



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**SÍNTESIS DE CONJUGADOS DENDRIMÉRICOS PORFIRINA-MELFALÁN**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.I. JULIO CÉSAR RAMÍREZ ARRONIZ

DR. MARCOS MARTÍNEZ GARCÍA  
INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM

INSTITUTO DE QUÍMICA UNAM, FEBRERO 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dr. Rafael Castillo Bocanegra  
**VOCAL:** M. en C. José Manuel Méndez Stivalet  
**VOCAL:** Dr. José Federico del Río Portilla  
**VOCAL:** Dr. José Alfredo Vázquez Martínez  
**SECRETARIO:** Dr. José Gustavo Ávila Zárraga

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 6-C, INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**DR. MARCOS MARTÍNEZ GARCÍA**

**SUSTENTANTE:**

---

**Q.I. RAMÍREZ ARRONIZ JULIO CÉSAR**

## Tabla de contenido

Lista de abreviaturas .....	I
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes .....	3
2.1. Porphirinas .....	3
2.1.1. Historia .....	4
2.1.2. Síntesis.....	5
2.1.2.1. Síntesis de porfirinas por la condensación de monopirroles .....	5
2.1.2.2. Síntesis de porfirinas a partir de intermediarios tripirrólicos .....	7
2.1.3. Aplicaciones .....	8
2.1.3.1 Imagen de resonancia magnética .....	9
2.1.3.2 Terapia fotodinámica e inactivación viral fotodinámica .....	10
2.1.3.3 Mejoramiento de radioterapia de rayos X (RTX) .....	11
2.1.3.4 Porphirinas expandidas como agentes aglutinantes de aniones.....	12
2.1.3.5 Porphirinas dendriméricas.....	12
2.2 Dendrímeros.....	15
2.2.1 Historia .....	16
2.2.2 Métodos de síntesis.....	18
2.2.2.1 Síntesis divergente.....	18
2.2.2.2 Síntesis convergente .....	19

2.2.2.3 Método ortogonal .....	20
2.2.2.4 Método convergente doble-etapa.....	20
2.2.2.5 Método doble exponencial.....	21
2.2.2.6. Método del hipermonómero .....	22
2.2.3 Aplicaciones de los dendrímeros.....	23
2.2.3.1 Dendrímeros luminiscentes .....	23
2.2.3.2 Nanoreactores moleculares.....	24
2.2.3.3 Fotofísicas .....	25
2.2.3.4 Liberación de fármacos con dendrímeros .....	25
2.3 Melfalán.....	27
2.3.1 Modo de empleo.....	27
2.3.2 Mecanismo de acción.....	28
2.3.3 Síntesis del melfalán .....	30
3. Objetivo general .....	33
3.1 Objetivos particulares .....	33
4. Estrategia experimental.....	34
5. Parte experimental .....	35
5.1. EQUIPOS .....	35
6. Metodología.....	38
6.1. Síntesis de la porfirina meso sustituida .....	38
6.1.1. Síntesis de 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dimetoxifenil)porfirina .....	38

6.1.2. Síntesis de 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dihidroxifenil)porfirina .....	39
6.2. Síntesis del porfirin-dendrímero generación 0.5 .....	40
6.3. Síntesis del porfirin-dendrímero generación 1.0 .....	42
6.4. Síntesis del porfirin-dendrímero generación 1.5 .....	43
6.5. Síntesis del porfirin-dendrímero generación 2.0 .....	44
6.6. Síntesis del conjugado porfirin-melfalán-dendrímero de generación 1.0 .....	46
6.7. Síntesis del conjugado porfirin-melfalán-dendrímero de generación 2.0 .....	47
7. Discusión de resultados .....	49
7.1. Obtención de 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dimetoxifenil)porfirina .....	49
7.2. Obtención de 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dihidroxifenil)porfirina .....	52
7.3. Obtención del porfirin-dendrímero generación 0.5 .....	54
7.4. Obtención del porfirin-dendrímero generación 1.0 .....	57
7.5. Obtención del porfirin-dendrímero generación 1.5 .....	61
7.6. Obtención del porfirin-dendrímero generación 2.0 .....	63
7.7 Caracterización del melfalán .....	67
7.8. Obtención del conjugado porfirin-melfalán-dendrímero de generación 1.0 ...	70
7.9. Obtención del conjugado porfirin-melfalán-dendrímero de generación 2.0 ....	72
7.10. Pruebas de citotoxicidad .....	74
7.10.1. Metodología experimental .....	74
7.10.2. Citotoxicidad de conjugados de melfalán .....	75
7.10.3 Determinación de la IC50 .....	77

7.10.4. La captación celular in vitro de los conjugados de melfalán.....	79
8. Conclusiones.....	81
Referencias .....	83

## Lista de abreviaturas

°C: Grado Celsius

an: Señal ancha

Ar: Aromático

ADN: Acido ribonucleico

ARN: Acido desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

CDCl<sub>3</sub>: Cloroformo deuterado

CD<sub>3</sub>OD: Metanol deuterado

CHCl<sub>3</sub>: Cloroformo

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: Diclorometano

cm<sup>-1</sup>: centímetros a la menos uno

DMSO: Dimetil sulfóxido

EM: Espectrometría de masas

ESI: Electrospray ionization

EtOH: Etanol

FAB<sup>+</sup>: Fast atom bombardment (Bombardeo atómico rápido)

HCl: Ácido clorhídrico

IR: Espectroscopía de infrarrojo

IRM: Imagen de resonancia magnética

IUPAC: International union of pure and applied chemistry (Unión internacional de química pura y aplicada)

IVF: Inactivación viral fotodinámica

*J*: Constante de acoplamiento

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Carbonato de potasio

KBr: Bromuro de potasio

m: multiplete

MALDI: Matrix assisted laser desorption ionization (desorción/ionización láser asistida por matriz)

MeOH: Metanol

MHz: Megahertz

mL: Mililitro

nm: Nanómetro

PAMAM: Poliamidoamino

ppm: Partes por millón

RMN <sup>1</sup>H: Resonancia magnética nuclear de protón

RMN <sup>13</sup>C: Resonancia magnética nuclear de carbono 13

RTX: Terapia de tumor de rayos X

s: Singulete

TTP: Tetraphenyl porphyrin (Tetrafenil porfirina)

TFD: Terapia Fotodinámica e Inactivación Viral Fotodinámica

UV-vis: Ultravioleta-visible

# 1. Introducción

El diseño y síntesis de nuevos fármacos para dianas farmacológicas bien establecidas es un compromiso de la ciencia con la sociedad, que demanda el desarrollo de nuevos y más eficientes fármacos que mejoren las posibilidades terapéuticas de los fármacos existentes, además que aporten una mayor actividad biológica. Se postula, cada vez con más fuerza, que la aplicación de la nanotecnología a la medicina será la clave para conseguir las mejoras necesarias tanto en diagnóstico como en la terapia anticancerígena. Para poder distinguirlos, los nanofármacos han sido definidos como “sistemas complejos de escala nanométrica constituidos al menos por dos componentes, siendo uno de ellos el agente bioactivo”. Actualmente ya existen en el mercado la aplicación de varios conjugados; polímero-proteína y 11 conjugados polímero-fármaco en fase clínica. Los polímeros terapéuticos pueden ser considerados como una de las primeras nanomedicinas poliméricas.

Estadísticas publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) revelan que cada año en México mueren alrededor de 500,000 personas por cáncer, entre los más comunes son; el cáncer de mama y el cáncer de próstata. Por lo tanto, surge la necesidad de mejores tratamientos para éstas y otras enfermedades degenerativas, crónicas o quimio-resistentes. Es por eso que muchos investigadores están trabajando en el diseño de sistemas innovadores de transporte para guiar el agente bioactivo de forma más adecuada a la célula tumoral. La conversión de nuevos agentes terapéuticos en fármacos se retrasa frecuentemente por la falta de tecnologías o sistemas adecuados para el transporte específico necesario para dirigir la terapia propuesta al compartimiento intracelular correcto de la célula dañada y, además, una vez allí, ser capaz de liberar el agente bioactivo a una concentración efectiva durante un período de tiempo apropiado.

En los últimos años, se ha observado un crecimiento exponencial tanto en el desarrollo como en la aprobación de nanosistemas terapéuticos híbridos y de transporte de fármacos con aplicación en terapias anticancerígenas, estos nanosistemas se encuentran, en: liposomas e inmuno conjugados, nanopartículas o polímeros terapéuticos y como fármacos poliméricos o conjugados polímero-proteína. Es importante mencionar que los dendrímeros son la siguiente etapa de la nanomedicina, por lo que en este proyecto se centra en el uso de conjugados dendriméricos como fármacos anticancerígenos.

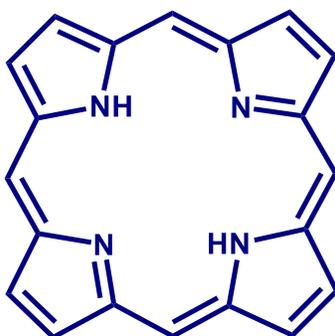
Los dendrímeros son macromoléculas globulares con una estructura química precisa y tamaño bien definidos, que poseen un bajo índice de polidispersidad, múltiples sitios de unión, y que pueden ser fácilmente modificables para cambiar las propiedades químicas del sistema. Los primeros informes sobre síntesis de dendrímeros se atribuyen al grupo Vogtle a finales del 1970, seguido por el trabajo de Tomalia y col. a principios de 1980. La aplicación de los dendrímeros en el área farmacéutica y química medicinal está convirtiéndose rápidamente en una de las áreas más atractivas de aplicación. Tal es el caso del uso de dendrímeros en la transporte de genes, como agentes médicos de imagen, como sistemas liberadores de fármacos.

Su alto grado de ramificación resulta en un incremento exponencial de grupos terminales en cada generación, los cuales están disponibles para su funcionalización con cualquier grupo químico o fracción biológica. Por lo tanto, cuando se comparan con los polímeros lineales se observa que sus propiedades fisicoquímicas tales como solubilidad y farmacocinética pueden ser dirigidas en un mayor grado, lo que los hace excelentes candidatos para su aplicación en la liberación controlada de fármacos por lo cual fueron utilizados para la elaboración de este proyecto.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Porfirinas

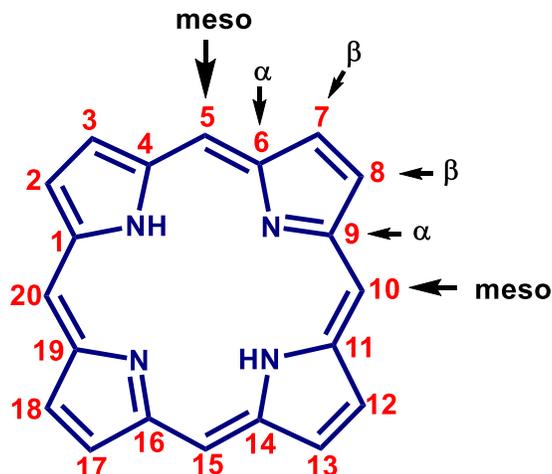
Las porfirinas (Figura 1) son una clase de macrociclos presentes en la naturaleza, y han sido llamados los "pigmentos de la vida". Esta designación refleja su importancia en numerosas funciones biológicas. Son compuestos tetrapirrólicos, consisten en cuatro anillos pirroles los cuales están unidos por puentes metenos, con un sistema conjugado alrededor del anillo tetrapirrol, la resonancia en este sistema hace a las porfirinas estables.<sup>1</sup>



**Figura 1.** Estructura de las porfirinas.

Las porfirinas son parte fundamental en los organismos vivos, como en la sangre formando parte de las hemoproteínas, lo que las hace biocompatibles. La vida tal como la entendemos depende de la gama completa de procesos biológicos que son realizados o catalizados por proteínas que contienen porfirinas. Por ejemplo, son los centros de reacción fotosintéticos presentes en la clorofila de las plantas, éstas convierten la energía luminosa en energía química mientras producen oxígeno a lo largo del camino.<sup>2</sup>

En la nomenclatura aceptada por la IUPAC se identifican las posiciones *meso*, las posiciones  $\beta$  y las posiciones  $\alpha$ , tal y como se indica en la Figura 2.

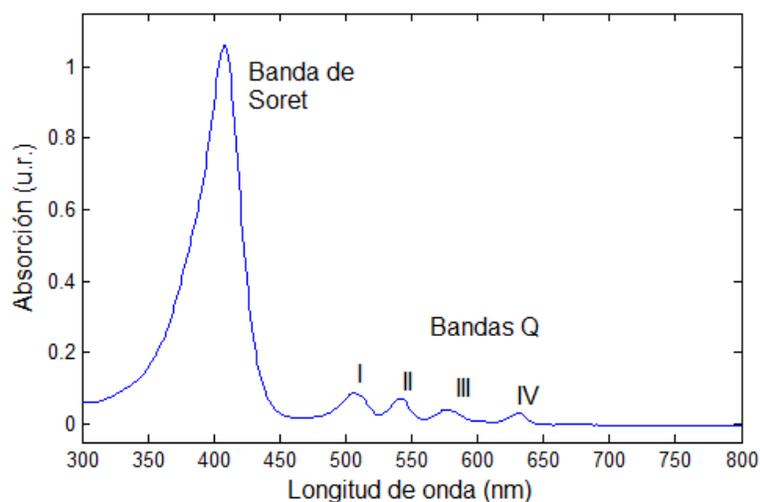


**Figura 2.** Nomenclatura y numeración de un anillo porfirínico.

El anillo de la porfirina es poliinsaturado y completamente conjugado, por lo que, las porfirinas y sus complejos con metales de transición tienen distintas características de absorción. El sistema de porfirínico es plano, contiene 22 electrones, de los cuales 18 se pueden deslocalizar y hacen que el compuesto tenga carácter aromático, de acuerdo con la regla de Hückel.<sup>3</sup>

### 2.1.1. Historia

El primer dato que se tiene del aislamiento de una porfirina fue en 1867 por Thudicums que trabajó con la fracción desnaturalizada de la hemoglobina y quien reportó su fluorescencia roja, pero fue hasta 1871 que Hoppe-Seyler llamó a este compuesto hematoporfirina y piloporfirina a la clorofila. Fue él quien por primera vez adoptó el término porfirina, éste proviene de la palabra griega porphura que significa morado o violeta. Posteriormente en 1883, Soret descubrió la fuerte banda de absorción cercana al ultravioleta, actualmente conocida como banda de Soret y que se encuentra alrededor de los 400 nm (Figura 3).<sup>4</sup>



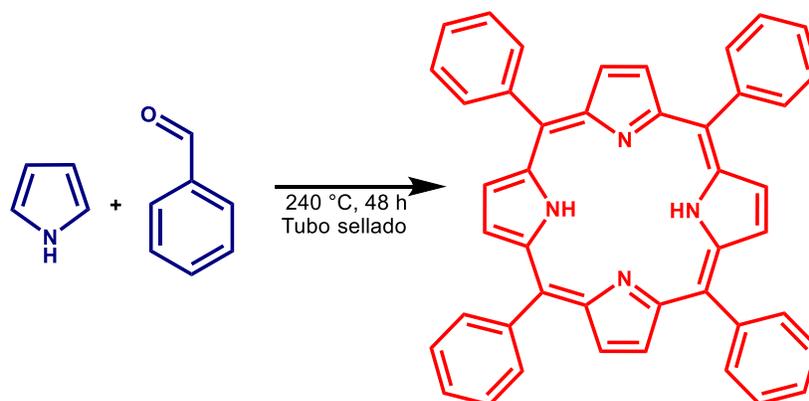
**Figura 3.** Banda de Soret.

## 2.1.2. Síntesis

Dada la importancia de las porfirinas, en los últimos años ha surgido una nueva dirección de investigación dedicada a la preparación y estudio de macrociclos porfirínicos. En este caso, los objetivos principales han sido generar sistemas totalmente sintéticos que tengan cierta semejanza estructural con derivados de porfirina que se producen en la naturaleza, aunque son muy diferentes en su composición química específica.

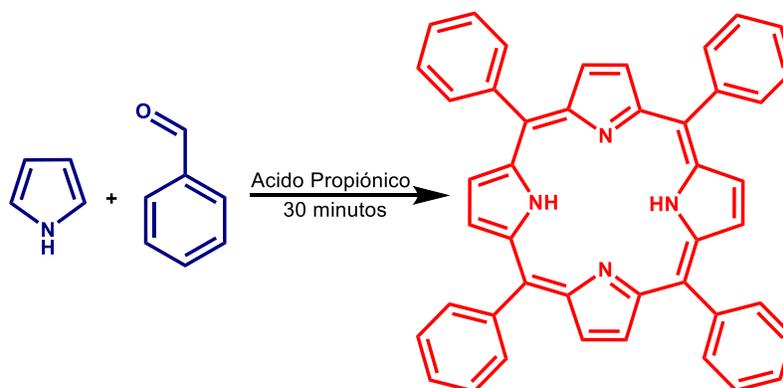
### 2.1.2.1. Síntesis de porfirinas por la condensación de monopirroles

El primero en sintetizar una tetraarilporfirina fue Rothmund, (Esquema 1) a partir de pirrol y benzaldehído, en un tubo sellado durante 48 horas y a 240 °C.<sup>5</sup>



**Esquema 1.** Síntesis de tetrafenilporfirinas diseñada por Rothmund.

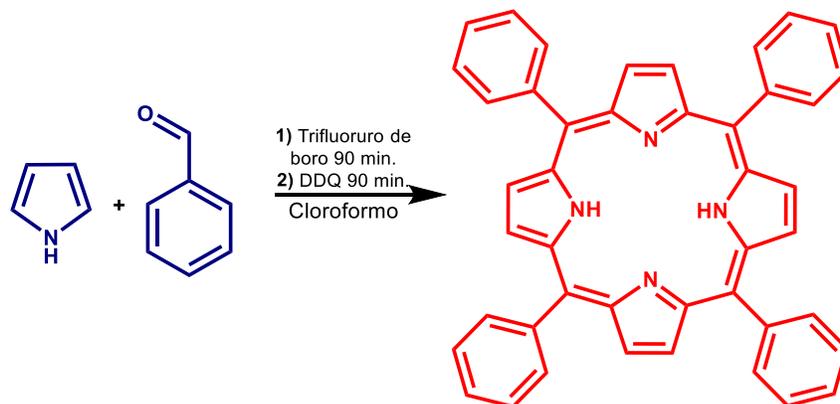
Tiempo después, Adler y Longo modificaron la metodología de Rothmund, empleando ácido propiónico como disolvente con lo cual se redujo la temperatura de 240 °C a 140 °C y de 48 horas a tan solo 30 minutos de reacción; sin embargo, no se logró mejorar el rendimiento.<sup>6</sup>



**Esquema 2.** Síntesis de tetrafenilporfirinas diseñada por Adler-Longo.

Posteriormente, a mediados de los ochenta Lindsey y col., basándose en estudios mecanísticos propusieron otra mejora para la síntesis, ya que identificaron a un intermediario clave que llamaron porfirinógeno; la metodología de Lindsey tiene dos etapas, que consisten en la condensación de pirrol y benzaldehído en presencia de un catalizador (ácido trifluoroacético, trifluoruro de boro) a temperatura ambiente para formar tetrafenilporfirinógeno. La segunda etapa consiste en la oxidación con

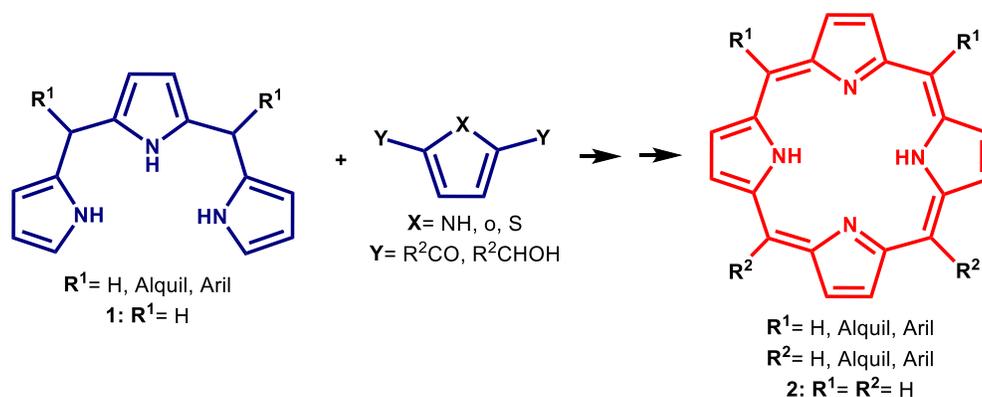
2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) para convertir el porfirinógeno en porfirina. Las suaves condiciones de reacción del método de Lindsey incrementa el número de moléculas de aldehído empleadas para la condensación.<sup>7</sup>



**Esquema 3.** Síntesis de tetrafenilporfirinas diseñada por Lindsey.

### 2.1.2.2. Síntesis de porfirinas a partir de intermediarios tripirrólicos

En esta síntesis de porfirinas la variante es conocida como la ruta [3+1] fue utilizada por primera vez por Johnson<sup>8</sup> (Esquema 3). Se basa en la condensación de las posiciones libres del  $\alpha$ -pirrol del tripirroano con sustituyentes adecuados situados en  $C_\alpha$  del otro reactivo y fue utilizado para la síntesis de amino y tioporfirinas, el rendimiento de esta metodología se encuentra en el intervalo del 20-30%. El ejemplo más relevante para los estudios actuales es el de Taniguchi y sus colaboradores, quienes informaron que la porfirina se obtuvo con un rendimiento del 31% mediante condensación de tripirano 1 no sustituido con 2,5-bis (hidroximetil)pirano.<sup>9</sup>

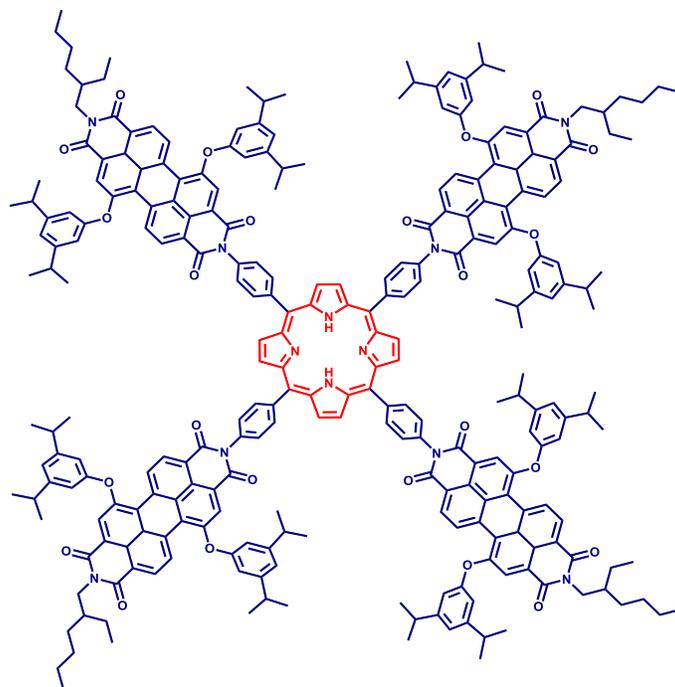


**Esquema 3.** Síntesis de porfirinas a partir de intermediarios tripirrólicos.

### 2.1.3. Aplicaciones

Actualmente el estudio de sistemas multiporfirínicos involucra una gran diversidad de campos como: la ciencia de materiales, bioquímica, química, biofísica y nanotecnología. Esto se debe a sus propiedades optoelectrónicas únicas, que hacen de las porfirinas excelentes candidatos para la síntesis de antenas moleculares o sistemas fotosintéticos. Además, tienen aplicación en catálisis como el modelo del citocromo P 450 diseñado por Diederich y en medicina las moléculas con anillos de porfirina han sido muy usadas en la terapia fotodinámica como tratamiento contra el cáncer.<sup>10</sup>

Complejos porfirínicos para la conversión de energía fotoquímica con moléculas de porfirina en el centro han sido reportados por Wasielewski que describe la formación de multicapas con la molécula que se ilustra en la Figura 4.<sup>11</sup>

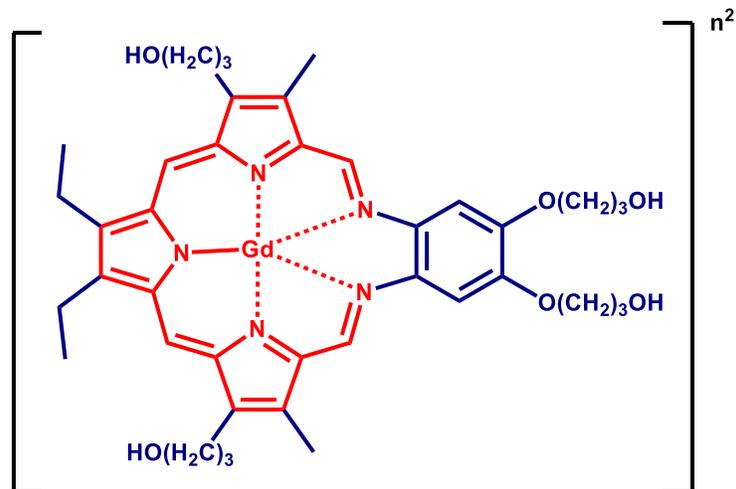


**Figura 4.** Formación de multicapas con porfirinas para el transporte de electrones.

En este contexto se ha evolucionado en tres direcciones de investigación diferentes, como lo son, las que implican las síntesis de porfirinas contraídas, isoméricas y expandidas, respectivamente.

### 2.1.3.1 Imagen de resonancia magnética

La imagen de resonancia magnética (IRM) es un método no invasivo, en el cual se observa una creciente aplicación de diagnóstico de muchas enfermedades (Figura 5). Desafortunadamente, la diferencia en la señal de IRM para los tejidos enfermos frente a los normales es a menudo pequeña.<sup>12</sup>

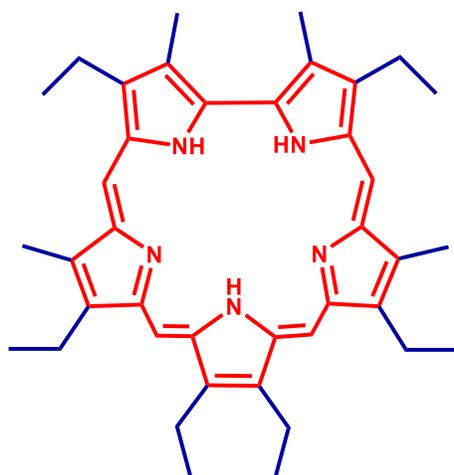


**Figura 5.** Estructura básica de las porfirinas utilizadas para imagen de resonancia magnética (IRM).

### 2.1.3.2 Terapia Fotodinámica e Inactivación Viral Fotodinámica

La terapia fotodinámica (TFD) es una de las nuevas modalidades que se está explorando actualmente para su uso en el control y tratamiento de tumores. Esta técnica se basa en el uso de un colorante fotosensibilizante, tal como una porfirina, que se localiza cerca o en el sitio del tumor, y cuando se irradia en presencia de oxígeno sirve para producir materiales citotóxicos. La TFD puede utilizarse para el tratamiento de tumores sólidos, como el cáncer de pulmón.

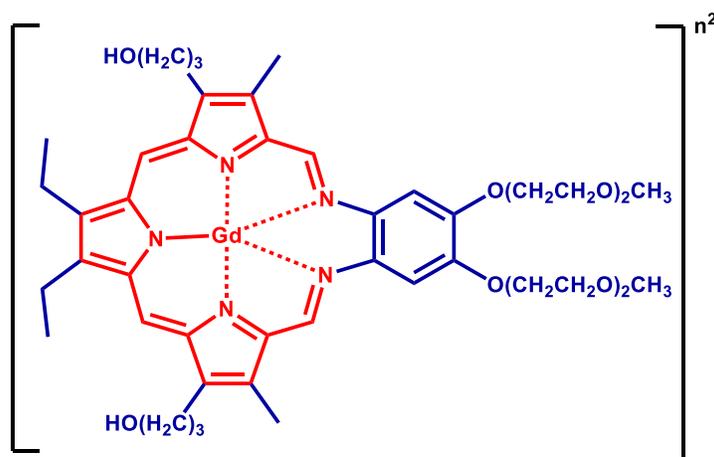
Dentro de la perspectiva de la terapia fotodinámica está incluida la inactivación viral fotodinámica (IVF). En este caso, el objetivo es utilizar una combinación de fármaco fotosensibilizante y activación de la luz para erradicar fotodinámicamente un virus u otro patógeno no deseado, con un medio dado de diana.<sup>13</sup>



**Figura 6.** Estructura de la safafina utilizadas para Terapia Fotodinámica e Inactivación Viral Fotodinámica.

### 2.1.3.3 Mejoramiento de radioterapia de rayos X (RTX)

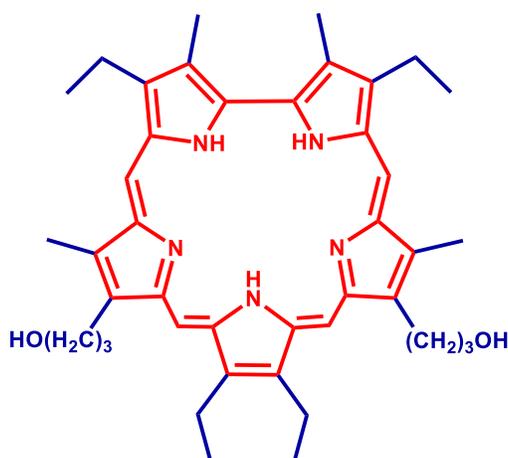
Otra aplicación potencialmente curativa de las porfirinas expandidas (Figura 7) es utilizarlas como sensibilizadores en la terapia de tumor de rayos X (RTX). Esto permitiría ser una de las estrategias más importantes en control del cáncer, lo que haría que la radioterapia se haga más eficaz.<sup>14</sup>



**Figura 7.** Estructura de la porfirina utilizada en el mejoramiento de radioterapia de rayos X.

#### 2.1.3.4 Porfirinas expandidas como agentes aglutinantes de aniones

Esta es un área mucho más generalizada de reconocimiento molecular y la química biológica. Las razones derivan en gran medida del hecho que tanto los aniones como los cationes son omnipresentes en la biología. Tienen funciones en diversos procesos como la manipulación de energía química (por ejemplo, hidrólisis de ATP), almacenamiento y procesamiento de información (por ejemplo, ADN y ARN), y conformación de proteína. Muchos aniones, especialmente fosfatos, cloruros y carboxilatos (incluidos los aminoácidos) están implicados en los ciclos metabólicos y pueden ser así la causa o la cura de enfermedades (Figura 8).<sup>15</sup>

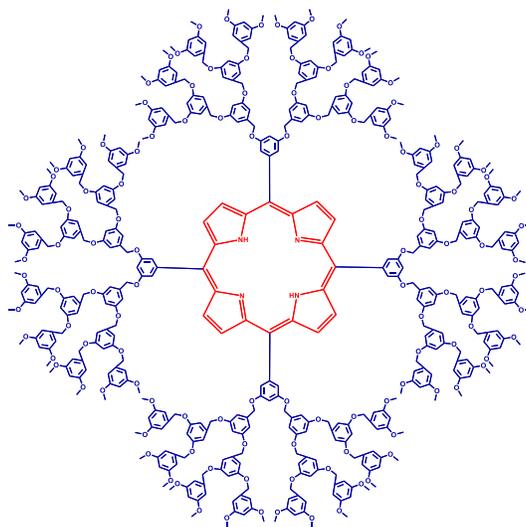


**Figura 8.** Estructura de la safafina utilizada como agente aglutinante de aniones.

#### 2.1.3.5 Porfirinas dendriméricas

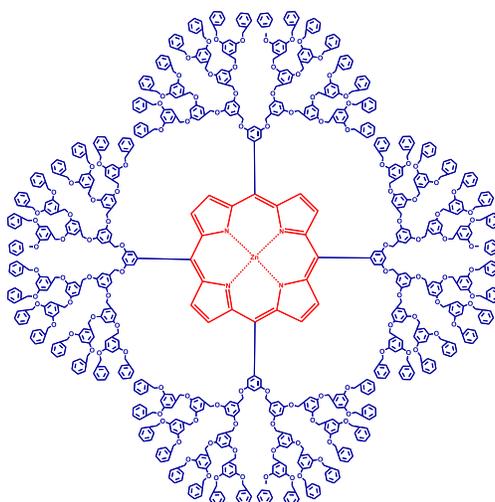
Por sus propiedades, las porfirinas han sido utilizadas como bloques dendrímeros, ya sea en el núcleo, en los brazos o en la superficie del dendrímero, debido a que son macrociclos. Cuando son utilizadas como núcleo, el crecimiento del dendrímero se inicia desde extremos opuestos, esto disminuye en gran medida el impedimento estérico que pudiera haber

en la molécula en las primeras generaciones. El primer dendrímero con una porfirina incluida como núcleo en su estructura fue sintetizado por Tomalia en 1993, este puede funcionar como sistema biomimético (Figura 9), ya que podría ser un buen candidato para mimetizar hemoproteínas.<sup>16</sup>



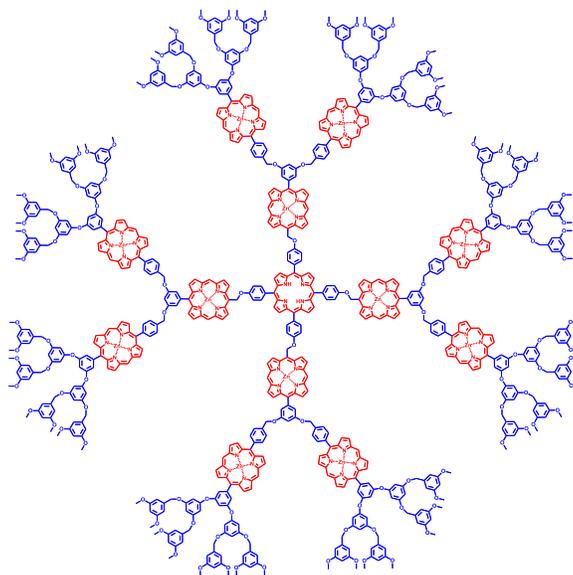
**Figura 9.** Dendrímero con porfirina en el núcleo.

Por otro lado, Matos y colaboradores también han utilizado porfirinas como núcleos de dendrímeros de poli(bencil-éter). En la Figura 10 se muestran los dendrímeros sintetizados por este grupo de investigación, por los cuales llegaron a conclusiones interesantes, una de ellas fue la observación de un desplazamiento hacia el rojo de la banda de Soret conforme aumenta la generación del dendrímero.<sup>17</sup>



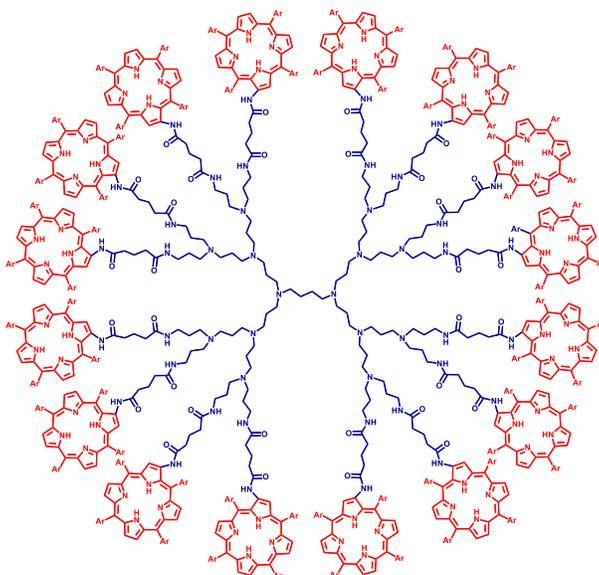
**Figura 10.** Dendrimeros de poli(bencil-éter) con una porfirina como núcleo.

También encontramos ejemplos de porfirinas como parte de las unidades dendríticas, entre ellos están las sintetizadas por Tazuko Aida con porfirina libre en su núcleo que funciona como aceptor, además de porfirinas con la incorporación de iones zinc en los brazos dendríticos que funcionan como donadores de energía (Figura 11). Palacin y col, también sintetizaron dendrones con moléculas de porfirina con el fin de funcionalizar nanotubos de carbono y así mejorar sus propiedades fotofísicas.<sup>18</sup>



**Figura 11.** Dendrimeros con moléculas de porfirina en los brazos dendríticos.

Dendrimeros con porfirinas en la periferia también han sido sintetizados, lo cual resulta muy útil, pues incrementa exponencialmente el número de porfirinas conforme incrementa la generación del dendrímico. En la figura 12 se muestra un ejemplo de dendrímico que tienen 16 moléculas porfirinas en la periferia.<sup>18</sup>



**Figura 12.** Dendrimeros tipo PAMAM con porfirinas en la periferia.

Por esta razón, en nuestro grupo de investigación se tomó la decisión de sintetizar dendrimeros con porfirinas, como núcleo dendrimérico, así que a continuación procederemos a profundizar más en el tema de los dendrimeros.

## 2.2 Dendrimeros

En la última década, el campo de los polímeros arborescentes (dendrimeros, polímeros hiperramificados y altamente ramificados) se ha establecido con una gran variedad de enfoques sintéticos, estudios fundamentales sobre la estructura y propiedades de estos materiales únicos y posibles aplicaciones. Los dendrimeros

son moléculas monodispersas con arquitecturas perfectamente ramificadas y bien definidas, realizadas en una síntesis orgánica de múltiples etapas.<sup>19</sup>

Los dendrímeros son estructuras poliméricas tridimensionales que poseen 3 componentes arquitectónicos: Un núcleo, una parte intermedia (brazos dendríticos) y una superficie (grupos terminales) (Figura 13).<sup>20</sup>

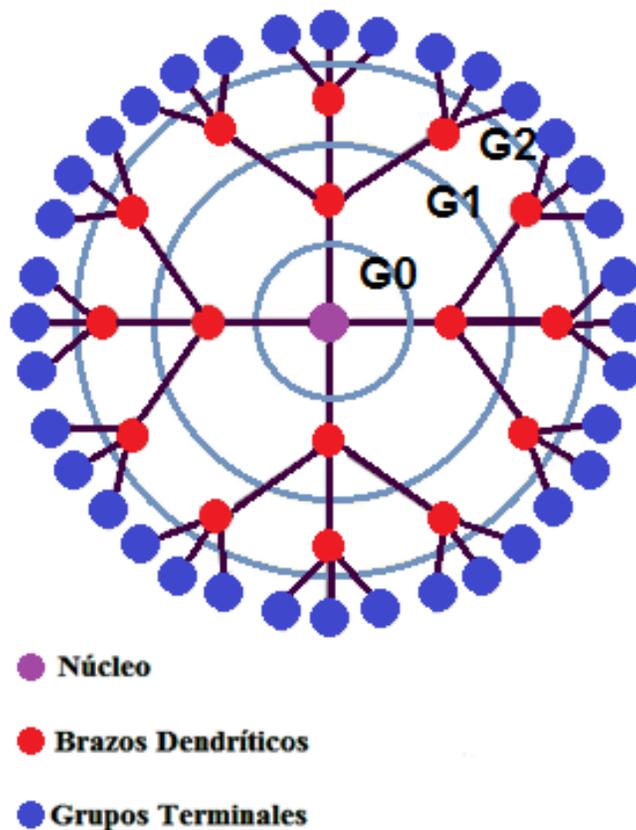
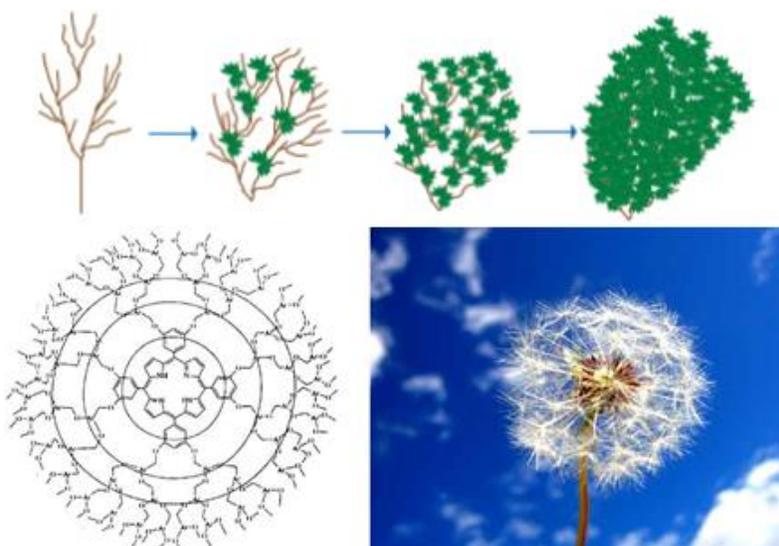


Figura 13. Estructura de un dendrímero.

### 2.2.1 Historia

La arquitectura de los dendrímeros quizá es una de las formas más observadas de planeta. Varios ejemplos de estos patrones se encuentran en sistemas abióticos y

biológicos, como lo son: árboles, copos de nieve y neuronas, entre otros, (Figura 14). La razón de que esta topología se encuentra en una amplia escala de longitudes en sistemas biológicos no es clara; sin embargo, la naturaleza ha proveído estas estructuras para la optimización de extracción y distribución de energía, nutrientes, y el almacenamiento y recuperación de información, durante varios billones de años.



**Figura 14.** Ejemplos de estructuras dendríticas en la naturaleza.

Recientemente se ha prestado mayor atención a la funcionalización de los dendrímeros, los cuales son regularmente macromoléculas hiper-ramificadas con nanoestructuras bien definidas. Un número de dendrímeros interesantes con grupos orgánicos funcionales se han informado. Por otra parte, la incorporación de especies metálicas en moléculas dendríticas ha permitido el acceso a materiales altamente ordenados con atractivas propiedades magnéticas, electrónicas y foto-ópticas, así como reactividad característica. Los dendrímeros organometálicos ofrecen varias ventajas para adaptar las moléculas dendríticas con funcionalidades deseables debido no sólo a la disponibilidad de una amplia variedad de compuestos orgánicos que coordinan a muchos tipos de átomos metálicos, sino también a la flexibilidad de los modos de coordinación entre átomos metálicos y ligantes orgánicos.<sup>21</sup>

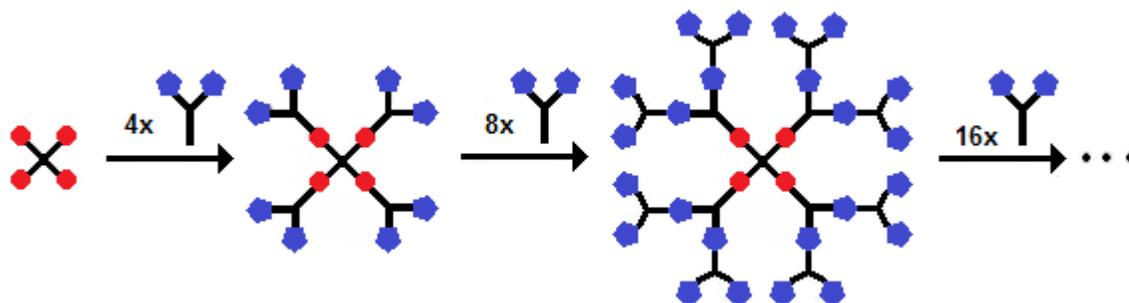
## **2.2.2 Métodos de síntesis**

La síntesis de dendrímeros generalmente involucra la iteración de dos reacciones, una de activación, y otra de acoplamiento. Estas reacciones se llevan a cabo simultáneamente en muchos sitios de la molécula, por lo que las reacciones deben de ser limpias y con altos rendimientos. Los métodos divergente y convergente son generalmente los más utilizados para la síntesis de dendrímeros.<sup>22</sup>

### **2.2.2.1 Síntesis Divergente**

Se desarrolló en el período 1979-1985 por Tomalia D. A. y col. para la síntesis de las generaciones 1 a la 13 de dendrímeros tipo PAMAM. La síntesis divergente se basa en el uso de monómeros de acrilato, dando buenos rendimientos y pocos problemas de purificación, en comparación con la síntesis en cascada reportada por Buhleier et al., el cual utilizó acrilonitrilo, su síntesis daba bajos rendimientos, así como dificultades en la purificación al incrementar la masa molecular. El nombre de esta metodología se debe a que el crecimiento del dendrímero es del núcleo y diverge en el espacio conforme se agregan monómeros de ramificación.

La síntesis divergente comprende la iteración de dos reacciones (Esquema 4), la primera de ellas es la activación de los grupos funcionales de la superficie y la segunda es el acoplamiento de monómeros de ramificación, en consecuencia, se necesitan de dos reacciones para pasar de una generación a la siguiente. Entre las ventajas de este método es que se pueden modificar fácilmente los grupos funcionales de la capa más externa.<sup>23</sup>

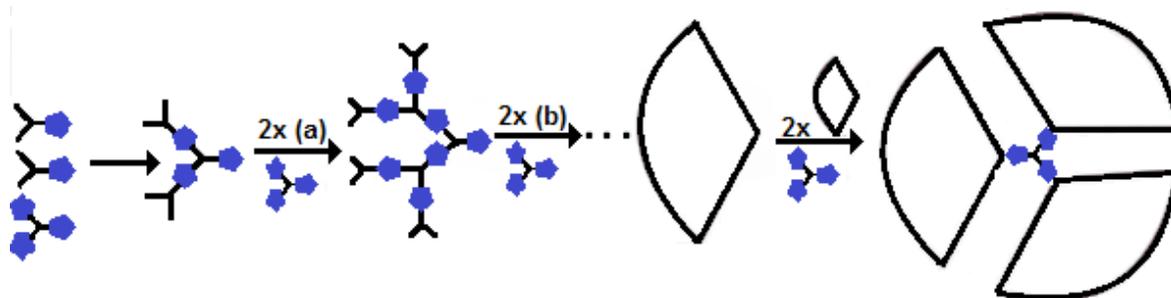


**Esquema 4.** Metodología de la síntesis divergente de dendrímeros.

### 2.2.2.2 Síntesis convergente

Fue desarrollada en el período de 1988-1989, por Craig Hawker y Athena Phillipides dos estudiantes posdoctorales bajo la dirección de M.J. Frechet y se aplicó al desarrollo de polímeros de poli(ariléter). El método convergente se inicia desde lo que será el exterior del dendrímero hacia el núcleo, mediante esta metodología se sintetizan primero los dendrones de diferentes generaciones que posteriormente se acoplarán al núcleo obteniendo el dendrímero como se ilustra en el Esquema 5.

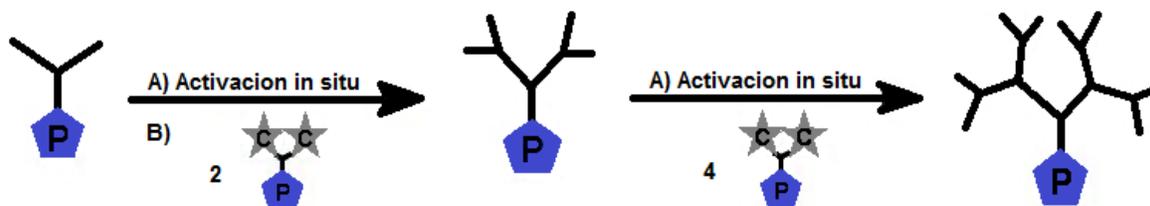
Esta metodología tiene este nombre debido a que la construcción del dendrímero comienza por las unidades dendríticas, las cuales se hacen converger en el núcleo. La síntesis convergente se ilustra en el Esquema 5, e involucra la iteración de dos reacciones, la primera es la adición de dos o más unidades de superficie a una unidad de ramificación, para dar un producto con un punto focal no reactivo, de aquí se sigue la activación del punto focal, estos pasos se repiten para obtener dendrones de mayor generación, el segundo paso es el acoplamiento de los dendrones con el núcleo del dendrímero. Frechet M. y col. desarrollaron este método para la síntesis de dendrímeros de poli(ariléter), para ello empleaban la reacción de un fenol con un bromuro bencílico. Una de las ventajas que tiene esta metodología es que evita el gran número de reacciones simultáneas que son necesarias en el crecimiento divergente, por lo que el número de impurezas es mucho menor.<sup>24</sup>



**Esquema 5.** Metodología de la síntesis convergente de dendrímeros.

### 2.2.2.3 Método ortogonal

En la síntesis ortogonal dos diferentes unidades de ramificación con funciones complementarias de acoplamiento son usadas alternativamente y un paso de activación *in situ* es empleado.<sup>25</sup> Los reactantes seleccionados, así como el producto resultante deben ser inertes al paso posterior de reacción. El término ortogonal significa que las funcionalidades son inicialmente inertes a las condiciones de acoplamiento, pero pueden ser activadas *in situ* para la subsecuente reacción o acoplamiento. Si se cumple esta condición, el dendrímero puede ser construido divergentemente o convergentemente en tan solo pocos pasos (Esquema 6).<sup>26</sup>

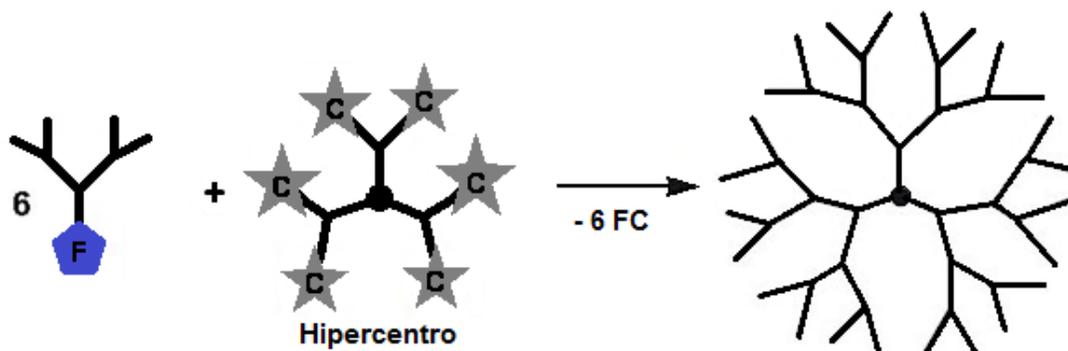


**Esquema 6.** Síntesis ortogonal, C= puntos de acoplamiento, P= grupo funcional inactivo (protegido).

### 2.2.2.4 Método convergente doble-etapa

Esta nueva variante es una combinación del método divergente y el convergente. El paso relevante consiste en el acoplamiento de un dendrón pequeño con un grupo

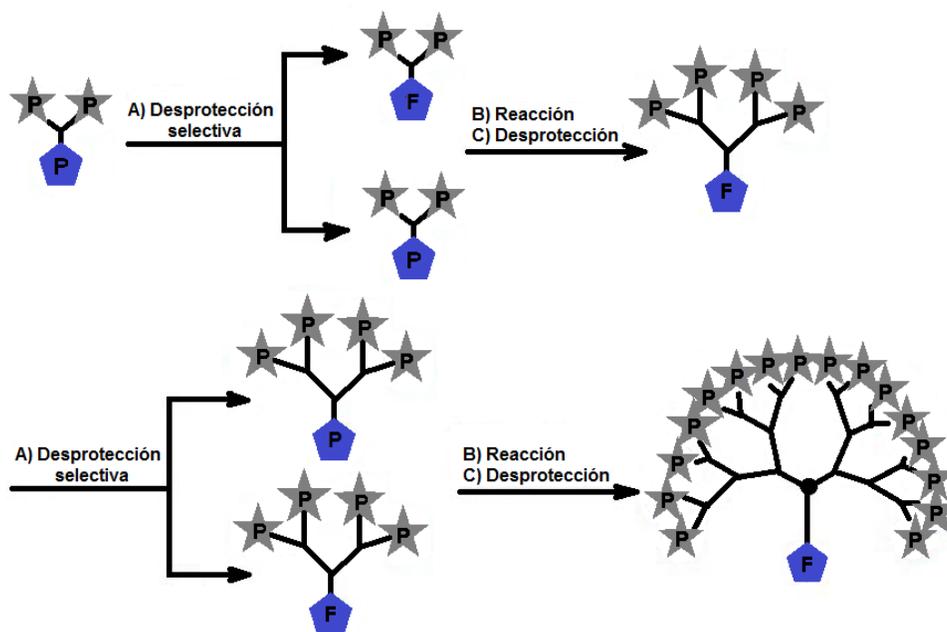
funcional activo (F) en el punto focal, producido por la síntesis convergente a un dendrímero multifuncional de baja generación con sitios periféricos de acoplamiento(C), donde el hipercentro es producido por el método divergente (Esquema 7).<sup>27, 28</sup>



**Esquema 7.** Método convergente doble-etapa, C= puntos de acoplamiento, F= grupo funcional activo (desprotegido).

### 2.2.2.5 Método doble exponencial

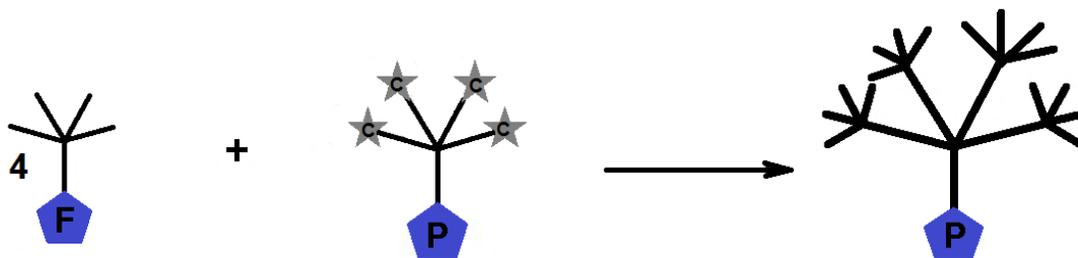
El método doble exponencial puede ser considerado básicamente como una estrategia de crecimiento convergente, de un dendrón. Esto involucra la síntesis en dos direcciones, hacia la periferia y hacia el punto focal. Iniciando de una unidad ramificada, completamente protegida, (que consiste en dos sitios de acoplamiento protegidos (C), y una funcionalidad (F, protegida)), la desprotección selectiva es realizada de manera que el grupo funcional (F) es activado en una de las unidades ramificadas y las otras dos unidades de acoplamiento son activadas en el otro. Si las dos unidades de ramificación con grupos activos ahora reaccionan con un grupo que tiene dos sitios de acoplamiento (C), un dendrón de segunda generación es formado. La iteración de la secuencia sintética permite la obtención de un dendrón de cuarta generación. El acceso a dendrones de cuarta generación tipo Fréchet, pueden realizarse en una sola etapa por este método, pero a partir del dendrón de segunda generación, ya que hay una duplicación en el número de generaciones, como se ilustra en el Esquema 8.<sup>29</sup>



**Esquema 8.** Método doble exponencial. C= puntos de acoplamiento, F=grupo funcional activo (desprotegido), P= grupo funcional inactivo (protegido).

### 2.2.2.6. Método del hipermonómero

Método del hipermonómero, comparando los monómeros convencionales FC2 o FC3, el número de grupos terminales se incrementa rápidamente (ramificación 1→4) con bloques de construcción monoméricas FC4 (ejemplo, hipermonómeros). Sin embargo, el número de pasos sintéticos requeridos para la construcción de un dendrímico, son iguales que los requeridos por el método convencional. El curso de la síntesis puede ser descrito como sigue: Cuatro unidades ramificadas con un grupo funcional activo (F) reaccionan con los grupos de acoplamiento (C) activos del hipermonómero FC4, donde el grupo funcional (F) en el hipermonómero por sí mismo es desactivado y por lo tanto se le etiqueta como protegido (P) (Esquema 9).<sup>30, 31</sup>



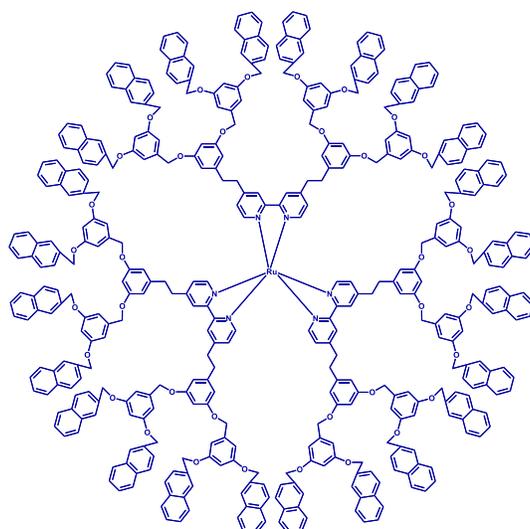
**Esquema 9.** Método Hipermonómero, C= puntos de acoplamiento, F= grupo funcional activo (desprotegido), P= grupo funcional inactivo (protegido).

### 2.2.3 Aplicaciones de los dendrímeros

Debido al potencial que pueden tener en la biología, la química y la medicina; la investigación en su síntesis, propiedades físicas y químicas ha incrementado exponencialmente en los últimos años.

#### 2.2.3.1 Dendrímeros luminiscentes

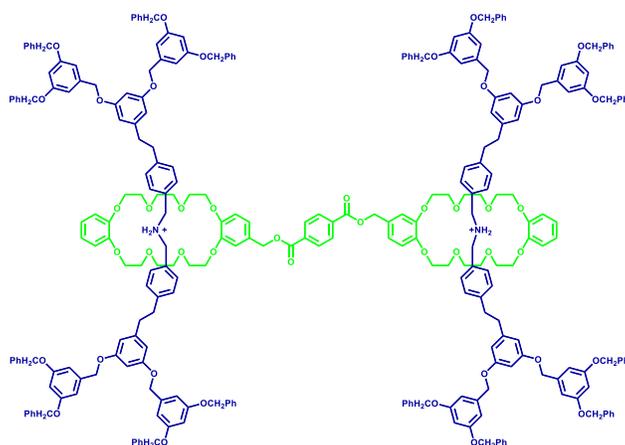
Los dendrímeros luminiscentes (Figura 15) están atrayendo actualmente mucha atención puesto que los temas de la investigación de la luminiscencia, así como del acoplamiento o del dendrímero pueden conducir a las nuevas funciones valiosas. De hecho, la luminiscencia es una valiosa herramienta para monitorear tanto las propiedades básicas como las posibles aplicaciones (sensores, pantallas, láseres) y dendrímeros son compuestos macromoleculares que presentan una estructura química bien definida con la posibilidad de contener unidades químicas seleccionadas en sitios predeterminados y de encapsular iones o moléculas neutras en sus cavidades dinámicas internas.<sup>32</sup>



**Figura 15.** Estructura de un dendrímero luminiscente.

### 2.2.3.2 Nanorreactores moleculares

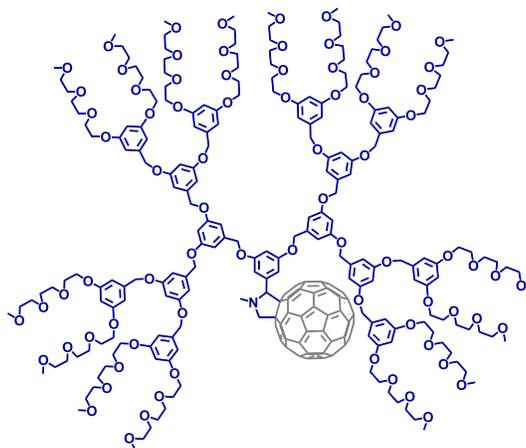
Las propiedades de estos dendrímeros de rotaxano son diferentes de las de los rotaxanos y de los dendrímeros individuales, por lo regular es una mezcla de ambos. Las aplicaciones potenciales de dendrímeros de rotaxano incluyen nanorreactores moleculares y administración génica (Figura 16).<sup>33</sup>



**Figura 16.** Estructura de un dendrímero de rotaxano.

### 2.2.3.3 Fotofísicas

Los fullerenos poseen propiedades electrónicas que los convierten en candidatos naturales para la preparación de dendrímeros funcionales. Cuando un fullereno-dendrímero está funcionalizado adicionalmente con un donador de electrones adecuado, puede presentar las características esenciales de un sistema fotosintético artificial multicomponente en el que la transferencia de energía fotoinducida desde la antena al núcleo  $C_{60}$  es seguida de una transferencia de electrones (Figura 17).<sup>34</sup>

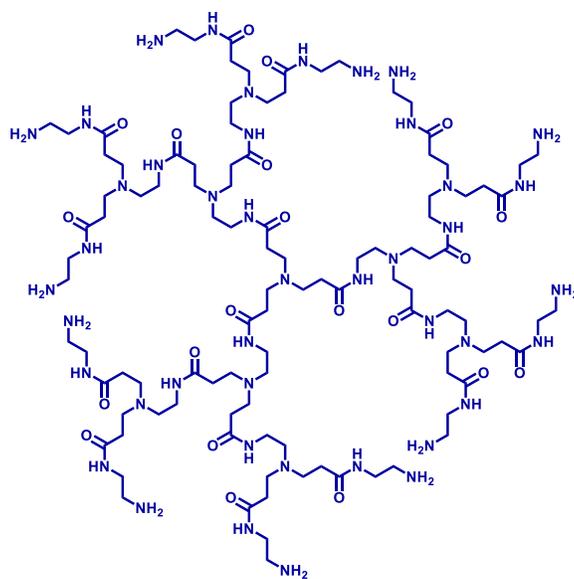


**Figura 17.** Estructura de un fullereno dendrímero.

### 2.2.3.4 Liberación de fármacos con dendrímeros

Durante las últimas tres décadas, se desarrollaron varias estrategias sintéticas para generar familias de dendrímeros con composiciones químicas versátiles, que se buscan para una variedad de aplicaciones en química, biología y medicina. Específicamente, se revisan las diferentes familias de dendrímeros, sus estrategias de síntesis, los métodos de carga e incorporación de agentes quimioterapéuticos sobre los portadores dendríticos y la actividad anticancerosa, *in vitro* e *in vivo* asociada de los dendrímeros como portadores de agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer (Figura 18).<sup>35</sup>

Un enfoque alternativo para el desarrollo de dendrímeros como portadores de fármacos contra el cáncer es explotar su multivalencia bien definida para la unión covalente de moléculas de fármaco a la periferia del dendrímero. La carga del fármaco puede ajustarse variando el número de generación del dendrímero, y la liberación del fármaco puede ser controlada mediante la incorporación de enlaces degradables entre el fármaco y el dendrímero. Por ejemplo, un conjugado de dendrímeros poliamidoamina (PAMAM) con cisplatino, un potente fármaco anticanceroso con toxicidad inespecífica y pobre solubilidad en agua. El conjugado muestra mayor solubilidad, disminución de la toxicidad sistémica y acumulación selectiva en tumores sólidos. Además, se ha encontrado que el complejo dendrímero-platino muestra una eficacia aumentada con respecto al cisplatino en el tratamiento del melanoma subcutáneo.<sup>36</sup>



**Figura 18.** Estructura de un dendrímero biocompatible tipo PAMAM que ha sido probado para aplicaciones de administración de fármacos.

Por esta aplicación decidimos realizar la conjugación de nuestros dendrímeros de primera y segunda generación con fármacos empleados en el tratamiento del cáncer de mama y próstata, por lo cual se decidió conjugar nuestros dendrímeros con el melfalán. Enseguida describiremos a detalle a este fármaco, utilizado en el tratamiento contra el cáncer.

## 2.3 Melfalán

El melfalán (Figura 19) es un agente alquilante bien conocido actualmente empleado como agente antineoplásico en seres humanos, y es a menudo el fármaco de elección en el tratamiento de melanoma metastásico, cáncer de ovario y de mama. Las mostazas de nitrógeno son anticancerosos citotóxicos no específicos del ciclo celular y por lo tanto pueden matar células en todas las etapas.<sup>37</sup>

Las mostazas de nitrógeno están entre los fármacos antitumoral más antiguos y eficaces usados en la quimioterapia contra el cáncer humano. Actualmente los agentes anticancerígenos utilizados son la mecloretamina y el melfalán. Se cree que estos fármacos citotóxicos ejercen actividad farmacológica al inducir enlaces cruzados en la ranura principal del ADN que representa la toxicidad de todos los eventos de alquilación.<sup>37</sup> Se han modificado numerosas mostazas de nitrógeno durante los últimos años para aumentar su citotoxicidad y afinidad de diana



**Figura 19.** Estructura del Melfalán.

### 2.3.1 Modo de empleo

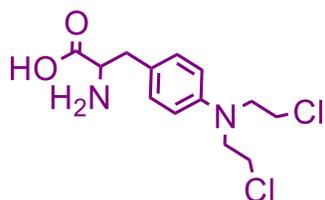
Melfalán (H-Mel-OH) se administra actualmente por vía oral (2 mg) y la absorción es irresoluta y deficiente; con una vida media de 90 minutos en el plasma, 20-50% se recupera en las heces y hasta un 15% se elimina en la orina. En un intento por mejorar la biodisponibilidad oral y superar algunas de las limitaciones de toxicidad del melfalán, se decidió sintetizar y probar los nuevos derivados de glicerol. De acuerdo con su estructura química, el melfalán puede entrar en las células mediante transportadores de aminoácidos.

### 2.3.2 Mecanismo de acción

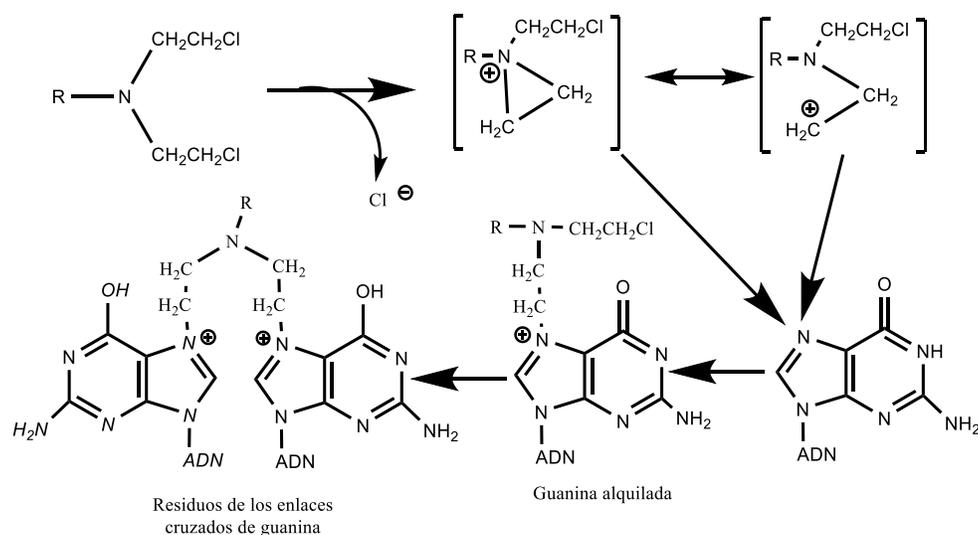
Una de las características de las células de cáncer de mama es una desregulación de su interacción con las proteínas de la matriz extracelular. El colágeno es el componente más abundante de la matriz extracelular y es responsable del mantenimiento de la arquitectura y la integridad del tejido conectivo. Es sabido que la interacción entre los receptores de integrina y las proteínas de la matriz extracelular, el colágeno, puede regular la inserción de células neoplásicas, la migración, la proliferación, la progresión y la supervivencia. Por lo tanto, los cambios en la cantidad, estructura y distribución de colágenos causados por agentes anticancerígenos pueden afectar el metabolismo y la función de las células de cáncer de mama humano.

Alkeran (melfalán), también conocido como mostaza L-fenilalanina, mostaza de fenilalanina, L-PAM o L-sarcolisina, es un derivado de fenilalanina de mostaza nitrogenada. El Melfalán es el isómero L activo del compuesto y fue sintetizado por primera vez en 1953 por Bergel y Stock. El isómero D, conocido como medfalan, es menos activo contra ciertos tumores de animales y la dosis necesaria para producir efectos en los cromosomas es mayor que la requerida con el isómero L. La forma racémica (DL-) se conoce como merfalfán o sarcolisina. El melfalán es prácticamente insoluble en agua. La fórmula molecular es  $C_{13}H_{18}N_2O_2Cl_2$  y el peso molecular es 305,20. El melfalán es un agente alquilante bifuncional que es activo contra enfermedades neoplásicas humanas selectivas. Se conoce químicamente como 4- [bis (2-cloroetil) amino] -L-fenilalanina. El melfalán es un medicamento contra el cáncer (antineoplásico), interfiere con el crecimiento de las células cancerosas y retarda su crecimiento y propagación en el cuerpo. Se usa para tratar mieloma múltiple (un tipo de cáncer de sangre), cáncer de ovario y cáncer de mama. La alquilación del ADN dentro del núcleo de las células es la reacción predominante, que causa daño a las células. El átomo de nitrógeno en la posición 7 y el átomo de oxígeno en la posición 6 en la molécula de guanina son los sitios más importantes para la alquilación del ADN (Esquema 10). El Melfalan muestra actividad

antitumoral, posiblemente a través de unión de ADN y ARN juntos y también a través de la inhibición de la síntesis de proteínas. Melfalán se ha utilizado para el tratamiento de melanoma maligno, sarcoma de tejido blando, neuroblastoma, cáncer de testículo, linfoma y sarcoma oterogénico. <sup>38</sup>



(4-bis(2-cloroetilen)amino-L-fenilalanina) (1)

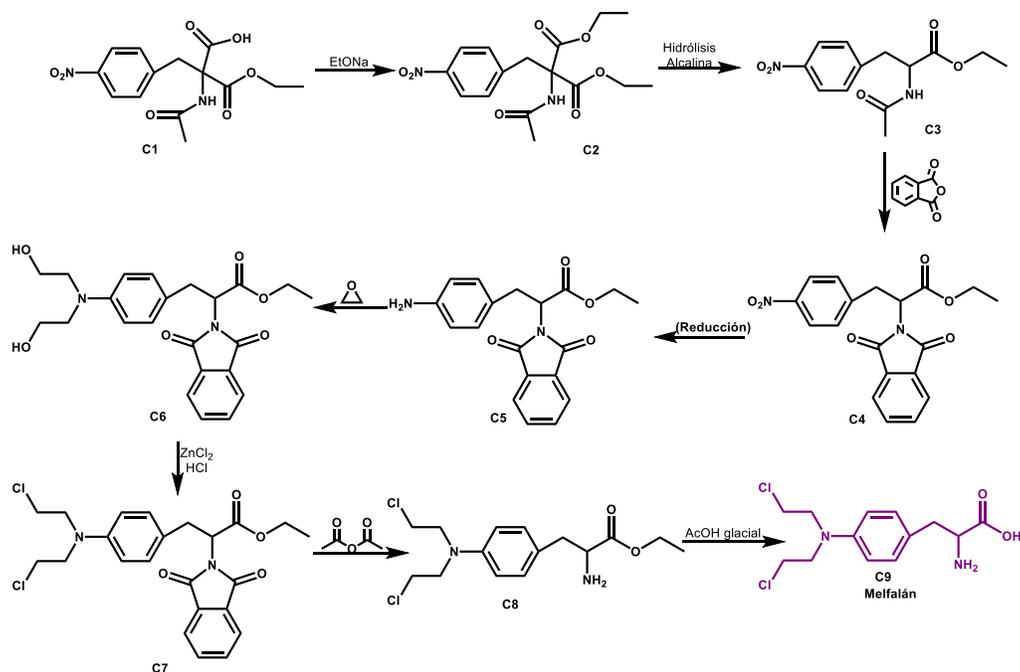


**Esquema 10.** Mecanismo de alquilación de ADN de guanina.

### 2.3.3 Síntesis del Melfalán

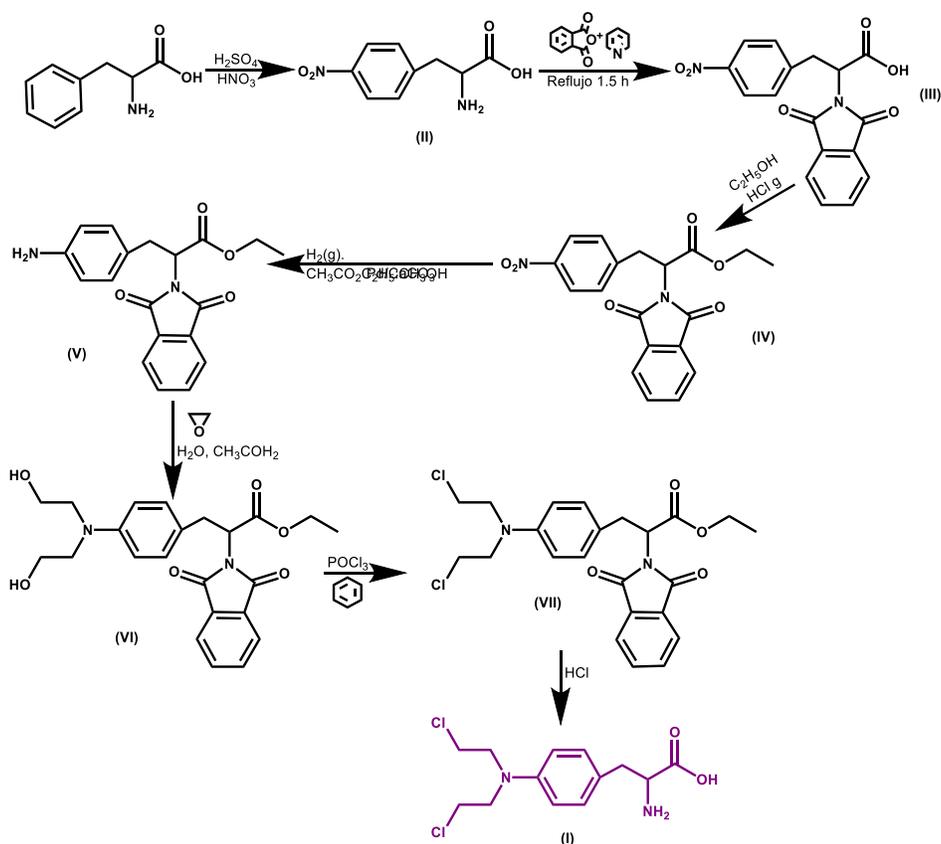
Los desarrollos en el campo de los agentes inhibidores de tumores o leucemia revelan que los derivados de  $\alpha$ -aminoácidos juegan un papel crucial en la síntesis de tales fármacos. La razón detrás de esto se debe en gran medida al descubrimiento de efectos antimetabolitos con los análogos de aminoácidos esenciales.

La primera síntesis fue reportada en 1952 por F. Bergel y J.A. Stooch (Esquema 11). En esta síntesis se utiliza el ácido 2-acetoamido-2-carboxietil-3-(4-nitrobenzil) propanoico (C1), que se hace reaccionar con el etóxido de sodio para obtener al malonato de L-fenilalanina (C2), el cual, mediante una hidrólisis alcalina se descarboxila obteniendo el C3. Después de proteger el grupo amino con anhídrido ftálico (C4), se llevó a cabo la reducción del grupo nitro, obteniendo (C5). Posteriormente se hizo reaccionar con óxido de etileno y formar C6, el cual se halogenó con cloruro de zinc y ácido clorhídrico (C7). Finalmente se hidrolizó en dos pasos, usando anhídrido acético y ácido acético glacial (C8) para obtener el Melfalán.<sup>39</sup>



**Esquema 11.** Primera Síntesis de melfalán.

La síntesis de melfalán también se ha llevado a cabo en varias etapas (Esquema 12), comenzando con el aminoácido DL-fenilalanina. Primero se llevó a cabo la nitración del anillo de benceno de la DL-fenilalanina en la posición *p*. En el segundo paso se protege el grupo amino de *p*-nitro-DL-fenilalanina (II) y se trató con anhídrido ftálico, convirtiendo el grupo amino en el grupo *N*-ftaloil (III). En la tercera etapa, el grupo carboxilo se convierte en éster etílico mediante esterificación de *p*-nitro-*N*-ftaloil-DL-fenilalanina con etanol (IV) en exceso. En la cuarta etapa, la hidrogenación catalítica del éster etílico de la *p*-nitro-*N*-ftaloil-DL-fenilalanina (IV), da el éster etílico de *p*-amino-*N*-ftaloil-DL-fenilalanina, se convirtió posteriormente en su sal hidroc্লoruro (V). En la quinta etapa, la sal hidroc্লoruro se trató con óxido de etileno en ácido acético glacial y dio como resultado la formación de (VI). En la sexta etapa, el tratamiento de (VI) con oxocloruro de fósforo, dio como resultado la formación de *p*-di (2-cloroetilamino) *N* - ftaloil - DL - fenilalanina (VII). Finalmente, con una hidrólisis ácida del último compuesto en ácido clorhídrico da como resultado el melfalán (I) como un polvo cristalino blanco. Todos los rendimientos fueron bastante buenos y aceptables.<sup>38</sup>



**Esquema 12.** Síntesis de melfalán.

Con base en lo mencionado anteriormente sobre las porfirinas, los dendrímeros y el uso del melfalán como un fármaco anti cancerígeno, en el presente trabajo de investigación nos propusimos como objetivo unir estos tres tipos de estructuras en una sola para contribuir en el conocimiento de los dendrímeros acarreadores de fármacos.

### **3. Objetivo general**

El presente trabajo de investigación propone la síntesis de porfirinas dendriméricas con brazos dendríticos tipo PAMAM. Las porfirinas serán empleadas como acarreadores de fármacos, los cuales al formar conjugados dendriméricos tendrán en su estructura al melfalán, un fármaco empleado para el tratamiento cáncer de mama y próstata.

#### **3.1 Objetivos particulares**

Síntetizar las porfirinas con ocho grupos hidroxilos en su estructura.

Obtener los dendrímeros tipo PAMAM de primera y segunda generación a partir de la porfirina obtenida en el punto anterior.

Obtener los conjugados del melfalán con los Porfirin-PAMAM dendrímeros del punto anterior.

Realizar la caracterización de cada uno de los compuestos obtenidos.

Determinar la citotoxicidad de los conjugados con dos líneas celulares cancerosas humanas la de próstata y la mama.

## 4. Estrategia experimental

Para llevar a cabo la síntesis de nuestro centro porfirínico seguiremos la síntesis de tetrafenilporfirinas diseñada por Adler-Longo, debido a que el grupo de investigación ya ha trabajado con esta reacción obteniendo rendimientos muy aceptables.

Por otro lado, para el crecimiento del dendrímero hemos decidido utilizar la síntesis divergente, la que se desarrolló en el período 1979-1985 por Tomalia D. A. y col. Debido a los buenos rendimientos y pocos problemas de purificación, en la cual se necesitan de dos reacciones para pasar de una generación a la siguiente: primero la activación de los grupos funcionales de la superficie y la segunda es el acoplamiento de monómeros de ramificación.

Para llevar a cabo la formación de conjugado de nuestros dendrímeros de generación 1.0 y generación 2.0 con el Melfalán realizaremos la reacción para la formación de amidas, llevando esta reacción por temperaturas superiores a los 100 °C, asegurándonos que se llevará la formación del compuesto y no la formación de las sales correspondientes.

Por último, caracterizaremos cada uno de los productos obtenidos por los métodos espectroscópicos; resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , FTIR, UV-vis, espectrometría de masas y análisis elemental.

Una vez que confirmemos la obtención de los conjugados dendriméricos porfirin-melfalán, estos serán enviados a realizarles pruebas de citotoxicidad, con la finalidad de conocer la actividad anticancerígena en cada uno de ellos.

## **5. Parte experimental**

### **5.1. EQUIPOS**

#### **Resonancia Magnética Nuclear**

BRUKER ADVANCE 300 MHz  $^1\text{H}$  y 75 MHz  $^{13}\text{C}$ .

VARIAN UNITY 300 MHz  $^1\text{H}$  y 75 MHz  $^{13}\text{C}$ .

Referencia  $^1\text{H}$  Tetrametilsilano ( $\text{Me}_4\text{Si}$ , 0.00 ppm).

Disolventes:

Cloroformo deuterado

Metanol deuterado

Agua deuterada

#### **Espectrofotometría de UV-vis**

Espectrofotómetro UV-vis Cary 50 Bio.

#### **Espectrofotometría de FT-IR**

Espectrofotómetro FT-IR MAGNA.700

#### **Espectrometría de Masas**

Espectrómetro de masas JEOL JMS AX505 HA.

Espectrómetro de masas Bruker Esquire.

MALDI-TOF Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer 34000033 Deflector  
Spec. No. 3.

## **Análisis Elemental**

Thermo Scientific, modelo Flash 2000.

## **Reactivos y Disolventes**

### **Reactivos**

3,5-dimetoxibenzaldehído 98% (Aldrich)

Ácido propiónico 99.5% (Aldrich)

Acrilato de metilo 99% (Aldrich)

Carbonato de potasio, 99 % (Aldrich)

Etilendiamina 99% (Aldrich)

Gel de sílice para cromatografía en columna MERCK SILICA GEL 60 Å (MALLA 70-230)

Melfalán (Aldrich)

Metil bromoacetato 97% (Aldrich)

Pirrol (Aldrich)

Tribromuro de boro 1 M. en diclorometano (Aldrich)

### **Disolventes**

Acetato de etilo

Acetona

Diclorometano

Hexano

Etanol

Metanol

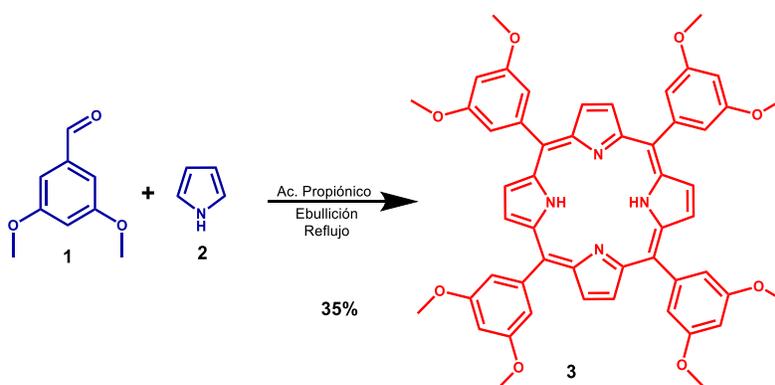
El acetato de etilo, acetona, diclorometano y hexano, fueron purificados por medio de destilación simple empleando como agente desecante hidróxido de potasio (acetato de etilo), cloruro de calcio (acetona y diclorometano) u óxido de calcio (metanol y etanol).

## 6. Metodología

### 6.1. Síntesis de porfirina meso sustituida

#### 6.1.1. Síntesis de 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dimetoxifenil)porfirina

En un matraz bola se adicionó 3,5-dimetoxibenzaldehído (**1**) (6.01 mmol), ácido propiónico (5 mL) y pirrol (**2**) (6.01 mmol) en exceso. Se colocó a agitación constante a 180°C durante 18 h. Al término de este tiempo se le adicionó ácido propiónico nuevamente (2 mL), se observó el término de la reacción mediante cromatografía en placa, para finalizar la reacción se adicionó agua, se enfrió la mezcla de reacción. Posteriormente, se filtró al vacío y se lavó con agua tibia hasta que el agua de lavado tuviera un pH neutro. El sólido se lavó con metanol y etanol hasta obtener un sólido de color purpura; el cual se purificó en columna cromatográfica con gel de sílice (70:230). Obteniéndose 390 mg (0.456 mmol) de porfirina **3** (Esquema 1).



**Esquema 1.** Síntesis de la porfirina **3**.

Sólido purpura. Rendimiento de 35%.

UV-vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\lambda_{nm}$ = 648, 588, 549, 514, 457, 417, 304, 279, 231.

IR (KBr  $\text{cm}^{-1}$ ): 3316, 2923, 2835, 1723, 1590, 1452, 1420, 1353, 1294, 1202, 1154, 1062, 1017, 976, 917, 884, 843, 797, 741, 695, 625, 539, 457, 434.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_{\text{H}}$ : 8.93 (s, 8H, Pirrol), 7.40 (d, 8H,  $J = 3$  Hz, Ar), 6.90 (t, 4H,  $J = 2.25$  Hz, Ar), 3.96 (s, 24H, O- $\text{CH}_3$ ), -2.82 (an, 2H, Pirrol).

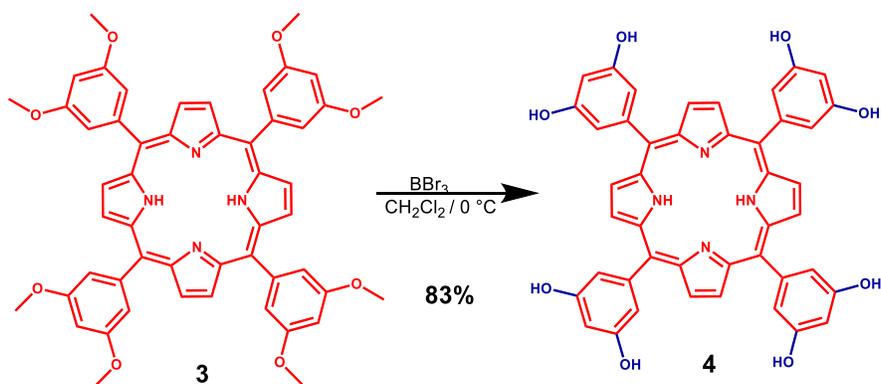
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_{\text{C}}$ : 169.2 (C-O), 157.0 (C-Pirrol), 144.2 (CH-Pirrol), 131.0 (C-Ar), 119.2 (CH-pirrol), 115.0 (CH-Ar), 101.3 (CH-Ar), 55.4 ( $\text{CH}_3$ -O).

EM FAB $^+$ (m/z): 854.

Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{52}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_8$ : C 73.05, H 5.42, N 6.55, O 14.97%.

### 6.1.2. Síntesis de 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dihidroxifenil)-porfirina.

En un matraz de bola de 25 mL, con agitación, se colocó la porfirina **3** (740 mg, 0.866 mmol) y se disolvió en diclorometano seco (20 mL). Se enfrió la solución a 0 °C con un baño de hielo y agua. Posteriormente, se añadió lentamente tribromuro de boro (7.27 mL, 7.27 mmol) de una solución 1 M en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante por 24 h. cuando terminó la reacción se evaporaron los disolventes obteniéndose un sólido de color verde, este mismo se disolvió en éter, se lavó 3 veces con bicarbonato de sodio, se filtró y se evaporó el disolvente, obteniéndose (533 mg, 718 mmol) de la porfirina **4**.



**Esquema 2.** Síntesis de la porfirina **4**

Sólido purpura. Rendimiento de 83%.

UV-vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , nm): 646, 616, 592, 546, 514, 420, 233.

IR (KBr  $\text{cm}^{-1}$ ): 3321, 2918, 2849, 1594, 1427, 1357, 1150, 1077, 997, 925, 878, 852, 800, 769, 721, 694, 547, 518, 476.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm)  $\delta_{\text{H}}$ : 8.93 (s, 8H, Pirrol), 7.40 (d, 8H,  $J = 3$  Hz, Ar), 6.90 (t, 4H,  $J = 2.25$  Hz, Ar), -2.82 (an, 2H, Pirrol).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , ppm)  $\delta_{\text{C}}$ : 157.0 (C-OH), 144.0 (C-Ar), 131.0 (C-Pirrol), 119.2 (CH-Pirrol), 115.3 (CH-Ar), 101.8 (CH-Ar).

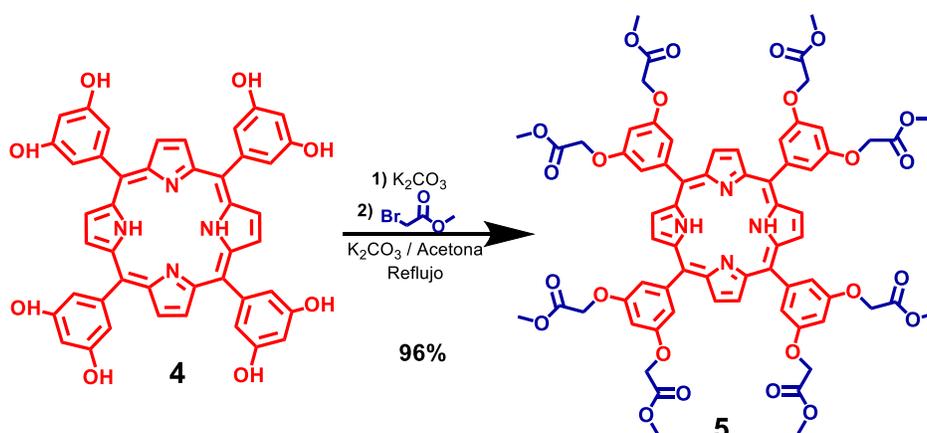
EM FAB $^+$ (m/z): 742

Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{44}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8$ : C 71.15, H 4.07, N 7.54, O 17.23%.

## 6.2. Síntesis del porfirin-dendrímico generación 0.5

En un matraz se colocó la porfirina **4** (140 mg, 0.188 mmol) y se disolvió en acetona (40 mL) se dejó en agitación, posteriormente se adicionó carbonato de potasio 208 mg (1.507 mmol), después se adicionó el bromo acetato de metilo 0.14 mL (1.507 mmol), la mezcla de reacción se calentó a 130 °C y en agitación constante por 24

h. La reacción se monitoreó por cromatografía en placa y cuando se observó la ausencia de uno de los reactivos se paró la reacción. La mezcla de reacción se filtró y el disolvente se evaporó en el rotavapor, el sólido resultante se lavó con hexano y acetato de etilo. Obteniéndose un sólido de color púrpura (135 mg, 0.098 mmol).



**Esquema 3.** Síntesis de dendrímero **5** generación 0.5.

Sólido púrpura. Rendimiento de 96%.

UV-vis ( $CHCl_3$ , nm): 651, 589, 549, 515, 455, 420, 276, 244.

IR (KBr  $cm^{-1}$ ): 3315, 2951, 2922, 2851, 1740, 1590, 1431, 1351, 1285, 1211, 1155, 1083, 977, 920, 847, 801, 731, 691, 584.

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ , ppm)  $\delta_H$ : 8.91 (s, 8H, Pirrol), 7.43 (d, 8H,  $J = 2.2$  Hz, Ar), 6.98 (t, 4H,  $J = 2.2$  Hz, Ar), 4.82 (s, 8H,  $CH_2-O$ ), 3.82 (m, 12H,  $CH_3$ ), -2.84 (an, 2H, NH).

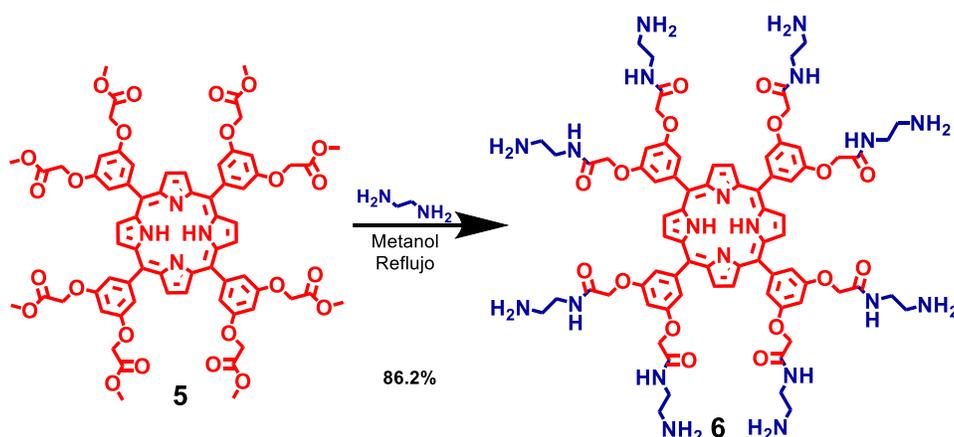
$^{13}C$ -NMR ( $CDCl_3$ , ppm)  $\delta_C$ : 169.06 (C=O), 157.0 (Ar-O), 144.0 (Ar), 131.0 (C-Pirrol) 119.20 (C-Ar), 115.03 C-(Ar), 101.8 (C-Ar), 65.4 ( $CH_2-O$ ), 52.3 ( $CH_3-O$ ).

Electro Spray (m/z): 1318

Análisis elemental calculado para  $C_{68}H_{62}N_4O_{24}$ : C 61.91, H 4.74, N 4.25, O 29.11 %.

### 6.3. Síntesis del porfirin-dendrímtero generación 1.0

En un matraz se colocó el dendrímtero **5** (250 mg, 0.190 mmol) y se disolvió en 40 mL de metanol, la mezcla de reacción se calentó a 130 °C en agitación constante. Posteriormente se adicionó la etilendiamina (0.1 mL, 1.52 mmol) gota a gota en exceso, se dejó en agitación constante durante 12 h, la reacción se monitoreó por cromatografía en placa y cuando se observó la ausencia de uno de los reactantes se paró la reacción. El disolvente se evaporó, el sólido resultante se lavó con hexano y acetato de etilo, obteniéndose (252 mg, 0.163 mmol) del dendrímtero **6**.



**Esquema 4.** Síntesis de dendrímtero **6** generación 1.0.

Sólido morado oscuro. Rendimiento de 86%.

UV-vis ( $\text{CH}_3\text{OH}$ , nm): 648, 588, 547, 513, 418, 207.

IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3269, 3074, 2923, 1648, 1594, 1539, 1428, 1349, 1292, 1162, 1074, 1040, 979, 921, 856, 800, 728, 690, 578, 500, 435.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , ppm)  $\delta_{\text{H}}$ : 8.81 (s, 8H, Pírrol), 8.39 (an, 8H, Ar), 8.01 (an, 4H, Ar), 4.04 (an, 8H, NH), 3.38 (m, 32H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 2.89 (an, 16H,  $\text{NH}_2$ ).

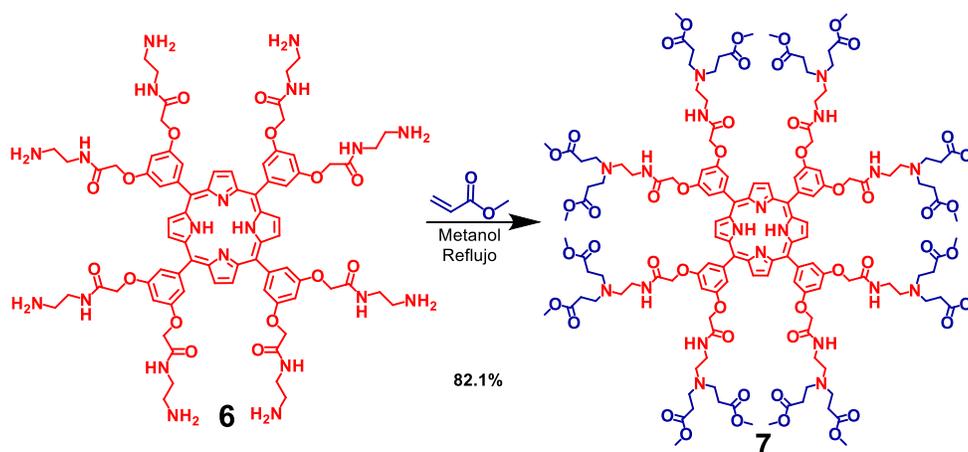
$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , ppm)  $\delta_{\text{c}}$ : 175.5 (C=O), 158.4 (C Ar-O), 138.7 (Ar), 124.5 (Pirrol), 115.4 (Ar), 107.5 (Ar), 60.4 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 47.2 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 40.0 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 39.0 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ ), 38.3 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ ).

Electro Spray (m/z): 1542

Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{76}\text{H}_{94}\text{N}_{20}\text{O}_{16}$ : C 59.13, H 6.14, N 18.15, O 16.58%.

#### 6.4. Síntesis del porfirin-dendrímico generación 1.5

En un matraz se colocó el dendrímico **6** (250 mg, 0.161 mmol) y se disolvió en metanol (40 mL), se incrementó la temperatura hasta  $130\text{ }^\circ\text{C}$  y se colocó en agitación constante hasta que alcanzó su máxima solubilidad. Se adicionó el acrilato de metilo (0.11 mL, 1.295 mmol) en exceso gota a gota se dejó en agitación constante, la mezcla de reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina y cuando se observó la ausencia de uno de los reactantes se paró la reacción, el disolvente se evaporó en el rotavapor; el sólido resultante se lavó con hexano y diclorometano, obteniéndose (386 mg, 0.132 mmol) del dendrímico **7**.



Esquema 5. Síntesis de dendrímico **7** generación 1.5.

Sólido morado oscuro. Rendimiento de 82.1%.

UV-vis ( $\text{CHCl}_3$ , nm): 647, 590, 549, 515, 421, 420, 277, 245.

IR ( $\text{KBr cm}^{-1}$ ): 3362, 3321, 2921, 2851, 1730, 1665, 1593, 1529, 1431, 1353, 1286, 1252, 1197, 1159, 1067, 981, 921, 840, 802, 735, 692, 587.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_{\text{H}}$ : 8.91 (s, 8H, Pirrol), 7.43 (d, 8H,  $J = 2.2$  Hz, Ar), 6.98 (t, 4H,  $J = 2.2$  Hz, Ar), 4.82 (s, 8H,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 3.82 (m, 12H,  $\text{CH}_3$ ), -2.84 (an, 2H, NH).

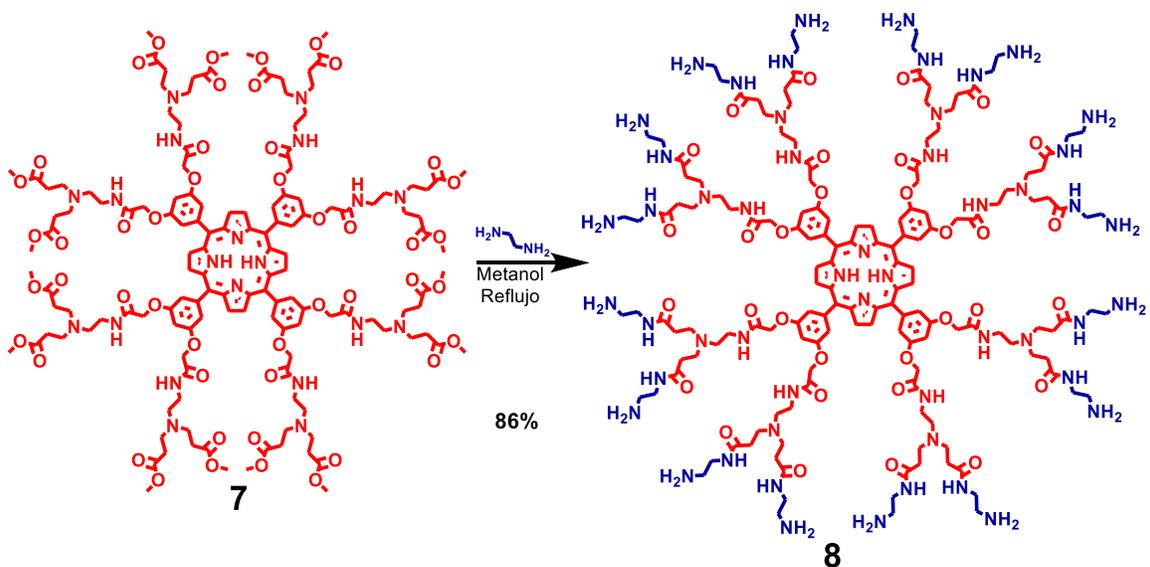
$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)  $\delta_{\text{C}}$ : 169.1 (C=O), 157.0 (C-Ar-O), 144.0 (CH-Ar), 131.0 (C-Pirrol), 119.2 (CH-Pirrol), 115.0 (CH-Ar), 101.8 (CH-Ar), 65.4 ( $\text{CH}_2\text{-O}$ ), 52.3 ( $\text{CH}_3\text{-O}$ ).

Electro Spray (m/z): 1542

Análisis elemental calculado para  $\text{C}_{140}\text{H}_{190}\text{N}_{20}\text{O}_{48}$ : C 57.56, H 6.56, N 9.59, O 26.29%.

## 6.5. Síntesis del porfirin-dendrímero generación 2.0

En un matraz se colocó la porfirina **7** (250 mg, 0.130 mmol) y se disolvió en metanol (40 mL), se elevó la temperatura hasta alcanzar 130 °C y se puso en agitación constante hasta que alcanzó su máxima solubilidad. Posteriormente se adicionó la etilendiamina (0.13 mL, 2.08 mmol) gota a gota en exceso, se dejó en agitación durante 12 h, se monitoreo por cromatografía en placa fina y cuando se observó la ausencia de uno de los reactantes se paró la reacción. El sólido resultante se lavó con hexano y diclorometano, obteniendo (245 mg, 0.072 mmol) de dendrímero **8**.



**Esquema 6.** Síntesis de dendrímero **8** generación 2.0.

Sólido purpura. Rendimiento de 85.5%.

UV-vis (CH<sub>3</sub>OH, nm): 644, 626, 587, 571, 515, 491, 419, 383, 282, 260, 208.

IR (KBr cm<sup>-1</sup>): 3412, 3291, 3085, 2945, 1647, 1551, 1465, 1438, 1383, 1357, 1327, 1298, 1166, 1121, 1038, 925, 675, 620, 599, 540, 517, 458, 442.

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, ppm) δ<sub>H</sub>: 8.91 (an, 8H, pirrol), 8.01 (an, 8H, Ar), 7.08 (an, 4H, Ar), 3.82 (an, 8H, NH<sub>2</sub>), 3.29 (an, 64H, NH<sub>2</sub>), 2.85 - 2.74 (an, 64H, CH<sub>2</sub>-N), 2.59 (an, 16H, NH), 2.39 (an, 32H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 2.16 (an, 32H, NH<sub>2</sub>).

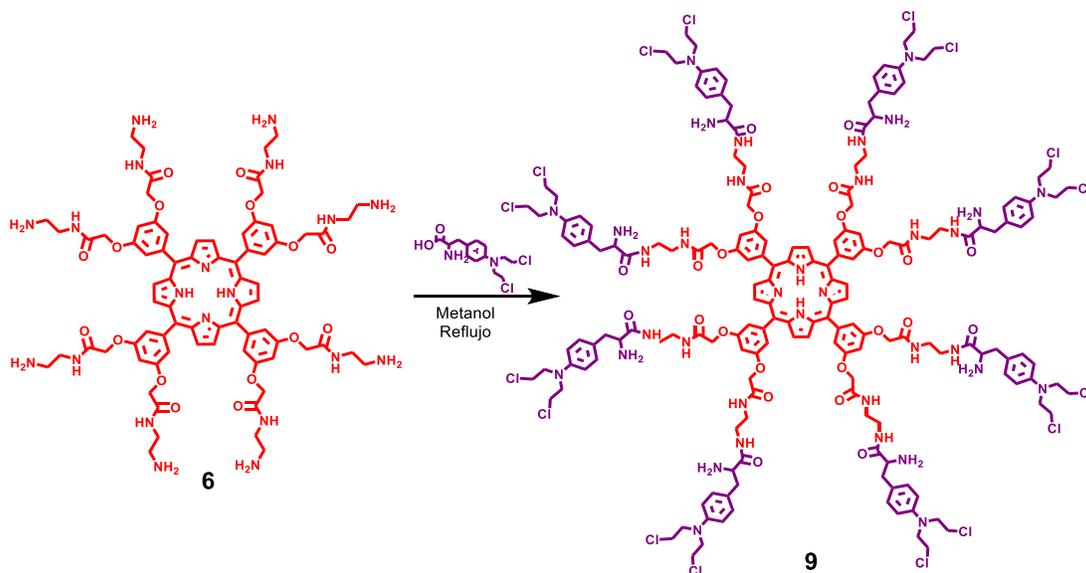
<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, ppm) δ<sub>C</sub>: 174.6 (C=O), 171.1 (C=O), 164.5 (C=O), 150.1 (C-Ar-O), 136.4 (Ar<sub>ipso</sub>), 129.7 (C-Pirrol), 117.5 (Ar<sub>ipso</sub>), 100.9 (CH-Ar), 75.4 (CH<sub>2</sub>-O), 52.2 (CH<sub>2</sub>-N), 52.1 (CH<sub>2</sub>-N), 51.1 (CH<sub>2</sub>-N), 50.8 (CH<sub>2</sub>-N), 47.1 (CH<sub>2</sub>-N), 44.4 (CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 40.4 (CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 39.6 (CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 32.7 (CH<sub>2</sub>-N), 30.8 (CH<sub>2</sub>-N).

Electro Spray (m/z): 3369

Análisis elemental calculado para C<sub>156</sub>H<sub>254</sub>N<sub>52</sub>O<sub>32</sub>: C 55.60, H 7.60, N 21.61, O 15.19%.

## 6.6. Síntesis del conjugado porfirin-melfalán-dendrímico de generación 1.0

En un matraz se colocó el dendrímico **6** (100 mg, 0.063 mmol) y se disolvió en metanol (20 mL), se incrementó la temperatura hasta 130 °C en agitación constante. Se adicionó el Melfalán (0.153 mg, 0.504 mmol) en exceso, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante por 96 h. La reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina y cuando se observó la ausencia de uno de los reactantes se paró la reacción y se evaporó el disolvente en el rotavapor. Obteniéndose un sólido de color café claro (194 mg, 0.038 mmol).



**Esquema 7.** Síntesis del conjugado de generación 1.0 compuesto **9**.

Sólido purpura. Rendimiento de 81%.

UV-vis (CH<sub>3</sub>OH, nm): 422, 385, 260, 227, 206.

IR (KBr cm<sup>-1</sup>): 3402, 2954, 2923, 2057, 1743, 1614, 1519, 1447, 1391, 1355, 1237, 1118, 1045, 924, 812, 735, 641, 531.

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, ppm) δ<sub>H</sub>: 7.20 (an, 16H, Ar porfirin), 7.09 (an, 32H, Ar melf), 6.69 (an, 4H, Ar), 4.26 (an, 18H, CH<sub>2</sub>-O), 3.87 (an, 16H, NH), 3.78 (an, 8H, NH), 3.76 (an, 8H,

NH), 3.60 (an, 32H, CH<sub>2</sub>-N), 3.33 (s, 32H, CH<sub>2</sub>), 3.29, (s, 32H, CH<sub>2</sub>), 3.24 (s, 16H, CH<sub>2</sub>).

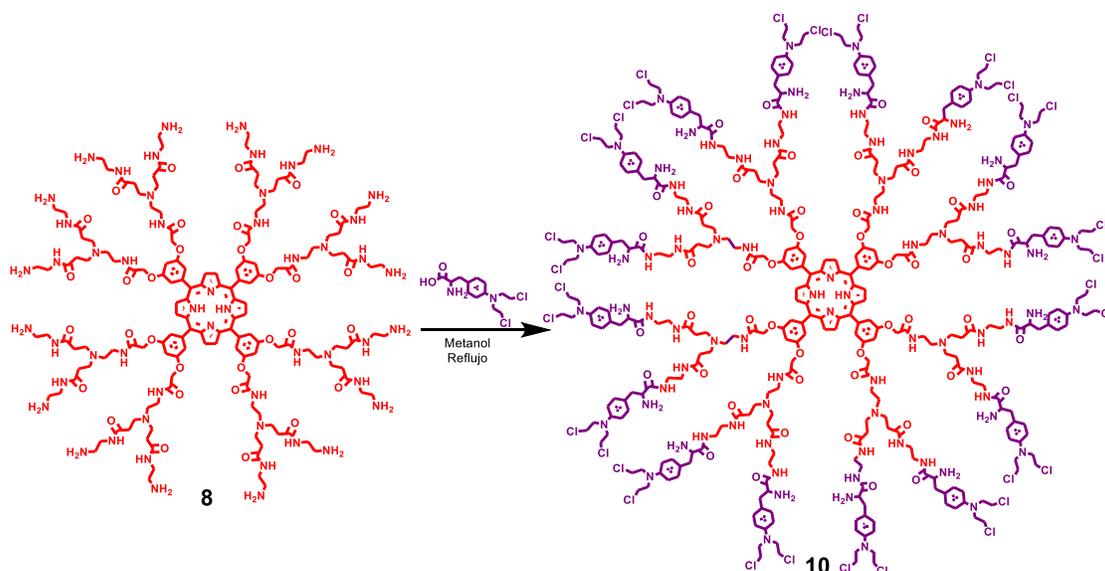
<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, ppm) δ<sub>C</sub>: 173.8 (C=O), 170.3 (C=O), 160.3 (Ar<sub>ipso</sub>), 146.2 (Ar), 130.5 (pirrol), 123.2 (Ar<sub>ipso</sub>), 118.0 (Ar), 113.1 (Ar), 66.1 (CH<sub>2</sub>-O), 54.2 (CH<sub>2</sub>), 48.9 (CH<sub>2</sub>-N), 41.1 (CH), 36.5 (CH<sub>2</sub>), 35.3 (CH<sub>2</sub>), 34.8 (CH<sub>2</sub>), 30.2 (CH<sub>2</sub>-Cl).

Electro Spray (m/z): 3839

Análisis elemental calculado para C<sub>180</sub>H<sub>222</sub>Cl<sub>16</sub>N<sub>36</sub>O<sub>24</sub>: C 56.28, H 5.83, Cl 14.77, N 13.13, O 10.00%.

## **6.7. Síntesis del conjugado porfirin-melfalán-dendrímico de generación 2.0**

En un matraz se colocó el dendrímico **8** (40 mg, 0.011 mmol) y se disolvió en metanol (20 mL), se incrementó la temperatura hasta 130 °C en agitación constante. Se adicionó el Melfalán (0.115 mg, 0.176 mmol) en exceso, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante por 240 h. La reacción se monitoreó por cromatografía en placa fina y cuando se observó la ausencia de uno de los reactantes se paró la reacción y se evaporó el disolvente en el rotavapor. Obteniéndose un sólido de color café claro (102 mg, 0.012 mmol).



**Esquema 8.** Síntesis del conjugado de generación 2.0 compuesto **10**.

Sólido purpura. Rendimiento de 77%.

UV-vis (CH<sub>3</sub>OH, nm): 418, 409, 303, 283, 259, 227, 207.

IR (KBr cm<sup>-1</sup>): 3405, 3064, 2973, 2947, 2740, 2678, 2626, 2533, 2495, 1740, 1613, 1519, 1473, 1445, 1394, 1354, 1279, 1244, 1182, 1036, 923, 810, 771, 738, 656, 537, 460.

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, ppm) δ<sub>H</sub>: 7.06 (an, 64H, Ar<sub>Melf</sub>). 6.84 (an, 16H, Ar, Pirrol), 6.63 (an, 4H, Ar), 3.88 (an, 16H, CH<sub>2</sub>-O), 3.61 (an, 64H, CH<sub>2</sub>-Cl), 3.47 (an, 64H, CH<sub>2</sub>-Cl), 3.37 (an, 32H, NH<sub>2</sub>), 3.28 (an, 32H, CH<sub>2</sub>-N), 3.17 (an, 32H, CH<sub>2</sub>-Ar), 3.12 (an, 128H, CH<sub>2</sub>-N), 2.99 (an, 16H, CH).

<sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, ppm) δ<sub>C</sub>: 174.0 (C=O), 147.6 (Ar), 132.2 (pirrol), 131.9 (Ar), 125.6 (Ar<sub>ipso</sub>), 125.6 (Ar<sub>ipso</sub>), 114.2 (Ar), 114.1 (Ar), 60.1 (CH<sub>2</sub>-O), 57.8 (CH<sub>2</sub>), 54.8 (CH<sub>2</sub>), 54.7 (CH<sub>2</sub>), 54.5 (CH<sub>2</sub>), 48.4 (CH<sub>2</sub>-N), 42.1 (CH), 37.5 (CH<sub>2</sub>), 12. (CH<sub>2</sub>), 9.7 (CH<sub>2</sub>-Cl).

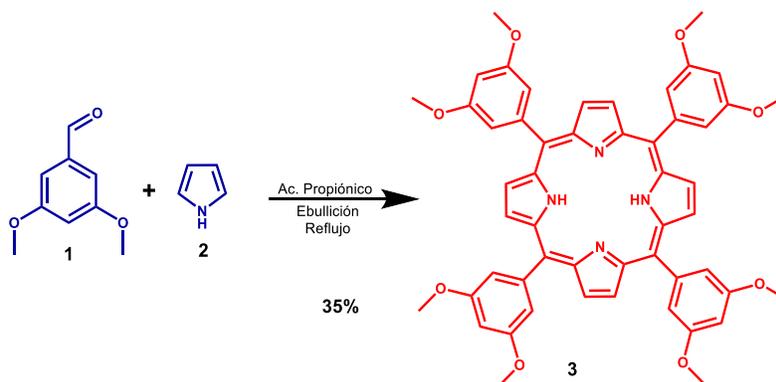
Electro Spray (m/z): 7945.01

Análisis elemental calculado para C<sub>364</sub>H<sub>510</sub>Cl<sub>32</sub>N<sub>84</sub>O<sub>48</sub>: C 54.89, H 6.45, Cl 14.24, N 14.77, O 9.64%.

## 7. Discusión de resultados

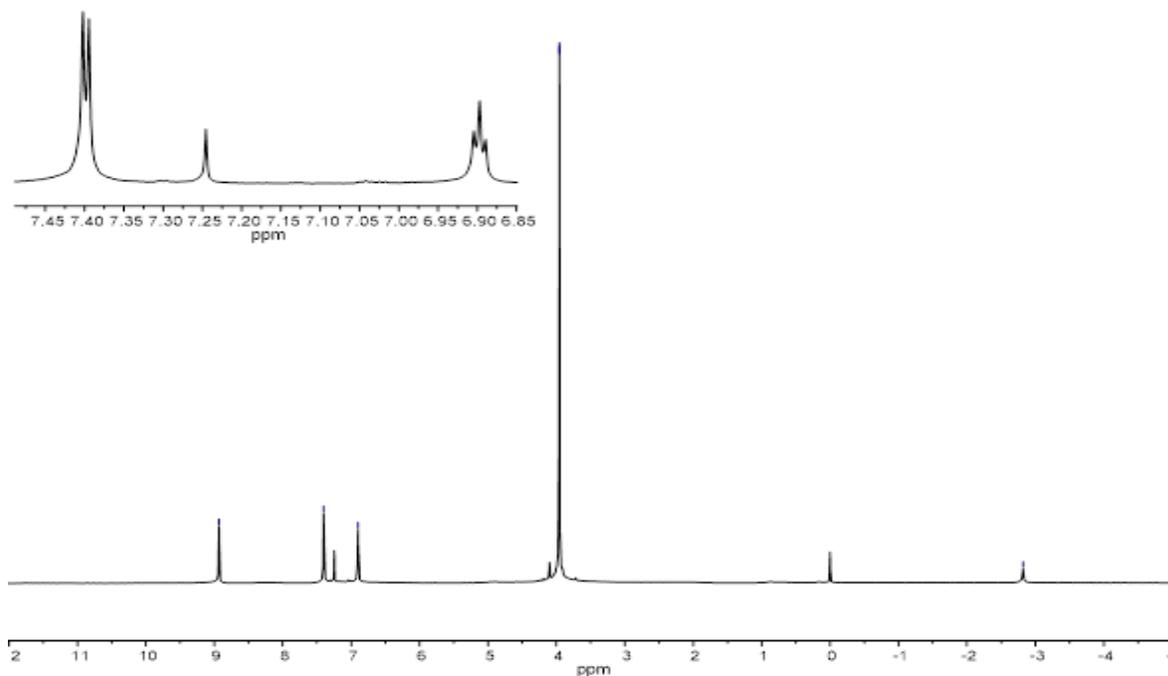
### 7.1. Obtención de 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dimetoxifenil)-porfirina

La porfirina 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dimetoxifenil)-porfirina (**3**) fue sintetizada a partir del 3,5-dimetoxibenzaldehído (**1**) (2.74 mmol) y el pirrol **2** (2.74 mmol) en ácido propiónico 5 mL. Obteniéndose la porfirina **3** (Esquema 1).



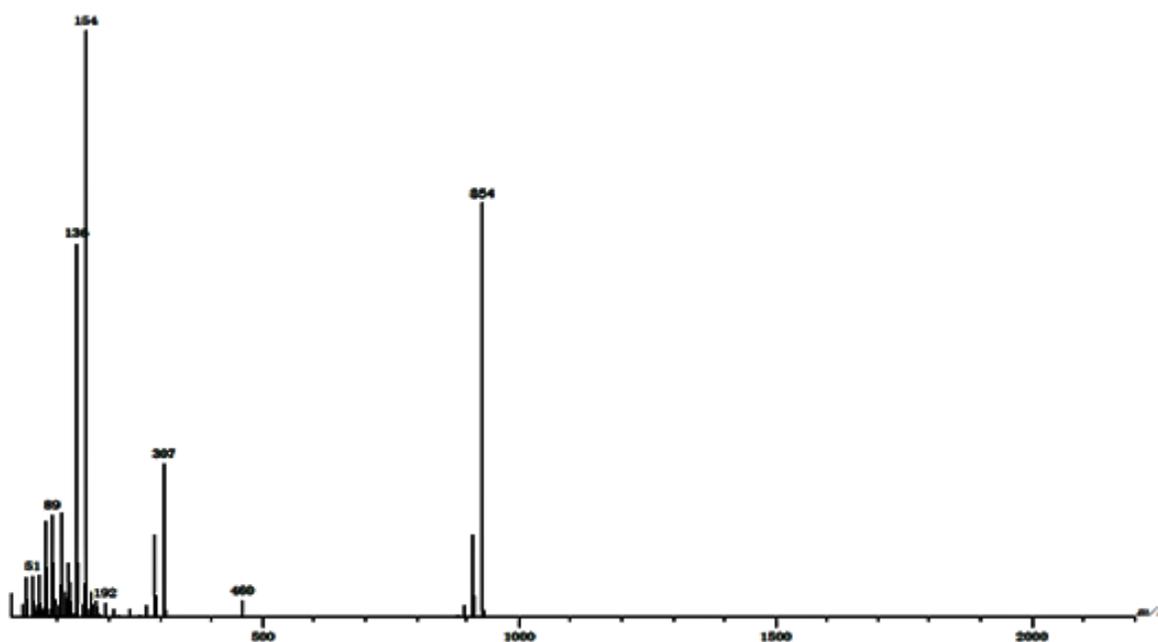
Esquema 1. Síntesis de la porfirina **3**.

La porfirina **3** fue caracterizada inicialmente por resonancia magnética de protón. En el espectro (Figura 1) se puede observar un singulete a  $\delta_H$  8.94 asignado a los protones externos del pirrol, un doblete a  $\delta_H$  7.41 correspondiente a los protones orto del anillo aromático con una constante de acoplamiento  $J= 2.3$  Hz, de igual manera se observó un triplete a  $\delta_H$  6.91 asignado a los protones en posición para del anillo aromático con una constante de acoplamiento  $J= 3$  Hz, a  $\delta_H$  3.97 se observó un singulete correspondiente a los grupos metoxilos y finalmente una señal a  $\delta_H$  -2.80 asignado a los protones internos de los pirroles.



**Figura 1.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  del compuesto **3**.

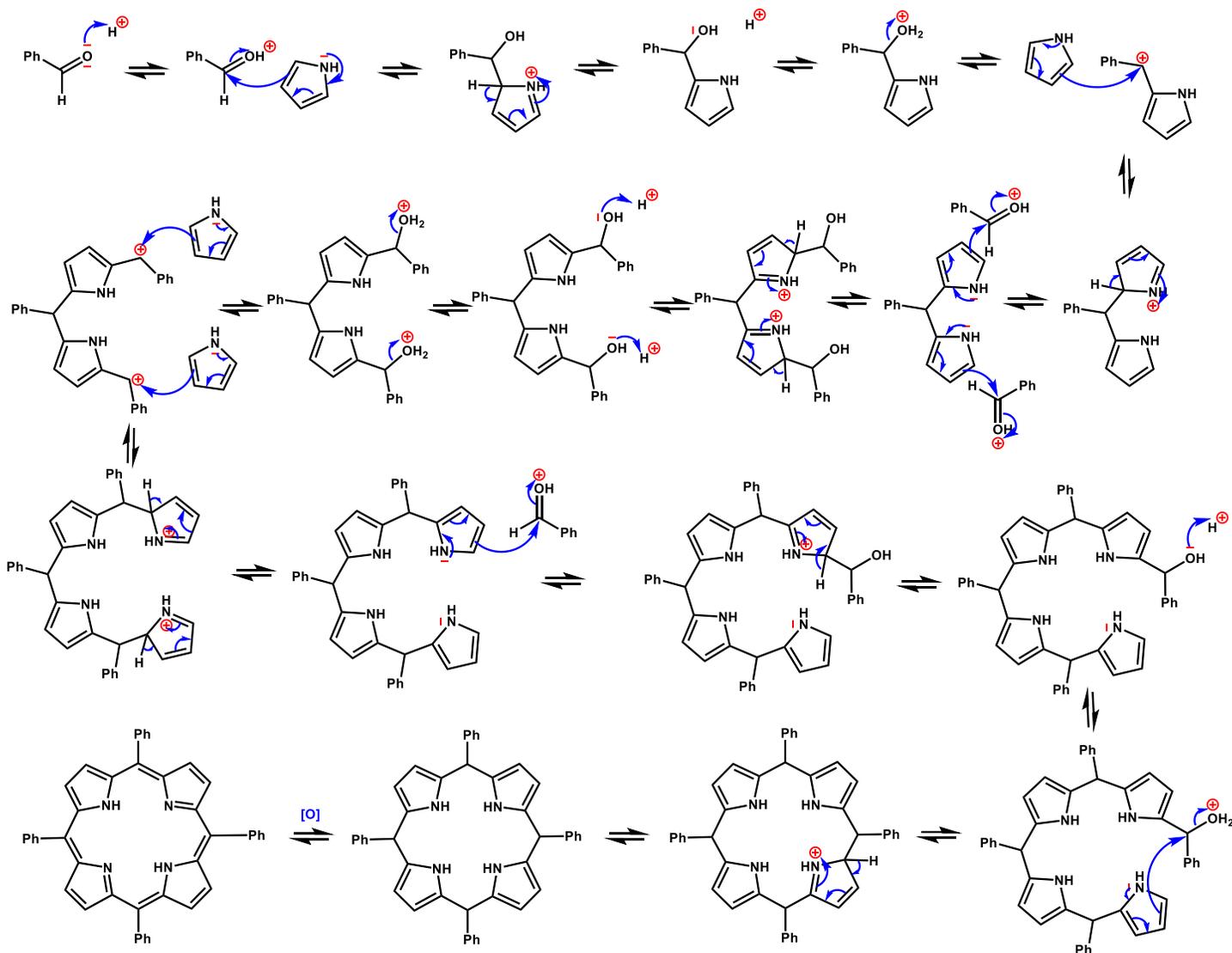
Se confirmó la obtención de compuesto **3** mediante espectrometría de masas FAB+ (Figura 2), en el espectro se observa un pico a 854 m/z, el cual corresponde a la masa molecular del compuesto.



**Figura 2.** Espectro de masas FAB+ del compuesto **3**.

### 7.1.1. Mecanismo de reacción para la formación de porfirinas

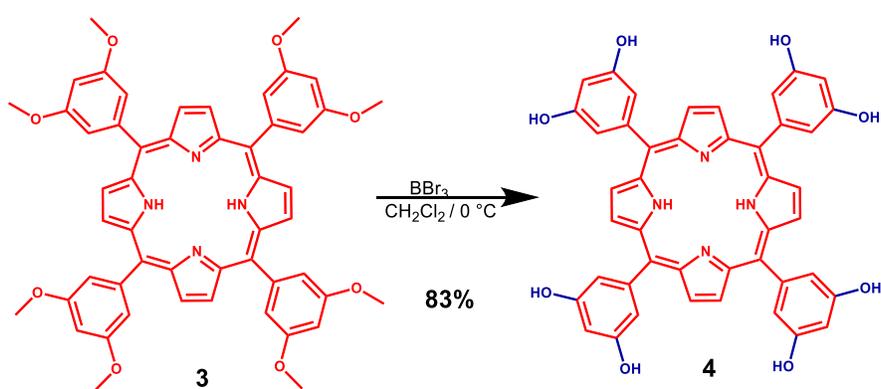
Se realiza la reacción de un pirrol y un aldehído (Síntesis de Rothmund). Comienza con la protonación del oxígeno del aldehído, seguido de un ataque nucleofílico de la doble ligadura del pirrol al carbonilo del aldehído protonado, continuando con un rearreglo en la estructura del pirrol y una segunda protonación para eliminar una molécula de agua, repitiendo el proceso 3 veces más a partir de segundo paso hasta llegar a la ciclación y por último terminar con una oxidación (Esquema 2).



Esquema 2. Mecanismo de reacción de la síntesis de la porfirina 3.

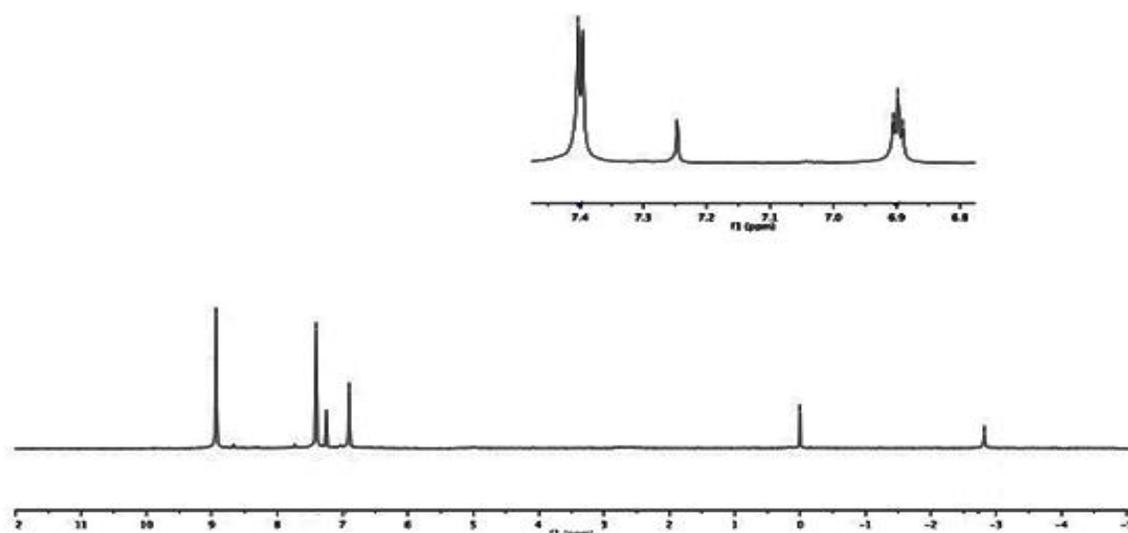
## 7.2. Obtención de 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dihidroxifenil)-porfirina

La porfirina 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dihidroxifenil)-porfirina (**4**) fue sintetizada a partir del 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dimetoxifenil)-porfirina (**3**) 740 mg (0.866 mmol) en diclorometano seco (20 mL), tribromuro de boro 7.27 mL (7.27 mmol) de una solución 1 M en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Obteniéndose la porfirina **4** (Esquema 3).



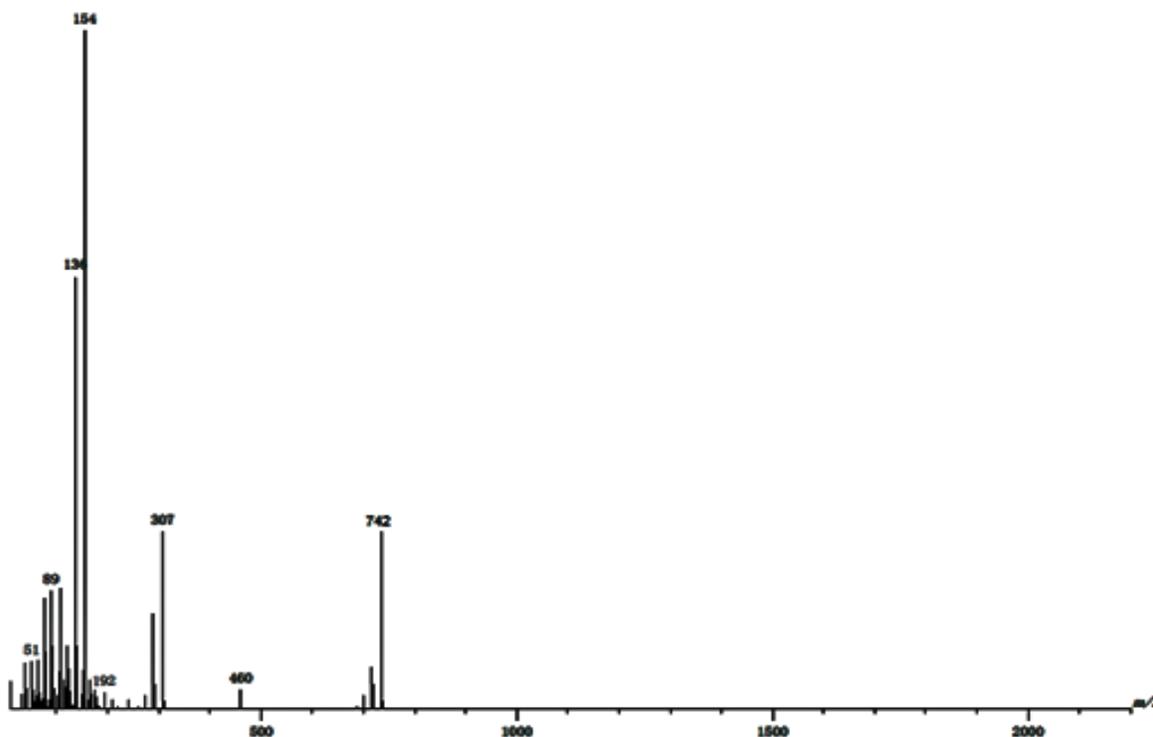
Esquema 3. Síntesis del compuesto **4**.

La porfirina **4** fue caracterizada inicialmente por resonancia magnética de protón, en el espectro (Figura 3) se puede observar un singulete a  $\delta_H$  8.93 asignado a los protones externos del pirrol, un doblete a  $\delta_H$  7.40 correspondiente a los protones orto del anillo aromático con una constante de acoplamiento  $J = 3$  Hz, de igual manera se observó un triplete a  $\delta_H$  6.91 asignado a los protones en posición para del anillo aromático con una constante de acoplamiento  $J = 2.3$  Hz, y finalmente una señal a  $\delta_H$  -2.80 asignado a los protones internos de la porfirina.



**Figura 3.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , 300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$  del compuesto **4**.

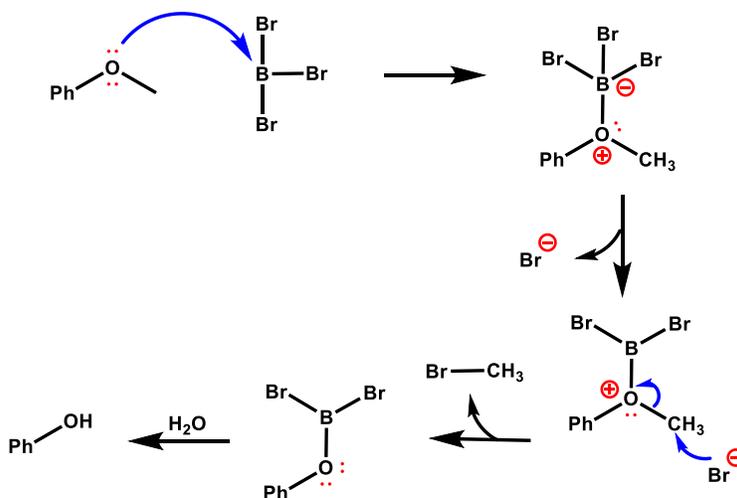
La obtención del compuesto **4** se confirmó mediante espectrometría de masas FAB+ (Figura 4), en el espectro se observa un pico a 742 m/z, el cual corresponde a la masa molecular del compuesto.



**Figura 4.** Espectro de masas FAB+ del compuesto **4**.

### 7.2.1. Mecanismo de reacción para la desprotección de fenoles

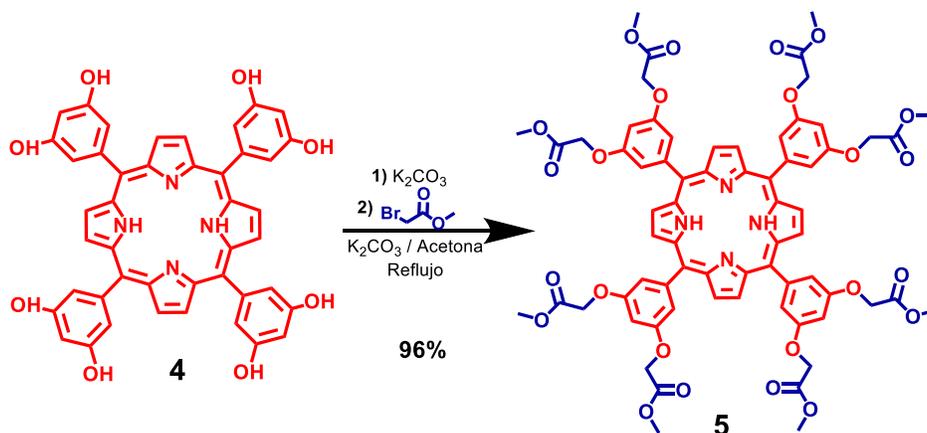
La desprotección de la porfirina se realizó por un tratamiento con  $\text{BBr}_3$ . Donde el grupo éter ataca al boro, convierte al resto grupo metiloxi en un buen grupo saliente (metil), el cual es atacado por el bromuro generando un bromuro de metilo ( $\text{S}_{\text{N}}2$ ) Esquema 4.



**Esquema 4.** Mecanismo de reacción para la desprotección de alcoholes.

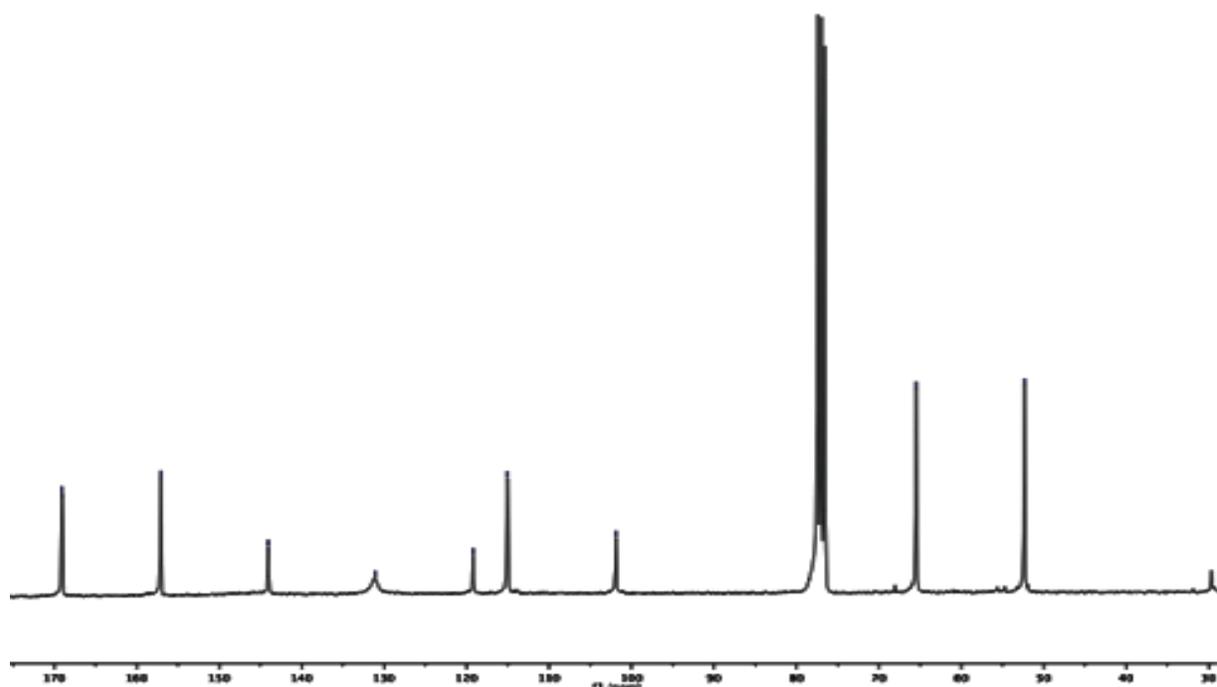
### 7.3. Obtención del porfirin-dendrímtero generación 0.5

El porfirin-dendrímtero generación 0.5 (**5**) fue sintetizado a partir del 5,10,15,20-Tetraquis(3',5'-dihidroxifenil)-porfirina (**4**) (140 mg / 0.188 mmol), carbonato de potasio (208 mg / 1.507 mmol) y el bromo acetato de metilo (0.14 mL / 1.507 mmol); en acetona (40 mL). Obteniéndose el compuesto **5** (Esquema 5).



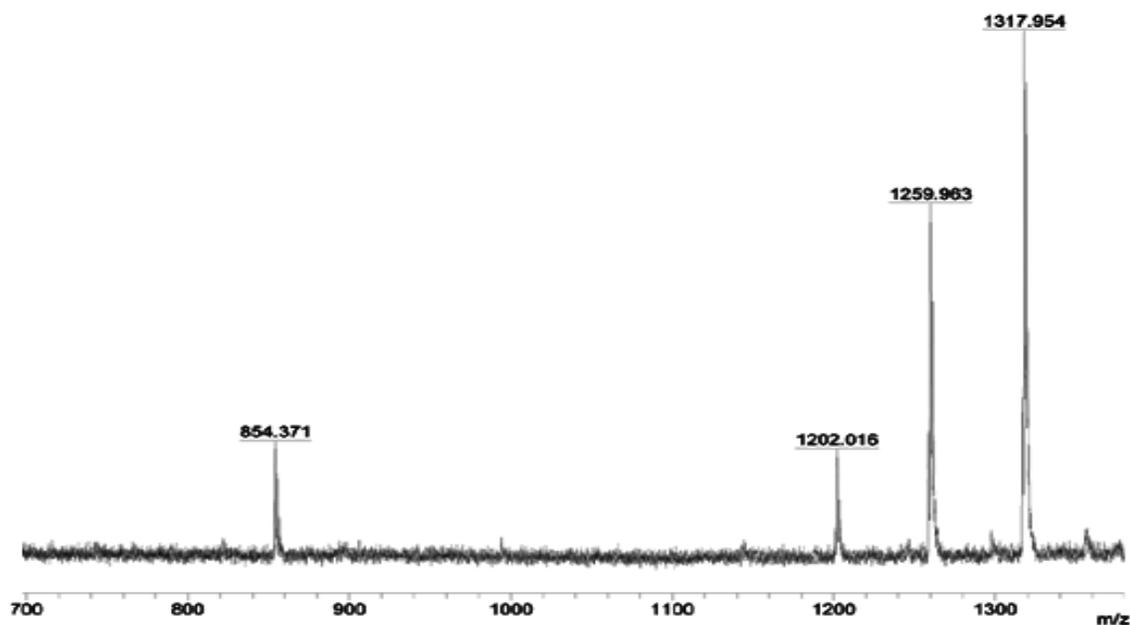
**Esquema 5.** Síntesis del compuesto **5**.

El porfirin-dendrímtero **5** fue caracterizado por resonancia magnética de carbono, en el espectro (Figura 5) se observan las siguientes señales:  $\delta_c$  169.0, una señal asignada a los grupos carbonilo, a  $\delta_c$  157.0 una señal asignada a los carbonos aromáticos *ipso* unidos a oxígeno, a  $\delta_c$  144.0 otra señal correspondiente a los carbonos aromáticos *ipso*, a  $\delta_c$  131.0 una señal ancha correspondiente a los carbonos  $\beta$  de los pirroles que forman el anillo porfirínico, a  $\delta_c$  119.2 una señal que corresponde a los carbonos de la posición *meso* del anillo aromático de la porfirina, a  $\delta_c$  115.03 una señal asignada al carbono de los aromáticos, a 101.8  $\delta_c$  una señal asignada a los CH en posición *p* del anillo aromático, a  $\delta_c$  65.4 se observa una señal correspondiente al grupo  $CH_2-O$ , otra señal a  $\delta_c$  52.3 correspondiente a los grupos  $O-CH_3$ .



**Figura 5.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , 300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  del compuesto **5**.

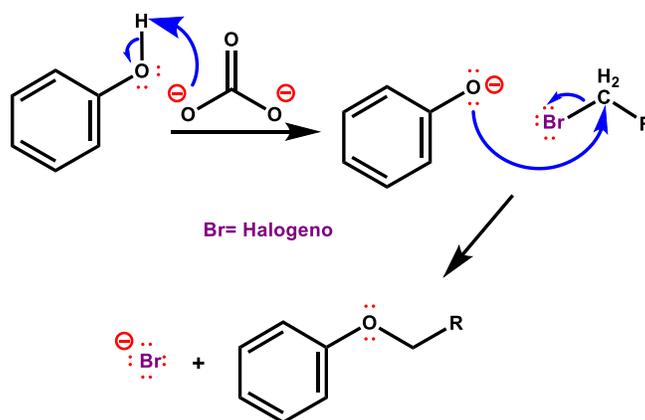
La obtención del compuesto **5** se confirmó mediante espectrometría de masas Electro Spray (Figura 6), en el espectro se observa un pico a 1317.95 m/z, el cual corresponde a la masa molecular del compuesto.



**Figura 6.** Espectro de masas Electro Spray del compuesto **5**.

## 7.2. Mecanismo de la reacción de Williamson para la formación de éteres

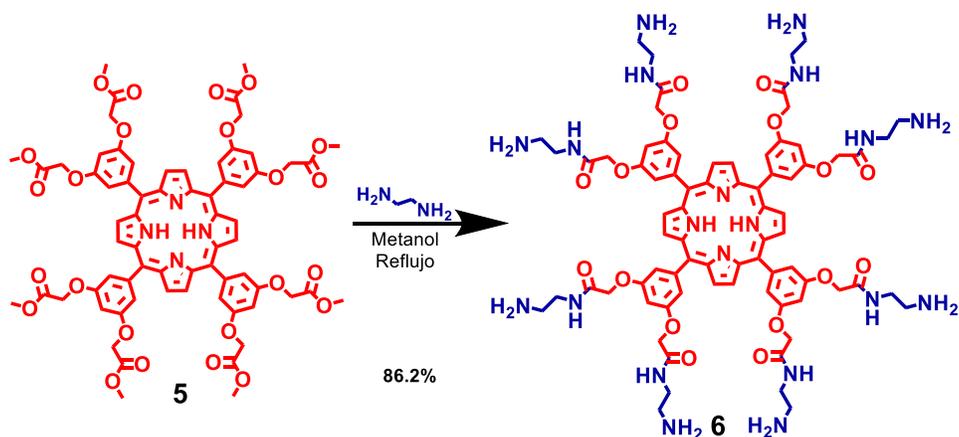
La reacción se da por un mecanismo  $S_N2$ , en la cual la base reacciona con el fenol extrayendo el protón, Esto genera un ión fenóxido que es un excelente nucleófilo, el siguiente paso es el ataque del nucleófilo hacia el carbono que soporta al halógeno, este último sale con el par de electrones que tenía en el enlace que estaba formando, lo que da por resultado la formación de un éter (Esquema 6).



**Esquema 6.** Mecanismo de reacción de Williamson para la formación de éteres.

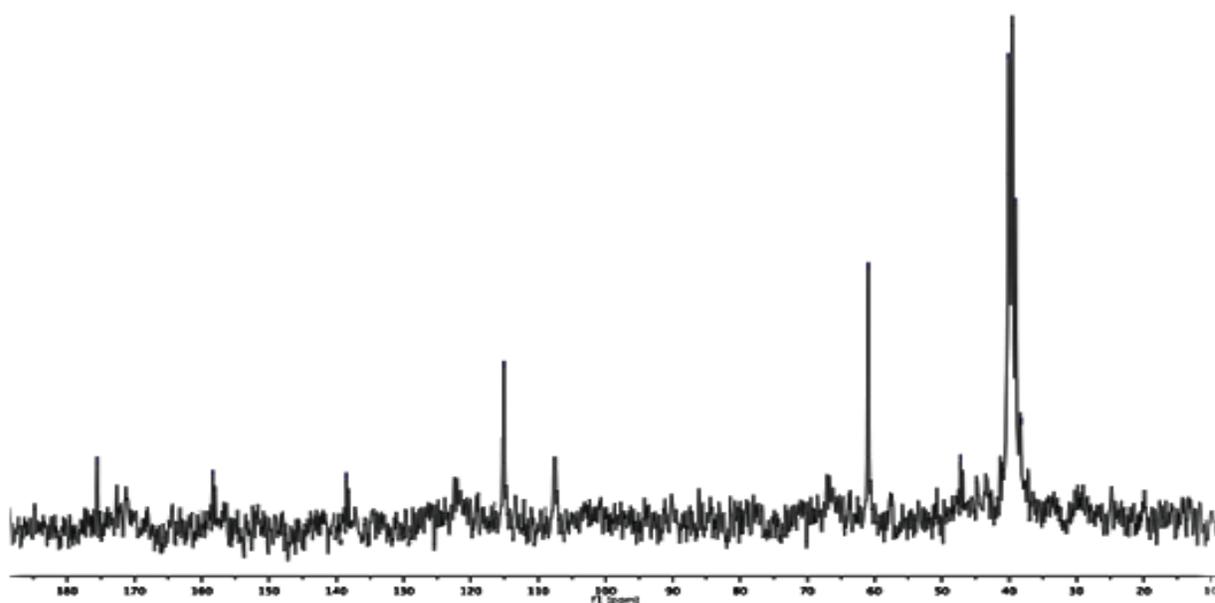
## 7.4. Obtención del porfirin-dendrímico generación 1.0

El porfirin-dendrímico generación 1.0 (**6**) fue sintetizado a partir del compuesto **5** (250 mg / 0.190 mmol), etilendiamina (0.1 mL/1.52 mmol) y 40 mL de metanol (Esquema 7).



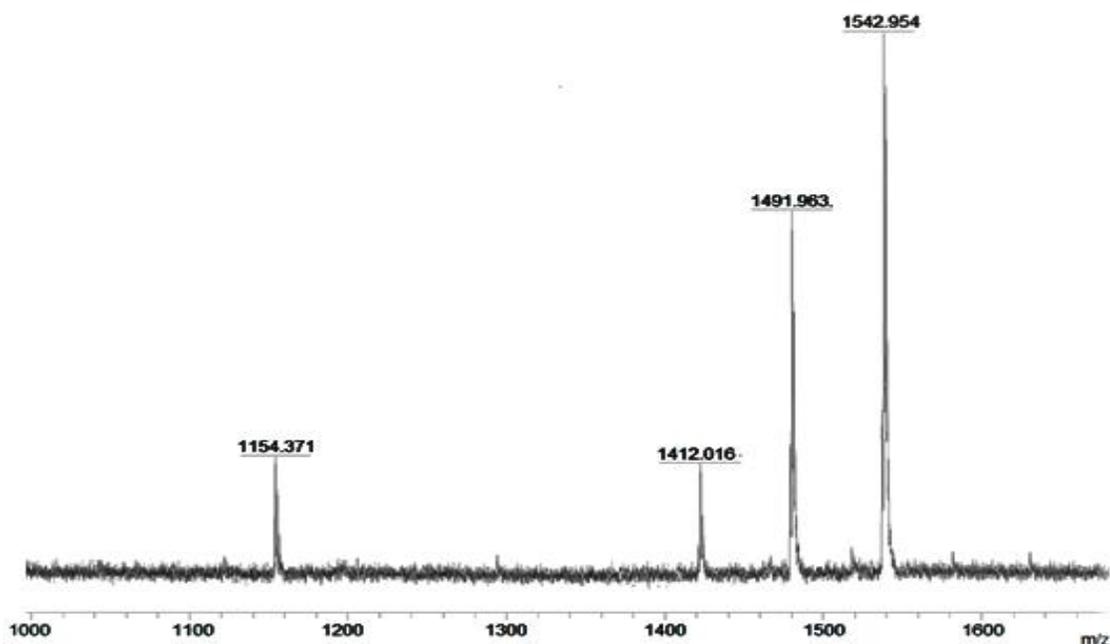
**Esquema 7.** Síntesis del compuesto **6**.

El porfirin-dendrímtero **6** fue caracterizado inicialmente por resonancia magnética de carbono, en el espectro (Figura 7) se observaron las siguientes señales: a  $\delta_c$  175.5 una señal asignada a los grupos carbonilo, a  $\delta_c$  158.4 una señal asignada a los carbonos aromáticos *ipso* unidos a oxígeno, a  $\delta_c$  129.0 una señal ancha correspondiente a los carbonos  $\beta$  de los pirroles que forman el anillo porfirínico, a  $\delta_c$  115.4 una señal que corresponde a los carbonos de la posición *meso* del anillo de porfirina de los aromáticos, a  $\delta_c$  115.0 una señal asignada al carbono de los aromáticos, a  $\delta_c$  107.5 una señal asignada a los CH en posición *p* del anillo aromático, a  $\delta_c$  60.4 se observa una señal correspondiente al grupo CH<sub>2</sub>-O, y cuatro señales a  $\delta_c$  47.2,  $\delta_c$  40.0,  $\delta_c$  39.0 y a  $\delta_c$  38.3 correspondientes a los grupos CH<sub>2</sub>-N.



**Figura 7.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C, 300 MHz, CD<sub>3</sub>OD del compuesto **6**.

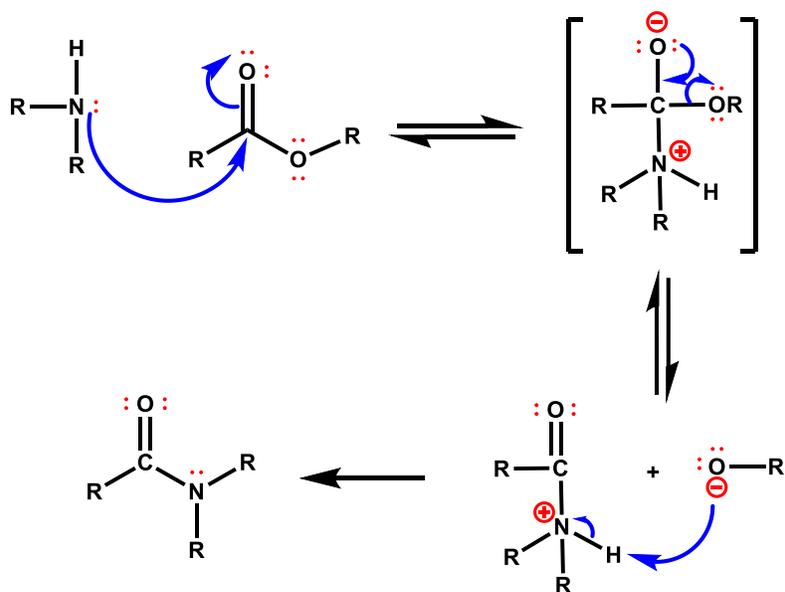
La obtención del compuesto **6** se confirmó mediante espectrometría de masas Electro Spray (Figura 8), en el espectro se observa un pico a 1542 m/z, el cual corresponde a la masa molecular del compuesto.



**Figura 8.** Espectro de masas Electro Spray del compuesto **6**.

### 7.4.1. Mecanismo de reacción de para la formación de amidas a partir del grupo éster

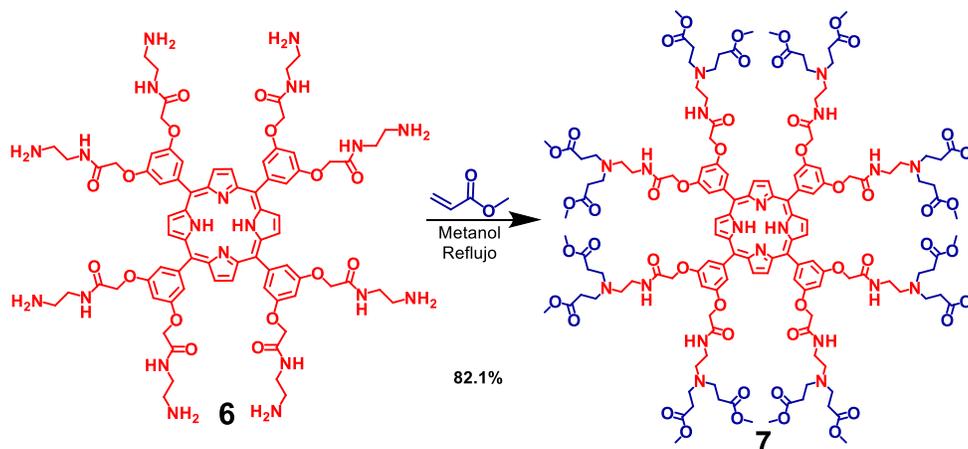
El mecanismo para la formación de amidas a partir de un éster ocurre por una sustitución nucleofílica en el grupo acilo. En este mecanismo hay dos etapas principales, una de adición y otra de eliminación. En el paso de adición, un nucleófilo en este caso una amina, realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico, provocando que los electrones del doble enlace del carbonilo migren hacia el oxígeno, lo que da por resultado un intermediario tetraédrico. En el paso de eliminación, el par de electrones del oxígeno vuelve a formar un doble enlace y expulsan un ion alcóxido, que posteriormente desprotona al átomo de nitrógeno cargado positivamente, para formar una amida (Esquema 8).



**Esquema 8.** Mecanismo de la reacción de aminólisis.

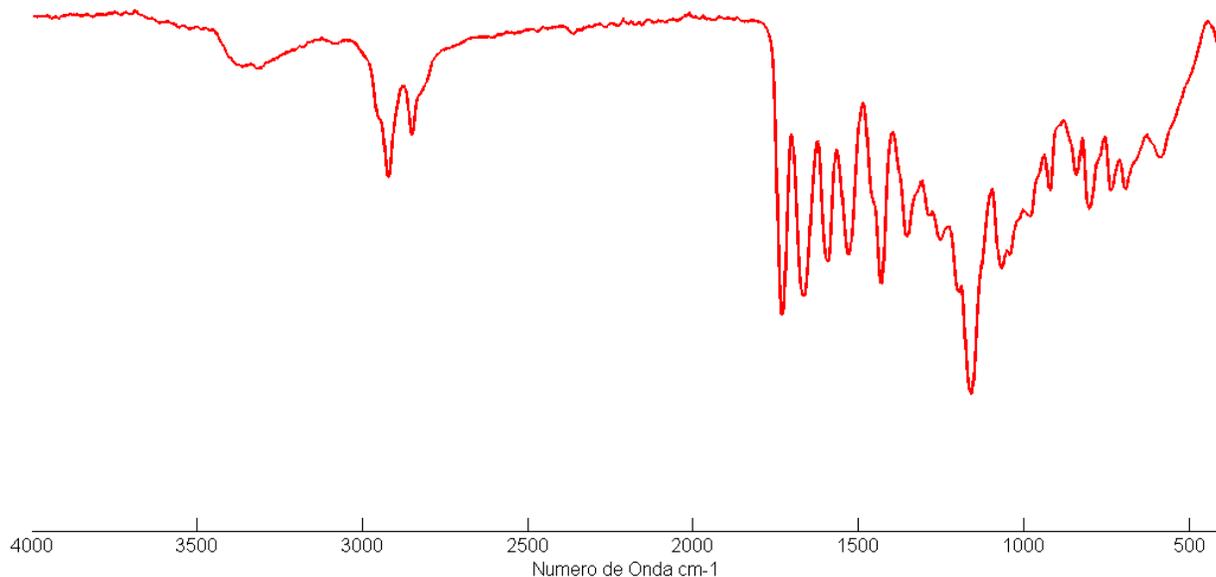
## 7.5. Obtención del porfirin-dendrúmero generación 1.5

El porfirin-dendrúmero generación 1.5 se obtuvo a partir de compuesto **6** (250 mg, 0.161 mmol) en 40 mL metanol, y se adicionó el acrilato de metilo (0.11 mL, 1.295 mmol) Esquema 9.



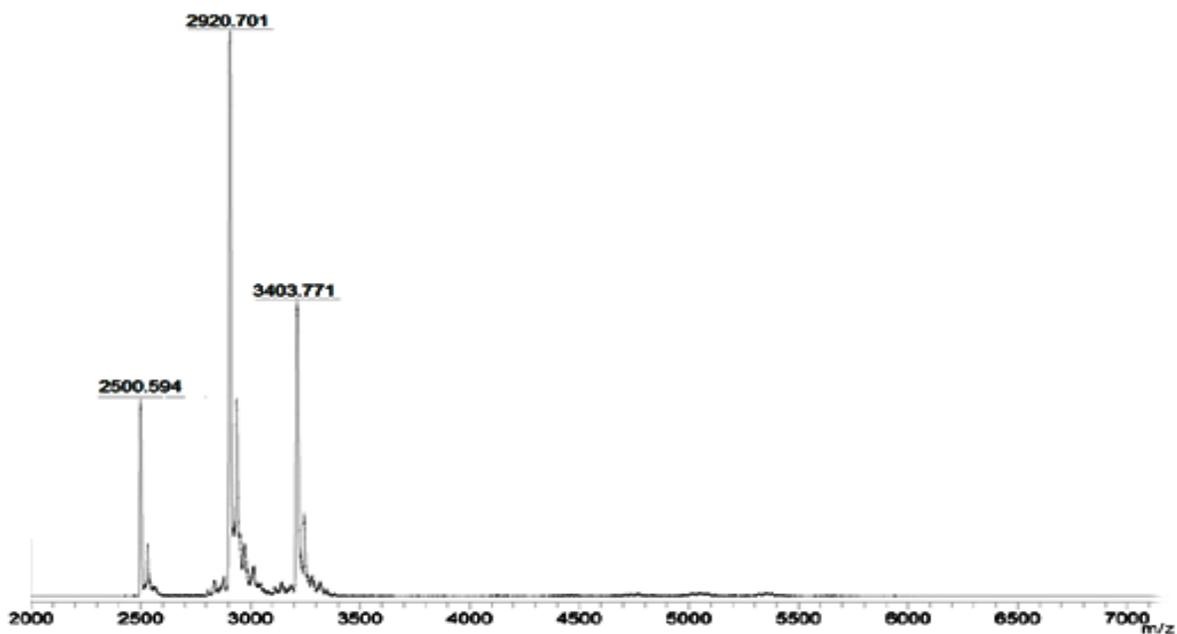
**Esquema 9.** Síntesis del compuesto **7**.

El compuesto **7** fue caracterizado por FTIR observándose las siguientes bandas: A  $3262$  y  $3321\text{ cm}^{-1}$  una banda que indica la presencia de aminas primarias, otra banda intensa a  $2921$  y  $2850\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los  $\text{CH}_2$  alifáticos y aromáticos, otra banda intensa a  $1730\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del doble enlace del carbonilo del ester, a  $1665\text{ cm}^{-1}$  una banda que corresponde a carbonilos unidos a amidas, a  $1368\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que pertenece al estiramiento del enlace C-H, a  $1285\text{ cm}^{-1}$  y  $1251\text{ cm}^{-1}$  se observan dos bandas asignadas a los éteres aromáticos, a  $1159\text{ cm}^{-1}$  una banda correspondiente a los enlaces C-O, y a  $1066\text{ cm}^{-1}$  una banda que corresponde a los enlaces sencillos C-N. (Figura 9).



**Figura 9.** Espectro de Infrarrojo del compuesto **7**.

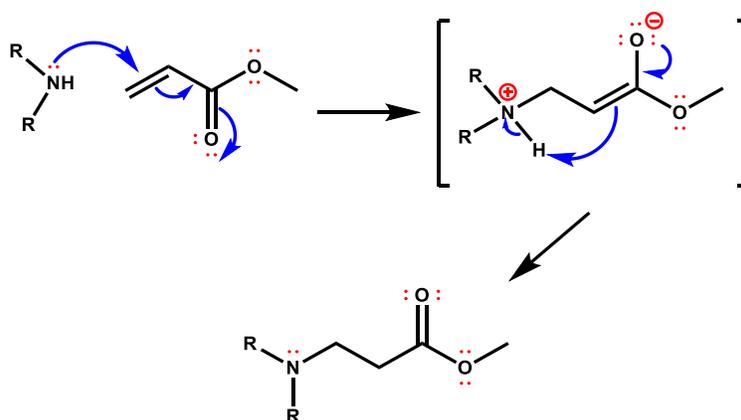
La obtención del compuesto **7** se confirmó mediante espectrometría de masas Electro Spray (Figura 10). En el espectro se observa un pico a 2920 m/z, el cual corresponde a la masa molecular del compuesto.



**Figura 10.** Espectro de masas Electro Spray del compuesto **7**.

### 7.5.1. Mecanismo de reacción de Michael para la formación de $\beta$ -aminoésteres

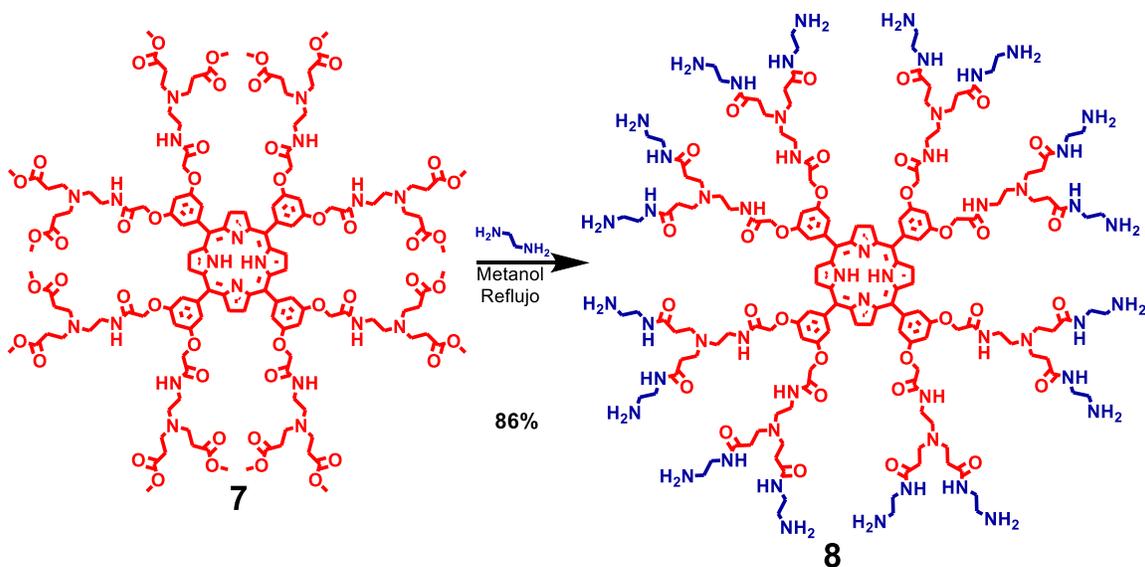
La reacción de Michael, o adición 1-4, se da en compuestos carbonílicos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados. El nucleófilo ataca al carbono  $\beta$  respecto al carbonilo, en el enlace doble carbono-carbono, esto desplaza a los electrones  $\pi$ , lo que da por resultado un ion enolato, este es el encargado de desprotonar al átomo de nitrógeno para que recupere su par de electrones, dando como producto una amina (Esquema 10).



**Esquema 10.** Mecanismo de la reacción de Michael para formar  $\beta$ -aminoésteres

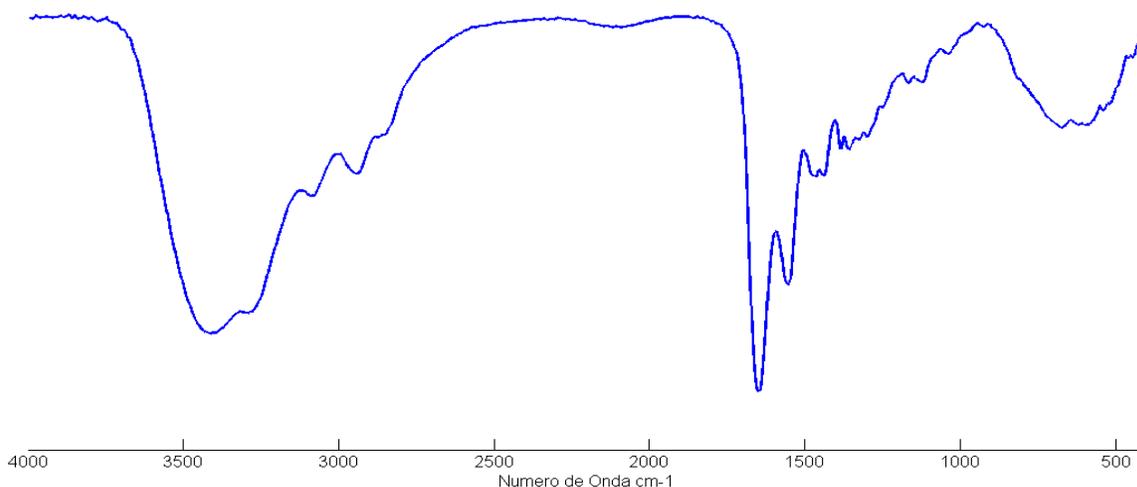
### 7.6. Obtención del porfirin-dendrímico generación 2.0

El porfirin-dendrímico generación 2.0, fue sintetizado a partir del compuesto **7** (250 mg, 0.130 mmol) y se disuelve en metanol (40 mL) y se adicionó la etilendiamina (0.13 mL, 2.08 mmol) Esquema 11.



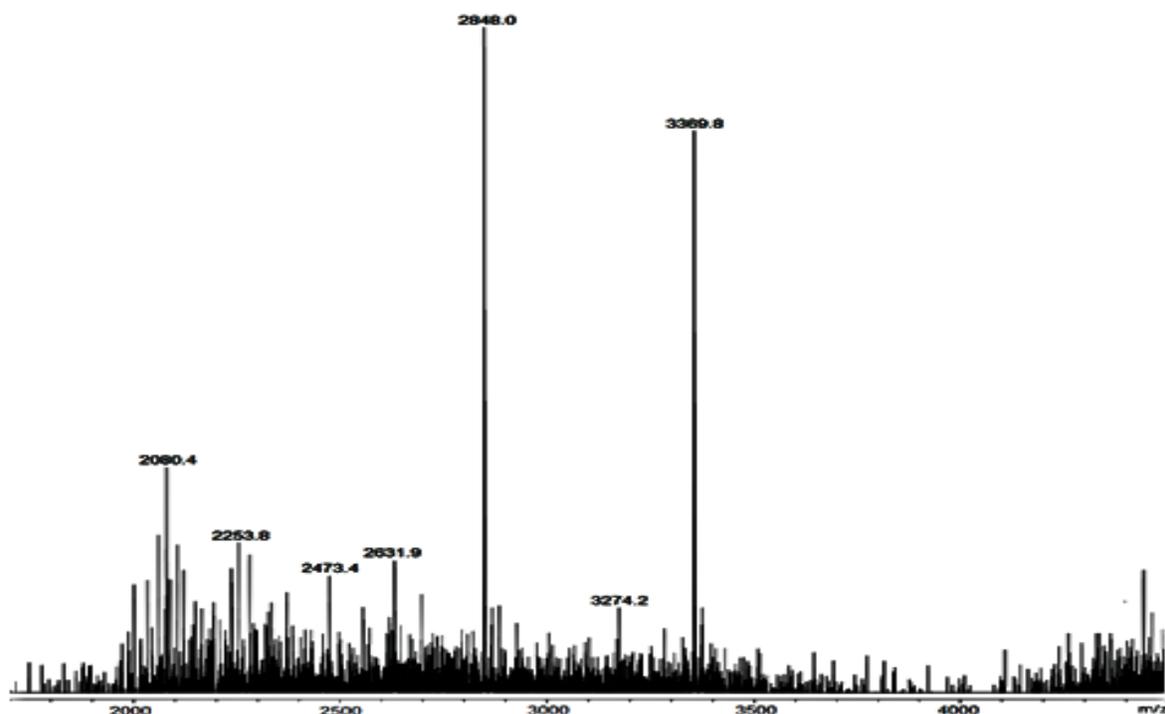
**Esquema 11.** Síntesis del compuesto **8**.

El compuesto **8** fue caracterizado por FTIR observándose las siguientes bandas: A 3412 y 3291  $\text{cm}^{-1}$  una banda debida a las vibraciones de los grupos N-H de las aminas primarias, otra banda intensa a 3085 y 2945  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los  $\text{CH}_2$  alifáticos y aromáticos, a 1647  $\text{cm}^{-1}$  una banda debida a las vibraciones de los grupos carbonilo unido a amidas, a 1357  $\text{cm}^{-1}$  se observa una banda que pertenece al estiramiento del enlace C-H, a 1166  $\text{cm}^{-1}$  una banda correspondiente a los enlaces C=O, y a 1038  $\text{cm}^{-1}$  una banda que corresponde a los enlaces sencillos C-N. (Figura 11).



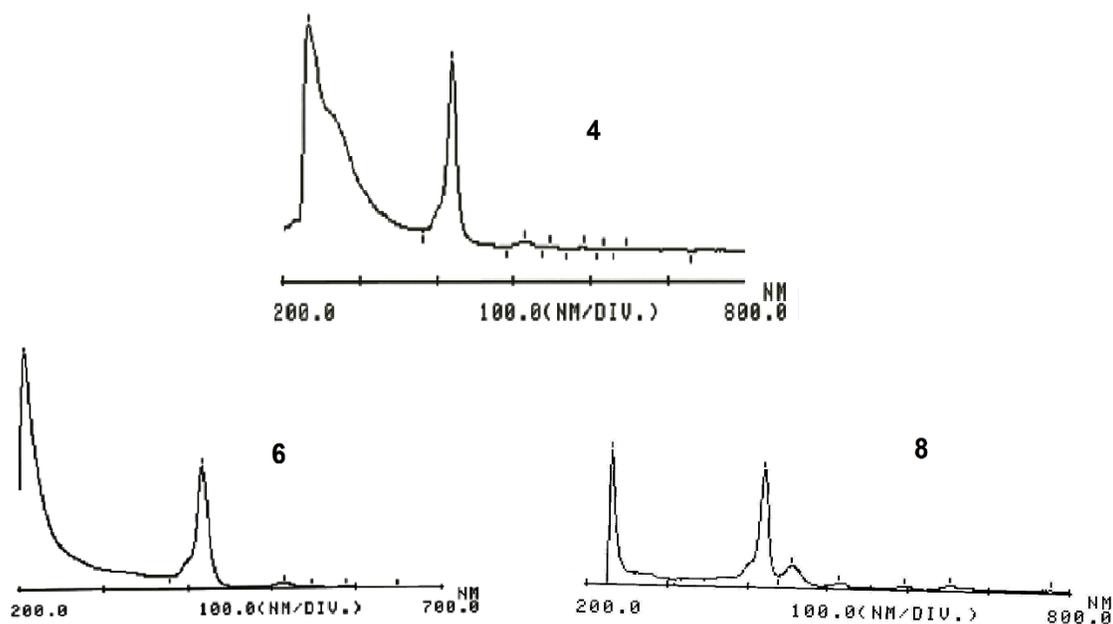
**Figura 11.** Espectro de Infrarrojo del compuesto **8**.

La obtención de compuesto **8** se confirmó mediante espectrometría de masas Electro Spray (Figura 12), en el espectro se observa un pico a 3369 m/z, el cual corresponde a la masa molecular del compuesto.



**Figura 12.** Espectro de masas Electro Spray del compuesto **8**.

Durante este trabajo se realizó también la caracterización mediante el ultravioleta visible, con la finalidad de dar seguimiento durante toda la síntesis de los dendrímeros de primera y segunda generación; y así poder asegurar que efectivamente se tenía la porfirina en el dendrímero y se observó que la banda Soret característica de las porfirinas prácticamente no tenía un desplazamiento significativo de un compuesto a otro: el compuesto **4** ( $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ ), para el compuesto **6** ( $\lambda_{\text{max}} = 418 \text{ nm}$ ) y para el compuesto **8** ( $\lambda_{\text{max}} = 421 \text{ nm}$ ) (Figura 13). Lo que indica que la planaridad de la porfirina empleada como núcleo dendrimérico no se ve afectada. La banda Q de igual manera no sufren un desplazamiento significativo y su intensidad cambia un poco.



**Figura 13.** Espectros de UV-vis de los compuestos **4**, **6** y **8**.

Con lo que se pudo comprobar que la estructura de la porfirina no sufre cambios significativos despues de la obtención de cada generación.

De la síntesis de los dendrímeros se puede concluir que se realizó la síntesis de los dendrímeros tipo PAMAM con un núcleo porfirínico de primera y segunda generación con 8 y 16 grupos amina primarias terminales. Los dendrímeros de primera y segunda generación fueron solubles en agua y los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizaron en agua deuterada.

Una vez obtenidos y caracterizados cada una de las generaciones de los dendrímeros, se procedió a realizar la caracterización del fármaco melfalán que sería empleado para la formación de los conjugados.

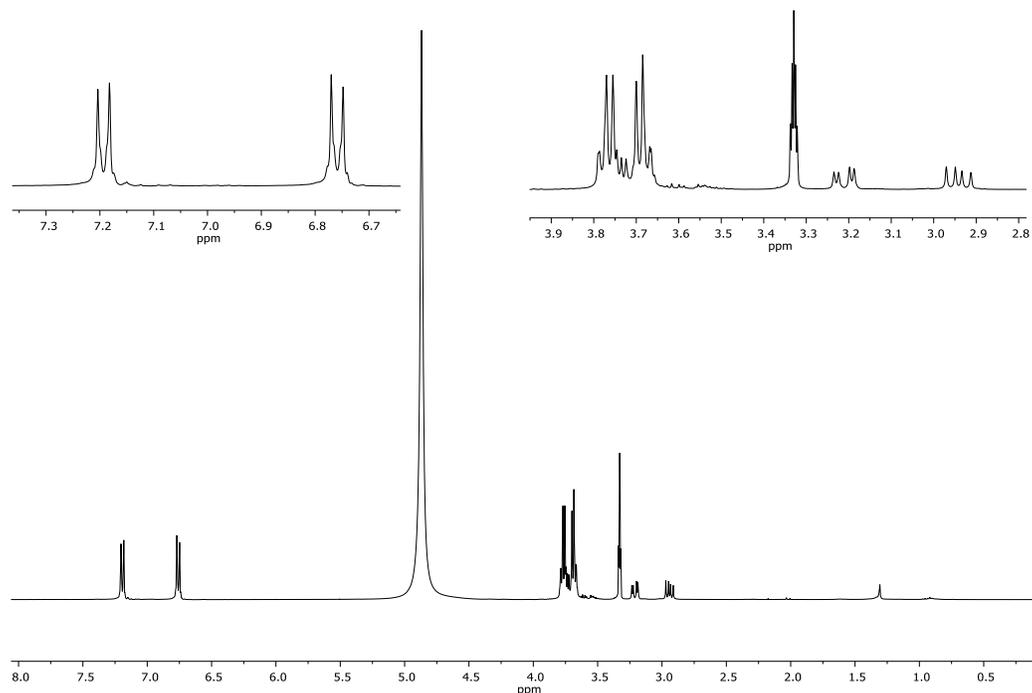
## 7.7 Caracterización del melfalán.

Con la finalidad de conocer el fármaco (Figura 14) se realizó la caracterización del mismo por todas las espectroscópicas.



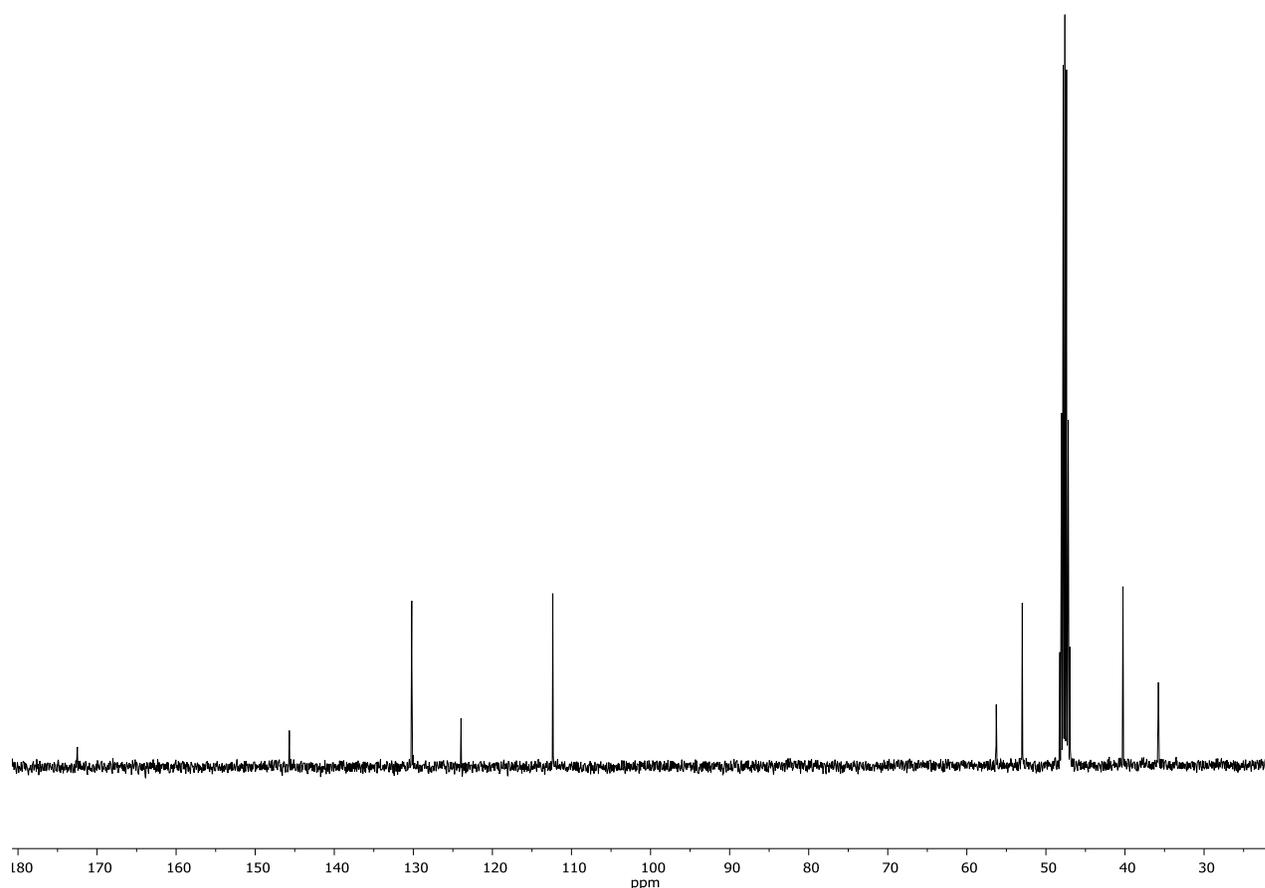
**Figura 14.** Estructura del Melfalán.

El melfalán fue caracterizado inicialmente por resonancia magnética de protón, en el espectro (Figura 15) se pueden observar dos dobletes a  $\delta_H$  7.18 y 6.77 asignados a los protones aromáticos en posiciones *orto* y *meta* con constantes de acoplamiento  $J= 8$  Hz, dos multipletes a  $\delta_H$  3.7 y a  $\delta_H$  3.6 correspondientes a los CH<sub>2</sub> unidos a lo cloros y nitrógeno, dos dobletes a  $\delta_H$  3.22 y a  $\delta_H$  3.18 correspondiente a los protones del grupos CH<sub>2</sub> unido a fenilo y finalmente un multiplete a 2.98 debido al protón unido al carbono-NH<sub>2</sub>.



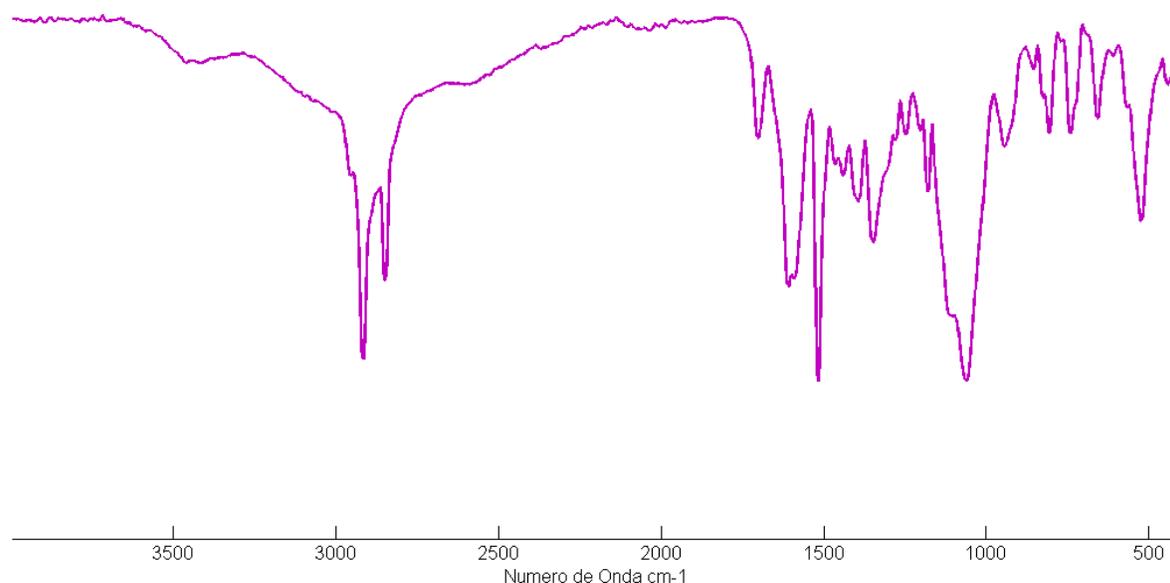
**Figura 15.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H, 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD del Melfalán.

De igual manera, se le realizó la caracterización por resonancia magnética de carbono (Figura 16). Se observaron las siguientes señales:  $\delta_c$  172.4 una señal asignada al grupo carbonilo, a  $\delta_c$  145.6 una señal asignada a los carbonos cuaternarios aromáticos unidos a nitrógeno, a  $\delta_c$  130.2 una señal ancha correspondiente a los carbonos aromáticos, a  $\delta_c$  123.9 una señal que corresponde a los carbonos cuaternarios aromáticos unidos a  $\text{CH}_2$ , a  $\delta_c$  112.3 una señal asignada a los carbonos aromáticos, a 56.2  $\delta_c$  una señal asignada a los CH unidos a  $\text{NH}_2$ , a  $\delta_c$  52.9 se observa una señal correspondiente al grupo  $\text{CH}_2\text{-Cl}$ , otra señal a  $\delta_c$  40.2 correspondiente a los grupos  $\text{CH}_2\text{-N}$  y otra señal a 35.7 que pertenece a los  $\text{CH}_2$  unidos al benceno.



**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del Melfalán.

Posteriormente fue realizada la caracterización por FT-IR observándose las siguientes bandas: A  $3415\text{ cm}^{-1}$  una banda que indica la presencia de aminas primarias, otra banda intensa a  $2917$  y  $2849\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los  $\text{CH}_2$ , otra banda intensa a  $1702\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al estiramiento del doble enlace del carbonilo, a  $1348\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que pertenece al estiramiento del enlace C-H, y a  $1061\text{ cm}^{-1}$  una banda que corresponde a los enlaces sencillos C-N. (Figura 17).



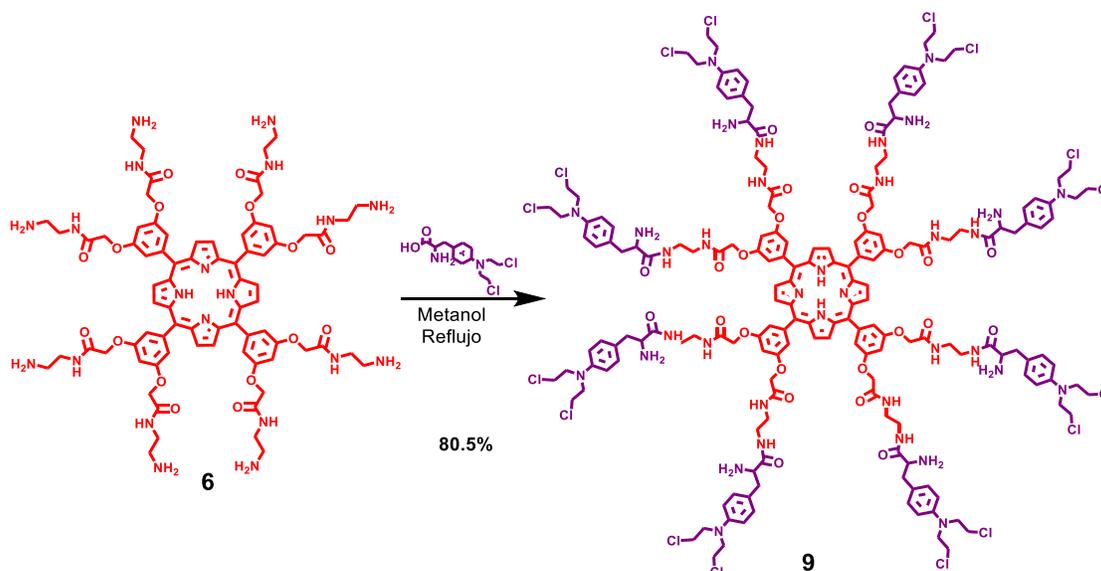
**Figura 17.** Espectro de Infrarrojo del Melfalán.

El melfalán fue completamente caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , FTIR, UV-vis, espectrometría de masas y análisis elemental, se realizaron pruebas de solubilidad del fármaco en agua y resultó que el fármaco no es soluble en agua.

Al término de la caracterización del fármaco se continuó con la síntesis de los conjugados dendriméricos con las generaciones G1.0 compuesto **9** y G2.0 compuesto **10**.

## 7.8. Obtención del conjugado porfirin-melfalán-dendrímico de generación 1.0

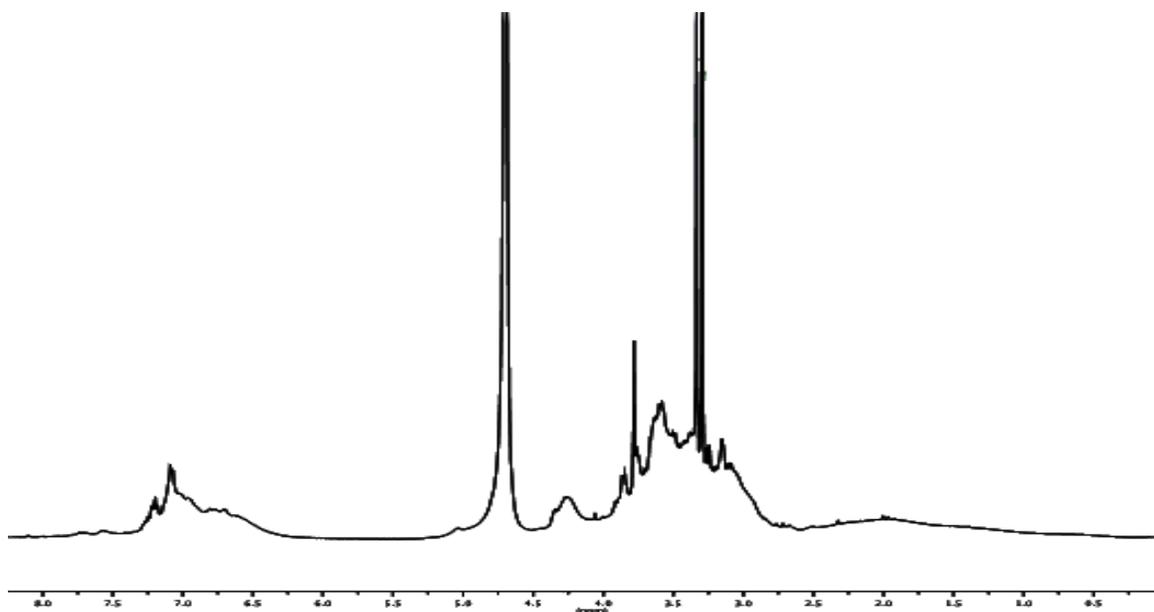
El conjugado de generación 1.0 **9** se sintetizó a partir del dendrímico **6** 100 mg (0.063 mmol) y se disolvió en metanol (20 mL), por último, se adicionó el Melfalán 0.153 mg (0.504 mmol) (Esquema 12).



**Esquema 12.** Síntesis del compuesto **9**.

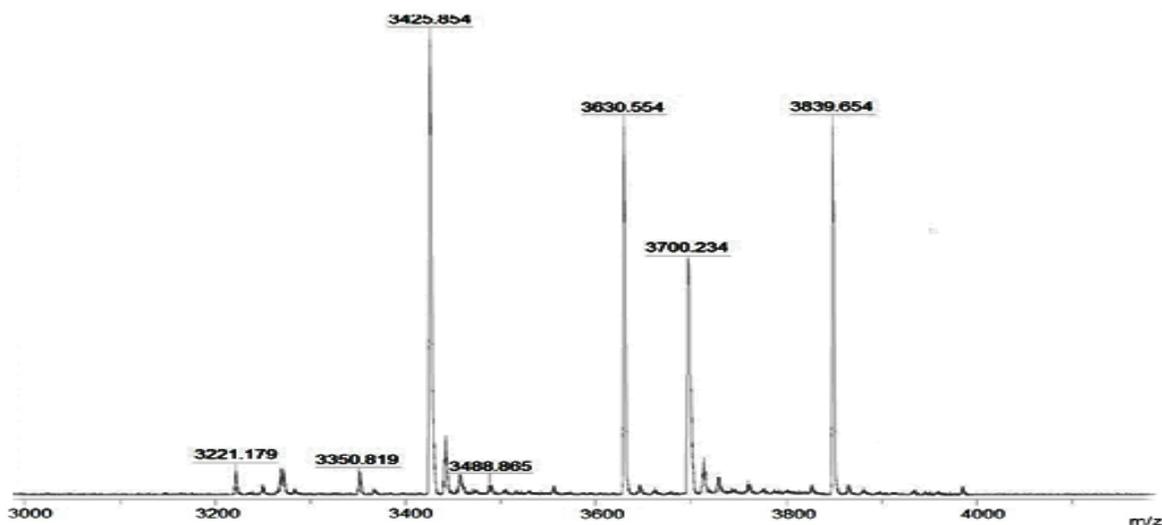
El conjugado 1.0 compuesto **9** fue caracterizado inicialmente por resonancia magnética de protón, en el espectro (Figura 18) se puede observar una señal a  $\delta_H$  7.20 correspondiente a los protones orto del anillo aromático, de igual manera se observó un triplete a  $\delta_H$  7.09 los protones del anillo aromático de melfalán, a  $\delta_H$  6.69 asignado a los protones en posición *para* del anillo aromático, a  $\delta_H$  4.26 se observaron los protones correspondientes a los CH<sub>2</sub> unidos a oxígenos, se observaron también señales anchas a  $\delta_H$  3.87, 3.78 y 3.76 que fueron asignados a los protones de las aminas secundarias, se encontró también una señal ancha a  $\delta_H$  3.60 que se asignaron a los protones de los CH<sub>2</sub> unidos a nitrógeno, una señal ancha a  $\delta_H$  3.33 de los protones unidos a los cloros del melfalán, encontraron una señal ancha a  $\delta_H$  3.29 que fue asignada a los protones de los CH<sub>2</sub> unidos a las

aminas terciarias del melfalán y finalmente una señal a  $\delta_H$  3.24 asignado a los protones de los  $CH_2$  unidos al benceno del melfalán.



**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1H$  400 MHz del compuesto **9** en  $D_2O$  a temperatura ambiente.

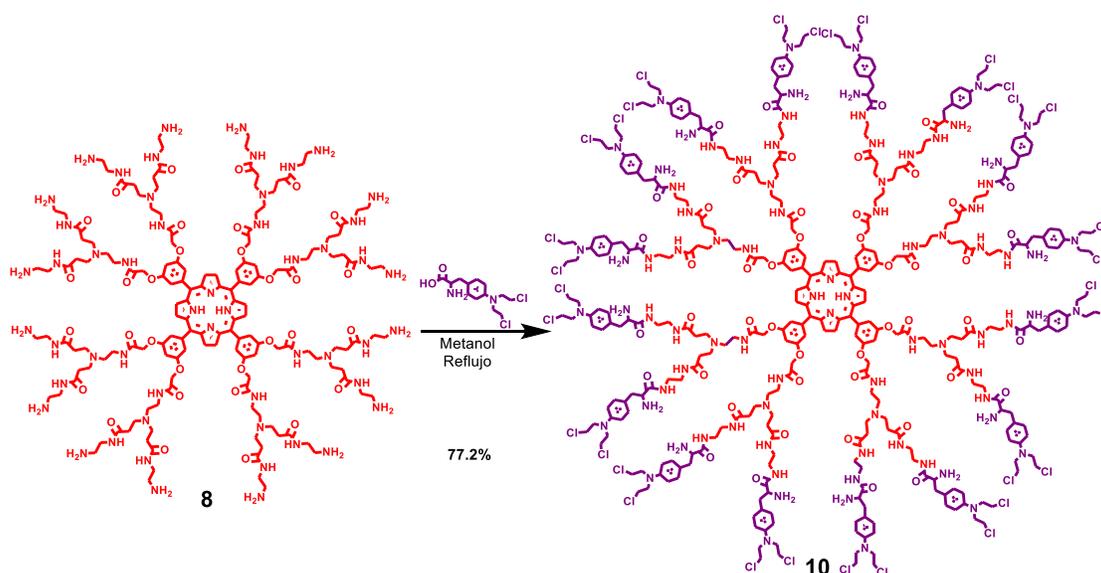
La obtención del compuesto **9** se confirmó mediante espectrometría de masas Electro Spray (Figura 19), en el espectro se observa un pico a 3839 m/z, el cual corresponde a la masa molecular del compuesto.



**Figura 19.** Espectro de masas Electro Spray del compuesto **9**.

## 7.9. Obtención del conjugado porfirin-melfalán-dendrímico de generación 2.0

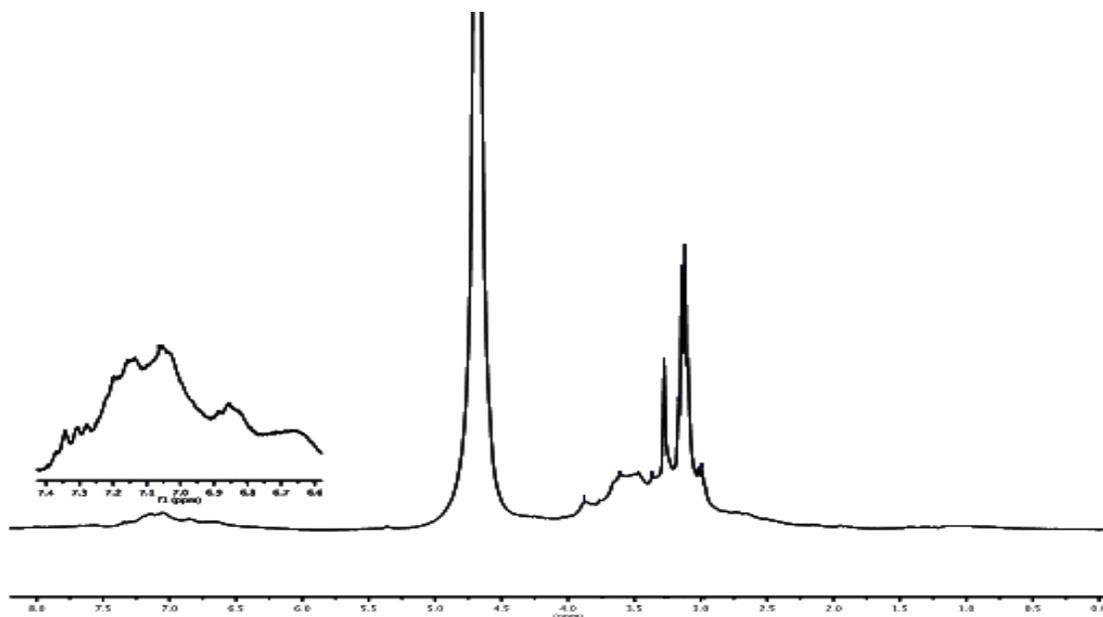
El conjugado de generación 2.0 **10**, fue obtenido a partir de compuesto **8** (40 mg, 0.011 mmol) el cual se disolvió en metanol (20 mL), se adicionó el Melfalán (0.115 mg, 0.176 mmol) (Esquema 8).



Esquema 14. Síntesis del compuesto **10**.

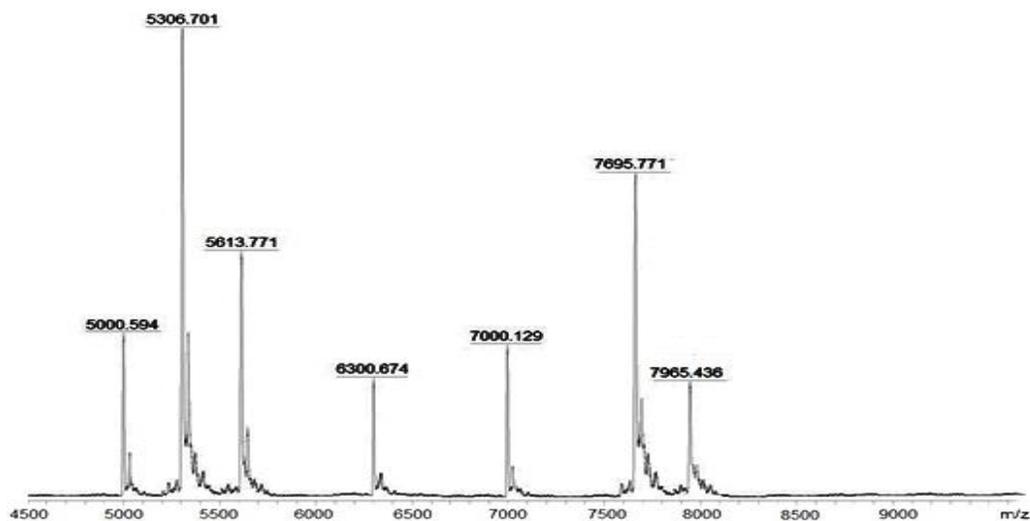
El conjugado 2.0 compuesto **10** fue caracterizado inicialmente por resonancia magnética de protón, en el espectro (Figura 20) se puede observar una señal a  $\delta_H$  7.06 debida a los protones del anillo aromático de melfalán, de igual manera se observó una señal ancha a  $\delta_H$  6.84 correspondiente a los protones *orto* del anillo aromático, a  $\delta_H$  6.63 un singlete asignado a los protones en posición *para* del anillo aromático, a  $\delta_H$  3.88 se observaron los protones correspondientes a los protones  $CH_2$  unidos a oxígenos, a  $\delta_H$  3.47 y 3.61 se observaron dos señales anchas asignadas a los protones de los grupos  $CH_2$  unidos a nitrógeno y cloro del melfalán respectivamente, se observaron también señales anchas a  $\delta_H$  3.37 que fueron asignadas a los protones de la amina, se observó también una señal ancha a  $\delta_H$  3.28 que se asignó a los protones de los protones de los grupos  $CH_2$  unidos a nitrógeno, una señal ancha a  $\delta_H$  3.17 de los protones del grupo  $CH_2$  unidos al

benceno del melfalán, a  $\delta_H$  3.12 se observa una señal ancha que fue asignada a los protones del CH<sub>2</sub> unidos a las aminas terciarias del melfalán y finalmente una señal a  $\delta_H$  2.99 asignado a los protones de los CH del melfalán.



**Figura 20.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H 400 MHz del compuesto **10** en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.

Se confirmó la obtención de compuesto **10** mediante espectrometría de masas Electro Spray (Figura 21), en el espectro se observa un pico a 7965 m/z, el cual corresponde a la masa molecular del compuesto.



**Figura 21.** Espectro de masas Electro Spray del compuesto **10**.

De los datos espectroscópicos, resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , FTIR, UV-vis, espectrometría de masas y análisis elemental se puede concluir que todos y cada uno de los centros activos, es decir aminas primarias 8 para el caso del dendrímero de primera generación y 16 aminas primarias para el caso del dendrímero de segunda generación reaccionaron con las correspondientes moléculas de melfalán.

Una vez caracterizados los conjugados dendriméricos de primera y segunda generación se procedió a realizar pruebas de citotoxicidad, para determinar su actividad anticancerígena.

## **6.10. Pruebas de citotoxicidad**

### **6.10.1. Metodología experimental**

La metodología experimental comenzó con un screening primario de seis líneas celulares de cáncer humano: U251 (glioblastoma humano), PC-3 (adenocarcinoma prostático humano), K-562 (células de leucemia mielógena crónica humana), HCT-15 (adenocarcinoma colorrectal humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano), SKLU-1 (pulmón humano) adenocarcinoma). Los fibroblastos gingivales humanos HGF se compraron a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) en medio RPMI 1640 que contiene 10% de suero bovino fetal y 2  $\mu\text{M}$  de L-glutamina. Para un experimento de selección típico, las células se inoculan en placas de microtitulación de 96 pocillos en 1000  $\mu\text{L}$  de alícuotas de suspensión de células que varían de 5000 a 10.000 células por pocillo. Después de la inoculación de células, las placas de microtitulación se incuban a 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , 95% de aire y 100% de humedad relativa durante 24 horas antes de la adición de los compuestos. Después de 24 h, dos placas de cada línea celular se fijan in situ con ácido tricloroacético (TCA), para verificar una medición de la población celular para cada línea celular en el momento

de la adición del fármaco (tiempo cero (Tz)). Se prepararon soluciones madre de compuestos de ensayo inicialmente disueltos en DMSO (20  $\mu$ M) y se diluyeron adicionalmente en un medio para producir las concentraciones deseadas. La selección de dosis única se lleva a cabo a una concentración de 10  $\mu$ M. Después de la adición del fármaco, las placas se incuban durante 48 h en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Para las células adherentes, el ensayo finaliza mediante la adición de ácido tricloroacético frío. Las células se fijan *in situ* mediante la adición de 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético al 50% (p / v) frío y se incuban durante 1 h. a 4 ° C. Se agrega solución de sulforrodamina (SRB) (100  $\mu$ L) al 0,4% (p / v) en ácido acético al 1% a cada pocillo, y las placas se colocan en un agitador durante 5 min a temperatura ambiente. La absorbancia se lee en un lector de placas automático Ultra Microplated Reader (Elx 808: Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE. UU.) A una longitud de onda de 515 nm, y utilizando el tiempo cero (Tz), control de crecimiento (C) y prueba el crecimiento en presencia del fármaco a una concentración de 10  $\mu$ M, se calcula el porcentaje de crecimiento.

#### **7.10.2. Citotoxicidad de conjugados de melfalán**

A los porfirin-dendrimeros **5-8** y conjugados de melfalán **9** y **10** se les determinó la actividad anticancerígena. Se cribaron *in vitro* contra seis líneas celulares de cáncer humano: U251 (glioblastoma humano), PC-3 (adenocarcinoma prostático humano), K-562 (células de leucemia mielógena crónica humana), HCT-15 (adenocarcinoma colorrectal humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) y SKLU-1 (pulmón humano). Las líneas celulares fueron suministradas por el National Cancer Institute (EE. UU.). Fibroblastos gingivales humanos HGF. Cada tratamiento se realizó en pocillos heptaplicados. Los valores de IC50 se estimaron ajustando los datos de inhibición a una curva dependiente de la dosis usando una ecuación de derivada logística. La actividad antiproliferativa de melfalán y cisplatino, como fármaco contra el cáncer de referencia, también se probaron contra todas las líneas celulares.

En la tabla 1 se muestran los resultados del escrinig primario realizado a las 6 líneas celulares a 25  $\mu$ M en DMSO, los porfirina-dendrimeros **5-8** presentaron una baja actividad anticancerígena prácticamente en todas las líneas celulares, y también se observó que no afectan las células sanas es decir a los fibroblastos gingivales humanos HGF, siendo el más activo el dendrimer de segunda generación compuesto **8** con un porcentaje de inhibición del 9.7 %, lo que indica su baja citotoxicidad en comparación con el fármaco de referencia melfalán.

Para los conjugados **9** y **10**, la actividad citotóxica fue más alta que los dendrimeros **5-8**, para el caso del conjugado **9** con 8 moléculas de melfalán, presentó una actividad anticancerígena del 41 al 60 % de inhibición del crecimiento en las 6 líneas celulares siendo más activo contra el glioblastoma humano U251 y adenocarcinoma mamario humano MFC-7. Para el caso del conjugado de segunda generación con 16 moléculas de melfalán en su estructura presentó una muy alta actividad anticancerígena del 82 al 100 en prácticamente en todas las líneas celulares, siendo más activo contra la línea celular PC-3 (adenocarcinoma prostático humano) en donde su inhibición fue del 100 %, y contra la línea MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) con un 92.7 % de inhibición. Cabe mencionar que el conjugado **10** también fue muy activo en contra la línea celular HCT-15 (adenocarcinoma colorrectal humano), con un 91.9 % de inhibición.

Por otra parte, una comparación entre los conjugados **9** y **10** contra el melfalán libre, el conjugado **10** resultó ser más activo que el melfalán y para el caso del conjugado **9** no fue tan activo como el melfalán libre. La comparación entre los conjugados **9** y **10** contra el cisplatino se puede concluir que el conjugado **9** no fue tan activo como el cisplatino, sin embargo, el conjugado **10** superó la actividad anticancerígena del cisplatino. Los conjugados **9** y **10** resultaron ser menos tóxicos contra las células sanas los fibroblastos gingivales humanos HGF que el melfalán libre; mientras que resultaron ser más tóxicos que el cisplatino.

**Tabla 1.** Actividad anticancerígena de los dendrímeros **5-8** y de los conjugados **9**, **10** contra 6 líneas celulares a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  en DMSO en porcentaje de inhibición.

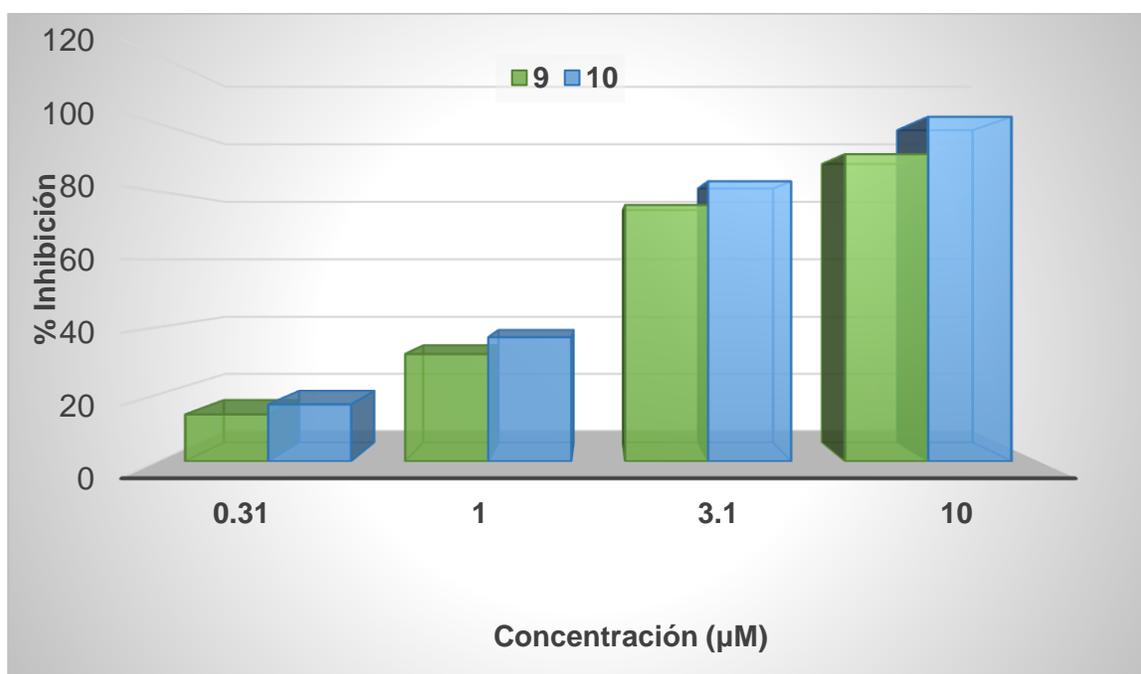
LÍNEAS CELULARES							
Compuestos	U251	PC-3	K-562	HCT-15	MFC-7	SKLU-1	HGF
<b>5</b>	NC	5.4	1.5	NC	7.10	NC	0.2
<b>6</b>	NC	6.3	2.5	5.6	4.2	8.9	0.9
<b>7</b>	18.7	9.7	34.0	NC	7.10	NC	1.8
<b>8</b>	7.9	10.3	13.4	10.9	5.4	NC	9.7
<b>9</b>	60.1	51.7	41.7	49.8	55.2	49.9	12.0
<b>10</b>	82.4	100	80.8	91.9	92.7	85.4	10.7
<b>Melfalán</b>	49.8	7.43	34.02	18.7	65.9	70.5	22.0
<b>Cis-Platino</b>	87.49	42.65	79.15	32.42	52.58	81.35	NC

NC: No citotóxico

Con base en estos resultados, se decidió obtener el 50% de la concentración máxima necesaria para de inhibición IC50. Sin embargo, durante el desarrollo de esta etapa se determinó que si los compuestos eran solubles en agua esta determinación debería realizarse usando agua como medio en lugar del DMSO, y además como el compuesto **10** presentó una alta actividad contra el cáncer de próstata la línea celular PC-3 (adenocarcinoma prostático humano), también se decidió determinar la IC50 únicamente para esta línea celular.

### 7.10.3 Determinación de la IC50

En la Figura 22 se muestra el % de inhibición del crecimiento celular de la línea celular PC-3 en función de la concentración de los dos conjugados **9** y **10**, la línea celular estuvo expuesta durante dos días a cuatro concentraciones (0.31, 1.0, 3.1 y 10  $\mu\text{M}$ ) de los conjugados de melfalán **9** y **10**. A dosis bajas de 0.31  $\mu\text{M}$  el conjugado tiene una buena actividad antiproliferativa, y cuando el conjugado se encuentra a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  la línea celular PC-3 presenta una muerte del 100 %. Del presente gráfico se calculó la IC50 de los compuestos **9** y **10** siendo de  $1.39 \pm 0.003$  y  $1.34 \pm 0.002$   $\mu\text{M}$  respectivamente.



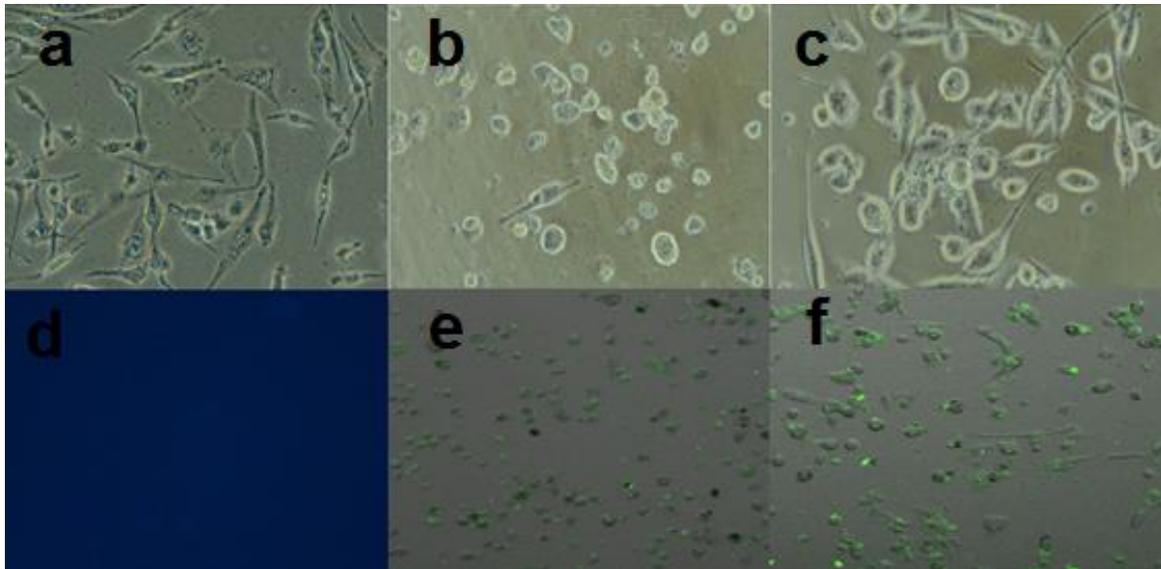
**Figura 22.** Citotoxicidad de los conjugados melfalán contra células tumorales PC-3. Las células se cultivaron en medio en presencia de las concentraciones indicadas de melfalán durante 48 h.

De los resultados obtenidos sobre la actividad anticancerígena de los conjugados **9** y **10** se puede concluir que el conjugado de segunda generación compuesto **10** con

16 moléculas de melfalán en su estructura a concentraciones muy bajas 3 y 10  $\mu\text{M}$  es un muy buen prospecto para ser empleado como un anticancerígeno en contra el cáncer de próstata.

#### **7.10.4. La captación celular *in vitro* de los conjugados de melfalán**

Se ha determinado la captación celular *in vitro* de los conjugados de melfalán en células PC-3. PC-3 células con melfalán y dendrímero conjugado a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  durante 24 h, antes del examen bajo un microscopio de fluorescencia (x10). Los conjugados dendrímeros a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  fueron citotóxicos para las células PC-3. En la Figura 23 se muestran las celdas de control de PC-3 (a). Las células control PC-3 no mostraron fluorescencia verde (d). Las células PC-3 tratadas con la porfirina-PAMAM-melfalán mostraron cambios en la morfología y también se observó cómo aumentó el volumen de las células y una disminución en el número de ellas debido a la muerte e inhibición en el crecimiento. La diferencia en el número de células por placa se debió al efecto inhibitor de los conjugados sobre la tasa de proliferación (b, c). Las células PC-3 con el dendrímero conjugado **9** y **10** mostraron fluorescencia verde, documentando la captación del conjugado de dendrímero (e, f). También se observan diferencias entre los conjugados **9** y **10** en la intensidad y la captación celular de los conjugados debido al número de unidades de melfalán en cada uno de los dendrímeros.



**Figura 23.** Morfología de PC-3. a) células PC-3 de control (10X), b, c) células PC-3 con conjugados de porfirina-PAMAM-melfalán **9** y **10**, d) fluorescencia de las células PC-3 sin conjugado y e, f) fluorescencia de la PC -3 células incubadas con porfirina-PAMAM-melfalán conjugado 9 y 10 (10X amplificación).

De la Figura 23 e y f se puede concluir que la internalización celular de los dendrímeros de porfirina-PAMAM-melfalán podría producirse por endocitosis mediada por clatrina.

## 8. Conclusiones

Se realizó la síntesis de la porfirina octametoxilada y se realizó la desprotección de está empleando el tribromuro de boro. La estructura de las porfirinas de confirmó por resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

Se realizó la síntesis de los dendrímeros tipo PAMAM con un núcleo porfirínico de primera y segunda generación empleando bromoacetato de metilo, etilendiamina y acrilato de metilo obteniéndose los dendrímeros de primera y segunda generación con 8 y 16 grupos amina primarias terminales.

Se realizaron pruebas de solubilidad a los dendrímeros de generación 1.0 y generación 2.0 resultando ser solubles en agua. Todos los dendrímeros obtenidos fueron caracterizados por las técnicas espectroscópicas.

Se realizaron las pruebas de solubilidad del melfalán en agua observándose que no es soluble en agua.

Se confirmó por los métodos espectroscópicos; resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , FTIR, UV-vis, espectrometría de masas y análisis elemental que cada uno de los centros activos presentes en los dendrímeros reaccionaron con el melfalán.

Se realizaron las pruebas de solubilidad de los conjugados con melfalán resultando ser solubles en agua.

Del estudio primario de la actividad anticancerígena a  $25\ \mu\text{M}$  se observó que los conjugados con melfalán compuestos **9** y **10** eran más activos contra dos líneas celulares la PC-3 y la MFC-7 en comparación con el cisplatino y el melfalán libre.

Se realizó la determinación del 50% de la concentración inhibitoria máxima IC50. Obteniéndose los valores de IC50 para los compuestos **9** y **10** de  $1.39 \pm 0.003$  y  $1.34 \pm 0.002\ \mu\text{M}$  respectivamente.

Se observó por microscopía confocal a las células de PC-3 en el medio de cultivo sin los conjugados y con los conjugados, observándose que con los conjugados

ocurría una disminución en el número de células de PC-3 así como un aumento del volumen de ellas.

Por microscopía confocal de fluorescencia se confirmó la captación celular *in vitro* de los conjugados con melfalán por las células PC-3, observándose una fluorescencia de color verde en las células PC-3 con los dendrímeros conjugados **9** o **10**. También se observaron diferencias en la intensidad y la captación celular de los conjugados **9** o **10** lo que se puede atribuir al número de moléculas de melfalán en cada uno de los dendrímeros.

Se considera que, para los conjugados de la porfirina-PAMAM-melfalán la internalización celular puede producirse por endocitosis mediada por clatrina.

## Referencias

1. Sessler J.L., Weghorn.S. J.; Expanded, Contracted & Isomeric Porphyrins, *Tetrahedron Organic Chemistry series* **1997**, 1.
2. Battersby A.R., Fookes C. J. R., Matcham G. W. J., McDonald E., Spectroscopy and Synthesis that Unrearranged Hydroxymethylbilane is the Product from Deaminase and the Substrate for Cosynthetase in the Biosynthesis of Uroporphyrinogen-III, *Nature*, **1980**, 285.
3. Sessler J.L., Weghorn S. J., Expanded, Contracted and Isomeric porphyrins, *Pergamon*, Great Britain, **1997**, 519.
4. Soret J.L., Recherchessur l'absorption des rayons ultraviolets par diverses substances. *Arch. Sci. Phys. Nut.* **1883**, 10:430.
5. Rothmund P., Porphirine estudies III, The Structure of the Porphine Ring System. *J. Am. Chem. Soc.* **1939**, 61:2912.
6. Rothmund P., Menotti AR.J., *Am. Chem. Soc.* **1941**, 63:247.
7. Barnet G.H., Hudson M.F., Smith K.M., *Tetrahedron.Lett.***1973**, 2887.
8. Broadhurst M. J., Grigg R., Johnson A. W.; *1 Chem. SOC. (C)* **1971. 3681**. A. W. Johnson in *Porphyrins and Meralloporphyrins* (Ed.: K. M. Smith), Elsevier. Amsterdam. **1975**, 729.
9. Lash T. D., Porphyrin Synthesis by the "3 + 1" Approach: New Applications for an Old Methodology, *Chem. Eur. J.* **1996**,2. 10: 0947-6539/96/02fO-12.
10. Nishiyama N., Stapert H.R., Zhang G.D., Harada A., Takasu D., Jiang D.L., et al. Lightharvesting ionic dendrimerporphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy, *Bioconjugate, Chem*, **2003**, 14:58.
11. Wasielewski R., Weiss A., Bushard J., Zhao Y., Hayes T., Van der Boom T, *J Am Chem Soc.***2002**, 124:9582.
12. Young S.W., *Magnetic Resonance Imaging." Basic Principles*, Raven Press: New York, **1987**, 298.
13. Henderson B.W., Dougherty T. J., How Does Photodynamic Therapy Work?, *Photochem and Photobiol*, **1992**, 145.

14. Russo A., Mitchell J., Kinsella T., Morstyn G., Glatstein E., Gadolinium(III) texaphyrin: a tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1996**, 13:6610.
15. W. Saenger, Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer Verlag: New York, **1988**, 352, 497.
16. Jin R.H., Aida T., Inoue S., 'Caged porphyrin': the first dendritic molecule having a core photochemical functionality, *J. Chem. Soc. Chem. Commun*, **1993**, 10:1260.
17. Matos M.S., Hofkens J., Verheijen F.C., Shryver D., Hecht S., Effect of core structure on photophysical and hydrodynamic properties of porphyrin dendrimers, *Macromolecules*, **2000**, 33:2967.
18. Choi M.S., Aida T., Yamazaki T., Yamazaki I., A large dendritic multiporphyrin arrays as a mimic of the bacteria light harvesting antenna complex: molecular design of an efficient energy funnel for visible photons, *Angew. Chem. Int.* **2001**, 521.
19. Buhleier E., Wehner W., Vögtle F., "Cascade" and "non-skid-chain-like" syntheses of molecular cavity topologies, *Synthesis*. **1978**, 2:155.
20. Tomalia A.D., Dvornic P.R., Recent advances in dendritic Polymers, *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.* **1996**, 1:221.
21. Fréchet J.M., Tomalia D.A., Dendrimers and other dendritic polymers, John Wiley & Sons, **2001**, 587.
22. Tomalia A.D., Fréchet M.J., Discovery of dendrimers and dendritic polymers: A brief historical perspective. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2002**, 40:2719.
23. Spindler F., Fréchet M.J., Two step approach towards the accelerated synthesis of dendritic macromolecules, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1991**, 913.
24. Zeng F., Zimmerman S.C., Rapid Synthesis of dendrimers by an orthogonal coupling strategy, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118:5326.

25. Wooley K.L., Hawker C.J., Fréchet M.J., Hyperbranched macromolecules via a novel doublestage convergent growth approach, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113:4252.
26. Miller T.M., Neenan T.X., Zayas R., Bair H.E., Synthesis and characterization of a series of monodisperse, 1,3,5-phenylene-based hydrocarbon dendrimers including C<sub>276</sub>H<sub>186</sub> and their fluorinated analogs, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114:1018
27. Klopsch R., Franke P., Schlüter A.D., Repetitive Strategy for Exponential Growth of Hydroxy-Functionalized Dendrons, *Chem. Eur. J.* **1996**, 2:1330.
28. Wooley K.L., Hawker C., Fréchet M.J., *Angew. Chem.* **1994**, 106.
29. Forier B., Dehaen W., Alternative convergent and accelerated double-stage convergent approaches towards functionalized dendritic polyethers. *Tetrahedron* **1999**, 55:9829.
30. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew Chem. Int. Ed.* **2001**, 40:11:2004.
31. Lee J. W., Kim K., Rotaxane Dendrimers, *Top Curr Chem* **2003**, 228:111.
32. Francois Nierengarten J., Fullerodendrimers: Fullerene-Containing Macromolecules with Intriguing Properties, *Top Curr Chem* **2003**, 228:87.
33. Scott Medina H., Mohamed E., El-Sayed H., Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Agents. *Chem. Rev.* **2009**, 109:3141.
34. Gillies E.R., Frechet J. M., *J. Drug Discovery Today* **2005**, 10:35.
35. Patri K.A., Kukowska-Latallo F.J., Baker Jr R.J., Targeted drug delivery with dendrimers. Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex (*Advanced Drug Delivery Reviews* **57** **2005**, 2203).
36. Morris A.D., Atassi G., Guilbaud N., Cordi A.A., The synthesis of novel melphalan derivatives as potential antineoplastic agents, *Eur J Med Chem* **1997**, 32:343.
37. Bielawski K., Bielawska A., Sosnowska K., Milyk W., Winnicka K., Pałka J., Novel amidine analogue of melphalan as a specific multifunctional inhibitor of

growth and metabolism of human breast cancer cells, *biochemical pharmacology* 72 **2006**, 320.

38. Ashnagar A., Gharib N., Darakhshanmehr M., Synthesis and Elucidation of 4-bis(Chloroethyl)-amino-L-phenylalanine, *Asian Journal of chemistry*, **2007**, 19, 5399.
39. Bergel F., Stock J.A., Cyto-active amino-acid and peptide derivatives. Part I. Substituted phenylalanines, *Journal of chemical Sciences*, **1954**, 2409.