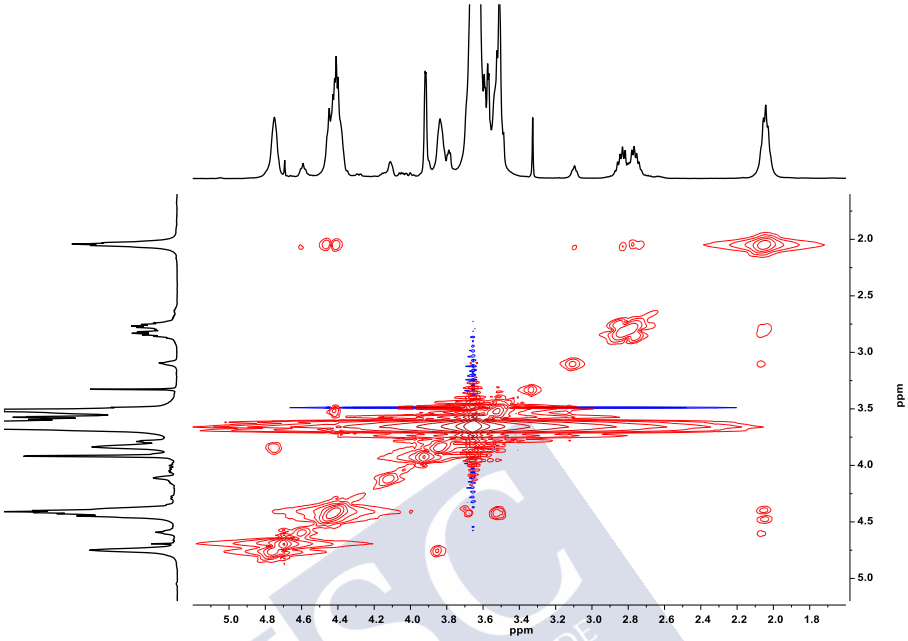
^{1}H-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Gal (D_2O).



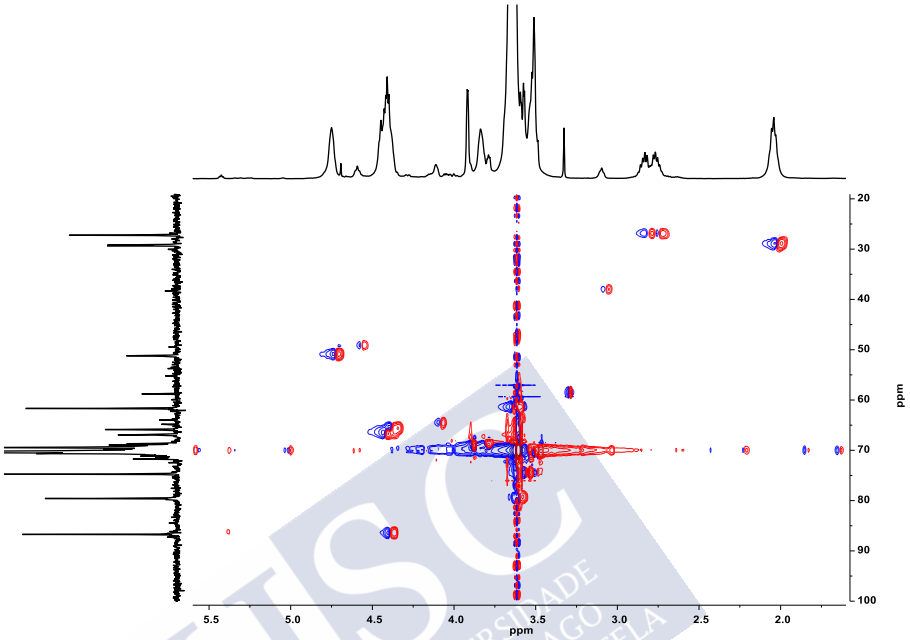
^{13}C-RMN de PEG-[G3^{AAC}]-Gal (D_2O).



IR de PEG[G3^{AAC}]-Gal.



COSY de PEG-[G3^{AAC}]-Gal (D_2O).



HSQC de PEG-[G3^{AAC}]-Gal (D_2O).

6.2.2. PREPARACIÓN DE MICELAS POLIMÉRICAS

6.2.2.1. Preparación de micelas anfifílicas

Las micelas de los productos PEG-[G3^{AAC}]-Et, PEG-[G3^{AAC}]-Dod y PEG-[G3^{AAC}]-Ph se formaron siguiendo el mismo procedimiento experimental. Sobre disoluciones de los copolímeros en MeOH HPLC a diferentes concentraciones (1, 4 y 8 mg/mL), se realizó la adición lenta de tampón 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl (volumen 1:1, disolvente orgánico/tampón), agitándose en un *vortex* las mezclas durante todo el proceso. Después de concentrar el disolvente orgánico en un rotavapor, se confirmó la formación de las micelas mediante medidas de DLS a 25 ºC.

6.2.2.2. Estudios de encapsulación de doxorubicina

Volúmenes de una disolución acuosa de doxorubicina hidrocloruro (2.2 mg/mL) en 150 mM NaCl, representando un 40% y 20% del número de grupos funcionales de la periferia del dendrímero, fueron adicionados a las micelas previamente formadas de PEG-[G3^{AAC}]-Dod y PEG-[G3^{AAC}]-Ph, realizándose una incubación a 37 ºC durante 48 h. Las micelas se purificaron mediante una diálisis (Spectra/Por® 6, MWCO 1 kDa) frente a tampón PBS pH 7.4 protegidas de la luz durante 6 h a 37ºC.

6.2.2.3. Preparación de micelas PIC

Micelas PIC con PLL

Se prepararon disoluciones de PEG-[G3^{AAC}]-ATS (0.36 mg/mL) en Na_2HPO_4 10 mM ($pH_{dis.}$ 8.31) y PLL (DP 108) (0.5 mg/mL) en 10 mM NaH_2PO_4/0.1 M HCl (10% v/v) (pH_{dis} 2.97). Las micelas se formaron adicionando la disolución de polímero PEG-[G3^{AAC}]-ATS sobre la PLL, manteniendo una relación de volúmenes 2:1 para obtener una relación de cargas estequiométrica (pH_{final} 6.57). Se confirmó la formación de micelas mediante medidas de DLS a 25 ºC.

Micelas PIC con PLA

Se prepararon disoluciones de PEG-[G3^{AAC}]-ATS (0.39 mg/mL) en Na_2HPO_4 10 mM ($pH_{dis.}$ 8.31) y PLA (DP 144) (0.5 mg/mL) en 10 mM NaH_2PO_4/0.1 M HCl (10% v/v) (pH_{dis} 2.97). Las micelas se formaron adicionando la disolución de polímero PEG-[G3^{AAC}]-ATS sobre la PLA, manteniendo una

relación de volúmenes 2:1 para obtener una correlación de cargas estequiométrica (pH_{final} 6.52). Se confirmó la formación de micelas mediante medidas de DLS a 25 ºC.

Estudios de estabilidad

Tras 1 h de formación, las micelas de PLL y PLA fueron sometidas a una diálisis en 10 mM PB pH 7.4 durante 45 min, y posteriormente, se sometieron a otra diálisis en 10 mM PB pH 7.4, 150 mM NaCl durante 90 min. Sus estabilidades fueron confirmadas mediante medidas de DLS a 25 ºC en cada etapa. Por último, las micelas se calentaron a 37 ºC con agitación magnética y se realizaron medidas de DLS a 37 ºC a los tiempos indicados.

6.2.2.4. Preparación de micelas Hybrid PIC

Micelas de Ca^{2+}

Se preparó una disolución de PEG-[$G3^{AAC}$]- ATS (1.071 mg/mL) en 50 mM Na_2HPO_4. Las micelas se formaron adicionando 66.60 µL de una disolución patrón de iones Ca^{2+} para ICP (1000 mg/L) sobre 933.4 µL de la disolución del polímero, manteniendo una relación de cargas estequiométrica entre el polímero y los iones metálicos (pH_{final} 7.8). La formación de micelas se confirmó mediante DLS a 25 ºC.

Micelas de Ag^{+}

Se prepararon disoluciones de PEG-[$G3^{AAC}$]- ATS (1.052 mg/mL) en 50 mM Na_2HPO_4 y $AgNO_3$ (5.64 mg/mL) en H2O MilliQ. Las micelas se formaron adicionando 50 µL de la disolución del metal sobre 950 µL de la disolución del polímero, manteniendo una relación de cargas estequiométrica entre el polímero y los iones metálicos (pH_{final} 7.8). La formación de micelas se confirmó mediante DLS a 25 ºC.

Micelas de Cd^{2+}

Se prepararon disoluciones de PEG-[$G3^{AAC}$]- ATS (1.052 mg/mL) en 50 mM Na_2HPO_4 y CdI_2 (12.17 mg/mL) en H2O MilliQ. Las micelas se formaron adicionando 50 µL de la disolución del metal sobre 950 µL de la disolución del polímero, manteniendo una relación de cargas estequiométrica entre el polímero y los iones metálicos (pH_{final} 7.8). La formación de micelas se confirmó mediante DLS a 25 ºC.

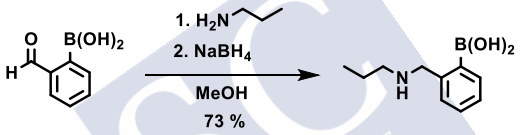
Micelas de Fe^{2+}

Se prepararon disoluciones de PEG-[$G3^{AAC}$]- ATS (1.052 mg/mL) en 50 mM Na_2HPO_4 y $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (9.24 mg/mL) en H2O MilliQ purgada con Argón. Las micelas se formaron adicionando 50 µL de la disolución inmediatamente preparada del metal sobre 950 µL de la disolución del polímero, manteniendo una relación de cargas estequiométrica entre el polímero y los iones metálicos (pH_{final} 7.8). La formación de micelas se confirmó mediante DLS a 25 ºC.

6.3. CAP. II

6.3.1. Síntesis y Caracterización

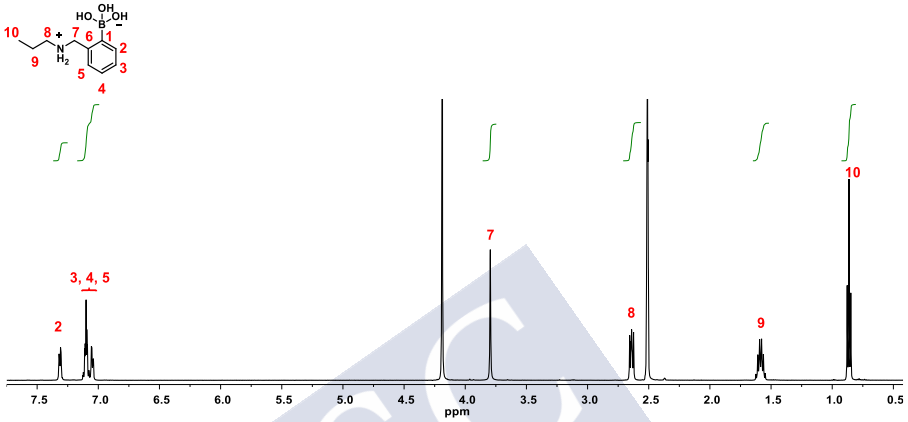
Ácido (2-((propilamino)metil)fenil)borónico (2-PFB_{OH})



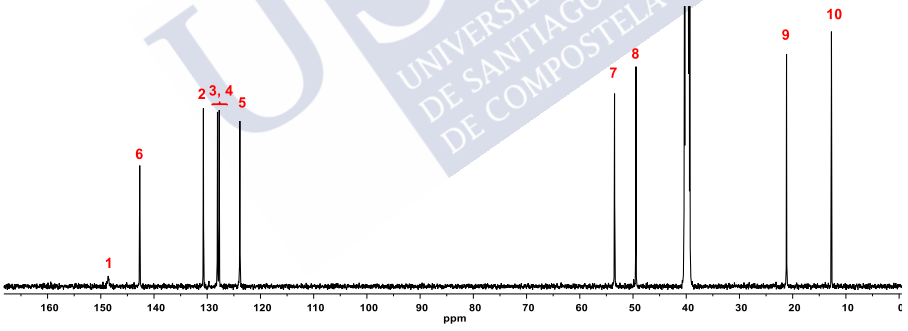
Una disolución de ácido 2-formilfenilborónico (200 mg, 1.33 mmol) en metanol anhidro (8.37 mL) se enfrió en un baño de agua-hielo bajo atmósfera inerte. Se le adicionó propilamina gota a gota (220 µL, 2.66 mmol) y se agitó la mezcla a 0 ºC durante 30 min y luego a ta durante 3 h. La disolución se volvió a enfriar en un baño de agua-hielo y se añadió $NaBH_4$ (100.6 mg, 2.66 mmol) por un período de 10 min. La disolución se agitó durante 1h a ta y el disolvente fue evaporado a 1/3 del volumen original. Se adicionó H_2O MQ (5 mL) y $NaHCO_3$ (223 mg, 2.66 mmol) y la mezcla se agitó durante 10 min a ta. Posteriormente, la mezcla se extrajo con DCM (5 x 50 mL) y las fases orgánicas combinadas se secaron con $MgSO_4$. El crudo de reacción se purificó por MPLC (gradiente de AcOEt a 15% MeOH/AcOEt, 20 min, columna de alúmina neutra). El sólido obtenido se redisolvió en H_2O MQ y se liofilizó, obteniéndose 2-PFB_T (190 mg, 73%) como un sólido blanco cristalino.

^{1}H-RMN (500 MHz, 30% D_2O en DMSO-d_6) δ: 7.33 – 7.27 (m, 1H), 7.13 – 7.00 (m, 3H), 3.79 (s, 2H), 2.67 – 2.59 (m, 2H), 1.63 – 1.52 (m, 2H), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). **^{13}C-RMN** (125 MHz, 30% D_2O en DMSO-d_6) δ: 148.3, 142.4, 130.4, 127.8, 127.4, 123.6, 53.2, 49.1, 20.9, 12.4. **^{11}B-RMN** (160 MHz, 30% D_2O/DMSO-d_6) δ:10.37. **HRMS (ES, m/z)** calculado para $C_{30}H_{42}B_3N_3O_3$ (2-PFB_T) ($M+H^+$): 526.3505; experimental: 526.3570. **HRMS**

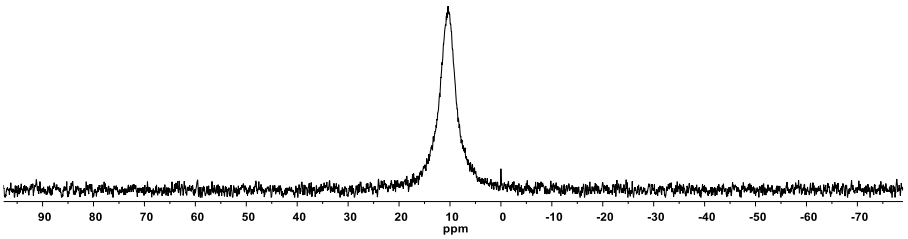
(ES, m/z) calculado para $C_{10}H_{16}BNO_2$ (2-PFB) ($M+H^+$): 194.1274; experimental: 194.1348. **HRMS (ES, m/z)** calculado para $C_{10}H_{16}BNO_2$ (2-PFB_B) ($M+H^+$): 176.1168; experimental: 176.1245. **Análisis elemental (%)** calculado para $C_{30}H_{42}B_3N_3O_3 \cdot 0.4\ H_2O$ (2-$PFB_T \cdot 0.4\ H_2O$): C 67.59, H 8.09, N 7.89; encontrado: C 67.56, H 8.04, N 7.86.



^{1}H-RMN de 2-PFB_{OH} (30% D_2O/DMSO-d_6).



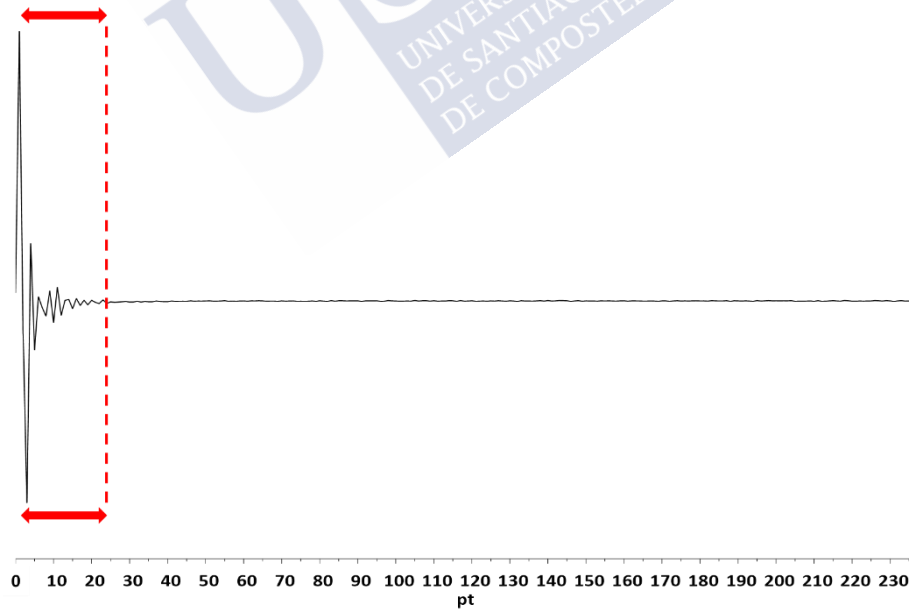
^{13}C-RMN de 2-PFB_{OH} (30% D_2O/DMSO-d_6).



^{11}B-RMN de 2-PFB$_{OH}$ (30% D_2O/DMSO-d_6).

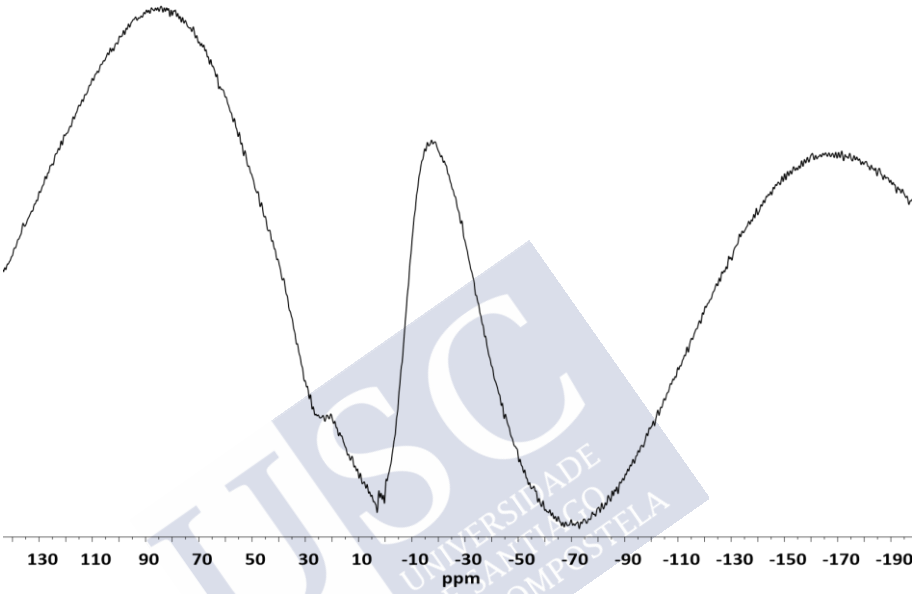
6.3.2. Procesado de los espectros de ^{11}B RMN

Para poder analizar las valoraciones de ^{11}B RMN, primero se realizó un ^{11}B RMN control del tubo utilizado para las valoraciones. Mediante el análisis de la FID se observaron las interferencias en ^{11}B RMN producidas por la sonda del espectrómetro. Se observó que estos artefactos afectaban a los 24 primeros puntos del espectro.



FID de ^{11}B RMN del tubo de cuarzo sin muestra.

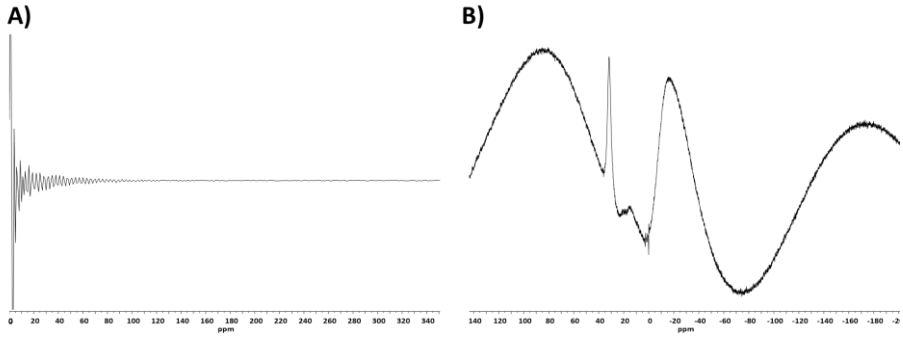
Si se aplica una Transformada de Fourier (FT) sobre la FID anterior se obtiene el siguiente espectro de ^{11}B RMN, en el cual se ven reflejadas todas las interferencias provocadas por la sonda.



Espectro de ^{11}B RMN del tubo de cuarzo sin muestra tras FT.

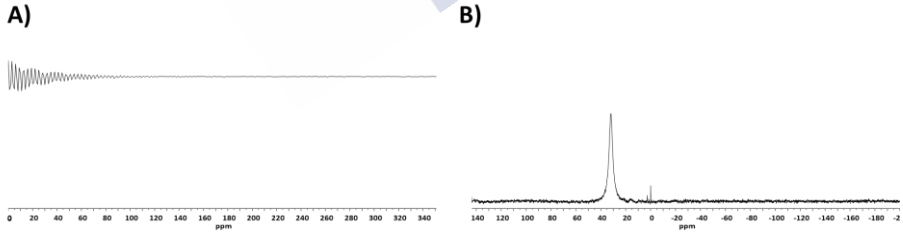
Para corregir estas interferencias se aplicó un procesado *Backwards Linear Prediction* (BLP) de los 24 primeros puntos de la FID.

Un ejemplo práctico de procesado de espectros de ^{11}B RMN se indica a continuación sobre una muestra 21.5 mM de 2-PFBT tras 12 h de disolución DMSO-d_6 a 37 ºC. Tanto la FID como el espectro tras la primera FT conservan las interferencias producidas por la sonda.



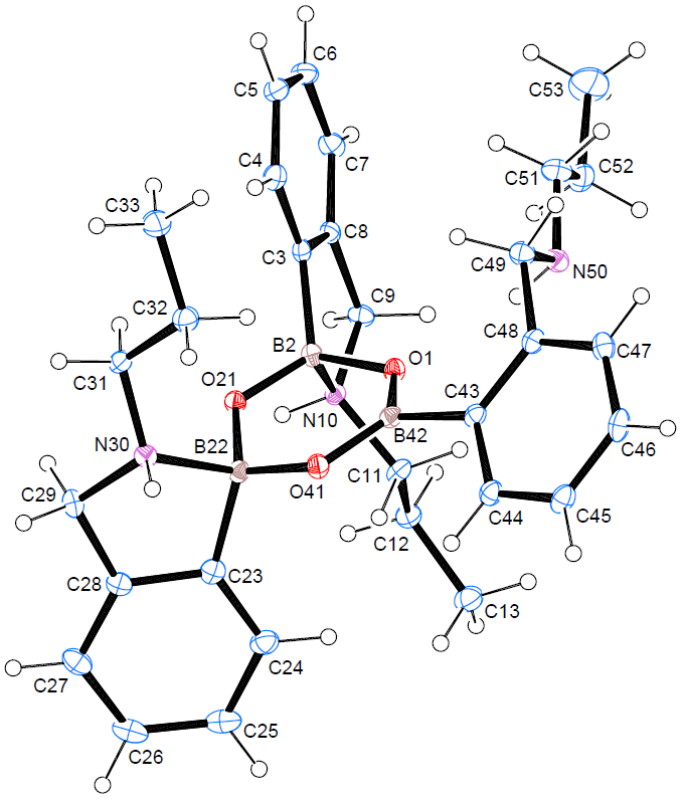
A) FID de la muestra sin procesar. B) Espectro tras FT.

Cuando se aplica una corrección BLP de los 24 primeros puntos sobre la FID, el espectro de ^{11}B RMN que se obtiene sólo muestra las señales del producto. Hay que destacar que este proceso de corrección no es perfecto, ya que se pierde parte de información original. Aunque al eliminar los primeros puntos de la FID se eliminan las interferencias provocadas por la sonda del espectrómetro, al hacerlo, también se están eliminando puntos de la FID que contienen gran parte de la información sobre la molécula en disolución. Por lo tanto, esta corrección provoca que no pueda realizarse un análisis cuantitativo de los espectros de ^{11}B RMN.



A) FID tras aplicar BLP. B) Espectro tras FT de la FID procesada.

6.3.3. Datos cristalográficos de la boroxina 2-PFB$_T$



Fórmula empírica	$C_{30}H_{42}B_3N_3O_3$
Masa molecular	525.09
Temperatura (K)	100(2)
Longitud de onda (Å)	0,71073
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	*P 1 21/n 1*
Dimensiones de la celda unidad	*a* = 13.0731(4) Å

	b = 14.0691(5) Å
	c = 16.5414(5) Å
	α = 90º
	β = 94.270(2)º
	γ = 90º
Volumen (Å^3)	3033.96(17)
Z	4
Densidad (Mg.m^{-3})	1.150
Coeficiente de absorción (mm^{-1})	0.072
F(000)	1128
Tamaño del cristal (mm)	0.165 x 0.184 x 0.310
Intervalo de θ para la adquisición de datos	1.90 - 27.20º
Intervalo de h, k, l	-16≤h≤16, -18≤k≤18, -19≤l≤21
Reflexiones medidas	47520
Reflexiones independientes	6692 [$R_{(int)}$ = 0.0751]
Datos / restricciones / parámetros	6692 / 0 / 364
Bondad del ajuste F^2	1.1014
Índices R Finales [$I>2\sigma(I)$]	R_1 = 0.0485, wR_2 = 0.0977

	x	y	z	U_{iso}*/U_{eq}
O1	0.28242(9)	0.53332(8)	0.31604(7)	0.0193(3)
B2	0.36638(15)	0.55041(14)	0.37850(13)	0.0185(5)
C3	0.32792(13)	0.53895(12)	0.46756(11)	0.0184(4)
C4	0.26853(14)	0.60099(13)	0.51105(11)	0.0234(4)
H4	0.250136	0.66147	0.488932	0.028*
C5	0.23636(14)	0.57517(14)	0.58587(11)	0.0260(4)
H5	0.195769	0.617798	0.614472	0.031*
C6	0.26314(14)	0.48726(14)	0.61931(12)	0.0271(5)
H6	0.241238	0.470059	0.670805	0.032*
C7	0.32169(14)	0.42476(14)	0.57763(11)	0.0247(4)
H7	0.340345	0.364577	0.60022	0.03*
C8	0.35294(13)	0.45110(12)	0.50222(11)	0.0193(4)
C9	0.41346(14)	0.38868(13)	0.44907(11)	0.0215(4)
H9A	0.475793	0.364084	0.479779	0.026*
H9B	0.371448	0.334148	0.428312	0.026*
N10	0.44162(12)	0.45065(10)	0.38085(9)	0.0180(3)
H10	0.5040(14)	0.4732(13)	0.3933(11)	0.022*
C11	0.44508(14)	0.40074(13)	0.30231(11)	0.0224(4)
H11A	0.458893	0.448179	0.260284	0.027*
H11B	0.376529	0.373203	0.28757	0.027*
C12	0.52384(14)	0.32250(13)	0.30028(11)	0.0242(4)
H12A	0.506578	0.270841	0.33756	0.029*
H12B	0.592256	0.347677	0.319003	0.029*
C13	0.52705(15)	0.28312(14)	0.21494(12)	0.0293(5)
H13A	0.458862	0.259698	0.195923	0.044*
H13B	0.576539	0.230775	0.215228	0.044*
H13C	0.54782	0.33348	0.178654	0.044*

O21	0.42934(9)	0.62837(8)	0.36225(7)	0.0186(3)
B22	0.42522(16)	0.67705(14)	0.28582(12)	0.0189(5)
C23	0.52715(14)	0.66586(13)	0.23689(11)	0.0214(4)
C24	0.55525(15)	0.60094(14)	0.17867(11)	0.0276(5)
H24	0.508044	0.553301	0.159383	0.033*
C25	0.65161(16)	0.60539(15)	0.14870(12)	0.0333(5)
H25	0.670157	0.560437	0.109505	0.04*
C26	0.72062(16)	0.67492(14)	0.17566(12)	0.0322(5)
H26	0.78641	0.677426	0.154918	0.039*
C27	0.69449(14)	0.74111(14)	0.23281(12)	0.0273(5)
H27	0.741723	0.788966	0.251585	0.033*
C28	0.59828(14)	0.73586(12)	0.26177(11)	0.0208(4)
C29	0.55581(13)	0.80263(13)	0.32204(12)	0.0230(4)
H29A	0.580179	0.784935	0.378127	0.028*
H29B	0.576718	0.868927	0.311831	0.028*
N30	0.44217(11)	0.79200(10)	0.30928(9)	0.0187(3)
H30	0.4220(13)	0.8292(13)	0.2629(11)	0.022*
C31	0.38838(13)	0.82951(13)	0.37840(11)	0.0206(4)
H31A	0.415424	0.893531	0.392749	0.025*
H31B	0.402924	0.787662	0.42598	0.025*
C32	0.27352(14)	0.83581(14)	0.35958(12)	0.0270(5)
H32A	0.245812	0.771422	0.347635	0.032*
H32B	0.258831	0.875557	0.310701	0.032*
C33	0.22007(15)	0.87839(14)	0.43007(12)	0.0316(5)
H33A	0.24548	0.943064	0.440699	0.047*
H33B	0.234505	0.83921	0.478557	0.047*
H33C	0.145895	0.880264	0.416215	0.047*
O41	0.32801(9)	0.66655(8)	0.23756(7)	0.0209(3)
B42	0.26199(16)	0.59631(14)	0.25460(13)	0.0194(4)

C43	0.15825(14)	0.58827(12)	0.19869(11)	0.0194(4)
C44	0.16002(14)	0.61560(12)	0.11753(11)	0.0222(4)
H44	0.222554	0.638057	0.098747	0.027*
C45	0.07384(15)	0.61113(13)	0.06344(12)	0.0256(4)
H45	0.078423	0.627736	0.008157	0.031*
C46	−0.01870(15)	0.58238(12)	0.09048(12)	0.0261(5)
H46	−0.078601	0.580173	0.054303	0.031*
C47	−0.02304(14)	0.55674(12)	0.17118(12)	0.0239(4)
H47	−0.087013	0.538214	0.189958	0.029*
C48	0.06411(13)	0.55742(12)	0.22564(11)	0.0203(4)
C49	0.05224(14)	0.52682(13)	0.31211(11)	0.0235(4)
H49A	0.089422	0.572081	0.349524	0.028*
H49B	−0.021259	0.529035	0.322713	0.028*
N50	0.09189(12)	0.42996(10)	0.32875(9)	0.0211(4)
H50	0.1609(15)	0.4344(13)	0.3289(11)	0.025*
C51	0.06594(15)	0.39758(14)	0.40928(12)	0.0302(5)
H51A	−0.009414	0.390831	0.409517	0.036*
H51B	0.088411	0.446018	0.45024	0.036*
C52	0.11618(16)	0.30382(14)	0.43200(11)	0.0308(5)
H52A	0.191599	0.311976	0.435884	0.037*
H52B	0.098147	0.256843	0.388701	0.037*
C53	0.0834(2)	0.26560(18)	0.51229(14)	0.0520(7)
H53A	0.00911	0.254893	0.508048	0.078*
H53B	0.101098	0.311838	0.555391	0.078*
H53C	0.118867	0.205495	0.525084	0.078*

6.3.4. Realización de las valoraciones

En un tubo de cuarzo provisto de un capilar con $BF_3 \cdot Et_2O$, se disolvió 2-PFB_T (21.5-43 mM) en disolvente deuterado (CD_3OD, $CDCl_3$, DMSO-d_6 o 30%D_2O/DMSO-d_6) y se dejó equilibrar la muestra durante 12 h a 37 ºC. Posteriormente se adicionó una cantidad estequiométrica de diol sobre la disolución. Antes de adquirir los espectros de ^{1}H y ^{11}B RMN de cada punto de la valoración, las disoluciones se dejaron equilibrar durante 12 h a 37 ºC. Para el procesado de todos los espectros de ^{11}B RMN se realizó una BLP de los 24 primeros puntos de la FID.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA