

## MATERIALS I MÈTODES

---

### A. Dissolvents, reactius generals i dissolucions tampó

#### A.1 Dissolvents i reactius generals

- ACN anh.: es destil·la acetonitril de qualitat HPLC (Scharlau) sobre  $\text{CaH}_2$  en pols i es guarda en atmosfera d'argó sobre  $\text{CaH}_2$  en forma de pedres.
- Aigua: de qualitat Millipore desionitzada i filtrada amb un sistema Milli-Q plus amb una resistivitat superior a  $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ .
- DCM: de Scharlau (qualitat Normalsolv), es neutralitza fent-lo passar per una columna d'alúmina bàsica.
- DCM anh.: es prepara de la forma anterior i es guarda en atmosfera d'argó sobre  $\text{CaH}_2$  en forma de pedres.
- Dioxà: de Merck (pro-analysis)
- DMF anh.: es guarda sobre tamís molecular de  $4\text{Å}$  prèviament activat a l'estufa. Abans d'utilitzar-la es bombolleja amb  $\text{N}_2$  durant mitja hora per tal d'eliminar impureses volàtils.
- Piridina: de Panreac (qualitat Karl-Fisher), guardada sobre pedres de  $\text{CaH}_2$ .
- Piridina anh.: de Panreac (qualitat Karl-Fischer), es destil·la sobre ninhidrina i es guarda sobre pedres de  $\text{CaH}_2$ .
- THF anh.: es destil·la sobre sodi en presència de benzofenona, sota atmosfera de nitrogen.
- TEA: es destil·la sobre  $\text{CaH}_2$  i es guarda sobre KOH.
- DCC, HOBt, TCA,  $^1\text{H}$ -tetrazole: de Fluka.
- Piperidina, pirrolidina i àcid isonipecòtic: d'Aldrich.
- $\text{CaH}_2$ : d'Aldrich (Lumps, Mesh 95%).
- $\text{NH}_3$ : de Merck (32% extrapur).

## **A.2 Preparació de dissolucions tampó**

### **A.2.1 Acetat d'amoni (NH<sub>4</sub>OAc), 2 M, pH 7**

Es dissolen 71 g d'acetat d'amoni en 400 mL d'aigua miliQ, s'ajusta el pH a 7 (amb HCl o NaOH segons convingui) i s'enrasa a 500 mL. La dissolució final es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm de porus i es guarda a la nevera.

### **A.2.2 Acetat de trietilamoni (TEAAc), 2 M, pH 7**

Es barregen 140 mL de TEA, 58 mL d'AcOH glacial i 250 mL d'aigua miliQ, agitant vigorosament. Un cop es refreda la dissolució, s'ajusta el pH a 7 (amb TEA o AcOH segons convingui) i s'enrasa el volum a 500 mL amb aigua miliQ. El tampó es filtra a través d'un filtre de 0.45 µm de porus i es guarda a la nevera.

### **A.2.3 Bicarbonat de trietilamoni (TEAB), 2 M, pH 7-8**

Es barregen 278 mL de TEA i 722 mL d'aigua miliQ en un matràs erlenmeyer de 2 L. En un Kitasato se sublima neu carbònica de manera que es fa bombollear a través d'un capil·lar de vidre sobre la barreja anterior el corrent de CO<sub>2</sub> resultant, sota agitació constant. Quan desapareixen les dues fases es continua bombollejant fins ajustar el pH a un valor entre 7 i 8. La solució resultant es guarda a la nevera.

### **A.2.4 Pipes, 100 mM, pH 7**

Es dissolen 1.88 g de Na<sub>2</sub>Pipes en 40 mL d'aigua miliQ en un matràs aforat de 50 mL. S'ajusta el pH a 7 amb HCl i s'enrasa a 50 mL amb aigua miliQ. Es guarda al congelador.

## **B. Instrumentació i tècniques generals**

### **B.1 Tècniques espectroscòpiques**

#### **B.1.1 Ressonància magnètica nuclear (RMN)**

Els espectres de rutina de ressonància magnètica nuclear de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C i <sup>31</sup>P s'han realitzat en aparells Mercury-400 MHz, Varian Unity-300 MHz i Gemini-200 MHz de la Unitat d'RMN d'Alt Camp, adscrita als Serveis Científic-Tècnics de la UB. Els valors de desplaçament químic de <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C (δ) s'expressen en ppm respecte a la senyal corresponent als protons i als carbonis del tetrametilslà (δ=0 ppm) respectivament. Per als espectres de <sup>31</sup>P s'ha utilitzat H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%, δ=0 ppm) com a patró estàndard extern

en D<sub>2</sub>O i trimetilfosfit en CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$ =141.6 ppm). Les constants d'acoblament s'expressen en Hz. Les abreviatures per indicar la multiplicitat de les senyals han estat la següent: s (singulet), d (doblet), dd (doble doblet), t (triplet), m (multiplet). Els experiments de ressonància de <sup>31</sup>P de resines en fase gel s'han realitzat suspent les resines en CDCl<sub>3</sub> i en tubs especials de fons pla que, amb l'ajut d'un èmbol, permeten concentrar la mostra en la zona d'irradiació (tub SHIGEMI Co, LDT, Japan).

### B.1.2 Espectroscòpia ultravioleta (UV)

Els espectres d'absorció d'UV-VIS s'han enregistrat en un espectrofotòmetre Perkin Elmer Lambda 5, en un Varian Cary 5E i en un Jasco V-550, proveït d'un Pelltier ETC-505T (Jasco) com a controlador de la temperatura. Les cubetes emprades han estat varies, totes elles de quars, amb camins òptics d'1 i de 0.1 cm i de 1.5 mL, 750  $\mu$ L, 450  $\mu$ L i 300  $\mu$ L de capacitat, depenent de les característiques de la mostra a analitzar.

## B.2 Espectrometria de masses

Els espectres de masses s'han realitzat al Servei d'Espectrometria de Masses de la Divisió III de la UB. Els espectres obtinguts mitjançant les tècniques d'ionització en electrospray (EM-ES) i per bombardeig d'àtoms ràpids (EM-FAB) s'han realitzat en un aparell VG-Quattro (Fison Instruments), utilitzant un voltatge capil·lar de 3.5 kV i 10 kV respectivament. Els espectres de masses adquirits mitjançant la tècnica de desorció iònica per làser assistida per matriu, amb detecció de temps de vol (EM-MALDI-TOF) s'han obtingut en un aparell de Perseptive Biosystems Voyager DE<sup>TM</sup>-RP, amb un làser de N<sub>2</sub> de 337 nm i polsos de 3 ns. Mitjançant aquesta tècnica s'han analitzat tant derivats acridínics (+) com oligonucleòtids i conjugats (-). Per dur a terme l'anàlisi per MALDI-TOF és necessari l'ús de matrius, i sovint, també de co-matrius.

### B.2.1 Preparació de les matrius i co-matrius utilitzades

- DHB (àcid 2,5-dihidroxibenzòic): 10 mg/mL en ACN/H<sub>2</sub>O (1:1) (0.1% TFA).
- CA (citrat amònic): 50 mg/mL en H<sub>2</sub>O.
- THAP (2,4,6-trihidroxiacetofenona): 10 mg/mL en ACN/H<sub>2</sub>O (1:1).
- HPA (àcid 3-hidroxicolínic): 10 mg/mL en ACN/H<sub>2</sub>O (1:1).

### B.2.2 Preparació de les mostres per a MALDI-TOF

- Derivats acridínics: a 1  $\mu$ L de dissolució de la molècula a analitzar, se li afegeix 1  $\mu$ L de la dissolució de DHB. S'homogeneïtza bé i es pren 1  $\mu$ L, que es diposita sobre la placa. Es deixa evaporar el dissolvent abans de realitzar l'anàlisi.

- Oligonucleòtids i conjugats: a 1  $\mu\text{L}$  de dissolució del producte a analitzar, se li afegeix 1  $\mu\text{L}$  de la dissolució de CA i s'homogeneïtza. A continuació s'afegeix 1  $\mu\text{L}$  de la matriu corresponent (THAP o HPA), es torna a homogeneïtzar i es prenen 2  $\mu\text{L}$ , que es dipositen sobre la placa. Es deixa evaporar el dissolvent abans de realitzar l'anàlisi.

## B.3 Tècniques cromatogràfiques

### B.3.1 Cromatografia en capa fina (CCF)

La cromatografia en capa fina (CCF) s'ha realitzat sobre cromatofolis de gel de sílice amb suport d'alumini (60 F, 0.2 mm, Merck), utilitzant majoritàriament com a eluents barreges de DCM, MeOH, TEA i acetona en diferents proporcions.

- Revelat per UV (grups aromàtics/cromòfors): el revelat de les capes fines s'ha realitzat mitjançant l'observació de la placa cromatogràfica directament sota una làmpada ultraviolada a les longituds d'ona  $\lambda=254$  nm i/o  $\lambda=365$  nm, depenent del tipus de mostra analitzada.
- Revelat de grups protectors DMT, MMT i tritol: el revelat dels compostos que contenen els grups protectors DMT, MMT o tritol, s'ha dut a terme sometent la placa cromatogràfica a vapors àcids, o bé escalfant-la amb una pistola. La coloració taronja revela la presència de la catió tritol.
- Revelat amb ninhidrina (detecció de grups aminos lliures): es polvoritza la placa cromatogràfica amb una dissolució de ninhidrina (0.5% en acetona) i s'esclafa a 110°C durant 3 minuts. La presència de grups amino es posa de manifest per l'aparició d'una coloració violeta.

### B.3.2 Cromatografia en columna

La cromatografia en columna s'ha realitzat sobre gel de sílice (Chromatogel, 60 $\text{\AA}$  CC, 35-70 microns, SDS). S'empren uns 60 g de sílice per cada gram de cru a purificar. Els eluents utilitzats s'indiquen en cada cas. En el cas de l'addició de les mostres en forma de càrrega sòlida, aquesta es prepara amb l'addició de sílice a la dissolució del cru a purificar (5 g de sílice per cada gram de producte). Posteriorment s'evapora el dissolvent a sequedat i es procedeix a la càrrega de la columna.

### B.3.3 Cromatografia líquida

#### B.3.3.1 Cromatografia líquida analítica

La cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) a escala analítica s'ha realitzat en 4 cromatògrafs de les cases comercials Shimadzu i Waters compostos per:

- Shimadzu I: dues bombes LC-6A amb un mesclador d'alta pressió, controlador SCL-6B, autoinjector SIL-6B, detector d'UV-VIS de longitud d'ona variable SPD-6A i enregistrator integrador Chromatopac C-R6A.
- Shimadzu II: dues bombes LC-10AS amb mesclador d'alta pressió, autoinjector SIL-9A, detector d'UV-VIS de longitud d'ona variable SPD-10A i enregistrator integrador Chromatopac C-R5A.
- Shimadzu III: dues bombes LC-10AD amb mesclador d'alta pressió, autoinjector SIL-10Axi, detector d'UV-VIS de longitud d'ona variable SPD-M10AVP6A, impressora Hewlett-Packard, mòdul de comunicació CBM-10A i ordinador COMPAQ DESKPRO (Diode-Array).
- Waters: cromatògraf compost per una unitat de Separations Module 2695 i un detector PDA 2996.

Per dur a terme la cromatografia en fase reversa s'han utilitzat columnes de diferents tipus:

- Kromasil C<sub>18</sub> (tracer): de 250 x 4 mm i de 10 µm de mida de partícula.
- Kromasil C<sub>18</sub> (tracer): de 100 x 4 mm i de 5 µm de mida de partícula.
- Kromasil C<sub>8</sub> (tracer): de 250 x 4 mm i de 10 µm de mida de partícula.
- Nucleosil C<sub>4</sub> (tracer): de 250 x 4 mm i de 10 µm de mida de partícula.
- Xterra<sup>TM</sup> MSC<sub>18</sub> (Waters): de 50 x 4.6 mm i de 2.5 µm de mida de partícula.

Els sistemes d'elució emprats (flux = 1 mL/min) s'han basat en gradients lineals de dos eluents diferents. Els eluents usats, així com també el gradient utilitzat, s'especifiquen en cada cas.

#### B.3.3.2 Cromatografia líquida preparativa

La purificació per cromatografia líquida de mitja pressió (MPLC) s'ha dut a terme en sistemes compostos per una bomba de pistó Duramat (cfg ProMinent), detector d'UV-VIS de longitud d'ona fixa Uvicord SII (Pharmacia Biotech), un col·lector de fraccions automàtic Ultrorac 7000 (LKB) i un enregistrator REC 101 (Pharmacia Biotech). S'han utilitzat columnes de fase reversa C<sub>18</sub> (Vydac, 20 x 2 cm, 15 – 20 µm de diàmetre de partícula i 300 Å de mida de porus) i C<sub>8</sub> (LiChroprep, 25 x 5 cm, 15 – 20 µm de diàmetre de partícula i 300 Å de mida de porus), eluint a un flux de 2-3

mL/min i col·lectant fraccions cada 2-3 minuts. Com a eluents s'han utilitzat els mateixos que per HPLC analític, però començant amb una proporció d'eluents més baixa en %B. Per crear el gradient s'ha utilitzat un sistema de vasos comunicants, de manera que en un es col·loca l'eluent inicial i en l'altre la mescla d'eluents a la que es vol arribar.

La purificació per cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) s'ha dut a terme en el cromatògraf Waters indicat anteriorment (apartat B.3.3.1), utilitzant una columna semi-preparativa de fase reversa Xterra MSC<sub>18</sub> (Waters, 10 x 50 mm, 2.5 µm de mida de partícula). El flux emprat en aquestes purificacions ha estat de 3 mL/min.

### B.3.3.3 Cromatografia d'exclusió molecular

El dessalatge de quantitats importants d'oligonucleòtids s'ha realitzat mitjançant la filtració molecular a través d'una columna de Sephadex G-10 (80 x 2 cm, Pharmacia). El sistema està format per una bomba peristàltica Pharmacia P-1 (LKB), un detector d'UV-VIS de longitud d'ona fixa Uvicord SII (Pharmacia Biotech), un col·lector de fraccions automàtic Ultrorac 7000 (LKB) i un enregistrator REC 101 (Pharmacia Biotech). L'oligonucleòtid es dissol en la mínima quantitat d'aigua i com a eluent s'utilitza una solució de TEAB 50 mM pH 8.

### B.3.3.4 Cromatografia de bescanvi iònic

L'intercanvi iònic per tal d'obtenir les sals sòdiques dels oligonucleòtids s'ha realitzat sobre una resina Dowex 50 W x 4 (200-400 mesh, 4.8 meq Na<sup>+</sup>/g de resina seca, Fluka). La resina es diposita en una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè i se segueixen els següents passos:

<i>Etapa</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Volum (mL)</i>
1	H <sub>2</sub> O	50
2	HCl 10%	200
3	H <sub>2</sub> O	fins a pH neutre
4	NaOH 1 M	200
5	H <sub>2</sub> O	fins a pH neutre

*Taula 1 – Tractaments realitzats per tal d'obtenir la sal sòdica d'un oligonucleòtid.*

## B.4 Altres tècniques

Els punts de fusió (pf) s'han determinat en aparells Gallenkamp. Les mesures de pH s'han realitzat en un pHmetre Crison micropH Basic 02. Les centrifugacions s'han dut a terme en una centrifuga termostatitzada Beckman GS-15R. Les liofilitzacions de les dissolucions aquoses s'han realitzat en els aparells Virtis model Freezemobile QD6 o 12EL i en l'aparell Labconco model Freezone 6.

## C. Síntesi d'oligonucleòtids en fase sòlida

### C.1 Instrumentació i reactius generals

La síntesi d'oligonucleòtids s'ha realitzat en un sintetitzador Applied Biosystems 380B, seguint el mètode del fosfit triester amb diferents programes de síntesi automàtica en funció de la resina utilitzada així com també de l'escala de treball. Els reactors són cartutxos d'OPC d'Applied Biosystems equipats amb teflon on s'hi introdueix la resina rentada i assecada, a punt per començar la síntesi. El reactor es tanca amb tacs de plàstic i se segella amb anelles d'alumini. Tot el material utilitzat s'asseca a 110°C i s'atempera al dessecador. Els suports polimèrics utilitzats són:

- TentaGel N NH<sub>2</sub> (f inicial = 0.24 mmol/g) de RAPP POLYMERE.
- MBHA-PS 4-(metilbenzhidrilamina)poliestirè (f inicial = 0.70 mmol/g) de Novabiochem.
- CPG (*Controlled Pore Glass*), amb el primer nucleòsid ja incorporat d'Applied Biosystems.

Els 3'-(2-cianoetil)-*N,N*-diisopropilfosforamidits de 5'-*O*-(4,4'-dimetoxitritil) desoxiribonucleòsids (DMT-dA<sup>Bz</sup>, DMT-dG<sup>iBu</sup>, DMT-dT, DMT-dC<sup>Bz</sup>, DMT-dC<sup>Ac</sup>) són de Glen Research. L'àcid *N*-Fmoc-6-aminohexanòic emprat és de Neosystem, l'1-mesitilensulfonil-3-nitro-1,2,4-triazole (MSNT) de Novabiochem, el 2-piridinal carbaldehid oxima de Merck i el TMG de Fluka. Els altres reactius habituals (tetrazole 0.5 M en ACN, Ac<sub>2</sub>O/lutidina/THF 1:1:8, 1-metilimidazole 6.5% en THF, TCA 3% en DCM) s'han adquirit a Applied Biosystems, a Cruachem o a Glenn Research, i l'agent oxidant <sup>t</sup>BuOOH 5-6 M en toluè a Fluka.

### C.2 Càlcul de l'eficiència d'acoblament i rendiment global en la síntesi automàtica

Els rendiments individuals de cada acoblament es determinen per comparació de les mesures d'absorbància de les dissolucions que provenen de l'etapa d'eliminació del grup DMT diluïdes en una solució d'àcid *p*-toluensulfònic 0.1 M en ACN (19 g d'àcid tòxic monohidrat en 1 L d'ACN). S'addiciona solució d'àcid *p*-toluensulfònic a les dissolucions que provenen del sintetitzador fins a assolir un volum total d'uns 25 mL per a cada dissolució de DMT a analitzar. Es mesura l'absorbància a 498 nm de cada dissolució i es calcula el rendiment de l'acoblament del nucleòsid *n* aplicant la següent equació:

$$Rdt_n = A_{498}(n)/A_{498}(n-1)$$

on  $A_{498}(n)$  és l'absorbància a 498 nm de la solució provinent de la detritilació del nucleòtid *n* i  $A_{498}(n-1)$ , l'equivalent al nucleòtid *n*-1.

Pel que fa al rendiment global, es realitza aquest procediment per primer acoblament i per l'últim, llavors el rendiment es calcula segons la següent equació:

$$Rdt_{\text{global}} = A_{498}(\text{darrer nucleòtid}) / A_{498}(\text{primer nucleòtid})$$

### C.3 Quantificació d'oligonucleòtids

La quantificació d'oligonucleòtids es realitza determinant la seva absorció a 260 nm i s'indica en unitats d'absorbància OD<sub>260</sub>. Una OD (densitat òptica) es defineix com la quantitat d'oligonucleòtid que, continguda en 1 mL de dissolució i en una cubeta d'1 cm de pas de llum dona una absorció A=1. Així per quantificar un oligonucleòtid, aquest es liofilitza i es dissol en una quantitat coneguda d'H<sub>2</sub>O (1-2 mL). Llavors es realitza una dilució coneguda de manera que l'absorbància de la dissolució final es trobi entre 0.2 i 0.8. Llavors s'obté la quantitat d'oligonucleòtid que tenim a través de la següent equació:

$$OD_{260} = A \times V \times d$$

on A és l'absorbància, V és el volum amb què s'ha dissolt l'oligonucleòtid i d és la dilució realitzada.

L'equivalència molar de les OD<sub>260</sub> es determina a partir d'una aproximació en què es considera que l'absorció global de l'oligonucleòtid en qüestió és deguda a l'efecte acumulat de l'absorció individual de cadascuna de les diferents nucleobases que el componen. En aquesta aproximació es realitza una correcció, en la qual es considera el fenomen de l'apilament que sofreixen les bases. El coeficient d'absortivitat molar d'un oligonucleòtid es calcula mitjançant la següent fórmula:

$$\epsilon_{\text{oligo}} = \sum \epsilon_{\text{base}} \cdot f$$

on  $\epsilon_{\text{base}}$  són els coeficients individuals de cada base i  $f$  el factor de correcció (0.9 per a oligonucleòtids de cadena única i 0.8 per a autocomplementaris o de doble cadena).

dA	dG	dC	T
15200	11500	7300	8830

Taula 2 —  $\epsilon_{260}$  de les diferents bases ( $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ).



## C.4 Dessalatge d'oligonucleòtids

El dessalatge de les mostres d'oligonucleòtids provinents de mesures de DC, d'RMN o d'UV s'ha realitzat mitjançant columnes Sep Pak C<sub>18</sub> (Classic-short body, Waters) seguint el següent protocol:

<i>Etapa</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Volum (mL)</i>
1	ACN	10
2	H <sub>2</sub> O	10
3	NH <sub>4</sub> OAc 2 M	2
4	Mostra de DNA en H <sub>2</sub> O	1-2
5	H <sub>2</sub> O	30
6	ACN/H <sub>2</sub> O (1:1)	Fins que ja no absorbeixi a 260 nm (~5 mL)

*Taula 3 – Tractaments realitzats per tal de dessalar un oligonucleòtid usant una columna Sep Pak C<sub>18</sub>.*

## D. Mètodes analítics

### D.1 Assaig qualitatiu de la ninhidrina

L'assaig posa de manifest la presència d'amines primàries en un polímer. El reactius utilitzats són:

- Reactiu A: es prepara una dissolució en calent de fenol (40 g) en EtOH absolut (10 mL). A continuació, es prepara una altra dissolució de KCN (65 mg) en H<sub>2</sub>O (100 mL). D'aquesta última es dilueixen 2 mL en 100 mL de piridina acabada de destil·lar sobre ninhidrina. Aquestes dues solucions s'agiten separadament amb 4 g de resina Amberlite MB-3 durant 45 minuts. Seguidament es filtren i es mesclen.
- Reactiu B: es prepara una dissolució de ninhidrina (2.5 g) en EtOH absolut (50 mL) i es manté protegida de la llum i preferentment sota atmosfera de N<sub>2</sub>.

Per dur a terme l'assaig es pren una petita quantitat de resina (0.5-2 mg) ben seca (rentada amb DCM o MeOH i assecada al buit) i es diposita dins un tub de vidre. S'afegeixen 6 gotes de reactiu A i 2 gotes de reactiu B al tub i aquest es col·loca dins l'estufa a 110°C durant 3 minuts. Passat aquest temps es refreda el tub i s'observa el color del sobrenedant i de la resina. Una coloració blavosa indica la presència d'amines primàries, mentre que una coloració groguenca indica la seva absència. Degut a la gran sensibilitat del mètode, una coloració groguenca assegura una presència d'amines inferior al 0.5 %.

## D.2 Determinació de la funcionalització de resines

### D.2.1 Funcionalització d’Fmoc-resines

Per tal de calcular la funcionalització d’una resina en la qual hi ha ancorat un grup Fmoc es pesa en una xeringa proveïda d’un filtre de polipropilè una quantitat de resina al voltant de 5-10 mg. Es diposita la xeringa al dessecador per tal d’assecar bé la resina que conté i es determina exactament el seu pes. Posteriorment se sotmet al següent tractament:

<i>Etapa</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Nº de tractaments</i>	<i>Temps (min.)</i>
1	DCM	4	1
2	DMF	4	1
3	Pip. 20% en DMF	3	3
4	DMF	1	1

**Taula 4** – Tractaments realitzats a la resina per tal d’eliminar el grup Fmoc.

Els filtrats procedents de les etapes 3 i 4 es recullen en un matràs aforat que s’enrasa amb DCM. A continuació es determina l’absorbància a 300 nm de la *N*-(9-fluorenilmetil)piperidina ( $\epsilon_{300}=7800 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) formada en l’eliminació del grup Fmoc. El valor de la funcionalització de la resina s’obté a través de la següent equació:

$$f(\mu\text{mol/g})=(A_{300}\cdot V\cdot 10^6) / (7800\cdot l\cdot m)$$

on  $A_{300}$  és l’absorbància a 300 nm,  $V$  el volum del matràs aforat,  $l$  el pas de llum de la cubeta i  $m$  la massa de la resina (mg).

### D.2.2 Funcionalització de DMT-resines

Per tal de calcular la funcionalització d’una resina en la qual hi ha ancorat un grup DMT es pesa en una xeringa proveïda d’un filtre de polipropilè una quantitat de resina al voltant de 5-10 mg. Es diposita la xeringa al dessecador per tal d’assecar bé la resina que conté i es determina exactament el seu pes. Posteriorment es tracta la resina amb TCA 2% en DCM. Es renta bé la resina amb DCM fins que no apareix coloració taronja. Tots els filtrats es recullen en un baló de 50 mL, i s’evaporen a sequedat. Es redissol el producte taronja obtingut amb una mescla  $\text{HClO}_4/\text{EtOH}$  (3:2) i s’enrasa en un matràs aforat. Es mesura l’absorbància a 498 nm corresponent al catió 4,4’-dimetoxitritil generat durant la desprotecció ( $\text{DMT}^+$ ,  $\epsilon_{498}=71700 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). El valor de la funcionalització de la resina s’obté a través de la següent equació:

$$f(\mu\text{mol/g})=(A_{498}\cdot V\cdot 10^6) / (71700\cdot l\cdot m)$$

on  $A_{498}$  és l'absorbància a 498 nm, V el volum del matràs aforat, I el pas de llum de la cubeta i m la massa de la resina (mg).

## E. Pre-tractaments de les resines

### E.1 Resina cloro-tritol

Aquesta resina es guarda al congelador ja que és molt sensible a la humitat. Abans d'utilitzar-la és necessari deixar-la 2 hores a temperatura ambient per tal que s'atemperi. Aquesta resina és molt sensible també a condicions àcides, de manera que convé evitar l'exposició de la mateixa a vapors àcids de qualsevol tipus.

Es pesa la quantitat necessària de resina en una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè i abans de començar la síntesi desitjada s'han de realitzar els següents tractaments:

<i>Etapa</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Nº de tractaments</i>	<i>Temps (min.)</i>
1	DCM	5	1
2	DMF	5	1

*Taula 5 – Tractaments d'acondicionament per a la resina cloro-tritol.*

### E.2 Resina MBHA

Es pesa la quantitat necessària de resina en una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè i abans de començar la síntesi desitjada s'han de realitzar els següents tractaments:

<i>Etapa</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Nº de tractaments</i>	<i>Temps (min.)</i>
1	DCM	2	2
2	TFA 5% en DCM	2	2
3	DCM	2	2
4	DIEA 5% en DMF	2	2
5	DMF	2	2
6	MeOH	2	2

*Taula 6 – Tractaments d'acondicionament per a la resina MBHA.*

### E.3 Resina TentaGel

Es pesa la quantitat necessària de resina en una xeringa proveïda d'un filtre de polipropilè i abans de començar la síntesi desitjada s'han de realitzar els següents tractaments:

<i>Etapa</i>	<i>Reactiu</i>	<i>Nº de tractaments</i>	<i>Temps (min.)</i>
1	DCM	2	2
2	TCA 20% en DCM	2	2
3	DCM	2	2
4	Pip. 20% en DMF	2	2
5	DMF	2	2
6	MeOH	2	2

*Taula 7 – Tractaments d'acondicionament per a la resina TentaGel.*