



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE GRADO

Síntesis, estudio y caracterización de dendrímeros anfífilos tipo Jano como nanotransportadores de fármacos contra la tuberculosis: toxicidad y actividad antimicrobiana

Synthesis, study and characterization of amphiphilic Janus dendrimers as nanocarriers for anti-tuberculosis drugs: toxicity and antimicrobial activity

Autora:

Sandra Hidalgo Arizón

Directores:

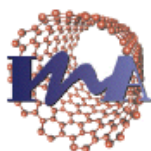
José Luis Serrano Ostáriz

Jose Antonio Aínsa Claver

Departamento de Química Orgánica

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

Curso académico 2017-2018



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza



Aragón
Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón

SIGLAS Y ABREVIATURAS

¹ H RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
¹³ C RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
AcOEt	Acetato de etilo
ADC	Albúmina, dextrosa, catalasa
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
bis-GMPA	Ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico
bis-MPA	Ácido 2,2'-bis(hidroximetil)propiónico
COSY	Espectroscopia de correlación
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DCU	N,N' – diciclohexilurea
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPTS	4-toluensulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio
ESI ⁺	Espectroscopia de ionización positiva
FTIR	Espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier
HoBt	1-hidroxibenzotriazol hidrato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz – Tiempo de vuelo
MDR-TB	Tuberculosis multirresistente
MeOH	Metanol
MIC	Concentración mínima inhibitoria
Monómero de bis-GMPA	bis-GMPA protegido con t-Boc
MS	Espectrometría de masas
OMS	Organización Mundial de la Salud
PMMA	Polimetilmetacrilato
RR-TB	Tuberculosis resistente a rifampicina
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
t-Boc	Tert-butoxicarbonilo
TBTA	Tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina
t-Boc glicina	N-(tert-butoxicarbonil)glicina
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
UFC	Unidades formadoras de colonia
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
XDR-TB	Tuberculosis extremadamente resistente

Índice

0. Resumen /Abstract	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	5
3. Plan de trabajo.....	6
4. Materiales y métodos	6
4.1. Síntesis química.....	6
4.1.1. Metodología	6
4.1.2. Caracterización de los compuestos.....	10
4.2. Encapsulación de fármacos	11
4.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de los nanoagregados.....	12
4.4. Caracterización de los nanoagregados	13
5. Resultados y discusión	15
5.1. Síntesis química.....	15
5.2. Formación de los nanoagregados dendríticos y encapsulación de fármacos.....	18
5.2.1. Actividad antimicrobiana	18
5.2.2. Cuantificación de fármaco encapsulado.....	20
5.2.3. Morfología y tamaño	21
5.2.4. Citotoxicidad	22
6. Conclusiones / Conclusions	24
7. Bibliografía	25
ANEXOS.....	26
ANEXO 1: Síntesis química	27
ANEXO 2: Caracterización de los nanoagregados	49

0. Resumen /Abstract

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que afecta a más de diez millones de personas cada año, por lo que supone un importante problema de salud pública. Además, en los últimos tiempos ha habido un incremento de los casos de cepas resistentes a fármacos, lo que implica el uso de tratamientos con medicamentos de segunda línea que suelen provocar importantes efectos adversos debido a su toxicidad. En el afán de encontrar nuevas alternativas terapéuticas con menos efectos perjudiciales, las nanopartículas han demostrado ser una potente herramienta para su uso como antibacterianos y nanotransportadores de fármacos.

Los dendrímeros tipo Jano son estructuras asimétricas, compuestas por una hemiesfera hidrófoba y una hidrófila, lo que les permite formar estructuras supramoleculares en disolución acuosa que pueden encapsular fármacos. En este trabajo se ha sintetizado un dendrón de bis-GMPA de tercera generación siguiendo una estrategia divergente, para posteriormente unirlo a través de su punto focal, mediante una cicloadición azida-alquino catalizada por Cu (I), a un dendrón de bis-MPA de segunda generación funcionalizado con dos cadenas de ácido esteárico.

Posteriormente, el dendrímero Jano sintetizado fue utilizado de forma eficiente para la encapsulación de fármacos antituberculosos: isoniazida, etambutol, estreptomina, rifampicina y bedaquilina. Los nanoagregados manifestaron actividad antimicrobiana contra BCG, como consecuencia del fármaco encapsulado, y baja toxicidad contra la línea celular Hep G2. Además, mediante microscopía electrónica de transmisión y dispersión dinámica de luz se estudió la morfología y tamaño de los nanoagregados, comprobando que en disolución acuosa formaban estructuras micelares. A pesar de que los resultados obtenidos son prometedores, es necesario hacer nuevos ensayos, especialmente para cuantificar la cantidad de cada fármaco encapsulado de forma precisa.

Tuberculosis is an infectious disease that affects more than ten million people each year, which is a major public health problem. In addition, in recent years, there has been an increase in cases of drug-resistant strains, which implies the use of treatments with second-line drugs that usually cause significant side effects due to their toxicity. In the eagerness to find new therapeutic alternatives with less harmful effects, nanoparticles have proved to be a powerful tool for their use as antibacterials and drug nanocarriers.

The Janus dendrimers are asymmetric structures, composed of a hydrophobic and a hydrophilic hemisphere, which allows them to form supramolecular structures in aqueous solution that can encapsulate drugs. In this work, a third-generation bis-GMPA dendron was synthesized following a divergent strategy, to later joint it through its focal point, through an azide-alkyne cycloaddition reaction catalyzed by Cu (I), to a bis-MPA second generation dendron functionalized with two chains of stearic acid.

Subsequently, the synthesized Janus dendrimer was used efficiently for the encapsulation of antituberculous drugs: isoniazid, ethambutol, streptomycin, rifampicin and bedaquiline. The nanoaggregates showed antimicrobial activity against BCG, as a consequence of the encapsulated drug, and low toxicity against the Hep G2 cell line. In addition, by means of transmission electron microscopy and dynamic light scattering, the morphology and size of the nanoaggregates was studied, confirming that, in aqueous solution, they formed micellar structures. Although the results obtained are promising, it is necessary to make new tests, especially to quantify the amount of each drug encapsulated in a precise way.

1. Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que en 2016 afectó a 10.4 millones de personas en todo el mundo según los registros de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se considera la novena causa de muerte mundial, siendo la primera de la lista debida a un único agente infeccioso, inclusive por delante del VIH. Además, se calcula que aproximadamente un cuarto de la población mundial es portadora de tuberculosis latente, que son aquellos individuos infectados pero que no desarrollan la enfermedad ni pueden transmitirla.

En 2016 la tuberculosis registró una tasa de mortalidad media del 16%, aunque estas cifras varían dependiendo de la localización geográfica, siendo en África superiores al 20%. Se estima que en 2016 hubo aproximadamente 1.3 millones de muertes debidas únicamente a esta enfermedad a las cuales se han de sumar las 374.000 muertes de sujetos infectados al mismo tiempo con el VIH, lo que hace que sea un importante factor de riesgo. Sin embargo, esta enfermedad presenta claras diferencias regionales, registrándose la mayor incidencia en la región del Sureste Asiático (45% de los casos) y África (25%) (1).

En base a los datos epidemiológicos, es innegable que se trata de un problema de salud pública grave, por lo que es necesario el desarrollo de estrategias que permitan abordarlo de forma eficiente.

El agente causal de esta enfermedad es el patógeno *Mycobacterium tuberculosis*. Se trata de un bacilo Gram positivo, aerobio facultativo y ácido alcohol resistente, debido a su alto contenido en lípidos en la pared celular. Su envoltura es muy hidrofóbica y por esto crecen formando agregados en forma de filamentos con ramificaciones (2).

Su mecanismo de transmisión más frecuente es por vía aérea, ya que los enfermos expulsan bacilos en suspensión cuando tosen o estornudan que, al ser inhalados por otra persona, podrán causar una nueva infección. En la mayoría de los infectados, la respuesta inmunitaria puede evitar el desarrollo de enfermedad y los bacilos son eliminados totalmente o bien permanecen en estado latente. Sin embargo, en otros individuos, aproximadamente el 10%, el sistema inmune no es capaz de controlar la infección y se produce el desarrollo de la enfermedad con sus manifestaciones clínicas características (3). El principal factor de riesgo que incrementa la probabilidad de sufrir la enfermedad es la coinfección por VIH, pero hay otros como son la diabetes, la silicosis, las terapias inmunosupresoras, la insuficiencia renal crónica, las neoplasias, el tabaquismo, etc. (1).

A pesar de los progresos que se están haciendo en la lucha contra la tuberculosis, estableciendo estrategias de prevención, diagnóstico y facilitando el acceso a tratamiento, ha surgido en los últimos años un nuevo problema: la aparición de cepas multi-resistentes a fármacos, lo que ha generado una nueva amenaza sanitaria. Se usan tres términos diferentes para clasificar su grado de resistencia:

- Tuberculosis resistente a rifampicina (RR-TB) que es uno de los antimicrobianos más potentes utilizados para el tratamiento de esta enfermedad.
- Tuberculosis multirresistente (MDR-TB). En este caso, las bacterias muestran resistencia a la rifampicina y la isoniazida por lo que la enfermedad requiere el uso de fármacos de segunda línea (fluoroquinolonas y fármacos inyectables como la ampicacina, capreomicina o kanamicina) al igual que la RR-TB.

- Tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB), que se define como un caso de MDR-TB en el que además se presenta resistencia contra una fluoroquinolona y a uno de los agentes inyectables de segunda línea (amicacina, capreomicina o kanamicina).

La OMS estima que en 2016 se dieron un total de 600.000 casos de MDR/RR-TB y 8000 infectados por XDR-TB, lo que supone un incremento con respecto a las cifras de 2015 (1). Sin embargo, los tratamientos con medicamentos de segunda línea para las cepas multirresistentes son caros, prolongados en el tiempo y en muchos casos requieren de la combinación de múltiples fármacos que suelen acarrear importantes efectos adversos debido a su toxicidad. Aunque en los últimos años se ha aprobado el uso de nuevos medicamentos como la bedaquilina y delamanid para la MDR-TB, es obvio que se necesitan nuevas estrategias para un desarrollo más rápido y eficiente de nuevos tratamientos con menos efectos adversos. De hecho, las nanopartículas han demostrado ser una potente herramienta para su uso como antibacterianos y nanotransportadores de fármacos(4). Mediante el uso de nanopartículas podrían reducirse los efectos secundarios de estos tratamientos debido a la mejora de la eficacia antimicrobiana de los fármacos encapsulados, lo que podría conllevar a disminuir las concentraciones administradas y quizá la duración de los tratamientos.

Las nanopartículas se caracterizan por tener un tamaño extraordinariamente pequeño y pueden ser de una gran variedad de materiales. Su interés en el campo de la medicina es que tienen la posibilidad de funcionar como transportadores de fármacos ya que incrementan la estabilidad, biodisponibilidad y direccionamiento de éstos. Además, pueden mejorar o solucionar algunos otros problemas como la baja solubilidad en agua o la citotoxicidad de algunos de estos compuestos.

Un tipo específico de nanopartículas son los dendrímeros, que se describen como polímeros sintéticos, esféricos y altamente ramificados. Comparados con los polímeros lineales tradicionales, los dendrímeros son mucho más eficientes en el transporte de fármacos debido a sus sobresalientes propiedades: monodispersidad, pequeño tamaño, biocompatibilidad y buena farmacocinética (5).

Los dendrímeros están constituidos por tres partes: un núcleo central, que determina la forma y el tamaño; brazos internos, formados por la repetición un monómero; y los grupos funcionales externos. Cada capa existente entre el núcleo y la periferia constituye lo que se denomina como *generación* de la estructura dendrítica. Además, las unidades estructurales que los constituyen pueden dejar cavidades en el interior de la macromolécula (6), que podrán ser utilizadas para el transporte de diferentes compuestos que se situarán en una región u otra dependiendo de sus características químicas.



Figura 1 – Estructura general de un dendrímero (6).

Debido a sus prometedoras propiedades, los dendrímeros han sido aplicados en el campo de la medicina para múltiples funciones. Han sido usados como nanotransportadores de fármacos para terapias antimicrobianas contra la malaria (7, 8), también para la encapsulación de fármacos antitumorales como la doxorubicina (9) y la 10-hidroxicamptotecina (10) y como terapia antiviral contra el virus de la hepatitis C actuando como transportadores de camptotecina (11). Por otra

parte, también ha destacado su uso para la transfección de células eucariotas y su potencial aplicación en terapia génica, mostrando ser unas buenas estructuras para tales fines debido a su capacidad para interactuar con el ADN y el ARN (12-14).

Existen diversidad de dendrímeros dependiendo de su estructura: copolímeros híbridos dendronizados, megámeros, redes dendríticas... (6). En los últimos años, se ha desarrollado un nuevo tipo de dendrímero, el tipo Jano. Se denominan de este modo debido al dios Romano que lleva el mismo nombre y que es representado por una cabeza con dos caras que miran en sentidos opuestos. Estos dendrímeros son estructuras asimétricas, compuestas por una hemiesfera hidrófoba y una hidrófila, pudiendo tener cada una de ellas diferentes tamaños y grupos terminales. Esta estructura anfífila los diferencia de los otros tipos de dendrímeros convencionales, lo que les ofrece la posibilidad de formar complejos auto-ensamblados generando estructuras supramoleculares (15).

La diferencia de polaridades entre ambos dendrones del dendrímero tipo Jano es un factor clave que va a favorecer su agregación espontánea en agua, formando estructuras supramoleculares que presentarán una capa externa hidrofílica que rodea y estabiliza a una interior hidrofóbica, pudiendo adoptar múltiples morfologías: micelas, vesículas, estructuras multicapa... Dependiendo de la relación entre el tamaño de la región hidrófoba e hidrófila se pueden observar diferentes tipos de agregados que son capaces de encapsular fármacos (16).

La síntesis de estos compuestos es compleja y se puede hacer mediante una estrategia divergente o convergente. En la estrategia divergente el dendrímero se construye de forma radial hacia afuera, partiendo de un núcleo multifuncional. De este modo, el dendrímero crece capa por capa mediante sucesivos ciclos de adición de moléculas, aumentando una *generación* tras cada reacción, incrementando su diámetro y duplicando el número de grupos terminales en la superficie. Por otro lado, en la estrategia convergente, el dendrímero es sintetizado desde la periferia hacia el interior, lo que implica la construcción de dendrones de forma separada y después su unión a través de su punto focal a un núcleo multifuncional (17).

El método convergente es el que genera mejores resultados, por ello, recientemente han aparecido nuevas aproximaciones basadas en él para mejorar la eficacia y la producción: crecimiento doble exponencial, estrategias hipermonoméricas, ortogonales y quimio-selectivas. De hecho es el acoplamiento quimio-selectivo mediante química click para la unión de dos dendrones por cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I) el método más utilizado (15). Esta técnica permite la obtención de dendrímeros con gran pureza y alto rendimiento a través de la formación de 1,2,3-triazoles (6).

Los dendrímeros pueden estar basados en la utilización de diferentes tipos de monómeros como molécula polimérica que dará lugar a su estructura base: poli(amidoamina) (PAMAM), poli(imina) (PPI), poli-(L)-lisina (PPL), ácido 2,2'-bis(hidroximetil)propiónico (bis-MPA), poliglicerol... Posteriormente, estos dendrímeros pueden ser funcionalizados con una amplia variedad de grupos/moléculas terminales, lo que condicionará sus propiedades físico-químicas.

Se ha observado que los dendrímeros que poseen en la periferia grupos amino manifiestan buenas propiedades para el transporte de fármacos unidos de forma no covalente. Los grupos cargados positivamente de su periferia, pueden interactuar con las membranas celulares que tienen una carga negativa y también establecer interacciones con los diferentes fármacos. A raíz de esto, el grupo de Cristales Líquidos y Polímeros (CLIP) de la Universidad de Zaragoza, como resultado de la tesis de Alexandre Lancelot, desarrolló un nuevo tipo de dendrón basado en el ácido 2,2'-

bis(gliciloximetil)propiónico (bis-GMPA). Esta nueva arquitectura dispone de motivos glicina tanto en el interior como en la periferia del dendrón, aumentando su carácter hidrófilo y permitiendo la formación de puentes de hidrógeno de un modo más favorable con pequeñas moléculas, como fármacos (18).

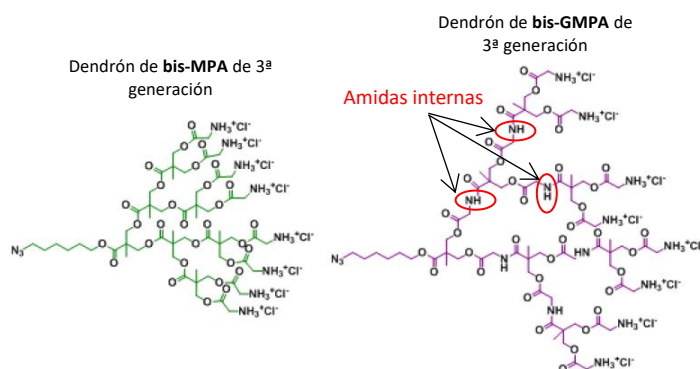


Figura 2 - Dendrones de bis-MPA (izquierda) y bis-GMPA (derecha).

La línea de investigación de este grupo continúa en el campo de los dendrímeros, estudiando el potencial de los tipo Jano como nanotransportadores de fármacos para el tratamiento de diferentes patologías. Para ello, se están realizando múltiples valoraciones de diferentes combinaciones de partes hidrofílicas e hidrofóbicas y su interacción con diferentes tipos de fármacos para ser usados como agentes terapéuticos. En concreto, en este trabajo, y continuando con la línea de investigación del grupo, se ha seleccionado sintetizar un dendrímero tipo Jano con una parte hidrófoba formada por un dendrón de 1ª generación de bis-MPA funcionalizado con ácido esteárico y una región hidrófila constituida por un dendrón de bis-GMPA de 3ª generación, con el objetivo de ser utilizado como agente transportador de fármacos contra la tuberculosis.

2. Objetivos

Se plantean tres objetivos principales en este trabajo:

- Sintetizar y caracterizar un dendrímero tipo Jano formado por un dendrón de bis-GMPA de 3ª generación en su región hidrofílica y un dendrón de bis-MPA de 1ª generación, funcionalizado con dos cadenas de ácido esteárico, en su parte hidrofóbica.
- Analizar la capacidad del dendrímero como nanotransportador de fármacos antituberculosos: isoniazida, etambutol, estreptomycin, bedaquilina y rifampicina.
- Estudiar las características de los nanoagregados formados por el dendrímero junto con cada uno de los antimicrobianos estudiados: morfología, tamaño, citotoxicidad y cuantificación de fármaco encapsulado.

3. Plan de trabajo

Para lograr alcanzar los objetivos anteriormente propuestos se ha seguido el siguiente esquema de trabajo:

1. Síntesis y caracterización del dendrón de bis-GMPA de 3^a generación.
2. Formación del dendrímero tipo Jano y caracterización.
3. Encapsulación de los cinco fármacos seleccionados, por separado, y determinación, *in vitro*, de la capacidad antimicrobiana de los nanoagregados frente a micobacterias.
4. Estudio de las características de los nanoagregados formados.
 - a. Morfología
 - b. Tamaño
 - c. Cuantificación de fármaco encapsulado
 - d. Citotoxicidad

4. Materiales y métodos

4.1. Síntesis química

Todos los procedimientos que se han llevado a cabo para la síntesis de cada uno de los compuestos que se recogen en esta sección están basados en la tesis de Alexandre Lancelot (18) aunque se han realizado diferentes adaptaciones para mejorar el rendimiento y la eficacia del proceso. Los protocolos se encuentran explicados de forma detallada en el *Anexo I* de este documento, donde se especifican todos los reactivos utilizados, condiciones de reacción, cantidades, procedimientos, etc., y cualquier otro aspecto que sea necesario de mención para la comprensión y el desarrollo del proceso de síntesis.

Asimismo, acompañando a la descripción de cada una de las reacciones, se encuentran los resultados de caracterización, por todas las técnicas empleadas, para cada uno de los compuestos.

Los disolventes y reactivos de los que se hizo uso para el proceso de síntesis química fueron adquiridos a la casa comercial Sigma-Aldrich, a excepción del TBTA, DPTS, monómero de bis-MPA y el dendrón hidrófobo de [bis-MPA,G1](C17)₂ que se sintetizaron previamente en el laboratorio.

4.1.1. Metodología

Únicamente las reacciones simbolizadas por flechas naranjas, son las que se han realizado en el transcurso de este trabajo. Para que en apartados posteriores su designación sea más sencilla, a cada una de las reacciones llevadas a cabo se les ha asignado un número, que en los esquemas de síntesis siguientes (figuras 3, 4 y 5) aparecen rodeados por un círculo naranja.

- **Síntesis del ácido 2,2'-bis(gliciloximetil)propiónico (bis-GMPA) protegido por el grupo *N*-(*tert*-butoxicarbonilo) (t-Boc) (monómero de bis-GMPA).**

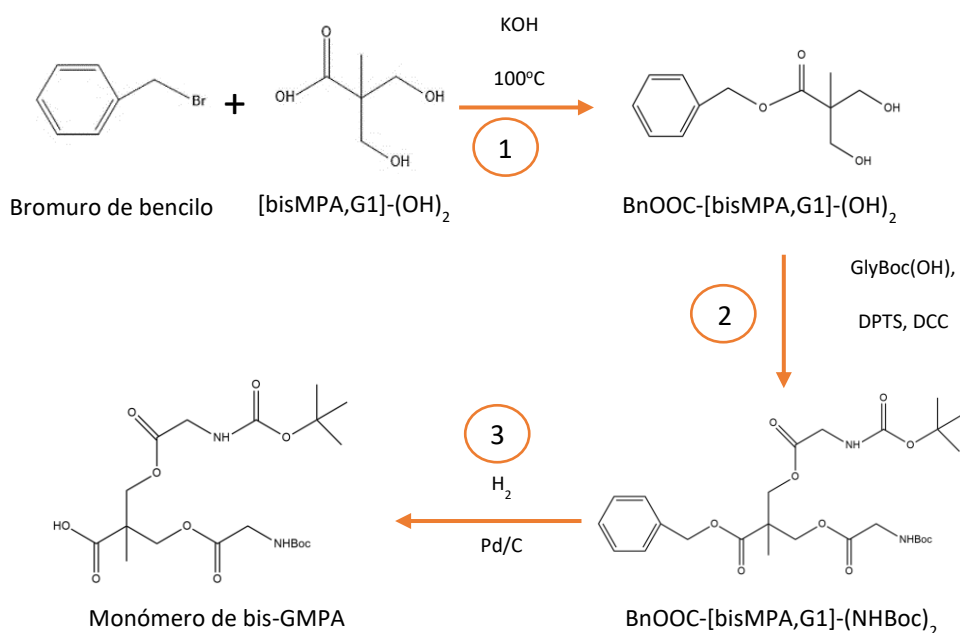


Figura 3 - Esquema de síntesis del monómero de bis-GMPA.

La síntesis del monómero de bis-GMPA a partir de bis-MPA consta de 3 pasos. En primer lugar, se realizó la protección del -OH del grupo carboxilo del bis-MPA mediante la adición de un grupo bencilo. Esta reacción tiene lugar por un ataque nucleófilo del grupo ácido del bis-MPA sobre el metileno unido al Br en el bromuro de bencilo, dando lugar a una reacción de sustitución formando el éster correspondiente.

Seguidamente, se protegieron los grupos -OH terminales mediante la adición de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)glicina (t-Boc glicina) que además de impedir la reactividad de la molécula por esta zona, incorporará las amidas internas y los grupos funcionales amino de la periferia a los que se ha hecho alusión anteriormente. Esta reacción es llevada a cabo mediante una esterificación de Steglich catalizada por 4-toluensulfonato de 4-(dimetilamino)piridinio (DPTS) y usando *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente acoplante.

Finalmente, se desprotegió el grupo ácido mediante una reacción de hidrogenación catalizada por Pd/C, eliminándose el grupo bencilo.

- Síntesis del dendrón de bis-GMPA de 3ª generación N₃-[bisGMPA,G3]-(NH₂Boc)₈

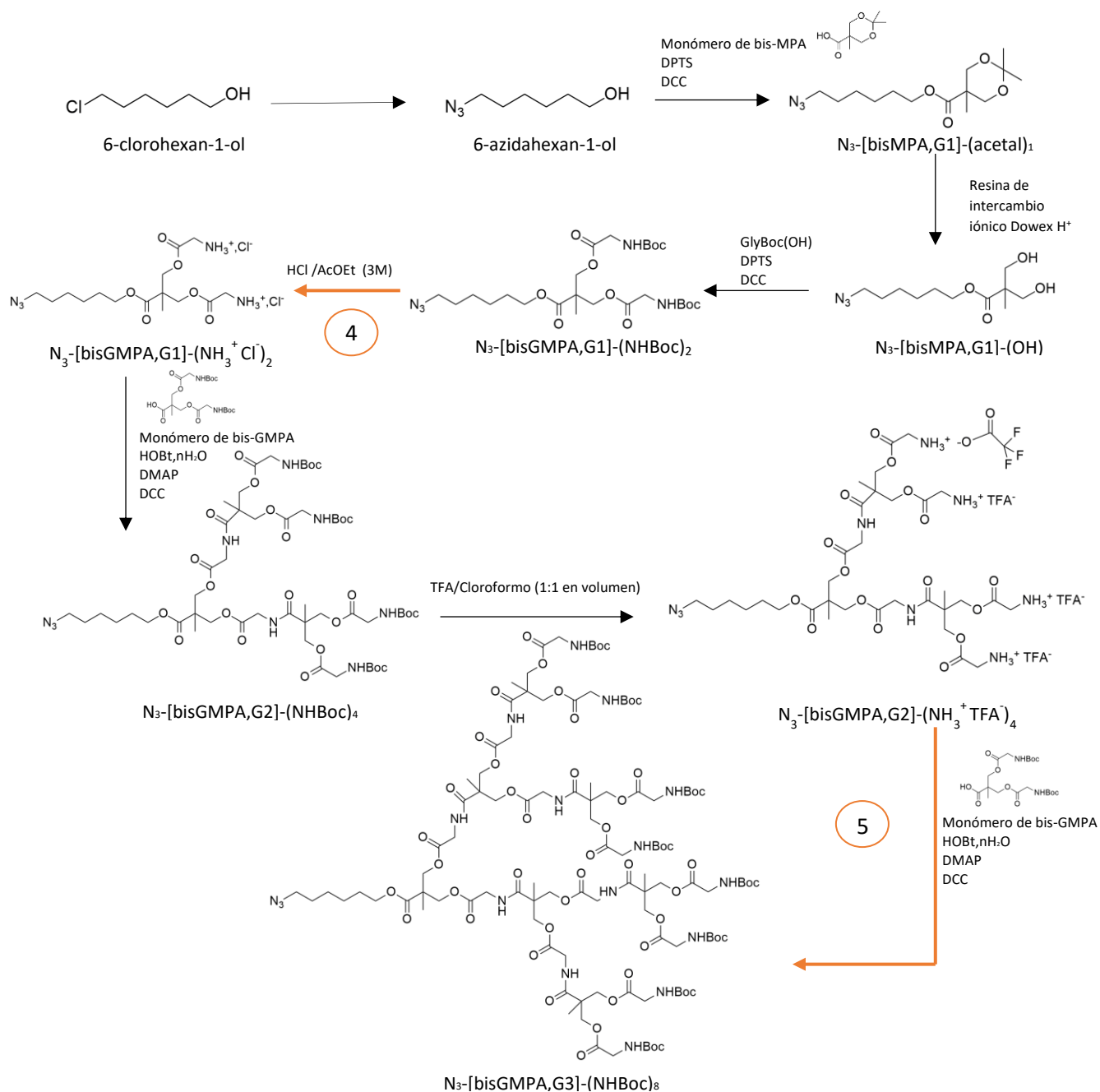


Figura 4 - Esquema de síntesis del dendrón de 3ª generación de bis-GMPA

En primer lugar, el 6-clorohexan-1-ol reaccionó con azida de sodio disuelta en dimetilformamida (DMF) a 100°C con el objetivo de generar una reacción de sustitución nucleófila para reemplazar el átomo de cloro por el grupo azida, generándose así el punto focal del dendrón que posteriormente podrá ser utilizado para la realización de la cicloadición azida-alquino. Posteriormente, al compuesto resultante (6-azidahexan-1-ol) se le adicionó un monómero de bis-MPA, que previamente fue protegido formando un grupo acetal, mediante esterificación de Steglich. Se usó DPTS como catalizador, DCC como agente acoplante y diclorometano (DCM)

como disolvente. A continuación, se procedió a la desprotección de los grupos OH terminales mediante una resina de intercambio iónico Dowex[®]H⁺ que permite la hidrólisis del grupo acetal.

Seguidamente, puesto que se ha utilizado una estrategia divergente, para la síntesis de las diferentes generaciones del dendrón de bis-GMPA, se han alternado esterificaciones de Steglich con desprotecciones de los grupos terminales -NH₃⁺. Las esterificaciones se llevaron a cabo mediante un acoplamiento amida con el monómero de bis-GMPA en el que intervienen: DCC y 1-hidroxibenzotriazol hidrato (HoBt) como agentes acoplantes y DMAP como activador del monómero de bis-GMPA. La escisión de los grupos t-Boc se hizo mediante condiciones ácidas. En primer lugar, se empleó una disolución de HCl/AcOEt (3M). Sin embargo, en las desprotecciones posteriores se utilizó el método descrito por Stenström et al.(19) basado en el uso de una disolución de ácido trifluoroacético/cloroformo (1:1 en volumen).

- **Síntesis del dendrímero tipo Jano (C17)₂[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NH₃⁺TFA⁻)₈**

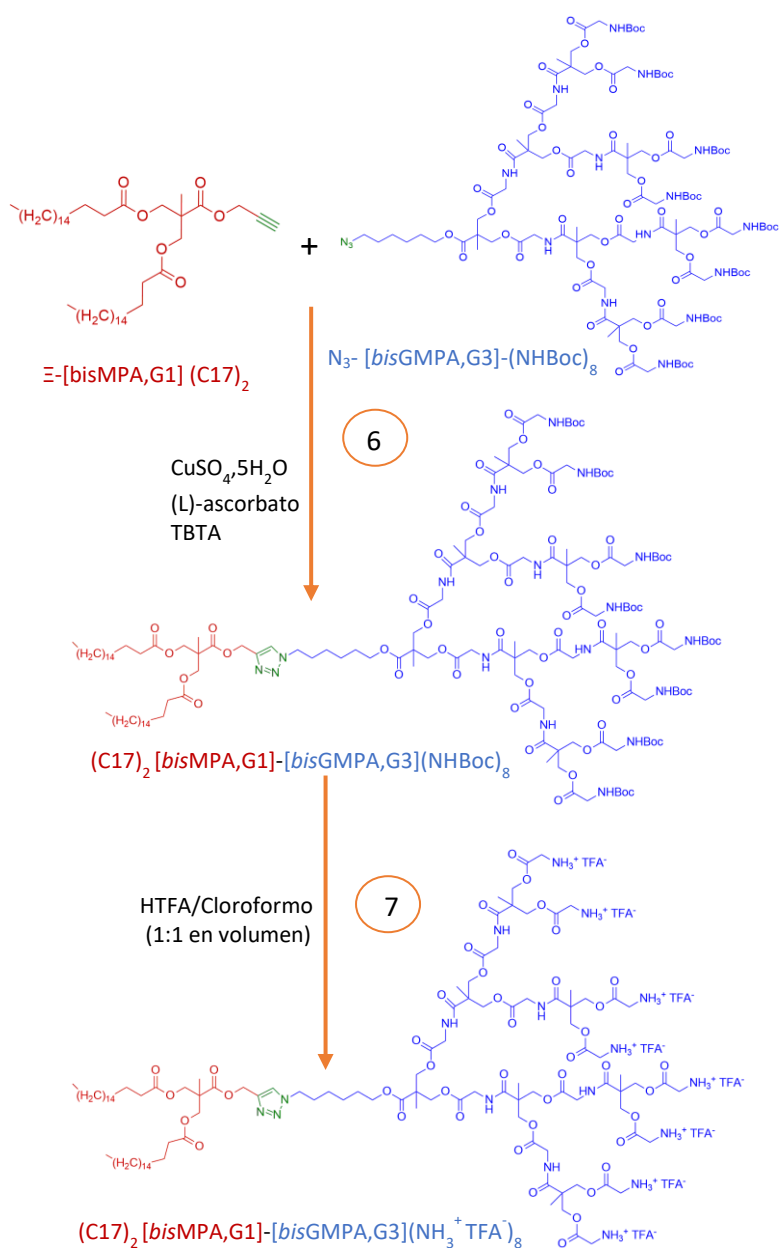


Figura 5 - Esquema del proceso de síntesis del dendrímero tipo Jano

El dendrón N₃-[bisGMPA,G3]-(NHBoc)₈ anteriormente sintetizado, fue ensamblado a través de su punto focal, formado por una azida, a un dendrón de bis-MPA de 1^a generación funcionalizado con dos cadenas de ácido esteárico. Este segundo dendrón, dispone en su punto focal de un grupo alquino, por ello, para la unión de ambos se realizó una cicloadición azida-alquino catalizada por Cu(I) conocida como química click, cuyo resultado es la formación de un grupo triazol que une ambos dendrones.

Se preparó el catalizador *in situ*, antes del inicio de la reacción. Para ello se empleó CuSO₄·5H₂O disuelto en DMF que fue reducido por (L)-ascorbato para formar Cu(I) y acomplejado por tris[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina (TBTA) para mantenerlo de forma estable. Una vez el catalizador estuvo preparado se añadió a una mezcla de ambos dendrones disueltos en DMF para llevar a cabo la cicloadición azida-alquino. Fue indispensable que toda la reacción se realizara en atmósfera desoxigenada para impedir la oxidación del catalizador.

Tras el transcurso de la cicloadición, se procedió a la purificación del dendrímero mediante la realización de lavados con brine (disolución de agua saturada de NaCl), lavados con solución de KCN y el uso de cromatografía en columna de sílica gel.

Por último, se realizó la desprotección de los grupos amino-terminales mediante la escisión del grupo t-Boc en medio ácido (TFA/cloroformo (1:1 en volumen)) y purificación por precipitación en dietiléter frío.

4.1.2. Caracterización de los compuestos

En la caracterización de cada uno de los compuestos químicos sintetizados se utilizó resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H y ¹³C, realizada con un espectrómetro Bruker AV-400 (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz). Se hizo uso de cloroformo o metanol deuterados como disolventes para la preparación de las muestras, según la solubilidad de cada producto. En los espectros resultantes, los desplazamientos químicos vienen expresados en ppm con respecto al tetrametilsilano y el pico del disolvente utilizado se usó como estándar interno. Asimismo, para aquellos compuestos de mayor complejidad se ha hecho uso de espectroscopia de correlación (COSY) para verificar la presencia de todos los tipos de protones.

Para el análisis del peso molecular, la espectrometría de masas ha sido la técnica de referencia. Se usó un sistema Bruker Microflex utilizando técnica de ESI⁺ o MALDI-TOF con láser de nitrógeno (337nm) y ditranol como matriz, dependiendo del peso molecular del compuesto a analizar. En el caso del dendrímero Jano (C17)₂[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3]-(NHBoc)₈ se hizo uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) utilizando un sistema Waters e2695 Alliance con dos columnas Styragel HR4 y HR1 (500 y 104 Å de tamaño de poro) y un detector evaporativo de dispersión de luz. La concentración de muestra fue de 1mg/mL en THF (de grado apto para HPLC) con un flujo de 1 mL/min. Como estándar de calibrado se utilizó polimetilmetacrilato (PMMA).

También se caracterizaron todos los compuestos por espectroscopía infrarroja (FTIR), con un equipo Bruker Vertex 70. Se obtuvieron espectros de transmitancia (ATR) abarcando los números de onda desde 4000 cm⁻¹ a 600 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹.

4.2. Encapsulación de fármacos

Se han seleccionado cinco fármacos antituberculosos diferentes para realizar el proceso de encapsulación. La isoniazida, la rifampicina, el etambutol y la estreptomina son fármacos considerados de *primera línea* para el tratamiento de la tuberculosis, debido a que tienen una alta eficacia y baja toxicidad. Respecto a sus mecanismos de acción, son dispares, y cada uno de ellos interviene sobre diferentes elementos bacterianos:

- La isoniazida es un pro-fármaco que debe de ser activado por la hemoproteína catalasa-oxidasa KatG. Inhibe a la enzima InhA una reductasa implicada en la síntesis de ácidos grasos (ácido micólico), fundamentales para la formación de la pared bacteriana. Tiene una acción bactericida contra las bacterias de rápido crecimiento y bacteriostática contra las que se dividen despacio.
- La rifampicina se une a la subunidad-β de la RNA polimerasa dependiente de DNA, impidiendo la síntesis de RNA (transcripción). Puede ser bactericida o bacteriostática, dependiendo de las concentraciones utilizadas.
- El etambutol, inhibe a las enzimas arabinosil transferasas implicadas en la formación de la pared celular, por lo que es un bacteriostático.
- La estreptomina es un aminoglicósido inyectable que impide la síntesis proteica por su interacción de la subunidad 30S ribosomal, por lo que es un bacteriostático. Se dispone en forma de estreptomina-sulfato.

El quinto fármaco con el que se va a trabajar es la bedaquilina (en forma de bedaquilina-fumarato). Se trata de un agente antituberculosis recientemente aprobado ante la necesidad de nuevas opciones de tratamiento contra las formas de tuberculosis multirresistentes (MDR-TB), y el problema de su uso es que presenta una elevada cardiotoxicidad. Se trata de una diarilquinolina que inhibe específicamente la ATP sintasa (20) y forma parte de los fármacos utilizados para el tratamiento de la tuberculosis MDR o XDR únicamente.

Para el proceso de encapsulación se tuvieron en cuenta sus solubilidades en agua o disolventes orgánicos con el objetivo de seleccionar el procedimiento más adecuado.

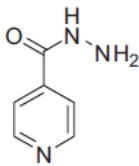
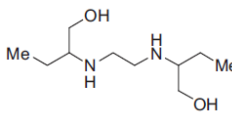
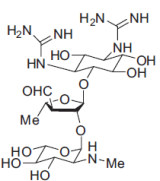
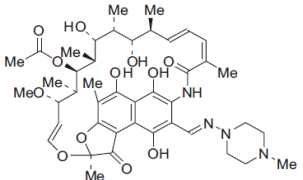
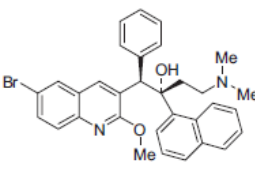
Isoniazida	Etambutol	Estreptomina	Solubles en agua / hidrófilos
			
Rifampicina	Bedaquilina		NO solubles agua / hidrófobos
			

Figura 6 - Estructuras moleculares de los antimicrobianos usados para la encapsulación (20).

Se usó el método *oil-in-water* descrito en la tesis de Alexandre Lancelot (18) para la encapsulación de todos los fármacos, salvo la bedaquilina. Este método consiste en la generación de dos fases: una orgánica (DCM) y una acuosa (agua destilada). Se disuelven el dendrímero y el fármaco por separado, uno en cada una de las fases, siendo la solubilidad del fármaco el principal

condicionante. Se genera una emulsión de ambas, y debido a que el DCM se evapora lentamente, las moléculas disueltas en la fase orgánica pasan a la fase acuosa de forma obligada. Dependiendo de la solubilidad de los fármacos, el proceso de encapsulación difiere en algunos pasos, los cuales se exponen a continuación.

Para los fármacos hidrosolubles (etambutol, isoniazida y estreptomycin) se disolvió el dendrímero a concentración 1 mg/mL en DCM y los fármacos en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL también. Sobre la disolución de dendrímero se adicionó un volumen adecuado de la solución de fármaco para que la concentración final del dendrímero en agua fuera 1 mg/mL, quedando por lo tanto la relación en masa fármaco:dendrímero 1:1. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante aproximadamente 6 horas, hasta la completa evaporación del DCM. Posteriormente, el fármaco no encapsulado se eliminó mediante diálisis frente a 200 mL de agua destilada durante 18 horas, a 4°C, usando una membrana de 1kDa.

La rifampicina, al ser un fármaco liposoluble, se disolvió en DCM [1mg/mL] y el dendrímero en agua destilada [1 mg/mL]. Se mezclaron volúmenes a partes iguales y se dejó evaporar el DCM como anteriormente. En este caso, para eliminar el fármaco no encapsulado se agregó al medio una disolución de NaOH (1M) para basificar el medio hasta un pH de 10 (comprobado con tira colorimétrica). Esto provoca que el fármaco no encapsulado precipite y pueda ser retirado mediante filtración usando un filtro de 0.2 µm.

En el caso de la bedaquilina, al encontrarse disuelta en DMSO, el método a utilizar fue la técnica de difusión de solvente. En primer lugar, se formaron los agregados de dendrímero, disolviendo éste en DCM y añadiendo agua para que la concentración final del dendrímero en agua fuera de 1 mg/mL. Como anteriormente, se dejó evaporar el DCM y tras esto se adicionó la disolución de bedaquilina [10 mg/mL]. Únicamente se dispuso de 314 µl de los 458 µl que eran necesarios para alcanzar la relación fármaco:dendrímero 1:1, por lo que la relación final obtenida fue 0.69:1. Se dejó la mezcla en agitación durante 12 horas a 4°C para que el fármaco pudiera llegar al núcleo hidrofóbico del agregado. Después el DMSO se eliminó mediante diálisis con membrana de 1 kDa durante 18 horas a 4 °C.

4.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los nanoagregados

Los estudios llevados a cabo para determinar la actividad antimicrobiana de los nanoagregados, se han realizado con una cepa de *Mycobacterium bovis* atenuada, el bacilo de Calmette y Guérin o más comúnmente conocido por sus siglas como BCG. La elección de esta micobacteria para los estudios ha sido debida a su elevado grado de similitud con *Mycobacterium tuberculosis* (99,9% a nivel genómico). Sin embargo, BCG posee la ventaja con respecto a *M.tuberculosis* de que es una bacteria inocua (de hecho, BCG es la actual vacuna contra la tuberculosis en humanos), por lo que no es necesario manipularla en un laboratorio con nivel de bioseguridad P3.

Para este ensayo, se utilizaron placas de 96 pocillos en las que se sembró BCG a una densidad final de 10^5 UFC/mL en medio de cultivo Middlebrook 7H9 Broth con glicerol al 0.2% (v/v) y suplementado al 10% con ADC (albúmina, dextrosa, catalasa). Para ajustar la densidad celular se hizo una medición de la densidad óptica del cultivo a 600 nm y se tomó como referencia el valor de 0.125 unidades de densidad óptica = 10^7 UFC/mL.

Se enfrentó a las bacterias a seis muestras diferentes: las encapsulaciones de los cinco fármacos preparadas con anterioridad y una disolución de nanopartículas vacías. De cada una de ellas se hizo un gradiente de concentraciones, de tal modo que las concentraciones finales en los pocillos, con respecto al dendrímero, fueron las siguientes: 125, 63.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98,

0.49, 0.24, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.008, 0.004, todas ellas expresadas en $\mu\text{g/mL}$. Las placas se mantuvieron en cultivo durante 6 días en estufa a 37°C .

A cada uno de los pocillos se adicionaron $30\ \mu\text{l}$ del colorante vital resazurina, un compuesto azul que, en presencia de actividad celular, es reducido adquiriendo una coloración rosa, fácilmente identificable de forma visual y que permitió identificar la presencia o no de microorganismos en los pocillos. Las placas se dejaron cultivar a 37°C y se observaron los resultados a las 24 y 48 horas.

Paralelamente al procedimiento descrito, para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada uno de los antimicrobianos, se realizó un ensayo con los fármacos de forma libre (sin encapsular) con el objetivo de poder hacer así un estudio comparativo frente a las nanopartículas. Las concentraciones que se utilizaron de antibiótico fueron: 63.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98, 0.49, 0.24, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.008, 0.004, 0.002 expresadas en $\mu\text{g/mL}$. Como control positivo de crecimiento microbiano, algunos pocillos se sembraron con BCG y no se les adicionó ningún compuesto (antimicrobiano o nanopartículas), y como control negativo, algunos pocillos no se inocularon con BCG.

Todos los reactivos utilizados para este ensayo fueron adquiridos de la casa Sigma-Aldrich a excepción de la bedaquilina-fumarato que fue obtenida de AURUM Pharmatech LLC.

4.4. Caracterización de los nanoagregados

- *Dispersión dinámica de luz (DLS)*

El DLS es una técnica espectroscópica que permite la determinar los radios hidrodinámicos de las partículas que se encuentran en una disolución. Se basa en la medición de la luz dispersada por la muestra en solución cuando sobre ella incide un láser de longitud de onda conocida. El tamaño de la partícula es determinado por la medición de los cambios aleatorios que se producen en la luz dispersada como consecuencia del movimiento Browniano de las partículas en la disolución. Posteriormente el sistema transforma estos datos en la distribución del tamaño de partícula. Para ello se utilizó un sistema Malvern Zetasizer Nano ZS que posee un láser de He-Ne con una longitud de onda de $633\ \text{nm}$ y un ángulo de detección de 173° . Los parámetros introducidos en el sistema fueron: 3 mediciones de 12 scans cada una, a temperatura de 25°C . Se analizaron las nanopartículas cargadas con los cinco tipos de fármacos y las vacías a una concentración de $25\ \mu\text{g}$ de dendrímero/ mL .

- *TEM*

Para el estudio de la morfología y el diámetro de los nanoagregados formados, se hizo uso de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las muestras se prepararon usando rejillas de cobre Holey carbón film 300 mesh sobre las que se vertió una gota de disolución de nanoagregado a una concentración de $1\ \text{mg}$ de dendrímero/ mL . Tras retirar el exceso de líquido, la muestra se tiñó con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 3% que genera una tinción negativa. De nuevo se eliminó el exceso de líquido con un papel absorbente y se dejaron secar durante 24 horas.

- *Cuantificación de fármaco encapsulado*

La cuantificación de los fármacos utilizados es compleja, por lo que se han seleccionado dos métodos diferentes:

- Cuantificación por espectrofotometría UV-vis

Por este método, únicamente se trató de cuantificar la isoniazida, la rifampicina y la bedaquilina, puesto que el etambutol y la estreptomycinina no manifiestan absorbancia en esta zona. Se generaron

disoluciones de los distintos fármacos a diferentes concentraciones para hacer una recta de calibrado y poder determinar el coeficiente de extinción molar (ϵ) para cada uno de los compuestos a la longitud de onda en la que presentan un pico de máxima absorción. El equipo utilizado para este método fue un espectrofotómetro Cary 100 Bio.

- Actividad antimicrobiana residual de las aguas de diálisis:

Este método lo que pretende es realizar una cuantificación indirecta del fármaco encapsulado mediante la determinación de la cantidad de fármaco libre que hay en las aguas de diálisis que se han generado tras el proceso de encapsulación, mediante la evaluación de su actividad antimicrobiana. Para ello las aguas de los fármacos hidrófilos encapsulados según el método *oil-in-water* (isoniazida, etambutol y estreptomycin) se han agregado a cultivos de BCG siguiendo el mismo protocolo que el determinado para los nanoagregados, detallado en el apartado 4.3.

• **Citotoxicidad**

Es fundamental verificar que los nanoagregados sintetizados no sean citotóxicos para las células humanas si en un futuro quisieran usarse como posibles agentes terapéuticos, por lo que son indispensables los estudios de biocompatibilidad.

Se ha realizado un ensayo con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol), que se basa en la reducción de este compuesto a su sal insoluble formazán ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano) llevada a cabo por las reductasas celulares utilizando NAD(P)H. Es un método colorimétrico que permite determinar la actividad metabólica que tiene el cultivo y asociar esto a la toxicidad de los compuestos adicionados.

En este ensayo, se utilizó la línea celular Hep G2, que son células inmortales que derivan de un carcinoma hepático humano. Tienen morfología epitelial y crecen de forma adherente en las placas de cultivo generando pequeños agregados.

Para la realización de este ensayo, se utilizaron placas de 96 pocillos en las que se sembraron 100 μ l de suspensión celular Hep G2 a una densidad celular de 2.5×10^4 cel/mL en medio DMEM con 1g/mL de glucosa y suplementado con piruvato y glutamina. Las placas se mantuvieron en cultivo durante 32 horas en estufa a 37 °C, atmósfera al 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Posteriormente se retiró el medio y se añadieron 100 μ l de los diferentes compuestos a ensayar (nanoagregados y fármacos libres) diluidos en medio de cultivo según las siguientes concentraciones:

- Fármacos libres (μ g/mL): 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.9, 1.95, 0.97, 0.05.
- Nanoagregados con fármacos (μ g de dendrímero/mL): 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.9, 1.95, 0.97.
- Nanoagregados sin fármacos (μ g de dendrímero/mL): 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.9, 1.95, 0.97.

Además, se incorporaron pocillos como controles negativos y positivos:

- **Negativo:** (-) Hep G2 con DMSO disuelta al 50% en medio DMEM
(--) DMEM sin células
(---) Hep G2 con DMEM disuelto al 50% en agua miliQ *(solo en una placa)*
- **Positivo:** células Hep G2 con 100% medio DMEM

Todos los compuestos, para cada una de las concentraciones, se ensayaron por triplicado, por lo que, a modo de ejemplo, la distribución de una de las placas fue la siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	+	125	125	125	125	125	125	125	125	125	--	+
B	+	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	--	+
C	+	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25	--	+
D	+	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	15.62	--	+
E	+	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	7.81	-	+
F	+	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	-	+
G	+	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95	-	+
H	+	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	-	+

Isoniazida Etambutol Estreptomina

Figura 7 - Representación esquemática de una placa de 96 pocillos del ensayo de toxicidad.

Los compuestos restantes se distribuyeron de forma similar a la figura 7, pero atendiendo a las concentraciones utilizadas en cada caso.

Tras 24 horas de incubación, se retiró nuevamente el medio de cultivo y se añadieron 50 µl de MTT a una concentración final de 1 mg/mL utilizando agua miliQ y medio de cultivo sin rojo fenol para su preparación. Tras la adición del MTT, se dejaron incubar las placas durante 2 horas. Por último, se decantó el contenido de los pocillos y se agregaron 100 µl de isopropanol para solubilizar las sales de formazán y se procedió a la lectura de la absorbancia a 570 nm en un lector de placas.

Los reactivos utilizados en este ensayo se adquirieron en diferentes casas comerciales. Los medios de cultivo son procedentes de la casa Gibco y el MTT junto con el isopropanol de Sigma-Aldrich.

5. Resultados y discusión

5.1. Síntesis química

Para la formación del dendrímero tipo Jano (C17)₂[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NH₃⁺ TFA⁻)₈ se ha realizado un proceso que se compone de tres pasos fundamentales: síntesis del monómero de bis-GMPA, síntesis del dendrón de 3^a generación formado por la adición de monómeros de bis-GMPA y por último, constitución del dendrímero tipo Jano.

La caracterización de cada uno de los compuestos obtenidos en el proceso de síntesis se hizo mediante H¹ RMN, C¹³ RMN, FTIR, MS (ESI⁺/MALDI-TOF) y SEC. A continuación, se recogen los aspectos más relevantes de todo el procedimiento. Los resultados completos de la caracterización de todos los compuestos se encuentran en el *Anexo I* de este trabajo.

- Síntesis del monómero de bis-GMPA

La síntesis del monómero de bis-GMPA se realizó en tres pasos, partiendo de bis-MPA, que se adquirió de forma comercial. En este proceso, se adicionaron mediante esterificación de Steglich las glicinas internas protegidas por los grupos t-Boc. Los rendimientos obtenidos en cada una de las reacciones y el rendimiento global fueron los siguientes:

Reacción	1	2	3	Rendimiento global
Rendimiento	51.8%	84.1%	98.7%	44.1%

Tabla 1- Rendimientos obtenidos en la síntesis del monómero de bis-GMPA

Existen una serie de señales características que permitieron identificar fácilmente que el proceso de síntesis del monómero había transcurrido de forma correcta. Como consecuencia de la reacción 1 en los espectros se mostraron los H¹ aromáticos del grupo bencilo añadido a un desplazamiento químico (δ) de 7.36. Tras el transcurso de la reacción 2, aparecieron las señales pertenecientes a los H¹ de los metilos del grupo t-Boc fácilmente identificables al ser una señal muy intensa. Por último, tras la reacción 3, las señales de los protones aromáticos del bencilo no aparecieron.

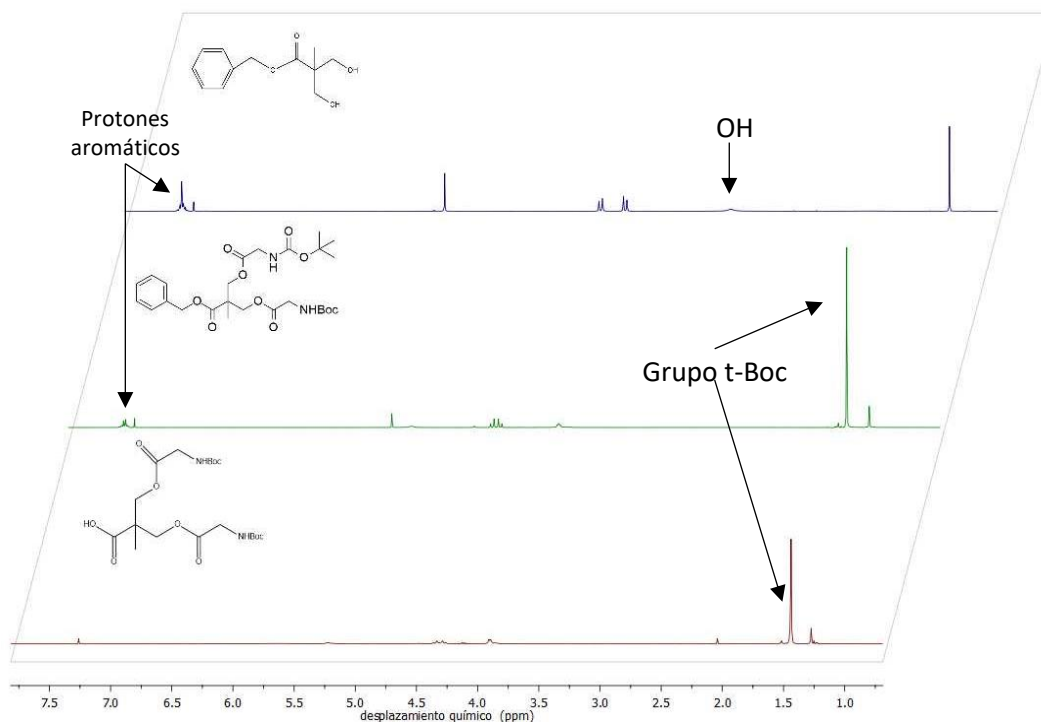


Figura 8 - Comparación de espectros de H¹ RMN de las reacciones 1, 2 y 3.

- Síntesis del dendrón de bis-GMPA de 3^a generación N₃-[bisGMPA,G3]-(NH₂Boc)₈

En la síntesis del dendrón de 3^a generación de bis-GMPA se han desarrollado dos reacciones: la desprotección del compuesto N₃-[bisGMPA,G1]-(NH₂Boc)₂ (reacción 4) y el crecimiento del dendrón de 2^a a 3^a generación mediante la adición de cuatro monómeros de bis-GMPA (reacción 5).

En lo referente a la reacción 4, se ha desarrollado en medio ácido, mediante una disolución de HCl/AcOEt 3M. En un principio la reacción no transcurrió de un modo adecuado dado que su avance era demasiado lento. Se creyó que esto era debido a que el compuesto no se encontraba correctamente disuelto, lo que se solventó calentando la mezcla a 50°C, mejorando así la solubilidad del dendrón en AcOEt. Como consecuencia de la escisión del grupo t-Boc se provoca la generación de la correspondiente sal de cloruro de amonio que precipita en el matraz. Se comprobó en los espectros H¹ RMN y C¹³ RMN la correcta desaparición de las señales pertenecientes al grupo t-Boc. El rendimiento obtenido en esta reacción fue del 94.2%. Dado que la eficacia de este método de desprotección no fue la deseada, ya que la reacción debió de ponerse en múltiples ocasiones, se acordó utilizar para desprotecciones posteriores el método basado en el ácido trifluoroacético.

En cuanto a la reacción 5, la correcta inserción de los monómeros de bis-GMPA tras la esterificación de Steglich puede visualizarse en el H¹ RMN por la identificación de los picos a 1.44 ppm correspondientes a los protones de los metilos del grupo t-Boc, así como la verificación

de la presencia del resto de señales para detectar cualquier posible proceso de degradación. Sin embargo, a pesar de que los picos característicos del compuesto en el H^1 RMN estaban todos presentes, sus integraciones, en muchos de los casos, aparecían incrementadas casi al doble, tomando como referencia el triplete a 3.27 ppm. Esto hizo sospechar que quizá se debiera a la existencia de dos o más especies debido a que la reacción de esterificación no hubiera conseguido la adición completa con los cuatro monómeros de bis-GMPA en todas las moléculas. Por esto se creyó que debían de existir moléculas que poseían un menor número de grupos terminales $-NH_3^+$ a causa de esta funcionalización incompleta. Además, mediante MS (MALDI-TOF) los resultados tampoco eran concluyentes ya que, además de la masa esperada, aparecían otra serie de picos de menor peso, probablemente como consecuencia de la fragmentación del dendrón. Por todo esto, se decidió poner a reaccionar de nuevo el dendrón en presencia de un exceso de monómero de bis-GMPA para intentar que la reacción transcurriera por completo y se sustituyeran los grupos terminales restantes. Sin embargo, no se obtuvieron mejores resultados en las pruebas de caracterización realizadas con posterioridad. El rendimiento obtenido tras la reacción 5 fue muy bajo, del 22.5%, probablemente debido a los múltiples procedimientos que se realizaron para tratar de lograr la obtención y purificación del dendrón.

La espectroscopía de correlación (COSY) fue fundamental para este compuesto ya que permitió verificar la presencia de todos los tipos de protones dado que en algunas zonas del H^1 RMN las señales no quedaban demasiado claras debido a la existencia de mucho ruido. Finalmente, a pesar de que la integración de las señales del H^1 RMN no eran adecuadas, se decidió proseguir con el proceso de síntesis, ya que, aunque no todas las moléculas estuvieran correctamente formadas, esto no debería de afectar en gran medida al uso posterior del dendrímero.

- **Síntesis del dendrímero tipo Jano $(C17)_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NH_3^+ TFA^-)_8$**

Para el acoplamiento del dendrón hidrófilo de bis-GMPA al hidrófobo de bis-MPA funcionalizado con ácido esteárico, se llevó a cabo una cicloadición azida-alquino catalizada por Cu (I). Para ello, el Cu (I) fue preparado *in situ* a partir de la reducción de Cu (II) mediante la adición (L)-ascorbato y TBTA. El dendrón hidrofóbico se puso en exceso con el objetivo de obtener el máximo rendimiento posible y facilitar la posterior purificación en columna de sílica gel gracias a la diferencia de polaridades. El rendimiento obtenido en esta reacción fue del 78.0%. El dendrímero recién formado se desprotegió para dejar sus grupos amino-terminales libres mediante el uso de TFA disuelto en cloroformo (1:1 en volumen) y se purificó posteriormente por precipitación en dietiléter frío, obteniéndose un rendimiento de 60.9%. Es un rendimiento bajo para una reacción de desprotección, lo que probablemente fue debido a que debieron de realizarse varias precipitaciones en dietiléter frío hasta conseguir el producto lo más puro posible. La masa final obtenida del dendrímero Jano $(C17)_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NH_3^+ TFA^-)_8$ fue de 316.9 mg.

Dado que en dendrímero $(C17)_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NHBoc)_8$ posee una masa molecular demasiado alta como para realizar MS, el compuesto se caracterizó por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Este análisis sirvió para constatar las suposiciones anteriormente realizadas, verificando la existencia de dos especies diferentes. La especie mayoritaria se trata del dendrímero completamente formado, pero aparece una segunda minoritaria a un mayor tiempo de retención, por lo que tiene una menor masa molecular. Probablemente esto sea debido a que se encuentre incompleta porque no se haya adicionado uno de los monómeros de bis-GMPA en la reacción 5. Esto puede verse en la figura A1.22 donde el pico estrecho, característico de una molécula monodispersa, como es un dendrímero de estas características, posee un pequeño hombro, señal de que existe una segunda especie. A pesar de que haya dos tipos de moléculas

diferentes, esto no debería de afectar a su capacidad de formar agregados supramoleculares en disolución acuosa.

Como señales destacadas en el análisis del H^1 RMN, tras la cicloadición se observó fácilmente la desaparición del triplete a un δ de 3.27 ppm del dendrón de bis-GMPA, que son los dos protones del carbono más próximo a la azida (por lo que ha reaccionado en su totalidad) y la presencia de un singlete a 7.61 ppm que forma parte del triazol. Además, se verificó la existencia de todas las señales de ambos dendrones para identificar cualquier tipo de degradación. Al igual que anteriormente y como era de esperar, en el análisis por integración de los picos del H^1 RMN se observa como las señales correspondientes a los protones del dendrón de bis-GMPA siguen dando valores por encima de los correctos.

El espectro FTIR el dendrón de bis-GMPA presenta una señal muy característica a 2096 cm^{-1} correspondiente a la azida, que tras la realización de la cicloadición fue eliminada. Después de la desprotección de los grupos $-NH_3^+$ terminales puede observarse como desapareció la señal del $C=O$ carbamato a 1699 cm^{-1} y se hizo más ancha la banda del enlace $N-H^+$ a $3600-2570\text{ cm}^{-1}$.

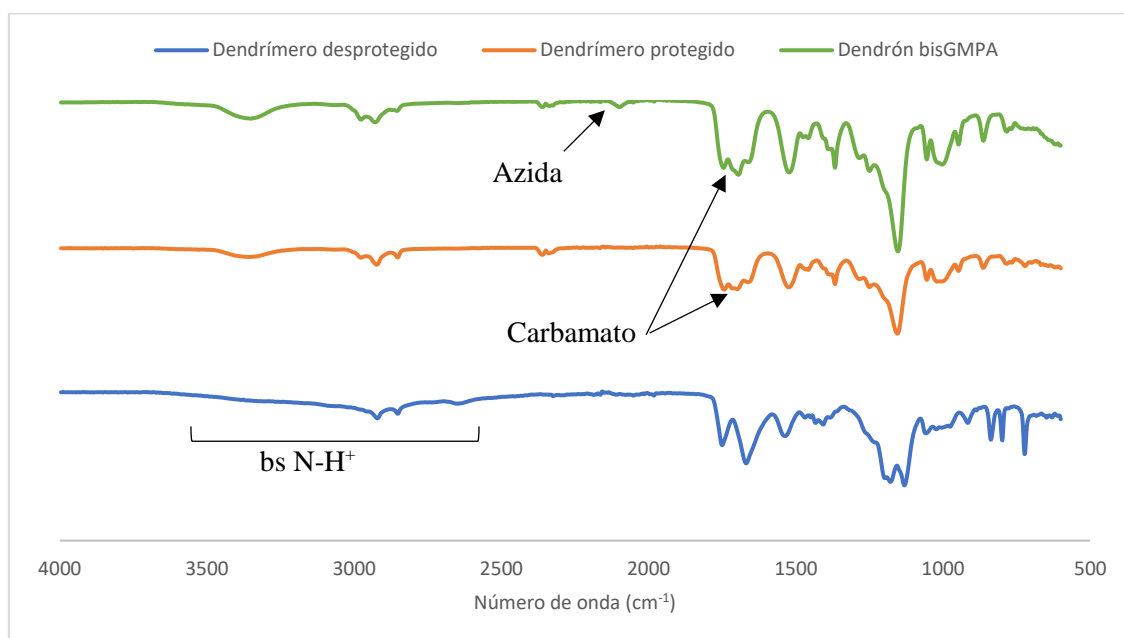


Figura 9 - Espectros FTIR del dendrón de 3ª generación de bis-GMPA (verde), el dendrón Jano $(C17)_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NH\text{Boc})_8$ (naranja) y el dendrón Jano $(C17)_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NH_3^+ TFA^-)_8$ (azul).

5.2. Formación y caracterización de los nanoagregados dendríticos transportadores de fármacos

5.2.1. Actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antimicrobiana de los nanoagregados y las MIC de los fármacos libres, se realizó un ensayo con BCG, en el que se enfrentó a la bacteria a diferentes concentraciones de estos compuestos. Posteriormente, tras incubar el cultivo durante 6 días, se añadió resazurina, un colorante que permite identificar la existencia de actividad metabólica en el cultivo, y por lo tanto evaluar el efecto antimicrobiano. El ensayo se repitió dos veces, con un intervalo de tiempo de 8 días con el objetivo de evaluar la reproducibilidad del mismo.

Las MIC determinadas para los fármacos libres en $\mu\text{g/mL}$ fueron las siguientes:

Etambutol	Isoniazida	Estreptomina	Bedaquilina	Rifampicina
1.95	0.49	0.49	0.03 - 0.015	0.06 - 0.03

Tabla 2 - MICs determinadas para cada uno de los fármacos libres expresadas en $\mu\text{g/mL}$

En general los valores de MIC obtenidos se ajustaron los datos de referencia en cultivo líquido con los que trabaja el grupo de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza, admitiendo una dilución (1:2) como una variabilidad dentro de lo aceptable. Sin embargo, para el caso de la rifampicina sí que se han observado diferencias significativas ya que ellos tienen determinada una MIC de $0.0015 \mu\text{g/mL}$. Se desconoce cuál puede haber sido el motivo de este resultado, aunque se puede especular con la mala solubilidad de la rifampicina en medio acuoso.

En cuanto a los datos obtenidos del cultivo con nanoagregados, todos ellos mostraron actividad antimicrobiana salvo las nanopartículas vacías, sin fármaco. Esto viene a indicar que se ha producido una eficiente encapsulación de todos los compuestos seleccionados y que la actividad antimicrobiana es debida al fármaco y no a la posible toxicidad del dendrímero sobre las bacterias. Las MIC obtenidas para cada uno de los tipos de nanoagregados, expresadas en μg de dendrímero/mL se recogen en la tabla 3.

Etambutol	Isoniazida	Estreptomina
1.95	0.49	0.49
Bedaquilina		Rifampicina
3.91		0.49

Tabla 3 – MIC de las nanopartículas cargadas con antimicrobianos expresadas en μg de dendrímero/mL

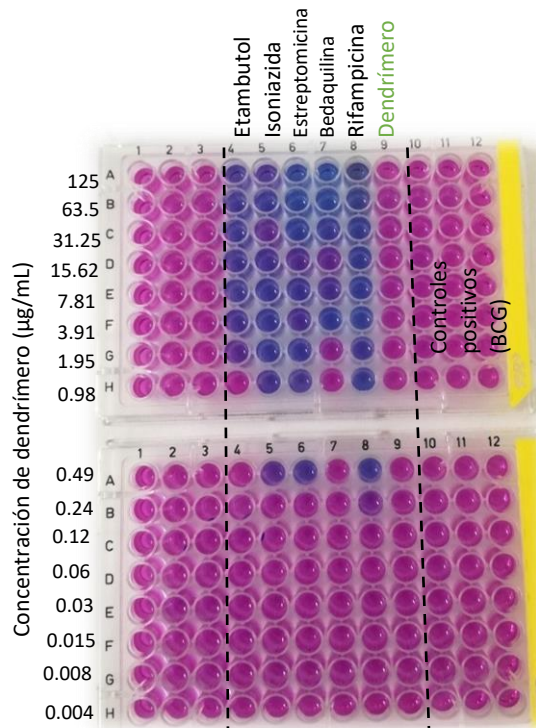


Figura 10 - Resultado del segundo ensayo realizado para evaluar la actividad antimicrobiana de los nanoagregados contra BCG.

Los resultados del segundo ensayo son bastante concordantes con respecto a los del primero salvo en el caso de la rifampicina encapsulada. En el primer experimento se obtuvo una MIC de $0.03 \mu\text{g}$ de dendrímero /mL, lo cual es más esperable debido a la elevada capacidad antimicrobiana de este compuesto. Esta disminución de la actividad tan acusada se cree que fue debida al hecho de que es la única disolución de nanoagregado que tuvo un pH muy básico, lo que pudo haber afectado tanto a la estructura del dendrímero, como a la estabilidad del fármaco. Es bastante probable que, en los 8 días que hubo de diferencia entre un ensayo y otro, se produjera algún tipo de degradación, especialmente de la rifampicina, ya que se apreció un cambio de color significativo en la preparación. El pH básico de la disolución no tuvo efecto sobre el cultivo dado que se adicionó de forma muy diluida y además los medios de cultivo poseen sustancias tamponantes (se comprobó con tira colorimétrica). Llama la atención también los valores altos de MIC obtenidos para la bedaquilina encapsulada, siendo que es un fármaco que de forma libre tiene una elevada actividad antimicrobiana. Esto podría deberse al hecho de que para el proceso de encapsulación la relación fármaco:dendrimer utilizada fue de 0.69:1 (a diferencia de la 1:1 utilizada en los otros fármacos), la mala solubilidad de la bedaquilina en agua o quizá a una interacción muy fuerte entre el dendrímero y la bedaquilina.

5.2.2. Cuantificación de fármaco encapsulado

Se ha tratado de cuantificar mediante mediciones directas o indirectas el porcentaje de fármaco encapsulado en cada uno de los casos. Sin embargo, la estreptomycin, el etambutol y la bedaquilina no absorben en longitudes de onda (λ) que puedan ser determinadas mediante un espectrofotómetro UV-visible. Por lo tanto, esta técnica únicamente pudo usarse para precisar la eficiencia de encapsulación de la isoniazida y la rifampicina.

En el caso de la isoniazida, el compuesto presenta un máximo de absorción a una λ de 264 nm, que fue utilizado para la cuantificación de fármaco (figura A2.1). En este caso, se usó un método indirecto, midiendo la concentración de fármaco presente en las aguas de diálisis. Para ello, previamente se realizó una recta de calibrado sobre la que poder extrapolar los resultados obtenidos (figura A2.2). La absorbancia de la muestra fue de 0.405, lo que se corresponde con una concentración de 11,76 $\mu\text{g/mL}$. Puesto que el volumen de las aguas de diálisis era de 200 mL, la cantidad de isoniazida sin encapsular fue de 2.35 mg, lo que supone una eficiencia de encapsulación del 52.42%.

Para la cuantificación de la rifampicina se usó un método directo al tratarse de un fármaco hidrófobo, que consistió tomar una alícuota de 100 μl de la disolución de los nanoagregados con fármaco encapsulado y disgregarlos en 1.9 mL de DMSO. Al igual que anteriormente, se preparó una recta patrón y se midió la absorbancia en la región de máxima absorción. En base a los resultados obtenidos, la eficiencia de encapsulación es del 5.21% lo cual es un resultado demasiado bajo para lo esperado según las características físico-químicas del fármaco. Dado que se trata de una molécula hidrófoba, es de suponer que la posibilidad de poderse albergar en un núcleo apolar cuando se pone en contacto con el dendrímero, le va a proporcionar un medio adecuado para su encapsulación al estar obligada a disolverse en medio acuoso. También es cierto que la rifampicina es un fármaco con un alto peso molecular, lo que podría condicionar negativamente su alojamiento en el interior de los nanoagregados.

Ante este resultado un poco desconcertante, se dedujo que tuvo lugar algún problema en el proceso de encapsulación. Debido al procedimiento usado, la disolución del fármaco encapsulado permaneció durante un largo tiempo a un pH muy básico, en torno a 10, lo que debió de afectar a la estructura de la rifampicina ya que sufrió un cambio de color bastante notable, de un naranja brillante a un ocre oscuro. De hecho, puede observarse como el espectro de absorción en el UV-visible ha cambiado para la muestra encapsulada, frente a rifampicina libre disuelta (figura A2.3). Además, los datos obtenidos de actividad antimicrobiana de los nanoagregados tampoco concuerdan con una eficiencia de encapsulación tan baja como la aquí determinada.

Por esta razón, la cuantificación estimada para la rifampicina no se ha considerado como válida ni el método utilizado para la encapsulación tampoco, ya que debería de eliminarse el procedimiento de basificación del pH o bien neutralizarse de forma rápida.

En el método de siembra frente a BCG de las aguas de diálisis ni siquiera los pocillos más concentrados provocaron inhibición del crecimiento microbiano. La concentración más alta ensayada se correspondía con una dilución de las aguas de diálisis 1:4. Únicamente puede afirmarse que la concentración de fármaco en cada uno de los pocillos es inferior a las MIC. Por ello, puede suponerse que la eficiencia de encapsulación para el etambutol ha sido superior al 64% y la de la estreptomycin y la isoniazida superiores al 92% (demasiado altas). Esto no concuerda con el valor anteriormente obtenido para la isoniazida por UV-vis, lo que es debido a la variabilidad que tiene este método y su falta de precisión. Además, el hecho de dar unas MIC basadas en dos ensayos todavía aumenta más el grado de imprecisión. Por lo tanto, la eficiencia

de encapsulación válida será la determinada por espectrofotometría y los otros resultados no se considerarán. Este experimento ha servido para ver como no se trata de una metodología adecuada para realizar mediciones precisas.

Por lo tanto, queda pendiente la cuantificación de cada uno de los fármacos encapsulados mediante métodos fiables y de precisión, como por ejemplo HPLC, que es el más ampliamente usado en la comunidad científica para la medición de estos fármacos.

5.2.3. Morfología y tamaño

Todos los nanoagregados sintetizados, seis en total (los cinco fármacos encapsulados y el dendrímero solo), se caracterizaron por TEM y DLS con el objetivo de conseguir determinar su morfología y tamaño.

Mediante el uso de la microscopia electrónica de transmisión se pudo visualizar la morfología de los nanoagregados. Se usó una tinción negativa a base de ácido fosfotúngstico, que al poseer átomos de tungsteno, con un elevado número atómico, cuando incide el haz de electrones da una coloración oscura de fondo sobre la que resaltan los nanoagregados de forma brillante al no poseer átomos pesados. La morfología predominante observada fueron micelas esféricas que formaban partículas discretas, especialmente en el caso de los nanoagregados de fármacos hidrófobos y los de dendrímero vacío (Imagen A2.1). Sin embargo, en el caso de la rifampicina (Imagen A2.6), aunque la morfología predominante sigue siendo de tipo esférico, aparecen en determinadas regiones unas estructuras con forma tipo gusano. Por otra parte, en el caso de los fármacos hidrófilos isoniazida, etambutol y estreptomycin (Imágenes A2.2/3/4), especialmente en los dos primeros, es frecuente encontrar partículas esféricas de un tamaño muy reducido formando grandes agregados entre sí.

Se utilizó DLS para la medida del radio hidrodinámico de los nanoagregados. Esta técnica evalúa el tamaño de las partículas mediante dos tipos de análisis: intensidad y número. La determinación por intensidad da más relevancia a las partículas de mayor tamaño, ya que dispersan una mayor cantidad de luz, sin embargo, da una mejor determinación del tamaño real de partícula. Por otro lado, el tratamiento por número se aproxima más a la distribución de tamaño real que se encuentra en la disolución y cuantifica menos fielmente el diámetro. En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos por DLS y TEM expresados en nm.

	DLS		TEM
	Intensidad	Número	
Dendrímero sin carga	14 ± 2	12 ± 2	14 ± 6
Dendrímero + Etambutol	13 ± 3 239 ± 58	10 ± 2	13 ± 2
Dendrímero + Isoniazida	150 ± 25 10 ± 2	9 ± 2	14 ± 6
Dendrímero + Estreptomycin	19 ± 7 418 ± 160 4433 ± 916	10 ± 3	11 ± 2
Dendrímero + Bedaquilina	464 ± 249	216 ± 141	11 ± 3 171 ± 41
Dendrímero + Rifampicina	40 ± 21 225 ± 74 4821 ± 718	18 ± 5	38 ± 29

Tabla 4- Tamaño de los nanoagregados vacíos y cargados con fármacos mediante DLS y TEM expresados en nm (media ± desviación típica).

Los resultados alcanzados por TEM y DLS, en lo que respecta al diámetro de las partículas de menor tamaño para cada uno de los fármacos, son bastante coincidentes y parece ser que se trata de la población mayoritaria. Los otros tamaños detectados mediante datos de DLS de intensidad pueden tener diferentes explicaciones: las señales de más de 4000 nm probablemente sean debidas a contaminaciones con partículas de polvo y las de rangos intermedios (entre 150 y 420 nm) quizá sean consecuencia de fenómenos de agregación entre partículas más pequeñas que han podido observarse también a través de TEM. Mediante microscopía se ha podido constatar como los grandes agregados de partículas de pequeño tamaño son más frecuentes en los fármacos hidrofílicos (Imagen A2.3). Esto podría deberse a que, al situarse los fármacos en la periferia del nanoagregado, por su naturaleza polar, pueden actuar como puente y permitir la asociación entre diferentes micelas. Sin embargo, estas interacciones no son favorables cuando los fármacos son hidrófobos ya que se alojan en el interior de la estructura. En estos casos, la carga fuertemente positiva de las micelas dendríticas debido a los grupos terminales $-NH_3^+$ las haría mantenerse unas alejadas de otras formando partículas discretas.

Cabe destacar que, en el caso de la rifampicina, los nanoagregados muestran un mayor tamaño promedio, lo que puede ser debido al hecho de que es un fármaco hidrófobo de una gran masa molecular (822 Da) que al alojarse en el interior de las micelas haga que éstas incrementen sus dimensiones de un modo significativo.

Únicamente los datos de la bedaquilina obtenidos por TEM y DLS no guardan demasiada relación. Aunque cabe destacar que este fármaco ha sido para el único que se han encontrado, de forma puntual, una serie de micelas de gran tamaño (Imagen A2.5) por TEM. Sin embargo, la mayoría predominante eran partículas similares a las encontradas en los otros compuestos en la preparación visualizada por TEM.

En definitiva, de forma mayoritaria, el dendrímero en disolución acuosa se encuentra formando pequeñas micelas (~13 nm) y su tamaño no se ve condicionado por la encapsulación de los diferentes fármacos salvo la rifampicina, que provoca un aumento bastante considerable debido a su elevada masa molecular. La bedaquilina parece tener un efecto similar pero deberían de hacerse nuevas mediciones para confirmarlo.

5.2.4. Citotoxicidad

Cualquier tipo de producto que vaya a tener un uso potencial sobre los seres humanos u otros organismos, ha de analizarse para valorar su potencial efecto citotóxico. En este caso se hizo un ensayo MTT utilizando la línea celular Hep G2, ampliamente usada en la comunidad científica para la realización de este tipo de estudios. Se testaron todos los tipos de nanoagregados sintetizados y también los fármacos libres con el objetivo de poder hacer un análisis comparativo. Los resultados obtenidos se encuentran representados gráficamente en las figuras 11 y 12.

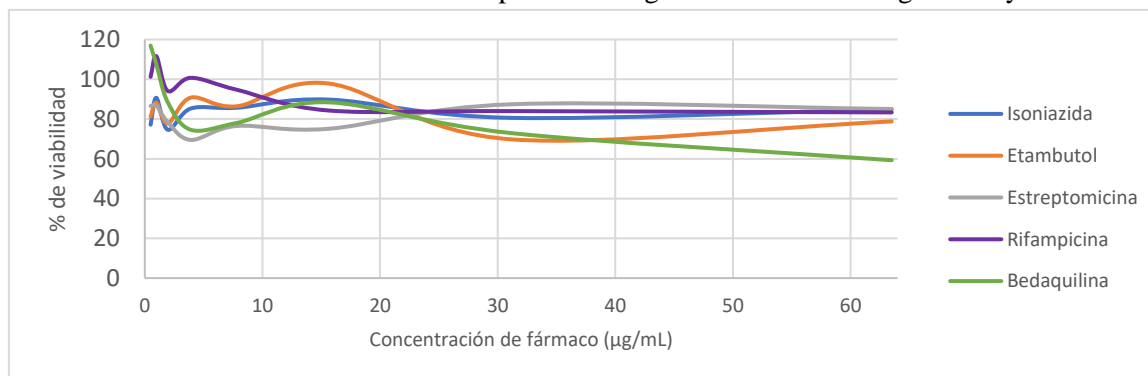


Figura 11- Viabilidad celular de las células Hep G2 ante los distintos tipos de fármacos libres.

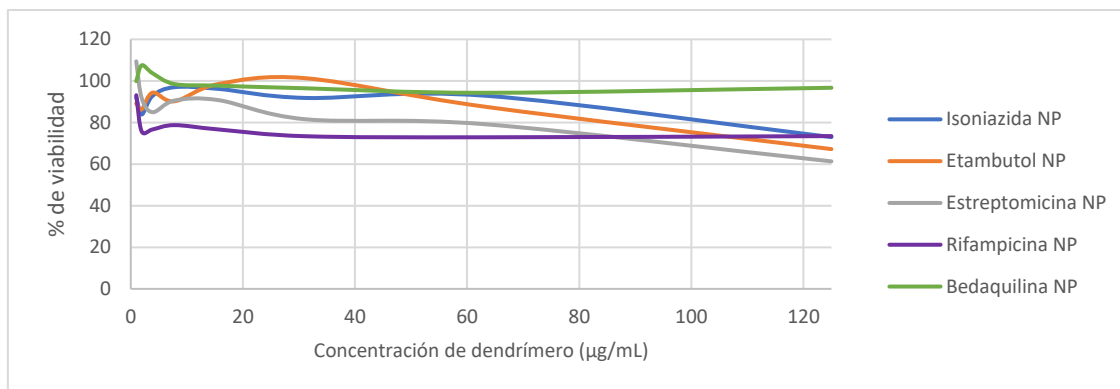


Figura 12-Viabilidad celular de la línea Hep G2 a diferentes concentraciones de fármaco encapsulado.

El dendrímtero únicamente manifestó elevada toxicidad cuando se expuso a elevadas concentraciones a las células (500 µg/mL), lo que está reflejado en la figura A2.4.

Es importante atender a los resultados obtenidos para la bedaquilina. Se trata de un fármaco con una elevada citotoxicidad tal y como puede verse en la figura 11 y llama la atención el hecho de que en la bedaquilina encapsulada, el efecto citotóxico ha desaparecido a cualquier concentración de dendrímtero. Podría pensarse que es debido a que la cantidad de bedaquilina en los nanoagregados es mínima, pero se ha visto anteriormente como poseen un notable efecto antimicrobiano en el ensayo con BCG. Esto es un punto muy interesante y que debería de estudiarse posteriormente con mayor detenimiento puesto que la toxicidad es el principal problema de este nuevo fármaco antituberculosis aprobado especialmente para el tratamiento de las MDR-TB.

Las conclusiones que se pueden extraer de los datos obtenidos en este ensayo son limitadas debido a dos motivos: en primer lugar, dado que se desconoce con precisión la cantidad de fármaco encapsulado, es difícil hacer una comparación con los datos correspondientes al fármaco libre; y en segundo lugar, las absorbancias detectadas tras la solubilización de los cristales de formazán fueron extremadamente bajas en todos los pocillos de las placas. Por ello sería conveniente repetir este ensayo sembrando a una mayor densidad celular inicial en cada pocillo y conociendo previamente la cantidad de fármaco encapsulado de forma precisa.

Sintetizando de un modo global los resultados obtenidos en la totalidad de los experimentos realizados, parece vislumbrarse como este tipo de dendrímtero Jano basado en un dendrón de bis-GMPA de 3ª generación y un dendrón de bis-MPA de 1ª generación funcionalizado con dos cadenas de ácido esteárico podría mejorar las propiedades farmacológicas de los antibióticos ensayados.

Los objetivos del trabajo planteaban la síntesis química de un dendrímtero tipo Jano (C17)₂ [bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NH₃⁺ TFA⁻)₈ la cual se ha logrado, salvo por el hecho de que existe una mezcla de especies, aunque el dendrímtero deseado representa la mayoritaria. También se ha conseguido la encapsulación de diferentes fármacos antituberculosos manteniendo su actividad antimicrobiana. Dado que entre los objetivos de este trabajo también se pretendía la caracterización de estos complejos supramoleculares, se realizaron diferentes ensayos para su estudio: DLS, TEM, citotoxicidad... Sin embargo, sería precisa la realización de nuevos experimentos para determinar otras cuestiones como: cinética de liberación, internalización, estudio de la interacción nanoagregado-bacteria, etc.

6. Conclusiones / Conclusions

Se realizó la síntesis de un dendrón de bis-GMPA de 3ª generación para posteriormente formar un dendrímero tipo Jano con un segundo dendrón de bis-MPA de 1ª generación funcionalizado con ácido esteárico. Aunque la mayoría de las moléculas presentaron la estructura deseada, una pequeña fracción mostró un menor peso molecular, probablemente debido al hecho de que la última reacción de esterificación de Steglich para el crecimiento de 2ª a 3ª generación del dendrón de bis-GMPA no fue completamente eficaz.

El dendrímero es capaz de encapsular y generar complejos supramoleculares tanto con fármacos hidrófobos (rifampicina y bedaquilina) como hidrófilos (etambutol, isoniazida y estreptomycin) en disolución acuosa, formando mayoritariamente micelas de un diámetro de ~13nm, salvo en el caso de la rifampicina, que al tener un elevado peso molecular las dimensiones son mayores.

Es necesaria la utilización de técnicas precisas que permitan cuantificar el fármaco encapsulado en cada uno de los casos, siendo el HPLC la técnica de referencia más adecuada para este objetivo. Sin conocer la cuantificación concreta del fármaco es difícil establecer si el dendrímero potencia o disminuye la capacidad antimicrobiana de los compuestos probados.

Estos nanoagregados presentan poder antimicrobiano contra BGC como consecuencia del fármaco encapsulado y no parecen ser tóxicos para las células eucariotas (Hep G2), lo que hace que el dendrímero sintetizado sea un buen candidato para continuar los estudios con él como nanotransportador de fármacos.

The synthesis of a 3rd generation bis-GMPA dendron was carried out to subsequently form a Janus-type dendrimer with a second 1st generation bis-MPA dendron functionalized with stearic acid. Although most molecules exhibited the desired structure, a small fraction showed a lower molecular weight, probably due to the fact that last Steglich's esterification reaction for the 2nd to 3rd generation growth of the bis-GMPA dendron was not completely effective.

The dendrimer is capable of encapsulating and generating supramolecular complexes with both hydrophobic (rifampicin and bedaquiline) and hydrophilic (ethambutol, isoniazid and streptomycin) drugs in aqueous solution, forming mostly micelles with a diameter of ~ 13nm, except in the case of rifampicin due to its higher molecular weight the dimensions are greater.

It is necessary to use precise techniques to quantify the encapsulated drug in each case, being HPLC the most appropriate reference technique for this purpose. Without knowing the specific quantification of the drug it is difficult to establish whether the dendrimer enhances or decreases the antimicrobial capacity of the tested compounds.

These nanoaggregates have antimicrobial power against BGC as a consequence of the encapsulated drug and do not appear to be toxic for eukaryotic cells (Hep G2), which makes the synthesized dendrimer a good candidate to continue studies with it as a drug nanocarrier.

7. Bibliografía

1. Global tuberculosis report 2017. Ginebra (Suiza): World Health Organization; 2017.
2. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock: Biología de los microorganismos. 10ª ed. Madrid 2010.
3. Rodríguez JC. Tuberculosis latente. Revista chilena de enfermedades respiratorias. 2012;28:61-8.
4. Costa-Gouveia J, Aínsa JA, Brodin P, Lucía A. How can nanoparticles contribute to antituberculosis therapy? Drug Discov Today. 2017;22(3):600-7.
5. Lin YS, Lee MY, Yang CH, Huang KS. Active targeted drug delivery for microbes using nano-carriers. Curr Top Med Chem. 2015;15(15):1525-31.
6. Marcos M, Serrano JL. Polímeros dendríticos. Anales de la Real Sociedad Española de Química. 2009;2:103-10.
7. Bhadra D, Bhadra S, Jain NK. PEGylated peptide dendrimeric carriers for the delivery of antimalarial drug chloroquine phosphate. Pharm Res. 2006;23(3):623-33.
8. Movellan J, Urbán P, Moles E, de la Fuente JM, Sierra T, Serrano JL, et al. Amphiphilic dendritic derivatives as nanocarriers for the targeted delivery of antimalarial drugs. Biomaterials. 2014;35(27):7940-50.
9. Padilla De Jesús OL, Ihre HR, Gagne L, Fréchet JM, Szoka FC. Polyester dendritic systems for drug delivery applications: in vitro and in vivo evaluation. Bioconj Chem. 2002;13(3):453-61.
10. Kong X, Yu K, Yu M, Feng Y, Wang J, Li M, et al. A novel multifunctional poly(amidoamine) dendrimeric delivery system with superior encapsulation capacity for targeted delivery of the chemotherapy drug 10-hydroxycamptothecin. Int J Pharm. 2014;465(1-2):378-87.
11. Lancelot A, Clavería-Gimenob R, Velázquez-Campoy A, Abian O, Serrano JL, Sierra T. Nanostructures based on ammonium-terminated amphiphilic Janus dendrimers as camptothecin carriers with antiviral activity European Polymer Journal. 2017;90:136-49.
12. Reul R, Nguyen J, Kissel T. Amine-modified hyperbranched polyesters as non-toxic, biodegradable gene delivery systems. Biomaterials. 2009;30(29):5815-24.
13. Malhotra S, Bauer H, Tschiche A, Staedtler AM, Mohr A, Calderón M, et al. Glycine-terminated dendritic amphiphiles for nonviral gene delivery. Biomacromolecules. 2012;13(10):3087-98.
14. Lancelot A, González-Pastor R, Concellón A, Sierra T, Martín-Duque P, Serrano JL. DNA Transfection to Mesenchymal Stem Cells Using a Novel Type of Pseudodendrimer Based on 2,2-Bis(hydroxymethyl)propionic Acid. Bioconj Chem. 2017;28(4):1135-50.
15. Sikwal DR, Kalhapure RS, Govender T. An emerging class of amphiphilic dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications: Janus amphiphilic dendrimers. Eur J Pharm Sci. 2017;97:113-34.
16. Fedeli E, Lancelot A, José Luis Serrano JL, Calvo P, Sierra P. Self-assembling amphiphilic Janus dendrimers: mesomorphic properties and aggregation in water New Journal of Chemistry. 2015;39(3):1960-7.
17. Amaral A, Góis J, Serra AC, Coelho JFJ. Synthesis of well controlled dendritic structures for biomedical applications IEEE 3rd Portuguese Meeting in Bioengineering (ENBENG)2013.
18. Lancelot A. New dendritic derivatives for applications in nanomedicine: drug delivery and gene transfection: Universidad de Zaragoza; 2017.
19. Stenström P, Hjorth E, Zhang Y, Andrén OCJ, Guette-Marquet S, Schultzberg M, et al. Synthesis and in Vitro Evaluation of Monodisperse Amino-Functional Polyester Dendrimers with Rapid Degradability and Antibacterial Properties. Biomacromolecules. 2017;18(12):4323-30.
20. Handbook of anti-tuberculosis agents. Introduction. Tuberculosis (Edinb). 2008;88(2):85-6.

Anexos

ANEXO 1: Síntesis química

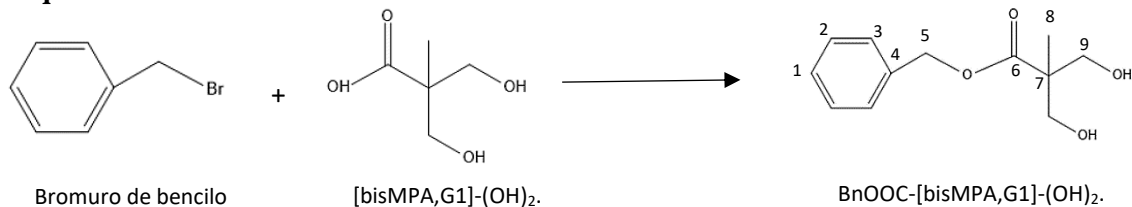
En esta sección se encuentran descritas todas las reacciones químicas llevadas a cabo en este trabajo. Se especifican reactivos, cantidades, volúmenes, temperaturas, tiempos, etc., y todas aquellas cuestiones que sean de interés para la realización de cada una de las reacciones.

Además, se recogen y detallan todos los resultados obtenidos mediante las diferentes pruebas de caracterización de todos los compuestos sintetizados.

Descripción de la reacción: síntesis de 2,2'-bis(gliciloximetil)propionato de bencilo
BnOOC-[bisMPA,G1]-(OH)₂.

Reacción de protección del grupo carbonilo del bis-MPA mediante un grupo bencilo.

Esquema:



Procedimiento:

Disolver bis-MPA (adquirido comercialmente) (20,00g, 149,1 mmol, 1 eq.) en DMF (100 mL) y añadir KOH (10,20g, 179mmol, 1.20 eq.). Mantener la mezcla en agitación durante 1 hora a 100 °C, conectando un reflujo de agua. Adicionar bromuro de bencilo (26,55 mL, 223,7 mmol, 1,50 eq.) gota a gota. La reacción se deja transcurrir durante toda la noche, manteniendo la temperatura de 100 °C.

Al día siguiente aparece un precipitado que se debe eliminar mediante filtración a vacío con placa filtrante. A continuación, añadir 450 mL de agua y realizar 3 extracciones con 200 mL de AcOEt cada una. Después, efectuar otras 3 extracciones con 150 mL de brine cada una. Se ha de guardar la fase orgánica en todos los procesos de extracción. Secar la fase orgánica obtenida utilizando MgSO₄ y evaporar disolventes en el rotavapor hasta obtener un aceite amarillo.

Recristalizar el compuesto añadiendo tolueno (50 mL) caliente y dejar que se enfríe a temperatura ambiente. Se obtiene un precipitado blanco que se recupera mediante filtración a vacío.

Caracterización:

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.08 (s, 3H, H-8), 2.87 (bs, -OH), 3.75 (d, J=11.3 Hz, 2H, H-9), 3.92 (d, J=11.3 Hz, 2H, H-9'), 5.21 (s, 2H, H-5), 7.36 (m, 5H, H-1, H-2, H-3).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 17.24 (C-8), 49.37 (C-7), 66.84 (C-5), 68.53 (C-9), 128.00 (C-3), 128.46 (C-1), 128.78 (C-2), 135.78 (C-4), 175.88 (C-6).

MS (ESI+) *m/z* (%): Encontrada: 226.1 (31), 247.0 (66) Calculada para [C₁₂H₁₆O₄,H]⁺
225.11 [C₁₂H₁₆O₄,Na]⁺ 247.09.

FTIR (ν_{max}/cm⁻¹, ATR): 3352 (O-H st), 2943-2885 (C-H st y ar), 1703 (C=O st).

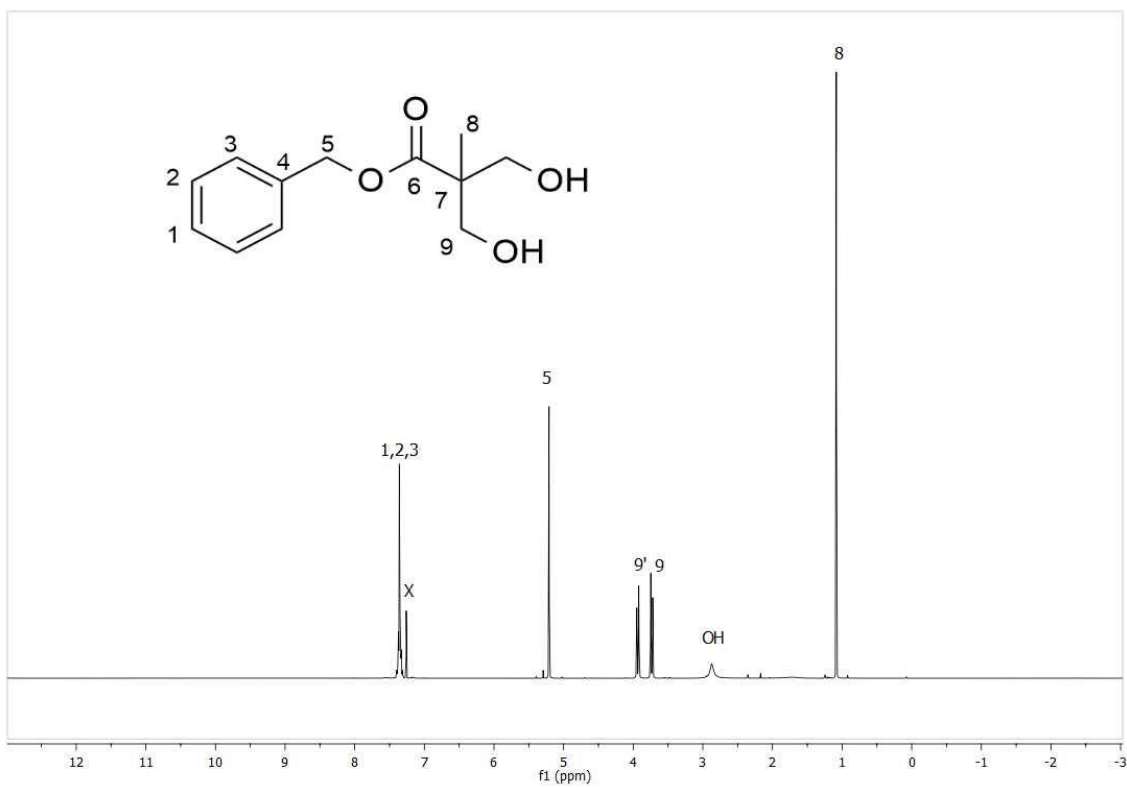


Figura A1.1: espectro H^1 RMN del compuesto $\text{BnOOC-}[\text{bisMPA,G1}]-(\text{OH})_2$.

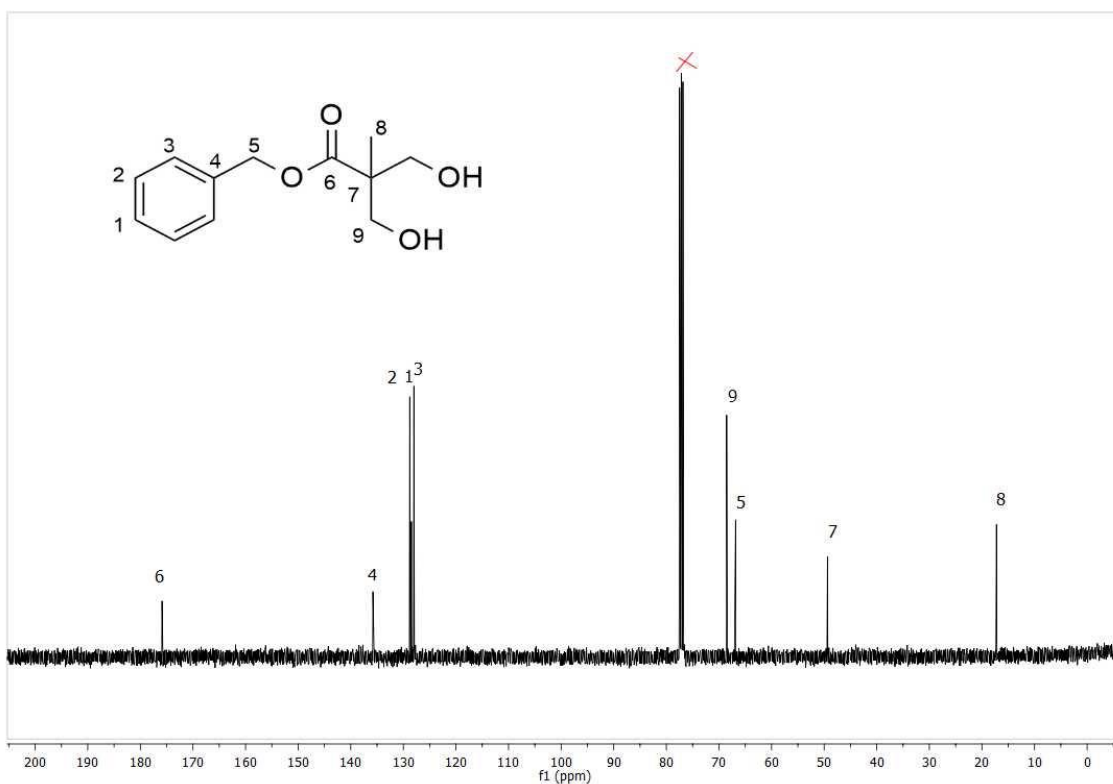


Figura A1.2: espectro C^{13} RMN del compuesto $\text{BnOOC-}[\text{bisMPA,G1}]-(\text{OH})_2$.

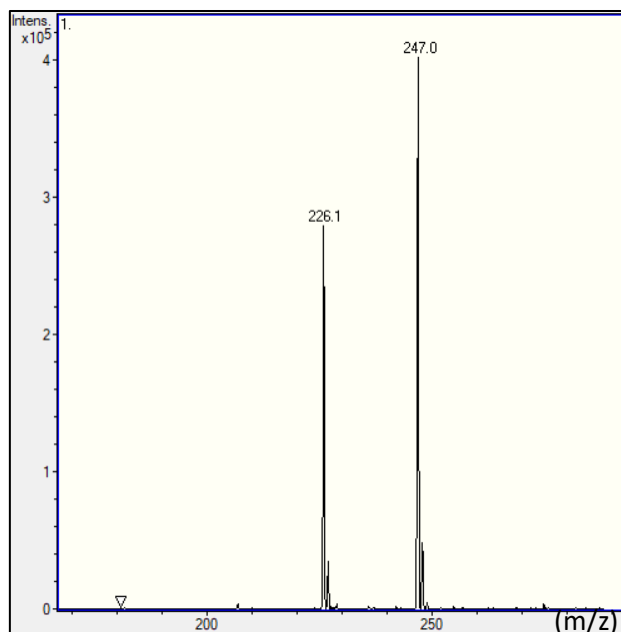


Figura A1.3: espectro de masas (ESI⁺) del compuesto BnOOC-[bisMPA,G1]-(OH)₂.

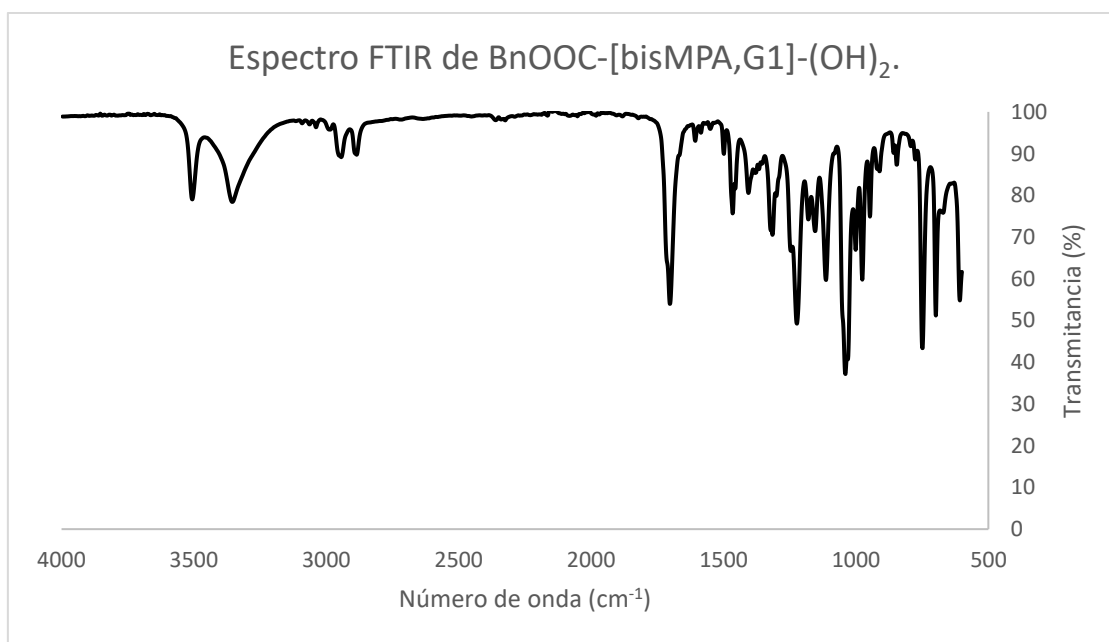
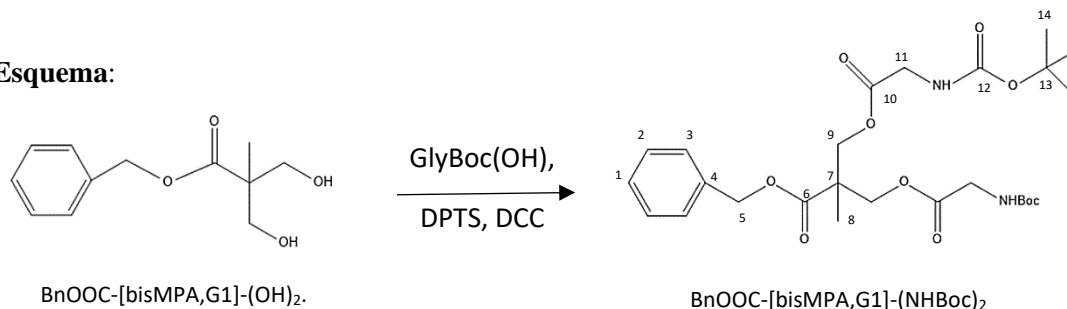


Figura A1.4: espectro FTIR del compuesto BnOOC-[bisMPA,G1]-(OH)₂.

Descripción de la reacción: síntesis de **BnOOC-[bisMPA,G1]-(NH₂Boc)₂**. Adición del grupo GlyBoc mediante esterificación de Steglich

Esquema:



Procedimiento:

Disolver BnOOC-[bisMPA,G1]-(OH)₂ (10,00 g, 44.62 mmol, 1 eq.) en DCM seco (230 mL) y posteriormente añadir Glyboc(OH) (19,54 g, 111,56 mmol, 2,50 eq.) y DPTS (10,51 g, 35,70 mmol, 0,80 eq.). Mantener la mezcla de reacción en agitación, bajo atmósfera de argón y enfriar a 0 °C. Adicionar la DCC (22,99 g, 111,56 mmol, 2,50 eq.) previamente disuelta en DCM seco (70 mL) gota a gota. Conectar de nuevo la atmósfera de argón y dejar transcurrir la reacción a temperatura ambiente durante toda la noche.

Aparece un precipitado blanco, N,N'-diciclohexilurea (DCU), que se elimina por filtración en placa filtrante. Eliminar el disolvente por evaporación a vacío. Precipitar la DCU restante mediante una mezcla de hexano:AcOEt (10:2) (240 mL) y filtrar de nuevo. Evaporar los disolventes en el rotavapor y purificar el compuesto mediante una columna de sílica gel (hexano:AcOEt = 8:2), para obtener un aceite incoloro.

Caracterización:

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.26 (s, 3H, H-8), 1.44 (s, 18 H, H-14), 3.79 (d, J = 9.3Hz, 4H, H-11), 4.31 (ABq, J = 11.1 Hz, Δ_{vAB} = 25.6Hz, 4H, H-9), 5.00 (bs, -NH), 5.16 (s, 2H, H-5), 7.36 (m, 5H, H-1, H-2, H-3).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 17.9 (C-8), 28.43 (C-14), 42.32 (C-11), 46.44 (C-7), 65.92 (C-9), 67.14 (C-5), 80.22 (C-13), 128.48 (C-3), 128.65 (C-1), 128.78 (C-2), 135.57 (C-4), 155.84 (C-12), 169.9 (C-10), 172.1 (C-6).

MS (ESI⁺) m/z (%): Encontrada 561.4 (68). Calculada para [C₂₆H₃₈N₂O₁₀,Na]⁺ 561.24

FTIR (ν_{max}/cm⁻¹, ATR): 3371 (N-H st), 2970-2935 (C-H st y C-H_{ar} st), 1724 (C=O st éster), 1710 (C=O st carbamato), 1519 (N-H δ), 1456 (CH₂, CH₃ δ) 1367 (C-N st), 1251 (CO-O st), 1155 (N-CO-O st), 1135 (O-C-C st)

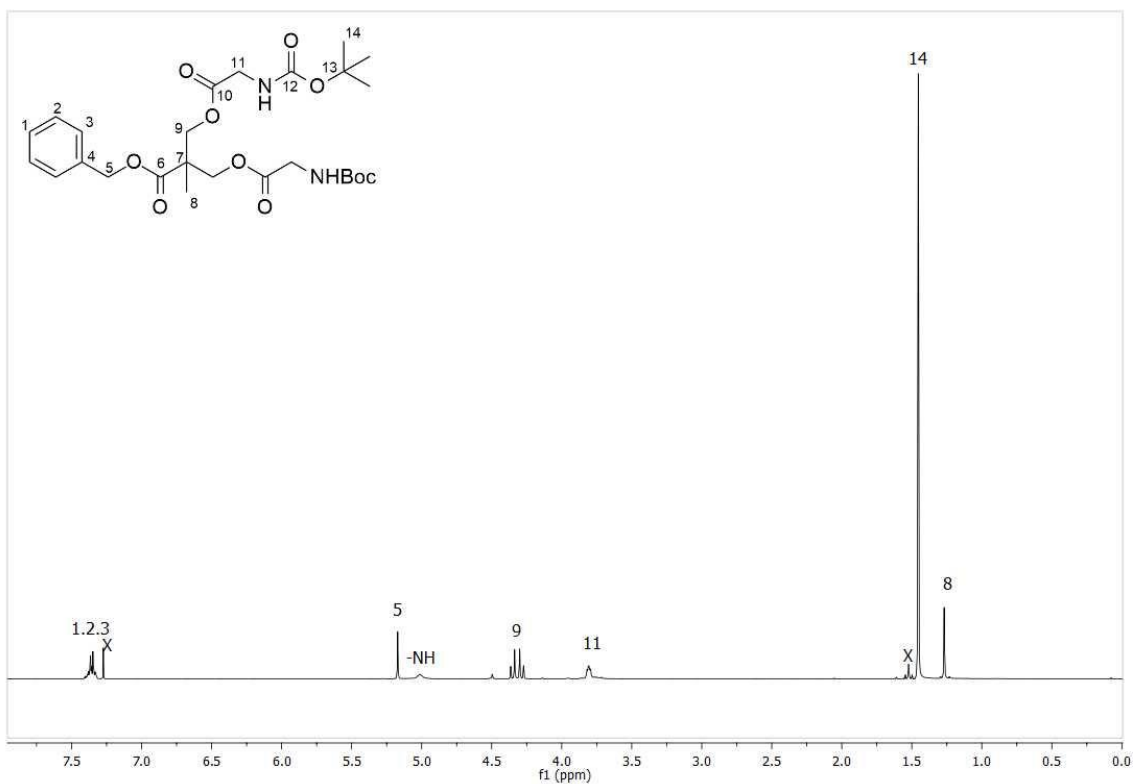


Figura A1.5: espectro ¹H RMN del compuesto BnOOC-[bisMPA,G1]-(NHBOC)₂

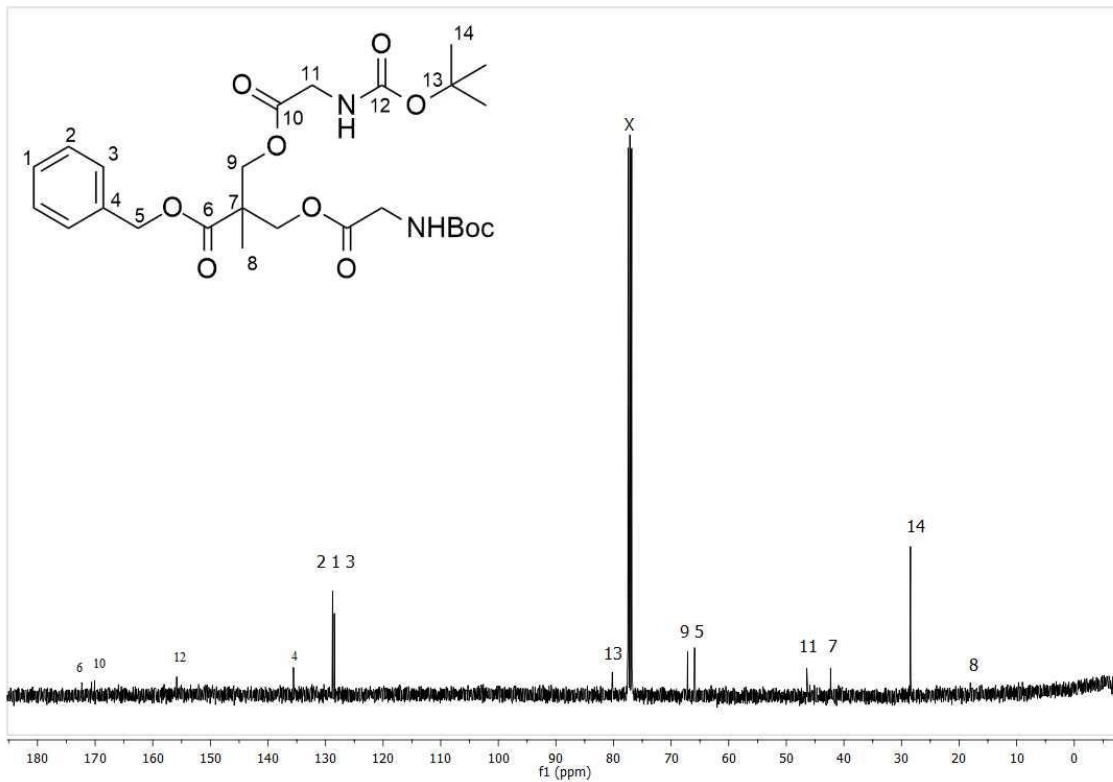


Figura A1.6: espectro ¹³C RMN del compuesto BnOOC-[bisMPA,G1]-(NHBOC)₂

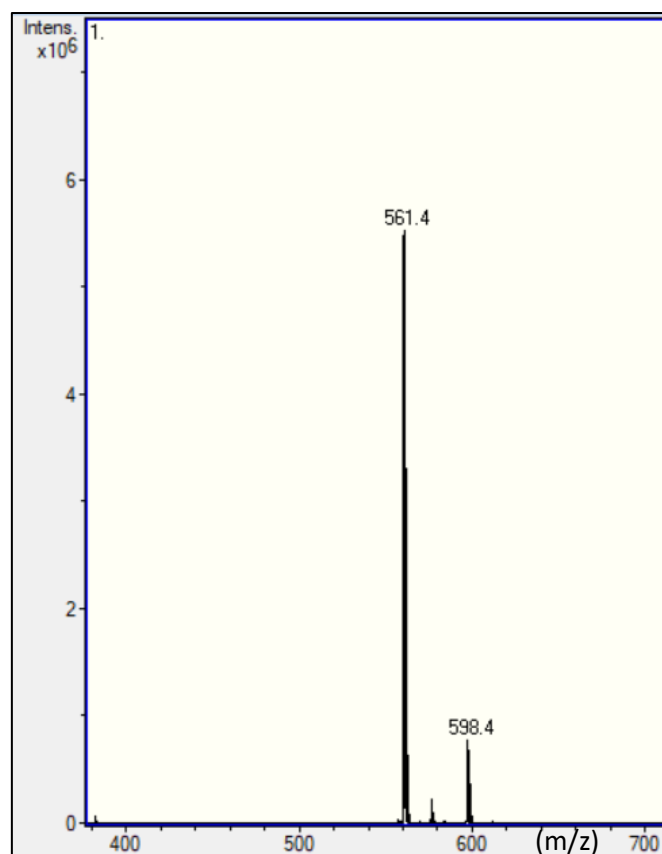


Figura A1.7: espectro de masas (ESI⁺) del compuesto BnOOC-[bisMPA,G1]-(NHBoc)₂

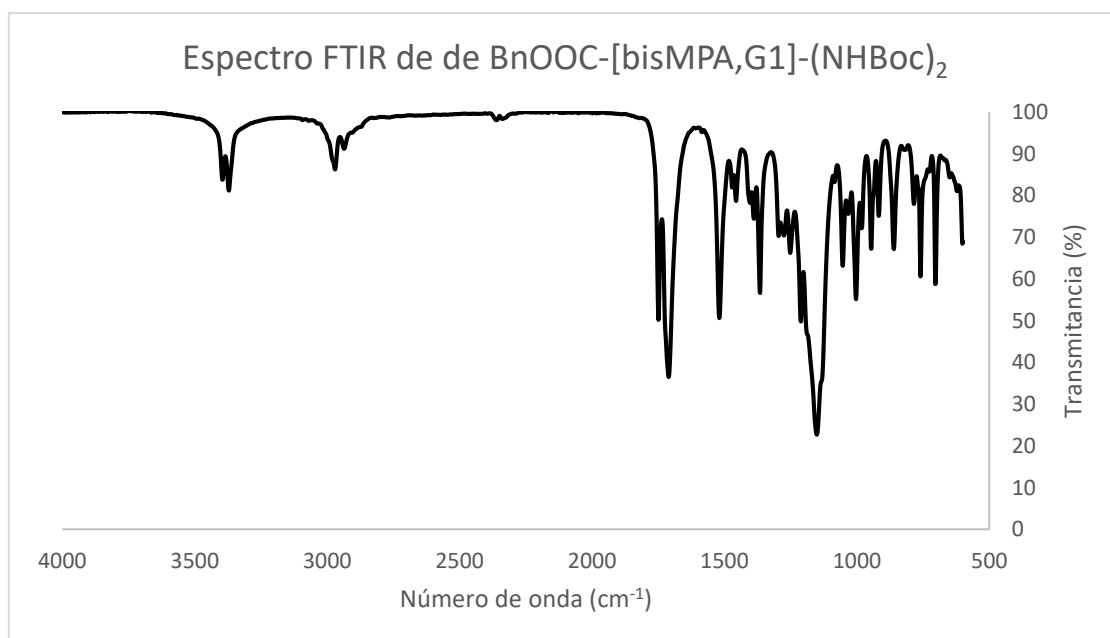
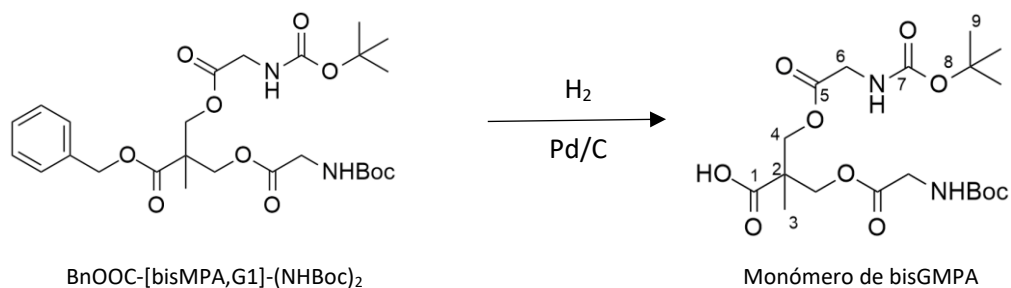


Figura A1.8: espectro FTIR del compuesto BnOOC-[bisMPA,G1]-(NHBoc)₂

Descripción de la reacción: obtención del monómero de bis-GMPA protegido por el grupo t-Boc (**monómero de bis-GMPA**).

Reacción de escisión del grupo bencilo por hidrogenación.

Esquema:



Procedimiento:

Disolver el BnOOC-[bis(MPA,G1)]-(NH-Boc)₂ (18g, 33.4 mmol, 1eq.) en 161 mL de AcOEt y añadir el catalizador Pd/C (0.9g, 0.05 eq. en peso). Hacer 3 ciclos de argón-vacío y posteriormente, hacer otros 3 ciclos de vacío-H₂. Dejar la reacción transcurrir durante 24 horas. Purificar el compuesto por filtración en columna de Celite.

Caracterización:

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.27 (s, 3H,H-3), 1.44 (s, 18H, H-9), 3.89 (d, J= 5.6 Hz, 4H, H-6), 4.29 (ABq, J=11.2 Hz Δ_v_{AB}=30.8 Hz, 4H, H-4), 5.23(bs, -NH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.26 (C-5), 80.40 (C-8), 65.93 (C-4), 46.11 (C-2), 42.42 (C-6), 28.43 (C-9), 14.32 (C-3).

** Las señales del C-1 y el C-7 no aparecen, probablemente debido a que la duración del experimento es corta, lo que da una resolución muy limitada.**

MS (ESI+) m/z (%): Encontrada 471.24 (100) Calculada para [C₁₉H₃₂N₂O₁₀,Na]⁺ 471.19

FTIR (ν_{max}/cm⁻¹, ATR): 3361 (N-H st), 2977-2935 (C-H st), 1739 (C=O st éster), 1693 (C=O st carbamato), 1515 (N-H δ), 1456 (CH₂,CH₃ δ), 1367 (C-N st), 1245 (CO-O st), 1151 (N-CO-O st)

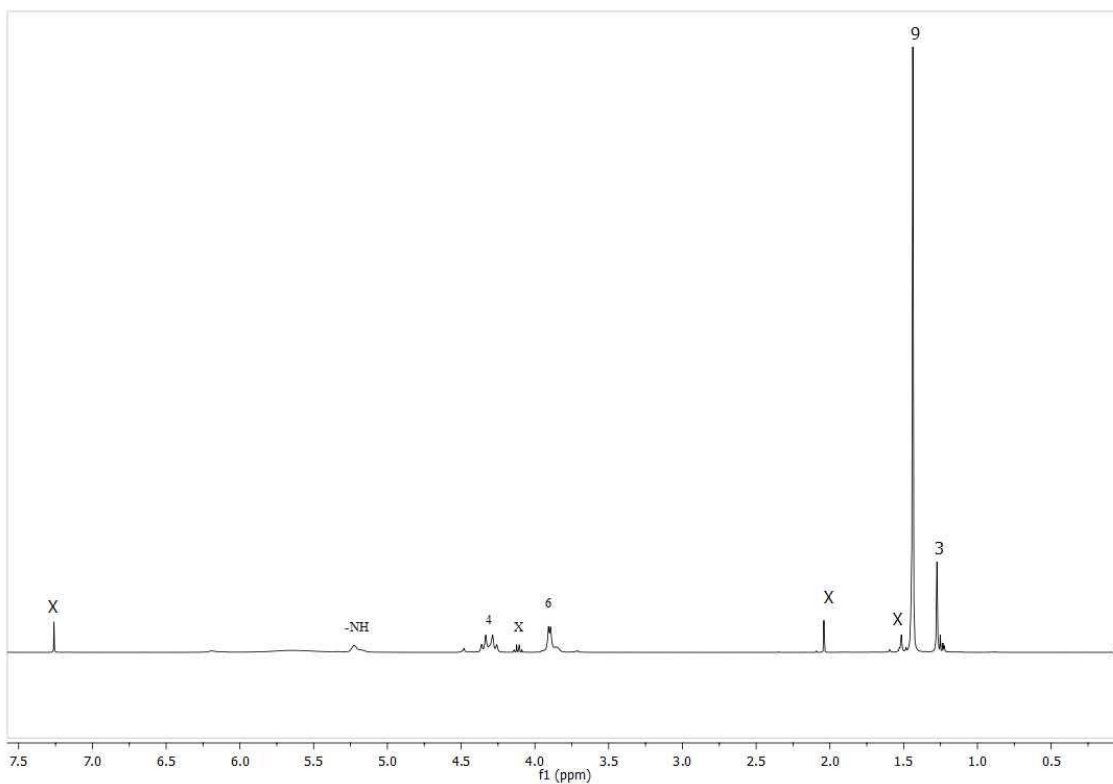


Figura A1.9: espectro H^1 RMN del monómero de bis-GMPA

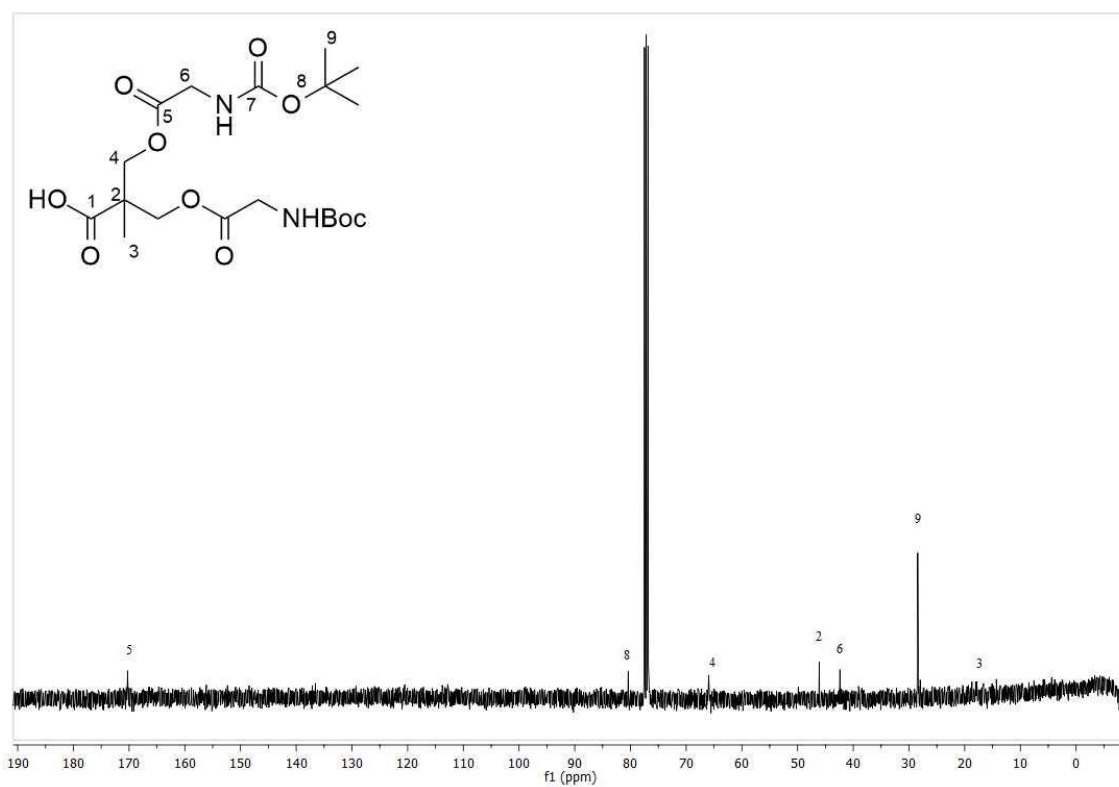


Figura A1.10: espectro C^{13} RMN del monómero de bis-GMPA

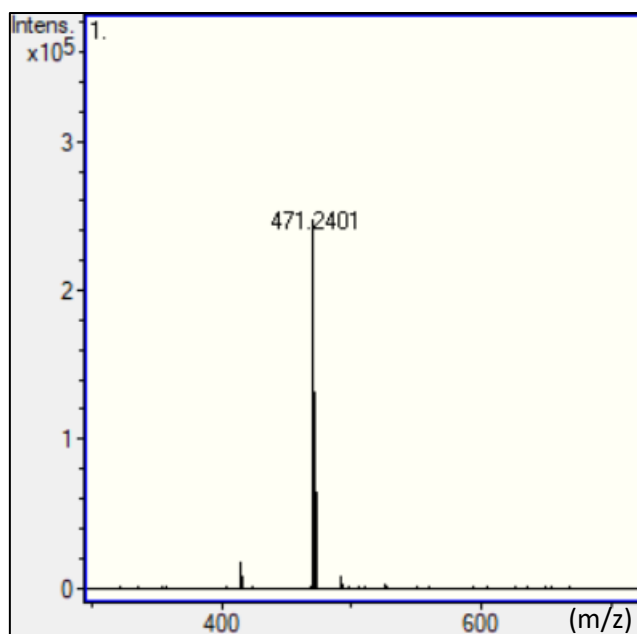


Figura A1.11: espectro de masas (ESI⁺) del monómero de bis-GMPA

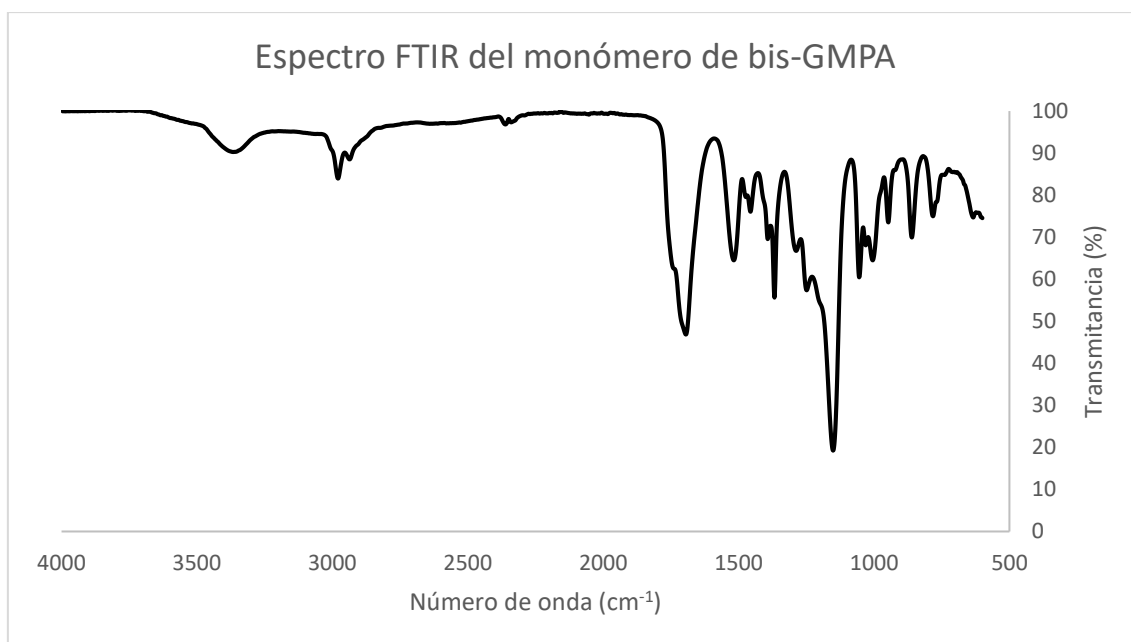
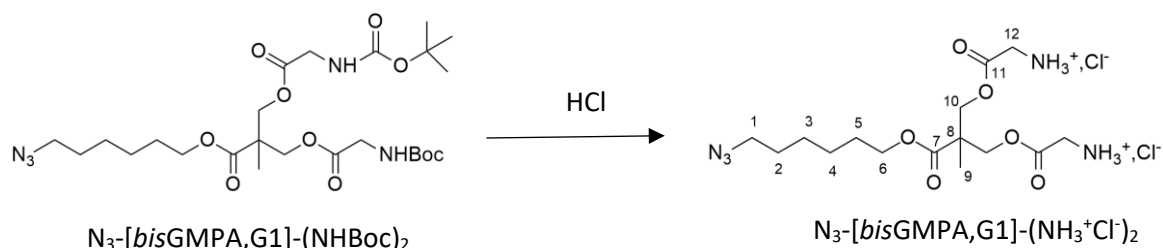


Figura A1.12: espectro FTIR del monómero de bis-GMPA

Descripción de la reacción: síntesis del compuesto N_3 -[bisGMPA,G1]-($NH_3^+Cl^-$)₂.

Reacción de desprotección en medio ácido mediante HCl.

Esquema:



Procedimiento:

Disolver el N_3 -[bisGMPA,G1]-(NHBoc)₂ (6 g, 10.46 mmol, 1.00 eq.) en AcOEt (19.8 mL) en un baño a 50°C. Añadir 19.8 mL de una disolución de HCl 3 M en AcOEt gota a gota. El avance de la reacción se ha de seguir mediante capa fina.

Aparece un precipitado. Para detener la reacción añadir 132 mL de AcOEt y dejar la reacción en agitación durante 30 minutos. Después, evaporar los vapores de HCl a vacío y el AcOEt. Realizar un lavado con AcOEt y evaporar el disolvente de nuevo hasta sequedad.

Caracterización:

RMN ¹H (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 1.32 (s, 3H, H-9), 1.43 (m, 4H, H-3 y H-4), 1.61 (m, 2H, H-2), 1.65 (m, 2H, H-5), 3.89 (s, 4H, H-12), 4.16 (t, J = 6.5 Hz, 2H, H-6), 4.45 (ABq, J=11.35 Hz, Δ_{VAB} = 2.06 Hz, 4H, H-10).

**La señal del H-1 (~ 3.2ppm) no aparece debido a que está solapada con la señal del disolvente (MeOD).*

RMN ¹³C (100 MHz, MeOD) δ (ppm): 17.99 (C-9), 26.53 (C-4), 27.39 (C-3), 29.40 (C-5), 29.77 (C-2), 40.96 (C-12), 47.49 (C-8), 52.35 (C-1), 66.59 (C-6), 67.78 (C-10), 168.29 (C-11), 173.64 (C-7).

MS (ESI+) m/z (%): Encontrada: 374.1779 (100) Calculada para $[C_{15}H_{27}N_5O_6,H]^+$ 374.2; $[C_{15}H_{27}N_5O_6,Na]^+$ 398.20

FTIR (ν_{max}/cm^{-1} , ATR): 3650-2516 (N-H⁺), 2933-2856-2711-2601 (C-H st), 2094 (N₃ st), 1739 (C=O st éster), 1606-1571 (N-H⁺ δ), 1500 (CH₂, CH₃ δ), 1419 (C-N st), 1224 (CO-O st), 1139 (O-C-C st).

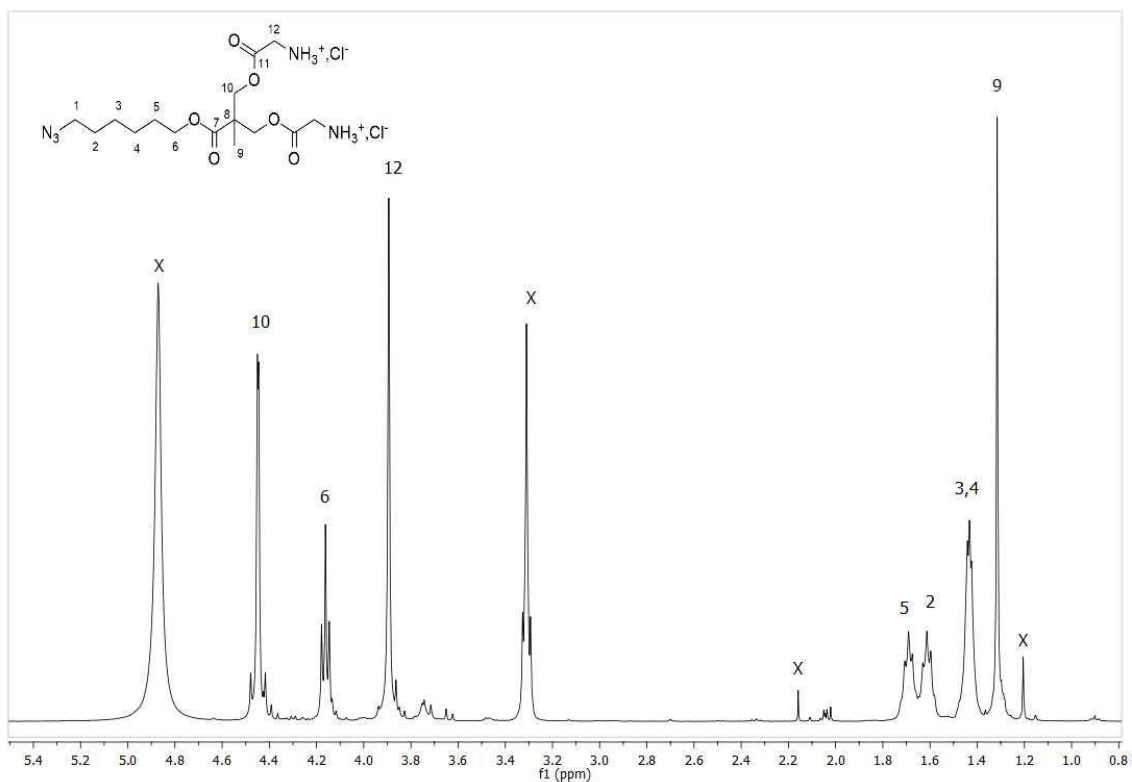


Figura A1.13: espectro H^1 RMN del compuesto N_3 -[bisGMPA,G1]-($NH_3^+Cl^-$)₂

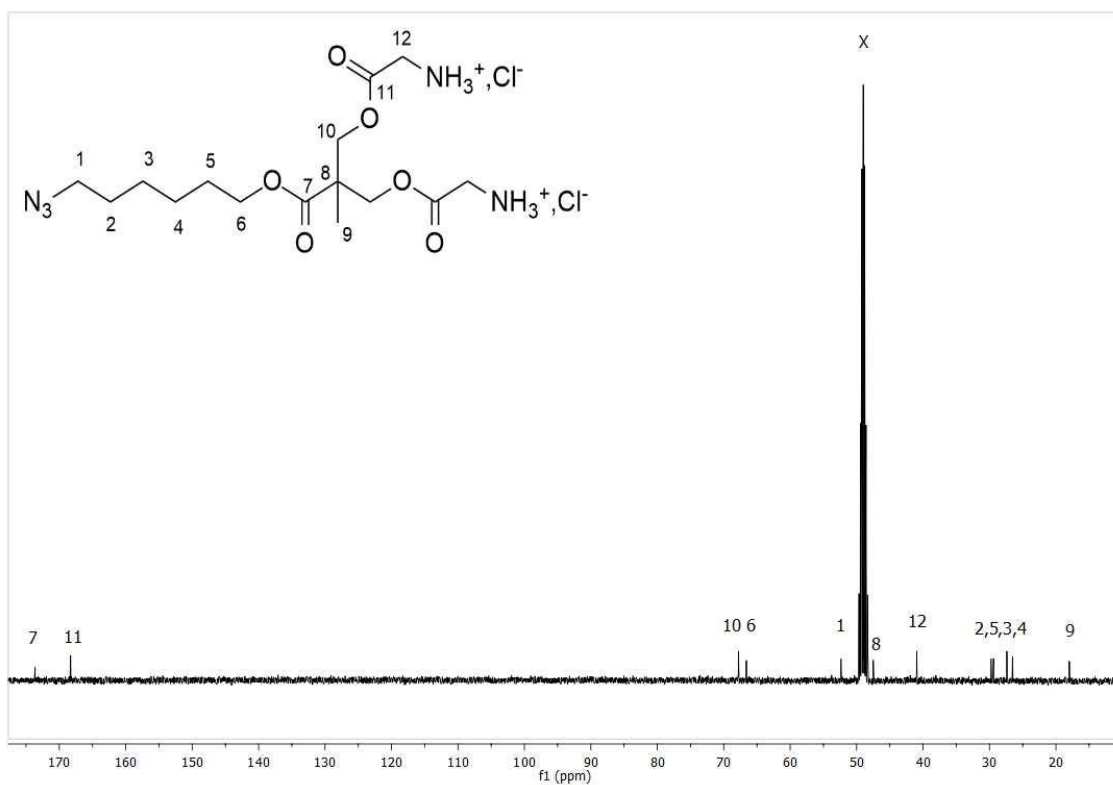


Figura A1.14: espectro C^{13} RMN del compuesto N_3 -[bisGMPA,G1]-($NH_3^+Cl^-$)₂

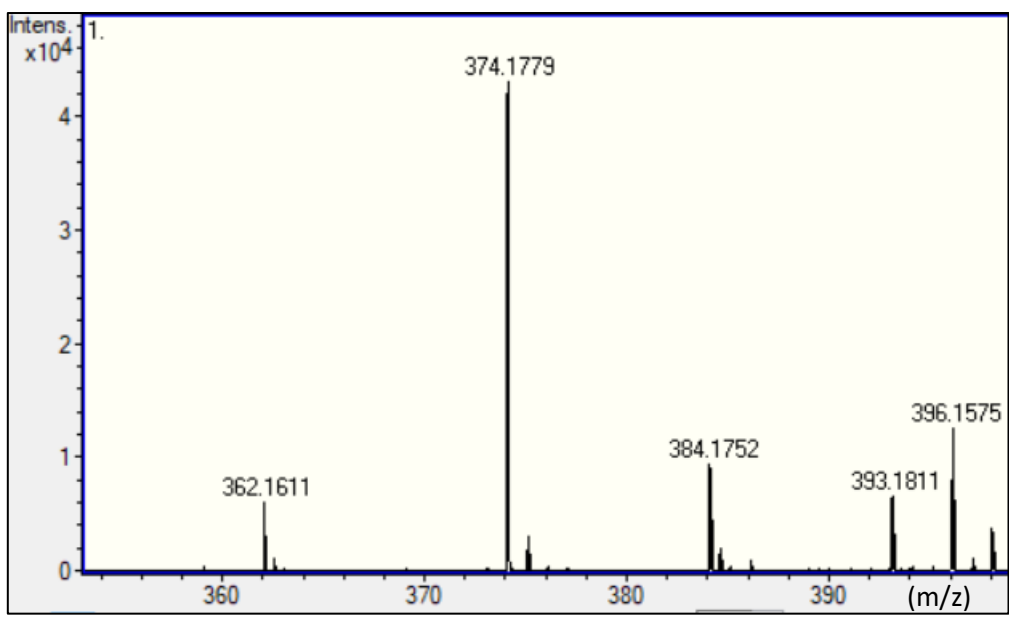


Figura A1.15: espectro de masas (ESI⁺) del compuesto N₃-[bisGMPA,G1]-(NH₃⁺Cl⁻)₂

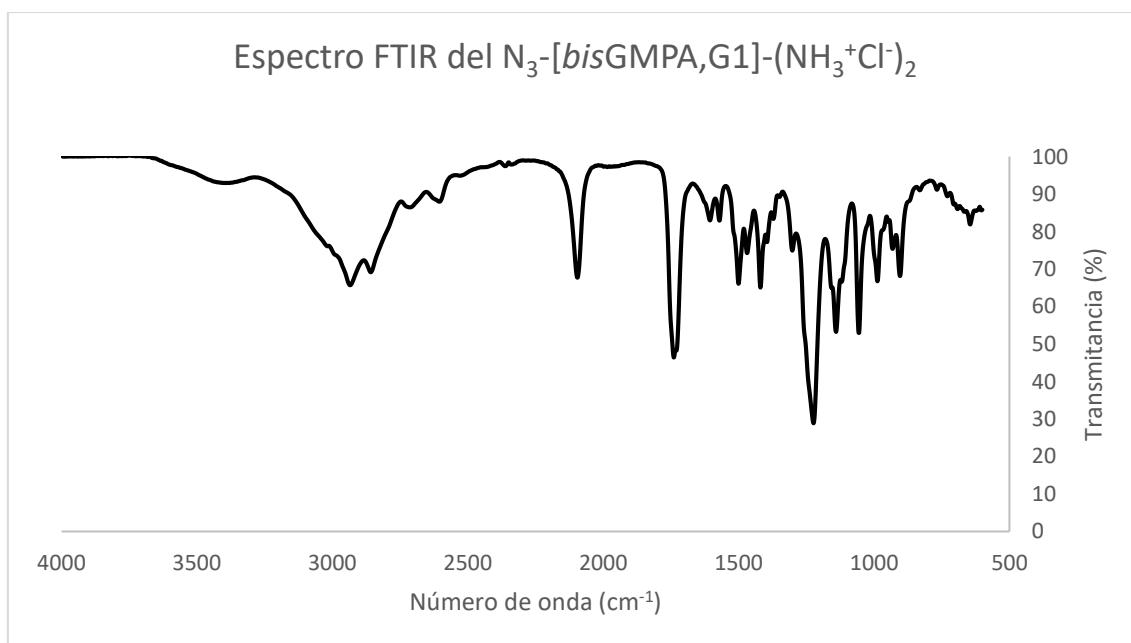
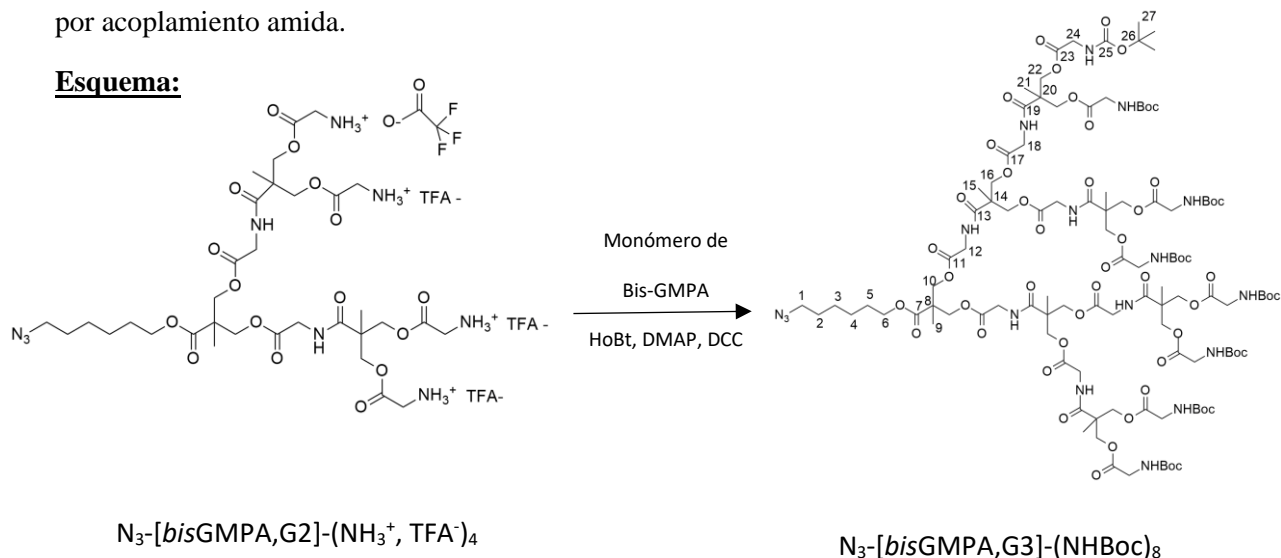


Figura A1.16: espectro FTIR del compuesto N₃-[bisGMPA,G1]-(NH₃⁺Cl⁻)₂

Descripción de la reacción: síntesis del compuesto N_3 -[bisGMPA,G1]-($NH_3^+Cl^-$)₂.

Aumento de la generación del compuesto (3^a) mediante la adición de monómero de bis-GMPA por acoplamiento amida.

Esquema:



Procedimiento:

Disolver el N_3 -[bisGMPA,G2]-(NH_3^+ , TFA⁻)₄ (4 g, 3.1 mmol, 1.00 eq.) en DMF seca (50 mL) y el monómero de bisGMPA en DCM seco (85 mL). Mezclar ambos compuestos y adicionar HoBt, nH₂O (2.84g, 18.6 mmol, 6 eq.) y DMAP (2.12 g, 17.36 mmol, 5.6 eq.). Conectar al matraz de reacción Ar durante 15 min y descender la temperatura a 0°C. Por último, añadir DCC disuelta en DCM seco (15 mL) y dejar transcurrir la reacción bajo atmósfera de Ar y a temperatura ambiente durante 3 días (seguir el avance de reacción por capa fina).

Aparece un precipitado blanco (DCU) que se ha de eliminar mediante filtración. Evaporar los disolventes en el rotavapor. Redisolver el compuesto en DCM y hacer 8 extracciones con brine (55mL x 8). Secar el compuesto mediante MgSO₄ anhidro y filtrar. Por último purificar en columna de silica gel DCM:MeOH (rampa de 98:2 a 95:5).

Caracterización:

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.25 (s, 6H, H-15), 1.27 (s, 3H, H-9), 1.28 (s, 12H, H-21), 1.44 (m, 76H, H-3, H-4 y H-27), 1.59 (m, 2H, H-2), 1.66 (m, 2H, H-5), 3.28 (t, 2H, H-1), 3.90 (d, 16H, H-24), 3.95 (d, 4H, H-12), 4.01 (d, 8H, H-18), 4.14 (t, 2H, H-6), [4.21-4.38] (m, 28H, H-10, H-16 y H-22), 5.42 (bs, -NHBoc), 7.19 (bs, -NHCO).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 17.78 (C-21), 18.0 (C-15), 18.3 (C-9), 25.3 (C-4), 26.2 (C-3), 28.47 (C-5 y C-27), 28.6 (C-2), 42.49(C-12 y C-18), 46.05 (C-8 y C-14), 46.22 (C-20), 51.45 (C-1), 66.63 (C-6, C-10 y C-16), 80.22 (C-26), 156.18 (C-25), 169.71 (C-11, C-17 y C-23).

* A pesar de programar un experimento de ~4horas algunos carbonos no se han detectado, lo que no quiere decir que no se encuentren en la estructura, ya que por H¹-RMN se detectan sus protones. (C-7, C-13, C-19 y C-24)

MS (MALDI-TOF) m/z (%): Encontrada: 2577.4(100). Calculada para [C₁₀₉H₁₇₅N₁₇O₅₂,Na]⁺ 2577,15

FTIR ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$, ATR): ($\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$, ATR): 3352 (N-H st), 2977-2927-2854 (C-H st), 2096 (N₃ st), 1747 (C=O st éster), 1695 (C=O st carbamato), 1656 (C=O st amida), 1521 (N-H δ), 1458 (CH₂,CH₃ δ), 1365 (C-N st), 1247 (CO-O st), 1149 (N-CO-O st).

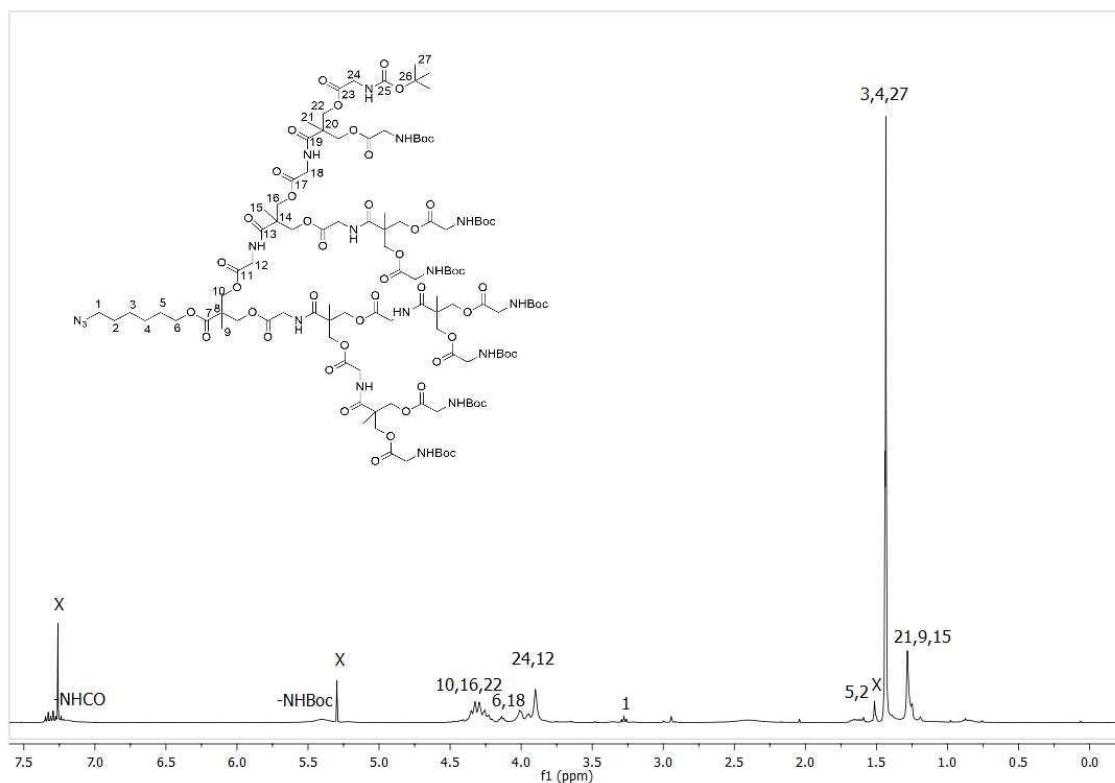


Figura A1.17: espectro H¹ RMN del compuesto N₃-[bisGMPA,G3]-(NHBOC)₈

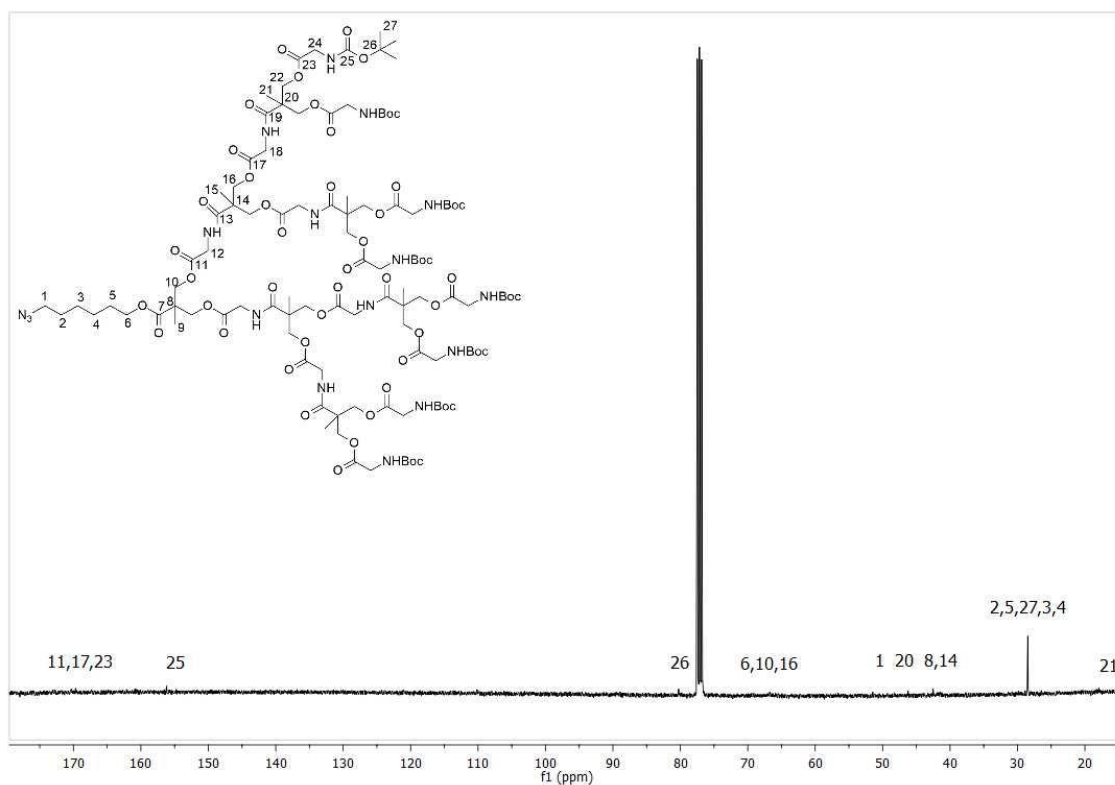


Figura A1.18 : espectro C¹³ RMN del compuesto N₃-[bisGMPA,G3]-(NHBOC)₈

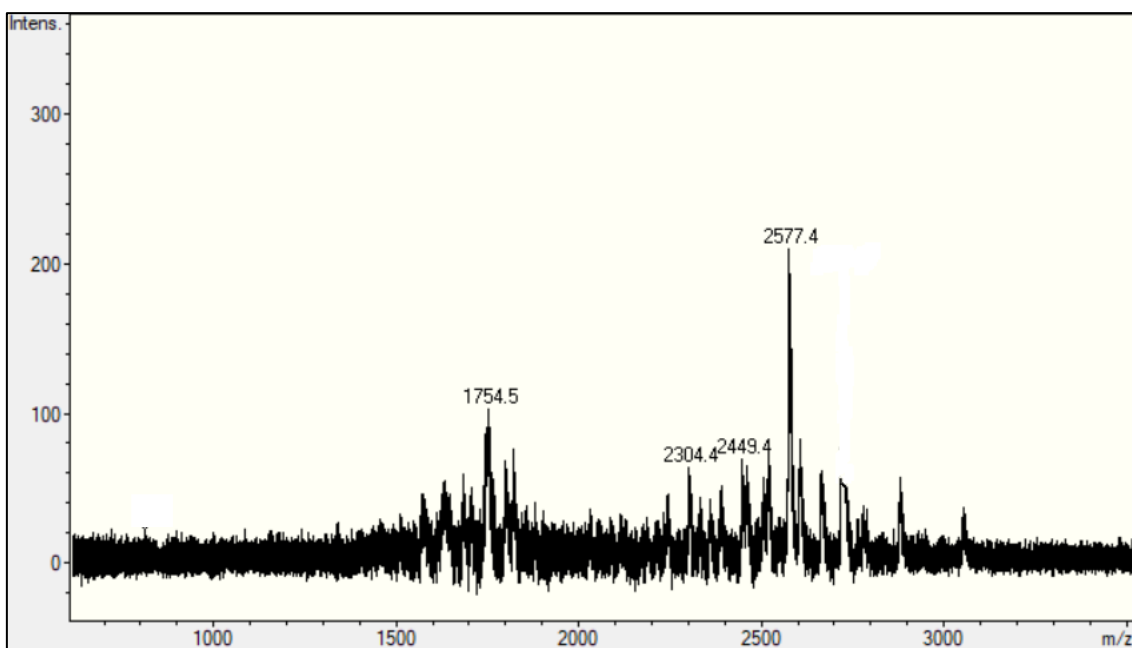


Figura A1.19 : espectro de masas (MALDI-TOF) del compuesto N_3 -[bisGMPA,G3]-(NHBOc)₈

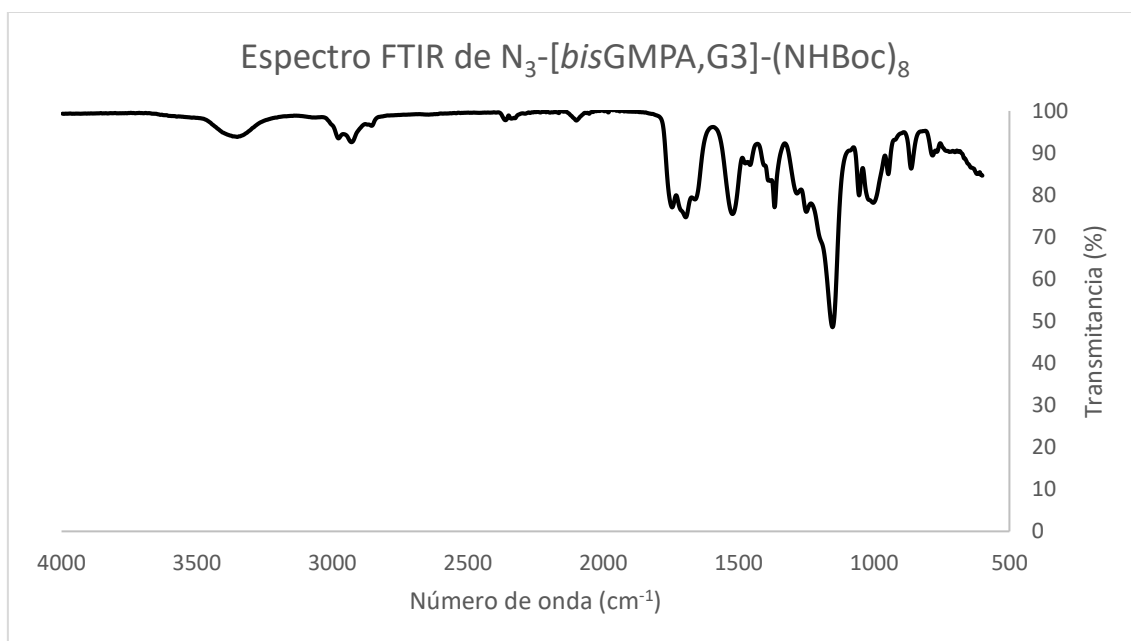
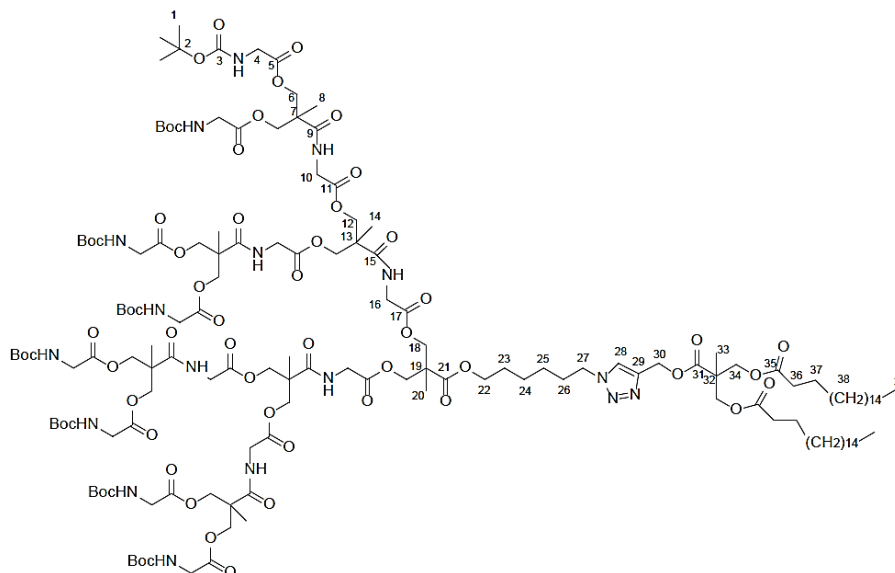


Figura A1.20: espectro FTIR del compuesto N_3 -[bisGMPA,G3]-(NHBOc)₈

Descripción de la reacción: síntesis del compuesto $(C_{17})_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3]$ (NHBoc) $_8$

Síntesis del dendrímero tipo Jano mediante la unión del dendrímero hidrófilo (NHBoc) $_8[bisGMPA,G3]$ y el dendrímero hidrófobo $[bisMPA,G1](C_{17})_2$ por cicloadición azida-alcano catalizada por Cu(I) (química click).

Esquema:



$(C_{17})_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3]$ (NHBoc) $_8$

Procedimiento:

Agregar los compuestos TBTA (12.45 mg, 0.024 mmol, 0.1 eq.), (L)-ascorbato (9.3mg, 0.047 mmol, 0.2 eq.) y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (6.92 mg, 0,024 mmol, 0.1 eq.) a un tubo Schlenk y disolver en 3 mL de DMF. Hacer 3 ciclos de vacío-argón para eliminar el O_2 . Dejar la reacción a 45 °C durante aproximadamente 30 min (hasta observar cambio de color).

Disolver el dendrón $N_3-[bisGMPA,G3]-(NHBoc)_8$ (500 mg, 0.196 mmol, 1 eq.) y el $[bisMPA,G1](C_{17})_2$ (165.57 mg, 0.235 mmol, 1.2 eq.) en 7 mL de DMF en otro tubo Schlenk. Realizar, como anteriormente, 3 ciclos de vacío-Ar y calentar a 45 °C. Canular la solución de cobre al segundo tubo Schlenk por presión de Ar. Dejar la reacción a 45 °C durante 5 días (comprobar por capa fina).

Añadir 70 mL de AcoEt a la reacción para extraerla a un embudo de decantación y agregar 100 ml de brine. Realizar una nueva extracción con otros 70 mL de AcoEt. Lavar la fase orgánica 3 veces con brine (3x100 mL). Posteriormente, lavar la fase orgánica una vez con una disolución de KCN (15 mg en 100 mL de agua) y realizar otros dos lavados con brine (2x100 mL). Secar la fase orgánica con $MgSO_4$ y evaporar disolventes a vacío. Finalmente, purificar en columna de silica gel DCM:MeOH (rampa de 100% DCM a 9:1).

Caracterización:

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 0.87 (t, 6H, H-39), 1.21 (s, 3H, H-33), 1.24 (m, 65H, H-14, H-20 y H-38), 1.27 (s, 12H, H-8), 1.37 (m, 4-H, H-24 y H-25), 1.43 (s, 72H, H-1), 1.51 (m, 8H, H-37), 1.62 (m, 2H, H-22), 1.93 (m, 2H, H-26), 2.25 (t, 4H, H-36), 3.91 (d, 16H, H-4), 3.95 (d, 4H, H-16), 4.01 (d, 8H, H-10), 4.12 (t, 2H, H-22), 4.19 (ABq, 4H, H-34), [4.21-4.37] (m, 30H, H-6, H-12, H-18 y H-27), 5.24 (s, 2H, H-30), 5.42 (bs, -NHBoc), 7.20 (bs, -NHCO), 7.61 (s, 1H, H-28).

SEC (ref PMMA): Peso molecular: 4261. Polidispersidad: 1.05. Calculado para $[\text{C}_{153}\text{H}_{255}\text{N}_{17}\text{O}_{58}]$: 3258.75

FTIR ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$, ATR): ($\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$, ATR): 3355 (N-H st), 2975-2923-2852 (C-H st), 1743 (C=O stéster), 1699 (C=O st carbamato), 1658 (C=O st amida), 1521 (N-H δ), 1458 (CH_2 , CH_3 δ), 1365 (C-N st), 1247 (CO-O st), 1155 (N-CO-O st).

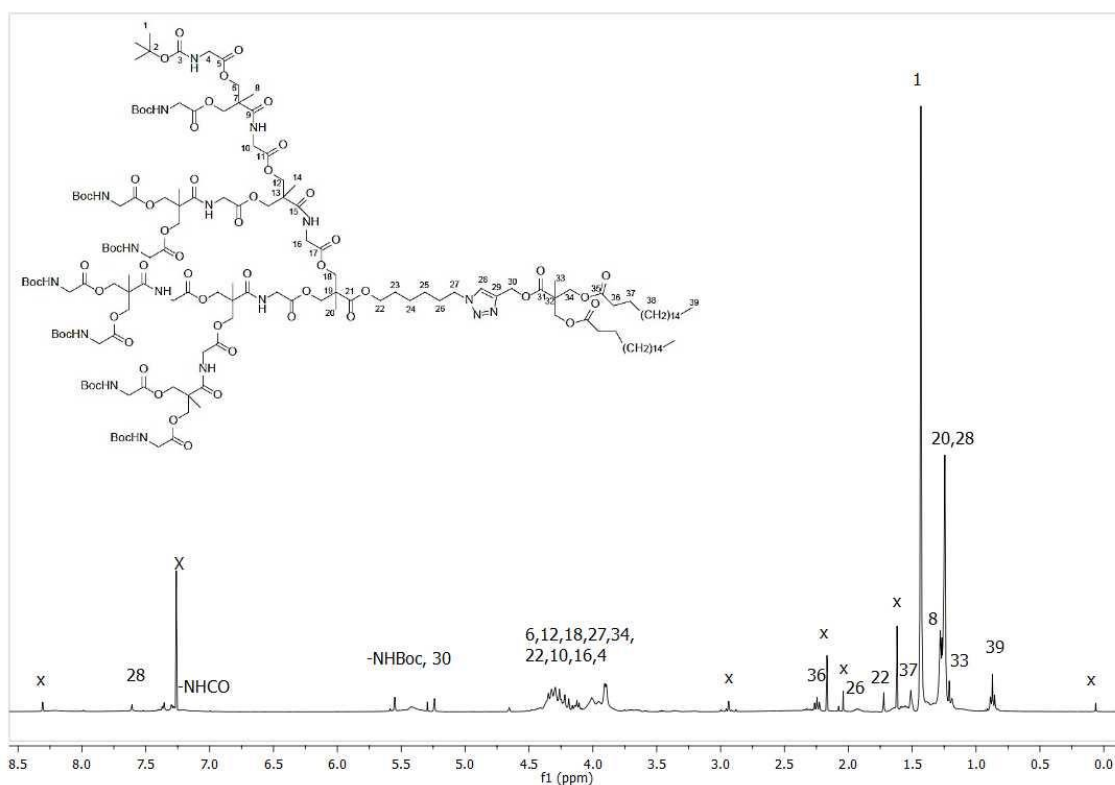


Figura A1.21: espectro ^1H RMN del compuesto $(\text{C}_{17})_2[\text{bisMPA,G1}]-[\text{bisGMPA,G3}](\text{NHBoc})_8$

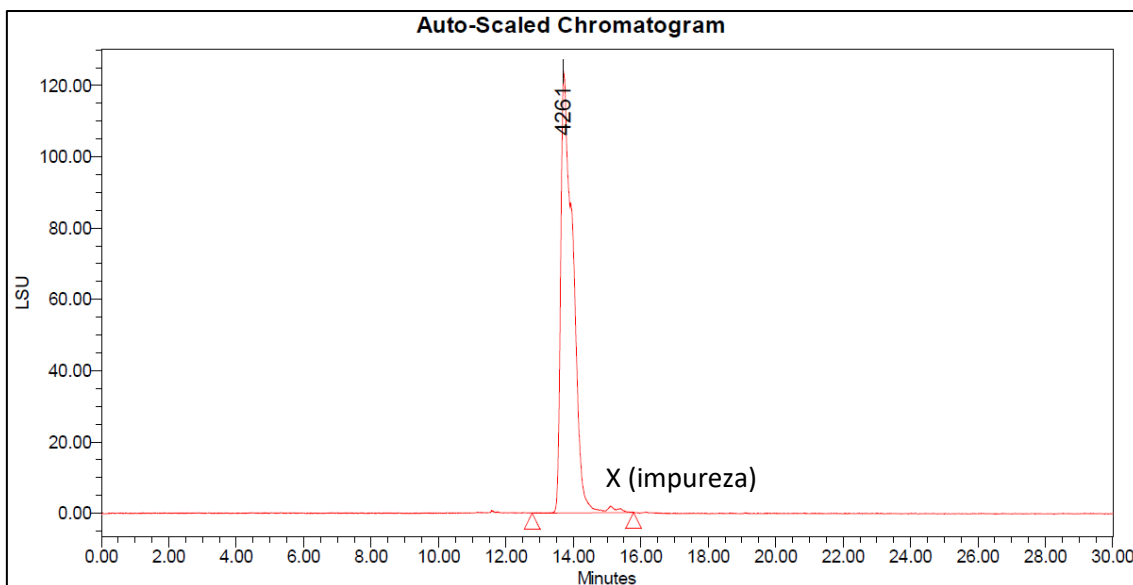


Figura A1.22: Resultado de SEC del compuesto $(C_{17})_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NHBoc)_8$

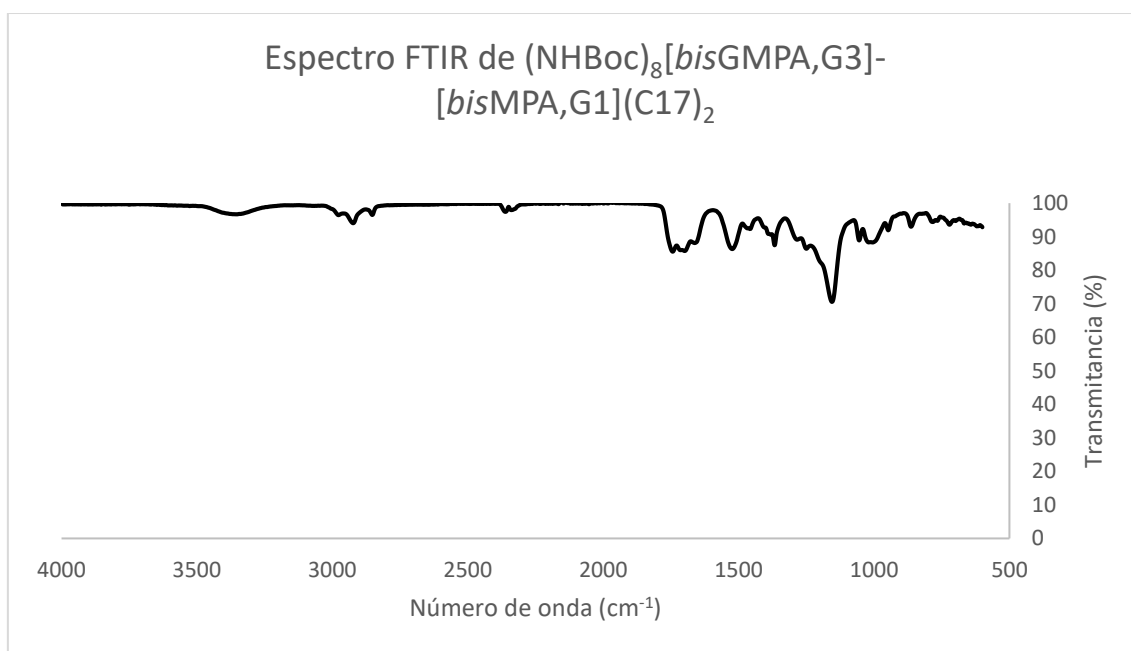
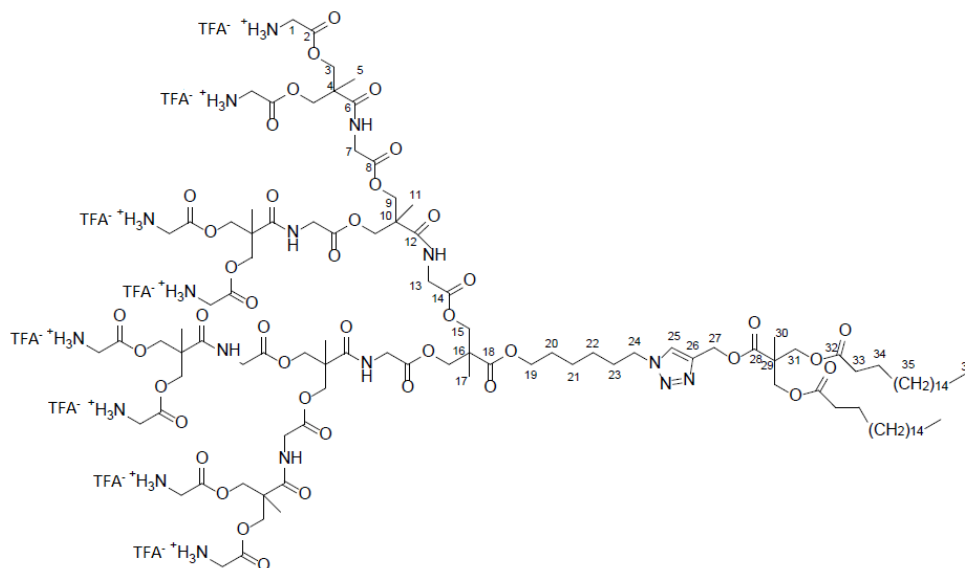


Figura A1.23 : espectro FTIR del compuesto $(NHBoc)_8[bisGMPA,G3]-[bisMPA,G1](C_{17})_2$

Descripción de la reacción: síntesis del compuesto $(C_{17})_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3] (NH_3^+TFA^-)_8$

Reacción de desprotección de los grupos $-NH_3^+$ terminales por escisión del grupo t-Boc mediante ácido trifluoroacético (TFA).

Esquema:



Procedimiento:

Disolver $(NHBoc)_8[bisGMPA,G3]-[bisMPA,G1](C_{17})_2$ (492.5 mg, 0.15 mmol, 1 eq.) en 1 mL de una mezcla de cloroformo y ácido trifluoroacético (1:1). Determinar el avance de reacción por cromatografía en capa fina. Eliminar los disolventes y el ácido por evaporación a vacío.

Redisolver el producto en 1.7 mL de MeOH y precipitar sobre dietiléter frío (170 mL) (relación disolvente:dietiléter 1:100). Dejar la precipitación en el congelador durante toda la noche ($-16^\circ C$). Aparece un precipitado blanco que se separa mediante centrifugación (5min a 3500 rpm.).

Masa obtenida: 316.89 mg

Caracterización:

RMN 1H (400 MHz, MeOD) δ (ppm): 0.90 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H, H-36), 1.25 (s, 3H, H-30), 1.27 (s, 3H, H-17), 1.29 (m, 56H, H-35), 1.31 (s, 6H, H-11), 1.36 (s, 12H, H-5), 1.45 (m, 4H, H-21 y H-22), 1.53 (m, 4H, H-34), 1.66 (m, 2H, H-20), 1.94 (m, 2H, H-23), 2.26 (t, 4H, H-33), 3.84 (s, 16H, H-1), 3.91 (s, 4H, H-13), 4.01 (s, 8H, H-7), 4.13 (t, 2H, H-19), 4.19 (ABq, 4H, H-31), 4.31 (m, 12H, H-9 y H-15), 4.43 (m, 18H, H-3 y H-24), 5.25 (s, 2H, H-27), 8.04 (s, 1H, H-25).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 14.47 (C-36), [17.61-18.16] (C-5, C-11, C-17 y C-30), 23.74 (C-35), 26.0 (C-34), 26.4 (C-21), 28.68 (C-22), 29.39 (C-20), [30.16-30.79] (C-35), 31.1 (C-23), 33.09 (C-35), 34.81 (C-33), 40.85 (C-1), 42.22 (C-7 y C-13), [47.4-47.6] (C-4, C-10, C-16 y C-29), 50.07 (C-24), [66.20-66.42] (C-19 y C-31), 67.57 (C-15), 67.8 (C-9), 168.3 (C-2), [170.98-171.25] (C-8 y C-14), [174.0-174.1] (C-18 y C-28), [174.6-175.2] (C-6, C-12 y C-32).

*A pesar de que se ha programado un experimento de larga duración (~4 horas) los carbonos C-3, C-25, C-26 y C-27 no se han encontrado.

MS (MALDI-TOF) m/z (%): Encontrada: 2459,6(100), 2481.6 (42.1). Calculada para $[C_{113}H_{191}N_{17}O_{42},H]^+$ 2459.3 ; $[C_{113}H_{191}N_{17}O_{42},Na]^+$ 2481.3

FTIR (ν_{max}/cm^{-1} , ATR): (3600-2570 (bs N-H⁺ st), 2919-2852 (C-H st), 1751 (C=O st éster), 1666 (C=O st amida y N-H⁺ δ), 1535 (N-H δ), 1432 (CH₂, CH₃ δ), 1295 (CO-O st), 1130 (N-CO-O st).

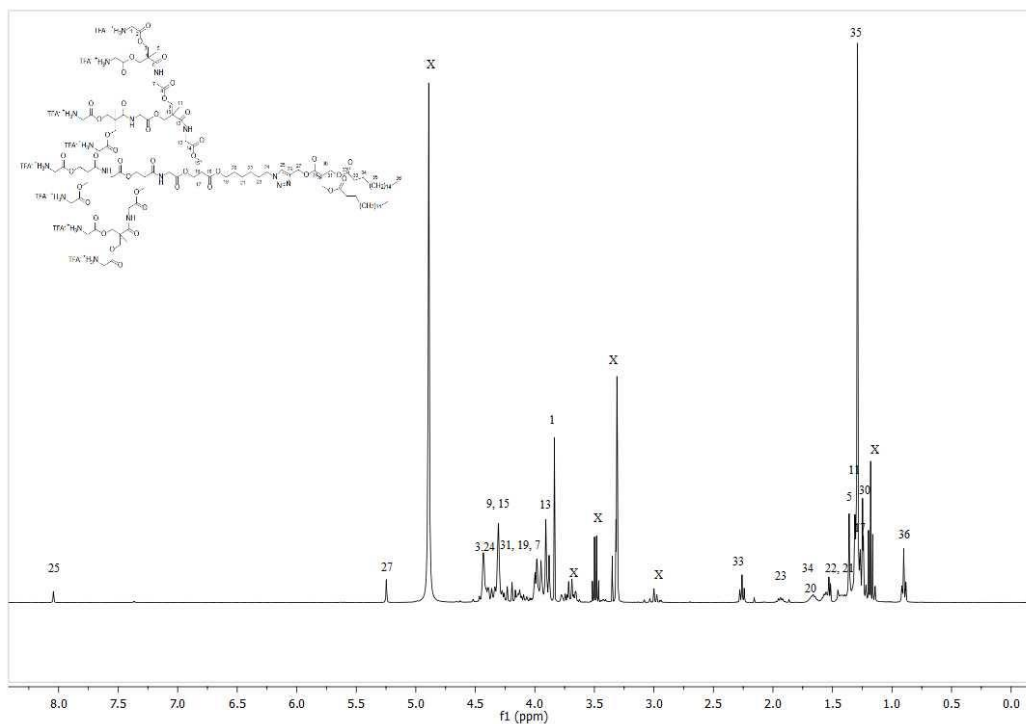


Figura A1.24: espectro 1H RMN del compuesto $(C_{17})_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NHBoc)_8$

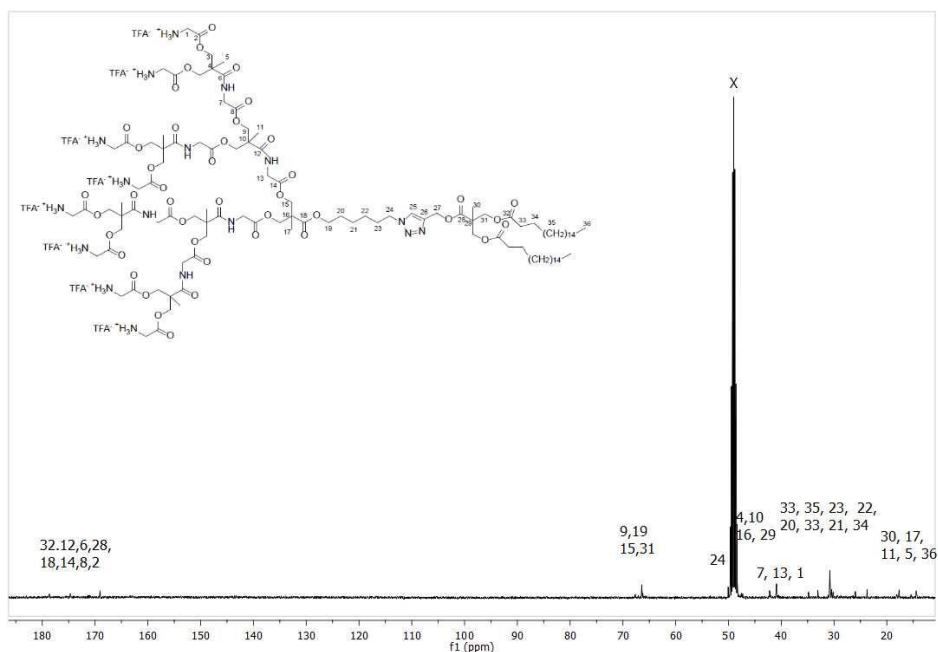


Figura A1.25: espectro ^{13}C RMN del compuesto $(C_{17})_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NHBoc)_8$

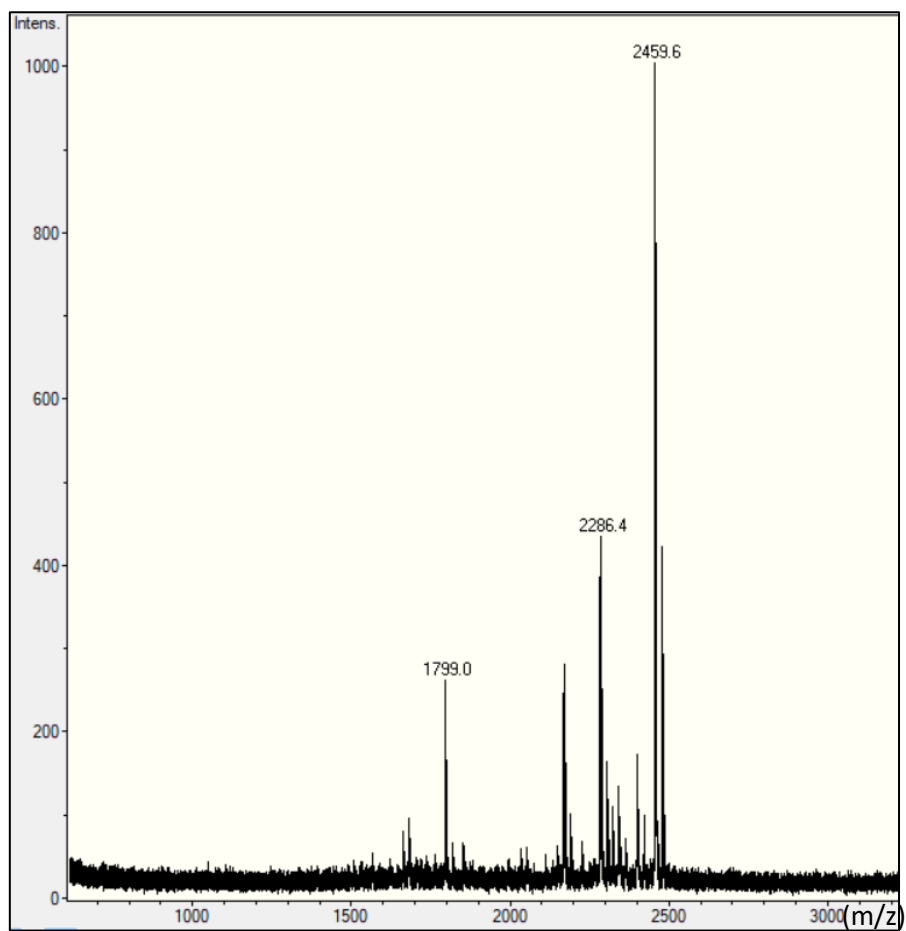


Figura A1.26: Resultado de MS (MALDI-TOF) de $(C_{17})_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NHBoc)_8$

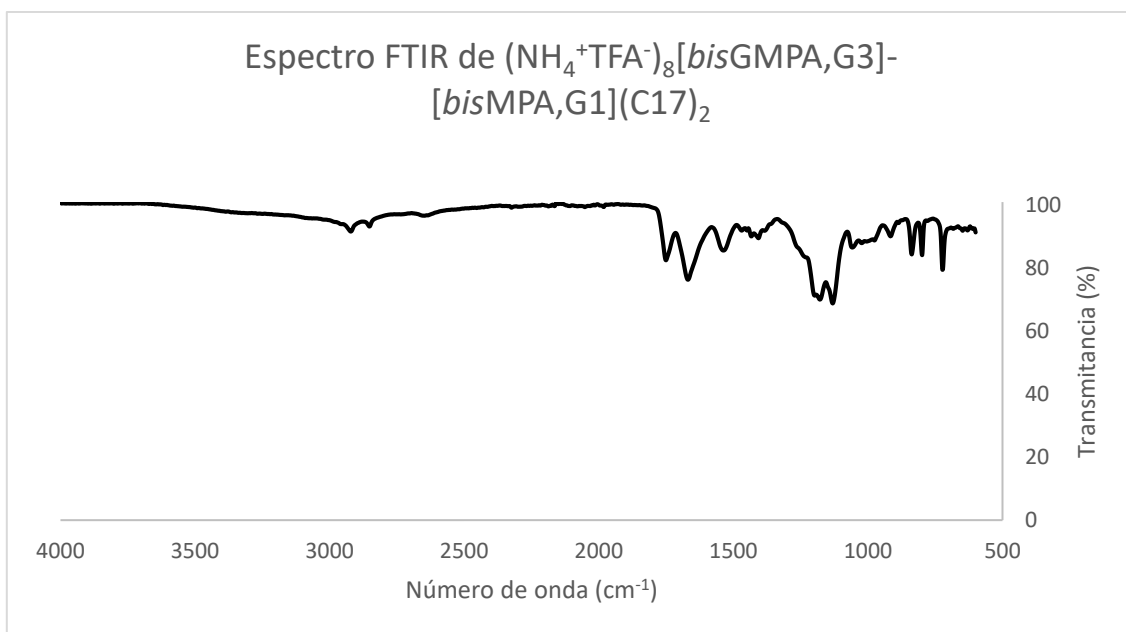


Figura A1.27: espectro FTIR del compuesto $(C_{17})_2[bisMPA,G1]-[bisGMPA,G3](NHBoc)_8$

ANEXO 2: Caracterización de los nanoagregados

En esta sección se encuentran recogidas todas aquellas figuras que se han generado como consecuencia del análisis de las diferentes características de los nanoagregados sintetizados.

Proceso de cuantificación de la isoniazida encapsulada:

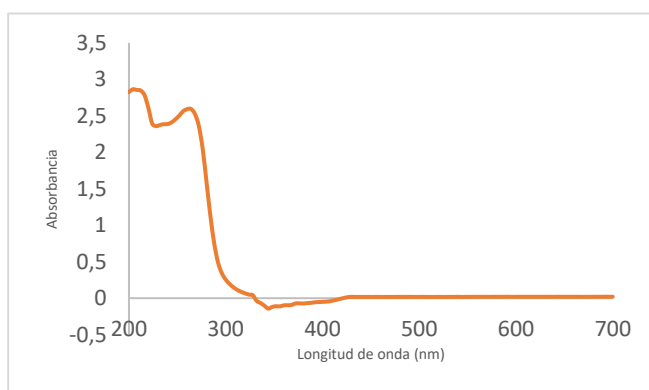


Figura A2.1: Espectro UV-vis de la isoniazida.

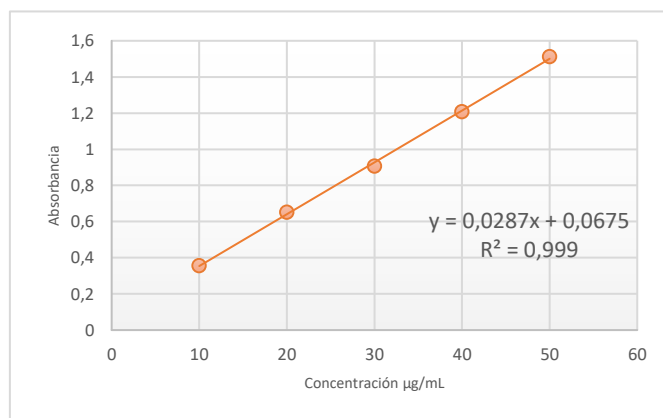


Figura A2.2: Recta de calibrado de la isoniazida.

Proceso de cuantificación de la rifampicina por espectrofotometría UV-Vis:

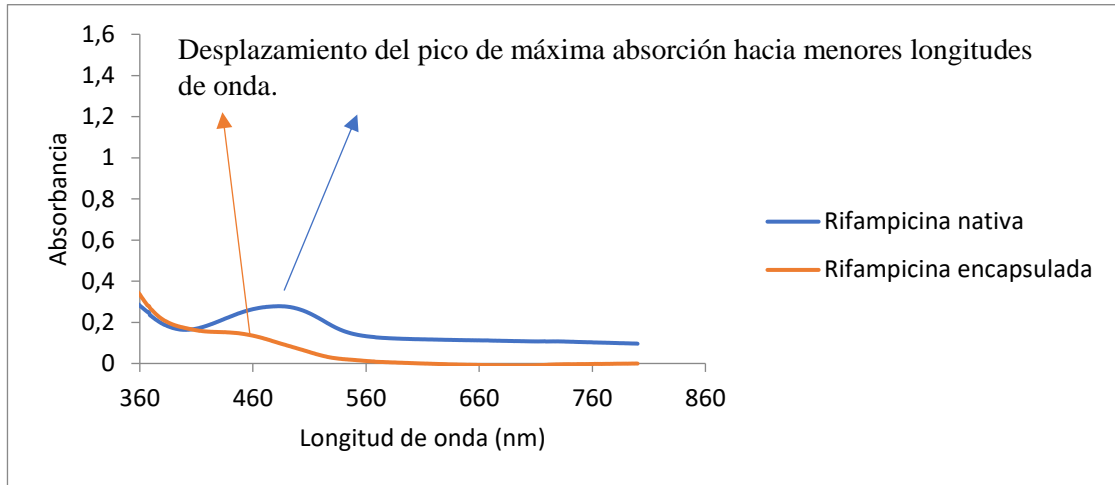


Figura A2.3: Espectros de absorción de la rifampicina.

Recopilación de algunas de las imágenes de TEM más representativas:

DENDRÍMERO SIN FÁRMACOS

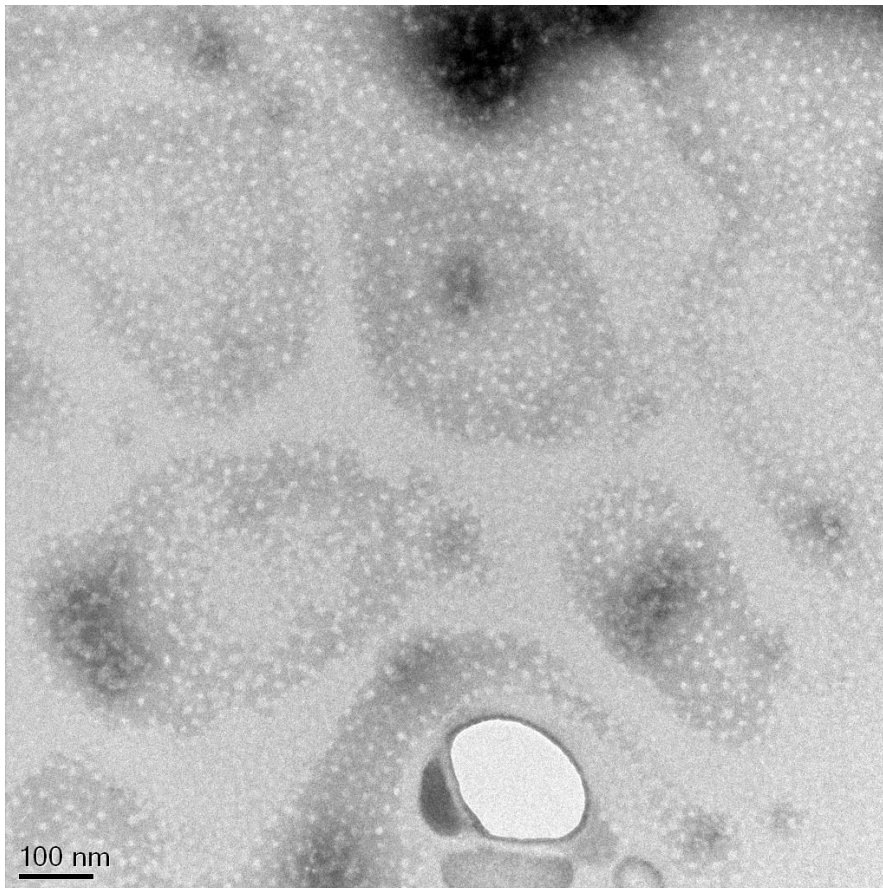


Imagen A2.1. Micelas producidas por el dendrímero en solitario en disolución acuosa

DENDRÍMERO + ETAMBUTOL

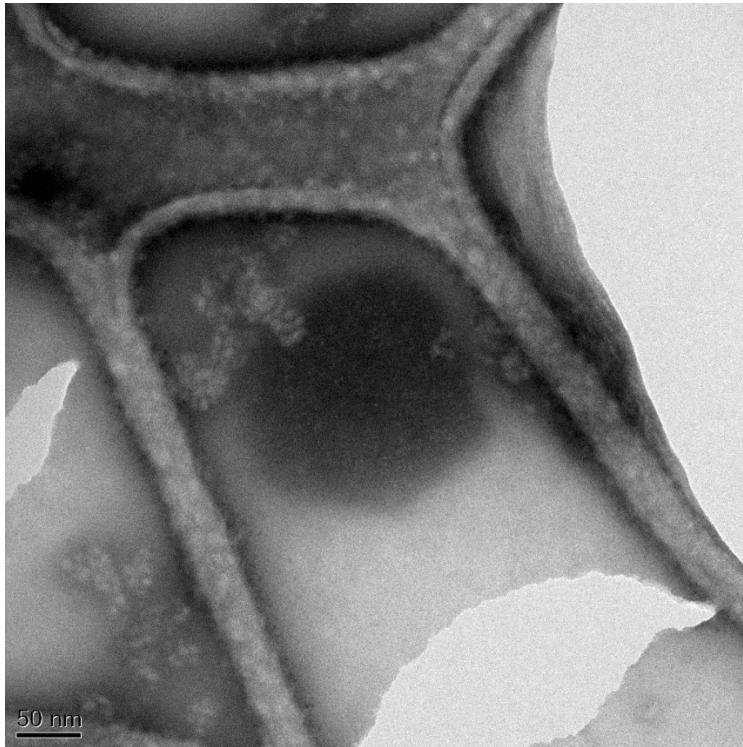


Imagen A2.2. Disolución de etambutol encapsulado. Pueden observarse micelas aisladas y pequeños agregados.

DENDRÍMERO + ISONIAZIDA

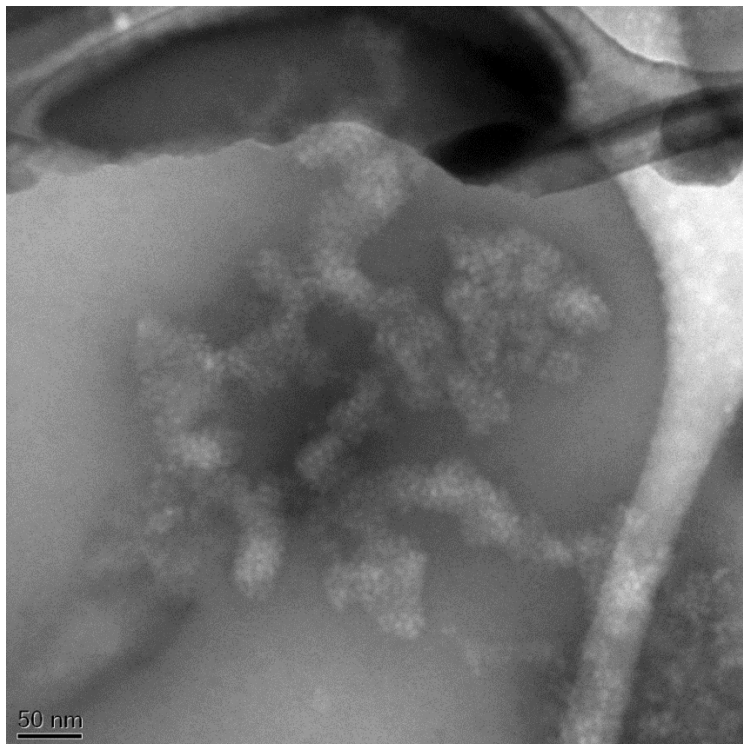


Imagen A2.3. Gran agregado encontrado en la disolución de isoniazida encapsulada.

DENSRÍMERO + ESTREPTOMICINA

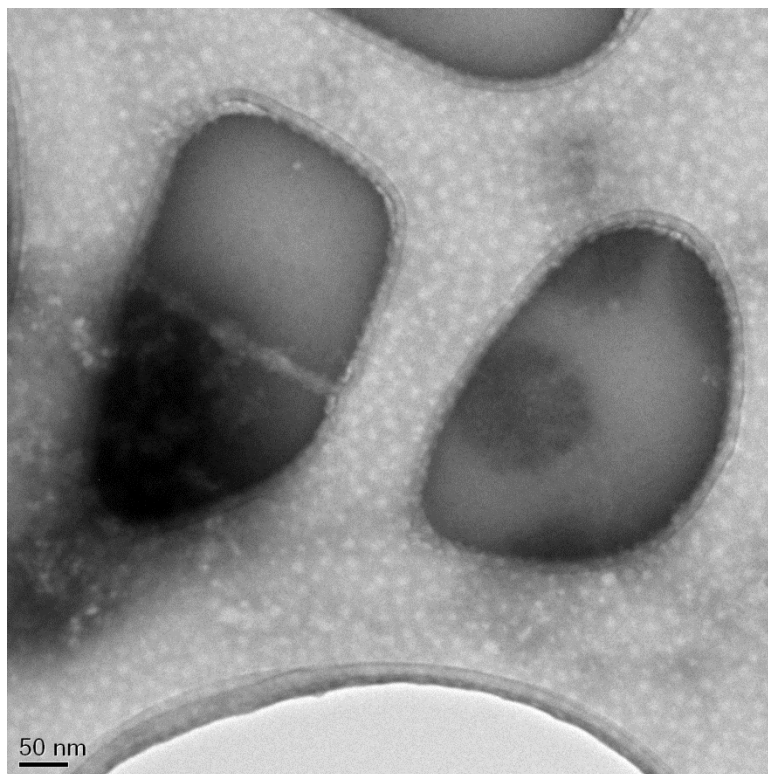


Imagen A2.4. Disolución de estreptomicina encapsulada. Se observan de forma mayoritaria pequeñas micelas pero también algunos agregados de éstas.

DENDRÍMERO + BEDAQUILINA

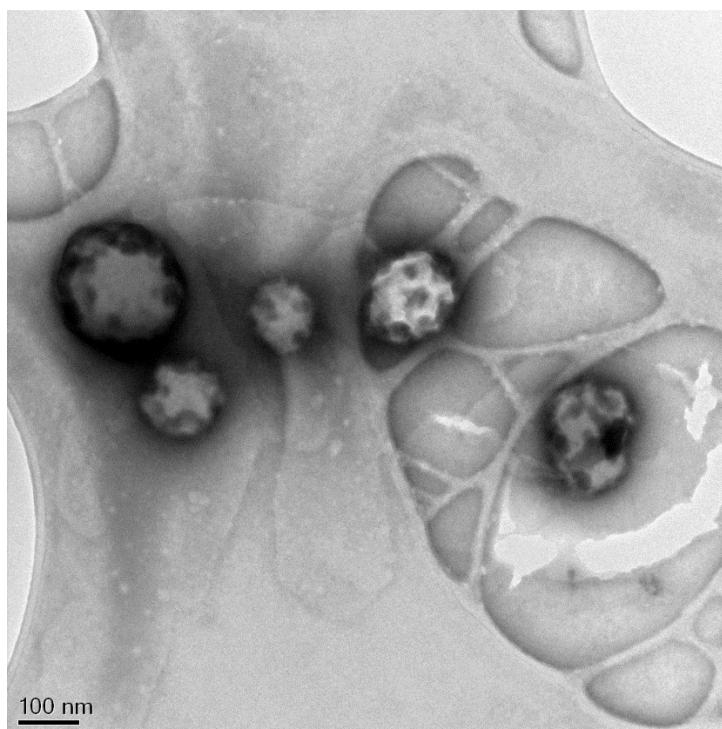


Imagen A2.5. Grandes micelas localizadas en la muestra de bedaquilina encapsulada. También se observan micelas de tamaño similar al de los otros fármacos.

DENDRÍMERO + RIFAMPICINA

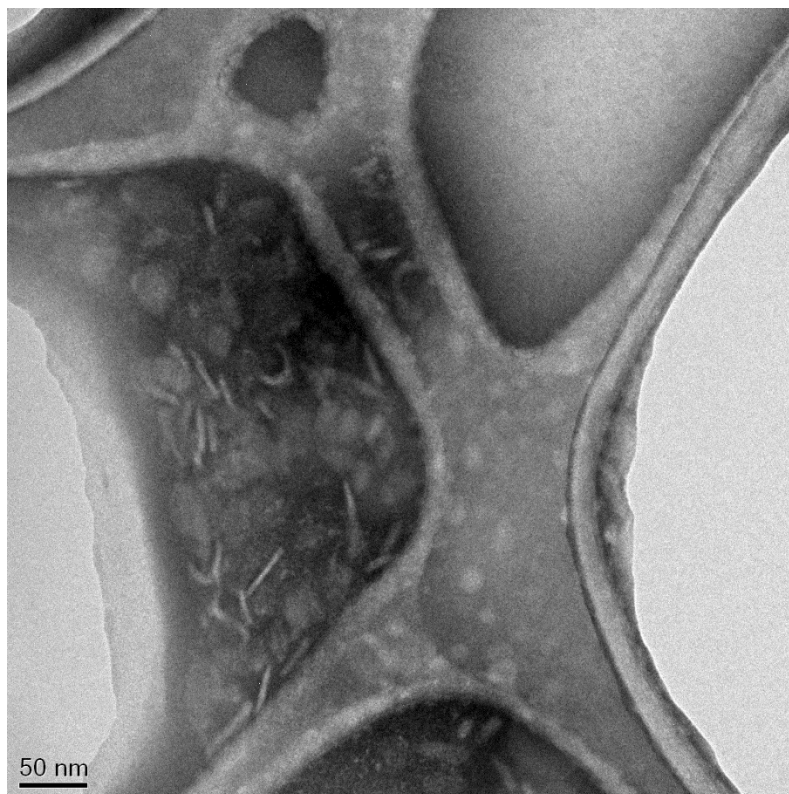


Imagen A2.6. Preparación de rifampicina encapsulada. Se pueden identificar algunos nanoagregados con forma tipo gusano, así como micelas de un diámetro superior a los anteriormente vistos.

Evaluación de la citotoxicidad del dendrímero contra la línea celular Hep G2.

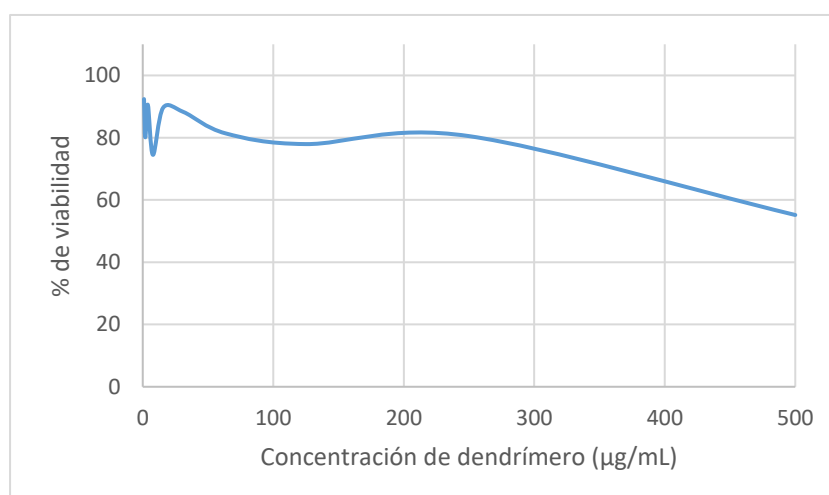


Figura A2.4: Citotoxicidad del dendrímero en disolución acuosa frente a la línea celular Hep G2.