



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Funcionalització de superfícies amb lligands per a la seva interacció específica amb avidina i estreptavidina

Ivan Canal Barcala

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Tesi Doctoral

**Funcionalització de superfícies amb lligands
per a la seva interacció específica amb avidina i
estreptavidina**

Ivan Canal Barcala

Barcelona, octubre de 2015

Departament de Química Orgànica

Facultat de Química

Universitat de Barcelona



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Funcionalització de superfícies amb lligands per a la seva interacció específica amb avidina i estreptavidina

Memòria presentada per **Ivan Canal Barcala** per optar
al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi doctoral dirigida per:

Dr. Joan Anton Farrera Piñol

Prof. Titular del Departament de Química Orgànica
Universitat de Barcelona

Programa de doctorat: Química Orgànica
Departament de Química Orgànica
Facultat de Química, Universitat de Barcelona



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Al meu pare

AGRAÏMENTS

En primer lloc, voldria agrair al meu director de tesi Dr. Joan-Anton Farrera per ajudar-me en tot moment a superar tots els obstacles que hem anat trobant durant tots aquests anys.

També agrair a tots meus companys de laboratori, de departament i de facultat per totes les estones passades i ajudes rebudes.

Agraïments també a tots els membres del grup de recerca SOC&SAM per acollir-me, ensenyar-me i guiar-me. Però en especial a la Dra. Rosa Albalat, (el teu suport m'ha portat aquí), i al Dr. Josep Claret.

A la meva família. A la meva mare per la seva incansable vocació d'ajudar als altres i estima, i al meu pare, per que sempre ha estat en mi i sempre hi serà. Als meus germans, nebots, i tota la resta.

I especialment a la Carme, que sense ella i el seu suport, res hagués estat possible.

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AcOEt	acetat d'etil
AcOH	àcid acètic
AFM	microscòpia de força atòmica
Av	avidina
BAM	microscòpia d'angle Brewster
BSA	albúmina de sèrum boví
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
Bt	Biotina
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
CCF	cromatografia de capa fina
COSY	espectroscòpia de correlació
d	doblet
DABCO	1,4-Diazabicciclo[2.2.2]octà
DBU	1,8-Diazabicciclo[5.4.0]undec-7-è
dd	doblet doble
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
δ	desplaçament químic
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMPDU	dimetilpropandiurea (9,9-dimetil-3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicciclo[3.3.1]nonà)
DMSO	dimetilsulfòxid
ϵ	coeficient d'absortivitat molar
ESI	ionització per electroesprai
EtOH	etanol
FAB	Fast atom bombardment
Fl	fluoresceïna
GPC	cromatografia d'exclusió molecular
Gril	glicoluril
HABA	àcid 2-(4-hidroxifenilazo)benzoic
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
HOBt	1-hidroxibenzotriazole
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
iPrOH	isopropanol

IR	Infraroig
K _a	constant d'associació
L	l·ligand
LB	Langmuir Blodgett
λ	longitud d'ona
λ _{ex}	longitud d'ona d'excitació
m	multiplet
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MeOH	metanol
MS	espectrometria de masses
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
PB	tampó fosfats
PEG	polietilenglicol
Pf	punt de fusió
PDU	propandiurea (3,7-dioxo-2,4,6,8-tetraazabicyclo[3.3.1]nonà)
PS	poliestirè
PyBOP	hexafluorofosfat de 1-(benzotriazoliloxi)tripirrolidinofosfoni
RMN	ressonància magnètica nuclear
s	singlet
S	subunitat de proteïna
SAM	monocapa autoensablada
(S)Av	estreptavidina o avidina
SAv	estreptavidina
t	triplet
t.a.	temperatura ambient
TA	tautòmer azo
TDM	4,4'-metilenbis(<i>N,N</i> -dimetilanilina)
TEA	triètilamina
TFA	àcid trifluoroacètic
TH	tautòmer hidrazona
THF	tetrahidrofurà
TMS	trimetilsilà
t _R	temps de retenció
Ts	tosil
UV	Ultraviolat
vis	visible

1	INTRODUCCIÓ GENERAL	1
1.1	Avidina (Av), estreptavidina (Sav) i els seus complexos.	3
1.1.2	<i>Complexos amb l'HABA</i>	6
1.1.3	<i>Complexos amb lligands derivats de la propandiurea (PDU) i dimetilpropandiurea (DMPDU)</i>	8
1.1.4	<i>Complexos multivalents</i>	8
1.2	Monocapes de Langmuir	10
1.3	Monocapes autoensamblades (SAM) amb (S)Av	14
1.4	Av i SAv unides a resines en fase sòlida	22
2	OBJECTIUS	25
	RESULTATS I DISCUSSIÓ	29
3	ESTUDI DE LA TAUTOMERIA AZO/HIDRAZONA I DE LA ISOMERITZACIÓ E/Z DE L'HABA I COMPOSTOS RELACIONATS, EN SOLUCIÓ I EN MONOCAPES DE LANGMUIR	31
3.1	Estudi del l'equilibri tautomèric azo/hidrazona de l'àcid 2-(4'-hidroxifenilazo) benzoic (2) i de l'àcid 2-(4'-hidroxi-3',5'-dimetilfenilazo)benzoic (9) en solució	33
3.1.1	<i>Estudis espectroscòpics sobre les espècies neutres (H₂B).</i>	35
3.1.2	<i>Estudis espectroscòpics sobre les espècies monoaniòniques (HB-).</i>	37
3.1.3	<i>Estudis de complexació de l'àcid 2-(4-metoxifenilazo)benzoic (11) a avidina.</i>	43
3.2	Estudis cinètics d'isomerització ZèE tèrmica de l'HABA (2) i compostos relacionats en solució	47
3.2.1	<i>Cinètiques d'isomerització tèrmica Z -> E de l'espècie neutra del compost 11 en diferents medis.</i>	48
3.2.2	<i>Cinètiques d'isomerització tèrmica Z -> E de l'espècie monoaniònica del compost 11 en diferents medis.</i>	49
3.2.2.1	<i>Ajust de les cinètiques al model d'Arrhenius</i>	50
3.2.2.2	<i>Ajust de les cinètiques al model d'Eyring</i>	51
3.3	Estudi de la isomerització E/Z i de la tautomeria azo/hidrazona de compostos amfifílics derivats de l'HABA en monocapes de Langmuir	55
3.3.1	<i>Síntesi dels compostos 13 i 14</i>	57
3.3.2	<i>Monocapes de Langmuir del compost (E)-14 en forma aniònica</i>	58
3.3.3	<i>Monocapes de Langmuir del compost (Z)-14 en forma aniònica.</i>	60
3.3.4	<i>Monocapes de Langmuir d'una barreja fotoestacionària dels dos isòmers del compost 14 en forma aniònica.</i>	61
3.3.5	<i>Monocapes de Langmuir del compost 13 en la seva forma monoaniònica.</i>	63
4	PREPARACIÓ DE SAMs MIXTES D'UN DERIVAT DE L'HABA SOBRE SUBSTRAT D'OR I ESTUDI DE LA SEVA INTERACCIÓ AMB AVIDINA	67
4.1	Elecció del substrat, tipus de SAM i del grup terminal que ha d'interaccionar amb l'avidina	69
4.2	Síntesi dels dos components de la SAM mixta	71
4.3	Estudis previs sobre la reducció electroquímica d'azobenzens en solució.	75
4.4	SAMs del compost 30 sobre or.	76
4.4.1	<i>Voltamperometria cíclica en medi PB a pH=7</i>	76
4.4.2	<i>Voltamperometria cíclica en medi KOH 500mM</i>	79
4.4.3	<i>Cinètica de formació de la SAM</i>	80
4.4.4	<i>Determinació de la densitat superficial de grups HABA i de l'àrea superficial per cadena amb HABA terminal</i>	81
4.5	SAMs del compost 23 sobre or.	82
4.5.1	<i>Voltamperometria cíclica en medi KOH 500mM</i>	82
4.5.2	<i>Cinètica de formació de la SAM.</i>	83
4.5.3	<i>Determinació de la densitat superficial de grups trietilenglicol i de l'àrea superficial per cadena de trietilenglicol terminal.</i>	84
4.6	SAMs mixtes dels compostos 30 i 23 sobre or.	85

4.7 Ancoratge d'avidina sobre SAMs mixtes de 30 i 23 sobre or.	87
4.7.1 Estudi mitjançant voltamperometria cíclica de les SAMs d'avidina.	87
4.7.2 Estudi mitjançant AFM de les SAMs d'avidina.	91
5 DESENVOLUPAMENT D'UNA METODOLOGIA PER A PREPARAR CONJUGATS HETEROBIFUNCIONALS D'AVIDINA I ESTREPTAVIDINA.	93
5.1 Metodologia per a la preparació de conjugats heterobifuncionals de (S)Av utilitzant monocapes de Langmuir	99
5.1.1 Disseny del compost amfifílic	99
5.1.2 Síntesi del compost amfifílic (43)	100
5.1.3 Síntesi del compost model DMPDU-C-C ₄ -CO ₂ -sp-NH ₂ (37) i determinació de la seva afinitat per l'avidina.	103
5.1.4 Síntesi de l'àcid hidroxàmic DMPDU-C-C ₄ -CONHOH (39) i determinació de la seva afinitat per l'avidina.	105
5.1.5 Estudis de trencament de l'enllaç ester del compost amfifílic (43) amb hidroxilamina en la interfase aire-aigua (monocapa de Langmuir)	107
5.1.6 Estudi del trencament de l'enllaç ester en un sistema bifàsic aigua/cloroform.	108
5.2 Metodologia basada en resines per a la síntesi en fase sòlida	111
5.2.1 Síntesi d'un compost model (45) i estudis d'afinitat i de trencament de l'enllaç ester en solució.	112
5.2.2 Optimització de les condicions de trencament de l'enllaç ester del compost model (45) amb hidroxilamina	114
5.2.3 Funcionalització de resines amb DMPDU-C-C ₄ -CO ₂ H (5)	115
5.2.3.1 NovaSyn TG Bromo Resin	115
5.2.3.2 NovaPEG Wang Resin	116
5.2.4 Ancorament de l'avidina a les resines derivatitzades amb el lligand DMPDU.	118
5.2.4.1 Mètodes utilitzats per quantificar l'ancorament de l'avidina a la resina	118
5.2.4.2 Ancoraments amb un defecte d'avidina	120
5.2.4.2.1 Resina NovaSyn TG-DMPDU	120
5.2.4.2.2 Resina NovaPEG Wang-DMPDU-A	121
5.2.4.2.3 Resina NovaPEG Wang-DMPDU-B	122
5.2.4.3 Ancorament a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B amb un excés d'avidina.	124
5.2.4.4 Unió de biotina-4-fluoresceïna a l'avidina immobilitzada en la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B.	125
5.2.5 Formació del conjugat heterobifuncional d'avidina amb fluoresceïna i BSA.	127
6 PART EXPERIMENTAL	129
6.1 Mètodes Generals	131
6.1.1 Dissolvents i reactius	131
6.1.2 Instrumentació general	132
<i>Procediment general de les valoracions espectrofotomètriques competitives.</i>	135
6.2 Estudi de la tautomeria azo/hidrazona i de la isomerització e/z de l'HABA i compostos relacionats, en solució i en monocapes de Langmuir	136
6.2.1 <i>Estudi del l'equilibri tautomèric azo/hidrazona de l'àcid 2-(4'-hidroxifenilazo) benzoic (2) i de l'àcid 2-(4'-hidroxi-3',5'-dimetilfenilazo)benzoic (9) en solució.</i>	136
6.2.1.1 Síntesi de 2-(4'-Metoxifenilazo)benzoat de metil (15)	136
6.2.1.2 Síntesi de l'Àcid 2-(4'-Metoxifenilazo)benzoic (11)	137
6.2.1.3 Síntesi de l'àcid 2-(4'-Hidroxi-3',5'-dimetilfenilazo)benzoic (9)	137
6.2.1.4 <i>Procediment general de les valoracions espectrofotomètriques de derivats de l'àcid 2(4-hidroxifenilazo)benzoic (2) amb base.</i>	138
6.2.1.5 <i>Espectroscopia Raman de l'àcid 2(4-hidroxifenilazo)benzoic (2) i l'àcid 2(4-metoxifenilazo)benzoic (11)</i>	138
6.2.1.6 <i>Estudis de RMN de l'àcid 2(4-hidroxifenilazo)benzoic en CDCl₃ (espècie neutra) i amb 1 equivalent de Na₂CO₃ en D₂O (monoanió).</i>	139

6.2.1.7	Complexació de l'àcid 2-(4-metoxifenilazo)benzoic (11) amb avidina.	139
6.2.2	Estudis cinètics d'isomerització ZèE tèrmica de l'HABA (2) i compostos relacionats en solució	140
6.2.2.1	Mètode general de realització d'una cinètica d'isomerització cis-trans	140
6.2.2.2	Equacions cinètiques corresponents a la isomerització	140
6.2.2.3	Cinètiques d'isomerització tèrmica Z -> E de l'espècie neutra del compost 11 en diferents medis.	141
6.2.2.4	Cinètiques d'isomerització de l'espècie monoaniònica del compost 11 en diferents medis.	144
6.2.3	Estudi de la isomerització E/Z i de la tautomeria azo/hidrazona de compostos amfifílics derivats de l'HABA en monocapes de Langmuir	155
6.2.3.1	Síntesi N-hexadecil-3-(2-hidroxifenil)propanamida (18)	155
6.2.3.2	Síntesi de l'àcid 2-(4'-Hidroxi-3' N-hexadecilpropanamida fenilazo)benzoic (13)	155
6.2.3.3	Síntesi del 2-(4'-metoxi-3' N-hexadecilpropanamida fenilazo)benzoat de metil (19)	156
6.2.3.4	Síntesi de l'àcid 2-(4'-metoxi-3' N-hexadecilpropanamida fenilazo)benzoic (14)	157
6.2.3.5	Procediment general de formació de monocapes de Langmuir	158
6.2.3.6	Monocapa de Langmuir del compost (E)-14 en forma aniònica	159
6.2.3.7	Monocapa de Langmuir del compost (Z)-14 en forma aniònica	159
6.2.3.8	Monocapes de Langmuir d'una barreja fotoestacionaria dels dos isòmers del compost 14 en forma aniònica	159
6.2.3.9	Monocapes de Langmuir del compost 13 en la seva forma monoaniònica.	160
6.3	Estudi de la interacció de SAMs mixtes de d'un derivat de l'HABA amb avidina	161
6.3.1	Síntesi de 2-(2-(2-((6-bromoheptil)oxi)etoxi)etoxi)etanol (20)	161
6.3.2	Síntesi de tioacetat de S-(6-(2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etoxi)hexil) (21)	161
6.3.3	Síntesi de 2-(2-(2-((6-mercaptoheptil)oxi)etoxi)etoxi)etanol (22)	162
6.3.4	Síntesi de 23	163
6.3.5	Síntesi de (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamat de tert-butil (24)	163
6.3.6	Síntesi de 25	164
6.3.7	Síntesi de 26	165
6.3.8	Síntesi de 27	165
6.3.9	Síntesi de 28	166
6.3.10	Síntesi de 29	166
6.3.11	Síntesi de 30	167
6.3.12	Procediment general de preparació de monocapes autoensamblades sobre or (SAM)	168
6.3.13	Determinació de la superfície de l'elèctrode d'or	169
6.4	Desenvolupament d'una metodologia per a preparar conjugats heterobifuncionals d'avidina i estreptavidina	171
6.4.1	Metodologia per a la preparació de conjugats heterobifuncionals de (S)Av utilitzant monocapes de Langmuir	171
6.4.1.1	Síntesi de p-toluensulfonat de trietilenglicol 31	171
6.4.1.2	Síntesi de 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etanol (32)	171
6.4.1.3	Síntesi de 2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etanol (33)	172
6.4.1.4	Síntesi de (2-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)etil)carbamat de tert-butil (34)	172

6.4.1.5	<i>Síntesi de (2-(2-(2-p- p-toluensulfonatetoxi)etoxi)etil)carbamat de tert-butil (35)</i>	173
6.4.1.6	<i>Síntesi de 36</i>	174
6.4.1.7	<i>Síntesi de 37</i>	174
6.4.1.8	<i>Síntesi de 38</i>	175
6.4.1.9	<i>Síntesi de 39</i>	176
6.4.1.10	<i>Síntesi de 41</i>	176
6.4.1.11	<i>Síntesi de 42</i>	177
6.4.1.12	<i>Síntesi de 43</i>	178
6.4.1.13	<i>Estudis de trencament de l'enllaç ester del compost amfifílic (43) amb hidroxilamina en la interfase aire-aigua (monocapa de Langmuir)</i>	179
6.4.1.14	<i>Estudi del trencament de l'enllaç ester en un sistema bifàsic aigua/cloroform</i>	179
6.4.2	<i>Metodologia basada en resines per a la síntesi en fase sòlida</i>	179
6.4.2.1	<i>Síntesi de 44</i>	180
6.4.2.2	<i>Síntesi de 45</i>	180
6.4.2.3	<i>Síntesi de 46</i>	181
6.4.2.4	<i>Síntesi de 47</i>	182
6.4.2.5	<i>Síntesi de 48</i>	183
6.4.2.6	<i>Ancoraments amb un defecte d'avidina</i>	184
6.4.2.7	<i>Ancorament a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B amb un excés d'avidina</i>	186
6.4.2.8	<i>Unió de biotina-4-fluoresceïna a l'avidina immobilitzada en la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B.</i>	187
6.4.2.9	<i>Formació del conjugat heterobifuncional d'avidina amb fluoresceïna i BSA</i>	188
7	CONCLUSIONS	191
8	ESTRUCTURES	195
9	BIBLIOGRAFIA	203

1 INTRODUCCIÓ GENERAL

Les superfícies s'han modificat des de fa temps per tal de proporcionar-els-hi noves funcionalitats i usos. Així, podem trobar una extensa diversitat de superfícies derivatitzades amb molècules que els hi proporcionen una funcionalitat determinada. D'entre les superfícies més estudiades per a funcionalitzar biomolècules hi ha les metàl·liques, les de vidre, les basades en silici, les monocapes de Langmuir i de Langmuir-Blodgett i les superfícies polimèriques.

En quant al tipus de biomolècules amb el que s'han funcionalitzat les superfícies, les més utilitzades són les proteïnes (enzims), els oligonucleòtids, els hidrats de carboni i també els lípids.

La unió de les biomolècules a la superfícies pot ser de diferents tipus: unió covalent, unió mitjançant interaccions no-covalents (un cas concret seria el de les interaccions específiques proteïna-ligand), per adsorció, etc.

Un dels sistemes lligand/proteïna més estudiats i utilitzats per unir de forma no-covalent específica altres biomolècules a superfícies són l'avidina/biotina (Av/Bt) i l'estreptavidina/biotina (SAv/Bt).¹⁻³

1.1 Avidina (Av), estreptavidina (SAv) i els seus complexos.

L'Avidina és una proteïna que està present en la clara de l'ou, mentre que l'estreptavidina s'ha aïllat del bacteri *streptomyces avidinii*. Ambdues són proteïnes tetramèriques formades per quatre subunitats idèntiques amb quatre llocs d'unio (un en cada subunitat) disposats dos a dos en costats oposats de les proteïnes. Cada subunitat es troba organitzada en vuit fulls β antiparal·lels, els quals formen un barril β clàssic (Figura 1). La majoria de diferències en l'estructura terciària d'ambdues proteïnes recauen en la llargada i la conformació dels bucles que connecten els fulls β .⁴⁻⁷

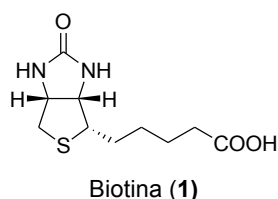


Figura 1: Estructura quaternària del tetràmer d'avidina. En groc hi han representades quatre unitats del seu lligand natural biotina. Els monòmers d'avidina es representen en colors diferents.^{5,7}

Els monòmers d'avidina s'uneixen a través d'interaccions per pont d'hidrogen i forces de van der Waals. Aquestes interaccions contribueixen a la rigidesa de l'estructura quaternària i també contribueixen a crear un entorn favorable per a la forta unió a la biotina.

1.1.1. Complexos amb biotina

La biotina (**1**) és un compost amb estructura de tipus biciclo[3.3.0], amb un grup urea en un dels cicles i un àtom de sofre en l'altre cicle, així com una cadena lateral de valerat unida al C α respecte de l'àtom de sofre.



La principal funció biològica de la biotina (Bt) és la de participar en la transferència de diòxid de carboni a substrats catalitzada per enzims³. Però la biotina és també el lligand natural de les proteïnes homòlogues avidina (Av) i estreptavidina (SAv). Les associacions entre aquestes proteïnes i la biotina, constitueixen dos dels complexos més estables (excloent els complexos metàl·lics), en què hi participi una molècula de baix pes molecular com és la biotina. Aquests complexos presenten unes constants d'associació de $2,5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ en el cas de la

SAv⁸ i de $1,6 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ en el cas de l'Av,⁸ essent la unió tant forta que es pot considerar pràcticament irreversible. L'alta afinitat entre la biotina i la (S)Av juntament amb el fet que el grup carboxílic de la biotina es pot derivatitzar sense que impedeixi l'associació forta amb la Av i SAV, ha permès utilitzar el sistema (S)Av-Bt en nombroses aplicacions biomèdiques: immunoassajos, cromatografia d'afinitat, kits de diagnòstic, etc.⁸

Les estructures cristal·lines dels complexos Av:Bt i SAV:Bt donen indicis per explicar la seva alta afinitat. Aquests factors inclouen la formació de múltiples interaccions per pont d'hidrogen i interaccions de van der Waals entre la biotina i la proteïna (Figures 2 i 3).

D'altra banda s'han realitzat experiments de valoracions calorimètriques que mostren com la unió de la biotina a estreptavidina està dominada per un terme entàlpic molt favorable ($\Delta G^\circ = -18,3 \text{ kcal/mol}$, $\Delta H^\circ = -32,0 \text{ kcal/mol}$).

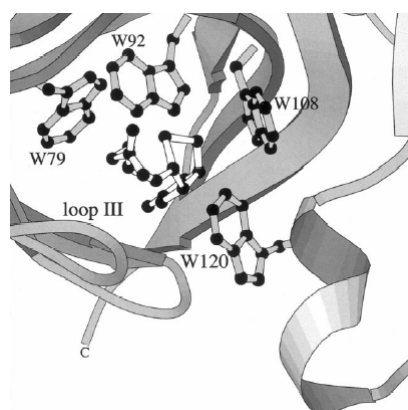


Figura 2: vista espacial dels residus de triptòfan, que envolten la biotina en el complex que forma amb estreptavidina.⁹⁻¹¹

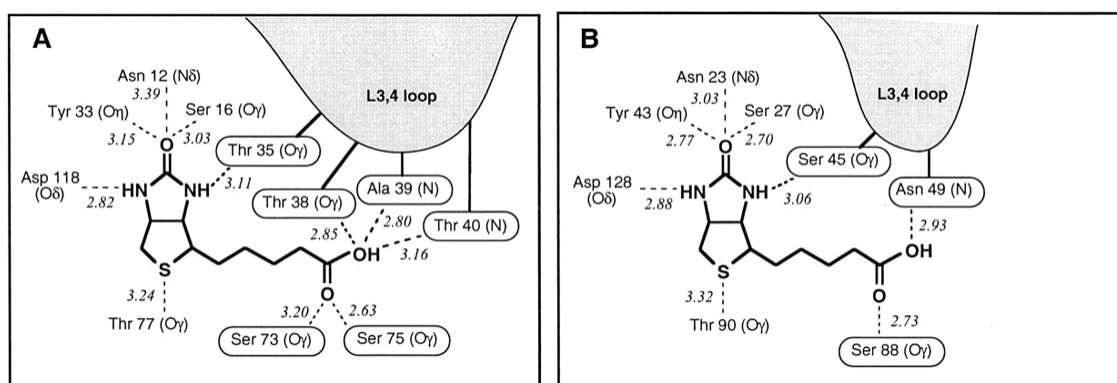
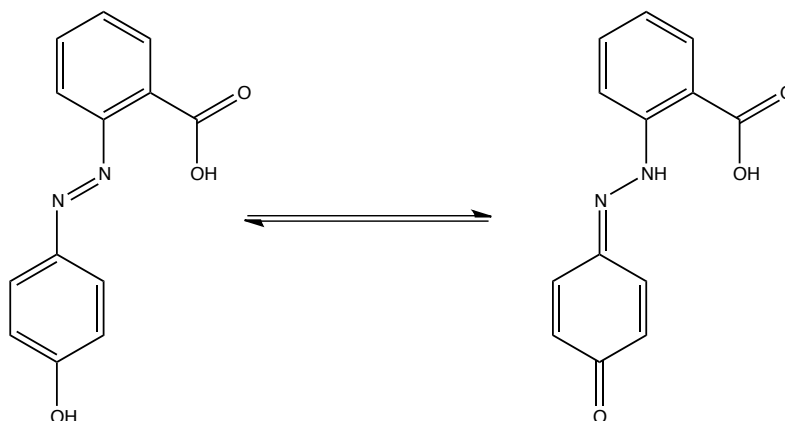


Figura 3: Representació esquemàtica de la xarxa d'interaccions per pont d'hidrogen dels complexos avidina-biotina (A) i estreptavidina-biotina (B).¹²

1.1.2 Complexos amb l'HABA

L'àcid 2-(4'-hidroxifenilazo)benzoic o HABA (**2**) (Figura 4) i alguns dels seus derivats també s'uneixen a avidina i estreptavidina en els mateixos llocs d'unió que la biotina, encara que amb una K_a inferior ($K_a = 1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ per avidina i $1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ per estreptavidina).^{8,15} Aquest compost és molt utilitzat en la tecnologia avidina-biotina ja que permet determinar la quantitat d'avidina i estreptavidina actives capaces d'unir-se a biotina en solució.^{16,17} Això és possible gràcies a que l'HABA canvia de color (de groc a vermellós) quan s'uneix a Av o SAV, fet que permet utilitzar-lo com a indicador en la determinació de l'activitat d'aquestes proteïnes. Aquest canvi de color és degut al desplaçament de l'equilibri tautomèric (Esquema 1) des de la forma azo ($\lambda_{\text{max}} = 345 \text{ nm}$) en què es troba la forma lliure, cap a la forma hidrazona ($\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$) en què es troba la forma complexada a Av i SAV. L'addició de biotina a una dissolució del complex Av-HABA o del complex SAV-HABA condueix a la formació quantitativa dels complexos Av-Bt i SAV-Bt respectivament, alliberant-se l'HABA (degut a la seva menor K_a) dels llocs d'unió. Això porta associat una disminució en l'absorbància a 500 nm que es pot utilitzar per determinar quantitativament l'activitat d'aquestes dues proteïnes. Aquests canvis en l'espectre és la base d'un assaig espectrofotomètric per a mesurar l'activitat de solucions d'avidina i d'estreptavidina.³⁵



Esquema 1: Representació de l'equilibri tautomèric azo-hidrazona de l'HABA (**2**)

L'estudi de la tautomeria de l'HABA ha rebut un gran interès amb l'objectiu de dissenyar compostos que presentin una important afinitat per aquestes proteïnes.³² L'HABA també s'utilitza per a detectar nous lligands sintètics d'Av i SAV en el mateix lloc d'unió que la biotina. En aquest assaig s'afegeix el nou lligand a una solució aquosa del complex HABA-(S)Av, observant-se un decreixement de l'absorció a

500 nm i el corresponent augment de l'absorció a 348 nm en el cas que el nou lligand desplaci l'HABA dels llocs d'unió de la proteïna. A més, com que es coneixen les constants d'associació de l'HABA a l'Av i a la SAV, també es podran determinar constants d'associació de nous lligands a l'Av i a la SAV mitjançant una valoració espectrofotomètrica competitiva.³⁶ (veure procediment experimental en secció 6.1.2). També s'ha demostrat que l'HABA s'uneix a l'albumina experimentant un desplaçament de la banda d'absorció cap a 480 nm, el qual ha sigut atribuït al predomini del tautòmer hidrazona en l'estadi complexat.³⁷⁻⁴⁰

L'HABA s'uneix a avidina i estreptavidina amb una alteració mínima de la geometria dels llocs d'unió. Algunes de les interaccions característiques dels complexos Av-Bt i SAV-Bt també s'observen en els complexos Av-HABA i SAV-HABA (Figura 4). L'anell hidroxifenílic del lligand es manté proper a l'anell indòlic del Trp70 en Av (Trp79 en SAV) formant un complex de transferència de càrrega, on el triptòfan actua com a donador i l'anell d'hidroxifenil de l'HABA (tautòmer hidrazona) actua com a acceptor.

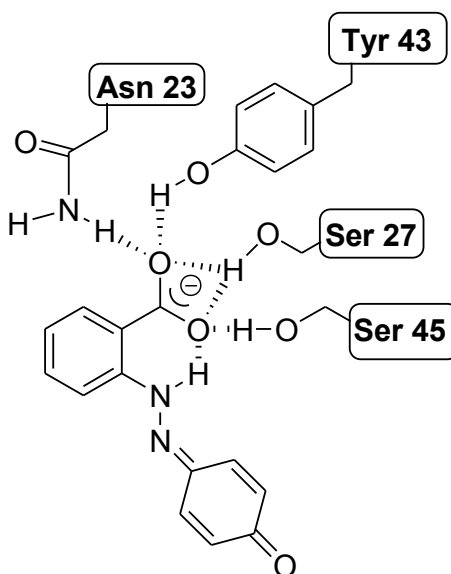
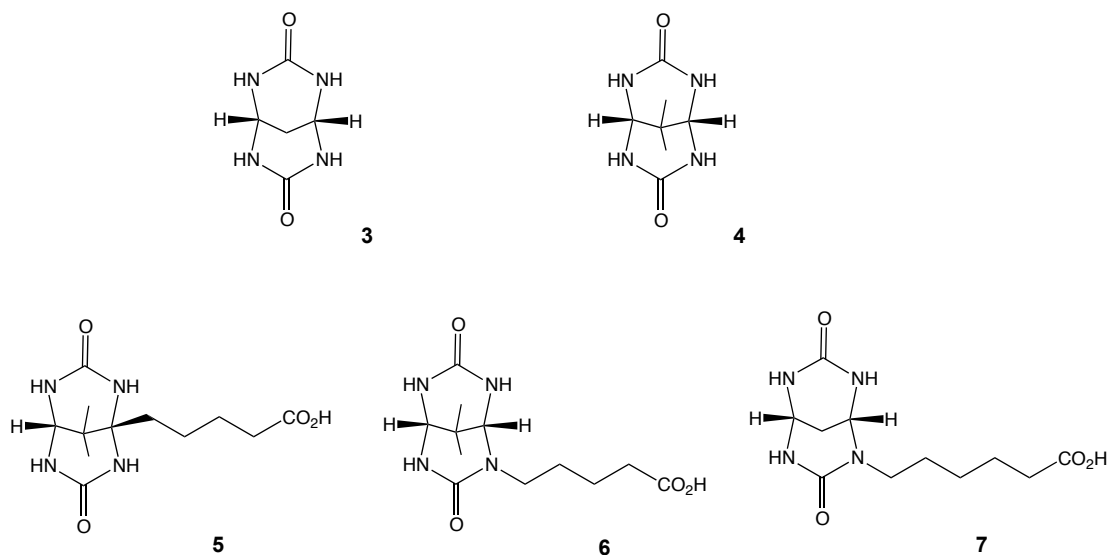


Figura 4: Representació esquemàtica de l'HABA unit a la SAV.¹⁸

A diferència de la biotina, on la unió a SAV està dominada pel terme entàlpic, la unió de l'HABA a estreptavidina està dominada pel terme entròpic ($\Delta G^\circ = -5,27$ kcal/mol, $T\Delta S^\circ = 6,97$ kcal/mol a 25°C). Això suggereix que, malgrat que les interaccions per pont d'hidrogen tenen una contribució important, les interaccions hidrofòbiques (efecte hidrofòbic) tenen una contribució energètica encara major en la unió de l'HABA.¹⁸

1.1.3 Complexos amb lligands derivats de la propandiurea (PDU) i dimetilpropandiurea (DMPDU).

En el nostre grup d'investigació s'han sintetitzat lligands derivats de la propandiurea (PDU, **3**) i de la dimetilpropandiurea (DMPDU, **4**) (Esquema 2). Aquests lligands tenen una estructura de tipus biciclo[3.3.1]^{21,22} amb un grup urea a cada cicle i una cadena d'àcid carboxílic unida a un àtom de nitrogen (*N*-alquilat) o un àtom de carboni cap de pont (*C*-alquilat). Tots aquests lligands s'uneixen a Av i SAv en el mateix lloc que la biotina. En el cas del compost *C*-alquilat (**5**) les K_a a Av i SAv són de $5,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ i $2,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ respectivament.³⁶



Esquema 2: Alguns lligands d'Av i SAv amb estructura de tipus biciclo[3.3.1]

1.1.4 Complexos multivalents.

La multivalència ha estat àmpliament estudiada per investigadors de diversos camps, com per exemple en el camp de la bioquímica, degut a que bastantes interaccions biològiques es poden considerar multivalents. Un altre camp és la química supramolecular, on la multivalència ofereix una manera de controlar, dirigir i seleccionar nanoestructures d'auto-ensamblatge funcionals i robustes.²³⁻²⁹

La multivalència descriu la unió de dues o més espècies que impliquen la interacció simultània entre múltiples funcionalitats complementàries dins d'aquestes espècies. La valència d'una espècie es defineix com el nombre de connexions

separades i del mateix tipus que pot formar, mitjançant interaccions no-covalents, amb una altra espècie amb funcionalitat complementària.²³ La valència d'un complex es defineix com el nombre d'interaccions compartides entre dues espècies que interaccionen. Així es pot parlar de complexos divalents, trivalents, etc. No s'ha de confondre el terme multivalència amb aquells casos en què la interacció entre dues espècies involucra múltiples grups funcionals, ni tampoc amb els casos d'una espècie multivalent que s'uneix a múltiples espècies monovalents (Figura 5).

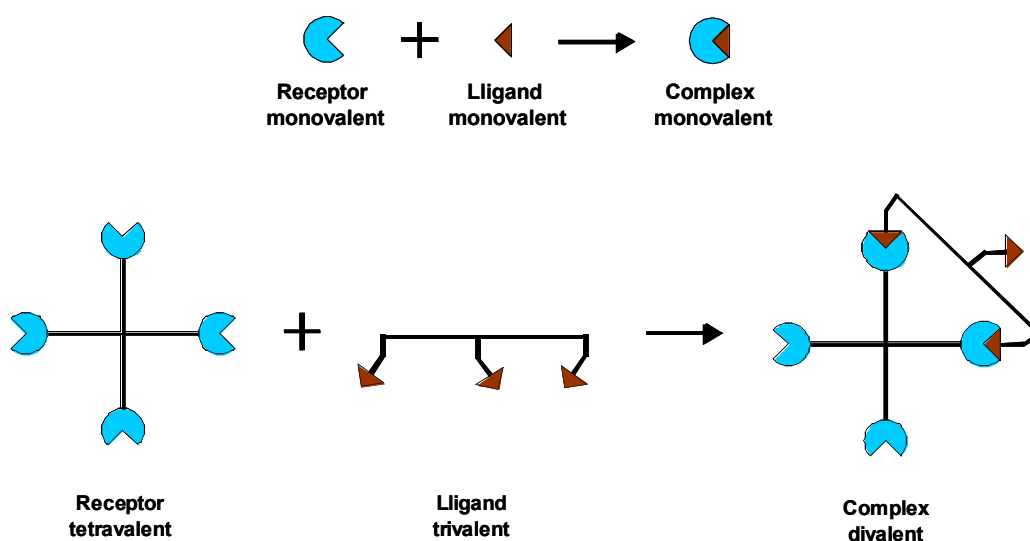
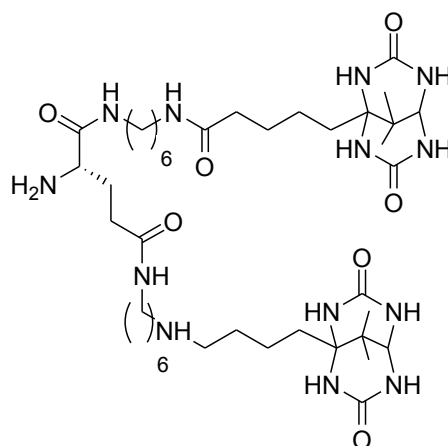


Figura 5: Terminologia de valències.²³

La formació d'un complex multivalent comporta un augment important en la constant d'associació respecte del corresponent complex monovalent. Així, per exemple, el lligand divalent **8** (Esquema 3), que conté dues entitats del lligand monovalent **5**, forma un complex amb Av amb una K_a de $6,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ mentre que la K_a del corresponent lligand monovalent era de $5,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.³⁶



Esquema 3: Lligand divalent **8** d'Av i SAv.

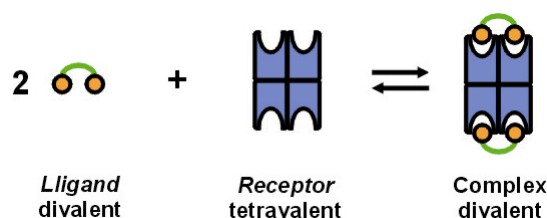


Figura 6: Representació de la unió d'un lligand divalent a (S)Av

1.2 Monocapes de Langmuir

S'anomena monocapa de Langmuir a una monocapa de molècules amfifíliques disposades a la interfície aire-aigua. Les monocapes de Langmuir es formen dipositant una solució del compost amfifílic, dissolt en dissolvent orgànic immiscible en aigua, sobre la fase aquosa. Al evaporar-se el dissolvent orgànic, les molècules del compost es disposen ordenades amb la part hidrofílica en contacte amb la fase aquosa i la part hidrofòbica en fora de l'aigua, formant-se una capa d'una molècula de gruix sobre la fase aquosa.

El mode més habitual per a caracteritzar des d'un punt de vista termodinàmic una monocapa de Langmuir consisteix en l'enregistrament d'isotermes, que és una representació de l'evolució de la pressió superficial en funció de l'àrea disponible per a cada molècula a la monocapa a mesura que aquesta es comprimeix, mantenint la temperatura constant.

Per obtenir una isoterma, es comença formant la monocapa amb les barreres completament separades i després es van apropant lentament per a comprimir la monocapa mentre es mesura la pressió superficial.

En anar disminuint l'àrea per molècula (al comprimir les barreres), la monocapa pot passar per diferents fases: gas, líquid expandit, líquid condensat inclinat i líquid condensat no inclinat i sòlida.^{45,46} La primera fase és la fase gasosa quan l'àrea per molècula és molt gran, i per tant no hi ha gaire interacció entre les molècules. Al anar comprimint passem a la fase de líquid expandit, on les molècules encara estan desordenades però les interaccions entre elles són majors i la pressió superficial és major que zero. Amb major compressió i per tant menor àrea per molècula, les molècules comencen a ordenar-se i passem a la fase de líquid condensat (inclinat i no inclinat). En aquesta fase les molècules queden ordenades de manera que les cadenes hidrofòbiques, queden paral·leles entre elles.

La diferència entre les fases líquid condensat inclinat i líquid condensat no inclinat és l'angle de les molècules respecte a la normal a la monocapa.

En el líquid condensat inclinat, les molècules formen un cert angle amb la normal de la interfície aigua/aire, i en el líquid condensat no inclinat les molècules s'ordenen perpendicularment a la interfase.

Per últim, si es segueix comprimint una monocapa en fase de líquid condensat no inclinat, arriba a un punt on comencen a formar-se agregats tridimensionals, disminuint bruscament la pressió superficial que correspon al col·lapse de la monocapa.

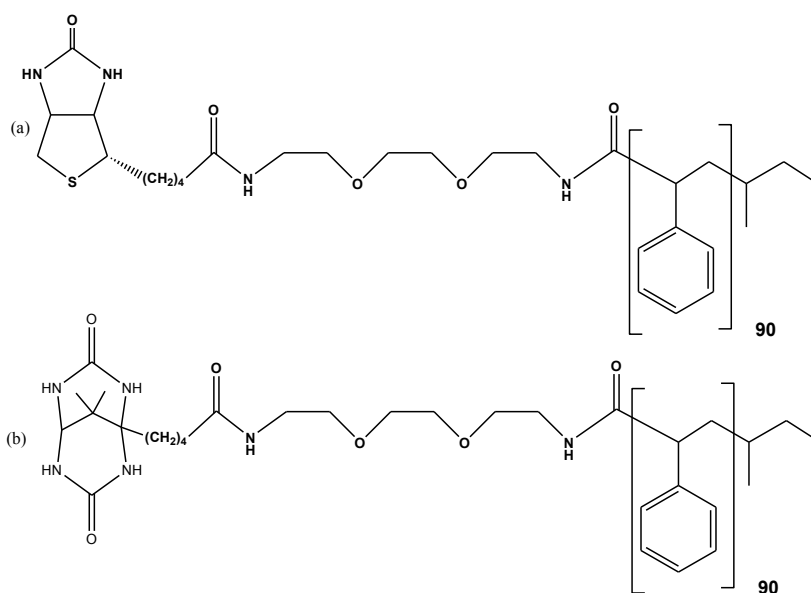
Per obtenir imatges de les monocapes, es pot utilitzar la microscòpia d'angle Brewster (BAM). Aquesta tècnica es basa en el fet que, quan la llum incideix sobre una superfície amb un angle igual a l'angle de Brewster, només es reflecteix la component del camp elèctric polaritzada segons la direcció perpendicular al pla d'incidència.

Així, en condicions d'angle de Brewster, si la llum incident està polaritzada paral·lelament al pla d'incidència, no hi haurà llum reflectida.

Un ús molt habitual de les monocapes de Langmuir és la formació de capes Langmuir-Blodgett (LB) que es formen al transferir una monocapa de Langmuir a un suport sòlid quan es fa travessar aquest a través de la interfase aire-aigua.⁴⁷

S'han descrit monocapes de Langmuir de (S)Av, les quals es van formar per interacció de la proteïna amb una monocapa d'un compost amfifílic biotinitat. Generalment aquests compostos amfifílics són lípids biotinitats, els quals han permès generar cristalls 2D de (S)Av a la interfície aire/aigua. Aquestes monocapes s'han caracteritzat mitjançant diferents tècniques como ara el BAM, microscòpia confocal de fluorescència i també AFM (després de transferir-les a un suport sòlid en forma de monocapa de Langmuir Blodgett).⁴⁸⁻⁵⁶

Un altre tipus de compost amfifílic biotinitat que s'ha descrit és el que té com a cadena apolar una cadena polimèrica, per exemple, de poliestirè (Esquema 4.a). Aquest polímer biotinitat, quan s'aplica a la interfície aire/aigua, té la capacitat d'unir-se de forma específica a la SA_v⁵⁷.



Esquema 4. Compostos amfifílics de poliestirè units a Biotina (a) i DMPDU (b) mitjançant un espaiador hidrofílic.

La unió a SA_v es va posar de manifest per l'augment considerable de l'àrea superficial per molècula detectada en la isoterma de compressió de Langmuir: es va passar de 3,9 nm² en absència de SA_v a 12,0 nm² quan en la subfase aquosa hi havia estreptavidina (Figura 7)

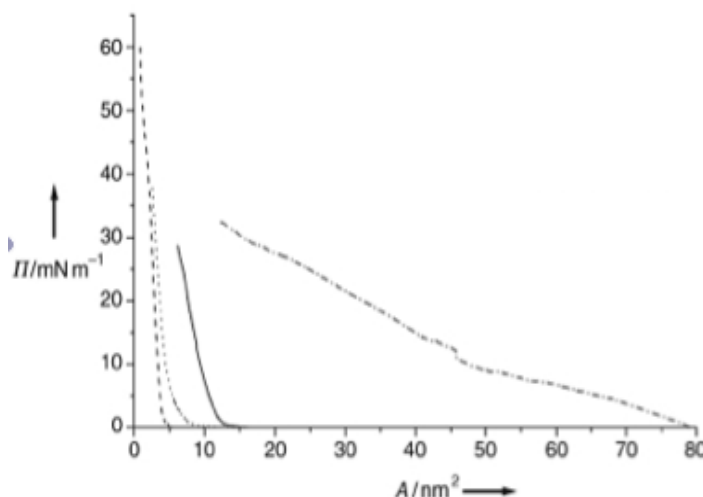


Figura 7. Isotermes (pressió superficial en front àrea superficial) de poliestirè biotinilat sense SAV en la subfase (- - -); amb SAV en la subfase (-); amb SAV desactivada en la subfase (····); i amb SAV i ferritina biotinilada en la subfase (-·-·-).⁵⁷

En aquesta monocapa, la SAV encara conservava la meitat dels llocs d'unió desocupats, i això va permetre incorporar una altra proteïna a la monocapa. Així, l'addició de ferritina biotinilada a la subfase aquosa es va traduir en un augment encara major de l'àrea superficial per molècula, fet que demostrava que s'havia unit a la SAV de la monocapa. La transferència d'aquesta monocapa a un suport sòlid va permetre verificar la incorporació de ferritina mitjançant microscòpia electrònica.⁵⁷

En un altre experiment es va tornar a generar la monocapa de SAV unida al poliestirè biotinilat, però en aquesta ocasió es va afegir un enzim biotinilat (HRP-Bt) a la subfase aquosa (Figura 8). Es va demostrar que l'enzim ancorat a la monocapa de Langmuir, conservava la seva capacitat catalítica.⁵⁸

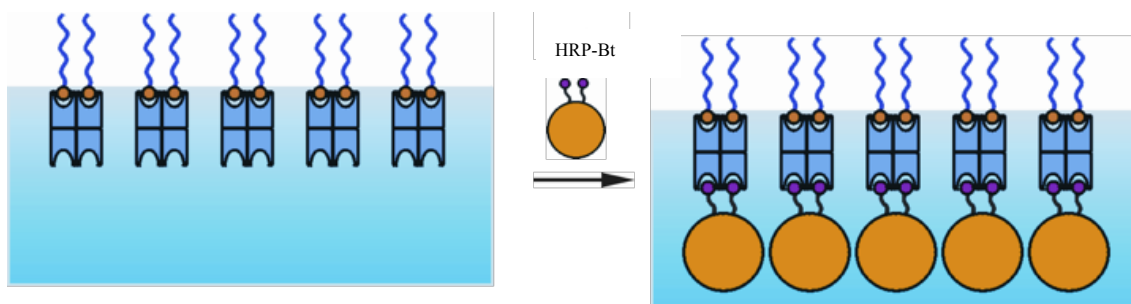


Figura 8. Formació d'una monocapa de Langmuir de SAV per interacció amb un polímer biotinilat, i ancorament d'un altre compost biotinilat per interacció amb la SAV de la monocapa.

Quan la cadena polimèrica es va unir a un lligand de (S)Av de menor afinitat que la Bt, com ara la DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) (Esquema 4.b), les isoterms de pressió superficial front a l'àrea superficial que es van obtenir, tant en absència com en presència de SAv, van ser molt similars a les obtingudes utilitzant el poliestirè biotinilat.⁵⁸

1.3 Monocapes autoensamblades (SAM) amb (S)Av

Les superfícies de metalls i d'òxids metàl·lics tendeixen a adsorbir materials orgànics fàcilment perquè aquests disminueixen l'energia lliure de la interfase entre el metall o l'òxid metàl·lic i el medi. Aquestes molècules també modifiquen les propietats interfacials i poden tenir una influència significativa en l'estabilitat de nanoestructures de metalls i òxids metàl·lics.⁵⁹

Les monocapes autoensamblades o SAMs són ensamblatges orgànics formats mitjançant l'adsorció de molècules a partir d'una fase líquida o gasosa sobre una superfície sòlida, i que s'organitza espontàniament en estructures cristallines.⁶⁰

Durant el procés d'autoensamblatge, les unitats constituents de la monocapa es combinen per formar una estructura secundària.

Cada molècula que constitueix la monocapa es pot subdividir en tres parts diferenciades: un grup cap d'ancorament que té l'afinitat per la superfície sòlida, una cadena espaciadora (cadena alquílica) i un grup funcional terminal a l'extrem oposat del grup d'ancorament. El grup cap d'ancorament guia el procés d'autoensamblatge unint la molècula a la superfície. Les cadenes espaciadores interaccionen mitjançant forces de van der Waals i hidrofòbiques assegurant l'empaquetament de la monocapa, de manera que en augmentar la longitud de la cadena augmentarà l'ordenació. El grup terminal li proporciona a la superfície propietats físico-químiques (hidrofobicitat/hidrofilitat, acidesa/basicitat, etc.) i també pot servir de nexa d'unió amb altres molècules o nanoestructures.

A la Figura 9 es mostra l'estructura d'una SAM ideal funcionalitzada amb alcantiols sobre una superfície d'or.⁵⁹

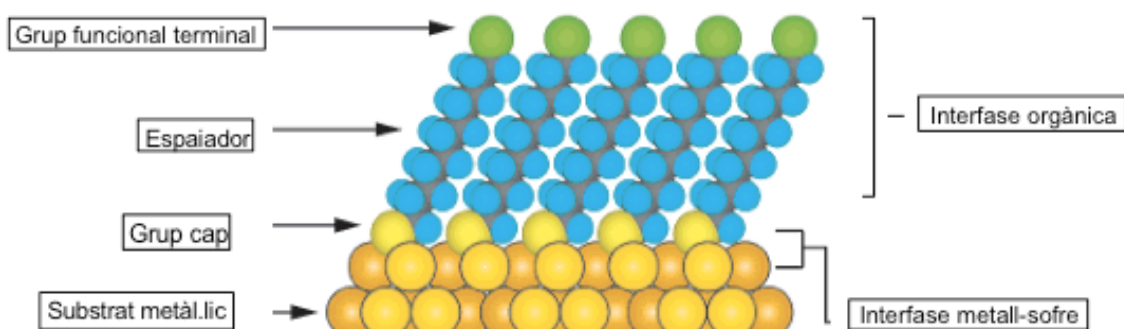


Figura 9: Diagrama esquemàtic d'una SAM ideal d'alcantiols sobre una superfície d'or (111).⁵⁹

Hi ha diversos grups funcionals amb capacitat d'interaccionar amb superfícies metàl·liques, però el cas més general és l'ús d'alcantiols en superfícies metàl·liques com ara l'or, plata, coure, pal·ladi, platí i mercuri.⁶⁰ Per una banda, la interfase orgànica té un gruix ben definit, actua com a barrera i modifica la conductivitat electrònica i les propietats òptiques locals; d'aquesta manera, determina les propietats de la superfície. Per una altra banda, la interfase metall-sofre estabilitza els àtoms de la superfície i modifica els estats electrònics.

El procés de formació de la SAM (Figura 10) es creu que està constituït per les següents fases⁶¹⁻⁶⁵:

- i. Una primera etapa de fisorció
- ii. Una quimiosorció de les molècules
- iii. L'empaquetament de les molècules formant una estructura cristallina ordenada
- iv. Compactació de la monocapa

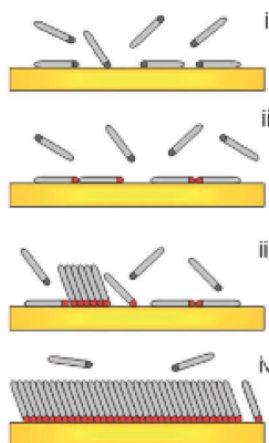


Figura 10: Procés de formació d'una SAM⁶¹

El gruix i l'organització d'una SAM depèn no només de la longitud de la cadena alquímica, sinó també de l'angle d'inclinació de la cadena respecte la superfície (Figura 11). La plata és un substrat excel·lent per formar SAMs, a l'igual que l'or, però mentre que en les SAMs d'or l'angle d'inclinació és d'uns 30° , en les de plata és de només 10° .⁶⁶

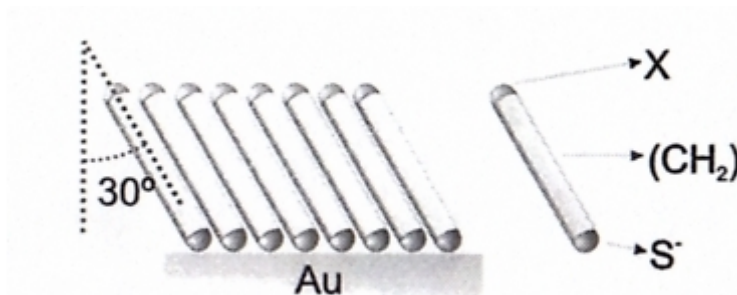


Figura 11: vista frontal d'una SAM d'or on es mostra la inclinació de les molècules.⁶⁶

La separació espacial i l'empaquetament dels alcantols en or depèn de l'estructura de la cara cristal·logràfica de l'or on s'uneix l'àtom de sofre. Hi ha diferències significatives, per exemple, entre la cara d'un pla (111) i la cara d'un pla (100) (Figura 12).⁶⁶

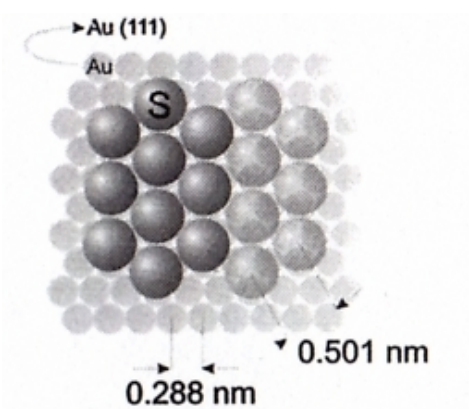


Figura 12: Àtoms de sofre que ocupen la cara d'una superfície d'or (111), donant a lloc a una monocapa densament empaquetada.

La densitat d'empaquetament i l'organització de les molècules en les SAMs ve determinada també per la grandària dels grups terminals que les formen. D'aquesta manera, tal com s'il·lustra a la Figura 13, es pot observar una diferent disposició de les molècules segons els diferents grups terminals. Quan la cadena té un grup terminal petit com el $-CH_3$ o el $-CN$ no es distorsiona l'organització secundària de la capa orgànica i no afecta a la disposició del sofre sobre el substrat. En canvi, grups terminals una mica més voluminosos comencen a distorsionar l'organització de la

capa orgànica i, quan la SAM està formada per lligands amb grups terminals voluminosos com pèptids, proteïnes i anticossos, estèricament les molècules no poden adoptar una organització secundària semblant a la que presenten els alcantiols amb grups terminals petits. En aquest cas, probablement, l'estructura serà més desordenada i menys compacta.⁵⁹

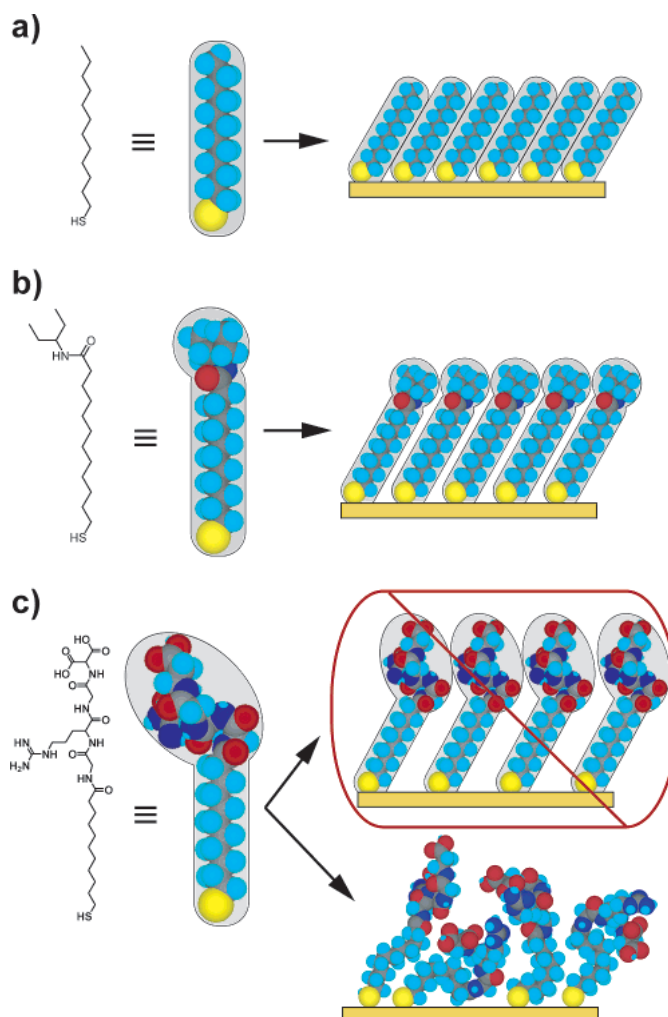


Figura 13: Diagrama esquemàtic on s'il·lustren els efectes de diferents grups terminals en la densitat d'empaquetament i l'organització de les SAMs. a) amb grups terminals petits com el $-CH_3$ o el $-CN$. b) amb grups terminals una mica més voluminosos. c) amb grups terminals voluminosos.⁵⁹

Per tal d'aconseguir monocapes amb un ordre ben definit, en el cas de formar-se a partir de molècules amb grups terminals voluminosos, és convenient preparar les anomenades SAMs mixtes. Una SAM mixta és aquella que està formada per cadenes de diferent naturalesa química. Unes cadenes que contindran el grup terminal voluminosos han de ser més llargues mentre que d'altres cadenes poden ser més curtes i, al estar intercalades entre les primeres, permeten un empaquetament més compacte de la monocapa.

Alguns dels fenòmens estudiats amb SAMs inclouen la corrosió⁶⁷, l'adhesió⁶⁸, la transferència de càrrega a través de les molècules⁶⁹, el creixement dels cristalls a la superfície⁷⁰, i s'empren com a superfícies model per a bioquímica i biologia⁷¹.

La composició complexa i la naturalesa dinàmica de les superfícies biològiques fan difícil estudiar certs aspectes fonamentals dels sistemes biològics. En canvi, les superfícies model amb composicions no tant complexes i més ben definides són útils per estudiar el component fisicoquímic de la disposició biomolecular (per exemple, la termodinàmica i la cinètica de l'associació/dissociació de proteïnes o altres biomolècules amb lligands).

D'aquesta manera, les SAMs són útils com a superfícies model per estudiar processos biològics i bioquímics. Per una banda, igual que les superfícies biològiques, són materials nanoestructurats formats per autoensamblatge. Per una altra banda, poden presentar un ampli rang de funcionalitat orgànica, incloent-hi funcionalitat que eviti l'adsorció de proteïnes en un lloc precís a certa distància del substrat.⁵⁹

Les tècniques d'anàlisi de superfícies com ara la microscòpia d'efecte túnel (STM), la microscòpia de força atòmica (AFM), l'elipsometria, l'espectroscòpia d'infraroig d'absorció de reflectància (RAIRS), l'espectroscòpia fotoelectrònica de raigs X (XPS) i les tècniques electroquímiques s'han emprat extensament en la caracterització de l'estructura i la morfologia de la superfície de les SAMs.

La microscòpia de força atòmica i la microscòpia d'efecte túnel proporcionen informació sobre el grau d'organització superficial de la monocapa⁷². L'elipsometria s'empra per mesurar el gruix i uniformitat dels films preparats⁷³. L'espectroscòpia fotoelectrònica de raigs X proporciona una anàlisi de la composició elemental de la superfície. També s'ha utilitzat per obtenir informació sobre la cinètica d'adsorció dels alcantiols i sobre la contribució dels àtoms a diferents profunditats de la monocapa⁷⁴.

En el cas d'un alcantiol senzill l'organització de la monocapa orgànica resulta de les interaccions laterals atractives (Van der Waals) entre les cadenes alquíliques. No obstant, la presència de certs grups funcionals amb capacitat de formar

interaccions per pont d'hidrogen, com ara els grups amida, pot influir en les propietats de la monocapa.⁷⁷ Així, en la SAM mostrada a la Figura 14. La xarxa d'interaccions per pont d'hidrogen permet explicar la densitat i estabilitat de la monocapa, així com l'orientació molecular.⁷⁹

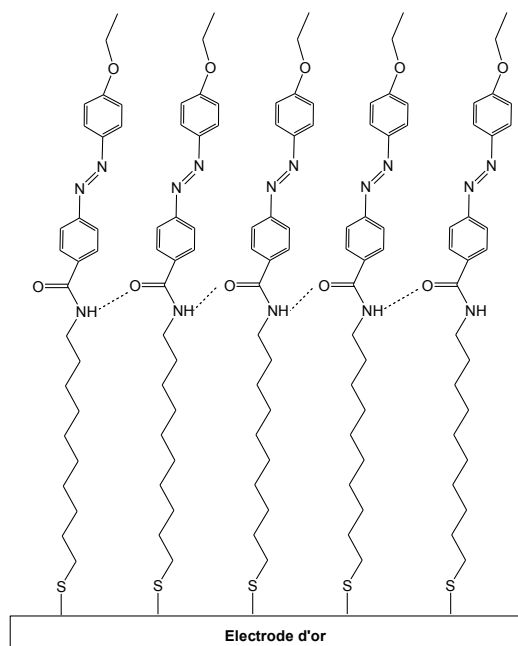


Figura 14: Monocapa d'un azobenzè sobre or amb interaccions per pont d'hidrogen entre cadenes.⁷⁷

Les SAMs que contenen un azobenzè com a grup terminal (com per exemple la de la Figura 14) són d'especialment interessants, no només des del punt de vista estructural sinó també per les característiques fotoquímiques i electroquímiques del grup azobenzè. Molts dels estudis realitzats són per observar la isomerització del grup azobenzè, així com també el seu comportament redox en la monocapa.^{60, 80-85}

En el camp de la nanotecnologia, les SAMs s'han utilitzat per funcionalitzar nanopartícules, nanotubs de carboni, dispositius fotònics (Optical waveguides) capaces de transportar llum o elèctrics (nanowires) capaços de transportar càrrega.

Les SAMs també s'han utilitzat com a segells en "*microcontact printing*" i en "*dip pen nanolithography*".

També s'han descrit SAMs en les que s'han incorporat biomolècules (ADN, enzims i altres proteïnes, etc.) a través del grup funcional terminal de l'alcantiol.⁸⁶⁻⁸⁹

La gran afinitat tant de l'avidina com de l'estreptavidina per la biotina s'ha aprofitat per immobilitzar aquestes proteïnes a SAMs de tiols biotinilats. Aquestes SAMs de (S)Av s'han utilitzat per construir sensors de biomolècules. Així, per exemple, l'adsorció d'un disulfur biotinilat sobre un elèctrode d'or va conduir a una SAM que tenia Bt com a grup terminal. En submergir aquest elèctrode en una dissolució d'avidina, aquesta proteïna va quedar immobilitzada a la superfície de l'elèctrode. En submergir després aquest elèctrode en una dissolució de glucosa oxidasa biotinilada (Bt-GOx), aquest enzim va quedar ancorat a l'avidina de l'elèctrode (Figura 15).⁹⁰

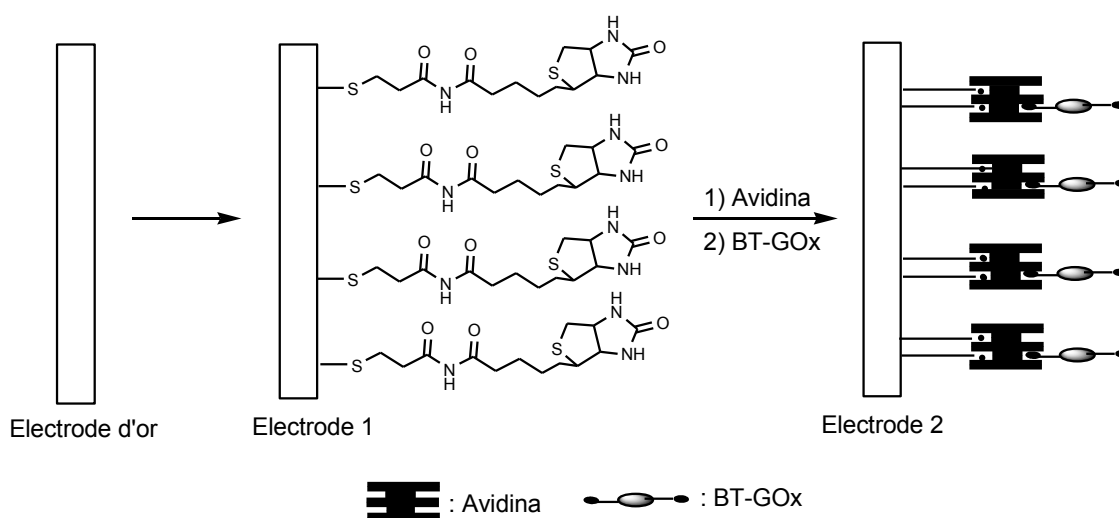


Figura 15. Representació de la formació d'una SAM sobre un elèctrode d'or amb biotina com a grup funcional terminal (elèctrode 1) i complexada amb avidina i Bt-GOx (elèctrode 2).

Aquest elèctrode d'or modificat amb l'enzim glucosa oxidasa es pot utilitzar com a sensor per a determinar la quantitat de glucosa en sang. Així, en presència de glucosa, aquesta és oxidada enzimàticament generant H₂O₂, el qual pot ser quantificat per oxidació a la superfície de l'elèctrode⁹⁰.

Tal com s'ha indicat anteriorment, quan el grup funcional terminal d'una SAM és voluminós és aconsellable que la SAM sigui del tipus mixte. La formació de SAMs mixtes es pot dur a terme de maneres diverses:

- Mitjançant la co-adsorció de solucions barreja de tiols o disulfurs (RSH + R'SH o RSSR + R'SSR'). En aquest cas, la proporció relativa de cada component en la monocapa no té per que coincidir amb la proporció en que estaven en la solució.
- Mitjançant disulfurs no simètrics (RSSR').

Així, si es vol ancorar una proteïna a una SAM, és aconsellable que la SAM estigui formada per dos tipus d'alcantriols: un de cadena llarga que contingui un lligand d'aquesta proteïna com a grup funcional terminal, i un altre de cadena més curta que s'intercalerà entre les cadenes llargues (Figura 16). D'aquesta manera, en el moment que la proteïna interaccioni amb el lligand, hi haurà espai suficient per a que les proteïnes s'ancorin sense impediments estèrics.⁹¹

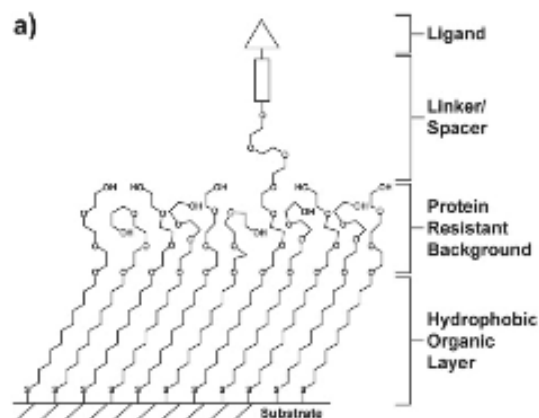


Figura 16. Representació esquemàtica d'una SAM mixta.

En aquest sentit s'ha descrit SAMs mixtes amb Bt com a grup terminal, les quals s'han utilitzat com a sensor de la proteïna Avidina, i on es demostra que les interaccions divalents proporcionen al sensor major sensibilitat.⁹²

Un altre exemple és l'ús de SAMs mixtes d'avidina mutada, que és capaç de dissociar les seves subunitats en un medi determinat (veure figura 17) i que d'aquesta manera s'ha utilitzat en sensors que permeten regenerar la SAM d'Av després de cada mesura.⁹³

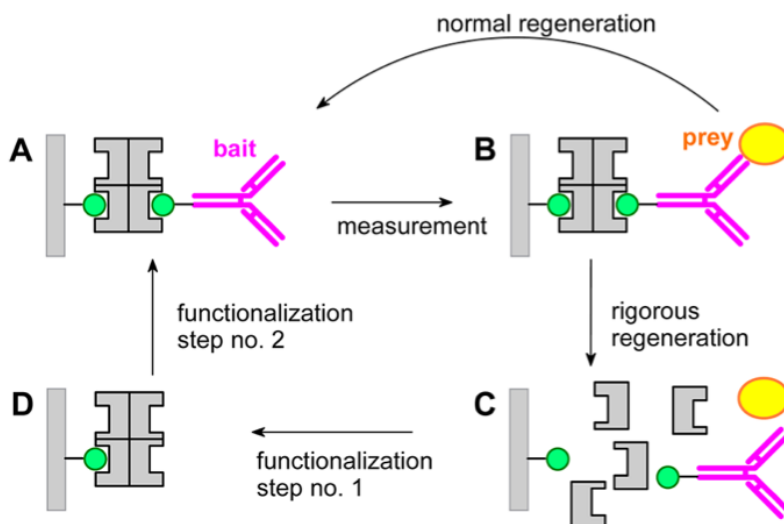


Figura 17. Esquema del funcionament de la SAM mixta que permet una funcionalització reversible amb avidina mutada. (A) Un anticòs biotinitat s'uneix a l'avidina. (B) Es produeix el reconeixement i la mesura. Es pot regenerar el sensor desnaturalitzant l'avidina mutada (C), tornant-hi a ancorar l'avidina nativa (D) i ancorant l'anticòs biotinitat (A).

1.4 Av i SAv unides a resines en fase sòlida

L'ús de resines en fase sòlida s'ha utilitzat àmpliament en la síntesi de pèptids, oligonucleòtids i oligosacàrids.

Els enzims es poden immobilitzar en una resina portadora per adsorció o per unió covalent. La unió covalent pot utilitzar els grups amino, àcid carboxílic o tiol (provinent dels enllaços disulfur) de l'enzim per reaccionar amb altres grups funcionals (esters activats, vinilsulfones, aldehids, maleïmides, azides, grups epoxi, etc.) de la resina activada ja sigui directament o a través d'un espaiador bifuncional.

94

També s'ha unit a resines de fase sòlida la (S)Av o neutravidina per a la purificació de proteïnes (per exemple proteïnes de membrana) marcades amb biotina (Figura 18).⁹⁵

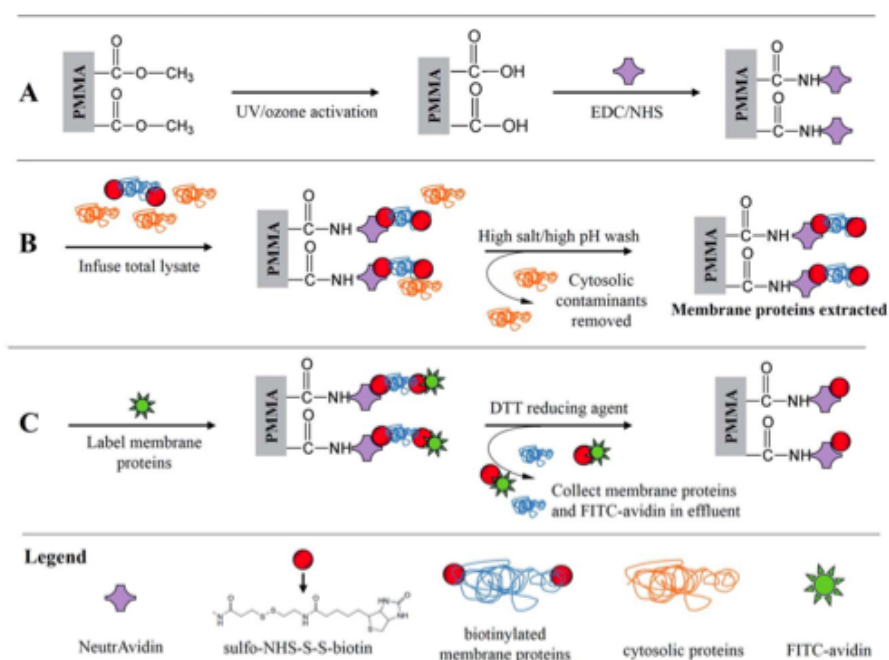


Figura 18. Esquema del xip d'extracció/purificació de les proteïnes de membrana biotinilades utilitzant la μ SPE. (A) activació de la resina i immobilització de la neutravidina; (B) retenció de proteïnes de membrana biotinilades; (C) marcat de les proteïnes de membrana biotinilades amb FITC-avidina seguit de la reducció de l'enllaç disulfur que allibera les proteïnes de membrana i la FITC-avidina.

Un altre ús general dels conjugats d'avidina amb enzims és en immunoassajos per amplificar el senyal i augmentar la sensibilitat en l'anàlisi d'antígens (Figura 19).⁹⁶

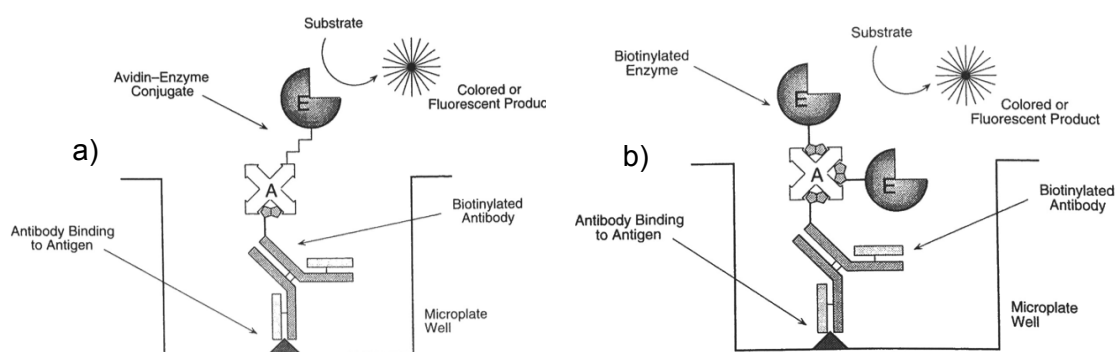


Figura 19. Representació de l'ús del sistema (S)Av per immunoassajos. (a) sistema senzill on un enzim s'ha unit covalentment a (S)Av ; (b) sistema on la (S)Av s'ha conjugat a dos enzims biotinilats.

La immobilització de (S)Av en resines de fase sòlida a través de la interacció antigen-anticòs ha permès la preparació de conjugats heterobifuncionals.⁹⁷ Tot i així, aquest mètode té certes limitacions ja que requereix disposar i immobilitzar en la resina un anticòs específic d'un dels components i, per altra banda, el control de l'estequiometria dels conjugats no és fàcil (Figura 20).

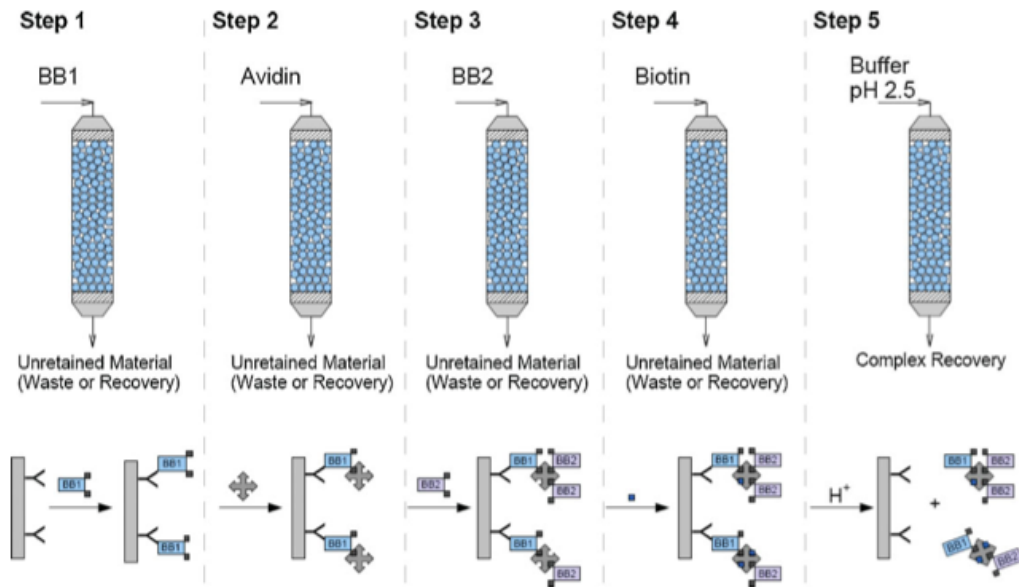


Figura 20. Representació de la preparació de conjugats heterobifuncionals. (1) immobilització de les primeres proteïnes biotilades en resines portadores d'anticossos específics, (2) addició un excés d'avidina per a complexar les biotines més accessibles, (3) addició d'un segon grup de proteïnes biotilades que es complexen en els llocs d'unió lliures de les avidines; (4) addició d'un excés de biotina per a complexar els llocs d'unió de les avidines que romanen lliures; (5) canvi de pH per afeblir l'interacció del anticòs al seu antigen i desancorar el conjugat heterobifuncional.

2 OBJECTIUS

Els objectius del present treball es resumeixen a continuació:

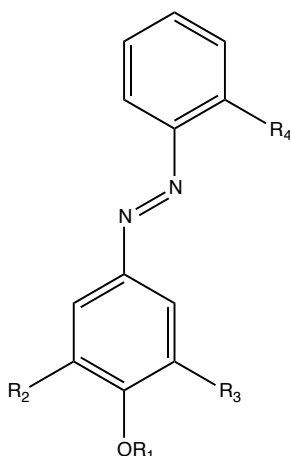
- Estudiar l'equilibri tautomèric azo-hidrazona i la isomerització *E/Z* de l'HABA (**2**) i derivats tant en solució, com en monocapes de Langmuir, així com de la influència sobre la complexació a l'avidina.
- Estudis de formació de monocapes autoensamblades (SAMs) que tinguin com a grup terminal el grup HABA, i la seva interacció amb avidina.
- Desenvolupament d'una metodologia per a preparar conjugats heterobifuncionals d'avidina basada en la utilització de lligands de diferent afinitat.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

**3 ESTUDI DE LA TAUTOMERIA AZO/HIDRAZONA I DE LA
ISOMERITZACIÓ E/Z DE L'HABA I COMPOSTOS
RELACIONATS, EN SOLUCIÓ I EN MONOCAPES DE
LANGMUIR**

3.1 Estudi del l'equilibri tautomèric azo/hidrazona de l'àcid 2-(4'-hidroxifenilazo)benzoic (**2**) i de l'àcid 2-(4'-hidroxi-3',5'-dimetilfenilazo)benzoic (**9**) en solució.

El 4-hidroxiazobenzé (**10**) i alguns dels seus derivats, són capaços de presentar un equilibri azo-hidrazona. En el cas del compost **10**, en tots els medis estudiats s'ha trobat que el tautòmer azo (TA) és el predominant.⁹⁸⁻¹⁰⁴ Un dels compostos més interessants d'aquest tipus és l'àcid 2-(4'-hidroxifenilazo)benzoic (HABA, **2**), ja que tal com s'ha indicat en la introducció, és capaç d'unir-se a proteïnes com l'avidina¹⁰⁵ i l'estreptavidina¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ en el mateix lloc d'unió que el seu lligand natural, la biotina.¹⁰⁹



2 R₁=R₂=R₃=H R₄=CO₂H

9 R₁=H R₂=R₃=CH₃ R₄=CO₂H

10 R₁=R₂=R₃=R₄=H

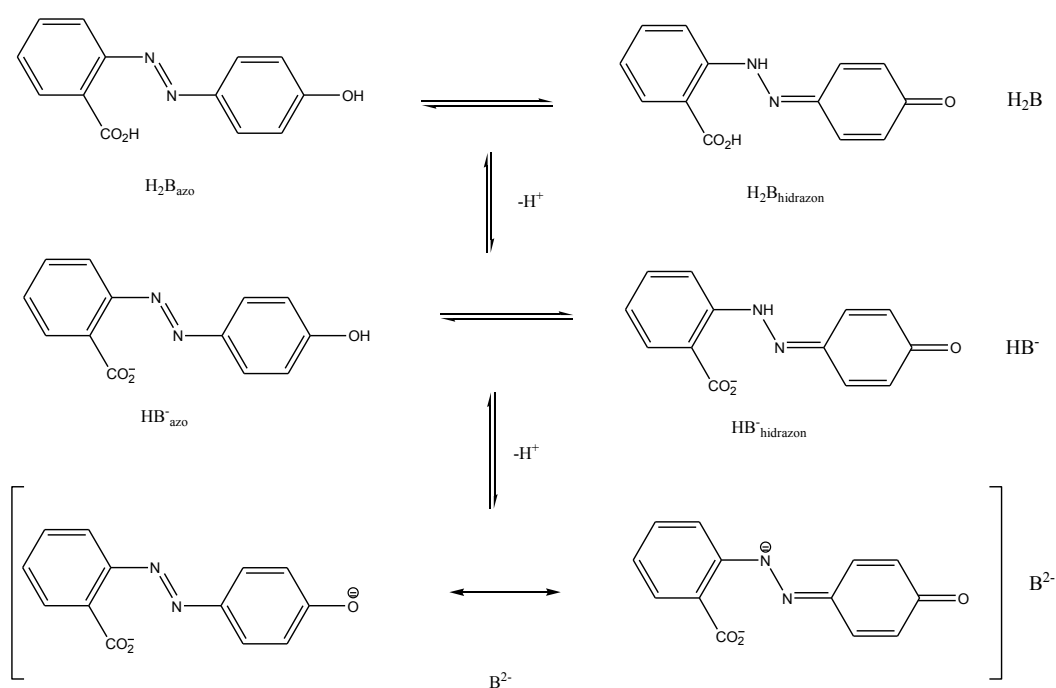
11 R₁=CH₃ R₂=R₃=H R₄=CO₂H

12 R₁=CH₃ R₂=R₃=R₄=H

Esquema 5. Estructures dels compostos **2**, **9**, **10**, **11** i **12**.

Apart dels complexos amb Av, SAV i albúmina descrits en la introducció, en els quals el tautòmer hidrazona (TH) de l'HABA és l'espècie predominant, no està clar sota quines condicions de pH i de dissolvent, aquest tautòmer podria ser també predominant en la seva forma lliure (no complexada). Per a les espècies neutres (H₂B), s'ha trobat que el TA és el predominant en una gran varietat de dissolvents orgànics de diversa polaritat, com ara en ciclohexà, cloroform, èter dietílic o

etanol.¹¹⁰⁻¹¹⁵ En canvi, en DMF la banda d'absorció principal es va trobar a 506 nm, la qual ve ser atribuïda al predomini del TH.¹¹⁶ La baixa solubilitat de l'HABA neutre (H_2B) en aigua no permet l'estudi de l'equilibri tautomèric en aquest dissolvent pur, però aquest problema va ser superat amb l'addició de codissolvents.¹¹⁶ Un altre manera d'augmentar la solubilitat de l'HABA en aigua és l'addició d'un àcid o una base,¹¹⁷ però d'aquesta manera es forma l'espècie catiònica (H_3B^+) o aniónica (HB^- o B^{2-} respectivament), i el tautòmer predominant no hauria de ser necessàriament el mateix en l'espècie neutra (H_2B) que en el seu monoanió (HB^-). Òbviament, no hi ha equilibri tautomèric possible per al dianió (B^{2-}), tot i que la seva estructura electrònica pot ser més semblant a azo o més semblant a hidrazona (Esquema 6).



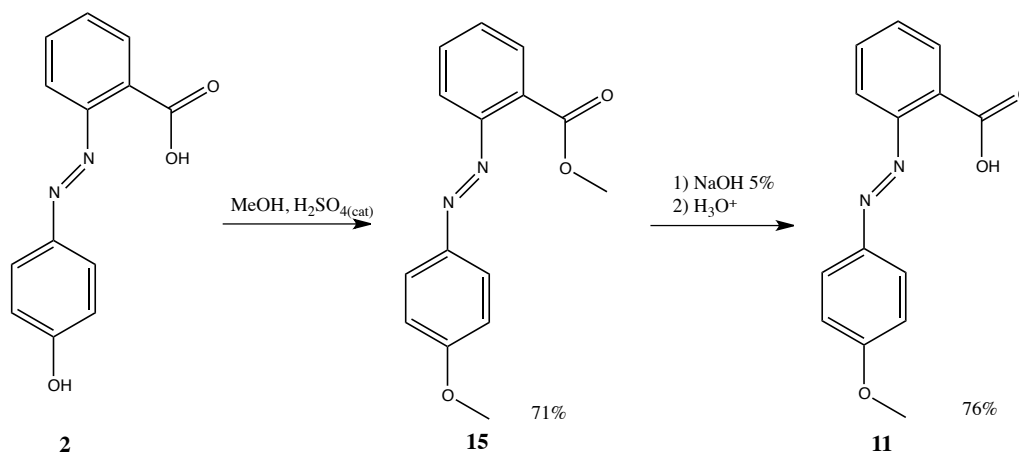
Esquema 6. Equilibris àcid-base i tautomèrics de l'HABA (2).

L'estudi de l'equilibri tautomèric en diferents medis de l'àcid 2-(4'-hidroxi-3',5'-dimetilfenilazo)benzoic (**9**) ens és interessant per estudiar com influeix la substitució alquílica en les posicions 3' i 5', sobre l'equilibri tautomèric d'aquests tipus de compostos. A més, aquesta informació pot ser útil de cara a dissenyar nous lligands de (S)Av, ja que sabem que el compost **9** s'uneix amb la SAv amb una constant d'associació dos ordres de magnitud superior que la de l'HABA (**2**)¹⁰⁷.

Per tal de facilitar la interpretació dels espectres i estudiar la seva complexació a Av és interessant disposar del derivat O-metilat (**11**) de l'HABA, en el qual no hi ha possibilitat que presenti equilibri tautomèric. Aquest compost serveix

de referència en els estudis espectroscòpics de la tautomeria azo-hidrazona, tant si estem en una situació de bescanvi lent com la observada en l'espectroscòpia UV-Vis com si estem en una situació de bescanvi ràpid com pot ser el cas de l'espectroscòpia de RMN. A més, aquest compost ens permetria realitzar experiments de complexació amb Av, i així observar com varia la constant d'associació respecte de la de l'HABA (**2**).

El compost **11** es va obtenir per reacció de l'HABA (**2**) amb metanol (reactiu i dissolvent alhora) en presència d'un àcid mineral (àcid sulfúric) com a catalitzador.¹²⁰ En aquestes condicions s'aconsegueix metilar tant l'hidroxil fenòlic com el del grup àcid carboxílic amb un rendiment del 71%. A continuació, aquest derivat dimetilat es va saponificar generant l'àcid **11** amb un rendiment del 76% (Esquema 7).



Esquema 7.

3.1.1 Estudis espectroscòpics sobre les espècies neutres (H₂B).

Per tal d'ajudar en l'assignació dels senyals espectroscòpics tant del TA com del TH, vam utilitzar el compost **11** com a referència, tenint present que aquest compost només pot existir com a forma azo (TA). Degut a això, en aquells medis on els senyals espectroscòpics de l'HABA (**2**) siguin similars als del compost **11**, les espècies predominants serien TA. Aquest és el cas de l'HABA (**2**) en toluè, cloroform, DMSO, n-butanol i etanol. L'espectre d'UV-Vis de l'HABA (**2**) en tots aquests dissolvents, sense l'addició de cap base, té un màxim d'absorció similar al del compost **11** en el mateix dissolvent, mostrant que les espècies predominants en ambdós compostos haurien de ser TA. La longitud d'ona dels màxims d'absorció de l'HABA (**2**) i del compost **11** en els diferents dissolvents estan resumits en la Taula 1.

Dissolvent	Base/pH	Màxim d'absorció d'UV-Vis (nm)		
		Compost 11	HABA (2)	Compost 9
Toluè	-----	376	372	391 (450 espatlla)
	1 eq DBU	330	471	473
CHCl ₃	-----	378	373	388 (450 espatlla)
	1 eq DBU	337	481	479
DMSO	-----	342	354	-----
n-BuOH	-----	345	364	480
EtOH	-----	350	355	471
	1 eq DBU	343	350 i 481	481
	70 eq DBU	343	406	481
H ₂ O	pH=7,0	345	347	352 i 476
	pH=10,0	345	400	444

Taula 1. Longitud d'ona dels màxims d'absorció dels compostos **11**, **2** i **9** en diferents medis.

El desplaçament hipsocròmic experimentat pels compostos **2** i **11** anant de dissolvents apolars ($\lambda_{\max} = 372\text{-}378$ nm) cap a dissolvents polars ($\lambda_{\max} = 342\text{-}364$ nm) podria ser explicat tant per una menor polaritat de l'estat excitat comparada amb la de l'estat fonamental, o per una major conjugació de **2** i **11** quan estan dissolts en dissolvents apolars. Aquesta possible major conjugació en dissolvents apolars podria ser indicativa de la formació d'alguna interacció per pont d'hidrogen intramolecular entre l'hidrogen de l'àcid carboxílic i l'àtom de nitrogen proper del grup azo, tal com s'ha trobat en l'estructura cristal·lina de l'HABA (**2**).¹¹⁸ Aquesta interacció per pont d'hidrogen intramolecular mantindria el grup àcid carboxílic aproximadament coplanar amb l'anell aromàtic, donant lloc a un sistema conjugat estès. Per altra banda, dissolvents polars com ara DMSO, n-butanol i etanol podrien interaccionar amb el grup àcid carboxílic mitjançant interaccions per pont d'hidrogen, trencant el pont d'hidrogen intramolecular. Llavors, el grup àcid carboxílic solvatat adoptaria una conformació diferent, menys coplanar amb l'anell aromàtic, constituint un sistema conjugat de menor extensió.

Per aprofundir més sobre els canvis estructurals provocats per la polaritat del dissolvent, Luque, J i col·laboradors¹³¹ van dur a terme càlculs teòrics per determinar l'estabilitat relativa dels dos tautòmers en diferents medis. L'estudi computacional va coincidir amb el comportament observat experimentalment ja que

l'espècie predominant del l'espècie neutre de l'HABA (**2**) en tots els medis analitzats va resultar ser el TA.¹³¹

A la vista dels resultats resumits a la taula 1, el predomini del TH de l'HABA (**2**) prèviament descrit en DMF,¹¹⁶ sense l'addició de base, és difícil d'explicar. No obstant, sabent que la DMF conté quasi sempre petites quantitats de dimetilamina com a impuresa, podria ser que l'espectre de l'HABA (**2**) descrit en DMF correspongués en realitat al monoanió de l'HABA (HB^-). Per tal de verificar aquesta hipòtesi vam mesurar l'espectre d'absorció UV-Vis de l'HABA (**2**) en DMF de qualitat analítica, que va mostrar una banda d'absorció principal a 352 nm (TA) i una banda menys intensa a 506 nm (TH). L'addició de trietilamina a aquella solució va fer augmentar la banda de 506 nm disminuint la de 352 nm, mentre que l'addició d'àcid acètic va fer augmentar la banda de 352 nm fent disminuir la de 506 nm. Aquests resultats donen suport a la nostra hipòtesi de que el TA ($\lambda_{\text{max}} = 352 \text{ nm}$) també és el predominant per a l'HABA neutre (H_2B) en DMF. En canvi, la banda d'absorció a 506 nm s'assignaria al TH del monoanió de l'HABA (HB^-_{TH}).

En el cas del 3',5'-dimetil-HABA (**9**), l'equilibri tautomèric sembla ser més favorable al TH que en el cas de l'HABA (**2**). En dissolvents apolars, tot i que el TA encara és l'espècie predominant per al compost **9**, també es detecta el TH en forma d'espatlla cap a 450 nm. Per altra banda, en dissolvents polars, s'observa una única banda d'absorció per al compost **9** a 471-480 nm, la qual correspondria al TH.

3.1.2 *Estudis espectroscòpics sobre les espècies monoanioniques (HB⁻).*

La determinació espectrofotomètrica de l'activitat de l'Av i de la SAv, així com les valoracions competitives amb lligands sintètics, normalment es realitzen a pH = 7,0 en el qual l'HABA és monoanió (HB^-). Per altra banda, és necessari un pH > 10 per generar quantitativament el dianió de l'HABA (B^{2-}), ja que el valor del segon pK_a de l'HABA (**2**) en aigua és de 8,2.¹¹⁹ S'ha descrit que la espècie predominant de l'HABA (**2**) en aigua a pH = 7,0 és el TA del monoanió (HB^-_{TA}),¹¹⁷ i la similitud que vam trobar en els espectres d'ambdós compostos **2** i **11** en aquest medi, dona suport a aquesta assignació. Per altra banda, la longitud d'ona dels màxims d'absorció de **2** i **11** en aigua a pH = 7,0 ($\lambda_{\text{max}} = 345\text{-}347 \text{ nm}$) és similar a la que

presenten en etanol, sense l'addició de base (Taula 1). Aquest fet podria ser indicatiu de que el grup carboxilat de **2** i **11** en aigua a pH = 7,0 no és coplanar amb l'anell aromàtic (sistema amb conjugació menys estesa). L'absència d'un pont d'hidrogen intramolecular en HB^-_{TA} , junt amb la solvatació i la repulsió entre la càrrega negativa del grup carboxilat i el parell d'electrons no enllaçants de l'àtom de nitrogen proper, podria explicar la no-coplanaritat entre el grup carboxilat i l'anell aromàtic.

En el cas de solucions d'HABA (**2**) i del compost **11** en cloroform, quan es va afegir un equivalent de la DBU a una solució del compost **11** en cloroform, es va formar una nova espècie amb una banda d'absorció a 337 nm. Aquesta nova espècie correspondria al TA del monoanió, i l'efecte hipsocròmic podria ser indicatiu d'una disminució de la conjugació deguda a la rotació del grup carboxilat que l'apartés del pla de l'anell aromàtic.

Per contra, quan es va afegir un equivalent de DBU a una solució d'HABA (**2**) en cloroform, es va observar un comportament completament diferent de l'observat per al compost **11**. En aquest cas, la banda d'absorció es va desplaçar batocròmicament als 481 nm (Figura 21), una longitud d'ona similar a la de l'HABA complexat a albúmina o a (S)Av, la qual és assignada a tautòmer hidrazona (HB^-_{TH}). L'addició d'un gran excés (1000 eq) de DBU no va causar cap canvi en l'espectre d'UV-Vis, lo qual vol dir que la DBU no és prou bàsica per a generar l'espècie dianiònica (B^{2-}) de l'HABA en cloroform.

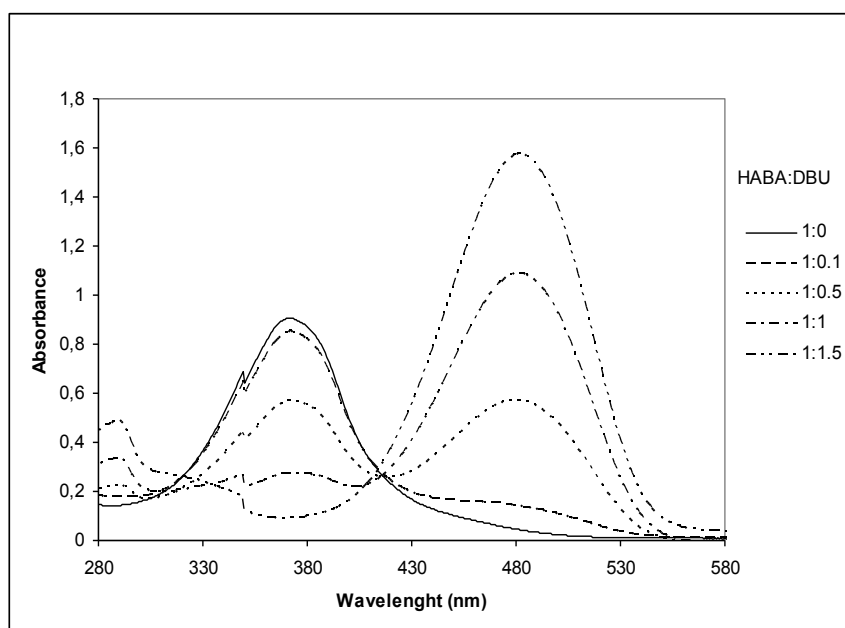


Figura 21. Espectre d'UV-Vis de la valoració de l'HABA $4,0 \times 10^{-05}$ M en cloroform amb DBU.

Per a confirmar que el màxim d'absorció a 481 nm era degut al TH del monoanió de l'HABA (HB^-_{TH}), vam enregistrar els espectres de Raman tant de **2** com de **11** en les mateixes condicions experimentals (solució clorofòrmica $4,0 \cdot 10^{-4}$ M amb 1 eq DBU). Com era d'esperar, l'espectre de Raman de l'anió del compost **11** conté una banda a 1416 cm^{-1} que es va assignar al N=N st.,¹¹⁷ mentre que no es van trobar bandes significatives a prop de 1615 cm^{-1} . Per altra banda, l'espectre de Raman del monoanió de l'HABA va presentar una banda intensa a 1624 cm^{-1} , atribuïble al tautòmer hidrazona (TH), però no es va detectar cap banda a prop de 1400 cm^{-1} (Figura 22). Aquests resultats estan d'acord amb els d'espectroscòpia UV-Vis que suggerien que el tautòmer hidrazona és el predominant quan tenim el monoanió de l'HABA en cloroform.

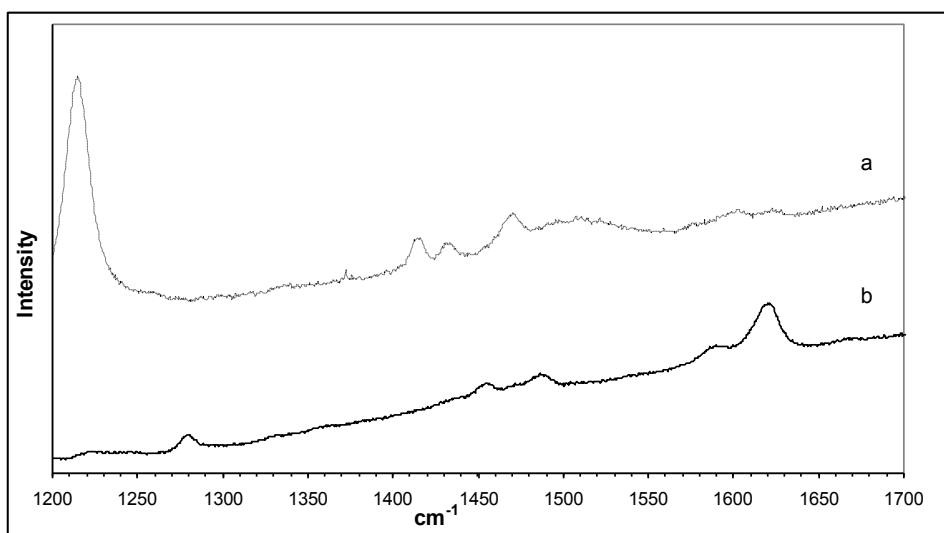


Figura 22. Espectres Raman de (a) barreja equimolar del compost **11** i DBU en cloroform, $c = 1,6 \times 10^{-3}$ M; (b) barreja equimolar d'HABA (**2**) i DBU en cloroform, $c = 8,0 \times 10^{-4}$ M. Longitud d'ona d'excitació: 488 nm.

La diferent posició de l'equilibri tautomèric del monoanió de l'HABA (**2**) en cloroform (TH predominant) i en aigua (TA predominant) ens va portar a estudiar aquest procés en un dissolvent de polaritat intermèdia: l'etanol. En primer lloc, es va afegir DBU a una solució etanòlica del compost **11** per a generar el seu anió, el qual només pot existir en la seva forma azo. La longitud d'ona del màxim d'absorció (343 nm) va ser similar a la de l'espècie neutra en el mateix dissolvent, com també a la de l'anió en aigua, suggerint que el grup carboxilat no es conjugaria amb l'anell aromàtic. Quan van ser afegides a una solució etanòlica d'HABA (**2**) tant en el cas d'afegir 1 eq de DBU com en el cas de l'addició d'un gran excés de DABCO, la banda d'absorció, inicialment a 355 nm, es va desdoblar en dues bandes. Una

d'aquestes noves bandes es va desplaçar lleugerament hipsocròmicament cap a 350 nm i podria ser atribuïda al TA, mentre que l'altra banda va aparèixer desplaçada batocròmicament cap a 481 nm i podria ser atribuïda al TH (Figura 23). Per tant, el monoanió de l'HABA (**2**) en etanol existeix com una barreja d'ambdós tautòmers, una situació intermèdia entre les trobades en cloroform i aigua.

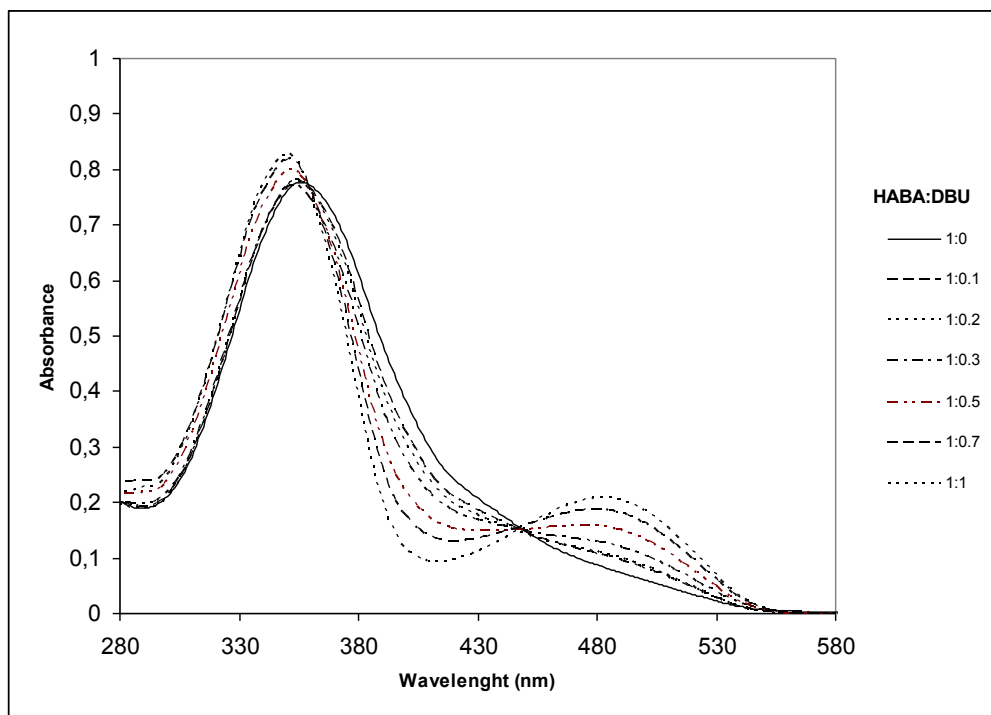


Figura 23. UV-Vis de la valoració de l'HABA $3,6 \times 10^{-5}$ M en etanol amb DBU.

En contrast al medi clorofòrmic, la DBU en medi etanòlic és prou bàsica per a generar el dianió de l'HABA (B^{2-}). Per tant, mitjançant l'addició d'un excés de DBU al monoanió de l'HABA en etanol, les bandes d'absorció dels dos tautòmers (350 nm i 481 nm) es van transformar en una sola banda a 406 nm corresponent al dianió (B^{2-}) de l'HABA (Figura 24). Aquesta assignació és recolzada per la similitud de la longitud d'ona del màxim d'absorció de l'HABA en aigua a pH = 10 ($\lambda_{\max} = 400$ nm), on el dianió també hauria de ser l'espècie predominant.

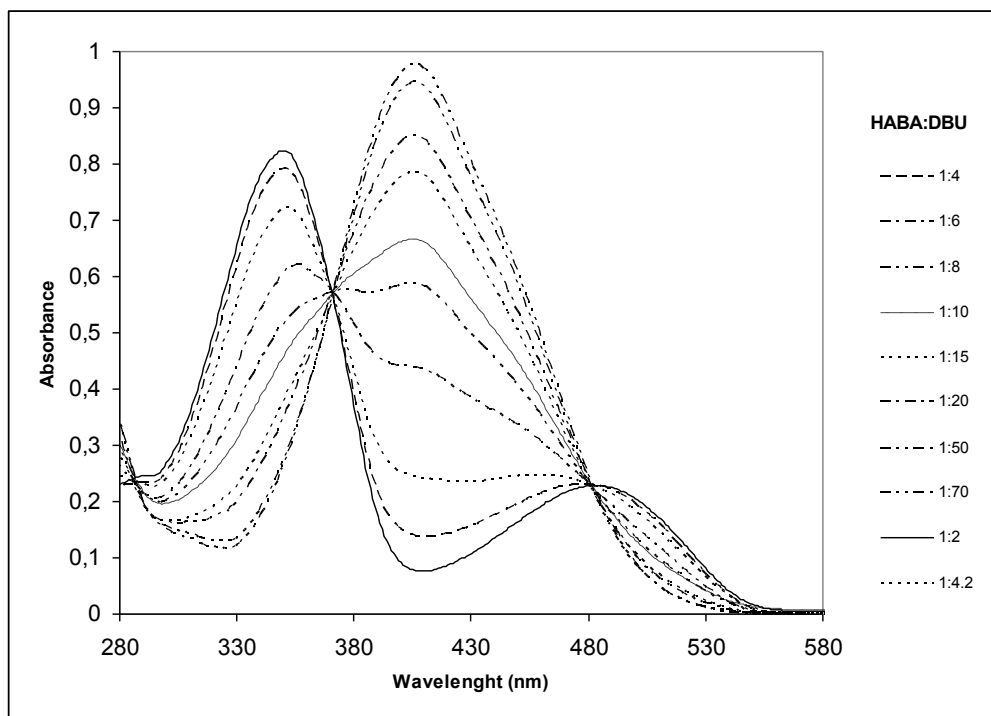


Figura 24. UV-Vis de la valoració de l'HABA $3,6 \times 10^{-05}$ M en etanol amb DBU.

Tal com hem trobat, la posició de l'equilibri tautomèric del monoanió de l'HABA depèn molt de la polaritat del medi. En dissolvents apolars com ara toluè o cloroform, el TH és l'espècie predominant. Mentre que en aigua, l'espècie predominant és el TA, i vam trobar una barreja d'ambdós tautòmers en dissolvents de polaritat intermèdia com l'etanol.

En el cas del monoanió del 3',5'-dimetil-HABA (**9**), l'equilibri tautomèric sembla ser encara més favorable cap al TH que en el cas del monoanió de l'HABA (**2**). Per al monoanió del 3',5'-dimetil-HABA (**9**), es va trobar una sola banda d'absorció entre 473 i 481 nm tant en toluè, cloroform o inclòs en etanol, la qual s'assignaria al TH. Només en aigua a pH entre 5 i 8, es va veure una barreja d'ambdós TA ($\lambda_{\max} = 352$ nm) i TH ($\lambda_{\max} = 476$ nm). Augmentant el pH, aquestes dues bandes es van transformar en una de sola amb $\lambda_{\max} = 444$ nm la qual correspondria al dianió del 3',5'-dimetil-HABA (**9**) (Figura 25). En una solució d'etanol, va caldre un gran excés de DBU per a generar una banda d'absorció similar ($\lambda_{\max} = 454$ nm) atribuïble al dianió del compost **9**.

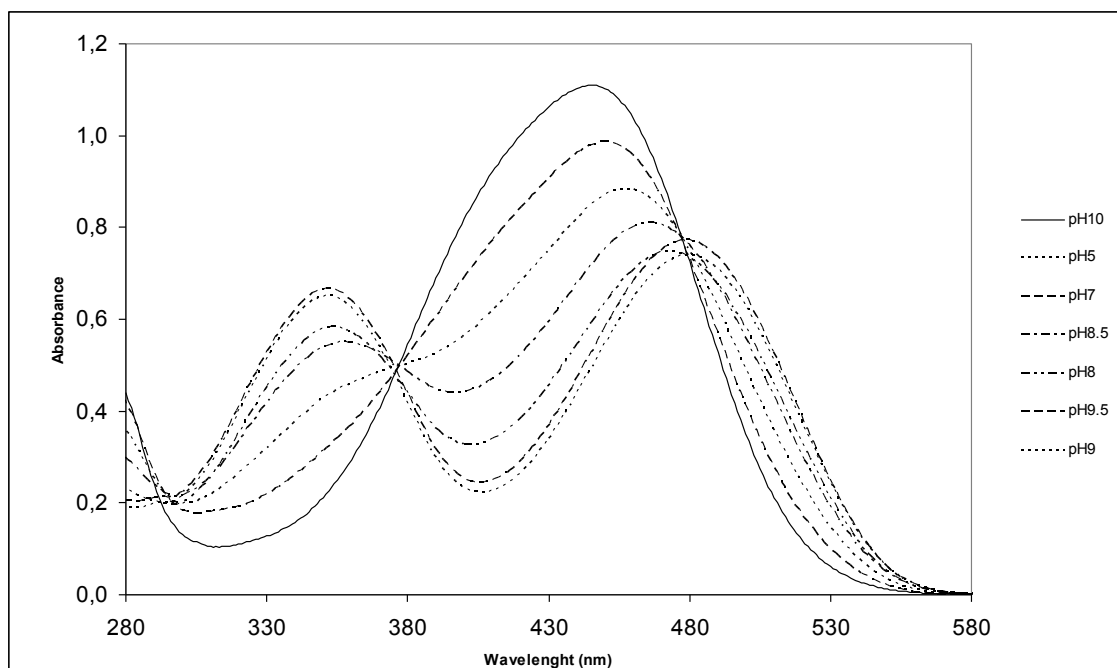


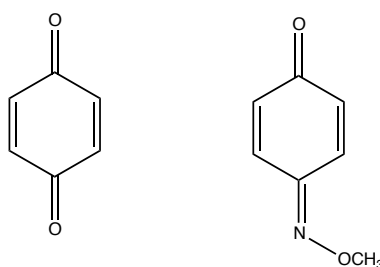
Figura 25. Espectres UV-Vis de 3',5'-dimetil-HABA (**9**) $5,3 \times 10^{-5}$ M en tampó fosfats 0,1 M a diferents valors de pH.

Paral·lelament als estudis anteriors, van ser enregistrats els espectres de RMN de l'HABA en alguns medis, tant per a l'espècie neutra com per al monoanió. D'aquesta manera es pretén comprovar la utilitat d'aquesta tècnica per a l'estudi de l'equilibri tautomèric de l'HABA.

En RMN es podria observar una situació de bescanvi ràpid entre els dos tautòmers de manera que, inclús en presència d'una barreja d'ambdós tautòmers, s'observés una única sèrie de senyals amb valors de desplaçament químic promitjats entre els dels dos tautòmers.

Es va registrar els espectres de RMN de ^1H i de ^{13}C de l'HABA dissolt en CDCl_3 amb un 5% de DMSO-d_6 necessari per solubilitzar el compost. L'espectre de COSY, HSQC i HMBC ens van permetre assignar els senyals de RMN de ^1H i de ^{13}C de l'HABA en aquest dissolvent. L'espectre de RMN de ^{13}C de l'HABA en aquest medi presenta una senyal corresponent al carboni 4' a 163,2 ppm similar al del C-OH del 4-fenilazofenol (161,0 ppm en DMSO-d_6) que correspon al tautòmer azo i gairebé idèntic als 163,0 ppm corresponents al desplaçament del carboni 4' del compost **11**. Si predominés el tautòmer hidrazona, caldria esperar que el desplaçament del carboni 4' fos similar al de la p-benzoquinona (amb un desplaçament químic de RMN de ^{13}C de 187,0 ppm en CDCl_3 per a C=O) o l'O-Metiloxima de la 1,4-Benzoquinona (amb un desplaçament químic de RMN de ^{13}C

de 187,1 ppm en Acetona- d_6 per a C=O) (Esquema 8). Per tant, com era d'esperar, l'HABA es troba majoritàriament com a tautòmer azo en aquest medi.



Esquema 8. Estructures de la *p*-benzoquinona i la l'O-Metiloxima de la 1,4-Benzoquinona

Seguidament es van enregistrar els espectres de RMN de ^1H i de ^{13}C de l'HABA en D_2O amb un equivalent de Na_2CO_3 per formar el monoanió. En aquest medi el desplaçament químic del carboni 4' és de 143,2 ppm, lluny dels 187 ppm del carboni C=O de la *p*-benzoquinona. Per tant, es podria dir que també predomina el tautòmer azo en aquest medi.

Els estudis computacionals amb el monoanió de l'HABA (**2**) portats a terme per Luque et al, van coincidir amb els resultats experimentals altre cop mostrant que en dissolvents apolars el tautòmer TH és el predominant, mentre que en medis polars l'espècie majoritària és el TA. A més, es va confirmar una tendència a favor del tautòmer TH quan augmentem la substitució de l'anell hidroxifenilic amb el 3',5'-dimetil-HABA (**9**)¹³¹

3.1.3 *Estudis de complexació de l'àcid 2-(4-metoxifenilazo)benzoic (11) a avidina.*

Per tal de verificar si la possibilitat de tautomerització d'azo a hidrazona és un requisit imprescindible per a que compostos azo similars a l'HABA es puguin complexar a (S)Av, es va estudiar la complexació de l'àcid 2-(4-metoxifenilazo)benzoic (**11**) a Av.

Per intentar esbrinar-ho es va fer una valoració espectrofotomètrica d'avidina amb el compost **11** en tampó fosfats 0,1 M a pH=7,0. El compost **11** lliure, en medi de tampó fosfats 0,1 M a pH=7,0 presenta un màxim d'absorbància a 344 nm, i quan es va anar addicionant a la dissolució d'avidina no es va observar cap canvi en la posició del màxim d'absorció ni en el coeficient d'absortivitat molar (Figura 26).

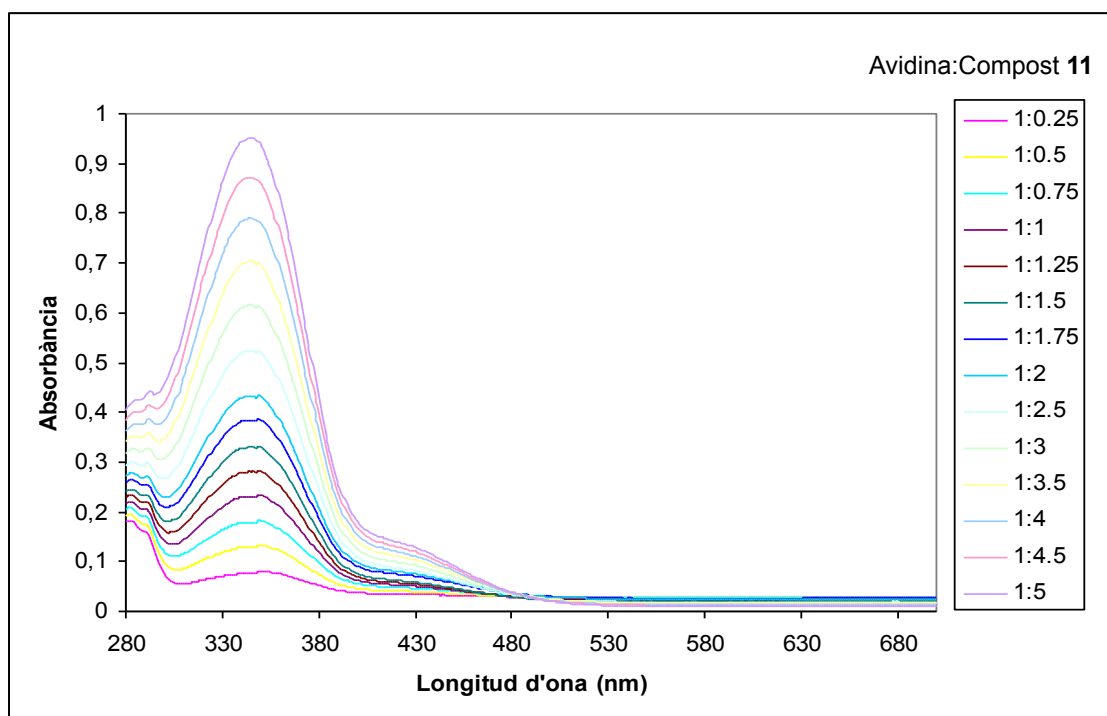


Figura 26. Valoració d'Av amb el compost **11** en tampó fosfats a pH=7,0.

Aquests resultats no ens permeten assegurar que el compost **11** fos capaç d'unir-se a la Avidina. Per tant, vam dissenyar un experiment de competició, en el qual l'HABA i **11** estiguessin competint per els mateixos llocs d'unió de la proteïna (valoració espectrofotomètrica competitiva).

En aquest experiment es va formar primer el complex Avidina:HABA ($\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$, $K_a = 1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$)¹³⁰ i es van anar addicionant quantitats creixents de compost **11**. Si el compost **11** s'unís a l'avidina en el mateix lloc d'unió que l'HABA, caldria esperar que anés desplaçant l'HABA del lloc d'unió a mesura que progressa la valoració. Això s'hauria de traduir en una disminució de l'absorbància a 500 nm.

Els resultats obtinguts indiquen que efectivament l'absorbància a 500 nm va disminuint a mesura que es va addicionant compost **11** (Figura 27), tot i que aquesta disminució és relativament petita. Això sembla indicar que el compost **11** també s'uneix a l'avidina en el mateix lloc que l'HABA, encara que amb una constant d'associació inferior. A partir d'aquesta valoració espectrofotomètrica competitiva es dedueix una constant d'associació de $1,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, aproximadament 2 ordres de magnitud inferiors a la constant d'associació de l'HABA amb avidina.

Aquests resultats semblen indicar que la tautomerització de azo a hidrazona fa que els lligands d'aquest tipus tinguin una afinitat major per l'avidina.

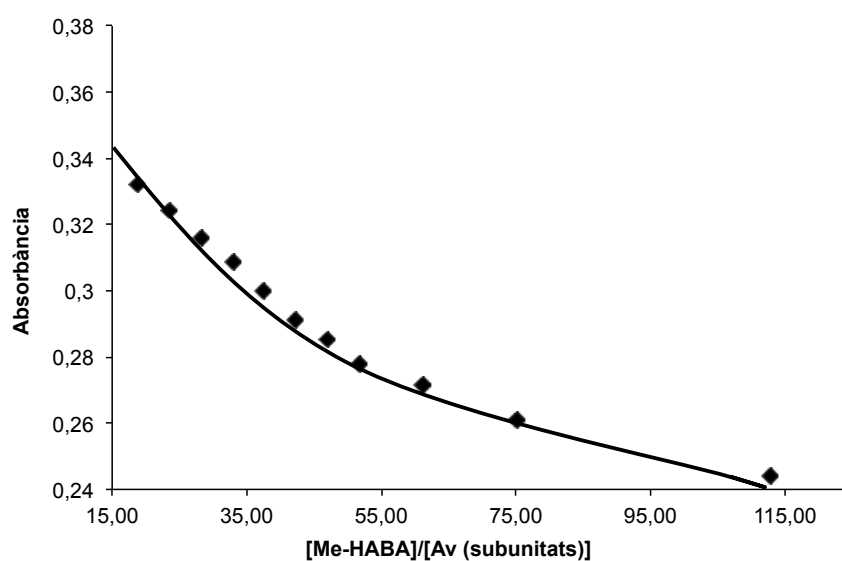
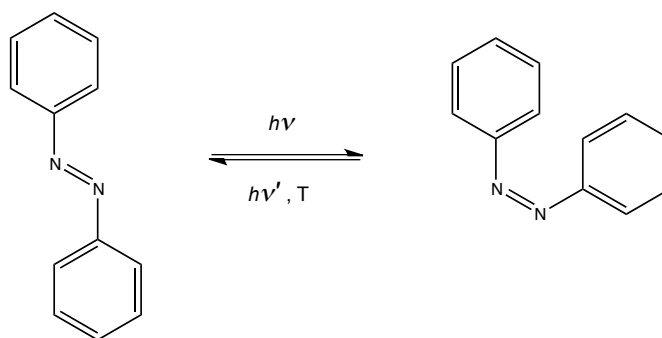


Figura 27. Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av $5,5 \times 10^{-5}$ M (tetràmer) i HABA $3,4 \times 10^{-5}$ M amb 11 en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades.

3.2 Estudis cinètics d'isomerització Z→E tèrmica de l'HABA (2) i compostos relacionats en solució.

Un dels comportaments més interessants dels azobencens és la seva isomerització reversible entre els isòmers *E* i *Z* que té lloc quan s'irradia un dels dos isòmers a una determinada longitud d'ona corresponent a la seva banda d'absorció. D'aquesta manera, quan s'irradia l'isòmer *E* a la longitud d'ona corresponent a la seva banda d'absorció es transforma en l'isòmer *Z* i, per altra banda, el procés invers de transformació de *Z* cap a *E* es pot produir tant irradiant a la longitud d'ona corresponent a la banda d'absorció de l'isòmer *Z* com relaxant tèrmicament.



Esquema 9. Isomerització de l'azobenzè.

La foto-isomerització dels azobencens és extremadament ràpida¹³², mentre que la isomerització tèrmica de *Z* cap a *E* és habitualment més lenta, depenent fortament de la substitució dels anells.

Si ens centrem en els hidroxiazobencens, veiem que la seva velocitat d'isomerització *Z*->*E* tèrmica depèn de la posició del grup hidroxil en l'anell i de la polaritat del dissolvent. Dissolvents apolars habitualment afavoreixen relaxacions més ràpides¹³⁴.

Si la posició del grup hidroxil en l'hidroxiazobenzè és *para* o *orto* el temps de vida mitja de l'isòmer *Z* a les fosques és generalment molt petit (inferior a un segon). En canvi, quan el grup hidroxil està en posició *meta*, el temps de vida mitja de l'isòmer *Z* és bastant superior. No obstant, quan el grup hidroxil en *orto* o *para* de l'azobenzè està alquilat, la cinètica de la isomerització *Z*->*E* tèrmica torna a ser lenta.¹³⁵ Aquest fet s'ha explicat per l'equilibri tautomèric azo-hidrazona que té lloc

en els *orto* i *para* hidroxiazobencens. La tautomeria azo-hidrazona proporcionaria una ruta alternativa de menor energia per a la isomerització $Z \rightarrow E$ tèrmica.¹³³

S'ha comprovat que aquest comportament també es compleix en un hidroxiazobenzè com l'HABA, que té un grup hidroxil en *para*. A continuació es descriuen els estudis de les cinètiques d'isomerització tèrmica $Z \rightarrow E$ del derivat O-metilat de l'HABA **11**, que no pot experimentar la tautomeria azo-hidrazona, en diferents medis.

3.2.1 Cinètiques d'isomerització tèrmica $Z \rightarrow E$ de l'espècie neutra del compost **11 en diferents medis.**

En primer lloc es va estudiar el comportament del compost **11** (Esquema 5) neutre, en dissolvents de diferent polaritat: com a medi apolar el cloroform i com a medi polar el metanol.

Per a calcular la constant cinètica de cada procés d'isomerització tèrmica $Z \rightarrow E$ es representen la corba cinètica corresponent al màxim d'absorbància en relació amb el temps i ajustar la corba a una equació exponencial.

A més, per a cada cinètica es va procedir a realitzar l'ajust lineal fruit de representar gràficament el logaritme neperià de la diferència de $(A_{\infty} - A_t)$ per el temps obtenint el pendent $-k$ (veure apartat 6.2.2.2.) Com que els dos ajustos donen resultats pràcticament coincidents, es va optar per només considerar els ajustos lineals de les cinètiques d'isomerització tèrmica $Z \rightarrow E$.

El valor de la constant cinètica del Me-HABA (**11**) en cloroform va resultar ser de $k_{\text{exp}} = 4,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Amb aquest valor es va determinar que el temps de vida mitja era de $1,6 \times 10^2 \text{ s}$

El valor de la constant cinètica segons ajust lineal del compost **11** en alcohol metílic va resultar ser de $k_{\text{exp}} = 4,4 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, dos ordres de magnitud menor que amb cloroform. El temps de vida mitja corresponent era de $1,6 \times 10^4 \text{ s}$.

3.2.2 Cinètiques d'isomerització tèrmica Z -> E de l'espècie monoaniònica del compost **11** en diferents medis.

Es va considerar interessant estudiar quins canvis en les cinètiques d'isomerització s'obtenien en el compost **11** quan aquest el tenim com a espècie monoaniònica.

En medi de cloroform amb 1 equivalent de DBU com a base per obtenir el monoanió, el valor de la constant cinètica segons ajust lineal del compost **11** va resultar ser de $k_{\text{exp}} = 1.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, 3,5 vegades menor que la constant de l'espècie neutra en cloroform. El temps de vida mitja corresponent va ser de $5,5 \times 10^2 \text{ s}$

Posteriorment es va estudiar el comportament de la cinètica d'isomerització del monoanió del compost **11** en metanol com a dissolvent orgànic polar i la DBU com a base. El valor de la constant cinètica segons ajust lineal del compost **11** en alcohol metílic va ser de $k_{\text{exp}} = 1.6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, 2,7 vegades menor que la constant de l'espècie neutra en cloroform. El temps de vida mitja corresponent va ser $4,2 \times 10^4 \text{ s}$.

Es van estudiar les cinètiques d'isomerització Z -> E tèrmica del monoanió del compost **11** en aigua, i per desprotonat l'espècie neutra es van preparar dissolucions del producte en medi tamponat amb PB a pH=7,0.

Per obtenir un valor de constant cinètica a temperatura ambient es va optar per estudiar les cinètiques a temperatures més altes i extrapolar el valor de la constant cinètica a temperatura ambient, ja que aquestes són molt lentes per la majoria d'hidroxiazobenzens.¹³⁴

Els valors de les constants cinètiques calculades a diferents temperatures del compost **11** en tampó PB a pH 7,0, a partir dels ajustos lineals de les cinètiques es resumeixen en la taula 2.

T (°C)	k _{exp} (s ⁻¹)
35	4,01x10 ⁻⁰⁶
45	1,05 x10 ⁻⁰⁵
50	1,95 x10 ⁻⁰⁵
55	3,51 x10 ⁻⁰⁵
60	6,15 x10 ⁻⁰⁵
65	1,02 x10 ⁻⁰⁴
75	2,93 x10 ⁻⁰⁴
80	5,02 x10 ⁻⁰⁴

Taula 2. Taula resum de les cinètiques del compost **11** en PB 0,1M a pH 7,0 a diferents temperatures

3.2.2.1 Ajust de les cinètiques al model d'Arrhenius

Amb els ajustos de les representacions lineals de les cinètiques a diferents temperatures podem obtenir la representació de l'equació d'Arrhenius.

Per extrapolar el valor de la constant cinètica a temperatura ambient es va utilitzar l'equació d'Arrhenius que relaciona la constant cinètica amb l'energia d'activació i la temperatura:

$$k(T) = A e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

Expressada en logaritmes neperians ens relaciona el logaritme neperià de la constant cinètica amb la inversa de la temperatura linealment.

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

Així, representant els logaritmes neperians de les constants cinètiques obtingudes segons ajust exponencial amb la inversa de temperatura obtenim una recta (Figura 28):

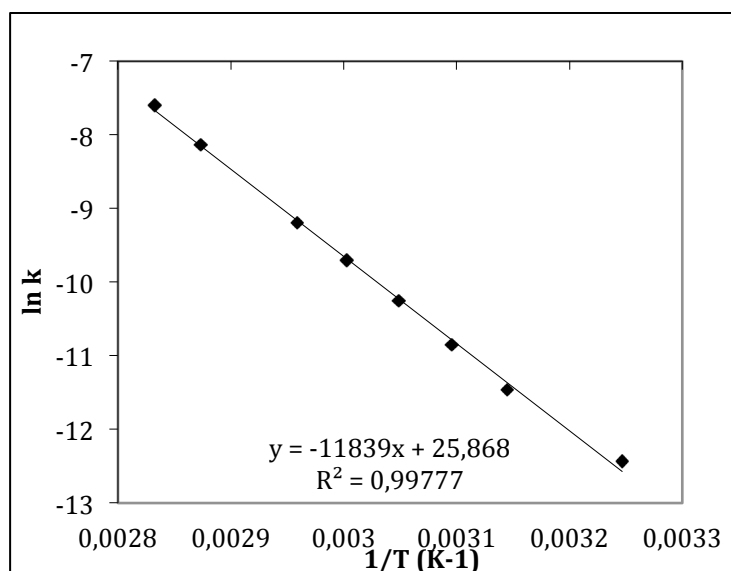


Figura 28. Representació l'ajust de la equació d'Arrhenius a partir dels valors de les constants cinètiques dels ajustos lineals del compost **11** en PB 0,1M a pH 7,0 a diferents temperatures

Mitjançant la regressió lineal de la recta que s'hi ajusta obtenim l'expressió:

$$y = -11839x + 25,868$$

I per tant l'energia d'activació (E_a) és de 98 kJ/mol

Extrapolant, es va obtenir el valor de constant cinètica i de temps de vida mitja a 23°C i 25°C, que es mostren a continuació:

T (°C)	k (s ⁻¹)	t _{1/2} (hores)
23	7,31 x10 ⁻⁰⁷	263,33
25	9,56 x10 ⁻⁰⁷	201,34

Taula 3. Valors de constant cinètica i temps de vida mitja del compost **11** a 23°C i 25°C

3.2.2.2 Ajust de les cinètiques al model d'Eyring

Mitjançant l'equació d'Eyring podem obtenir els paràmetres termodinàmics de l'estat de transició:

$$k = \left(\frac{k_B \cdot T}{h} \right) \cdot e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} \cdot e^{\frac{-\Delta H^\ddagger}{RT}}$$

Linealment, tenim que:

$$\ln \frac{k}{T} = \frac{-\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} + \ln \frac{k_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R}$$

Representant $\ln(k/T)$ de les cinètiques obtingudes segons ajust lineal versus la inversa de temperatura obtenim una recta:

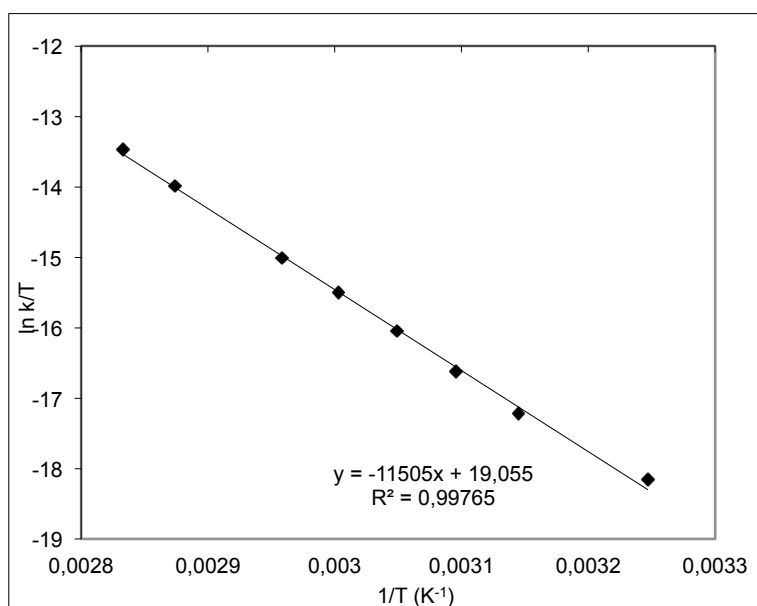


Figura 29. Representació l'ajust de la equació d'Eyring a partir de les constants cinètiques dels ajustos lineals del compost **11** en PB 0,1M a pH 7,0 a diferents temperatures.

Amb l'ajust lineal de la recta de regressió podem obtenir l'entalpia d'activació i entropia d'activació de la cinètica d'isomerització tèrmica $Z \rightarrow E$ a 23°C (Taula 4)

ΔH^\ddagger (kcal/mol)	22,86
ΔS^\ddagger (cal/mol)	0,04

Taula 4.

A continuació representem un quadre resum dels paràmetres cinètics del compost **11** en diferents medis a 23°C (a medi tampó fosfats s'ha calculat els valors de constant i temps de vida mitja extrapolant amb els ajustos lineals de les cinètiques a diferents temperatures, Taula 5).

Dissolvent	Espècie	K (s ⁻¹)	t _{1/2} (s)
Cloroform	Neutre	4,44 x10 ⁻⁰³	1,56 x10 ⁺⁰²
	Monoanió	1,27 x10 ⁻⁰³	5,46 x10 ⁺⁰²
MeOH	Neutre	4,36 x10 ⁻⁰⁵	1,59 x10 ⁺⁰⁴
	Monoanió	1,64 x10 ⁻⁰⁵	4,23 x10 ⁺⁰⁴
PB (23°C)	Monoanió	7,31 x10 ⁻⁰⁷	9,48 x10 ⁺⁰⁵

Taula 5. Paràmetres cinètics del compost **11** en diferents medis a 23°C

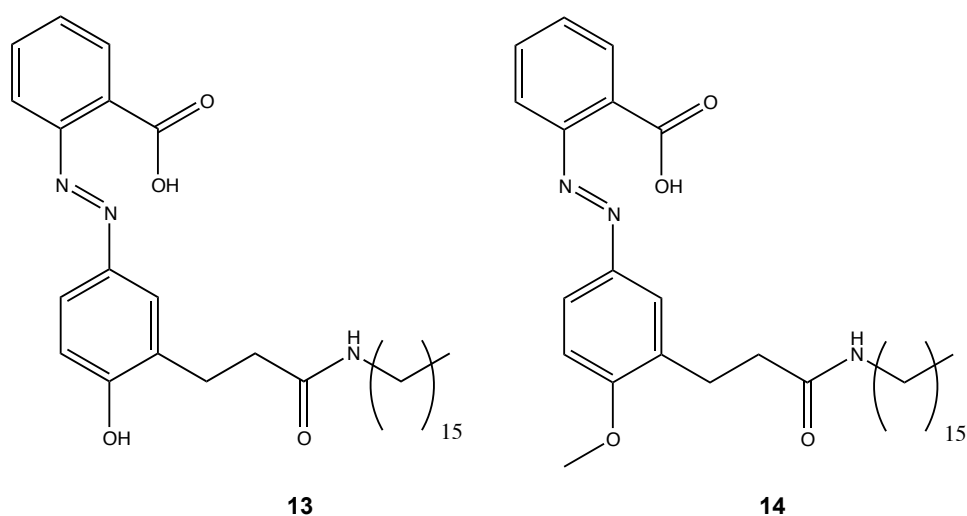
Després d'haver estudiat les cinètiques d'isomerització Z -> E de les espècies monoanió i neutre de l'HABA podem concloure que les interaccions entre el dissolvent i el cromòfor juguen un paper important en quan a la velocitat d'isomerització, sent majors (major constant cinètica) quant més apolar és el dissolvent tant per l'espècie neutra com per la monoaniònica.

En canvi, no hi ha gaire diferència entre les constants cinètiques de les cinètiques d'isomerització de les espècies neutra i monoaniònica, sent lleugerament majors per a l'espècie neutra.

3.3 Estudi de la isomerització E/Z i de la tautomeria azo/hidrazona de compostos amfifílics derivats de l'HABA en monocapes de Langmuir

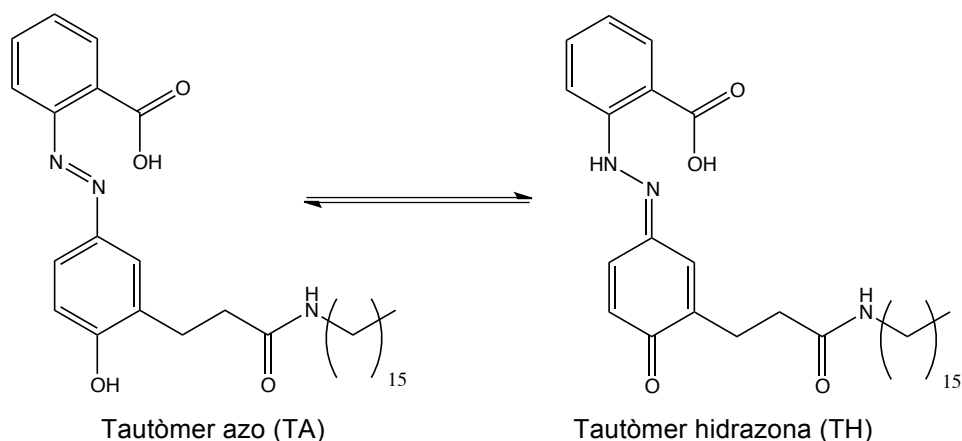
Una vegada estudiat el comportament de l'HABA i compostos relacionats en solució, es va procedir a estudiar la isomerització E/Z i la tautomeria azo/hidrazona en monocapes de Langmuir.

Per a formar monocapes de Langmuir d'un derivat de l'HABA es va dissenyar un compost amfifílic amb l'HABA com a extrem hidrofílic (en la seva forma monoaniònica) i una cadena alquíllica de 16 carbonis com a grup hidrofòbic (compost **13**, Esquema 10). La unió de la cadena alquíllica a l'HABA es va fer a través de la posició 3' de l'HABA, ja que així el compost **13** pot experimentar la tautomeria azo/hidrazona (Esquema 11).

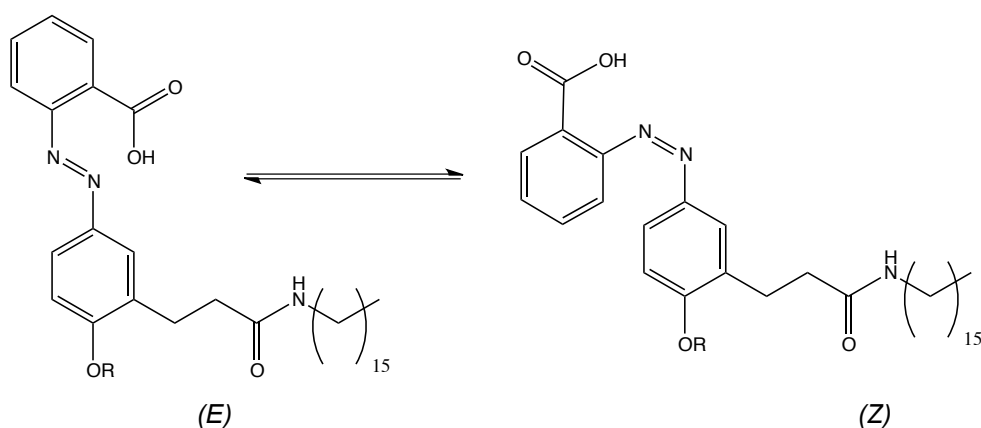


Esquema 10.

En els estudis de les monocapes de Langmuir també ens interessa comparar el comportament d'aquest compost amfifílic **13**, que pot experimentar tant tautomeria azo/hidrazona (Esquema 11) com isomerització E/Z (Esquema 12), amb la d'un altre compost amfifílic anàleg **14**, que pugués experimentar isomerització E/Z però no pugués experimentar la tautomeria azo/hidrazona. El compost **14** es pot considerar un compost model del tautòmer azo (TA) del compost amfifílic **13**.



Esquema 11.



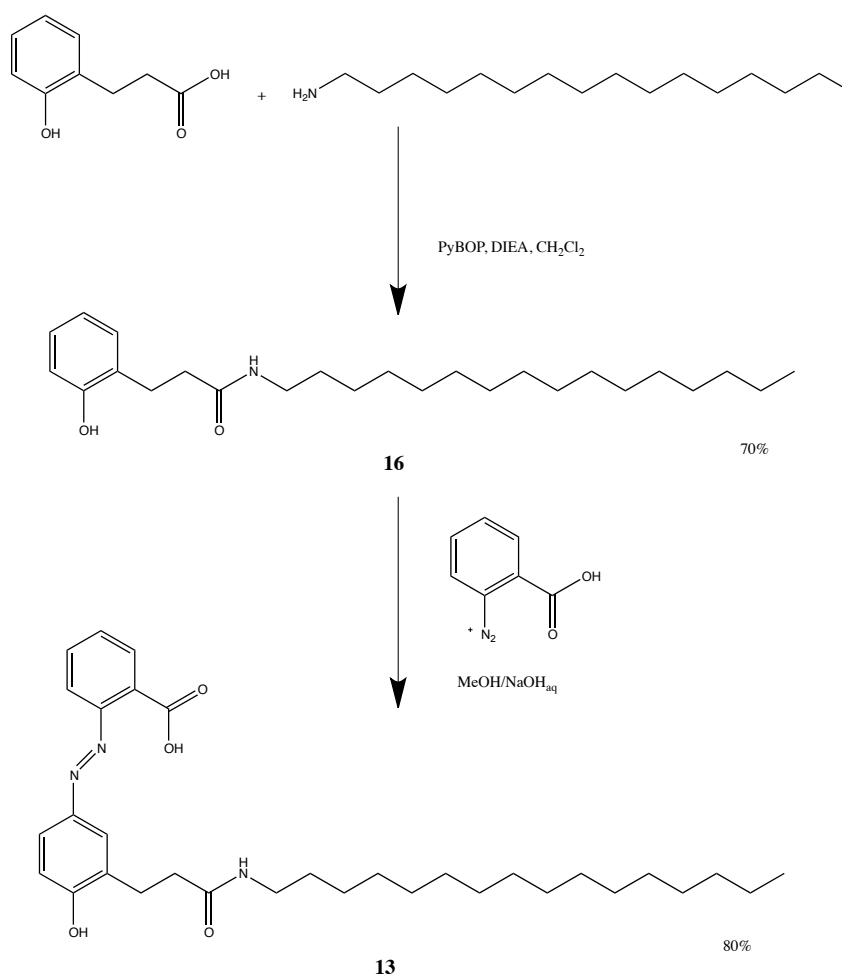
Esquema 12.

Les solucions dels compostos **13** i **14** (en cloroform) que es van utilitzar per a preparar les monocapes, per estar segurs que tot el compost estigués com a isòmer (*E*), es van mantenir un mínim de 24 hores a les fosques. Posteriorment, al preparar i estudiar la monocapa de Langmuir, sempre que no s'indiqui el contrari, es va treballar en tot moment en absència de llum natural, i només es va utilitzar llum vermella ocasionalment.

Per preparar la monocapa es va aplicar la solució del compost amfifílic sobre una fase aquosa que contenia PB 0,05 M a pH=7,0 i es va esperar uns 10 minuts (fins que es va establir la pressió superficial) abans de començar la compressió de la monocapa. En aquest pH, el grup polar dels compostos amfifílics **13** i **14** estava en forma de monoanió (carboxilat).

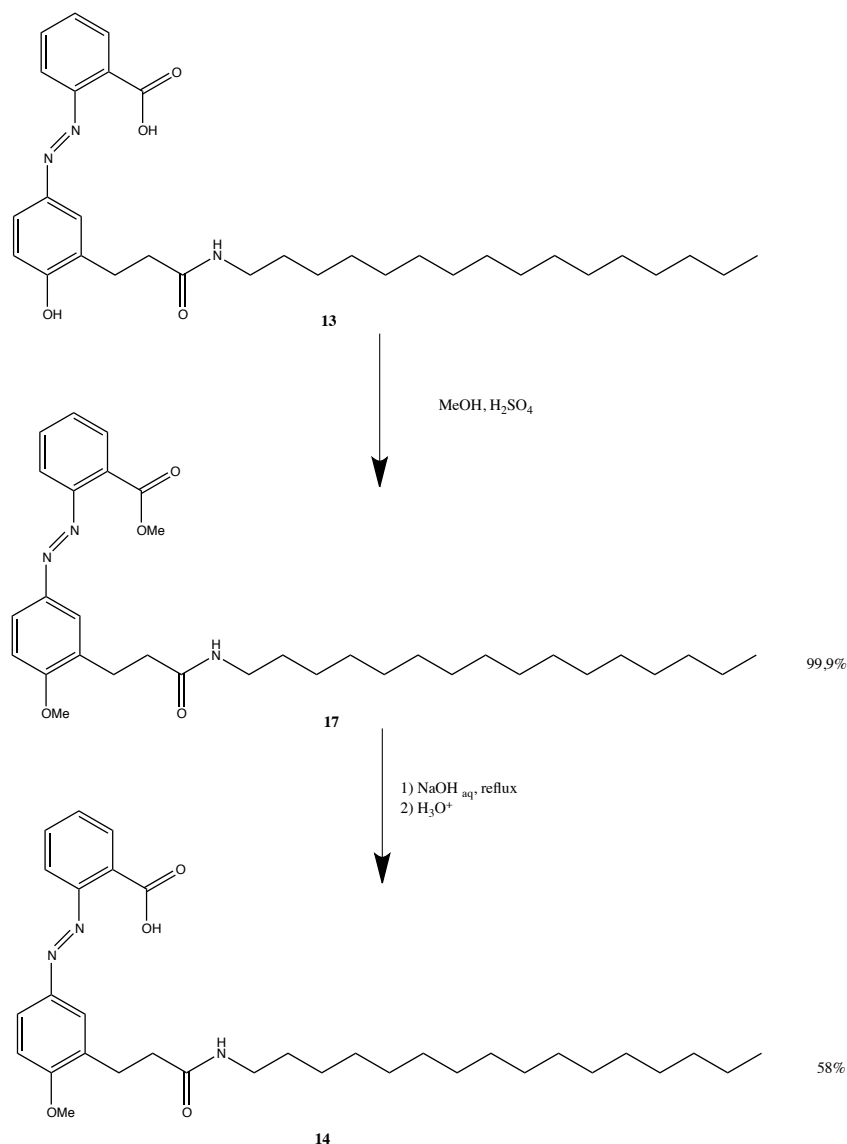
3.3.1 Síntesi dels compostos 13 i 14

La síntesi del compost **13** es va dur a terme en dues etapes. En la primera etapa es va fer reaccionar l'àcid 3-(2-hidroxifenil)propanoic amb la hexadecilamina, emprant PyBOP com agent d'acoblament i DIEA, obtenint-se l'amida **16** amb un 70% de rendiment. Posteriorment, el compost **16** es va fer reaccionar amb la sal de diazoni de l'àcid antranílic per obtenir el compost **13** amb un 80% de rendiment (Esquema 13).



Esquema 13

El compost **14** es va sintetitzar a partir de **13** en dues etapes. En la primera etapa es van metilar els dos grups hidroxil (fenòlic i carboxílic) amb metanol i àcid sulfúric a reflux. A continuació es va saponificar el grup ester amb NaOH 10% a reflux i, després d'acidificar, es va obtenir el compost **14** amb un rendiment conjunt d'aquestes dues etapes del 58% (Esquema 14).



Esquema 14.

3.3.2 Monocapes de Langmuir del compost (E)-14 en forma aniònica.

Durant la compressió d'una monocapa de Langmuir del compost (E)-14 (mitjançant una solució mantinguda a les fosques durant 24 hores) es va observar un canvi de fase a una pressió superficial de 13 mN/m i un altre canvi de fase a una pressió superficial de 14 mN/m (Figura 30). Quan es va arribar al límit de compressió (àrea superficial de 55 Å²/molècula) es va aturar la compressió durant 10 minuts i tot seguit es va procedir a expandir la monocapa a la mateixa velocitat amb que s'havia comprimit, observant-se un comportament irreversible.

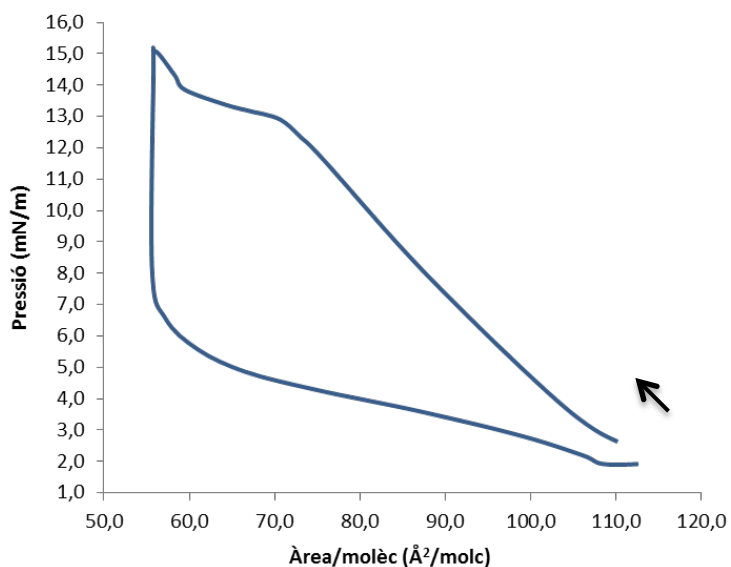


Figura 30. Isoterma de pressió superficial/àrea per al compost (E)-14 a 25°C sobre PB 0,05 M a pH=7,0.

Les imatges obtingudes mitjançant un microscopi d'angle Brewster (BAM) indiquen la progressiva formació de petits dominis o nuclis en anar comprimint la monocapa (Figura 31).

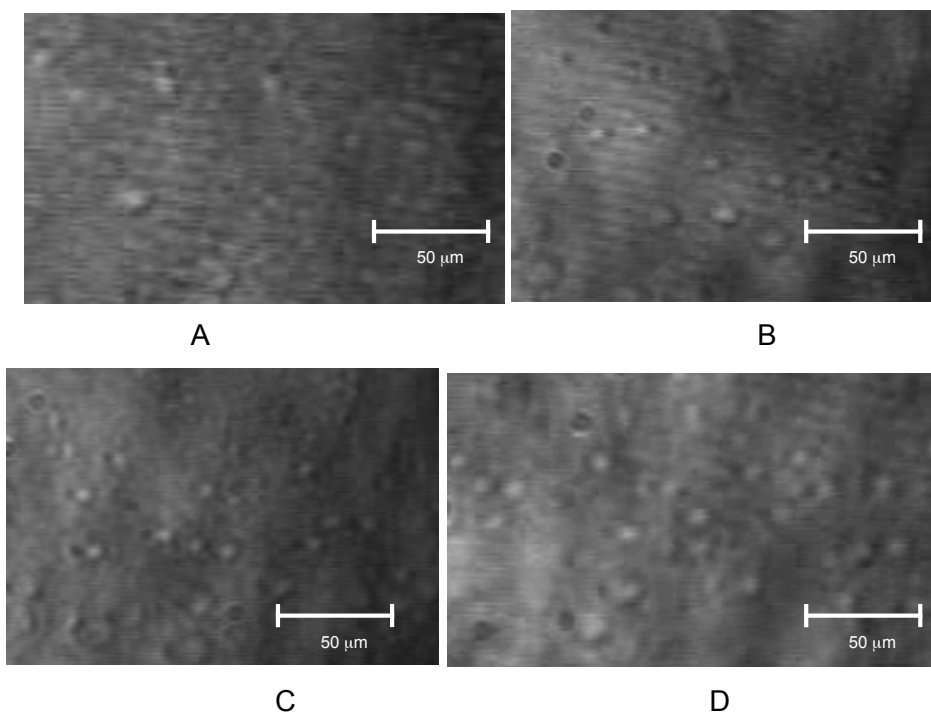


Figura 31. Imatges de microscòpia d'angle Brewster (BAM) de la monocapa de Langmuir del compost (E)-14 a 25°C sobre PB 0,05M a pH=7,0. Pressió superficial: A) 3,45 mN/m, B) 7,62 mN/m, C) 10,44 mN/m, D) 14,85 mN/m.

3.3.3 Monocapes de Langmuir del compost (Z)-14 en forma aniònica.

En aquest experiment, la solució del compost **14** en cloroform es va irradiar durant 10 min a 365 nm per tal de provocar la isomerització de (*E*) a (*Z*) i, tot seguit, es va aplicar sobre la fase aquosa tamponada. Es va esperar 2 minuts i, amb la pressió ja estabilitzada, es va comprimir la monocapa fins al màxim que permetia la cubeta, però no es va observar cap canvi de fase. En aquest punt, es va aturar la compressió durant 10 minuts i tot seguit es va procedir a la expansió de la monocapa, observant-se en aquest cas un comportament reversible (Figura 32).

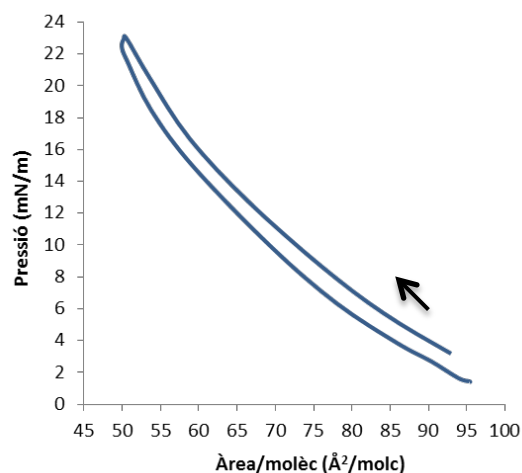


Figura 32. Isotherma de pressió superficial/àrea del compost (Z)-14 a 25°C sobre PB 0,05 M a pH=7,0.

Les imatges de la monocapa en el BAM no van presentar cap tipus de domini en tota la compressió. Aquest comportament isòtrop és similar a l'observat en monocapes de Langmuir d'altres azobenzens amfifílics en la seva forma (*Z*) (Figura 33).¹³⁶

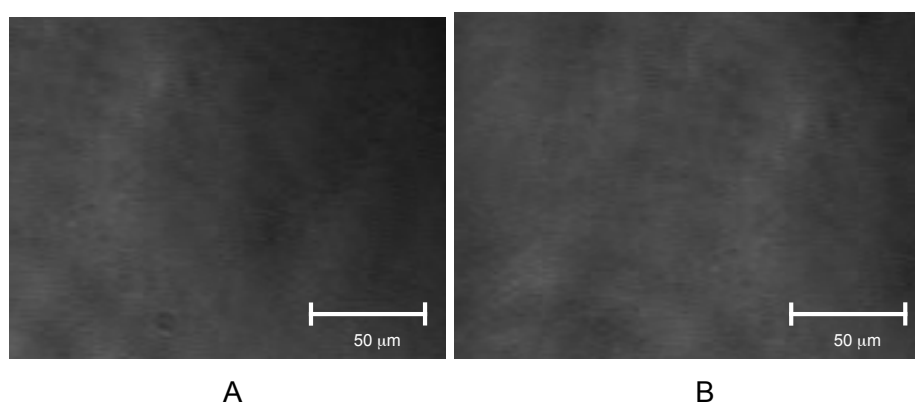


Figura 33. Imatges de microscòpia d'angle Brewster (BAM) de la monocapa de Langmuir del compost (*E*)-14 a 25°C sobre PB 0,05M a pH=7,0. Pressió superficial: A) 6,36 mN/m., B) 18,35 mN/m

3.3.4 Monocapes de Langmuir d'una barreja fotoestacionària dels dos isòmers del compost **14** en forma aniònica.

En primer lloc, la solució del compost **14** en cloroform es va deixar a la llum del laboratori durant 15 hores (per estar segurs que s'arribava a l'equilibri fotoestacionari) abans d'aplicar-la sobre la fase aquosa tamponada.

Durant la compressió de la monocapa es va observar un canvi de fase a una pressió superficial de 18 mN/m i un altre canvi de fase a 19 mN/m. En la zona de major compressió, la isoterma va presentar un major pendent que en la zona de menor compressió (Figura 34).

Quan es va arribar al màxim de compressió que permetia la cubeta, es va aturar la compressió durant 10 minuts i tot seguit es va procedir a expandir la monocapa a la mateixa velocitat amb que s'havia comprimit, observant-se un comportament irreversible.

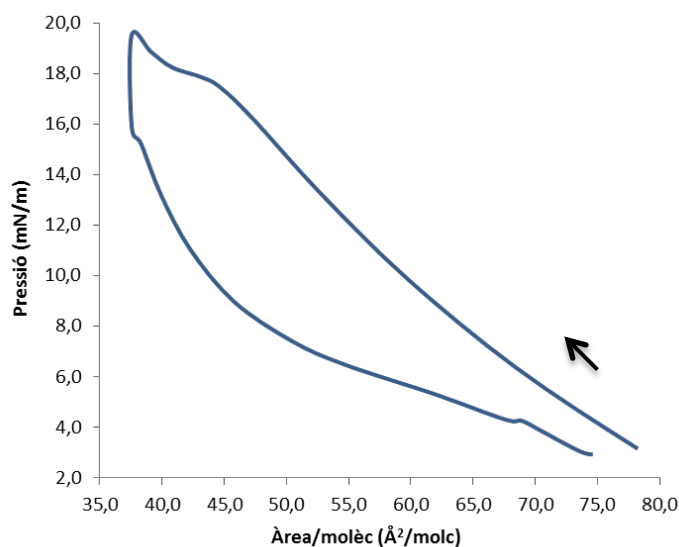


Figura 34. Isoterma de pressió superficial/àrea de la barreja fotoestacionària del compost **14** a 25°C sobre PB 0,05 M a pH=7,0.

Les imatges de la monocapa obtingudes mitjançant el BAM van indicar la progressiva formació de petits dominis o nuclis, similars als observats en la monocapa de l'isòmer (*E*)-**14** pur. En la zona de major compressió es va observar l'aparició una textura més brillant (Figura 35).

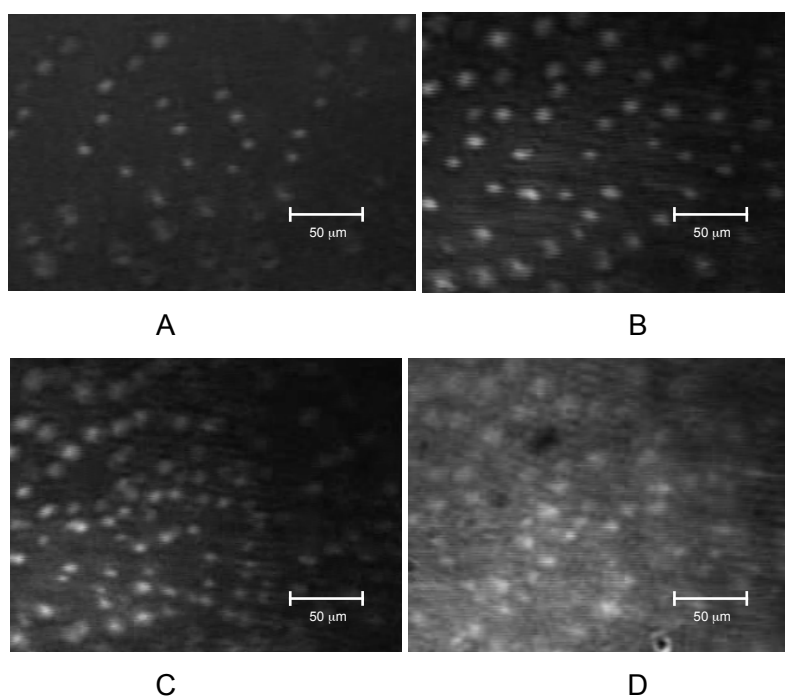


Figura 35: Imatges de BAM de la monocapa de Langmuir de la barreja fotoestacionaria del compost **14** a 25°C sobre PB 0,05M a pH=7,0. Pressió superficial: A) 3,86 mN/m, B) 10,11 mN/m, C) 17,28 mN/m, D) 19,33 mN/m

Posteriorment es va preparar una segona monocapa de la barreja fotoestacionaria del compost **14** per observar el seu comportament a pressions més elevades, i se'n va enregistrar la isoterma de pressió superficial/àrea (Figura 36).

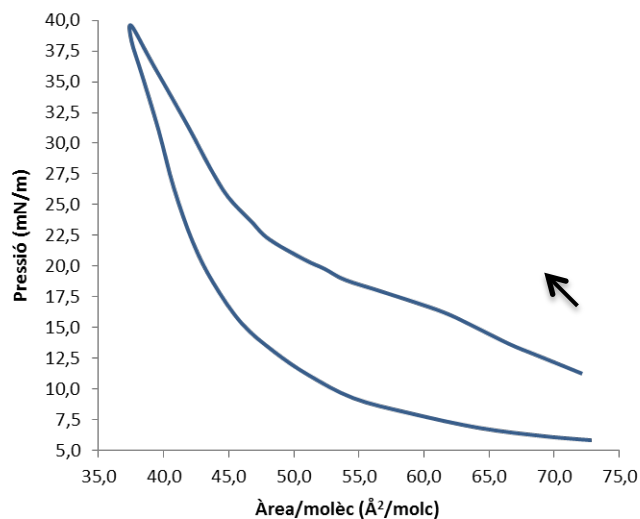


Figura 36. Isotherma de pressió superficial/àrea de la barreja fotoestacionaria del compost **14** a 25°C sobre PB 0,05 M a pH=7,0.

Les imatges de BAM van mostrar que, en anar comprimint, els nuclis observats inicialment s'anaven transformant en dominis més extensos fins que al final es formava la fase sòlida (Figura 37).

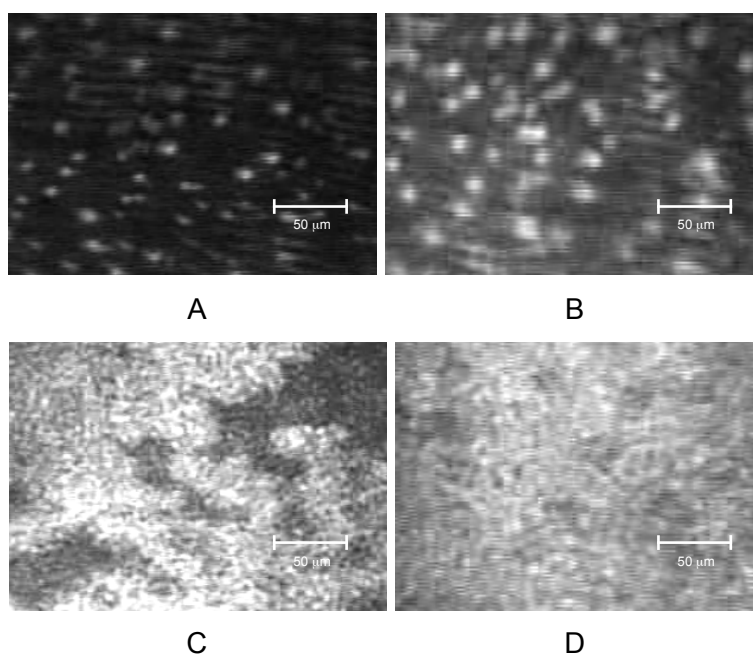


Figura 37. Imatges de BAM de la monocapa de Langmuir de la barreja fotoestacionària del compost **14** a 25°C sobre PB 0,05M a pH=7,0. Pressió superficial: A) 12,03 mN/m, B) 17,56 mN/m, C) 22,44 mN/m, D) 38,72mN/m.

3.3.5 *Monocapes de Langmuir del compost 13 en la seva forma monoaniònica.*

En el cas del compost amfifílic **13**, que té el monoanió de l'HABA com a grup polar, al comprimir la monocapa es va començar a observar un canvi de fase a una pressió superficial de 6 mN/m (Figura 38). Les imatges BAM (Figura 39) no van mostrar cap tipus de domini abans d'aquesta pressió, però a pressions superfícials més elevades es van començar a observar uns dominis amb forma d'agulla que s'anaven fent més llargs i després s'ajuntaven costat a costat formant feixos d'agulles en paral·lel. Aquests dominis van anar creixent el nombre i superfície fins a ocupar pràcticament tota la cubeta (fase sòlida) quan la pressió superficial era de 9,9 mN/m, just abans de que col·lapsés la monocapa

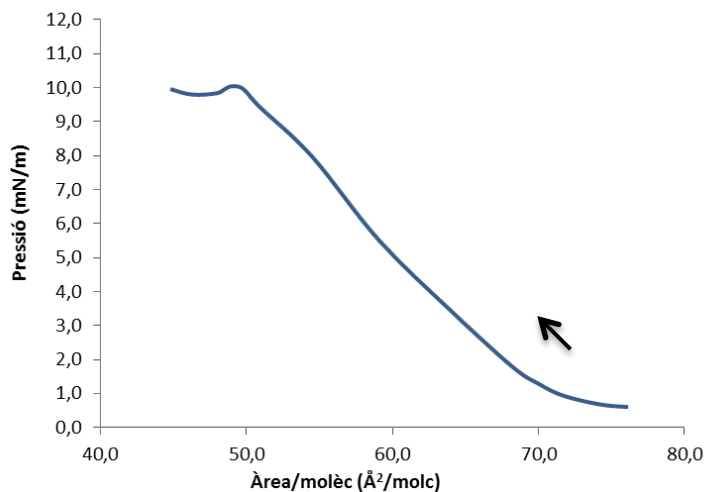


Figura 38. Isoterma de pressió superficial/àrea del compost **13** a 25°C sobre PB 0,05 M a pH=7,0

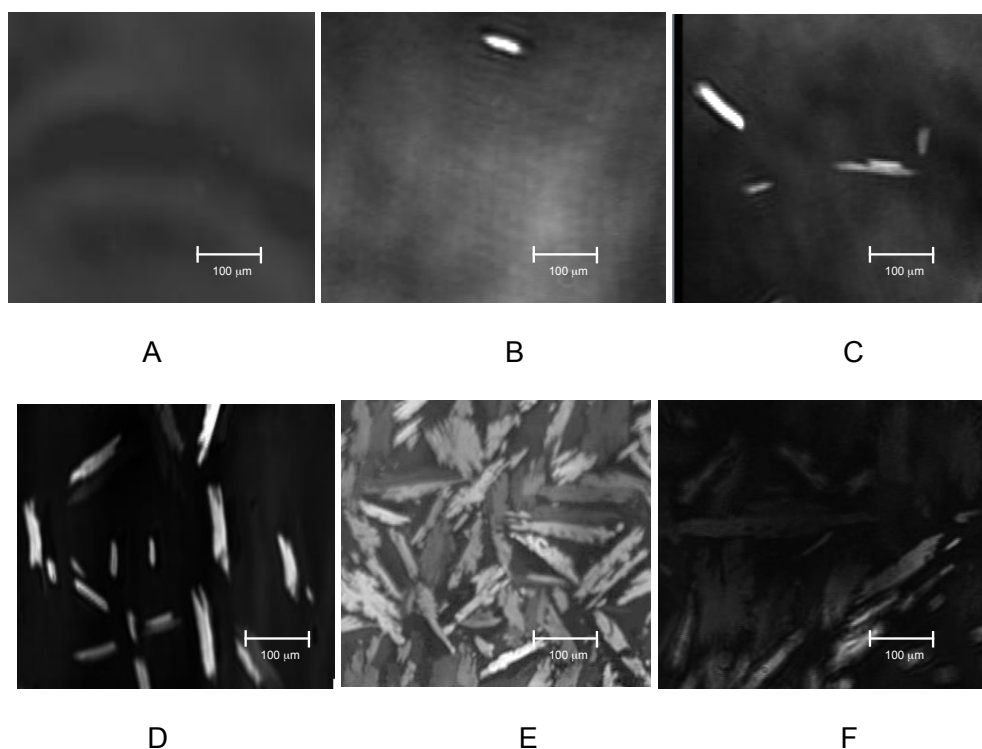


Figura 39. Imatges de BAM de la monocapa de Langmuir del compost **13** a 25°C sobre PB 0,05M a pH=7,0. Pressió superficial: A) 0,8 mN/m, B) 6,0 mN/m, C) 6,8 mN/m D) 9,0 mN/m E) 9,9 mN/m, F) 10,1 mN/m

La forma d'aquest dominis suggereix que, dins d'un mateix domini, l'estructura és molt ordenada, formant una espècie de cristall bidimensional.

Aquests estructures en forma d'agulla no les havíem observat en cap dels dos isòmers (*E* i *Z*) del compost model **14**. Aquest diferent comportament sembla que ha de ser degut a que el compost amfifílic **13** pot experimentar la tautomeria azo/hidrazona mentre que el compost **14** no pot experimentar tautomeria. El

compost **14** té una estructura de tipus azo, mentre que el compost **13** pot tenir les dues estructures (TA i TH) en equilibri. Si els cristalls 2D en forma d'agulla del compost **13** fossin deguts al TA, molt probablement també els hauríem d'observar en el compost **14** que també té estructura azo. Com que el compost **14** no presenta aquests cristalls 2D, sembla que en el compost **13** han de ser deguts al seu TH.

A continuació es va estudiar si era possible detectar la isomerització *E/Z*, a partir d'algun canvi en la pressió superficial o en les imatges de BAM, en irradiar a 365 nm una monocapa del compost **13** parcialment comprimida.

Per això, es va comprimir una monocapa de Langmuir del compost **13** fins arribar a una pressió de 5 mN/m. En aquest punt es va aturar la compressió i es va esperar 5 minuts, verificant que la pressió es mantingués estable. Aleshores es va irradiar 5 minuts a 365 nm però no es va observar cap canvi ni en la pressió ni en les imatges de BAM. Aquest resultat sembla indicar que en aquesta monocapa de Langmuir tenim majoritàriament el TH del compost **13**, ja que aquest no pot experimentar isomerització *E/Z*. Si tinguéssim predominantment el TA caldria esperar algun canvi en la pressió superficial o en les imatges de BAM en irradiar la monocapa.

El predomini del TH en la monocapa de Langmuir del compost **13** concorda amb el comportament del monoanió de l'HABA en solució. Per al monoanió de l'HABA en medi aquós només es detecta TA, però la posició de l'equilibri tautomèric és molt sensible a la polaritat del medi i a la introducció de substituents en l'anell hidroxifenílic. Així, quan es disminueix lleugerament la polaritat del medi (per exemple, al passar a un medi etanòlic) o quan s'introdueixen substituents alquílics en les posicions 3' i 5' de HABA ja passem a tenir els dos tautòmers en equilibri. Els càlculs teòrics realitzats en el grup del Prof. F. J. Luque¹³¹ van indicar que en medi apolar el TH és molt més estable que el TA, però la diferència d'energia entre els dos tautòmers es redueix dràsticament en augmentar la polaritat del medi. En medi d'octanol encara és més estable el TH, però en medi aquós ja passa a ser lleugerament més estable el TA. Com que en medi aquós la diferència d'energia entre TA i TH és petita, es comprensible que petits canvis ja desplacin l'equilibri tautomèric i facin que canviï el tautòmer predominant.

Tornant al compost amfifílic **13**, aquest té un substituent alquílic en posició 3' de l'HABA que afavoreix la formació del TH. Per altra banda, en la monocapa en fase gas els grups HABA estan bastant separats i es pot considerar que estan en un entorn hidrofílic. Però en comprimir la monocapa i passar a una fase líquida, els grups HABA ja queden molt més a prop els uns dels altres i, segons com quedin

disposats en la interfície, podrien crear-se mútuament un entorn més hidrofòbic que encara afavorís més la formació del TH. Finalment, en augmentar la compressió de la monocapa, els grups HABA passarien a estar tant a prop el uns dels altres que ja podrien formar-se interaccions per pont d'hidrogen intermoleculars, entre el grup carboxilat d'una molècula i els NH del grup hidrazona de les molècules veïnes. L'existència d'una xarxa d'interaccions per pont d'hidrogen que unís els grups polars del compost amfifílic podria explicar la formació d'estructures tant ordenades com els cristalls 2D observats en les imatges de BAM.

Cal remarcar que tant el compost amfifílic **13** com el **14** tenen en la cadena un grup amida amb capacitat de formar interaccions per pont d'hidrogen intermoleculars. Però la presència d'aquest grup amida sol no és suficient per a generar les estructures altament ordenades dels cristalls 2D, ja que el compost **14** no les forma. Cal la presència simultània dels grups carboxilat i hidrazona en el grup HABA del compost **13** per a formar els cristalls 2D en la monocapa. Ara bé, una vegada formada aquesta xarxa d'interaccions per pont d'hidrogen entre els grups HABA, els grups amida de les cadenes podria ser que contribuïssin a estabilitzar-la formant també interaccions per pont d'hidrogen entre cadenes veïnes.

Finalment es va preparar una monocapa de Langmuir del compost **13** i, quan la pressió superficial era de 5,0 mN/m, es va injectar a la subfase aquosa una quantitat equivalent d'Av (en subunitats). Després d'esperar 30 minuts, per assegurar que l'Av es pogués difondre i arribar a la interfície, no es va observar cap canvi en la pressió superficial. Si l'Av s'hagués unit a la monocapa hauríem d'haver observat un augment de pressió considerable, ja que llavors el grup polar del compost amfifílic seria la pròpia Av, que té una àrea superficial/molècula molt superior a la de l'HABA. Com que això no va succeir, podem concloure que l'Av no pot unir-se als grups HABA de la monocapa quan aquesta monocapa ja estava parcialment comprimida fins a un estadi de compressió lleugerament inferior al que condueix a la formació de cristalls 2D. L'empaquetament relativament elevat dels grups HABA dificulta que es puguin introduir en els llocs d'unió de l'Av.

**4 PREPARACIÓ DE SAMs MIXTES D'UN DERIVAT DE L'HABA
SOBRE SUBSTRAT D'OR I ESTUDI DE LA SEVA INTERACCIÓ
AMB AVIDINA.**

4.1 Elecció del substrat, tipus de SAM i del grup terminal que ha d'interaccionar amb l'avidina.

Es va escollir utilitzar un substrat d'or degut a que és un metall bastant inert, que s'uneix a tiols i disulfurs amb elevada afinitat i que les seves SAMs són estables durant períodes llargs. A més és un tipus de substrat que es pot utilitzar en una sèrie de tècniques espectroscòpiques i analítiques com ara l'el·lipsometria, les microbalances de cristall de quars (QCM), *Surface Plasmon Resonance* (SPR), *Reflection Absorption Infrared Spectroscopy* (RAIRS) i la voltamperometria cíclica.¹³⁷

Tal com s'ha indicat a la introducció, la gran majoria de SAMs preparades per a immobilitzar (S)Av ho fan mitjançant la interacció amb Bt. Generalment es preparen SAMs mixtes en que un dels components té una cadena més llarga i Bt com a grup terminal. L'altre component, de cadena més curta, té a l'extrem grups etilenglicol per tal d'evitar l'adsorció no específica de (S)Av o altres biomolècules. El component de cadena curta permet que un lligand es pugui unir específicament a la proteïna sense que hi hagi impediment estèric degut als lligands veïns. Per tant, es va optar per preparar SAMs mixtes a partir de dos tiols (o disulfurs), un que tingués un lligand d'Av com a grup terminal i l'altre sense aquest lligand però amb grups etilenglicol (EG)_n a l'extrem de la cadena.

El fet que el lligand utilitzat per a immobilitzar (S)Av sigui la Bt fa que la unió sigui molt forta i pràcticament irreversible. Aquest caràcter irreversible fa que els errors de construcció no siguin autoreparables. En canvi, si el lligand utilitzat per immobilitzar (S)Av tingués una afinitat lleugerament inferior, els errors de construcció serien en principi autoreparables.

En el nostre grup estem interessats en la utilització de lligands de (S)Av de menor afinitat que la Bt en la immobilització de (S)Av a superfícies. En aquest sentit, els lligands derivats de la propandiurea (PDU) i els derivats de l'HABA (vegeu apartat 1.2) semblen molt interessants. Tenen afinitats per l'Av de l'ordre de 10^5 a 10^7 M⁻¹ quan actuen com a lligands monovalents. Però quan l'Av s'uneix a una superfície, dos dels quatre llocs d'unió poden ser ocupats pels lligands units a la superfície donant lloc a un complex de tipus divalent. Aquest caràcter divalent fa que la unió de l'Av a la superfície pugui ser més robusta, amb afinitats variis ordres de magnitud superiors a les dels corresponents complexos monovalents. Quan una SAM mixta que contingui lligands de tipus HABA o PDU es submergeixi en una solució d'Av, inicialment es formaran complexos monovalents i divalents, però degut

a la reversibilitat de la complexació, molècules d'Av unides inicialment de forma monovalent, amb el temps passaran a estar unides de forma divalent. En aquesta reordenació de la monocapa hi ha la possibilitat de que els errors d'autoassemblatge s'autoreparin, cosa que no podria passar si el lligand fos Bt (Figura 40).

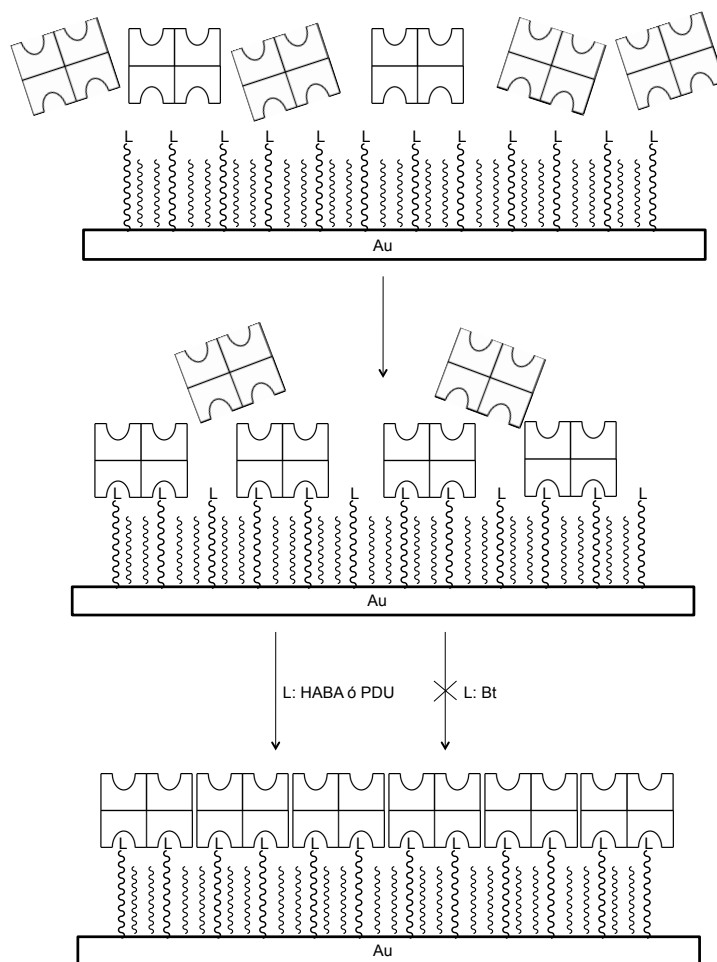


Figura 40. Procés d'autoreparació dels errors de construcció

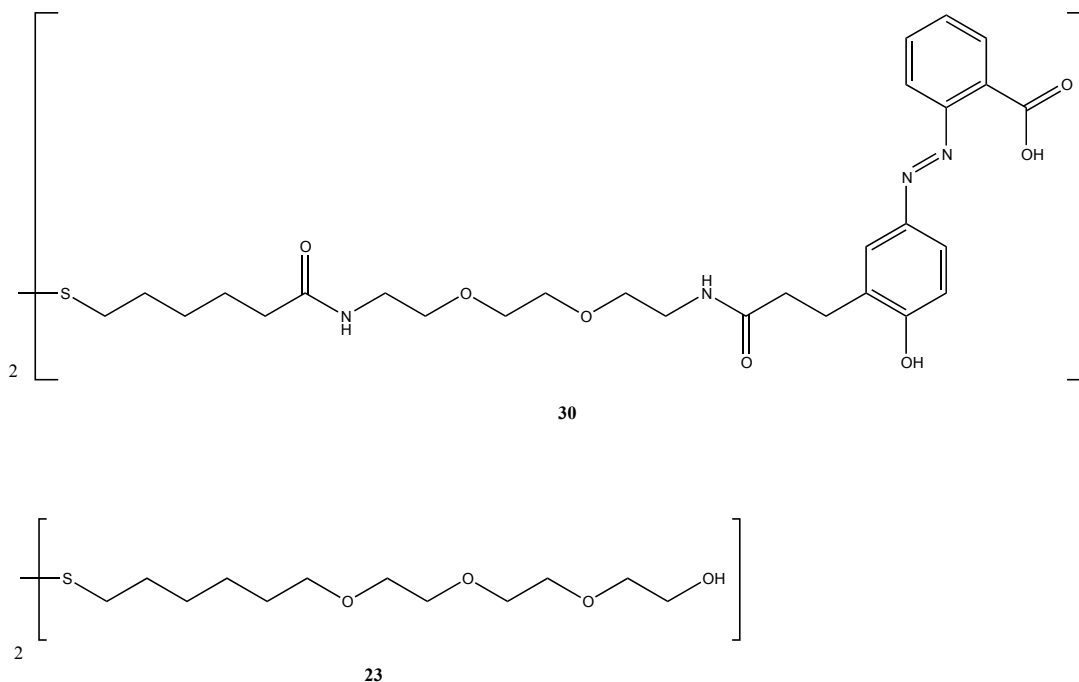
A part de les diferències en quant a afinitat per l'Av, els lligands de tipus PDU i HABA en presenten d'altres que són més rellevants. La utilització de l'HABA té l'avantatge de que és un cromòfor i pot experimentar una major varietat de processos químics (isomerització E/Z, tautomeria azo/hidrazona, redox, etc). Si s'utilitzés l'HABA com a lligand terminal sobre un substrat d'or, les condicions de formació de la SAM mixta i de la seva interacció amb l'Av es podrien optimitzar mitjançant tècniques electroanalítiques. Però tindria la limitació de que la reducció de l'HABA és un procés irreversible, en el qual el grup azobenzè es descomposa. Malgrat aquesta limitació, es va optar per utilitzar un lligand derivat de l'HABA en la

preparació de les SAMs d'Av, ja que les tècniques electroanalítiques només les utilitzaríem en la optimització de les condicions de formació de les SAMs mixtes i la seva interacció amb Av.

4.2 Síntesi dels dos components de la SAM mixta

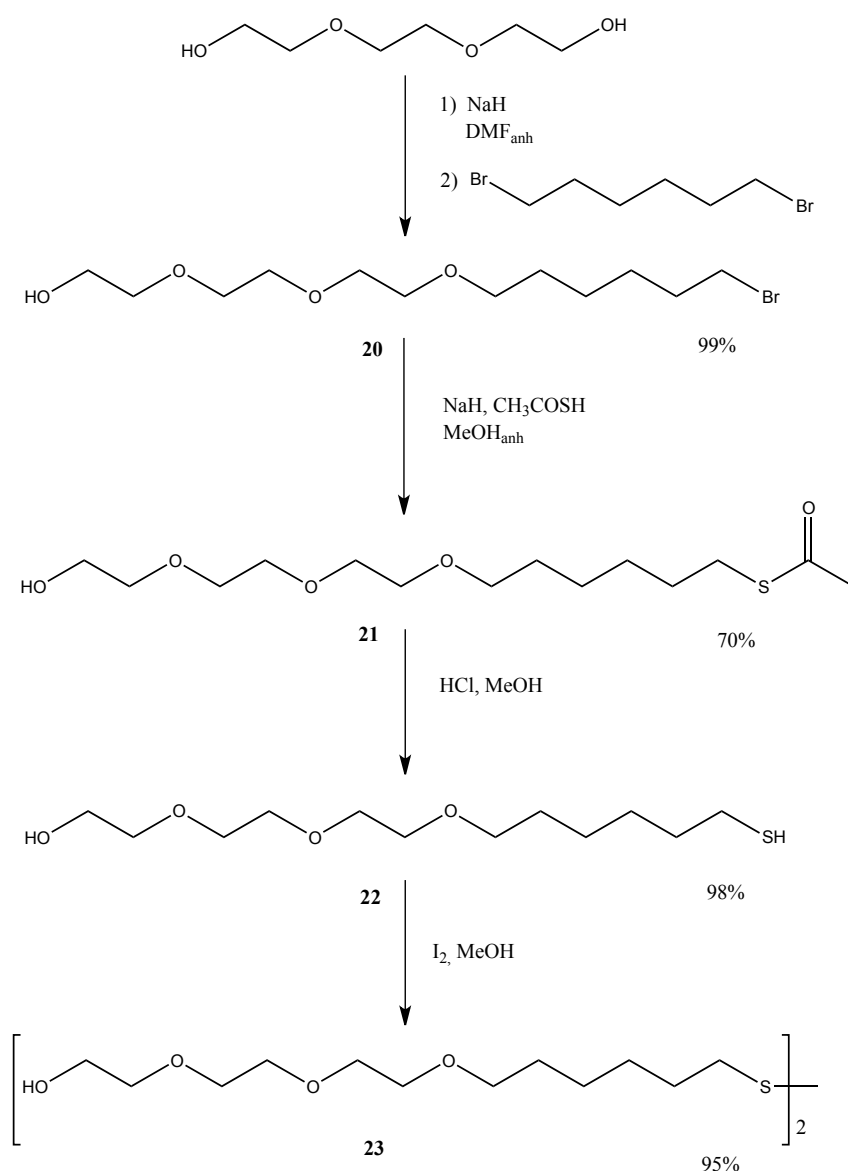
Tal com ja hem dit, els dos components de la SAM mixta es poden incorporar al substrat d'or en forma de tiol o bé en forma de disulfur. Es va optar per preparar els disulfurs ja que, a diferència dels tiols, són molt més estables en front a l'oxidació per l'aire i és més fàcil conservar-los en estat pur.

En el disulfur que té el lligand HABA com a grup terminal (compost **30**), la unió de la cadena a l'HABA es va fer a través de la posició 3' de l'HABA, ja que així pot experimentar la tautomeria azo/hidrazona. A més, es conegut que la substitució alquíllica en les posicions 3' i 5' de l'HABA augmenta la seva afinitat per (S)Av. Entre el grup HABA i la cadena alquíllica s'hi va intercalar un espaiador hidrofílic derivat de l'etilenglicol. Aquest compost ja havia estat sintetitzat en el nostre grup per la Rosa Olivas,¹³⁸ però en aquesta tesi s'ha seguit una ruta sintètica lleugerament diferent que parteix de l'àcid 6-acetiltiohexanoic i millora bastant el rendiment global. En l'altre disulfur (compost **23**) la cadena alquíllica està unida a un grup trietilenglicol (Esquema 15) per tal d'evitar l'adsorció no específica de proteïnes.



Esquema 15. Disulfurs **30** i **23** utilitzats en la preparació de les SAMs mixtes.

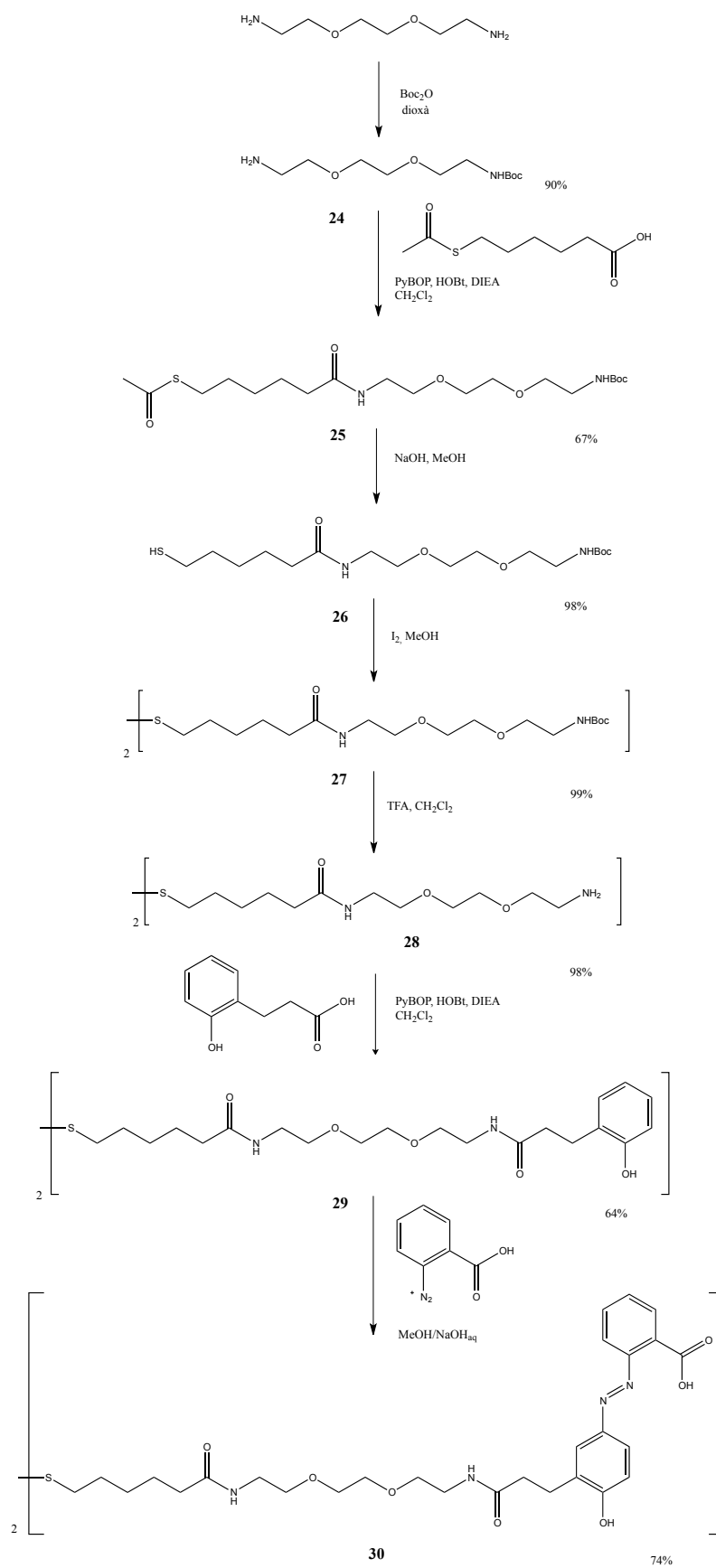
La síntesi del disulfur de cadena curta (**23**, Esquema 16) va començar amb la monoalquilació del trietilenglicol amb 1,6-dibromohexà que va proporcionar l'èter **20** amb un rendiment del 99%. A continuació en compost **20** es va fer reaccionar amb tioacetat de sodi per formar el tioèster **21** amb un rendiment del 70%. Aquest tioèster (**21**), per reacció amb HCl/MeOH, va generar el tiol **22** amb un rendiment del 98%. Finalment el tiol **22** es va oxidar amb iode, obtenint-se el disulfur **23** amb un 95% de rendiment.



Esquema 16.

Per sintetitzar el disulfur **30** (Esquema 17) en primer lloc es va monoprotegir amb el grup Boc el 1,8-diamino-3,6-dioxaoctà. A continuació l'amina **24** es va acoblar amb l'àcid 6-acetiltiohexanoic amb PyBOP, HOBT i DIEA per obtenir l'amida **25** amb un 67% de rendiment. Seguidament es va desprotegir el grup tiol amb hidròxid de sodi en metanol obtenint-se el tiol **26** amb un 98% de rendiment. Aquest tiol (**26**) es va oxidar amb iode per obtenir el disulfur corresponent (**27**) amb un rendiment del 99%.

Tot seguit es va desprotegir el grup amino amb TFA en diclorometà, obtenint-se l'amina **28** amb un 98% de rendiment. A continuació, l'amina **28** es va acoblar amb l'àcid 3-(2-hidroxifenil)propanoic amb PyBOP, HOBT i DIEA per obtenir l'amida **29** amb un rendiment del 64%. Finalment, l'amida **29** es va fer reaccionar amb la sal de diazoni de l'àcid antranílic per obtenir el disulfur **30** amb un 74% de rendiment.



Esquema 17.

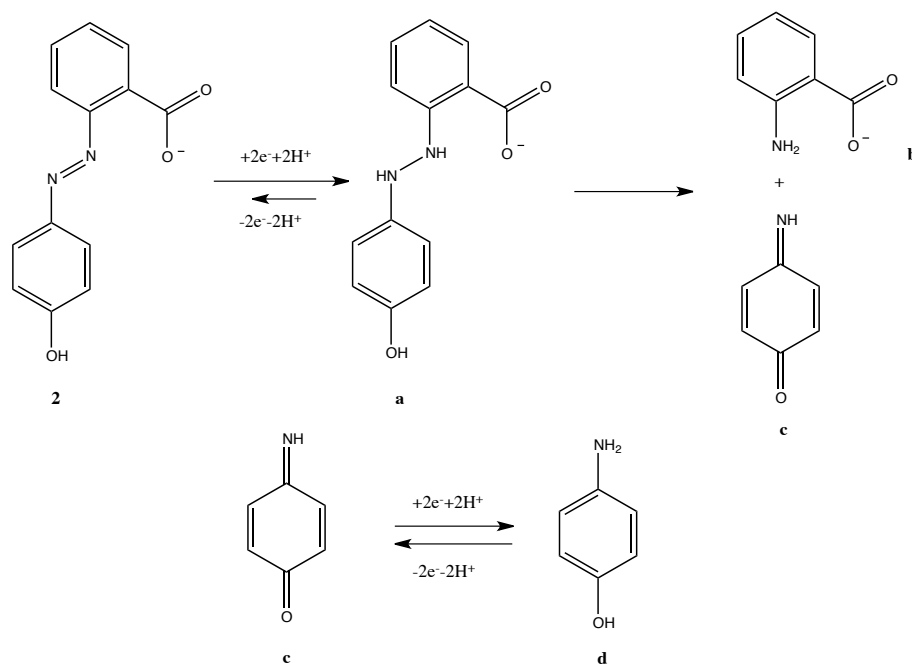
4.3 Estudis previs sobre la reducció electroquímica d'azobenzens en solució.

La reducció electroquímica de l'azobenzè, del 4-hidroxiazobenzè¹³⁹ i inclús de l'HABA¹⁴⁰ ja ha estat descrita, però les condicions experimentals utilitzades són diferents de les que farem servir per estudiar les SAMs. És conegut que el grup azo és un dels més fàcilment reduïbles mitjançant tècniques electroquímiques, de manera que en sistemes complexos amb diversitat de grups funcionals, un dels quals sigui l'azo, el primer pic de reducció correspondrà quasi sempre a la reducció del grup azo.^{139,140}

En absència de donadors de protons, per exemple en DMF, el azobenzè experimenten dues etapes de reducció mono-electròniques. En la primera etapa es forma l'anió radical mentre que en la segona etapa es forma el dianió. El sistema azobenzè/hidrazobenzè és un dels pocs parells redox orgànics que es comporten de manera reversible o quasi reversible al ser estudiats per voltamperometria cíclica.¹⁴²⁻¹⁴³ En presència d'un donador de protons, la reducció bielectrònica de l'azobenzè dona lloc a l'hidrazobenzè el qual pot continuar reduint-se en una reacció que globalment és tetraelectrònica, amb trencament de l'enllaç nitrogen-nitrogen.¹⁴²

En el cas del 4-hidroxiazobenzè s'observa una reducció tetraelectrònica que comporta el trencament de l'enllaç nitrogen-nitrogen. El mecanisme proposat implica una reducció bielectrònica fins al corresponent hidrazobenzè, el qual experimenta un trencament de l'enllaç N-N donant lloc a la corresponent amina aromàtica i a la monoimina de la *p*-benzoquinona. Finalment, aquesta imina experimentaria una reducció bielectrònica per donar el 4-aminofenol.¹⁴²

Està descrit que la reducció electroquímica de l'HABA, amb elèctrode de grafit en medi aquós tamponat a pH=7,0, condueix també a un trencament similar de l'enllaç azo donant com a productes el 4-aminofenol i l'àcid antranílic (Esquema 18). El pic de reducció de l'HABA a pH=7,0 apareix a $E_p = -525\text{mV}$ (respecte calomelans), però es desplaça a $E_p = -600\text{mV}$ quan el pH es de 8,2.¹⁴⁰



Esquema 18. Mecanisme proposat per a la reducció electroquímica de l'HABA¹⁴⁰

4.4 SAMs del compost 30 sobre or.

4.4.1 Voltamperometria cíclica en medi PB a pH=7

En primer lloc es va formar una SAM del compost **30** sobre un elèctrode d'or policristal·lí, submergint aquest elèctrode durant 20 minuts en una solució 0,47 mM del disulfur **30** en etanol. Tot seguit es va utilitzar aquest elèctrode per caracteritzar la SAM que conté, emprant voltamperometria cíclica en medi de PB 100 mM a pH=7,0.

El voltamperograma (Figura 41) va mostrar els mateixos pics que l'HABA (2) en solució però a uns potencials una mica diferents. Es va observar un pic de reducció (Ic) a -315 mV corresponent a la reducció del grup azo i també de la monoimina de la *p*-benzoquinona (c, Esquema 18) per donar el 4-aminofenol (d, Esquema 18) i l'àcid antranílic (b, Esquema 18). En invertir el sentit d'escombrat cap a potencials positius es va observar un pic d'oxidació (IIa) a +25 mV, corresponent a l'oxidació del 4-aminofenol cap a la monoimina de la *p*-benzoquinona. En tornar a invertir el sentit d'escombrat cap a potencials negatius es va observar un pic de reducció (IIc) a -65 mV corresponent a la reducció de la monoimina de la *p*-benzoquinona cap al 4-aminofenol.

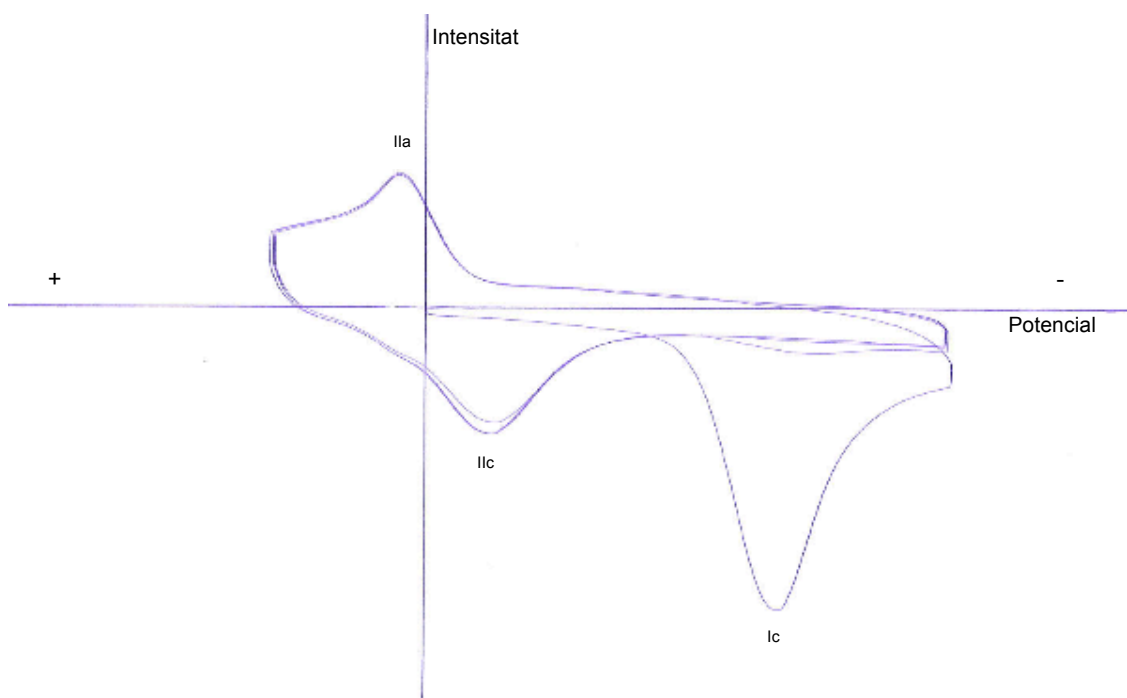
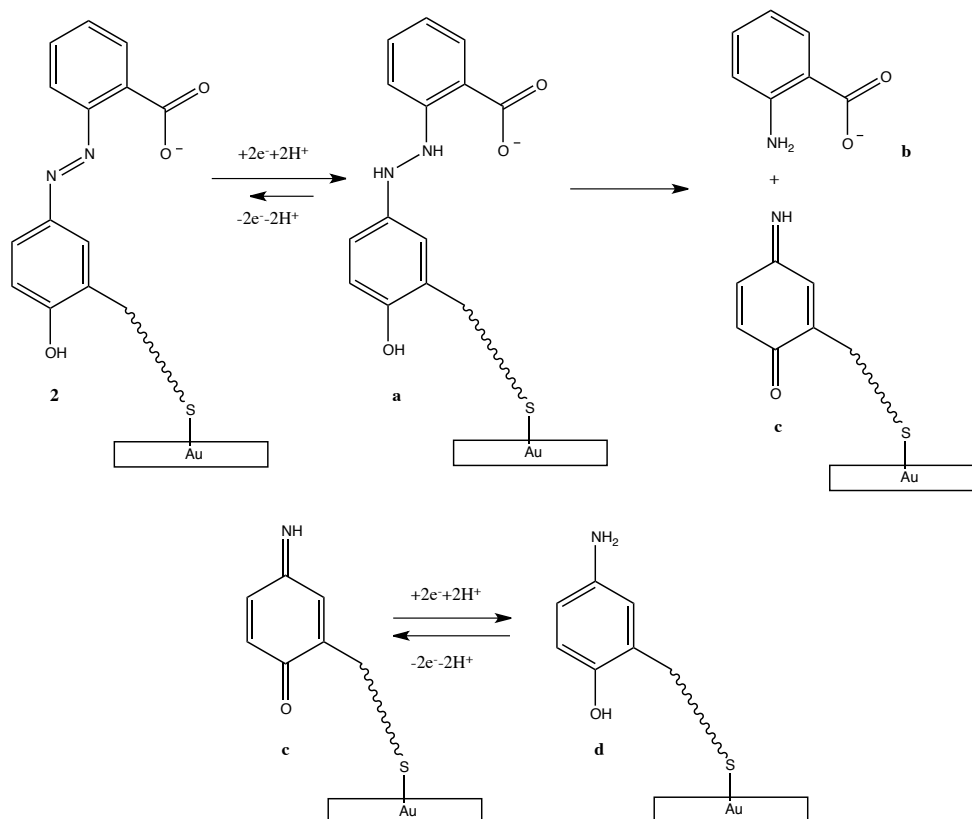


Figura 41. Voltamperometria cíclica d'una SAM del compost **30**, sobre or policristal·lí en PB 100 mM a pH=7,0. Velocitat d'escombrat 100 mV/s.

La reducció del grup azo (Ic) és un procés irreversible, mentre que el parell redox aminofenol/monoimina de la *p*-benzoquinona (pics Ila/Ilc), que ara resten units a l'elèctrode a través de la posició *orto* respecte de l'hidroxil fenòlic, constitueixen un parell redox quasi-reversible. En fer varis escombrats de potencial cíclics es veu com el pic Ic només s'observa en el primer cicle, mentre que el parell redox Ila/Ilc no desapareix del voltamperograma, ni tan sols bombollejant Ar per la solució, cosa que demostra que el grup *p*-aminofenol resta unit a l'elèctrode (Figura 41).

Anant cap a potencials més negatius que el pic (Ic) de reducció del grup azo hauríem de trobar el pic corresponent a la reducció de l'enllaç S-Au, però a pH neutre la descàrrega d'hidrogen s'hi solapava.



Esquema 19. Mecanisme per a la reducció electroquímica de l'HABA en una SAM del compost **30**.

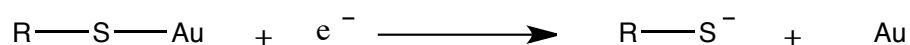
Quan es comença fent un escombrat cap a potencials positius s'observa l'oxidació irreversible de l'HABA superposada amb l'oxidació de l'or, i en invertir l'escombrat cap a potencials negatius s'observa la reducció dels òxids d'or formats en l'escombrat anterior. Per tant, com que el pic de reducció del grup azo (Ic) no apareix superposat a altres processos, es va escollir aquest pic per caracteritzar les SAMs mixtes i la seva interacció amb l'Av.

Les diferències en els potencials dels pics I i II entre l'HABA (**2**) en solució i la SAM del compost **30** podrien ser degudes a diferents factors: el compost **30** té un substituent alquílic en la posició 3' que l'HABA no té, i que modifica l'equilibri tautomèric azo/hidrazona; en la SAM del compost **30** l'empaquetament compacte dels grups terminals HABA podria afectar a la seva conformació i també a la posició de l'equilibri tautomèric azo/hidrazona.

4.4.2 Voltamperometria cíclica en medi KOH 500mM

Per tal de poder detectar els pics de reducció de l'enllaç S-Au i poder determinar la quantitat de disulfurs que s'han unit a la superfície d'or s'ha de desplaçar el pic de descàrrega d'hidrogen cap a potencials més negatius. Això s'aconsegueix treballant en un medi de KOH 500mM.

Es va preparar una SAM del compost **30** submergint durant 5 minuts l'elèctrode d'or en una solució 0,47mM del compost **30** en etanol. Tot seguit es va analitzar mitjançant voltamperometria cíclica en medi de KOH 500mM i es va detectar un primer pic de reducció (Ic) a -920mV (Figura 42). Aquest pic correspon a la reducció del grup azo i surt a potencials més negatius que en PB a pH=7,0. Això és degut principalment a que a pH=7,0 tenim el grup terminal HABA en forma de monoanió, mentre que en el medi fortament bàsic de KOH 500M tenim el grup HABA en forma de dianió, i aquest és més difícil de reduir (cal un potencial més negatiu) que el monoanió. També la menor concentració de protons en medi fortament bàsic pot contribuir a aquest desplaçament del pic de reducció cap a potencials més negatius. Continuant l'escombrat cap a potencials més negatius es van observar dos pics més (IIc i IIIc) a -1125mV i -1165mV respectivament, corresponents a la reducció de l'enllaç S-Au. Els dos pics es poden atribuir a les diferents cares de l'or policristal·lí a les quals estan units els àtoms de sofre (Figura 42). La reducció de l'enllaç S-Au provoca la desorció del tiol segons l'equació següent:



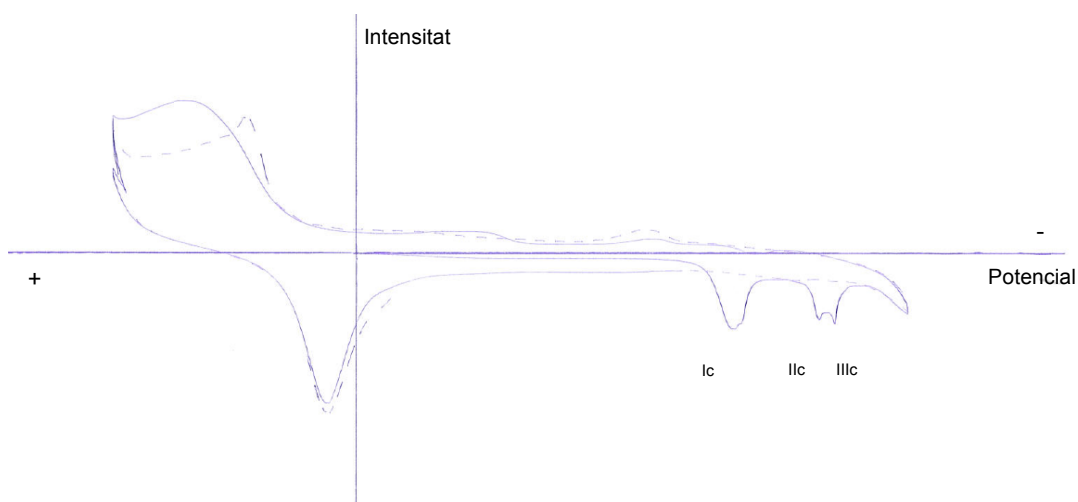


Figura 42. Voltamperometria cíclica d'una SAM del compost **30**, sobre or policristal·lí en KOH 500 mM. Velocitat d'escombrat 100 mV/s.

4.4.3 Cinètica de formació de la SAM

Es van preparar consecutivament diferents SAMs del compost **30** sobre el mateix elèctrode d'or. Totes aquestes SAMs es van preparar submergint l'elèctrode en la mateixa solució 3,75 μM del disulfur **30** en etanol, durant un temps determinat que va ser diferent per a cada SAM. A continuació, per a cada SAM es va enregistrar el seu voltamperograma, es va determinar l'àrea global dels pics (II_c i III_c) de reducció de l'enllaç S-Au, i es va calcular la càrrega associada a aquesta reducció. Aquesta càrrega, dividida per l'àrea de l'elèctrode d'or, ens va donar la densitat de càrrega per a cada SAM. La representació de la densitat de càrrega de cada SAM en funció del temps d'immersió de l'elèctrode en la solució de disulfur **30** és una mesura de la cinètica de la formació de la SAM.

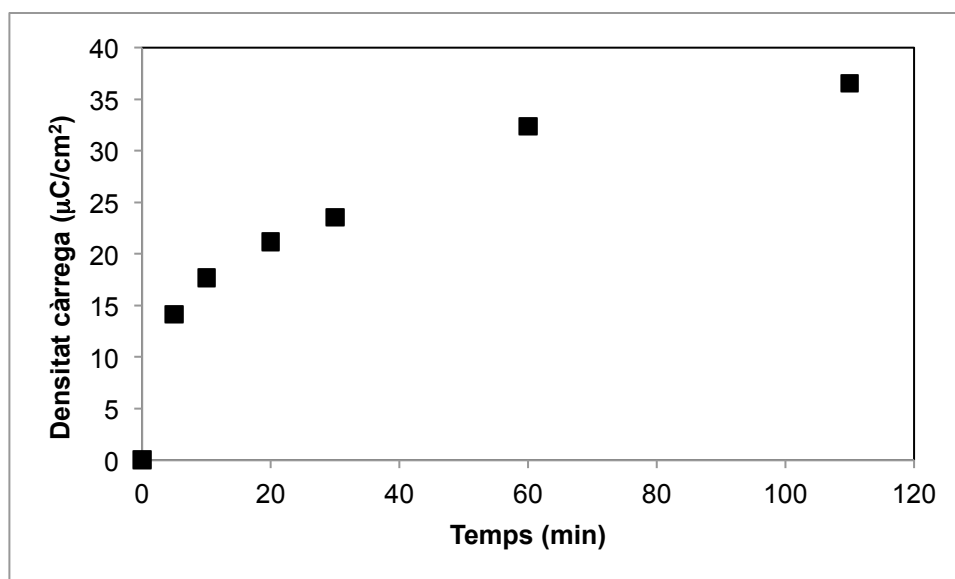


Figura 43. Cinètica de formació d'una SAM del compost **30** sobre or. Densitat de càrrega associada al trencament de l'enllaç S-Au en funció del temps d'immersió en una solució $3,75 \mu\text{M}$ del disulfur **30** en etanol.

Els resultats de la figura 43 indiquen que, utilitzant una solució de disulfur **30** de concentració $3,75 \mu\text{M}$, el temps d'immersió de l'elèctrode per obtenir un recobriment màxim podria ser una mica superior a les 2 h, però que amb 1 h ja s'obté un bon recobriment.

4.4.4 Determinació de la densitat superficial de grups HABA i de l'àrea superficial per cadena amb HABA terminal

A la figura 43 s'indica que en la SAM de major recobriment la densitat de càrrega associada a la reducció de l'enllaç S-Au és de $37 \mu\text{C}/\text{cm}^2$. Considerant que aquest procés de reducció és monoelectrònic, es dedueix que aquesta SAM té una densitat superficial de $2,3 \times 10^{14}$ grups HABA/ cm^2 . Això equival a una àrea superficial de 43 \AA^2 per cada cadena amb HABA terminal. Si comparem l'àrea superficial d'una cadena d'alcantiol amb HABA terminal (S—HABA) en la SAM amb els valors que apareixen en la isoterma de Langmuir del compost amfifílic anàleg (**13**) veurem la SAM és més compacte que la monocapa de Langmuir. Aquest resultat és raonable si consideren que la SAM s'ha format a partir del disulfur **30** neutre en solució etanòlica, mentre que en la monocapa de Langmuir el compost **13** estava en forma de monoanió. En comprimir la monocapa de Langmuir, la repulsió dels grups polars aniònics fa que no es puguin assolir àrees superficials/HABA molt baixes sense provocar el col·lapse de la monocapa. En canvi en la SAM es poden assolir àrees

superficials/HABA més baixes, es a dir major densitat superficial de grups HABA, ja que aquest grup no està ionitzat quan es forma la SAM i no experimenta repulsions electrostàtiques. No obstant, per determinar la densitat superficial de grups HABA, s'ha hagut de fer un voltamperograma de la SAM en medi de KOH 500mM, i en aquest medi el grup HABA hauria d'estar ionitzat. La fortalesa de l'enllaç S-Au probablement evita que es danyi la monocapa, però les interaccions electrostàtiques entre grups HABA ionitzats podrien afavorir que les cadenes de S—HABA⁻ en la SAM es reorganitzessin per intentar disminuir la repulsió electrostàtica.

4.5 SAMs del compost **23** sobre or.

4.5.1 Voltamperometria cíclica en medi KOH 500mM.

En primer lloc es va formar una SAM del compost **23** sobre l'elèctrode d'or policristal·lí, submergint aquest elèctrode durant 15 minuts en una solució 0,47mM del disulfur **23** en etanol. Primerament, es va comprovar que en medi aquós a pH 7,0, el pic de reducció corresponent al trencament de l'enllaç S-Au es solapava amb la descàrrega d'hidrogen i que, per tant, calia treballar en un medi fortament bàsic. Tot seguit es va tornar a preparar la SAM i es va caracteritzar emprant voltamperometria cíclica en medi KOH 500 mM. El voltamperograma (Figura 44) va mostrar un pic de reducció (I_c) a -1110 mV corresponent a la reducció de l'enllaç S-Au. El fet que el potencial de reducció de l'enllaç S-Au en la SAM del compost **23** sigui diferent del de la SAM del compost **30** ens permetrà caracteritzar i quantificar per separat ambdós components quan formin part de SAMs mixtes.

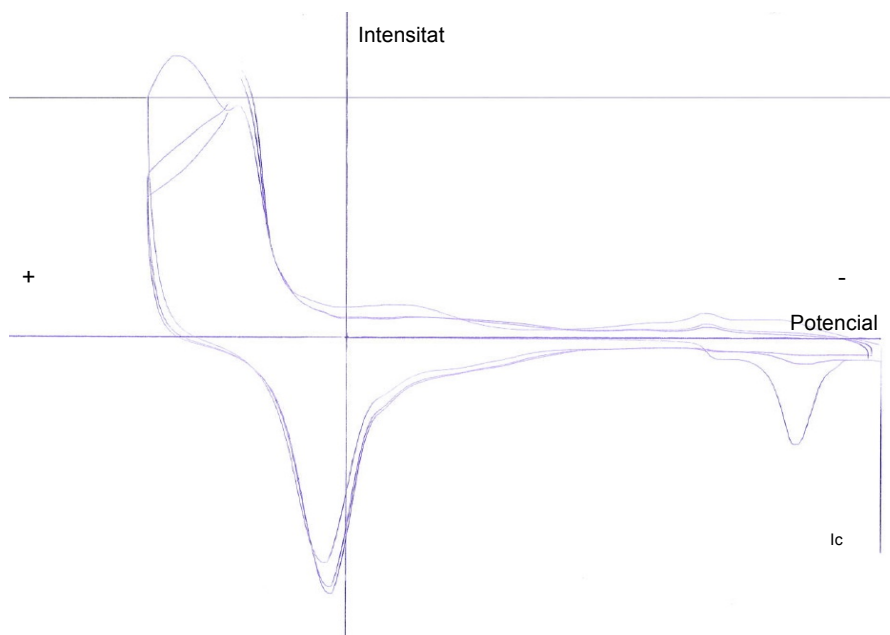


Figura 44. Voltamperometria cíclica d'una SAM del compost **23**, sobre or policristal·lí en KOH 500 mM. Velocitat d'escombrat 100 mV/s.

4.5.2 Cinètica de formació de la SAM.

Es va procedir de manera anàloga a la descrita per al compost **30** (apartat 4.4.3), però utilitzant en primer lloc una solució 1,1 mM del disulfur **23** en etanol per tal de preparar les diferents SAMs. A la figura 45 es representa la densitat de càrrega de cada SAM en funció del temps d'immersió de l'elèctrode en la solució de disulfur **23**.

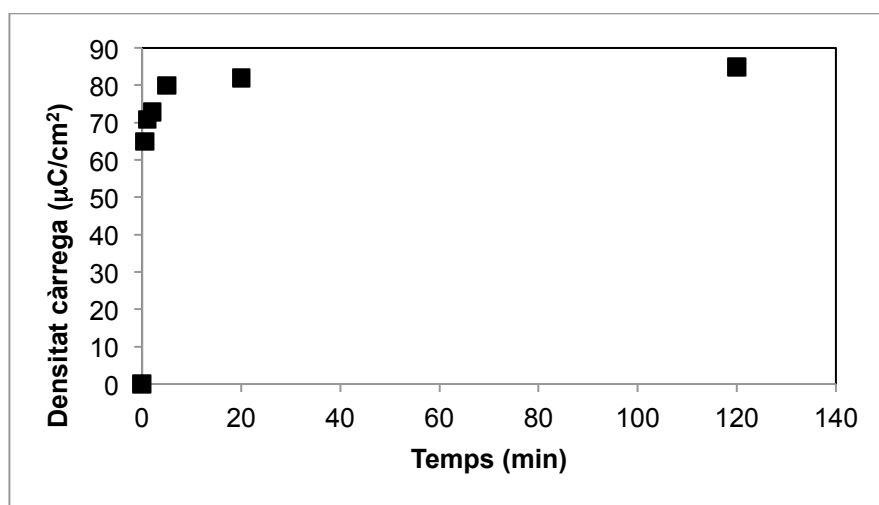


Figura 45. Cinètica de formació d'una SAM del compost **23** sobre or. Densitat de càrrega associada al trencament de l'enllaç S-Au en funció del temps d'immersió en una solució 1,1 mM del disulfur **23** en etanol.

A continuació es va repetir la cinètica però utilitzant ara una solució 1,1 μM del disulfur **23** en etanol per tal de preparar les diferents SAMs. A la figura 46 es representa la densitat de càrrega de cada SAM en funció del temps d'immersió de l'elèctrode en la solució de disulfur **23**.

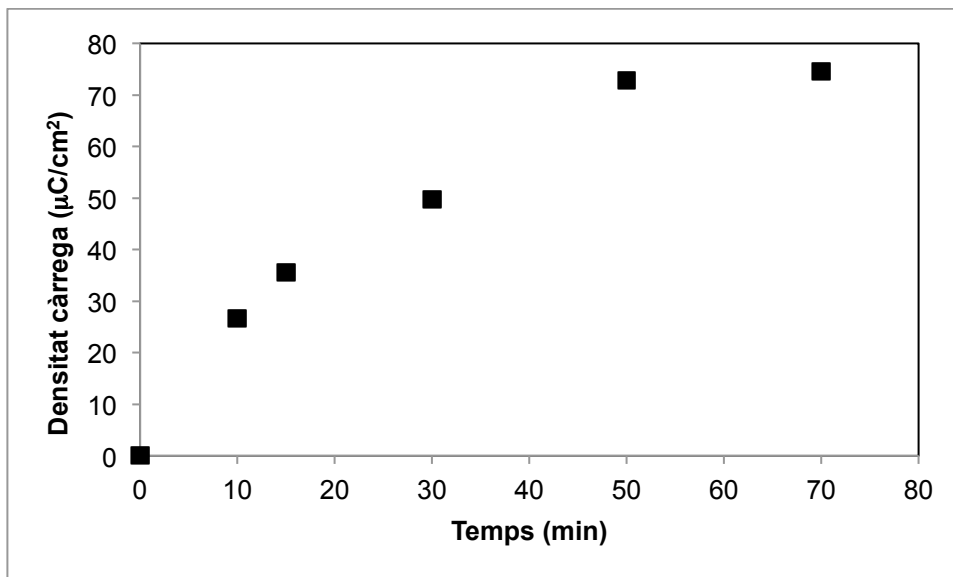


Figura 46. Cinètica de formació d'una SAM del compost **23** sobre or. Densitat de càrrega associada al trencament de l'enllaç S-Au en funció del temps d'immersió en una solució 1,1 μM del disulfur **23** en etanol.

A partir d'aquestes dades cinètiques es va deduir que, quan la concentració dels disulfurs **30** ó **23** en etanol és de l'ordre de μM , el temps d'immersió aconsellable és d'aproximadament 60 minuts. En canvi, si la concentració de disulfur **23** en etanol és de l'ordre de mM, el temps d'immersió es podria escurçar fins a aproximadament 10 minuts.

4.5.3 Determinació de la densitat superficial de grups trietilenglicol i de l'àrea superficial per cadena de trietilenglicol terminal.

En aquest cas, per preparar la SAM de màxim recobriment es va utilitzar una solució etanòlica de disulfur **23** de concentració 1,1 mM i s'hi va submergir l'elèctrode durant 2h. Tot seguit es va enregistrar el voltamperograma de la SAM en medi de KOH 500mM i es va mesurar la càrrega associada a la reducció dels enllaços S-Au, que va resultar ser de 18 μC . Com que la reducció d'un enllaç S-Au

és un procés monoelectrònic, això vol dir que la densitat superficial de era de $5,2 \times 10^{14}$ cadenes de trietilenglicol/cm². Això equival a una àrea superficial de 19 Å² per cada cadena de trietilenglicol terminal. Aquesta area superficial/EG és una mica menys de la meitat de la que presenten les cadenes de S—HABA (apartat 4.4.4).

4.6 SAMs mixtes dels compostos **30** i **23** sobre or.

Les SAMs mixtes es van preparar per immersió de l'elèctrode d'or en una solució que contenia els dos disulfurs (**30** i **23**) en una proporció determinada. En aquestes solucions, la concentració del disulfur **30** sempre va ser de 2,5 µM, mentre que la concentració del disulfur **23** es va anar variant. Es va optar per utilitzar solucions micromolars ja que amb les solucions milimolars l'adsorció dels disulfurs és bastant ràpida, i es va creure que alentint-la una mica afavoriríem la formació d'una SAM més ordenada. A més, una adsorció dels disulfurs una mica lenta dona temps a que les cadenes amb grup HABA terminal (S—HABA) i les cadenes amb grup trietilenglicol terminal (S—EG) es puguin reorganitzar una mica, abans que el grau de recobriment ja sigui elevat.

A partir dels voltamperogrames (per exemple el de la figura 47) es va determinar la càrrega associada a la reducció de tots els enllaços S-Au, i es va representar en funció del temps de formació de la SAM (Figura 50). Aquesta corba ens indica que amb un temps de 50 minuts l'adsorció de disulfurs sobre l'elèctrode d'or ja s'ha pràcticament completat.

Els potencials de reducció del grup HABA ($E_{pc,HABA}$) en les diferents SAMs mixtes estan indicats a la taula 7 i en la figura 52, (apartat 4.7.1) i es discuteixen en aquell apartat conjuntament amb els resultats de les SAMs d'Av.

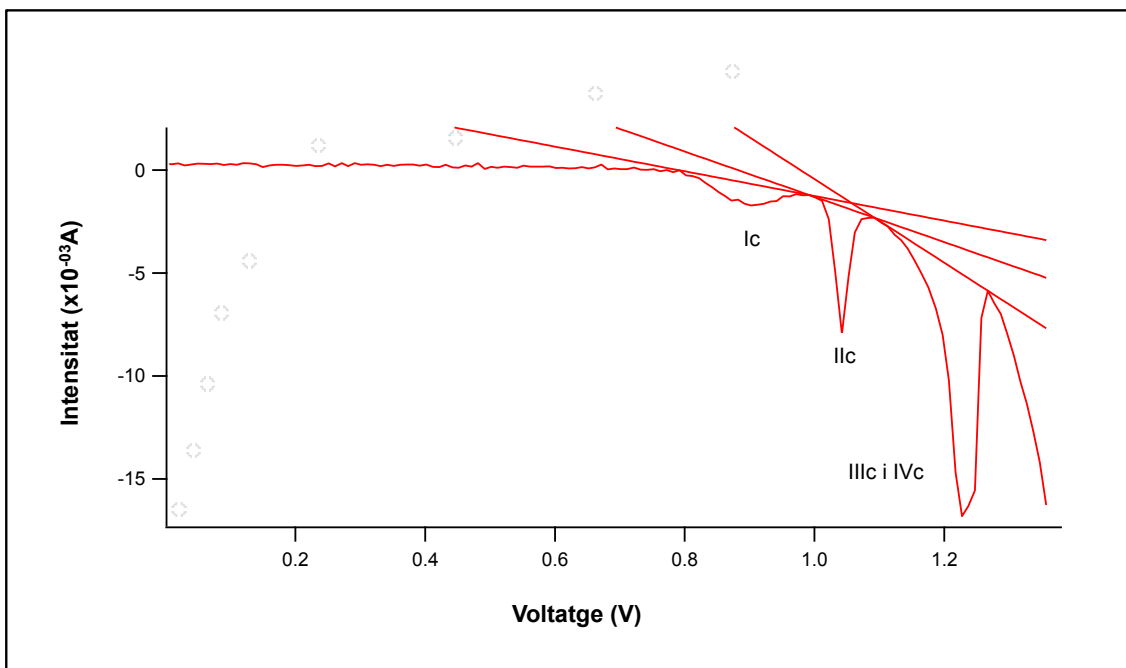


Figura 47. Voltamperometria cíclica d'una SAM mixta a partir d'una barreja en etanol del compost **30** $2,5 \mu\text{M}$ i del compost **23** $7,5 \mu\text{M}$, sobre or policristal·lí en KOH 500 mM . Velocitat d'escombrat 100 mV/s . Temps d'immersió: 40 minuts .

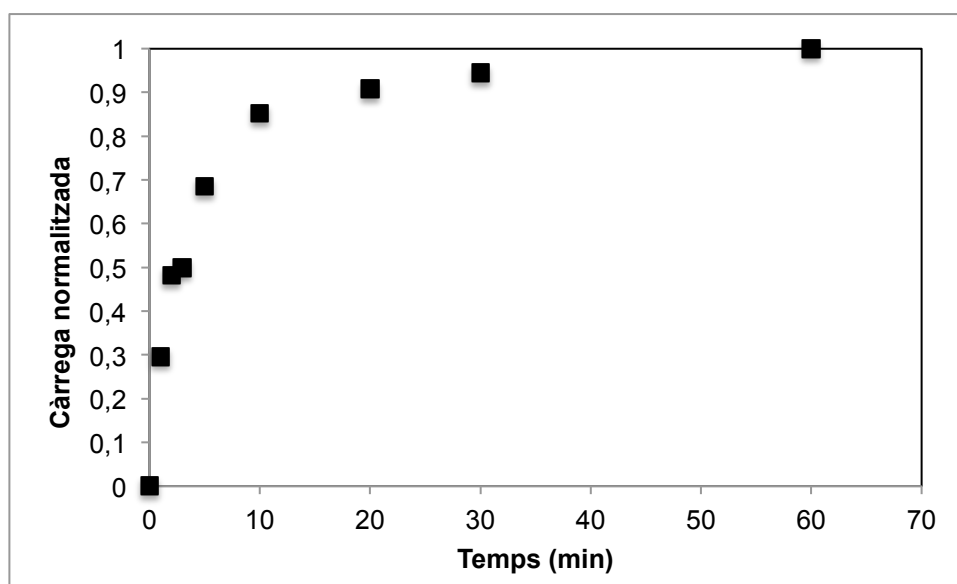


Figura 48. Cinètica de formació de la SAM mixta de **30** $2,50 \mu\text{M}$ i **23** $5,0 \mu\text{M}$.

4.7 Ancoratge d'avidina sobre SAMs mixtes de **30** i **23** sobre or.

4.7.1 Estudi mitjançant voltamperometria cíclica de les SAMs d'avidina.

Els processos d'associació supramolecular poden modificar els potencials als quals tenen lloc els processos redox d'un component electroactiu. El potencial de reducció (o d'oxidació) d'una substància es bastant sensible a l'estat de complexació d'aquesta substància, especialment si el grup funcional que experimenta el procés redox està situat a prop del lloc d'unió.¹⁴⁸

En el cas de les SAMs d'avidina, es va escollir que la unió de la proteïna es produís mitjançant un lligand electroactiu (HABA) unit a la superfície de l'or. Aquest lligand electroactiu ens hauria de permetre avaluar el grau de complexació a Av a partir del desplaçament en el potencial de reducció del grup HABA.

A nosaltres ens interessa poder fer les mesures de voltamperometria de les SAMs d'avidina en un medi tamponat a pH neutre, ja que són les òptimes per estudiar les interaccions de biomolècules. Afortunadament, el potencial de reducció del grup HABA en una SAM del compost **30** en medi de PB 100 mM a pH=7,0 (apartat 4.4.1) queda bastant separat del pic de descàrrega d'hidrogen. Per tant, queda molt de marge per detectar els canvis de potencial de reducció del grup HABA que pugui provocar la seva complexació a Av.

Per esbrinar quina era la SAM mixta que maximitzava la unió a Av es van preparar successivament (amb el mateix elèctrode d'or) tota una sèrie de SAMs mixtes a partir de solucions etanòliques que contenien els dos components (**30** i **23**) en diferents proporcions. En aquestes solucions, la concentració del disulfur **30** sempre va ser de 2,5 μ M, mentre que la concentració del disulfur **23** es va anar variant. Després dels 50 minuts d'immersió, l'electrode es va rentar amb aigua i es va introduir en PB 100 mM a pH=7,0.

Per a cada proporció dels dos components, la SAM mixta es va preparar quatre vegades, ja que el potencial de reducció del grup HABA es va mesurar en quatre situacions diferents que anomenarem **SAMa**, **SAMb**, **SAMc** i **SAMd**. A més, totes les mesures es van fer, com a mínim, per duplicat. Aquestes quatre situacions en que es va enregistrar el voltamperograma per determinar el potencial de reducció del grup HABA ($E_{pc,HABA}$) difereixen en el que se li va fer a l'electrode d'or després dels rentats amb aigua:

- SAMa:** Mesurar tot seguit $E_{pc,HABA}$ en medi de PB 100 mM a pH=7,0
- SAMb:** a) Deixar 50 minuts en PB 100 mM a pH=7,0 i
b) Mesurar el $E_{pc,HABA}$.
- SAMc:** a) Deixar 50 minuts en PB 100 mM a pH=7,0
b) Deixar 1 h en solució d'Av de concentració 3 mg/mL en PB 100 mM a pH=7,0
c) Mesurar el $E_{pc,HABA}$ en el mateix medi (amb Av).
- SAMd:** a) Deixar 50 minuts en PB 100 mM a pH=7,0
b) Deixar 1 h en solució d'Av de concentració 3 mg/mL en PB 100 mM a pH=7,0
c) Rentar l'elèctrode amb PB 50 mM a pH=7,0
d) Mesurar el $E_{pc,HABA}$ en medi de PB 100 mM a pH=7,0

La finalitat de deixar la SAMc en PB durant 50 minuts és la de permetre que la SAM es reorganitzi abans de posar-la en la solució d'Av. La finalitat de rentar la SAMd amb PB és la d'eliminar l'Av unida de forma no específica i l'Av unida de forma monovalent als grups HABA de la SAM (unions febles).

A la figura 51 es reproduïx el voltamperograma cíclic d'una **SAMc**, i en la taula 7 s'indiquen els potencials de reducció dels grups HABA ($E_{pc,HABA}$) en les diferents SAMs.

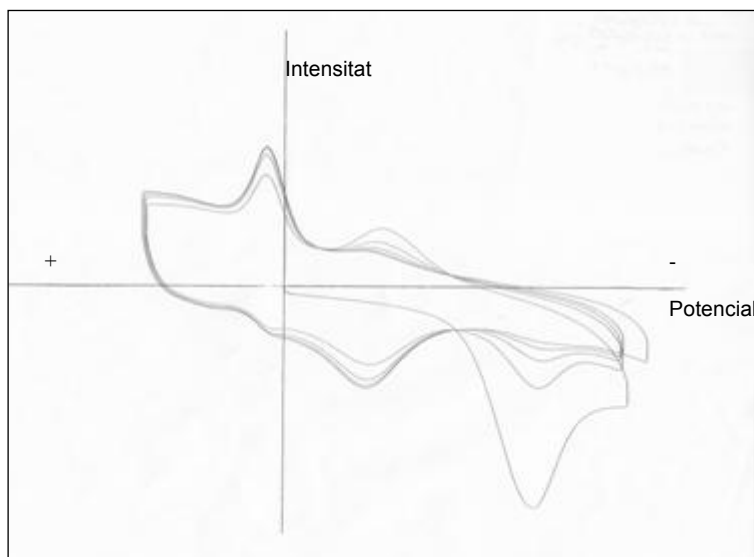


Figura 51. Voltamperometria cíclica en PB 500 mM a pH=7,0 d'una SAMc formada a partir d'una solució etanòlica de **30** i **23** amb una relació molar de 1 a 0,5, a la qual s'ha ancorat l'avidina. Velocitat d'escombrat 100 mV/s.

Si ens fixem en els $E_{pc,HABA}$ de les **SAMa**, s'observa que el potencial de reducció es va fent més negatiu a mesura que augmenta la relació molar **23/30**. Es a dir que quant major és la densitat superficial de grups HABA i més propers estan els uns als altres, més fàcil és reduir-los. Una elevada densitat superficial de grups HABA podria afavorir una conformació o un tautòmer que facilités la reducció. Quan la relació molar **23/30** ja és elevada i els grups HABA ja estan bastant separats entre sí, majors augments en la relació molar **23/30** ja no fa variar més el potencial de reducció (Taula 7).

Si ara ens fixem en els $E_{pc,HABA}$ de les **SAMb**, s'observa la mateixa tendència que abans. El potencial de reducció es va fent més negatiu a mesura que augmenta la relació molar **23/30**, i la explicació hauria de ser la mateixa que per a les **SAMa**. Però per una mateixa relació molar **23/30**, el $E_{pc,HABA}$ de la **SAMb** és més negatiu que el de la corresponent **SAMa**. Això es pot interpretar si considerem que el $E_{pc,HABA}$ de la **SAMb** s'ha obtingut després de deixar la SAM en PB 100 mM a pH=7,0 durant 50 minuts. Sembla que durant aquest temps la SAM s'ha reorganitzat en el sentit de els grups HABA s'han anat separant entre sí de manera que disminuís la repulsió electrostàtica entre ells. Però quan la relació molar **23/30** ja és elevada i els grups HABA ja estan prou separats en la **SAMa**, esperar un temps en medi de PB 100 mM a pH=7,0 ja no afecta al $E_{pc,HABA}$ de la SAM. Això és veu molt clar en la figura 52, per la confluència de les corbes de $E_{pc,HABA}$ de les **SAMa** i les **SAMb** quan la relació molar **23/30** és elevada.

Quan comparem el $E_{pc,HABA}$ d'una **SAMc** amb el de la corresponent **SAMb** de la mateixa relació molar **23/30**, s'observa un desplaçament del potencial de reducció cap a valors més negatius (entre 40 i 68 mV) per efecte de la complexació de l'Av als grups HABA de la SAM. Es a dir que la complexació a l'Av dificulta la reducció dels grups HABA de la SAM. A mesura que augmenta la relació molar **23/30**, aquest desplaçament es va fent major. Però a partir d'una relació molar **23/30** de 3,1 el desplaçament cap a potencials de reducció més negatius es va fent cada vegada més petit. El fet que aquest desplaçament sigui màxim quan la relació molar **23/30** és de 3,0-3,1 sembla indicar que és en aquestes SAMs que la complexació d'Av amb grups HABA és màxima. És a dir, que la relació molar **23/30** de 3,0-3,1 és la que permet un millor ancoratge de l'Av a la SAM, degut probablement a que en aquestes SAMs la separació entre els grups HABA és l'òptima per a formar el màxim d'unions de tipus divalent amb l'Av.

Una manera de verificar aquesta hipòtesi va consistir en rentar l'elèctrode que contenia la SAM d'Av amb PB 50 mM a pH=7,0. En aquests rentats era d'esperar que ens emportéssim l'Av unida de forma no específica i l'Av unida de forma

monovalent (unions febles), però no l'Av unida de forma divalent (unió forta). Per tant, aquelles SAMs en que hi hagués una major proporció de grups HABA units de forma divalent caldria esperar que experimentessin un menor desplaçament del $E_{pc,HABA}$ cap a potencials menys negatius en passar de de la **SAMc** (sense rentar) a la **SAMd** (després de rentar). En aquest sentit, va quedar clar que la SAM amb la relació molar **23/30** de 3,1 era la que experimentava el desplaçament més petit en rentar la SAM d'Av (en passar de **SAMc** a **SAMd**).

Relació molar 30:23 (solució etanòlica)	$E_{pc,HABA}$ (mV)			
	SAMa	SAMb	SAMc	SAMd
1,0:0	-315	-325	-377	-367
1,0:0,5	-363	-380	-425	-415
1,0:1,0	-385	-390	-440	-420
1,0:2,0	-390	-396	-457	-430
1,0:2,5	-392	-399	-465	-445
1,0:3,0	-399	-405	-473	-465
1,0:3,1	-400	-410	-478	-475
1,0:3,5	-403	-411	-477	-460
1,0:4,0	-405	-412	-475	-455
1,0:5,0	-410	-415	-474	-450
1,0:6,0	-415	-415	-470	-445
1,0:10,0	-415	-415	-455	-440

Taula 7. Valors del potencial de reducció del grup HABA ($E_{pc,HABA}$) en els diferents tipus de SAM (**a**, **b**, **c**, **d**), en funció de la relació molar **30:23**

En la figura 52 es veu com la representació de la **SAMc** pràcticament coincideix amb la de la **SAMd** en un únic punt, el corresponent a la relació molar **23/30** de 3,1. Això sembla indicar que, amb aquesta relació molar entre els dos components de la SAM, l'ancoratge de l'Av és quasi totalment divalent, degut a que la separació entre els grups HABA de la SAM és òptima per a aquest tipus d'unió. Per tant, aquesta relació molar **23/30** de 3,1 és la que dona lloc a SAMs d'Av més robustes, que poden ser rentades sense experimentar pèrdues importants d'Av.

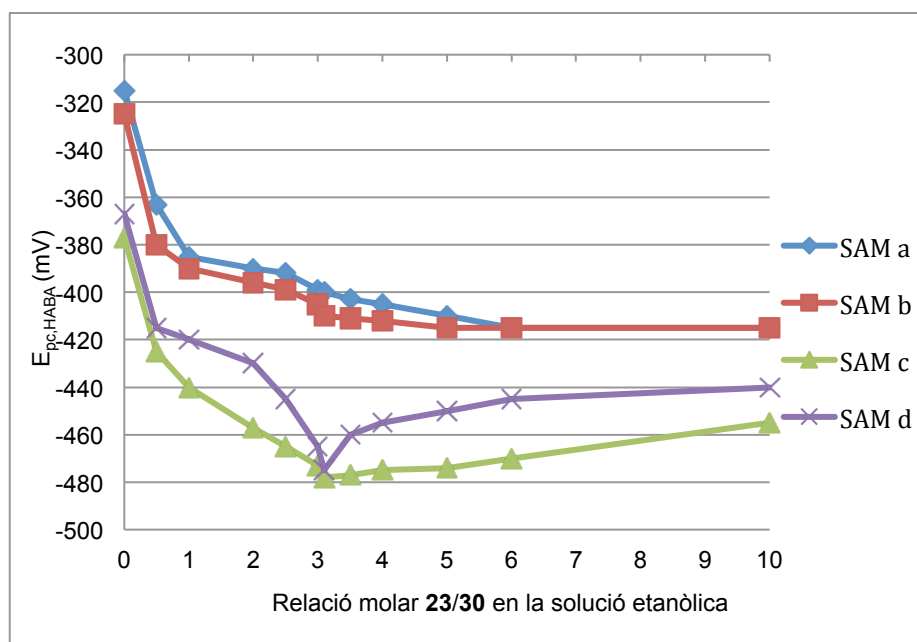


Figura 52. Representació del canvis en el $E_{pc,HABA}$ de les SAMs en funció del tipus de SAM (a, b, c, d) i de la relació molar 23/30 en la solució etanòlica.

4.7.2 Estudi mitjançant AFM de les SAMs d'avidina.

Per confirmar que l'Av s'havia unit a la SAM mixta es va preparar una **SAMd** sobre un disc de Au (111) amb una relació molar 30:23 de 1,0:3,1 i es va analitzar per AFM. Les imatges obtingudes mostren que la superfície d'or es troba recoberta per una monocapa d'una alçada d'entre 4 i 5 nm. Aquest resultat estaria d'acord amb que l'avidina s'ha unit a la SAM mixta funcionalitzada amb grups HABA.

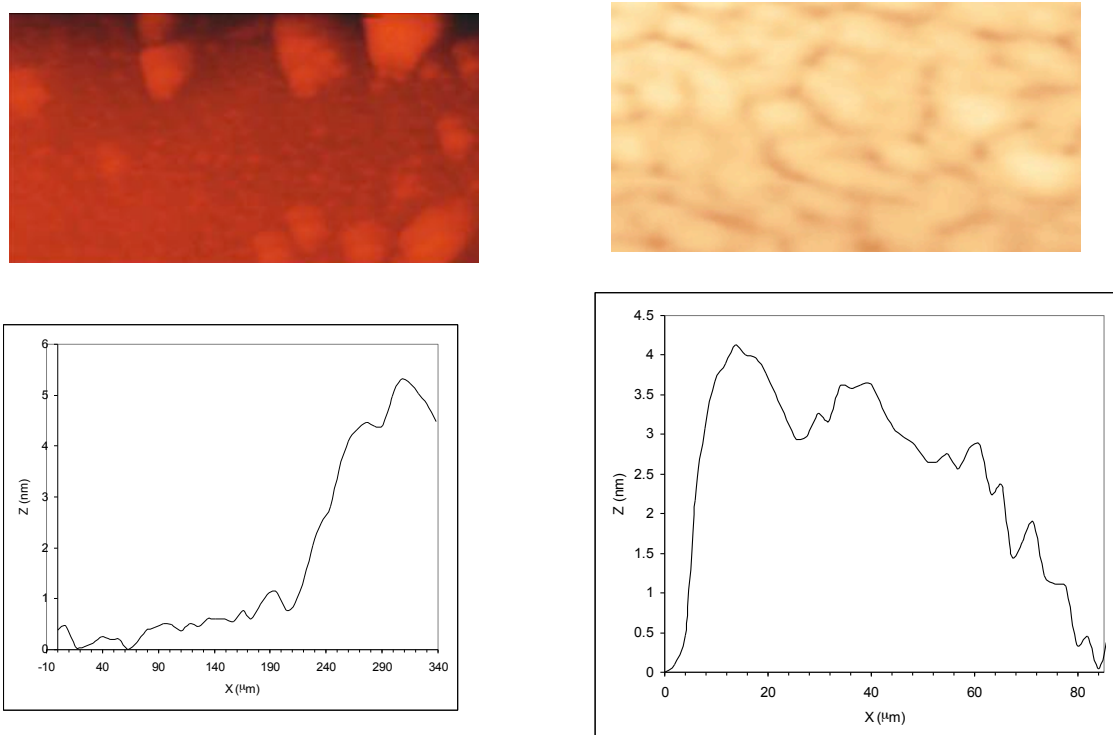


Figura 53. Imatges de AFM d'una SAM mixta preparada a partir de d'una barreja de **30** i **23** amb una relació molar de 1,0:3,1 després de d'ancorar-hi avidina i rentar-la amb PB (**SAMd**). A l'esquerra: pla sense avidina i avidina a l'extrem. A la dreta: zona amb avidina.

**5 DESENVOLUPAMENT D'UNA METODOLOGIA PER A
PREPARAR CONJUGATS HETEROBIFUNCIONALS
D'AVIDINA I ESTREPTAVIDINA.**

L'obtenció de conjugats heterobifuncionals d'avidina i d'estreptavidina és un tema de gran interès en el camp dels biomaterials i en el camp biomèdic, ja que permetria unir dues biomolècules de funcions diferents, o bé per exemple, un fàrmac amb un anticòs que el dirigeixi cap a la seva diana (Figura 54).

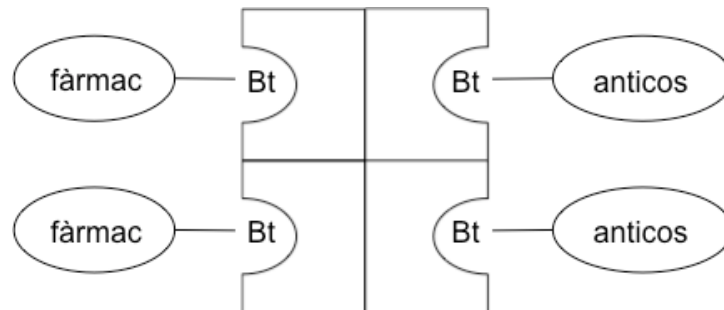


Figura 54: Representació esquemàtica d'un conjugat heterobifuncional d'avidina del tipus A-Bt:Av:Bt-B.

Aquests conjugats són especialment interessants ja que la unió no és del tipus covalent sinó que es basa en el reconeixement molecular de l'avidina i l'estreptavidina per la biotina i també pels productes de derivatització de la biotina a través del seu grup carboxílic (compostos biotinitilats). La unió específica i amb elevada afinitat entre (S)Av i compostos biotinitilats fa que aquests conjugats tinguin una estructura ben definida i que la unió sigui pràcticament irreversible (Figura 55).

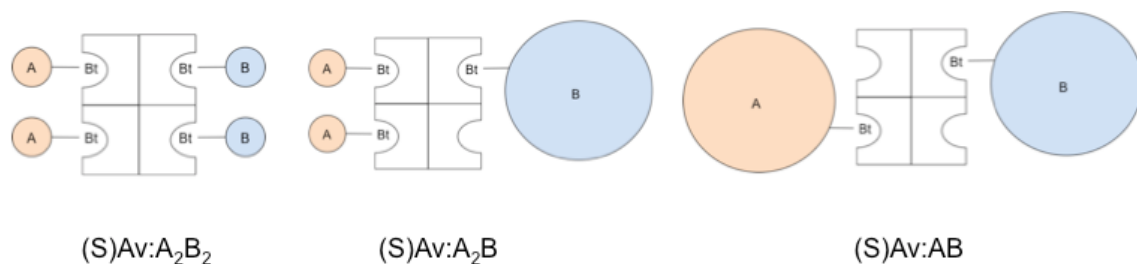
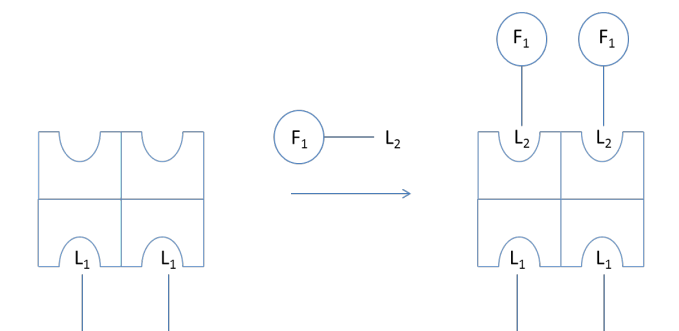


Figura 55. Diferents tipus de conjugats heterobifuncionals d'avidina i estreptavidina, segons la grandària dels compostos biotinitilats (A i B) que s'hi uneixen.

No obstant, per preparar conjugats heterobifuncionals de (S)Av amb una estequiometria ben definida (com els de la figura 55), cal utilitzar una metodologia adequada ja que en presència d'una barreja equimolar de dos components biotinitilats diferents, l'avidina i l'estreptavidina formarien una barreja de complexos de diferents estequiometries en proporcions estadístiques. Si es vol que es formi un únic tipus de complex de (S)Av que contingui els dos compostos biotinitilats (A i B) amb una estequiometria ben definida, cal utilitzar una metodologia apropiada.

Per desenvolupar aquesta metodologia ens hem basat en el fet que l'avidina i l'estreptavidina tenen quatre llocs d'unió disposats dos a dos en costats oposats de la proteïna. Quan s'ancora l'avidina o l'estreptavidina a una monocapa (per exemple, una monocapa de Langmuir o una SAM) a través d'un dels seus lligands (Bt, HABA, etc), hem vist que aquests lligands ocupen els dos llocs d'unió d'una cara, deixant lliures els dos llocs d'unió de la cara oposada. Aquests llocs d'unió estan disponibles per unir-hi altres molècules també derivatitzades amb el corresponent lligand de (S)Av

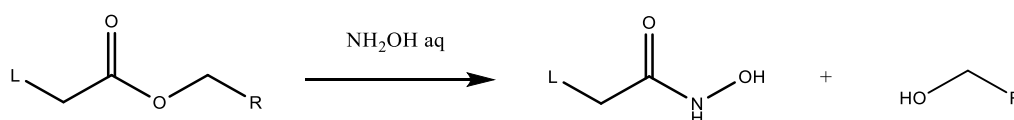


Esquema 20. Representació de la unió entre una (S)Av ancorada a una superfície funcionalitzada amb un lligand L_1 i una altra molècula funcionalitzada amb un lligand L_2

Tal i com s'ha demostrat anteriorment, si es vol generar una monocapa de Langmuir⁵⁸ o una SAM d'(S)Av (vegeu apartats 3.3 i 4 respectivament), el lligand L amb que s'ha de funcionalitzar la monocapa no cal que sigui la biotina, que té una constant d'afinitat molt elevada per la (S)Av. Lligands de menor afinitat també poden ser utilitzats per immobilitzar (S)Av a una monocapa. La unió de la (S)Av a aquesta monocapa podria ser suficientment robusta, i la SAM podria resistir rentats amb aigua, si la unió de la (S)Av a la superfície fos de tipus divalent.

En aquesta nova metodologia es pretén utilitzar dos lligands de (S)Av de diferent afinitat. El lligand de menor afinitat (L_1) hauria de presentar una unió robusta a la (S)Av quan formés complexos divalents, però la unió hauria de ser làbil i reversible quan formés complexos monovalents. En canvi, el lligand de major afinitat (L_2) hauria de presentar una unió robusta tant si forma una unió de tipus divalent com si la forma de tipus monovalent. Aquest segon lligand (L_2) serà biotina o un derivat seu d'alta afinitat.

Per tal que el lligand de menor afinitat (L_1) pugui passar de formar un complex divalent (robust) a un complex monovalent (làbil) s'ha pensat en introduir entre el lligand (L_1) i la superfície o monocapa a on està ancorat un enllaç que es pugui trencar fàcilment. Concretament es va pensar en utilitzar un enllaç ester, que es pot trencar en condicions suaus en presència d'hidroxilamina (bon nucleòfil), donant el corresponent àcid hidroxàmic i l'alcohol (Esquema 21).

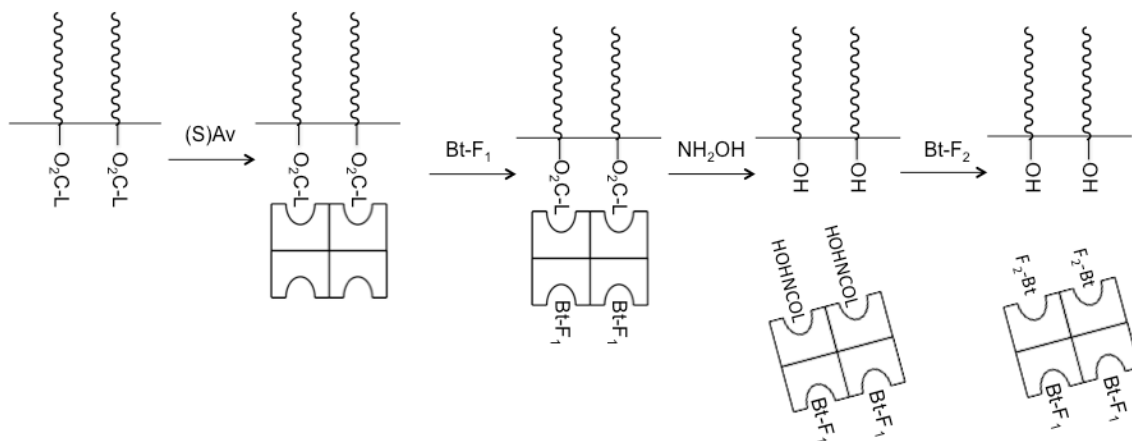


Esquema 21. Reacció de trencament de l'enllaç ester amb hidroxilamina

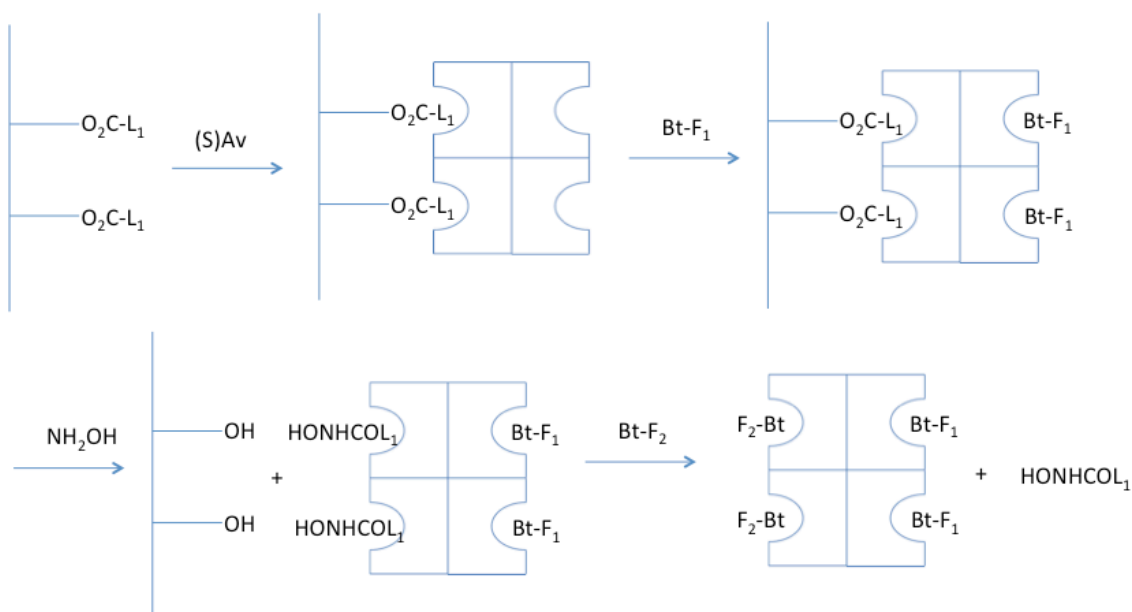
Per tant, la metodologia que pretenem implementar per preparar conjugats heterobifuncionals de (S)Av consistiria, a grans trets, en les següents etapes:

- 1- Preparació d'una monocapa o superfície funcionalitzada amb el lligand de menor afinitat (L_1) a través d'un enllaç ester làbil
- 2- Unió de la (S)Av a la monocapa o superfície per interacció específica amb el lligand L_1
- 3- Complexació d'una espècie funcional biotinitilada (F_1 -Bt, etc.)
- 4- Trencament de l'enllaç ester làbil amb hidroxilamina per tal d'alliberar el complex monofuncional de (S)Av que teníem ancorat a la monocapa o superfície, i que passi a la solució.
- 5- Desplaçament del lligand (L_1) de baixa afinitat per addició de la segona espècie funcional biotinitilada (F_2 -Bt)

Per a desenvolupar aquesta metodologia cal poder ancorar (S)Av a una monocapa o a una superfície mitjançant un enllaç làbil. Concretament, s'han desenvolupat dues variants d'aquesta metodologia: una basada en monocapes de Langmuir (Esquema 22) i l'altra basada en resines per a síntesi en fase sòlida (Esquema 23)



Esquema 22. Metodologia per preparar conjugats heterobifuncionals d'(S)Av utilitzant monocapes de langmuir d'un compost amfifílic unit a un lligand.



Esquema 23. Metodologia per preparar conjugats heterobifuncionals d'(S)Av utilitzant resines per a la síntesi en fase sòlida.

5.1 Metodologia per a la preparació de conjugats heterobifuncionals de (S)Av utilitzant monocapes de Langmuir

5.1.1 Disseny del compost amfifílic

En aquesta metodologia ens cal preparar un compost amfifílic que tingui en la part hidrofílica un lligand de (S)Av de baixa afinitat.

Com a lligand de baixa afinitat es va triar la DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) ja que és un lligand aquiral i es pot sintetitzar en poques etapes. Aquest compost, s'uneix a l'avidina amb una constant d'associació de $5,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, major que la constant d'associació de l'HABA ($1,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) però continua sent molt menor que la biotina ($1,6 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$). La molècula DMPDU-C-C₄-CO₂H té una constant d'associació ideal per als nostres objectius ja que:

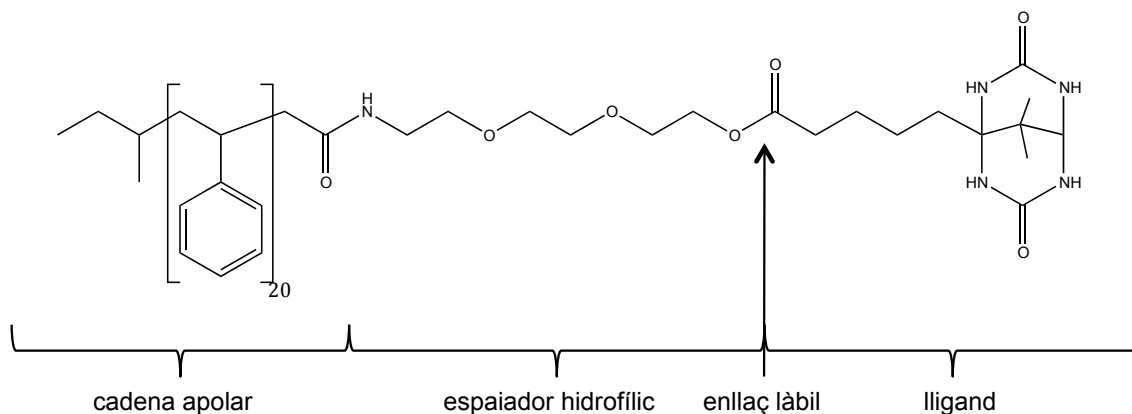
- Quan s'uneix de forma aparentment divalent, per exemple en una monocapa de Langmuir, la unió a (S)Av és relativament forta⁵⁸
- Quan s'uneix de forma monovalent (en solució), l'afinitat per (S)Av és relativament baixa (unió reversible) i es pot desplaçar dels llocs d'unió amb compostos biotinilats

La part hidrofòbica del compost amfifílic ha de ser una relativament gran, de manera que quan s'uneixi (S)Av a la monocapa no ens arrossegui el compost amfifílic cap a la subfase aquosa. Per aquest motiu, es va escollir un polímer lineal del tipus poliestirè de cadena curta (n=20 en promig), funcionalitzat en un extrem amb un grup àcid carboxílic per a facilitar la unió de la cadena polimèrica a la corresponent part hidrofílica.

Per tal de facilitar la unió de (S)Av als grups DMPDU-C-C₄-CO₂H del compost amfifílic, es va intercalar un espaiador hidrofílic del tipus polietilenglicol entre la cadena de poliestirè i el lligand DMPDU. La longitud del espaiador es va dissenyar per a que el polímer no interferís en la unió del lligand amb la proteïna.

Finalment, la unió del lligand DMPDU a l'espaiador s'ha escollit que sigui del tipus ester, per tal que es pugui trencar en presència d'hidroxilamina.

Considerant tots aquests elements estructurals, el compost amfifílic que es va optar per sintetitzar és l'indicat en el esquema 24.



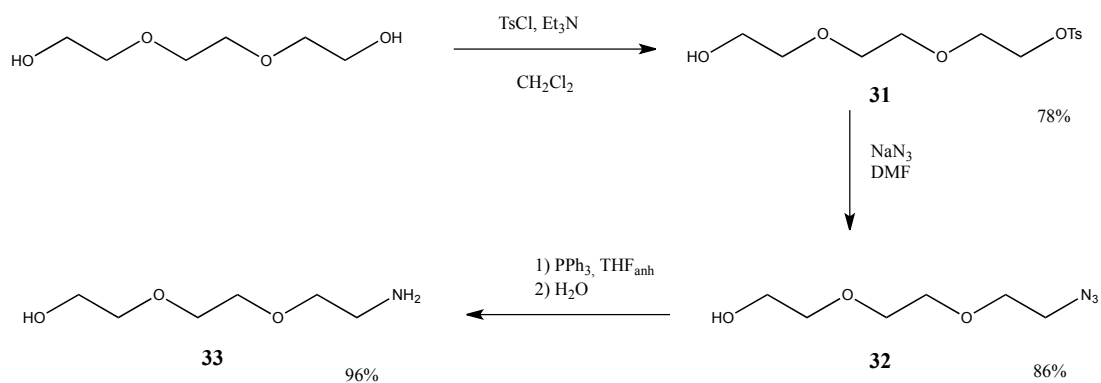
Esquema 24. Estructura del compost amfifílic PS₂₀-sp-O₂C-C₄-C-DMPDU

El nucleòfil utilitzat capaç de trencar enllaços èster en condicions suaus és la hidroxilamina, que donaria com a productes l'alcohol (que es podria reutilitzar) i l'àcid hidroxàmic corresponent (Esquema 22).

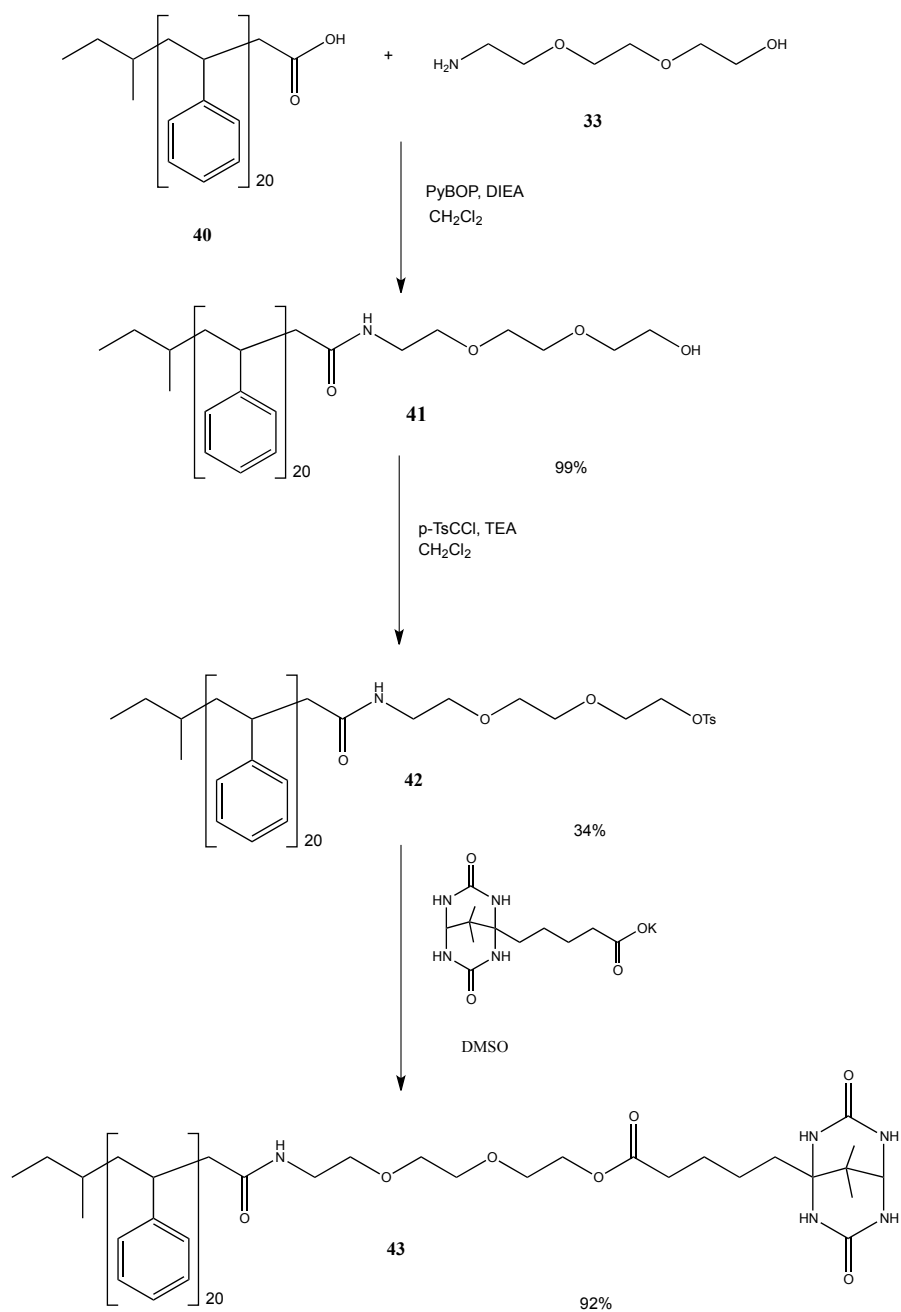
5.1.2 Síntesi del compost amfifílic (43)

En primer lloc es va preparar l'espaiador hidrofílic de manera que tingués en un dels extrems un grup amino (per unir-se al polímer mitjançant un enllaç amida) i en l'altre extrem un grup hidroxil (per unir-se al lligand formant un enllaç ester)

Per a sintetitzar l'espaiador desitjat (**33**) (Esquema 25), es va partir del trietilenglicol que primerament es va fer reaccionar amb un defecte de clorur de tosil en presència de trietilamina, per obtenir el producte monotosilat (**31**) amb un 78% de rendiment. A continuació es va substituir el grup tosilat amb 1,5 equivalents d'azida sòdica a través d'un mecanisme S_N2, obtenint-se la corresponent azida (**32**) amb un rendiment del 86%. Tot seguit, es va reduir el grup azida amb trifenilfosfina obtenint-se l'amina (**33**) amb un rendiment del 96%.

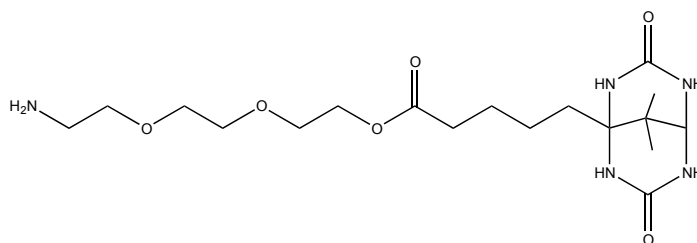
Esquema 25. Síntesi del compost **33**

Una vegada obtingut l'espaiador, aquest es va unir al poliestirè mitjançant un acoblament amb PyBOP i DIEA, obtenint-se l'amida **41** amb un 99% de rendiment. Finalment, es va tosilar el grup hidroxil terminal del espaiador (**42**) amb un 34% de rendiment i es va substituir el grup tosilat per reacció amb la sal potàssica DMPDU- $\text{C-C}_4\text{-CO}_2\text{K}$ a través d'un mecanisme $\text{S}_{\text{N}}2$. El rendiment d'aquesta darrera etapa en la síntesi del compost amfifílic (**43**) va ser del 92% (Esquema 26).

Esquema 26. Obtenció del compost $\text{PS}_{20}\text{-sp-O}_2\text{C-C}_4\text{-C-DMPDU}$ (43)

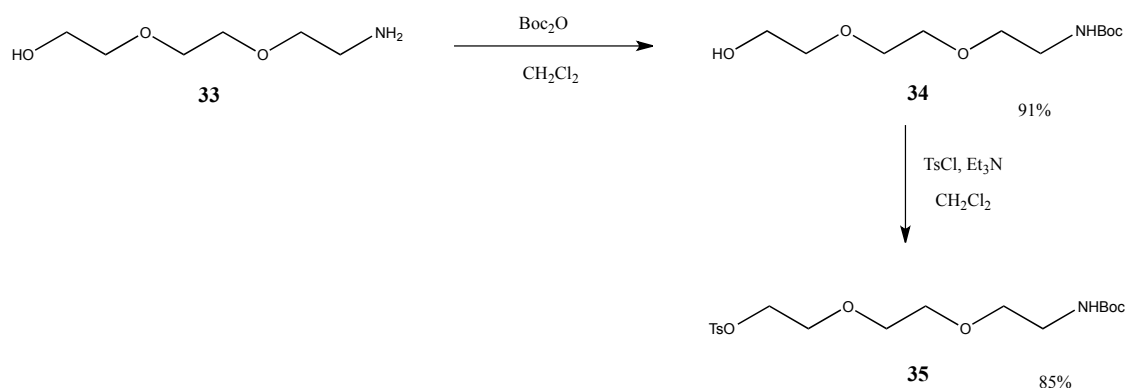
5.1.3 Síntesi del compost model DMPDU-C-C₄-CO₂-sp-NH₂ (**37**) i determinació de la seva afinitat per l'avidina

Degut a la naturalesa química del compost amfifílic (**43**, Esquema 27) (polímer lineal d'una determinada polidispersitat) i la seva insolubilitat en medi aquós, no s'ha determinat la seva afinitat per l'avidina. Però aquesta afinitat hauria de ser molt similar a la d'un compost model que contingués la part hidrofílica d'aquest compost amfifílic. Per això es va sintetitzar un compost model (**37**), format pel lligand DMPDU-C-C₄-CO₂H unit al mateix espaiador derivat del propilenglicol i amb l'extrem amino terminal sense derivatitzar. Igual que en el compost amfifílic, la unió entre el lligand i l'espaiador ha de ser del tipus ester.



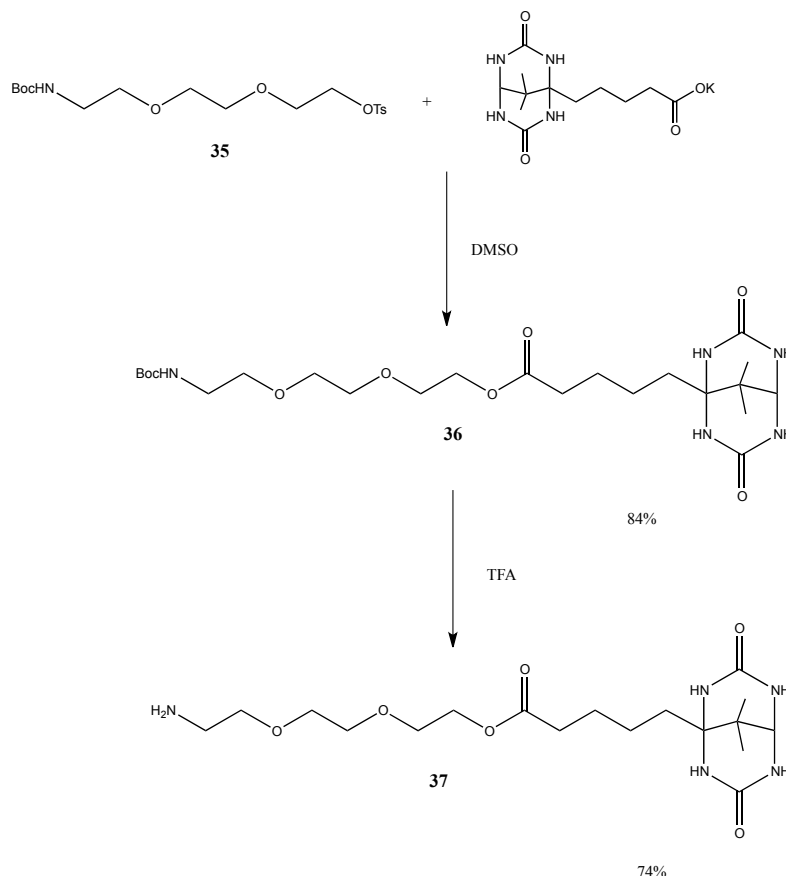
Esquema 27. Estructura del compost model **37**.

La síntesi del compost model (**37**) (Esquema 28) va consistir en primer lloc en la protecció amb Boc del grup amino del compost **33**, obtenint-se el compost (**34**) amb un rendiment del 91%. A continuació, es va tosilar l'alcohol amb clorur de tosíl i trietilamina, obtenint-se el compost (**35**) amb un 85% de rendiment.



Esquema 28.

Posteriorment, es va fer reaccionar el tosilat amb la sal DMPDU-C-C₄-CO₂K per a obtenir el compost **36** (Esquema 29), amb un rendiment del 84%. Finalment es va desprotegir amb TFA per obtenir l'amina corresponent (**37**), amb un 74% de rendiment. Aquest compost (**37**), ja és soluble en medi aquós i això va permetre determinar la seva afinitat per l'avidina.



Es va procedir a determinar la constant d'associació (Figura 56) de la DMPDU-C-C₄-CO₂-sp-NH₂ (**37**) amb l'avidina mitjançant una valoració competitiva amb HABA. La constant d'associació resultant va ser de $8,6 \times 10^3 \text{M}^{-1}$.

Aquesta constant d'associació, és major que la de la DMPDU-C-C₄-CONH-sp-NH₂, que va sintetitzar Eva Ayet: $1,7 \times 10^3 \text{M}^{-1}$ (**49**), compost que només difereix en l'enllaç entre el lligand i l'espaiador. Aquest enllaç, al ser proper al lligand podria tenir interacció amb la proteïna i influir en la constant d'associació.

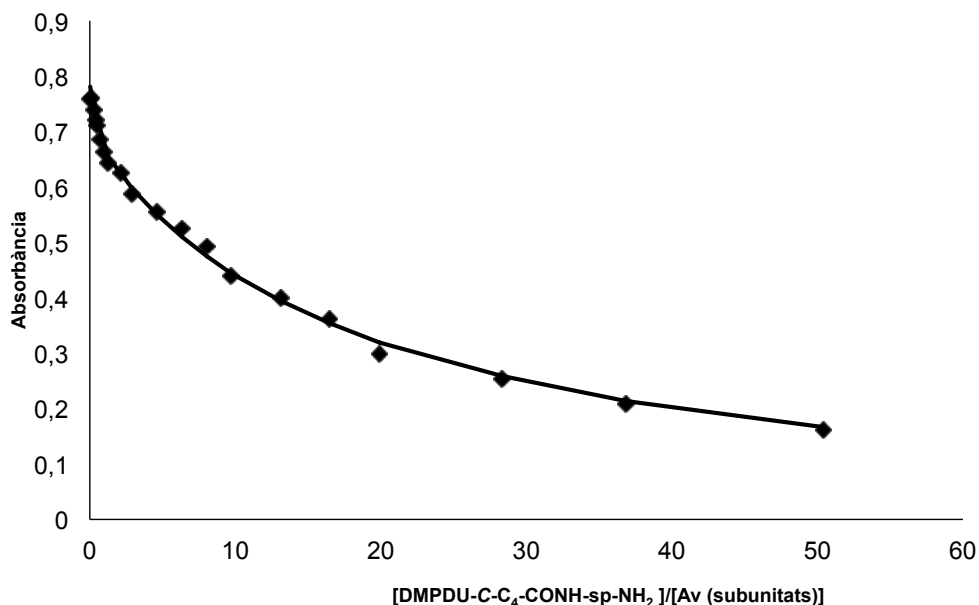


Figura 56. Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 51.2 μ M (tetràmer) i HABA 26.4 μ M amb el lligand DMPDU-C-C₄-CO₂-sp-NH₂ (**37**) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades.

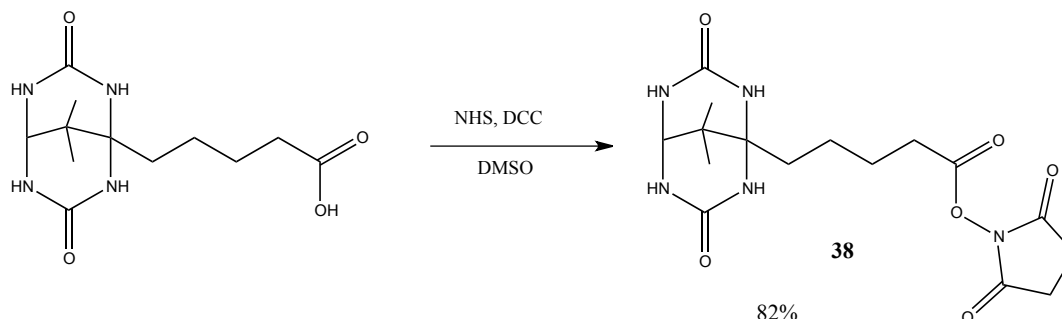
5.1.4 Síntesi de l'àcid hidroxàmic DMPDU-C-C₄-CONHOH (**39**) i determinació de la seva afinitat per l'avidina.

Es va sintetitzar l'àcid hidroxàmic DMPDU-C-C₄-CONHOH (**39**) ja que és el producte de la reacció de trencament de l'enllaç èster amb hidroxilamina, tant del compost amfifílic PS₂₀-sp-O₂C-C₄-C-DMPDU (**43**) com del compost model DMPDU-C-C₄-CO₂-sp-NH₂ (**37**).

Abans de continuar amb el desenvolupament d'aquesta metodologia era convenient determinar l'afinitat d'aquest àcid hidroxàmic (**39**) per l'avidina i així estar segurs que podria ser desplaçat dels llocs d'unió de l'avidina pels compostos funcionals biotinitats. Per altra banda el podríem utilitzar com a patró per quantificar la reacció de trencament de l'enllaç èster.

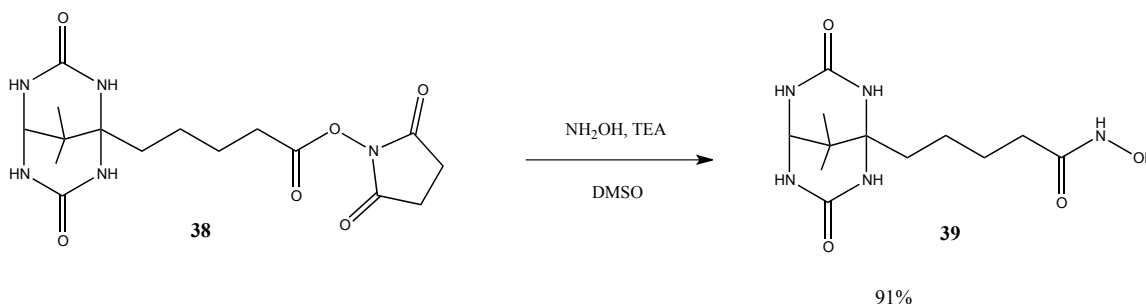
La síntesi de l'àcid hidroxàmic de la DMPDU-C-C₄-CO₂H es va dur a terme a partir de la reacció entre un ester activat de la DMPDU-C-C₄-CO₂H i hidroxilamina (Esquema 29).

Primerament es va preparar l'èster activat de la DMPDU-C-C₄-CO₂H fent-la reaccionar amb N-hidroxisuccinimida i DCC en medi DMSO amb un 82% de rendiment.



Esquema 29.

Posteriorment es va fer reaccionar l'èster activat (**38**) amb hidroxilamina i TEA en DMSO per a obtenir el corresponent àcid hidroxàmic amb un 91% de rendiment (Esquema 30).



Esquema 30.

Una vegada sintetitzat l'àcid hidroxàmic DMPDU-C-C₄-CONHOH (**39**), es va procedir a determinar la seva constant d'associació a l'avidina mitjançant una valoració espectrofotomètrica competitiva amb HABA (Figura 57). La constant d'associació obtinguda va ser de $2,5 \times 10^3 \text{M}^{-1}$, menor que la del compost model del compost amfifílic DMPDU-C-C₄-CO₂-sp-NH₂ (**37**) que va resultar $8,6 \times 10^3 \text{M}^{-1}$. Per tant, sí que podria ser desplaçat dels llocs d'unió de l'avidina amb un compost funcionalitzat amb biotina.

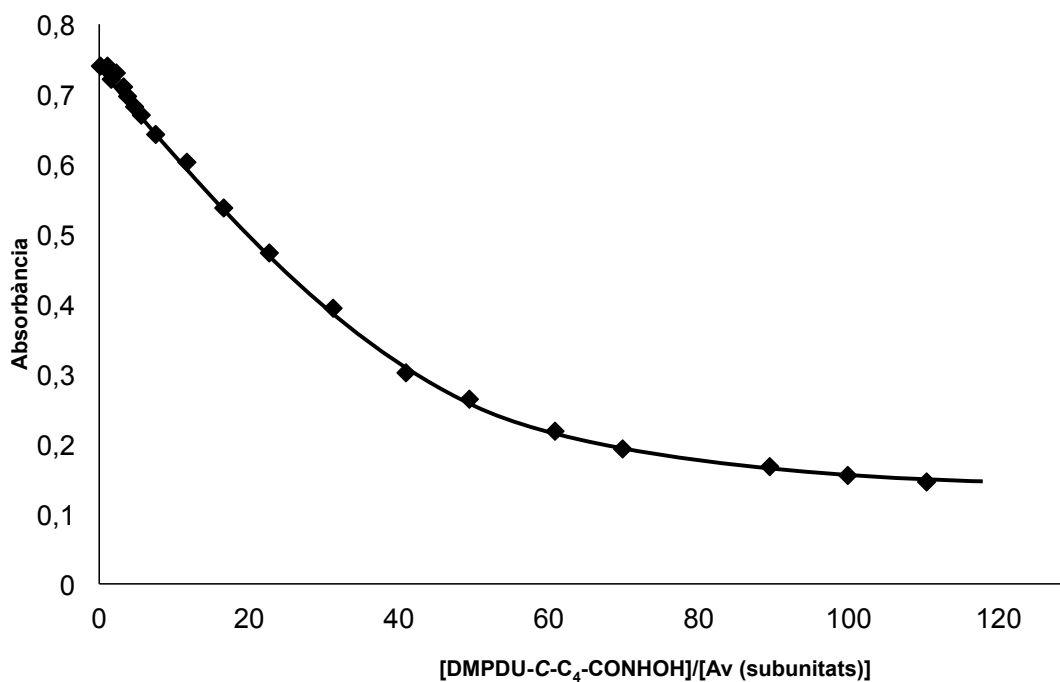
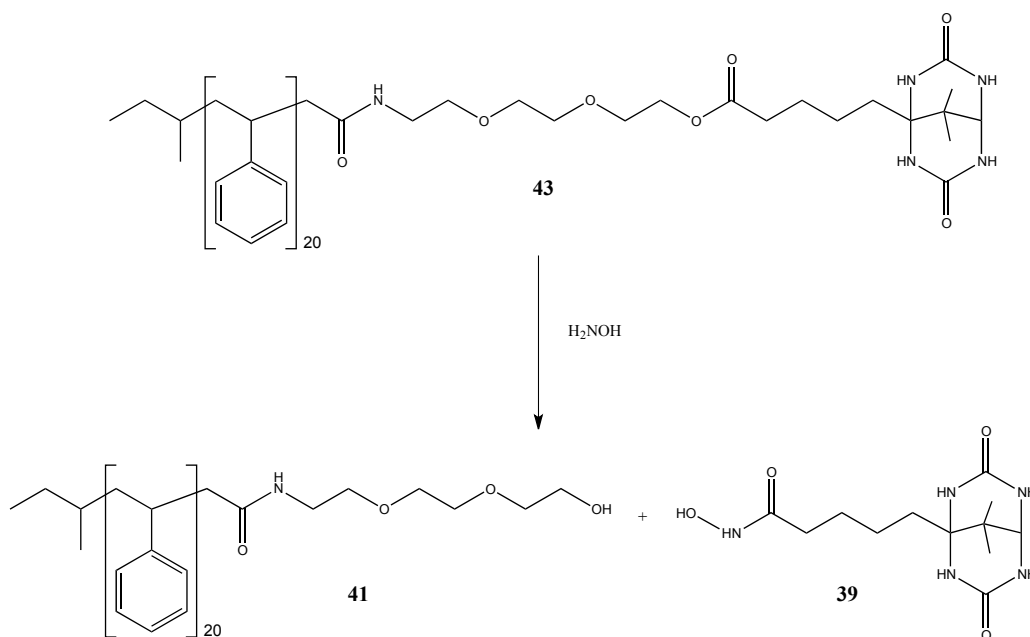


Figura 57. Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 45.2 μ M (tetràmer) i HABA 83.4 μ M amb el lligand DMPDU-C-C₄-CONHOH (**39**) en tampó fosfats 0,1 M a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades.

5.1.5 *Estudis de trencament de l'enllaç ester del compost amfifílic (43) amb hidroxilamina en la interfase aire-aigua (monocapa de Langmuir)*

Com s'ha comentat en l'apartat 1.2 el lift-off d'una monocapa de poliestirè biotinilat a la qual s'hi ha unit SAv és de 14,8 nm².⁵⁷

Per tant, a l'hora de preparar la monocapa del compost amfifílic **43** sense (S)Av, es va dipositar una quantitat d'aquest compost lleugerament inferior a la que s'hauria d'utilitzar quan en aquesta monocapa de Langmuir s'hi volgués unir (S)Av. Així ens asseguràvem que tots els grups DMPDU serien accessibles a la (S)Av en posteriors experiments.



Esquema 31. Trencament del PS₂₀-sp-O₂C-C₄-C-DMPDU (**43**) amb hidroxilamina

En aquest cas, com que volíem estudiar el trencament de l'enllaç ester, la subfase aquosa estava formada per una solució de tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a pH=8,5 amb hidroxilamina 10mM també dissolta. Després de 12 hores a 40°C, es va detectar per HPLC-MS/ESI l'àcid hidroxàmic (**39**) format. Això demostrava que es produïa el trencament de l'enllaç ester del compost amfifílic en la monocapa de Langmuir. Malauradament no es va poder determinar el rendiment de la reacció de trencament, ja que la concentració d'àcid hidroxàmic estava sota el límit de quantificació, degut a la baixa quantitat de compost amfifílic que s'havia dipositat.

5.1.6 Estudi del trencament de l'enllaç ester en un sistema bifàsic aigua/cloroform.

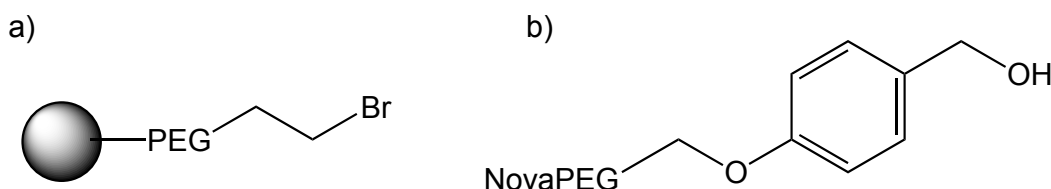
Per tal de poder determinar el rendiment aproximat de la reacció de trencament de l'enllaç ester en el compost amfifílic **43**, es va realitzar un nou experiment, però aquesta vegada en un sistema bifàsic aigua/cloroform. El compost amfifílic el tindrem en la interfície i en la fase orgànica, mentre que en la fase aquosa hi teníem bicarbonat d'amoni 10 mM a pH 8,5 i hidroxilamina 10 mM. Ara la concentració de compost amfifílic ja era superior ja que no només el teníem en interfície sinó també en tota la fase orgànica.

Es va deixar reaccionar durant 12 hores a 40°C i es va poder quantificar l'àcid hidroxàmic (**39**) format per HPLC-MS/ESI que va resultar ser un 91±3% del teòric. Aquest rendiment ens confirma que el trencament de l'enllaç ester del compost amfifílic ha estat pràcticament quantitatiu. No obstant, la quantitat de (S)Av que es podria unir a una monocapa de Langmuir sempre seria molt petita.

Un mètode que permetria augmentar la superfície i, per tant, també la quantitat de lligand i de (S)Av que s'hi podria unir seria l'ús de resines per a la síntesi en fase sòlida.

5.2 Metodologia basada en resines per a la síntesi en fase sòlida

Per tal de posar a punt aquesta metodologia (Esquema 23, apartat 5) es van escollir dues resines àmpliament utilitzades en síntesi en fase sòlida, la NovaSyn TG Bromo resin i la NovaPEG Wang resin. La primera és un composite de poliestirè i polietilenglicol en el qual els extrems de les cadenes de PEG s'han funcionalitzat amb brom. En canvi, la segona resina només conté unitats de PEG (Esquema 32) .



Esquema 32. a) resina NovaSyn TG bromo; b) resina NovaPEG Wang

L'elecció d'aquestes dues resines es va realitzar per els següents motius:

- S'inflen tant en medi orgànic com en medi aquós
- Tenen cavitats interiors suficientment grans per encabir-hi complexos multiproteínics i que no generin complexos tri o tetravalents amb (S)Av

En el cas de la Nova PEG Wang la mida de porus és de 100-200 mesh, i en el cas de la Nova Syn TG Bromo, és de 170 mesh

- El grau de funcionalització és suficientment elevat per permetre unions divalents a (S)Av

La Nova PEG Wang té una funcionalització de 0,5-1,3 mmol/g (per el nostre lot va ser de 0,79 mmol/g), i la Nova Syn TG Bromo té 0,2-0,4 mmol/g (per el nostre lot va ser de 0,3 mmol/g)

- Tenen, o bé es pot generar fàcilment, un àtom de carboni amb caràcter electròfil, el qual pot ser atacat pel lligand de baixa afinitat en forma de carboxilat

($L_1\text{-CO}_2^-$), generant la unió de tipus èster làbil. La resina Nova Syn TG Bromo té un àtom de carboni electròfil ja que conté un bromur d'alquil primari.

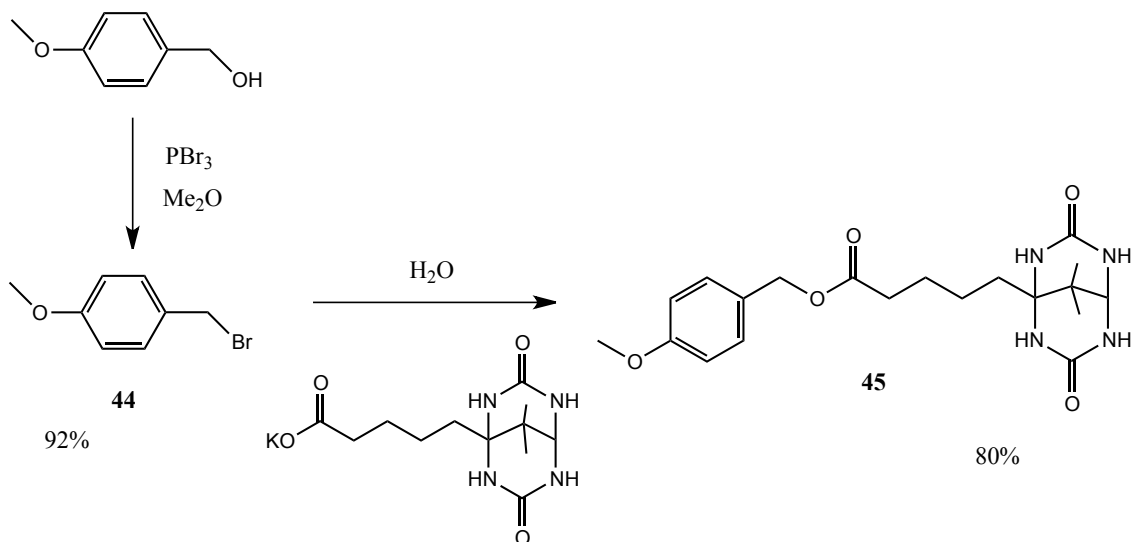
En canvi la resina Nova PEG Wang conté un alcohol de tipus benzílic, però aquest és pot transformar fàcilment en un bromur de tipus benzílic en una sola etapa. Igual que en la metodologia basada en monocapes de Langmuir (apartat 5.1.), aquí també es va utilitzar com a lligand de baixa afinitat per a funcionalitzar les resines la DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**). Com a proteïna es va escollir l'avidina ja que presenta constants d'afinitat prou apropiades amb el DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) i té un cost inferior al de la estreptavidina. Com a compostos biotinilats que ens permetessin demostrar la validesa d'aquesta metodologia, es va escollir la biotina-fluoresceïna (Bt-FI) i l'albumina biotinilada (Bt-BSA).

5.2.1 Síntesi d'un compost model (45) i estudis d'afinitat i de trencament de l'enllaç ester en solució.

El compost (**37**) descrit a l'apartat 5.1.3 com a model del polímer amfifílic (**43**), al tenir el lligand DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) unit a l'espaiador de tipus etilenglicol a través d'un enllaç ester, també és model del lligand unit a la resina NovaSyn TG bromo. En canvi, quan el lligand estigui unit a la resina NovaPEG Wang, l'èster serà de tipus benzílic. Per això, es va procedir a sintetitzar un compost model amb una funcionalització semblant a la de la DMPDU quan està unida a la resina NovaPEG Wang. El compost model que es va decidir preparar (**45**) va ser l'èster 4-metoxibenzílic de la DMPDU-C-C₄-CO₂H.

D'aquesta manera es volia provar primer en dissolució les reaccions que posteriorment es pretenien dur a terme en fase sòlida: verificar si el derivat de la DMPDU és capaç d'unir-se a l'avidina i verificar si l'enllaç èster es pot trencar en condicions suaus.

La DMPDU-C-C₄-CO₂CH₂Ph-OCH₃ (**45**, Esquema 33) es va preparar per bromació de l'alcohol 4-metoxibenzílic amb tribromur de fòsfor per obtenir el bromur de 4-metoxibenzil (**44**) amb un rendiment del 92%. Després es va substituir el grup bromur per reacció amb la sal potàssica DMPDU-C-C₄-CO₂K a través d'un mecanisme S_N2, amb un rendiment del 80%.



Esquema 33. Esquema sintètic de la síntesi del compost model (**45**)

La constant d'associació del compost model (**45**) a l'avidina es va determinar per el mètode de valoració competitiva amb HABA (Figura 58) en medi tampó PB:DMSO 85:15, per afavorir la solubilitat del compost **45**, i va resultar ser de $9,5 \times 10^3 \text{M}^{-1}$.

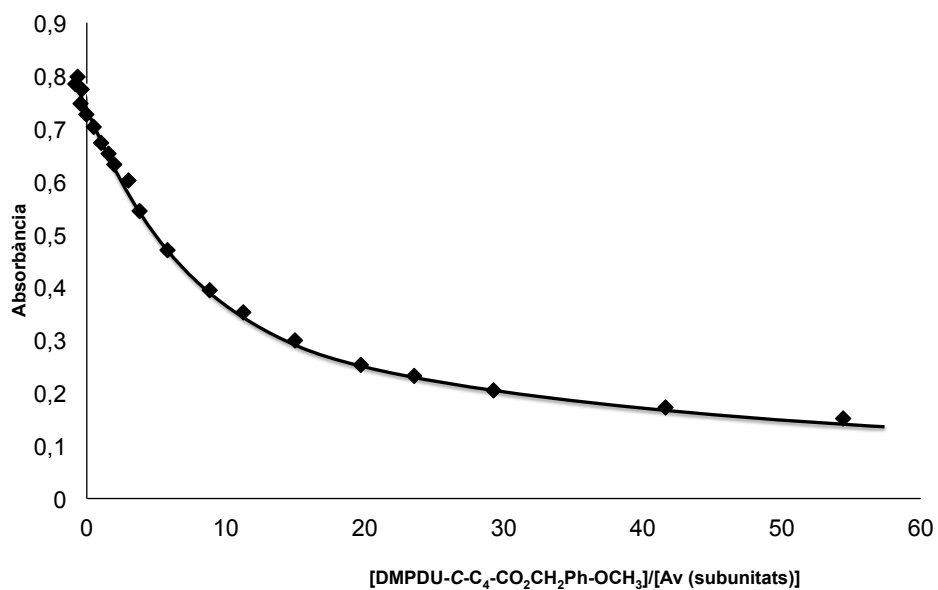
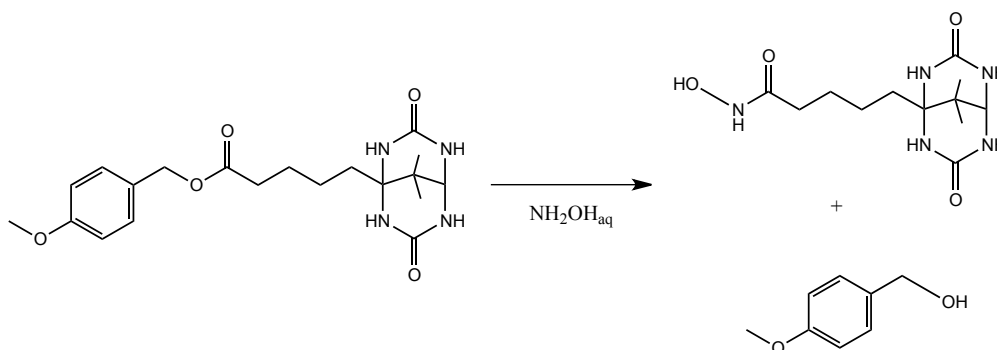


Figura 58. Canvis d'absorbància a 500 nm en la valoració de Av 47.3 μM (tetràmer) i HABA 81.3 μM amb el lligand **45** en PB 0,1 M:DMSO 85:15 a pH = 7.0. La línia contínua representa l'ajust de les dades.

5.2.2 Optimització de les condicions de trencament de l'enllaç ester del compost model (45) amb hidroxilamina

En primer lloc es volia trobar les condicions més suaus possibles per trencar l'enllaç ester entre el lligand de menor afinitat i la resina Nova PEG Wang. Per això es va utilitzar el compost model DMPDU-C-C₄-CO₂CH₂Ph-OCH₃ (**45**), en el que el lligand de baixa afinitat està funcionalitzat en forma d'ester benzílic (Esquema 34).

Com a condicions de trencament es va provar NH₂OH en medi de tampó fosfats 0,1M a diferents valors de pH. El progrés de la reacció es va seguir per CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 1:1)



Esquema 34. Esquema de la reacció de trencament del compost model (**45**) amb hidroxilamina.

Condicció	Resultat a les 24h
NH ₂ OH 10mM PB 0,1M pH 6,0	No reacciona*
NH ₂ OH 10mM PB 0,1M pH 7,0	No reacciona*
NH ₂ OH 10mM PB 0,1M pH 8,0	Reacciona parcialment
NH ₂ OH 10mM PB 0,1M pH 8,5	Reacciona totalment

*No s'observa àcid hidroxàmic per CCF

Taula 9. Proves de trencament de l'enllaç ester de del compost model (**45**).

Les condicions de trencament més suaus en les que la reacció es va completar van resultar ser les d'utilitzar hidroxilamina 10 mM a pH=8,5 (Taula 9), pH que es considera compatible amb les proteïnes (S)Av.

A continuació es va buscar quin era el temps de reacció necessari per al trencament de l'enllaç ester entre el lligand de menor afinitat i la resina Nova Syn

TG. En aquest cas es va utilitzar com a compost model la DMPDU-C-C₄-CO₂-sp-NH₂ (**37**), ja que és més soluble en medi aquós.

Es va realitzar un estudi cinètic de la reacció de trencament de la DMPDU-C-C₄-CO₂-sp-NH₂ (**37**) amb hidroxilamina 10mM amb bicarbonat d'amoni 10mM pH 8,5 parant alíquotes de la reacció cada 30 min diluint-les i congelant-les. Es van analitzar quantificant el producte de la reacció (àcid hidroxàmic, **39**) per HPLS-MS/ESI.

El resultat va ser que en 4 hores la reacció de trencament de l'enllaç ester ja arriba a ser quantitativa (Figura 59). Per tant, les condicions de trencament òptimes de trencament de l'enllaç ester són utilitzar hidroxilamina 10mM amb bicarbonat d'amoni 10mM pH 8,5 durant 4 hores.

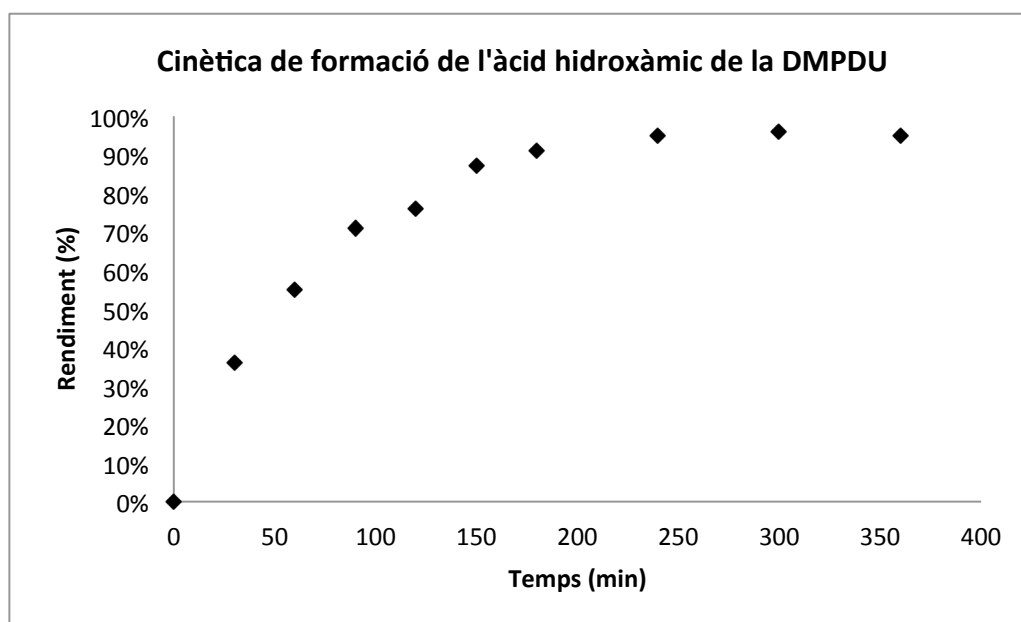
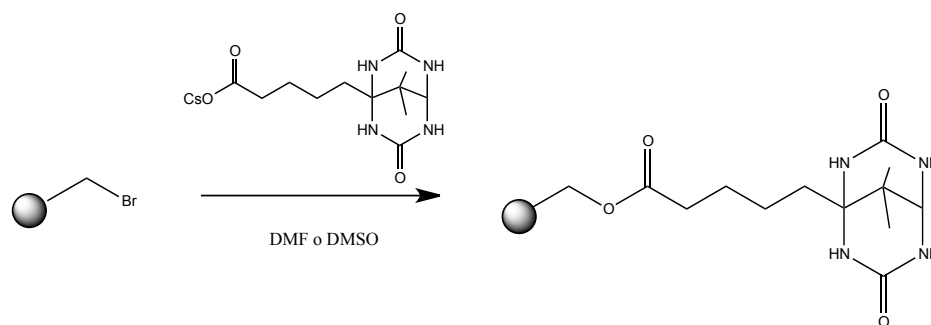


Figura 59. Representació del rendiment en funció del temps de la cinètica de trencament de l'enllaç ester de DMPDU-C-C₄-CO₂-sp-NH₂ (**37**).

5.2.3 Funcionalització de resines amb DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**)

5.2.3.1 NovaSyn TG Bromo Resin

Aquesta resina va ser funcionalitzada amb DMPDU fent-la reaccionar amb 5 equivalents de la sal de Cessi del lligand de baixa afinitat DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) en DMSO durant 3 dies (Esquema 35).

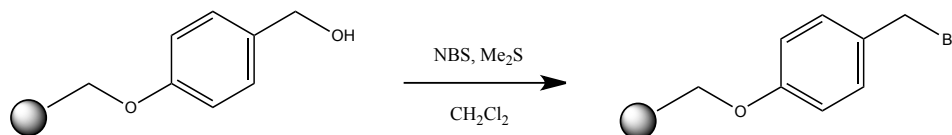


Esquema 35. Esquema sintètic de la funcionalització de la resina NovaSyn TG amb DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**)

El grau de funcionalització de la resina amb DMPDU es va determinar trencant l'enllaç ester que uneix el lligand a la resina amb NH₂OH 10mM en bicarbonat d'amoni 10mM a pH=8,5 durant 4 hores. Posteriorment es quantificà l'àcid hidroxàmic resultant (**39**) mitjançant HPLC-MS/ESI. La funcionalització obtinguda va ser de 0,28 mmol/g.

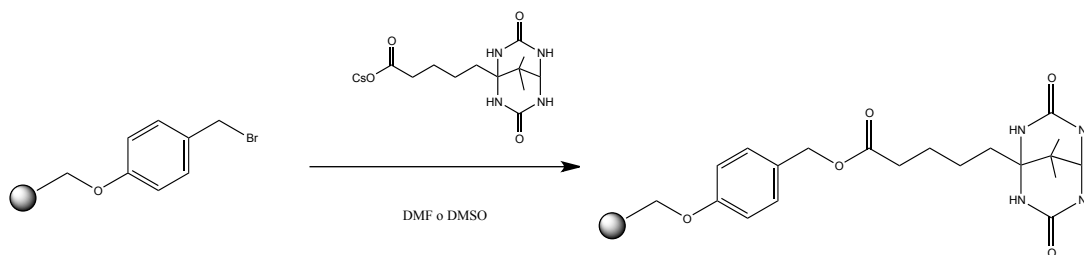
5.2.3.2 NovaPEG Wang Resin

La resina va ser primer bromada amb NBS (11 equivalents) en clorur de metilè durant 3 hores a 0°C (Esquema 36).



Esquema 36. Esquema sintètic de **47**

Posteriorment es va fer reaccionar amb 5 equivalents de la sal de Cessi del lligand de baixa afinitat DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) durant 3 dies, en DMSO i també DMF com a dissolvents (Esquema 37).¹⁴⁹



Esquema 37. Esquema sintètic de la funcionalització de la resina NovaPEG Wang amb DMPDU-C-C₄-CO₂H (5)

La funcionalització es va determinar trencant l'enllaç ester que uneix el lligand amb la resina amb NH₂OH 10mM en acetat d'amoni 10mM pH=8,5 durant 4 hores. Posteriorment es quantifica l'àcid hidroxàmic resultant mitjançant HPLC-MS/ESI.

Els graus de funcionalització obtinguts s'indiquen en la taula 10:

Resina resultant	Dissolvent	Grau de funcionalització (mmol/g)	Grau de conversió global* (%)
NovaPEG Wang-DMPDU-A	DMF	0,27	34
NovaPEG Wang-DMPDU-B	DMSO	0,75	94

*Bromació i substitució nucleòfila.

Taula 10. Grau de funcionalització de la resina NovaPEG Wang amb DMPDU i grau de conversió global.

Les resines amb funcionalització 0,27 mmol/g i 0,75 mmol/g les anomenarem respectivament NovaPEG Wang-DMPDU-A i NovaPEG Wang-DMPDU-B.

El diferent grau de funcionalització podria ser degut a varis factors com poden ser:

- El diferent grau d'inflament de la resina segons sigui el dissolvent DMSO o DMF
- El diferent grau d'autoassociació de la DMPDU que podria fer disminuir el nombre de grups carboxilat disponibles per a la reacció de substitució nucleòfila.

5.2.4 Ancorament de l'avidina a les resines derivatitzades amb el lligand DMPDU.

S'han realitzat ancoraments d'avidina en les tres resines funcionalitzades amb el lligand DMPDU (NovaSyn TG-DMPDU, NovaPEG Wang-DMPDU-A i NovaPEG Wang-DMPDU-B).

En primer lloc s'ha utilitzat per als tres ancoraments un gran defecte d'avidina respecte del grup DMPDU, concretament relacions molars DMPDU:subunitats d'avidina de 37:1, 39:1 i 52:1 respectivament. Amb aquest defecte d'avidina es pretén que la major part possible de la proteïna es quedi fortament (divalentment) unida a la resina.

Les barreges s'han deixat evolucionar durant 1 hora per tal d'afavorir que, si hi hagués avidina unida inicialment de manera monovalent en un lloc, aquesta es pogués dissociar i ancorar-se divalentment en un altre lloc.

A continuació s'han rentat les resines amb aigua i s'ha quantificat l'avidina ancorada a cada resina.

Finalment, la resina que ha presentat un major grau d'ancorament (en condicions de defecte d'avidina), s'ha sotmès a unes altres condicions d'ancorament, en les quals la quantitat d'avidina afegida fos un excés respecte de la quantitat estequiomètrica corresponent a una hipotètica unió totalment divalent.

5.2.4.1 Mètodes utilitzats per quantificar l'ancorament de l'avidina a la resina

Es van utilitzar dos mètodes per analitzar el grau de funcionalització de la resina resultant i la quantitat d'avidina ancorada:

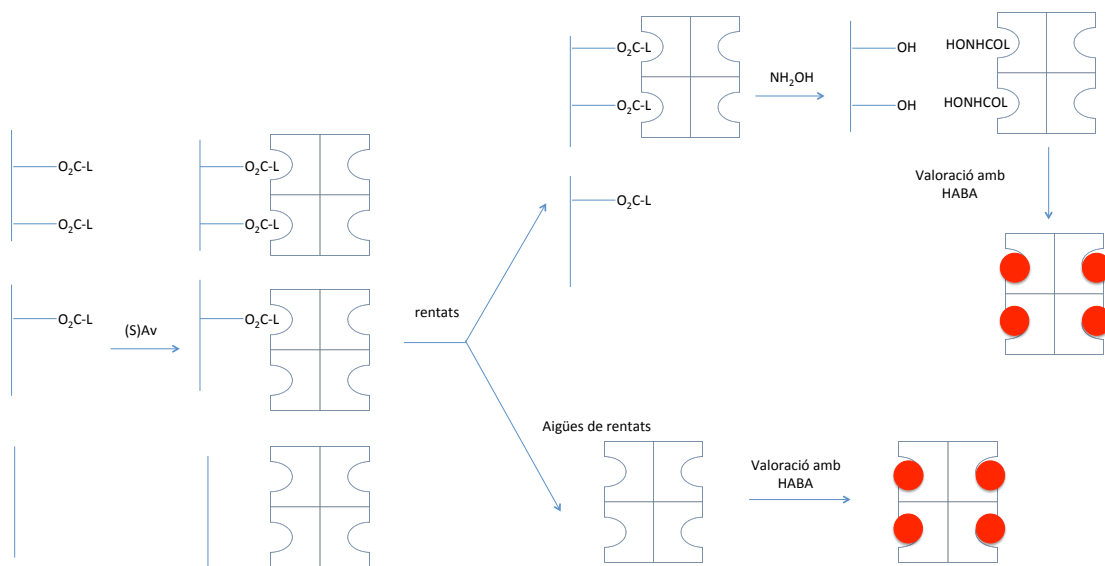
- **Mètode A. Valoració de l'avidina recuperada en els rentats.**

L'avidina que resta ancorada a la resina després dels primers rentats amb aigua hauria de ser aquella que s'ha unit divalentment a la resina, mentre que l'avidina unida de forma monovalent, ens l'hauríem d'haver emportat amb els primers rentats, ja que l'afinitat seria moderada (Esquema 38).

Com que sabem quina quantitat d'avidina s'ha afegit a la resina, quantificant l'avidina que hi ha en les aigües dels primers rentats (valoració amb HABA) es pot deduir, per diferència, l'avidina que ha quedat ancorada a la resina i el grau de funcionalització de la resina amb l'avidina.

- **Mètode B. Valoració de l'avidina resultant del desancorament de la resina.**

Després dels primers rentats, l'avidina que havia quedat ancorada a la resina es desancora per trencament de l'enllaç ester amb hidroxilamina i es quantifica de manera directa per valoració competitiva amb HABA (Esquema 38).



Esquema 38. Representació dels mètodes emprats per determinar l'ancorament de la proteïna avidina a les resines funcionalitzades amb el lligand DMPDU-C-C₄-CO₂H (L₁-CO₂H).

Les dues metodologies haurien de donar resultats bastant similars, i és d'esperar que si hi ha diferències degut a l'error experimental dels mètodes, aquestes siguin petites. Tot i així, en tots els casos l'avidina ancorada a la resina s'ha quantificat pels dos mètodes.

5.2.4.2 Ancoraments amb un defecte d'avidina

5.2.4.2.1 Resina NovaSyn TG-DMPDU

Es va afegir a la resina NovaSyn TG-DMPDU que té un grau de funcionalització de 0,28 mmol/g, una quantitat d'avidina tal que la relació molar lligand DMPDU/subunitats d'Av fos de 37:1.

Passada una hora es va rentar la resina amb aigua i es va analitzar pels dos mètodes (A i B, apartat 5.2.3.1) l'avidina que havia restat ancorada després dels rentats.

En aquest cas, malgrat estar en defecte, l'avidina afegida no va ser capaç d'ancorar-se totalment a la resina, sinó que només es va ancorar un 60% de l'avidina afegida (Taula 11). Aquest moderat grau d'ancorament es pot explicar considerant que els 0,28 mmols de DMPDU per gram de resina equivalen a 0,14 mmols de parells de DMPDU per gram de resina. Si en tots aquests parells de grups DMPDU tinguessin una disposició espacial òptima, cada parell de DMPDU podria unir-se divalentment a una avidina tetramèrica i per tant podríem arribar a ancorar fins a 0,14 mmol d'avidina tetramèrica per gram de resina. Com que la quantitat d'avidina afegida ($1,9 \times 10^{-3}$ mmol de tetràmer per gram de resina) és bastant inferior, només que un 1,4% de totes les parelles de grups DMPDU tinguessin la disposició espacial òptima, amb el temps, tota l'avidina s'hauria d'haver unit divalentment i no ens l'hauríem d'haver emportat amb els rentats.

El fet que després dels rentats només quedessin ancorats $1,1 \times 10^{-3}$ mmol d'avidina tetramèrica per gram de resina semblaria indicar, suposant que tota l'avidina que va quedar ancorada presentés una unió de tipus divalent, que només un 60% de l'avidina afegida s'hauria unit de forma divalent.

Això indicaria que hi ha $2,3 \times 10^{-3}$ mmol de DMPDU per gram de resina han restat units divalentment a l'avidina després dels rentats, que representaria un 0,8% del total de grups DMPDU que conté la resina (Taula 11).

Per tant, sembla que només un 0,8% dels grups DMPDU de la resina tenen una disposició espacial òptima per a unir-se de forma divalent a l'avidina, sempre i quan el temps d'espera d'una hora hagi estat suficient per permetre la redistribució de l'avidina cap un ancorament divalent òptim per a aquesta resina.

Concepte	Quantitat (mmol/g de resina)
1. Grau de funcionalització amb DMPDU	$2,8 \times 10^{-01}$
2. Total avidina afegida*	$1,9 \times 10^{-03}$
3. Avidina eliminada amb els rentats*	$6,8 \times 10^{-04}$
4. Avidina ancorada*	
• Mètode A	$1,2 \times 10^{-03}$
• Mètode B	$1,1 \times 10^{-03}$
5. Percentatge d'avidina ancorada	60%
6. Percentatge de DMPDU ancorada a avidina	0,8%
7. Relació molar DMDPU:subunitats Av afegida	37:1

*Expressat en mmols de tetràmer/g de resina

Taula 11. Ancorament de l'avidina a la resina NovaSyn TG-DMPDU

5.2.4.2.2 Resina NovaPEG Wang-DMPDU-A

A continuació es va realitzar un experiment similar, també amb defecte d'avidina, amb la resina NovaPEG Wang-DMDPU-A que té un grau de funcionalització de 0,27 mmol de DMPDU per gram de resina (molt similar al de la resina NovaSyn TG-DMPDU).

En aquest cas, la relació molar DMPDU:subunitats d'avidina va ser de 39:1.

Després de 1 hora, es va rentar la resina amb aigua i es va quantificar pels dos mètodes l'avidina que havia restat ancorada, que va resultar ser de $1,2 \times 10^{-3}$ mmol d'avidina tetramèrica per gram de resina. Això representa un 70% del total d'avidina afegida (Taula 12). Aquest petit increment en el percentatge d'avidina ancorada en el cas de la resina NovaPEG Wang-DMDPU-A respecte de la NovaSyn TG-DMPDU podria indicar una major facilitat per adoptar la disposició espacial òptima dels parells de grups DMPDU en el cas de la resina NovaPEG Wang-DMDPU-A, ja que el grau de funcionalització amb DMPDU és molt similar en totes dues resines.

No obstant, aquesta quantitat representaria que només un 0,9% dels lligands DMPDU de la resina tenen la disposició espacial òptima per permetre una unió divalent amb la proteïna sempre i quan el temps d'espera d'una hora hagi estat suficient per permetre la redistribució de l'avidina cap un ancorament divalent òptim per a aquesta resina.

Tal com veurem posteriorment, amb la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B el temps d'espera de 1 hora abans dels rentats sí que va ser suficient per ancorar tota l'avidina. Per tant suposem que el temps d'espera de 1 hora també és suficient en el cas de la resina NovaPEG Wang-DMPDU-A.

Concepte	Quantitat (mmol/g de resina)
1. Grau de funcionalització amb DMPDU	$2,7 \times 10^{-01}$
2. Total avidina afegida*	$1,7 \times 10^{-03}$
3. Avidina eliminada amb els rentats*	$5,9 \times 10^{-04}$
4. Avidina ancorada*	
• Mètode A	$1,1 \times 10^{-03}$
• Mètode B	$1,3 \times 10^{-03}$
5. Percentatge d'avidina ancorada	70%
6. Percentatge de DMPDU ancorada a avidina	0,9%
7. Relació molar DMPDU:subunitats Av afegida	39:1

*Expressat en mmols de tetràmer/g de resina

Taula 12. Ancorament de l'avidina a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-A.

En resum, veiem que dues resines diferents (NovaSyn TG-DMPDU i NovaPEG Wang-DMPDU-A) amb graus de funcionalització de grups DMPDU similars i relativament baixos (al voltant de 0,27 mmol DMPDU/g) presenten graus d'ancorament d'avidina moderats (60-70%) malgrat treballar amb un defecte d'avidina.

Per tant, sembla que per tenir un grau d'ancorament d'avidina superior ens caldria una resina amb un grau de funcionalització de grups DMPDU més elevat, de manera que aquests quedessin més propers els uns als altres i augmentés la formació d'unions divalents amb l'avidina. Aquest major grau de funcionalització dels grups DMPDU és el que ens aporta la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B que es descriu a continuació.

5.2.4.2.3 Resina NovaPEG Wang-DMPDU-B

Aquesta resina té un grau de funcionalització de grups DMPDU de 0,75 mmol DMPDU/g, superior a les dues resines estudiades anteriorment. En aquest cas, l'avidina afegida encara va estar en major defecte respecte dels grups DMPDU, de manera que la relació molar lligand de DMPDU i subunitats d'avidina va ser de 52:1.

Després de 1 hora es va rentar la resina amb aigua i es va quantificar pels dos mètodes el percentatge d'avidina que havia restat ancorada, que va resultar ser del 100%.

Aquest ancorament total de l'avidina afegida en el cas de la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B és degut a que aquesta resina té un grau de funcionalització de DMPDU tres vegades superior al de la resina NovaPEG Wang-DMPDU-A i això fa que els grups DMPDU quedin més propers en l'espai i un major nombre de parells de grups DMPDU puguin adoptar la disposició espacial òptima per a unir-se divalentment a l'avidina. Per altra banda, la quantitat d'avidina afegida només ha estat dues vegades superior a la que es va afegir a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-A.

Tot i així, el percentatge de grups DMPDU units a l'avidina és només un 1,1% de la quantitat total de grups DMPDU que hi ha en la resina, ja que l'avidina afegida estava en un gran defecte.

Concepte	Quantitat (mmol/g de resina)
1. Grau de funcionalització amb DMPDU*	$7,5 \times 10^{-01}$
2. Total avidina afegida*	$3,6 \times 10^{-03}$
3. Avidina eliminada amb els rentats *	no es detecta
4. Avidina ancorada	
• Mètode A	$3,6 \times 10^{-03}$
• Mètode B	$3,6 \times 10^{-03}$
5. Percentatge d'avidina ancorada	100%
6. Percentatge de DMPDU ancorada a avidina	1,0%
7. Relació molar DMDPU:subunitats Av afegida	52:1

*Expressat en mmols de tetràmer/g de resina

Taula 13. Ancorament de l'avidina a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B

Per esbrinar quin percentatge de grups DMPDU de la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B tenien la disposició espacial adequada per a formar unions divalents fortes amb l'avidina es va realitzar un experiment d'ancorament d'aquesta resina amb un excés d'avidina.

5.2.4.3 Ancorament a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B amb un excés d'avidina.

En aquest experiment es va afegir a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B una quantitat d'avidina tal que la relació molar lligand DMPDU:subunitats d'avidina fos de 1:4,4.

Després de 1 hora es va rentar la resina amb tampó fosfats i es va quantificar l'avidina ancorada que va resultar ser de 0,36 mmol de tetràmer/g de resina. Això significa que aquesta resina conté 0,72 mmols de grups DMPDU/g amb una disposició espacial adequada per formar unions divalents amb l'avidina. És a dir, que en la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B, un 97% dels grups DMPDU tenen la disposició adequada per a formar unions divalents amb l'avidina.

Així doncs, en el cas de la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B, una Funcionalització de 0,75 mmols de grups DMPDU/g ja és suficient per a que quasi tots ells (concretament un 97% d'ells) s'aprofitin per ancorar l'avidina.

Concepte	Quantitat (mmol/g de resina)
1. Grau de funcionalització amb DMPDU*	0,75
2. Total avidina afegida*	0,82
3. Avidina eliminada amb els rentats *	0,46
4. Avidina ancorada	
• Mètode A	0,36
• Mètode B	0,36
5. Percentatge d'avidina ancorada	44%
6. Percentatge de DMPDU ancorada a avidina	97%
7. Relació molar DMPDU:subunitats Av afegida	1:4,4

*Expressat en mmols de tetràmer/g de resina

Taula 14. Ancorament de l'avidina a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B.

Com que l'avidina ancorada encara té aproximadament la meitat dels llocs d'unió desocupats, es va intentar ocupar-los amb un compost biotinitat que fos fluorescent, concretament la biotina-4-fluoresecina. També es va estudiar si un excés de compost biotinitat era capaç de competir amb els grups DMPDU i desancorar l'avidina.

5.2.4.4 Unió de biotina-4-fluoresceïna a l'avidina immobilitzada en la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B.

En primer lloc, a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B a la qual s'havia ancorat avidina (tal com s'ha descrit a l'apartat 5.2.4.3.), després dels rentats amb aigua, se li va afegir una quantitat de biotina-4-fluoresceïna (Bt-FI) de manera que la relació molar entre tetràmer d'avidina i Bt-FI fos 1:1,9. Aquesta quantitat de Bt-FI seria suficient per ocupar gairebé tots els llocs d'unió desocupats que li queden a l'avidina unida a la resina. Però al estar en lleuger defecte, evitem que quedi Bt-FI lliure en solució i que part de l'avidina es pugui desancorar al haver-hi competició entre la Bt-FI i la DMPDU unida a la resina. Després de 1 hora es van fer rentats que no van presentar fluorescència, fet que demostra que tota la Bt-FI s'ha unit a l'avidina i no n'ha quedat en solució (Taula 15).

A continuació, es va afegir a la resina anterior una quantitat de Bt-FI similar a la de la primera addició, de manera que pogués competir amb els grups DMPDU i , en el cas que la competició li fos favorable, pogués desancorar tota l'avidina ocupant tots els seus llocs d'unió. És a dir que, considerant les dues addicions, la relació molar entre tetràmer d'avidina i Bt-FI fos 1:4. La finalitat d'aquesta segona addició de Bt-FI era comprovar si un excés de compost biotinitat de baix pes molecular era capaç de competir amb els grups DMPDU i desancorar l'avidina unida a la resina. Al cap de 1 hora, es van fer rentats que sí que van presentar fluorescència. A partir de l'absorbància a 280 nm es va poder quantificar l'avidina que s'havia desancorat, que va resultar ser un 15% de l'avidina ancorada inicialment.

Generalment els compostos biotinitats presenten una afinitat per l'avidina i l'estreptavidina inferior que la que presenta la pròpia biotina. Això és degut a que, al derivatitzar la biotina a través del seu grup carboxilat, la xarxa d'interaccions no covalents amb la proteïna es veu modificada. Per avaluar quant robusta era la unió de l'avidina a través dels lligands DMPDU es va afegir a continuació el lligand de major afinitat, la biotina, i es va quantificar l'avidina que era capaç de desancorar.

Així doncs, a continuació es va afegir a la resina que tenia ancorada Av:Bt-FI una quantitat de biotina tal que la relació molar entre el tetràmer de l'avidina ancorada i la biotina fos 1:4. Després de 1 hora es van fer rentats i es va comprovar que també presentaven fluorescència. A partir de l'absorbància a 280 nm es va

poder quantificar l'avidina que s'havia desancorat, que va resultar ser un 15% de l'avidina ancorada inicialment.

Per últim, es va procedir a trencar l'enllaç èster entre la DMPDU i la resina, amb hidroxilamina 10 mM en tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a pH=8,5 durant 4 hores. Seguidament es van realitzar rentats que van presentar fluorescència. A partir de l'absorbància a 280 nm es va determinar que l'avidina que s'havia desancorat era un 70% de l'avidina ancorada inicialment.

Concepte	Quantitat (mmol/g de resina)
Grau de funcionalització amb DMPDU	0,75
Avidina ancorada*	0,36
Bt-FI afegida en 1a addició	0,69
Avidina eliminada amb els rentats de 1a addició*	n.d.
Bt-FI afegida en 2a addició	0,75
Avidina eliminada amb els rentats de 2a addició*	0,054
Bt Afegida	1,4
Avidina eliminada amb els rentats addició Bt*	0,055
NH ₂ OH Afegida	100
Avidina eliminada després addició NH ₂ OH*	0,25

*Expressat en mmols de tetràmer/g de resina

Taula 15. Unió de Bt-FI a la resina NovaPEG WANG-DMPDU-B funcionalitzada amb avidina.

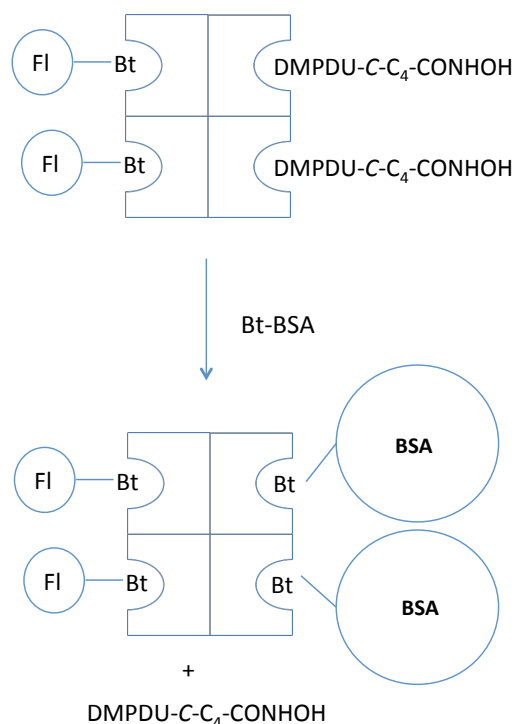
Per tant podem concloure que l'avidina ancorada a la resina es pot funcionalitzar amb un compost biotinitat i que, si aquest no està en excés, no provoca desancorament de l'avidina. Un excés de Bt-FI només provoca el desancorament d'un 15% de l'avidina unida a la resina, mentre que un excés de Bt, provoca el desancorament d'un altre 15% de l'avidina.

Sembla doncs, que la disposició dels grups DMPDU en la resina fa que un 70% de l'avidina formi una unió divalent molt robusta (ja que no es desancora ni tant sols amb biotina), un altre 15% formi una unió divalent una mica menys robusta (ja que es desancora amb biotina però no amb Bt-FI) i un altre 15% formi una unió divalent encara menys robusta (ja que es desancora amb Bt-FI).

5.2.5 Formació del conjugat heterobifuncional d'avidina amb fluoresceïna i BSA.

En trencar l'enllaç ester amb hidroxilamina, els grups DMPDU han passat d'actuar com a lligands divalents a unir-se de forma monovalent a l'avidina, amb el que això comporta de disminució de la seva afinitat. Per tant, després del desancorament, els grups DMPDU podran ser desplaçats quantitativament dels seus llocs d'unió a l'avidina en presència d'un compost biotinitat.

Així doncs, a l'avidina desancorada pel trencament de l'enllaç ester se li va afegir una quantitat d'albumina biotinitada (Bt-BSA) tal que la relació molar entre tetràmer d'avidina i Bt-BSA fos 1:2. Amb l'addició d'aquesta quantitat de Bt-BSA seria d'esperar que la proteïna biotinitada desplaqués tot l'àcid hidroxàmic de la DMPDU (39) que restava unit a l'avidina, formant-se el corresponent conjugat heterobifuncional (Esquema 39).



Esquema 39. Representació de la formació del conjugat heterobifuncional d'avidina amb fluoresceïna i BSA.

Per a verificar que no queda DMPDU unida a l'avidina es van afegir quantitats creixents d'HABA i es va comprovar mitjançant espectroscòpia UV-Vis que la solució d'avidina no presentava banda a 500 nm corresponent a l'HABA unit a l'avidina. Aquest fet ens va confirmar que no quedava DMPDU unida a l'avidina, ja

que havia estat desplaçada per la Bt-BSA. Per tant, aquest experiment demostra d'una manera indirecta que s'ha format un conjugat heterobifuncional d'avidina amb Bt-FI unida a dos llocs d'unió d'un costat de la proteïna, i Bt-BSA en l'altre costat de la proteïna.

En resum, la metodologia que s'ha desenvolupat per tal de preparar conjugats heterobifuncionals d'avidina consistiria en les següents etapes (esquema 22):

1. Funcionalitzar la resina, com ara la NovaPEG WANG, amb grups DMPDU a través d'un enllaç ester amb un grau de funcionalització adequat (per exemple de 0,75 mmol DMPDU/g de resina).
2. Incubar durant una hora aquesta resina amb una quantitat d'avidina tal que la relació molar de grups DMPDU:subunitats d'avidina sigui de 1:4,4.
3. Rentar amb aigua per eliminar l'avidina no ancorada o ancorada mitjançant una unió poc robusta i, si s'escau, quantificar per diferència la que ha quedat ancorada.
4. Incubar la resina sobre la que s'ha ancorat avidina amb una quantitat estequiomètrica del primer compost biotinitat, considerant que només estan desocupats la meitat dels llocs d'unió de l'avidina.
5. Rentar amb aigua per eliminar possibles restes del primer compost biotinitat que no s'haguessin ancorat.
6. Desancorar el conjugat del primer compost biotinitat i l'avidina per trencament de l'enllaç ester amb hidroxilamina (hidroxilamina 10mM a pH 8,5).
7. Afegir a la solució que conté el conjugat anterior una quantitat estequiomètrica del segon compost biotinitat considerant que ha de desplaçar els grups DMPDU que ocupen l'altra meitat dels llocs d'unió de l'avidina.

6 PART EXPERIMENTAL

6.1 Mètodes Generals

6.1.1 Dissolvents i reactius

Els reactius comercials van ser utilitzats directament, sense prèvia purificació si no s'especifica el contrari i comprovant que les dades espectroscòpiques experimentals corresponien amb les teòriques.

El PS-CO₂H utilitzat és comercial (Mn=2000, Mw/Mn=1,20) (Sigma-Aldrich)

Els dissolvents utilitzats en les reaccions van ser purificats i assecats quan va ser necessari.

Per tal d'obtenir el DMSO anhidre es va fer una congelació parcial del DMSO comercial i a continuació es va destil·lar el DMSO a pressió reduïda sobre CaH₂, descartant els caps i recollint el DMSO anhidre sota atmosfera de N₂.

L'aigua utilitzada per a realitzar els experiments d'unió del lligand a la proteïna, HPLC, i voltametria es va filtrar i purificar en un sistema Millipore (Milli-Q).

6.1.2 Instrumentació general

Punt de fusió (Pf): mesurats amb un aparell Kofler Reichert Thermovar amb llum polaritzada i no estan corregits.

Espectroscòpia d'infraroig (IR): es van realitzar utilitzant un aparell de transformada de Fourier Nicolet 510 FT-IR o Perkin-Elmer 681, utilitzant per a les mostres sòlides barreges sòlides amb KBr i per a les mostres líquides una pel·lícula sobre una pastilla de NaCl.

Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN): els espectres es van enregistrar en dissolucions de CDCl_3 , CD_3OD , $d_6\text{-DMSO}$, D_2O o $d_6\text{-acetona}$ segons el cas. Els aparells utilitzats són:

- Varian-Gemini 200 per ^1H -RMN (200 MHz) i ^{13}C -RMN (50 MHz)
- Bruker-Unity 300 per ^1H -RMN (300 MHz) i ^{13}C -RMN (75 MHz)
- Mercury 400 per ^1H -RMN (400 MHz) i ^{13}C -RMN (100 MHz)

Els desplaçaments químics es donen en ppm i referenciats respecte al TMS (^1H i ^{13}C , δ : 0,0), al CDCl_3 (^1H , δ : 7,26, ^{13}C , δ : 77,0), al CD_3OD (^1H , δ : 3,34, ^{13}C , δ : 49,86), al $d_6\text{-DMSO}$ (^1H , δ : 2,54, ^{13}C , δ : 40,45), i a la $d_6\text{-acetona}$ (^1H , δ : 2,09, ^{13}C , δ : 30,6). Les constants d'acoblament (J) es donen en Hz i la seva multiplicitat s'indica de la següent manera: s (singlet), d (doblet), dd (doblet de doblets), dt (doblet de triplets), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet) i així successivament. La multiplicitat del carboni (CH_3 : carboni primari), (CH_2 : carboni secundari), (CH : carboni terciari) i (C : carboni quaternari) s'estableix a partir d'experiments DEPT i correlació per HSQC.

Espectrometria de masses (MS): Els espectres de masses es van realitzar per ESI (espectròmetre de masses ZQ, Micromass, UK), FAB (espectròmetre de masses VG-QUATTRO, Micromass, UK), ionització química i MALDI al Departament de Química Orgànica de la UB i Mariner ESI-TOF (Applied Biosystems) al Servei de Masses dels Serveis Científic-Tècnics.

Espectroscòpia d'UV-Visible: Els espectres UV-Visible es van realitzar amb un espectrofotòmetre CARY 500 Scan / UV-Vis-NIR.

Espectroscòpia de fluorescència: Els espectres de fluorescència es van realitzar en un aparell Aminco Bowman Series 2 connectat a un termòstat Haake DC 10 a una temperatura de 25°C . Les esletxes d'excitació es van mantenir a 4 nm i les d'emissió es van mantenir a 16 nm. El voltatge aplicat per a fotomultiplicar el senyal al detector es va

anar variant en funció de cada conjunt de mesures per tal de no saturar el detector. Es va emprar una cubeta de quars d'un cm de pas de llum.

Espectroscòpia Raman: Els espectres de Raman van ser enregistrats en un espectrofotòmetre Jobin Yvon T64000 utilitzant una línia d'excitació de 488,0 nm d'un làser d'Ar⁺ Coherent INNOVA 300.

pH-metre: Les mesures de pH es van dur a terme mitjançant un pH-metre Cyberscan 510.

Cromatografia en columna flash: Es va utilitzar gel de sílice (SDS, 35-70 µm) i pressió d'aire per a compactar les columnes i eluir els productes.

Cromatografia en capa fina (CCF): Es va realitzar sobre plaques cromatogràfiques de gel de sílice de Merck (DC-Alufolien KIESELGEL 60 F254; SiO₂ de 0,2 mm) i els components es van visualitzar sota una làmpada de llum ultraviolada a 254 nm o 365 nm, o per tractament amb els següents reveladors:

- Les plaques van ser exposades a vapors de Cl₂ gas i a continuació a un agent revelador de 4,4'-metilenbis(*N,N*-dimetilanilina) (TDM). Amb aquest procediment eren actius els grups amida, fenols, àcids carboxílics, urea i amina entre d'altres.

- Permanganat de potassi: 3 g KMnO₄, 20 g K₂CO₃, 300 mL d'aigua i 5 mL de NaOH_{aq}. (5%). Aquest revelador va ser útil per a pràcticament tots els grups funcionals.

- Iode: vapors de iode. Aquest revelador es va utilitzar per detectar una gran quantitat de grups funcionals.

Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC): Les mesures d'HPLC es van fer utilitzant els aparells següents: Shimadzu (amb bombes LC9A i LC10A) i detector UV o detector de díode-Array, Waters 510 amb detector d'índex de refracció i Waters acoblat a detector de díode-Array i espectròmetre de masses electrospray (Micromass ZQ). Es van utilitzar segons el cas, les següents columnes: Kromasil C18 (30 x 0,46 cm Ø), Kromasil C18 (15 x 4,5 cm Ø).

GPC: Les mesures de GPC es van realitzar al Servei de Cromatografia de Líquids dels Serveis Científic-Tècnics utilitzant una columna d'exclusió molecular (Superosa 12 10/30).

AFM: Les imatges d'AFM de les SAMs es van realitzar amb una Electrònica Dulcinea de Nanotec.

Voltametria Cíclica: Les mesures de voltametria cíclica van ser realitzades amb un voltamperòmetre analògic connectat a als elèctrodes disposats en una cel·la electroquímica (Figura 85, Secció 6.3.11).

Monocapes de Langmuir:

Les monocapes de Langmuir van ser realitzades en una cubeta de tefló amb unes barreres que poden moure's a velocitat variable (Figura 60). La pressió superficial es va mesurar mitjançant una placa de Wilhelmy que consta d'una placa de cel·lulosa (paper de filtre) submergida a l'aigua parcialment (de 1 cm^2 aproximadament) penjada d'una microbalança. La pressió superficial és la diferència de tensió superficial entre l'aigua i la de la monocapa.). La cubeta de Langmuir es va controlar per un software proporcionat pel fabricant de la cubeta (KSV LB Control Software), que permet controlar la posició i velocitat de les barreres i enregistrar la variació de pressió superficial i de les isoterms.

Per a isomeritzar fotoquímicament es va utilitzar una làmpada amb una potència de 6 W d'una sola longitud d'ona 365 nm . L'aigua utilitzada és sempre milli-Q i totes les solucions tampó es filtren posteriorment amb un filtre de $0,4 \text{ \AA}$.

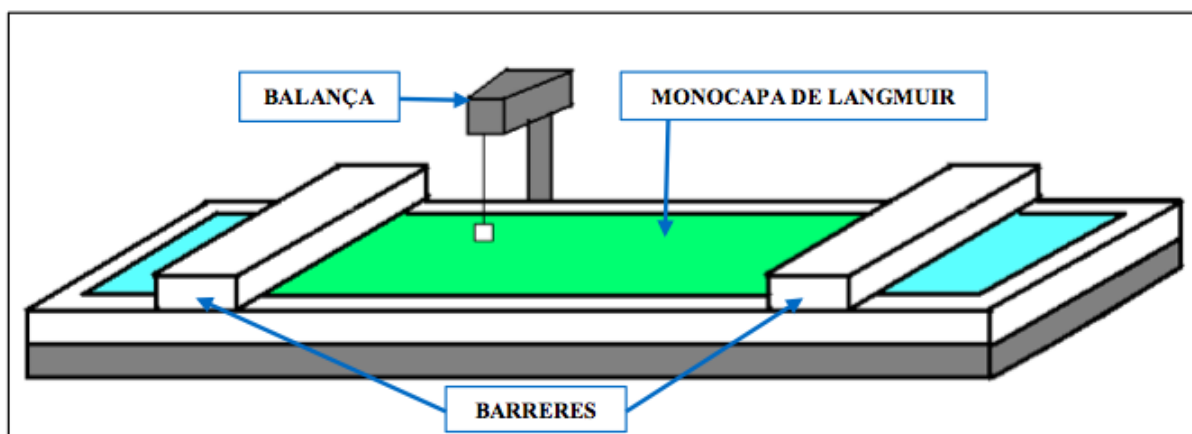


Figura 60. Representació de la cubeta on es van realitzar les monocapes de Langmuir.

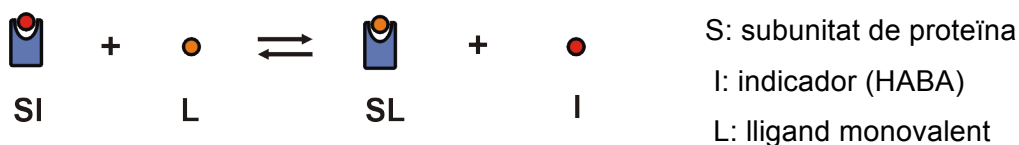
Microscopia d'Angle Brewster (BAM): Les imatges es van obtenir mitjançant un microscopi d'angle Brewster. El microscopi disposa d'un làser amb un díode làser de 650 nm i 30 mW que incideix amb un angle igual a l'angle Brewster, fent passar prèviament el feix per un polaritzador (prismes de Glan-Thomson) per a que estigui polaritzat paral·lelament al pla d'incidència quan arriba a l'aigua. Això fa que, quan només hi ha aigua pura a la cubeta, no hi hagi feix reflectit. El feix reflectit obtingut en els experiments és degut a la presència de la monocapa. Aquest feix reflectit és recollit per un microscopi i enregistrat per una càmera de vídeo (JAI CV-M50 IR) situada a continuació per al posterior tractament i anàlisi de les imatges.

Donat que la cubeta de Langmuir era de tefló blanc, per evitar que la llum dispersada en el fons de la cubeta s'afegeixi a la llum reflectida per la monocapa, es va cobrir el fons de la cubeta amb vidres negres i rugosos, que absorben la llum.

Aquest microscopi portava un motor incorporat que permet moure's per sobre la superfície de la monocapa. Aquest tipus de tècnica detecta textures de fases que no siguin isotròpiques.

Procediment general de les valoracions espectrofotomètriques competitives.

Les valoracions espectrofotomètriques competitives es van dur a terme en una cel·la de 1,5 mL amb 1 cm de pas de llum. Es van addicionar al·lquotes d'una dissolució de lligand de concentració 0,1-2,0 mM en tampó fosfats (0,1 M, a pH = 7,0) a una dissolució de proteïna 3-30 µM i d'HABA 70-100 µM en el mateix tampó fosfats. 5 minuts després de cada addició es va enregistrar el corresponent espectre d'absorció entre 200-700 nm. Els canvis d'absorbància produïts a 500 nm o a 348 nm (deguts al desplaçament del HABA unit a la proteïna produït pel lligand) són ajustats al model d'unió 1:1 assumint que hi ha comportament independent entre els quatre llocs d'unió de la proteïna. Fent aquesta suposició del comportament independent, l'experiment de competició es pot representar de la següent manera (Esquema 40).



Esquema 40.

Les expressions [S], [I], [L], [SI] i [SL] derivades del model d'unió 1:1, són utilitzades en l'ajust de mínims quadrats de l'absorbància a 500 nm calculada (A_{calc}) (Equació 1)¹¹¹ a l'absorbància experimental (A_{exp}).

$$A_{calc} = \epsilon_{I(500)} \cdot [I] + \epsilon_{SI(500)} \cdot [SI]$$

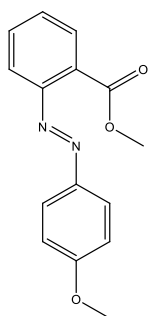
Equació 1

Aquest procediment d'ajust dóna un valor òptim de constant d'associació entre S i L. El bon ajust obtingut entre les corbes teòriques i les corbes experimentals suporten la suposició del comportament independent entre els llocs d'unió d'aquestes proteïnes.

6.2 Estudi de la tautomeria azo/hidrazona i de la isomerització e/z de l'HABA i compostos relacionats, en solució i en monocapes de Langmuir

6.2.1 Estudi del l'equilibri tautomèric azo/hidrazona de l'àcid 2-(4'-hidroxifenilazo)benzoic (2) i de l'àcid 2-(4'-hidroxi-3',5'-dimetilfenilazo)benzoic (9) en solució.

6.2.1.1 Síntesi de 2-(4'-Metoxifenilazo)benzoat de metil (15)



Es dissolen 414 mg (1,7 mmol) d'àcid 2-(4-hidroxifenilazo)benzoic (2) en 6mL de metanol anhidre, s'afegeixen 0,80 mL d'àcid sulfúric concentrat, i la barreja s'escalfa a reflux durant 5 hores.

Després de deixar refredar a temperatura ambient s'afegeixen 10 mL d'una solució saturada d'hidrogencarbonat de sodi fins arribar a pH 8 i s'evapora el metanol a pressió reduïda i s'extreu la barreja de reacció amb cloroform (5x40 mL). La fase orgànica resultant es renta amb solució de KOH 1M (1x20 mL) i amb aigua (4x40 mL). Tot seguit s'asseca sobre sulfat de sodi anhidre i s'evapora el dissolvent obtenint-se 329 mg (1,21 mmol) del producte esperat en forma d'oli de color marró. Rendiment: 71%

CCF (SiO₂; CH₂Cl₂), R_f 0,6

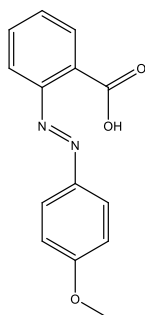
¹H RMN (200MHz, DMSO-d₆, δ): 7,83 (d, J=9,2, 2H, H-Ar), 7,72 (m, 1H, H-Ar), 7,63 (m, 1H, H-Ar), 7,59 (m, 1H, H-Ar), 7,55 (m, 1H, H-Ar), 7,16 (d, J=9,2, 2H, H-Ar), 3,85 (s, 3H, Ar-OCH₃), 3,80 (s, 3H, COOCH₃).

¹³C RMN (50,3MHz, DMSO-d₆, δ): 168,1 (COOCH₃), 162,9 (CH₃O-C₆H₄), 151,2 (CH₃O-C₆H₄), 146,7 (CH₃OCOC₆H₄), 132,5 (CH₃OCOC₆H₄), 130,4 (CH₃OCOC₆H₄), 129,7 (CH₃O-C₆H₄), 129,0 (CH₃OCOC₆H₄), 125,4 (CH₃OCOC₆H₄), 119,8 (CH₃OCOC₆H₄), 115,3 (CH₃O-C₆H₄), 56,3 (CH₃O-C₆H₄), 52,9 (CH₃OCO-C₆H₄).

IR (KBr) ν(cm⁻¹)= 3070, 2925, 1717, 1252 cm⁻¹

EM-FAB(+)= 271,4 [M+H]⁺, 239,3 [M-31]⁺

6.2.1.2 Síntesi de l'Àcid 2-(4'-Metoxifenilazo)benzoic (11)



Es dissolen 52 mg de 2-(4-metoxifenilazo)benzoat de metil (**15**) en 5 mL d'hidròxid de sodi al 5% i s'escalfa la solució a 95 °C durant 2 hores. Es refreda a temperatura ambient i, a continuació s'acidifica la mescla de reacció amb àcid clorhídric 2%, obtenint un precipitat groc. Finalment, aquest precipitat es separa per centrifugació, es renta amb HCl diluït i aigua i s'asseca en un dessecador, obtenint-se 37mg (0,14 mmol) del producte desitjat en forma de sòlid groc. Rendiment: 76%

Pf= 150-153 °C

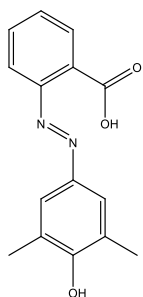
CCF (SiO₂; CH₂Cl₂:AcOEt 1:1), Rf 0,7

¹H RMN (200MHz, DMSO-d₆, δ): 7,83 (d, J=8,2, 2H, H-Ar), 7,73 (m, 1H, H-Ar), 7,58 (m, 3H, H-Ar), 7,14 (d, J=8,2, 2H, H-Ar), 3,85 (s, 3H, Ar-OCH₃).

¹³C RMN (50,3MHz, DMSO-d₆, δ): 169,0 (COOH), 163,0 (CH₃O-C₆H₄), 151,2 (CH₃O-C₆H₄), 147,0 (HOCOC₆H₄), 132,1 (HOCOC₆H₄), 131,0 (HOCOC₆H₄), 130,4 (CH₃O-C₆H₄), 123,0 (HOCOC₆H₄), 125,5 (HOCOC₆H₄), 118,5 (HOCOC₆H₄), 115,3 (CH₃O-C₆H₄), 56,4 (CH₃O-C₆H₄).

EM-CI(+)= 256,0 [M]⁺, 134,9 [M-CH₃OC₆H₄N]⁺

6.2.1.3 Síntesi de l'àcid 2-(4'-Hidroxi-3',5'-dimetilfenilazo)benzoic (9)



Primerament es forma la sal de diazoni de l'àcid antranílic dissolent 1 g (7,3 mmol) d'àcid antranílic en 10 mL d'aigua i 1,8 mL d'àcid clorhídric concentrat. Un cop dissolt es refreda en un bany de gel (pot precipitar parcialment) i se li afegeix gota a gota una solució de 528 mg (7,7 mmol) de NaNO₂ en 10 mL d'aigua freda. Per tal de comprovar que la solució resultant té un excés de NaNO₂ es va realitzar un test amb NaI donant positiu.

Per altra banda es dissolen 892 mg (7,3 mmol) de 2,6-dimetilfenol en una barreja 1:1 de MeOH i una solució d'hidròxid de potassi 0,5 M. Es refreda la solució resultant amb un bany de gel. A continuació s'aboca gota a gota la solució de sal de diazoni sobre la solució de fenol apareixent un color vermell intens. Un cop finalitzada l'addició s'acidifica la mescla de reacció amb NaHSO₄ fins a precipitar totalment el producte resultant. Es

filtra el precipitat amb una placa del nº 4 i s'asseca al dessecador. Finalment es purifica el producte mitjançant una recristal·lització amb H₂O/MeOH 1:3 obtenint-se 1,785 g (6,6 mmol) del producte esperat en forma de sòlid groc. Rendiment: 91%.

CCF (SiO₂; AcOEt), Rf 0,3

¹H RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ): 2,24 (s, 6H ; CH₃), 7,48–7,76ppm (m; 6H).

EM-CI (+): m/z: 270,0 [M]⁺, 149,0 [M-C₆H₄CO₂H]⁺, 121,0 [M-N₂C₆H₂ (CH₃)₂OH]⁺.

6.2.1.4 Procediment general de les valoracions espectrofotomètriques de derivats de l'àcid 2(4-hidroxifenilazo)benzoic (2) amb base.

Primerament es prepara una dissolució mare de compost azoic amb una concentració de l'ordre de 10⁻³ M. A partir d'aquesta, es van preparar una sèrie de dissolucions amb la mateixa concentració de compost azoic (de l'orde de 3x10⁻⁵ M) i amb quantitats creixents de base. Es va enregistrar l'espectre d'UV-Vis de cadascuna d'elles en una cel·la de 1 cm de pas de llum.

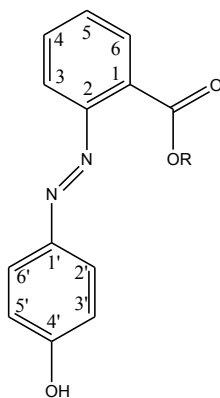
6.2.1.5 Espectroscopia Raman de l'àcid 2(4-hidroxifenilazo)benzoic (2) i l'àcid 2(4-metoxifenilazo)benzoic (11)

Es van preparar dissolucions equimolars de compost azoic i DBU (1,6x10⁻³M) en cloroform destil·lat i es van enregistrar els espctres Raman utilitzant un làser per a excitar amb una llongitud d'ona de 488 nm.

6.2.1.6 Estudis de RMN de l'àcid 2(4-hidroxifenilazo)benzoic en $CDCl_3$ (espècie neutra) i amb 1 equivalent de Na_2CO_3 en D_2O (monoanió).

Es van enregistrar espectres de RMN de 1H i de ^{13}C de l'HABA en $CDCl_3$ (espècie neutra) i amb 1 equivalent de Na_2CO_3 en D_2O (monoanió). L'assignació dels desplaçaments químics de cada experiment es mostren en la taula 16.

a	1H -RMN	-	-	7,99	7,67	7,6	8,34	-	7,8	7,02	-	7,02	7,8	10,1	13,7
	^{13}C -RMN	126,2	149,7	115,7	133,3	130,9	132,3	144,7	126,2	116,7	163,2	116,7	126,2	-	166,6
b	1H -RMN	-	-	7,52-7,56			7,52	-	7,86	7,02	-	7,02	7,86	-	-
	^{13}C -RMN	131,2	119,9	101,0-112,2				128,8	108,2	99,3	143,2	99,3	108,2	-	160,1



Taula 16. Assignació de l'RMN de 1H i ^{13}C de l'HABA en $CDCl_3+5\%DMSO-d_6$ (a), i en D_2O amb 1 eq. de Na_2CO_3 (b). Els desplaçaments químics estan expressats en ppm respecte TMS.

6.2.1.7 Complexació de l'àcid 2-(4-metoxifenilazo)benzoic (11) amb avidina.

Es va preparar una dissolució d'avidina $1,37 \times 10^{-6}$ M en subunitats (1,17 mg en 10 ml) en tampó fosfats 0,01 M a pH 7,0 i una dissolució de Me-HABA $6,8 \times 10^{-4}$ M en el mateix tampó fosfats. En una cubeta de 1 cm de pas de llum i 4 mm d'amplada interior, es va afegir 600 μ L de la dissolució d'avidina i s'enregistrà l'espectre UV-Vis. A continuació es van fer addicions successives de Me-HABA i es va enregistrar els corresponents espectres d'UV-Vis.

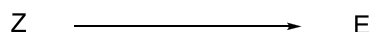
6.2.2 Estudis cinètics d'isomerització Z→E tèrmica de l'HABA (2) i compostos relacionats en solució

6.2.2.1 Mètode general de realització d'una cinètica d'isomerització cis-trans

Les cinètiques d'isomerització es van realitzar en un espectrofotòmetre UV-visible CARY 500 Scan / UV-Vis-NIR. Per a isomeritzar fotoquímicament es va utilitzar una làmpada amb una potència de 6 W d'una sola longitud d'ona 365 nm.

6.2.2.2 Equacions cinètiques corresponents a la isomerització

La cinètica d'isomerització tèrmica de l'isòmer Z a l'isòmer E és un procés de primer ordre, que compleix la equació:



Per tant, la llei de velocitat serà:

$$\frac{d[Z]}{dt} = -k[Z]$$

La integració d'aquesta equació condueix a una expressió logarítmica:

$$\ln[Z] = -kt + \ln[Z]_0$$

En tot moment es compleix $[AB]=[Z]+[E]$, on $[AB]$ és la concentració total d'azobenzé i $[Z]$ i $[E]$ les concentracions de cadascun dels isòmers de l'azobenzé.

$$\ln([AB]-[E]) - \ln([AB]-[E]_0) = -kt$$

Substituint per la llei de Lambert-Beer ens quedarà:

$$\ln(A_{fosc} - A_t) - \ln(A_{fosc} - A_0) = -kt$$

On A_{fosc} és l'absorbància abans d'irradiar, A_t és l'absorbància a temps t i A_0 és l'absorbància just després d'irradiar a la longitud d'ona màxima de l'isòmer E. A partir d'aquesta, si representem el logaritme neperià de $(A_{\infty}-A_t)$ respecte del temps tenim una recta de pendent igual a $-k$.

També es pot utilitzar l'equació en forma exponencial per a fer la representació gràfica:

$$A_t = A_{fosc} - (A_{fosc} - A_0) \cdot e^{-kt}$$

D'aquesta manera, si representem l'absorbància corresponent a l'isòmer E respecte el temps, obtindrem una corba exponencial d'on podrem obtenir la constant cinètica.

El temps de vida mitja o període de semirreacció es pot quantificar a partir del valor de la constant cinètica.

$$\frac{[A]_0}{2} = [A]_0 \cdot e^{-kt_{1/2}}$$

Per tant,

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

6.2.2.3 Cinètiques d'isomerització tèrmica Z -> E de l'espècie neutra del compost 11 en diferents medis.

6.2.2.3.1 Medi clorofòrmic

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $6,7 \times 10^{-5}$ M en cloroform destil·lat i passat per alumina bàsica, i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 30 segons a les fosques.

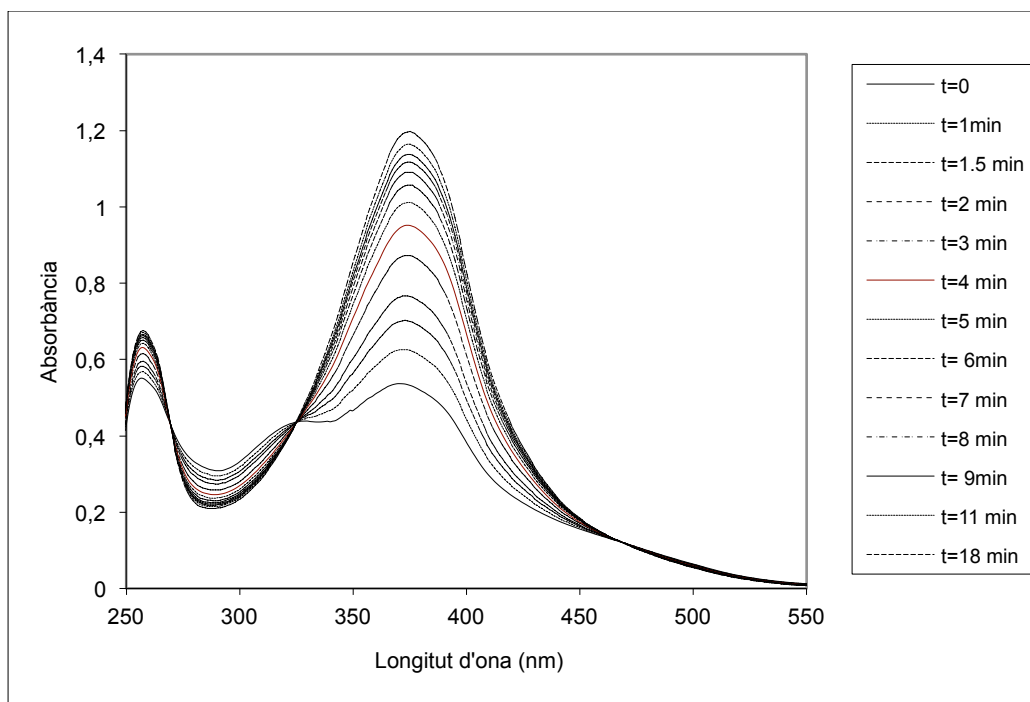


Figura 61. Espectres d'UV-Vis de $11\ 6,7 \times 10^{-5}$ M en CHCl_3 enregistrats a diferents temps a 23°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

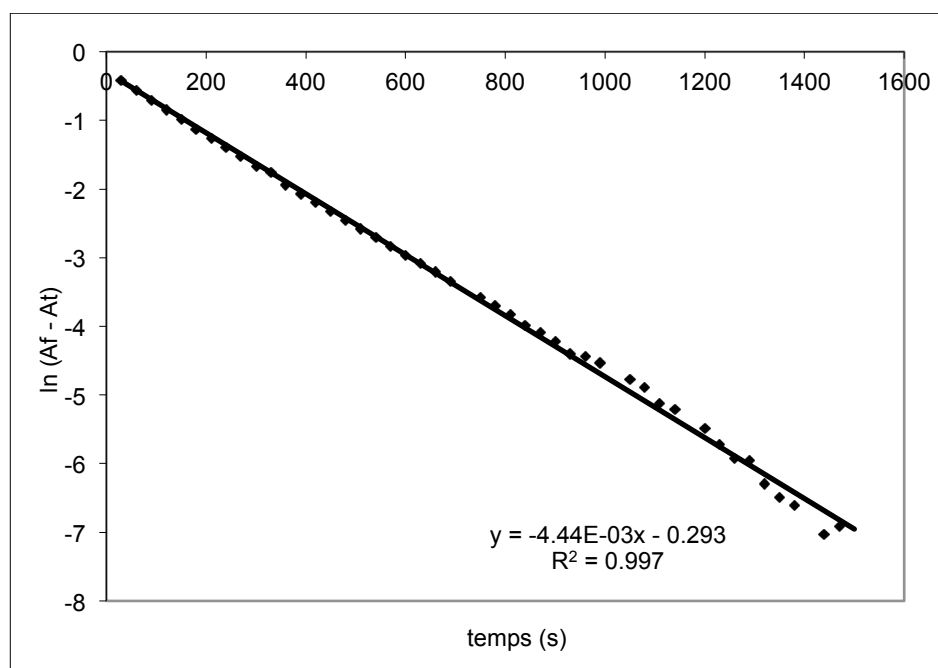


Figura 62. Representació de $\ln(A_f - A_t)$ en funció del temps en CHCl_3 a 23°C .

6.2.2.3.2 Medi metanòlic

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $5,51 \times 10^{-5}$ M en metanol destil·lat i passat per alumina bàsica, i es va irradiar durant dues hores i mitja a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 2 minuts a les fosques.

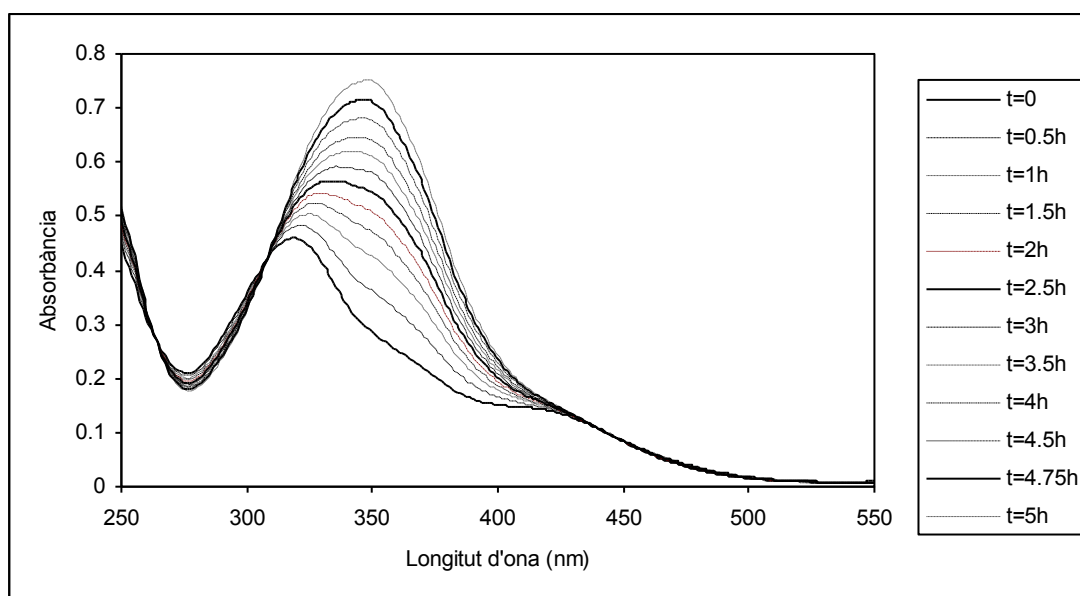


Figura 63. Espectres d'UV-Vis de **11** ($5,5 \times 10^{-5}$ M) enregistrats a diferents temps en MeOH a 23°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 2,5 hores.

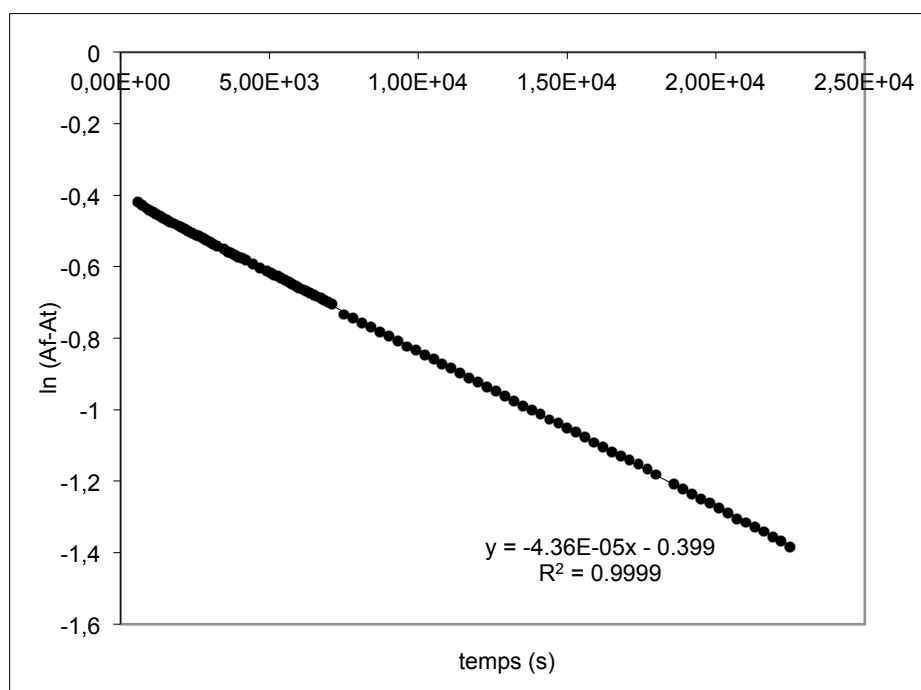


Figura 64. Representació de $\ln(A_f - A_t)$ prenent $A_{\max} = 328$ nm en funció del temps en MeOH a 23°C.

6.2.2.4 Cinètiques d'isomerització de l'espècie monoaniònica del compost **11** en diferents medis.

6.2.2.4.1 Medi clorofòrmic

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $7,81 \times 10^{-5}$ M en cloroform destil·lat i passat per alumina bàsica, se li va afegir un equivalent de la base DBU i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 2 minuts a les fosques.

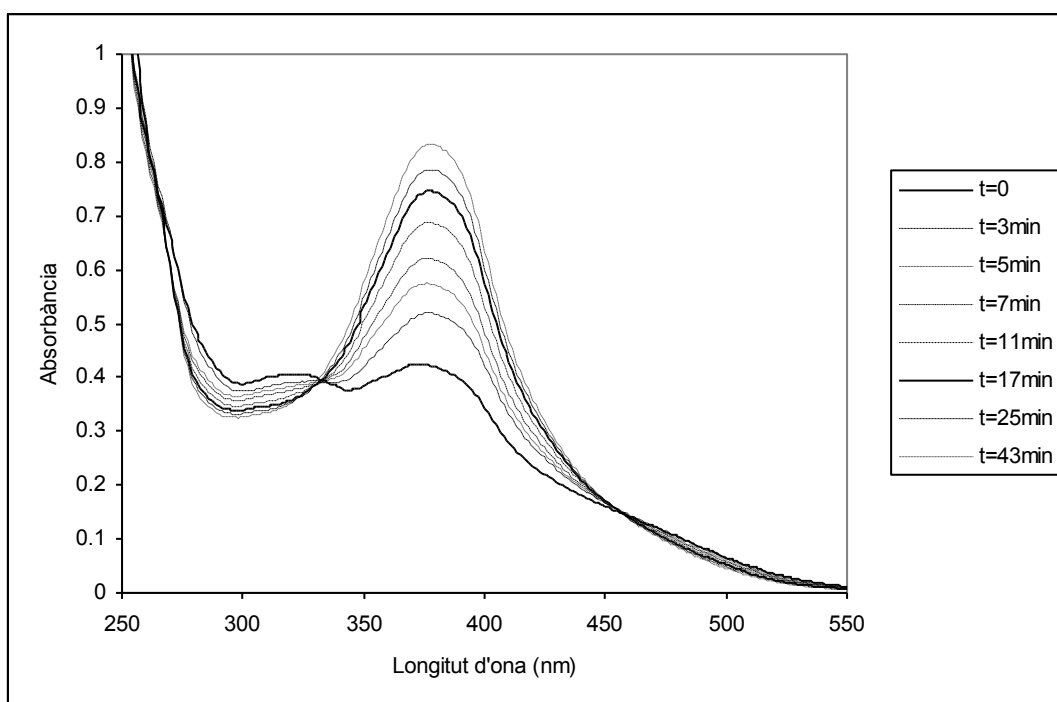


Figura 65. Espectres d'UV-Vis de **11** ($7,8 \times 10^{-5}$ M) amb un equivalent de DBU enregistrats a diferents temps en CHCl_3 a 23°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

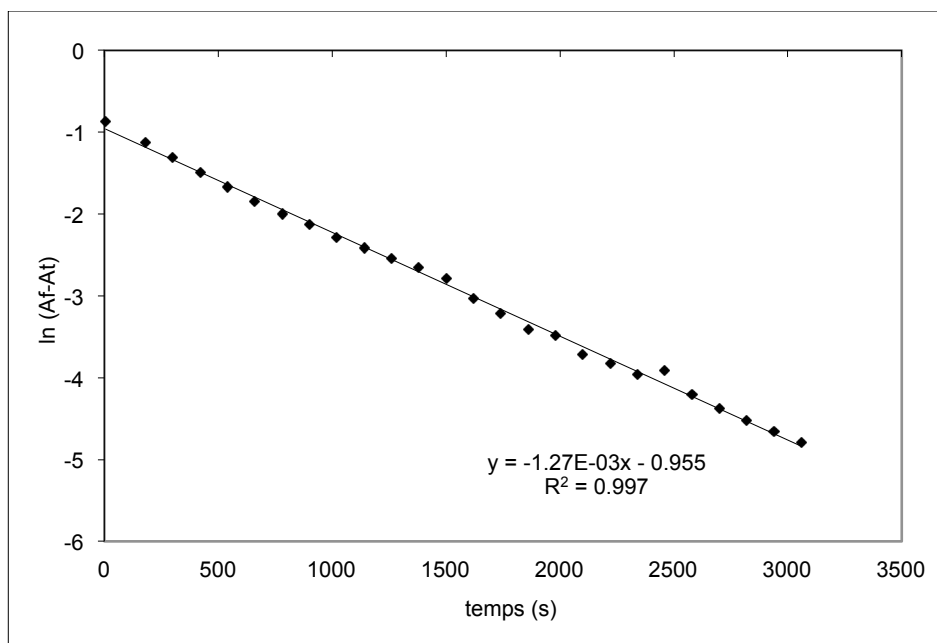


Figura 66. Representació de $\ln(A_f - A_t)$ prenent $A_{\max} = 375$ nm, en funció del temps en CHCl_3 de **11** amb un equivalent de DBU a 23°C .

6.2.2.4.2 Medi metanòlic

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $5,51 \times 10^{-5}$ M en metanol destil·lat i passat per alumina bàsica, es va afegir un equivalent de DBU i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 10 minuts a les fosques.

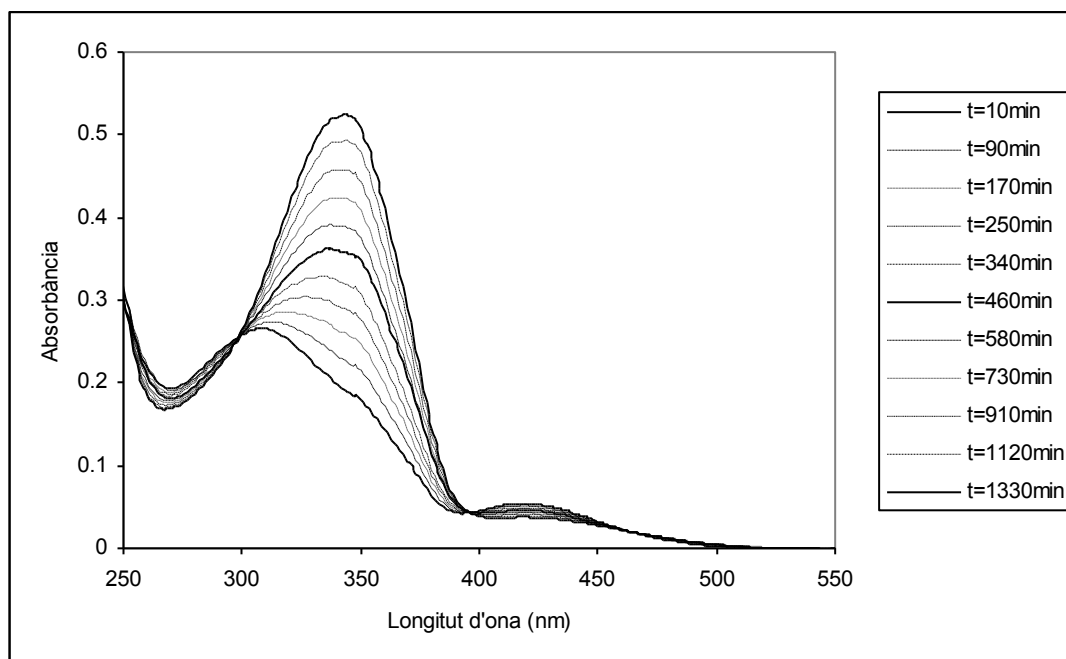


Figura 67. Espectres d'UV-Vis de **11** ($5,51 \times 10^{-5}$ M) amb un equivalent de DBU enregistrats a diferents temps en MeOH a 23°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

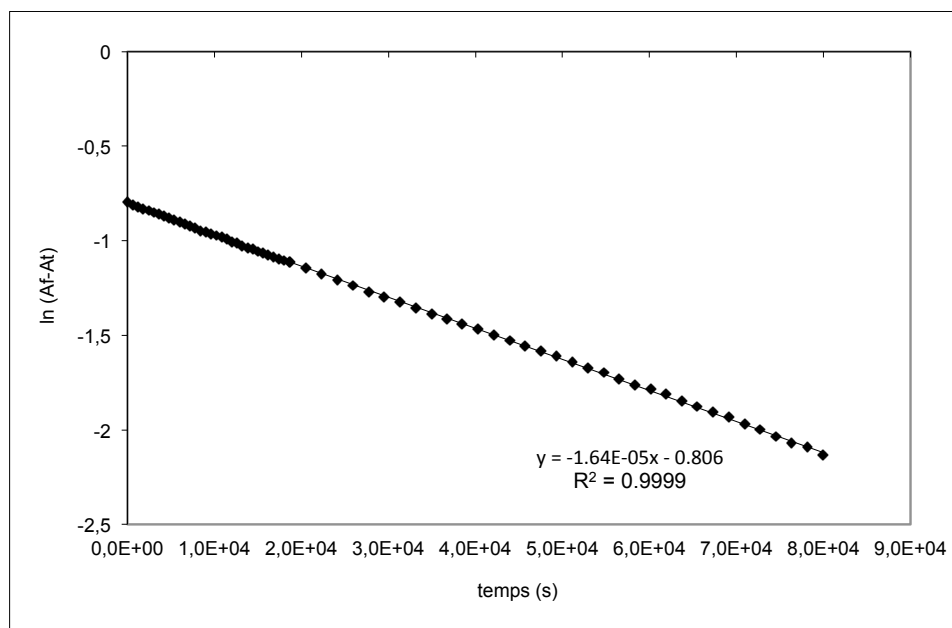


Figura 68. Representació de $\ln (A_f - A_t)$ prenent $A_{\max} = 341$ nm, en funció del temps en MeOH de **11** amb un equivalent de DBU a 23°C.

6.2.2.4.3 Medi aquós a pH=7,0 a diferents temperatures.

- **Cinètica a 35°C en medi aquós a pH=7,0**

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $6,57 \times 10^{-5}$ M en tampó fosfats 0,1M a pH=7,0 i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 60 minuts a les fosques mantenint la temperatura a 35 °C.

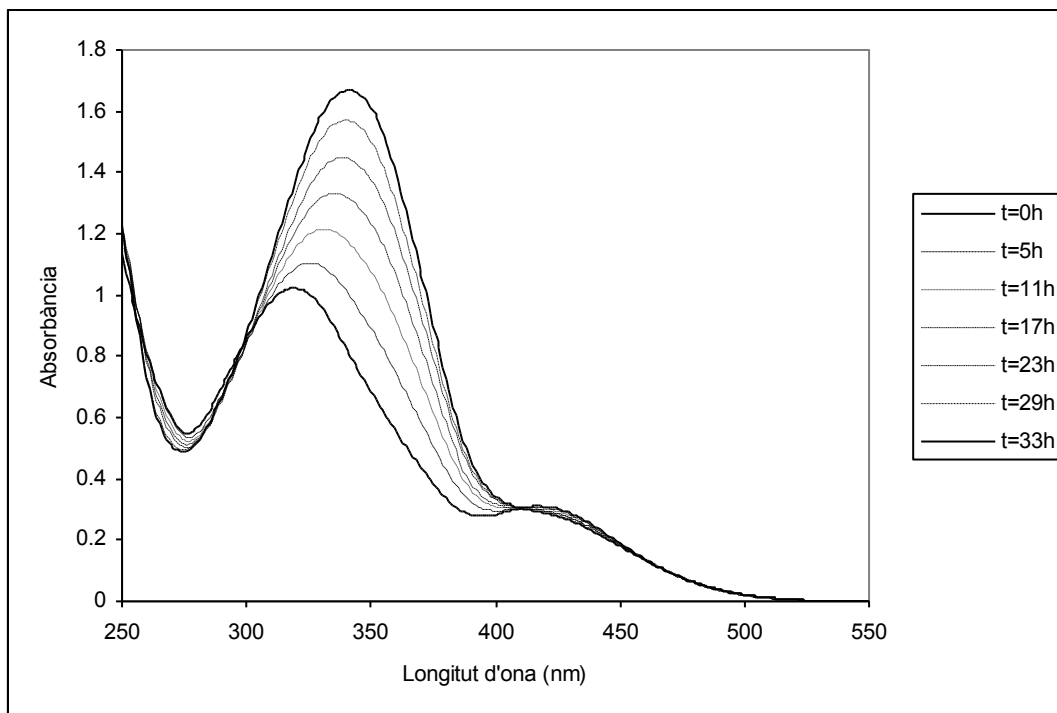


Figura 69. Espectres d'UV-Vis de **11** ($6,6 \times 10^{-5}$ M) enregistrats a diferents temps en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 35°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

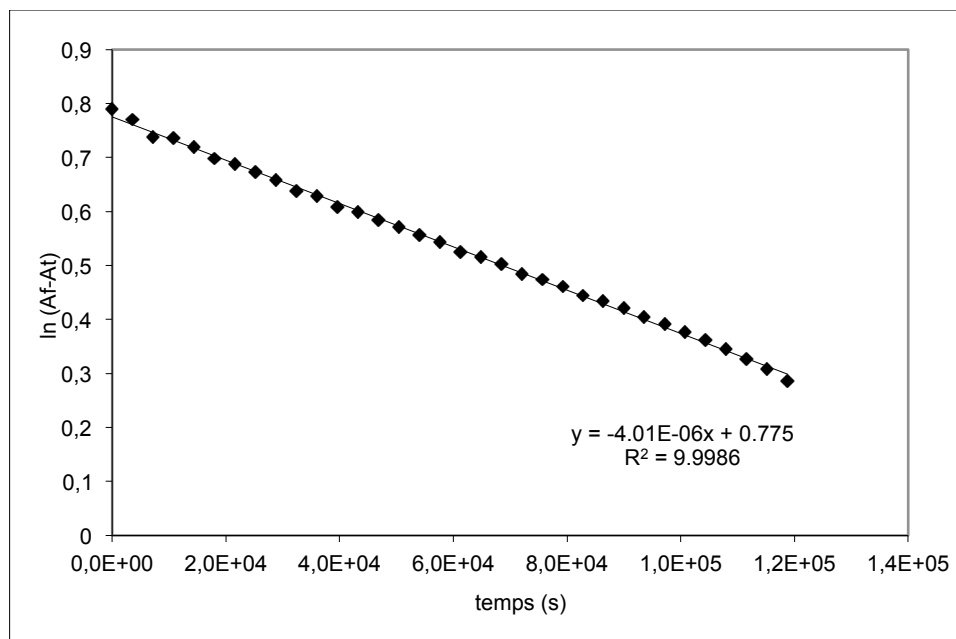


Figura 70. Representació de $\ln(A_f - A_t)$ prenent $A_{\max} = 342$ nm, en funció del temps de **11** en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 35°C

- **Cinètica a 45°C en medi aquós a pH=7,0**

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $6,57 \times 10^{-5}$ M en tampó fosfats 0,1M a pH=7,0 i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va registrar un espectre d'UV-visible cada 60 minuts a les fosques mantenint la temperatura a 45 °C.

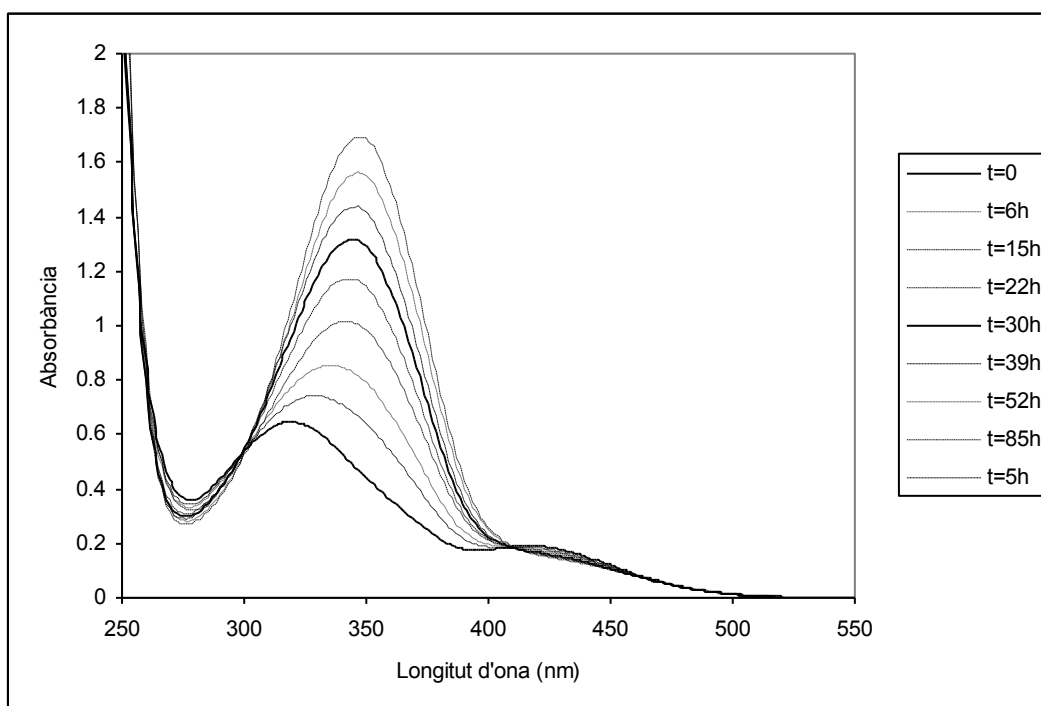


Figura 71. Espectres d'UV-Vis de **11** ($6,6 \times 10^{-5}$ M) enregistrats a diferents temps en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 45°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

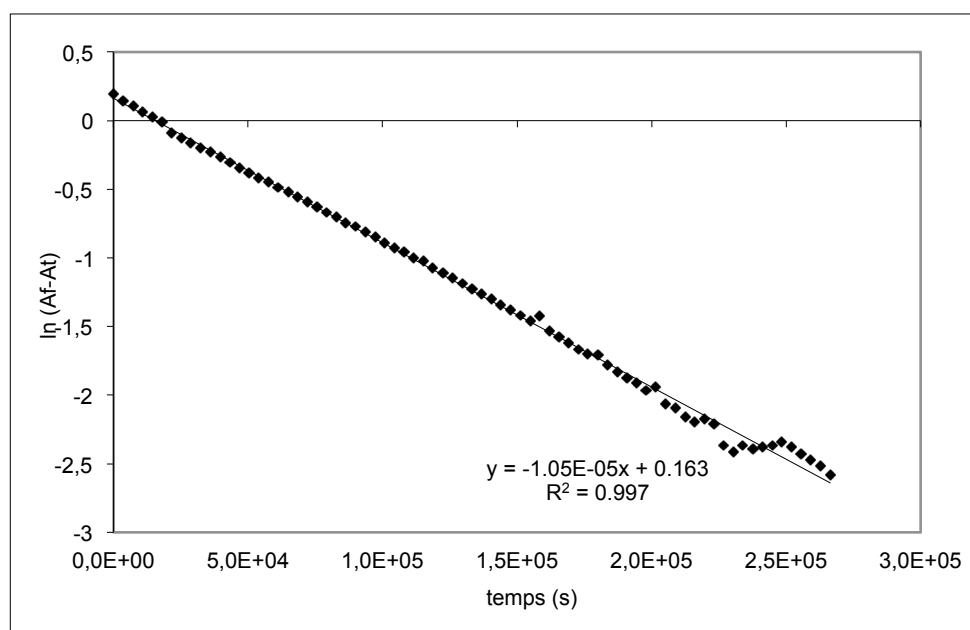


Figura 72. Representació lineal de la cinètica d'isomerització de **11** prenent $A_{\max}=342$ nm en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 45°C

- **Cinètica a 50°C en medi aquós a pH=7,0**

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $6,57 \times 10^{-5}$ M en tampó fosfats 0,1M a pH=7,0 i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 30 minuts a les fosques mantenint la temperatura a 50 °C.

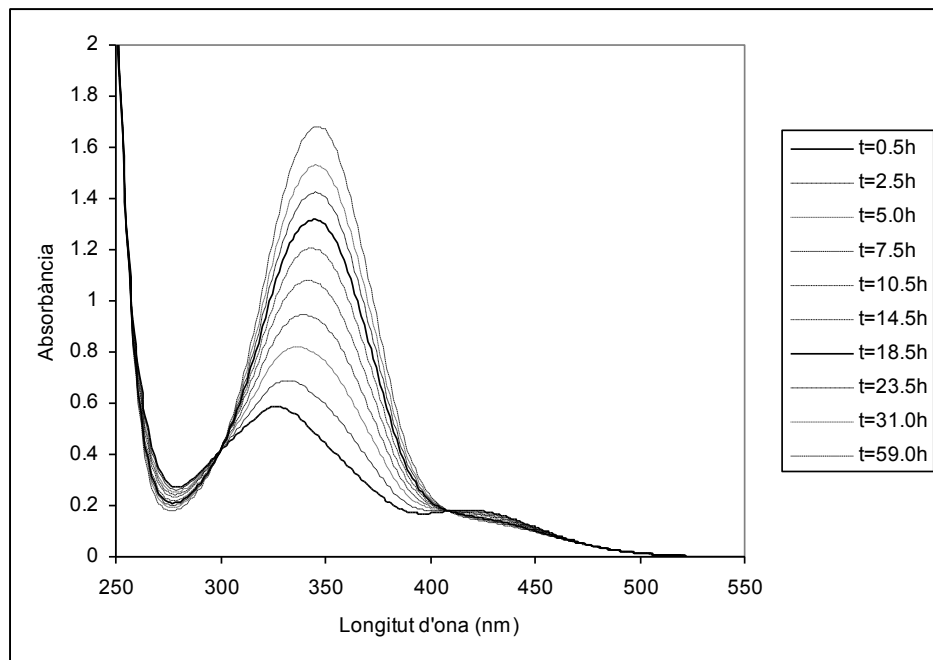


Figura 73. Espectres d'UV-Vis de **11** ($6,6 \times 10^{-5}$ M) enregistrats a diferents temps en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 50°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

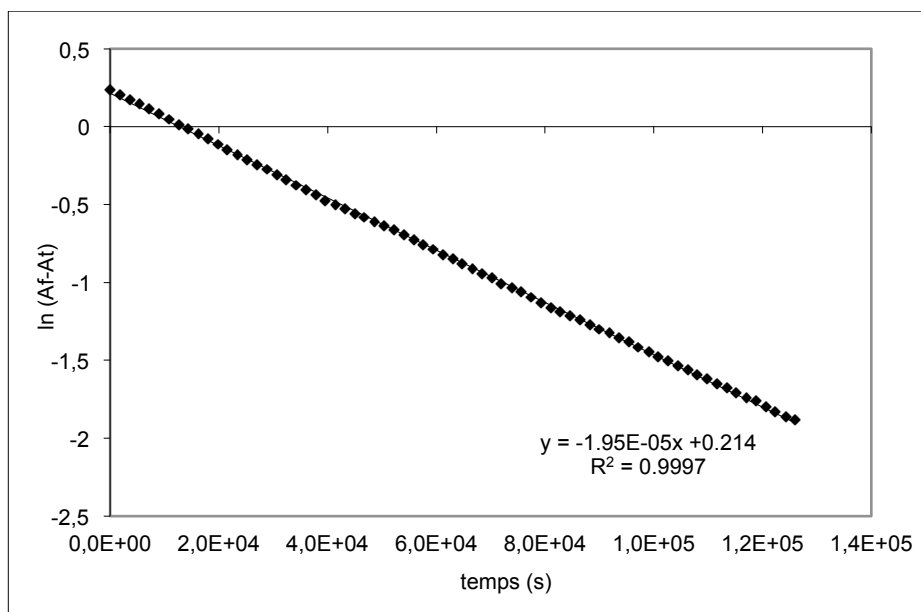


Figura 74. Representació lineal de la cinètica d'isomerització de **11** prenent $A_{\max}=344$ nm en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 50°C

- **Cinètica a 55°C en medi aquós a pH=7,0**

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $6,57 \times 10^{-5}$ M en tampó fosfats 0,1M a pH=7,0 i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 15 minuts a les fosques mantenint la temperatura a 55 °C.

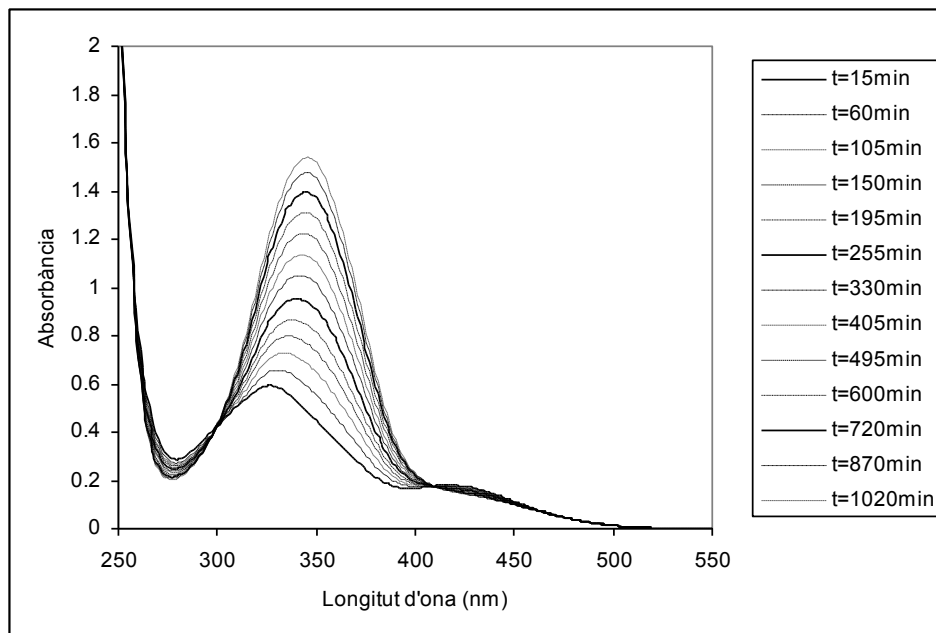


Figura 75. Espectres d'UV-Vis de **11** ($6,6 \times 10^{-5}$ M) enregistrats a diferents temps en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 55°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

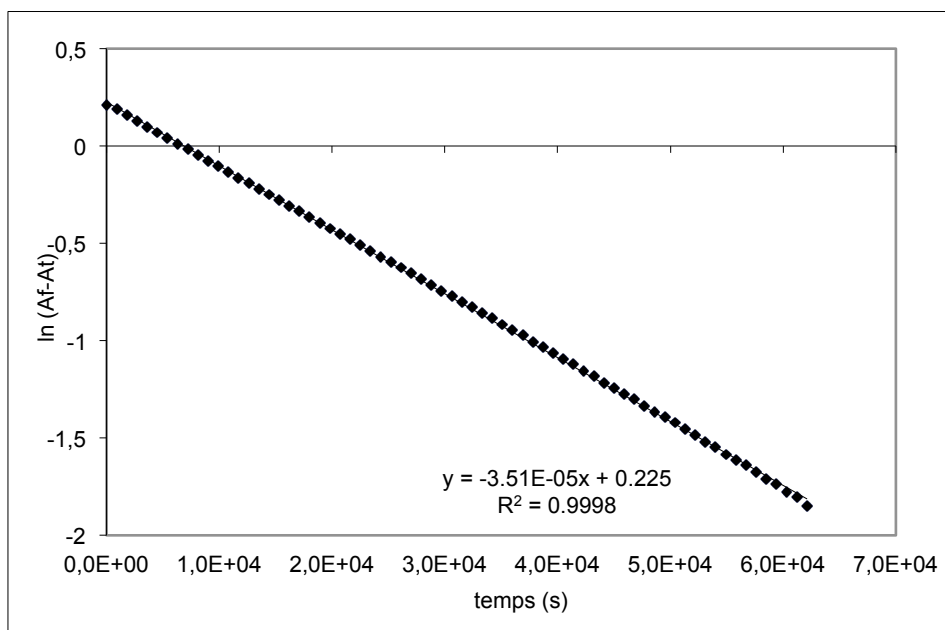


Figura 76. Representació lineal de la cinètica d'isomerització de **11** prenent $A_{\max}=344$ nm en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 55°C

- **Cinètica a 60°C en medi aquós a pH=7,0**

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $6,57 \times 10^{-5}$ M en tampó fosfats 0,1M a pH=7,0 i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 5 minuts a les fosques mantenint la temperatura a 60 °C.

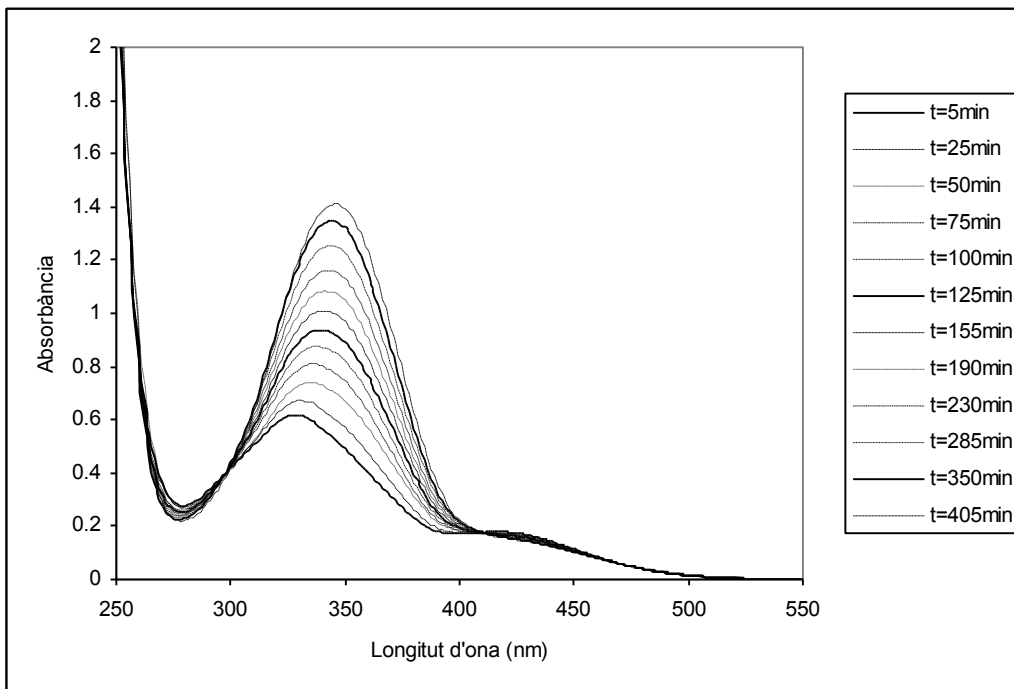


Figura 77. Espectres d'UV-Vis de **11** ($6,6 \times 10^{-5}$ M) enregistrats a diferents temps en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 60°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

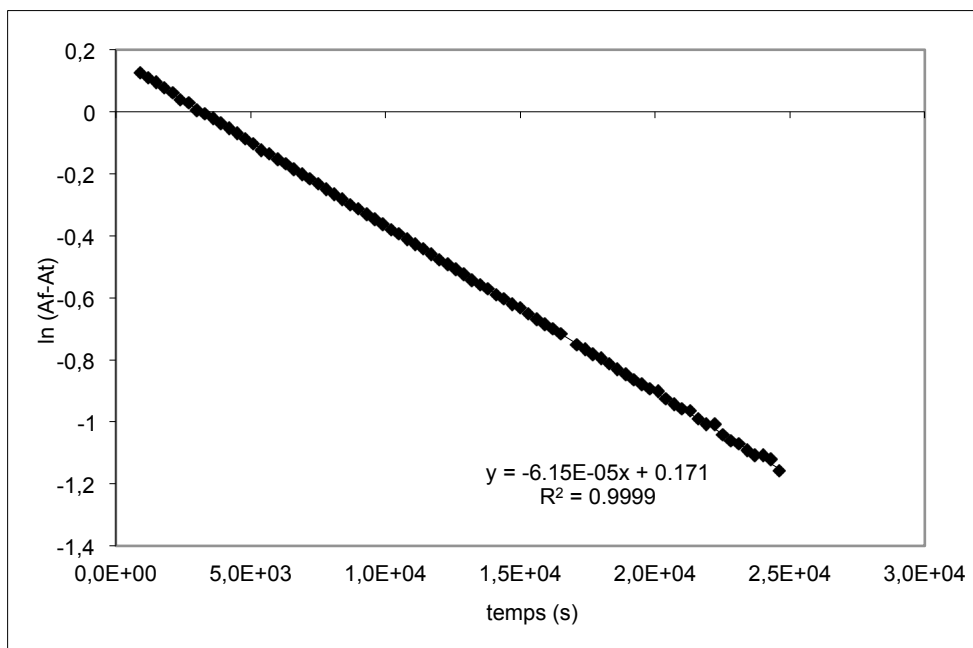


Figura 78. Representació lineal de la cinètica d'isomerització de **11** prenent $A_{\max}=342$ nm en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 60°C

- Cinètica a 65°C en medi aquós a pH=7,0

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $6,57 \times 10^{-5}$ M en tampó fosfats 0,1M a pH=7,0 i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 5 minuts a les fosques mantenint la temperatura a 65 °C.

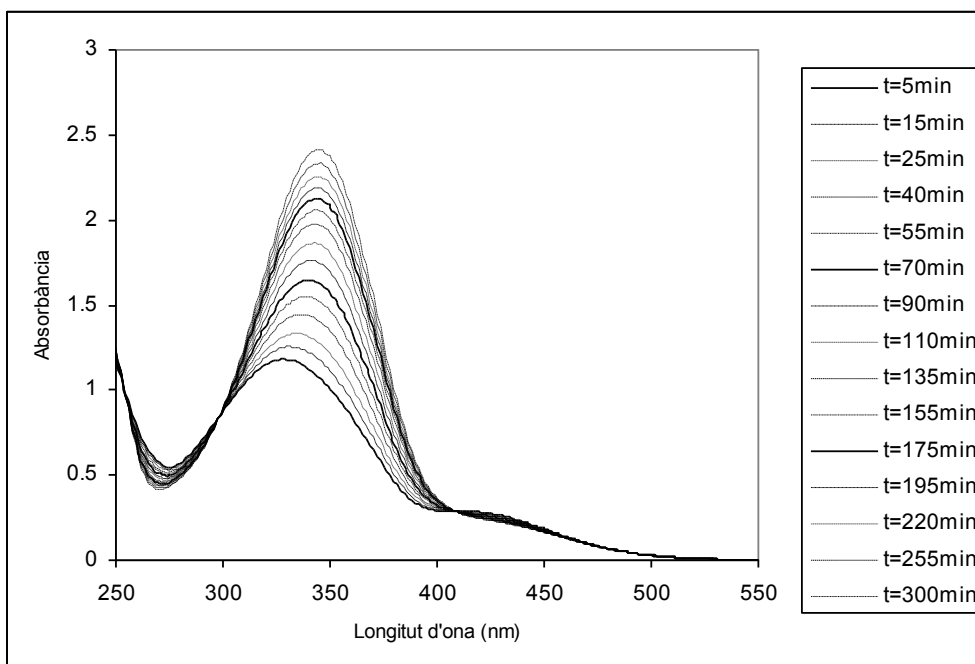


Figura 79. Espectres d'UV-Vis de **11** ($6,6 \times 10^{-5}$ M) enregistrats a diferents temps en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 65°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

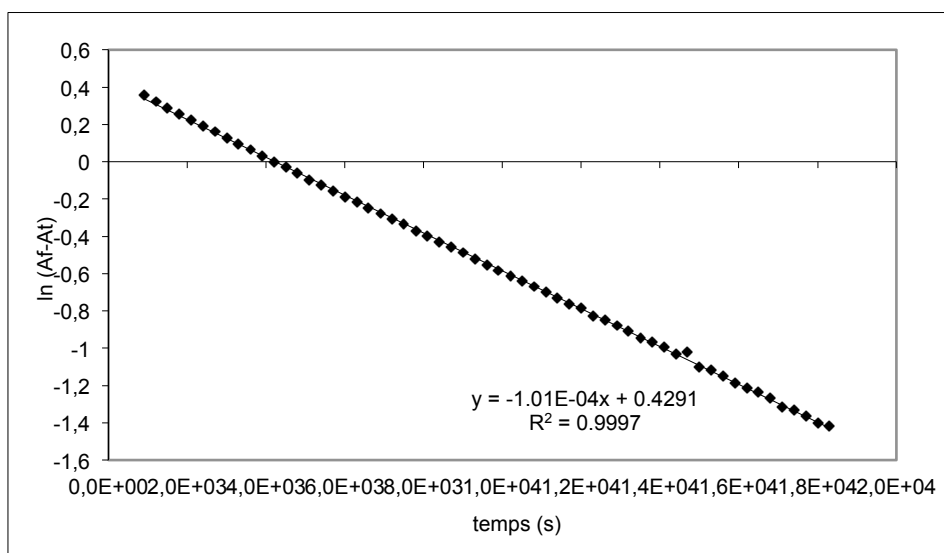


Figura 80. Representació lineal de la cinètica d'isomerització de **11** prenent $A_{\text{max}}=342$ nm en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 65°C

- Cinètica a 75°C en medi aquós a pH=7,0

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $6,57 \times 10^{-5}$ M en tampó fosfats 0,1M a pH=7,0 i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 2 minuts a les fosques mantenint la temperatura a 75 °C.

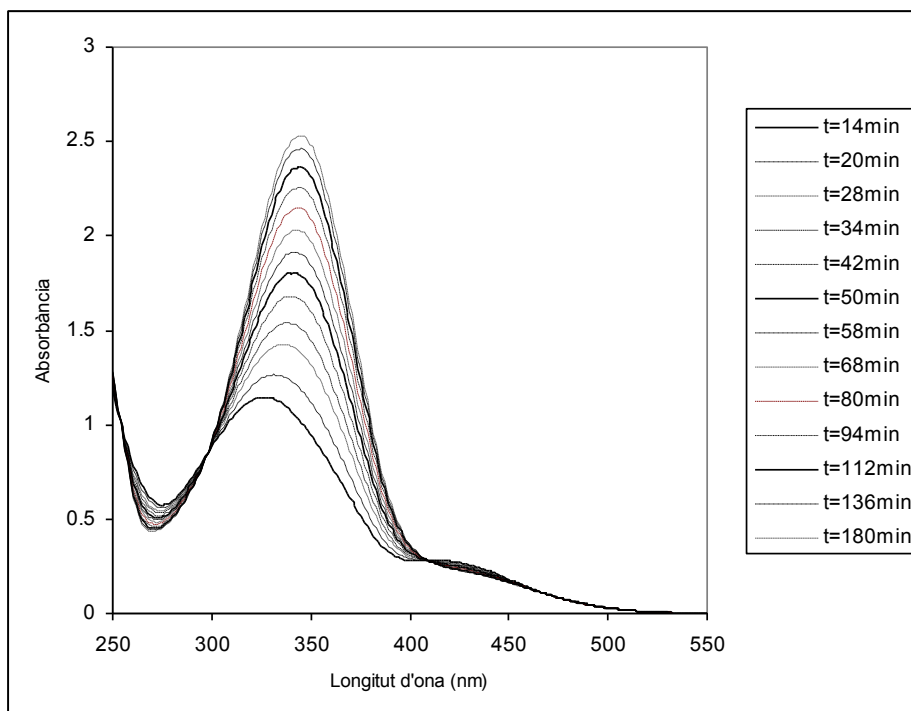


Figura 81. Espectres d'UV-Vis de **11** ($6,6 \times 10^{-5}$ M) enregistrats a diferents temps en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 75°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

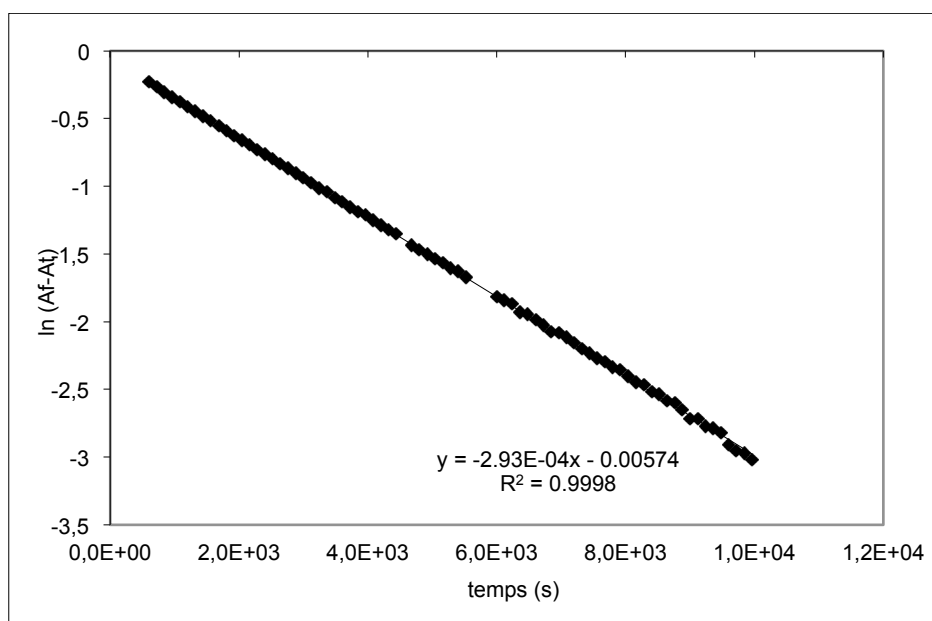


Figura 82. Representació lineal de la cinètica d'isomerització de **11** prenent $A_{\max}=321$ nm en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 75°C

- Cinètica a 80°C en medi aquós a pH=7,0

Es va preparar una dissolució de **11** de concentració $6,57 \times 10^{-5}$ M en tampó fosfats 0,1M a pH=7,0 i es va irradiar durant una hora a 365 nm. Tot seguit, es va enregistrar un espectre d'UV-visible cada 2 minuts a les fosques mantenint la temperatura a 80 °C.

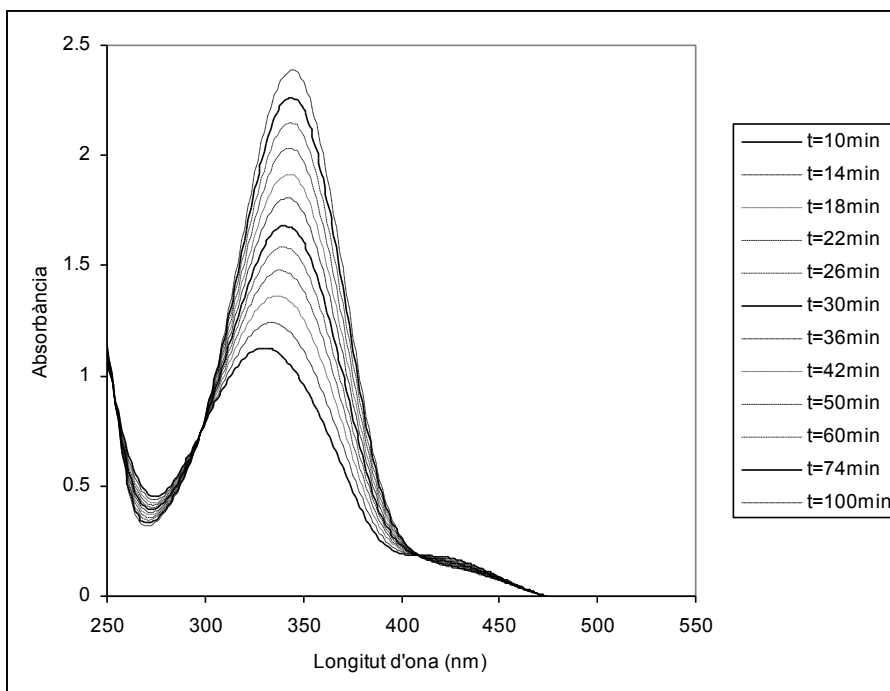


Figura 83. Espectres d'UV-Vis de **11** ($6,6 \times 10^{-5}$ M) enregistrats a diferents temps en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 80°C a les fosques, després d'haver irradiat a 365 nm durant 1 hora.

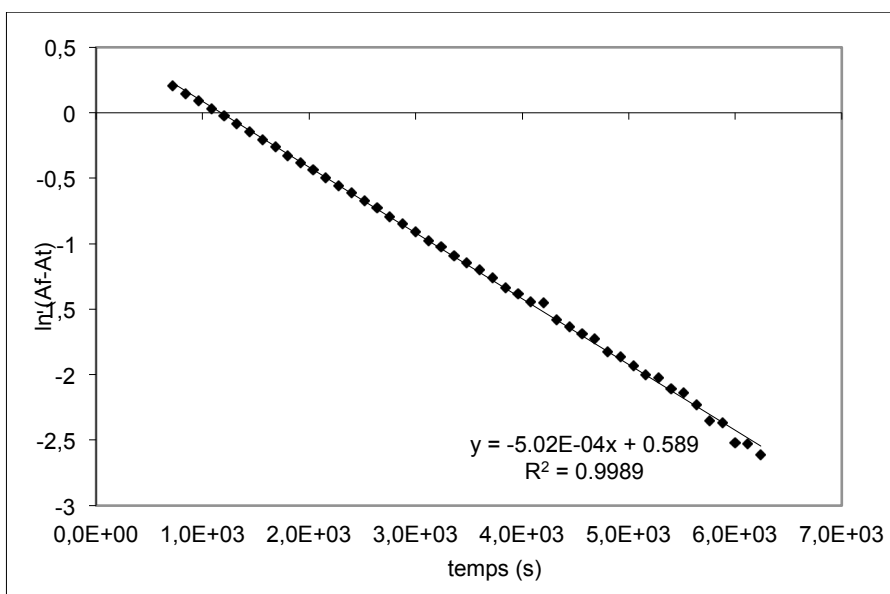
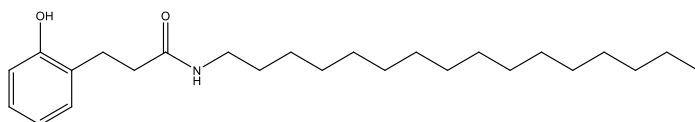


Figura 84. Representació lineal de la cinètica d'isomerització de **11** prenent $A_{\max}=340$ nm en tampó PB 0,1 M a pH=7,0 a una temperatura constant de 80°C

6.2.3 Estudi de la isomerització E/Z i de la tautomeria azo/hidrazona de compostos amfifílics derivats de l'HABA en monocapes de Langmuir

6.2.3.1 Síntesi N-hexadecil-3-(2-hidroxifenil)propanamida (18)



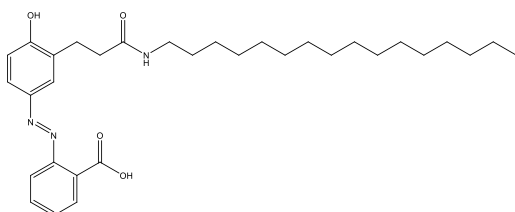
Es dissol 100 mg (0,596 mmol) de l'àcid 3-(2-hidroxifenil)propanoic en 50 mL de CH₂Cl₂ filtrat per alumina bàsica. Tot seguit, s'afegeixen 0,30 mL (0,18 mmol) de DIEA i 52 mg (0,685 mmol) de PyBOP i es deixa agitant durant 10 minuts a temperatura ambient. Passat aquest temps s'afegeix una dissolució de 144 mg (0,596 mmol) d'hexadecilamina en 50 mL de CH₂Cl₂ i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant tota la nit.

Quan la reacció ha finalitzat, es renta la mescla de reacció amb NaHCO_{3sat} (5x50 mL) i aigua (3x50 mL). La fase orgànica s'evapora a sequedat obtenint un oli que es purifica mitjançant cromatografia en columna flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH des de 1:0 fins a 97:3) i obtenint 168 mg (0,426 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 70%.

CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 9:1) *R_f* 0,60.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ) 0,88 (3H, t, CH₂-CH₃), 1,26 (26H, m, CH₂-CH₂-CH₂), 1,47 (2H, dt, CONH-CH₂-CH₂-CH₂), 2,61 (2H, t, Ar-CH₂-CH₂-CONH),), 2,90 (2H, t, Ar-CH₂-CH₂-CONH), 3,22 (2H, dt, CONH-CH₂-CH₂), 5,45 (1H, br, CONH-CH₂), 6,70-7,20 (4H, m,, Ar).

6.2.3.2 Síntesi de l'àcid 2-(4'-Hidroxi-3' N-hexadecilpropanamida fenilazo)benzoic (13)



Primerament es forma la sal de diazoni de l'àcid antranílic dissolent 78,9 mg (0,58 mmol) d'àcid antranílic en 10 mL d'aigua i 0,25 mL d'àcid clorhídric concentrat. Un cop dissolt es refreda en un bany de gel (pot precipitar parcialment) i se li afegeix gota a gota una solució de 43,7 mg (0,633 mmol) de NaNO₂ en 10 mL d'aigua freda. Per tal de comprovar

que la solució resultant té un excés de NaNO₂ es va realitzar un test amb NaI donant positiu.

Per altra banda es dissolen 38,9 mg (0,29 mmol) del compost **18** en una barreja 1:1 de MeOH i una solució d'hidròxid de potassi 2,5 M. Es refreda la solució resultant amb un bany de gel. A continuació s'aboca gota a gota la solució de sal de diazoni sobre la solució de fenol apareixent un color vermell intens. Un cop finalitzada l'addició es deixa reaccionar durant 20 min a 0 °C i 20 min a temperatura ambient i, a continuació, s'evapora el MeOH al rotavapor i s'acidifica la mescla de reacció amb una solució de HCl al 10% fins a precipitar totalment el producte resultant. El precipitat es filtra amb una placa del 4 i posteriorment es recristal·litza dues vegades en MeOH obtenint 125 mg (0,23 mmol) del producte esperat en forma de sòlid vermell. Rendiment: 80%.

CCF (SiO₂, AcOEt 100%) Rf 0,65.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3300 (ample), 2921, 2851, 1718, 1638, 1286 cm^{-1}

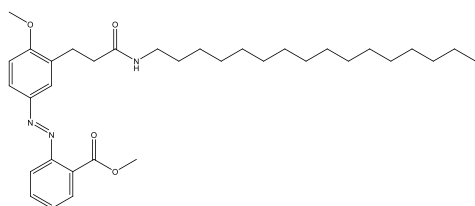
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ): 0,88 (3H, t, CH₂-CH₃), 1,25 (26H, m, CH₂-CH₂-CH₂), 1,47 (2H, dt, CONH-CH₂-CH₂-CH₂), 2,68 (2H, t, Ar-CH₂-CH₂-CONH), 3,02 (2H, t, Ar-CH₂-CH₂-CONH), 3,25 (2H, dt, CONH-CH₂-CH₂), 5,85 (1H, br, CONH-CH₂), 7,08 (1H, d, Ar), 7,50-7,80 (4H, m, Ar), 7,98 (1H, d, Ar), 8,40 (1H, d, Ar).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ): 14,5 (CH₂-CH₃), 22,9 (CH₂-CH₂-CH₂), 25,3 (2H, t, Ar-CH₂-CH₂-CONH), 27,1 (CH₂-CH₂-CH₂), 30,0-30,2 (CH₂-CH₂-CH₂), 31,0 (CH₂-CH₂-CH₂), 32,2 (CH₂-CH₂-CH₂), 39,1 (Ar-CH₂-CH₂-CONH), 40,9 (CONH-CH₂-CH₂), 115,9 (Ar), 119,8 (Ar), 126,3 (Ar), 128,1 (Ar), 129,9 (Ar), 131,6 (Ar), 133,5 (Ar), 133,7 (Ar), 135,1 (Ar), 145,5, 150,0, 162,3, 166,7, 174,4.

EM-ESI (+): m/z: 538,2 [M+1]⁺, 560,2 [M+Na]⁺.

UV-Vis (CHCl₃): λ_{max} =391nm, ϵ_{391} =11520

6.2.3.3 Síntesi del 2-(4'-metoxi-3' N-hexadecilpropanamida fenilazo)benzoat de metil (**19**)



Es dissolen 50 mg (0,093 mmol) d' HABA-C₂-CONH-C₁₆ (**13**) en 50 mL de MeOH anhidre, s'hi afegeix 0,2 mL (3,64 mmol) d'àcid sulfúric concentrat i es porta a reflux durant 18

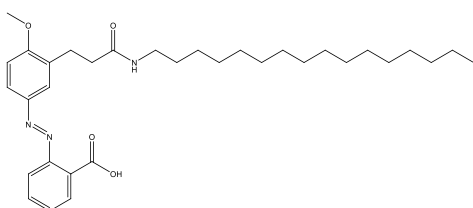
hores. Quan la reacció ha finalitzat, s'afegeix a la barreja de reacció 150 mL de $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$ i es fan extraccions amb CH_2Cl_2 (10x50 mL) fins que la fase orgànica ja no té color. S'asseca el dissolvent amb $\text{MgSO}_{4\text{anh}}$ i s'evapora a sequedat obtenint 53 mg (0,093 mmol) del producte esperat en forma d'oli vermell. Rendiment quantitatiu.

CCF (SiO_2 , AcOEt 100%) *Rf* 0,50.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ): 0,88 (3H, t, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1,25 (26H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,47 (2H, dt, $\text{CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2,68 (2H, t, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 3,02 (2H, t, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 3,25 (2H, dt, $\text{CONH-CH}_2\text{-CH}_2$), 3,82-3,89 (6H, s, $-\text{OCH}_3$), 5,85 (1H, br, CONH-CH_2), 7,08 (1H, d, Ar), 7,50-7,80 (4H, m, Ar), 7,98 (1H, d, Ar), 8,40 (1H, d, Ar).

EM-ESI (+): *m/z*: 566,2 $[\text{M}+1]^+$, 589,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.2.3.4 Síntesi de l'àcid 2-(4'-metoxi-3' N-hexadecilpropanamida fenilazo)benzoic (14)



Es disposen 53 mg (0,093 mmol) de **19** en 50 mL d'una solució de NaOH al 10% i es porta a reflux durant dues hores. A mesura que va reaccionant es va dissolent la barreja de reacció, i quan ha acabat de reaccionar, es refreda i s'afegeix $\text{NaHSO}_4\text{ sat}$ fins que precipita tot el producte. La suspensió de producte s'extreu amb CH_2Cl_2 (10x50 mL) fins que la fase aquosa ja no té coloració. El producte resultant es purifica primerament mitjançant cromatografia en columna flash (SiO_2 , AcOEt/AcOH des de 1:0 fins a 9:1) i posteriorment recristal·litzant amb una barreja aigua/metanol/acetona 1:2:2 obtenint 30 mg (0,054 mmol) del producte esperat en forma de sòlid groc. Rendiment: 58%.

CCF (SiO_2 , AcOEt:AcOH 99,5:0,5) *Rf* 0,70.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3299 (ample), 2919, 2850, 1734, 1635, 1261 cm^{-1}

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ): 0,88 (3H, t, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1,25 (26H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,47 (2H, dt, $\text{CONH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2,68 (2H, t, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 3,02 (2H, t, $\text{Ar-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH}$), 3,25 (2H, dt, $\text{CONH-CH}_2\text{-CH}_2$), 3,98 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 5,55 (1H, br, CONH-CH_2), 7,02 (1H, d, Ar), 7,60-7,84 (4H, m, Ar), 8,03 (1H, d, Ar), 8,42 (1H, d, Ar).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ): 14,7 (CH₂-CH₃), 23,3 (CH₂-CH₂-CH₂), 25,3 (2H, t, Ar-CH₂-CH₂-CONH), 26,6 (CH₂-CH₂-CH₂), 30,0-30,2 (CH₂-CH₂-CH₂), 31,0 (CH₂-CH₂-CH₂), 32,2 (CH₂-CH₂-CH₂), 36,4 (Ar-CH₂-CH₂-CONH), 40,24 (CONH-CH₂-CH₂), 56,8 (CH₃), 111,4 (Ar), 116,3 (Ar), 125,2 (Ar), 128,5 (Ar), 130,2 (Ar), 131,8 (Ar), 132,3 (Ar), 133,6 (Ar), 134,3 (Ar), 145,3, 147,0, 159,3, 166,4, 178,2.

EM-ESI (+): m/z: 552,5 [M+1]⁺, 574,4 [M+Na]⁺, 590,5 [M+K]⁺, 1126,1 [2M+Na]⁺.

UV-Vis (CHCl₃): λ_{max}=395nm, ε₃₉₅=13000

6.2.3.5 Procediment general de formació de monocapes de Langmuir

- Primerament es procedeix a realitzar una neteja exhaustiva de tot el material i en especial de la cubeta, ja que cal eliminar completament els restes de compostos i les corresponents monocapes dipositades anteriorment. Per a netejar la cubeta s'utilitza primerament un detergent a base de octanoat sòdic o sabó concentrat Micro-90 (Sigma-Aldrich) diluïts en aigua Milli-Q. Per esbandir s'utilitza aigua Milli-Q varies vegades. Per netejar la xeringa Hamilton s'utilitza el mateix dissolvent utilitzat per dissoldre el compost a dipositar.
- Es prepara una solució estàndard del compost a dipositar de concentració 0,5-1 mg/mL en cloroform de qualitat extra-pura i a les fosques. Aquesta solució, abans de ser utilitzada, es deixa 24 hores a les fosques a la nevera.
- El compost es diposita sobre la superfície aquosa gota a gota amb mitjançant una xeringa Hamilton de 50 o 100 µl intentant que les gotes caiguin de la mínima alçada possible (si és possible que toquin la superfície) per a que no passin a la subfase, i esperant uns 10 segons entre cadascuna per que s'evapori el dissolvent. Es va dipositant fins que la balança s'estabilitza a la pressió que es vol, i a continuació es deixa estabilitzar la monocapa uns 10 minuts.
- Quan es dipositen azobenzens o compostos susceptibles de presentar fotoisomerització, tot el procediment es realitza a les fosques de llum natural o blanca, ajudant-nos amb una làmpada de llum vermella.
- Un cop tenim la monocapa dipositada, es tanquen les barreres a una velocitat fixa (normalment 0,1 mm/s) i mitjançant l'enregistrament de les mesures de pressió en tot moment, podem obtenir una representació isotèrmica de la variació de la pressió en front de l'àrea molecular. Els canvis de pendent d'aquestes corbes indiquen canvis de fase.

-
- En tot moment es van poder enregistrar imatges de la monocapa mitjançant el microscopi d'angle Brewster que la cubeta porta muntat.

6.2.3.6 Monocapa de Langmuir del compost (E)-14 en forma aniònica

Es va dipositar 22 μL d'una solució de **14** de 0,6 mg/mL preparada i mantinguda a les fosques prèviament 24 hores abans sobre la superfície de tampó PB 0,05 M a pH=7,0 a 25 °C i es va deixar reposar la monocapa 10 minuts mantenint-se la pressió constant a 3,0 mN/m. A continuació es van tancar barreres a 0,4 mm/s fins a una pressió de 15 mN/m.

6.2.3.7 Monocapa de Langmuir del compost (Z)-14 en forma aniònica

Es va dipositar 30 μL d'una solució de **14** de concentració 0,60 mg/mL irradiada a 365 nm durant 10 minuts prèviament, sobre la superfície de tampó PB 0,05 M a pH=7,0 a 25 °C i es va deixar reposar la monocapa 2 minuts mantenint-se la pressió constant a 5,0 mN/m. A continuació es van tancar barreres a 0,4 mm/s fins a una pressió de 23 mN/m. La monocapa no va presentar canvis de fase en aquest interval de pressions.

6.2.3.8 Monocapes de Langmuir d'una barreja fotoestacionaria dels dos isòmers del compost 14 en forma aniònica

Monocapa 1

En primer lloc, la solució del compost **14** en cloroform es va deixar a la llum del laboratori durant 15 hores (per estar segurs que s'arribava a l'equilibri fotoestacionari) abans d'aplicar-la sobre la fase aquosa tamponada. Es va dipositar 39 μL d'una solució de **14** 0,50 mg/mL sobre la superfície de tampó PB 0,05 M a pH=7,0 a 25 °C i es va deixar reposar la monocapa 15 minuts mantenint-se la pressió constant a 3 mN/m. A continuació es van tancar barreres a 0,1 mm/s fins a 20 mN/m.

Monocapa 2

Es va dipositar 50 μL d'una solució 0,50 mg/mL de **14** sobre la superfície de tampó PB 0,05 M a pH=7,0 a 25 °C i es va deixar reposar la monocapa 15 minuts mantenint-se la

pressió que es manté a 12,5 mN/m. A continuació es van tancar barreres a 0,1 mm/s fins a una pressió de 40 mN/m, per a determinar el comportament de la monocapa a pressions elevades.

6.2.3.9 Monocapes de Langmuir del compost 13 en la seva forma monoaniònica.

Monocapa 1

Es va dipositar 32 μ L d'una solució 0,88 mg/mL de **13** sobre la superfície de tampó PB 0,05 M a pH=7,0 a 25 °C i es va deixar reposar la monocapa 8 minuts obtenint una pressió estable de 0,5 mN/m. A continuació es van tancar les barreres a 0,1 mm/s fins a arribar a obtenir una pressió de 10,9 mN/m. Aquesta monocapa va ser repetida per a confirmar la seva reproduïbilitat obtenint els mateixos resultats.

Monocapa 2

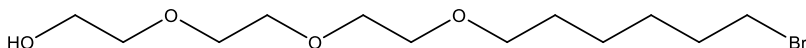
Es va dipositar 18 μ L d'una solució 0,55 mg/mL de **13** sobre la superfície de tampó PB 0,05 M a pH=7,0 a 25 °C i es va deixar reposar la monocapa 10 minuts mantenint-se la pressió constant a 0,42 mN/m. A continuació es van tancar les barreres a una velocitat de 0,2 mm/s fins arribar a una pressió de 5 mN/m, on es va parar de comprimir i es va irradiar 5 minuts a 365 nm, però no es va produir cap canvi.

Monocapa 3

Es va dipositar 30 μ L d'una solució 0,58 mg/mL de **13** sobre la superfície de tampó PB 0,05 M a pH=7,0 a 25 °C i es va deixar reposar la monocapa 5 minuts obtenint una pressió estable de 5,0 mN/m. A continuació es va afegir 0,5 mg d'avidina d'activitat 13 unit/mg de proteïna dissolta en 1 mL de PB 0,05 M a pH=7,0. Es va esperar 30 minuts per a veure l'evolució de la monocapa en aquest estadi però no es va enregistrar cap canvi de pressió ni de les imatges.

6.3 Estudi de la interacció de SAMs mixtes de d'un derivat de l'HABA amb avidina.

6.3.1 Síntesi de 2-(2-(2-((6-bromohexil)oxi)etoxi)etoxi)etanol (20)



Es dissol 27,0 g (180 mmol) de trietilenglicol en 250 mL de DMF anhidre. Tot seguit, s'afegeixen en petites porcions 1,28 g (32,0 mmol) d'hidrur de sodi (al 60% en oli mineral) observant-se un bombolleig, i es deixa reaccionar durant 70 minuts a temperatura ambient. Posteriorment s'afegeixen una sola porció 7,84 g (32,0 mmol) de 1,6-dibromohexà i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 17 hores.

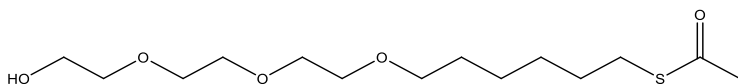
Quan la reacció ha finalitzat, s'afegeix 200 mL d'aigua i 400 mL d'èter dietílic, es separa la fase aquosa i es renta amb 3 volums de 100 mL d'èter. Les fases orgàniques s'ajunten i s'evaporen a sequedat obtenint un oli que es purifica mitjançant cromatografia en columna flash (SiO₂, AcOEt/hexà des de 20:80 fins a 40:60) i obtenint 9,9 g (31,6 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 99%.

CCF (SiO₂, AcOEt/hexà 40:60) *R_f* 0,30.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ) 1,40 (4H, m, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br), 1,60 (2H, m, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br), 1,86 (2H, m, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br), 2,72 (1H, br, OH), 3,43 (4H, m, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-Br), 3,52-3,80 (12H, m, O-CH₂-CH₂-O).

EM-ESI (+): m/z: 314,5 [M+1]⁺, 336,5 [M+Na]⁺.

6.3.2 Síntesi de tioacetat de S-(6-(2-(2-(2-hidroxi)etoxi)etoxi)etoxi)hexil) (21)



Es dissol 2,73 g (113,8 mmol) d'hidrur de sodi (al 60% en oli mineral) en 150 mL de metanol anhidre i es deixa reaccionar amb el dissolvent 45 minuts a temperatura ambient. Tot seguit, s'afegeix 6,2 g (81,5 mmol) d'àcid tioacètic i el deixem reaccionar 45 minuts més a temperatura ambient. Per últim, s'afegeix 9,9 g (31,6 mmol) del compost **20** dissolt

en 10 mL de metanol anhidre i es deixa reaccionar la barreja a temperatura ambient durant 4 dies.

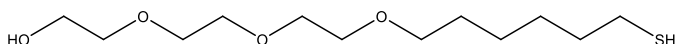
Quan la reacció ha finalitzat, s'evapora a sequedat el dissolvent, es redissol en 200 mL d'èter dietílic i es fa un rentat amb 100 mL de $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$. La fase aquosa es renta amb més porcions d'èter (3x100 mL) que s'ajunten, s'assequen amb $\text{Na}_2\text{SO}_4\text{anh}$ i es rotavaporen fins a sequedat obtenint un oli que es purifica mitjançant cromatografia en columna flash (SiO_2 , AcOEt/hexà des de 30:70 fins a 50:50). Finalment s'obté 6,8 g (22,1 mmol) del producte desitjat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 70%.

CCF (SiO_2 , AcOEt/hexà 50:50) *Rf* 0,30.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ) 1,30-1,41 (4H, m, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SAc), 1,50-1,65 (4H, m, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SAc), 2,32 (3H, s, SCOCH_3), 2,85 (2H, t, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SAc), 3,45 (2H, t, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SAc), 3,55-3,80 (13H, m, O- CH_2 - CH_2 -O, -OH).

EM-ESI (+): m/z: 309,3 $[\text{M}+1]^+$, 330,5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.3.3 Síntesi de 2-(2-(2-((6-mercaptohexil)oxi)etoxi)etoxi)etanol (22)



Es dissol 1,16 g (3,76 mmol) del compost **21** en 100 mL de metanol, s'afegeix 1 mL (12,1 mmol) d'àcid clorhídric concentrat i es fa reaccionar a reflux durant 4 hores.

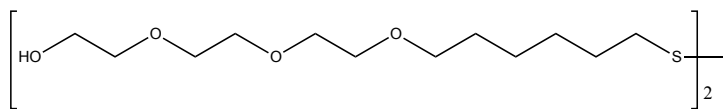
Quan la reacció ha finalitzat, s'evapora a sequedat el dissolvent i es purifica el producte cru mitjançant cromatografia en columna flash (SiO_2 , AcOEt/ CH_2Cl_2 des de 10:90 fins a 20:80), obtenint-se 980 mg (3,67 mmol) del producte desitjat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 98%.

CCF (SiO_2 , AcOEt/ CH_2Cl_2 20:80) *Rf* 0,30.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ) 1,30-1,45 (4H, m, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SH), 1,57-1,70 (4H, m, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SH), 2,50 (2H, dt, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SH), 3,45 (2H, t, O- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SH), 3,55-3,80 (13H, m, O- CH_2 - CH_2 -O, -OH).

EM-ESI (+): m/z: 267,5 $[\text{M}+1]^+$, 289,6 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 533,2 $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 555,2 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.3.4 Síntesi de 23



Es dissol 60 mg (0,23 mmol) del compost **22** en 50 mL de metanol i s'afegeix petites porcions d'una solució saturada de iode en metanol fins que en la barreja de reacció persisteix un color groguenc, per després deixar-la reaccionar una hora a temperatura ambient. Finalitzada la reacció evaporem el dissolvent a sequedat obtenint un oli que purificarem primer per cromatografia en columna flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 50%) i després per HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H₂O/MeOH; 80:20), obtenint-se 117 mg (0,22 mmol) del producte desitjat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 95%.

CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 50%) R_f 0,60.

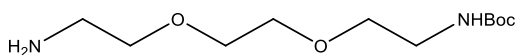
HPLC (H₂O/MeOH 80:20) t=14 min.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ) 1,30-1,45 (8H, m, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-), 1,57-1,78 (8H, m, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-), 1,85 (2H, br, OH), 2,67 (4H, t, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-S-), 3,46 (4H, t, O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SH), 3,55-3,80 (24H, m, O-CH₂-CH₂-O).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃, δ): 70,2-70,8 (CH₂-O); 61,3 (CH₂-OH); 39,4 (CH₂-S₂); 30,0 (CH₂(CH₂)₃CH₂S₂); 29,5 (CH₂-CH₂S₂); 27,8 (CH₂CH₂CH₂S₂); 25,2, (CH₂(CH₂)₂CH₂S₂).

EM-ESI (+): m/z: 553,4 [M+Na]⁺.

6.3.5 Síntesi de (2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etil)carbamat de tert-butil (24)



Es dissol 10.0 g (64.5 mmol) de 2-2'(etilendioxi)bis(etilamina) en 100 mL de dioxà. Tot seguit, s'addiciona lentament una solució de 4.0 g d'anhídrid de Boc (18.1 mmol) dissolts en 60 mL de dioxà. La barreja resultant s'escalfa a 45 °C durant quatre hores i es refreda a temperatura ambient durant 24 hores.

Un cop finalitzada la reacció, s'evapora a sequedat el dissolvent i es redissol el cru resultant amb aigua. Acidifiquem la solució amb HCl 1M fins a pH=2 i la rentem amb 3 volums de 75 mL de CH₂Cl₂. Basifiquem la fase aquosa amb NaOH 1M fins a pH=10 i fem extraccions amb CH₂Cl₂ (25 x 25mL) fins que per CCF no veiem producte en la fase orgànica. S'ajunten

els extractes orgànics i es renten amb NaCl_{sat} , els assequem amb $\text{Na}_2\text{SO}_{4\text{anh}}$ i evaporem el dissolvent a sequedat.

S'obté 4.02 g (16.2 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 90%.

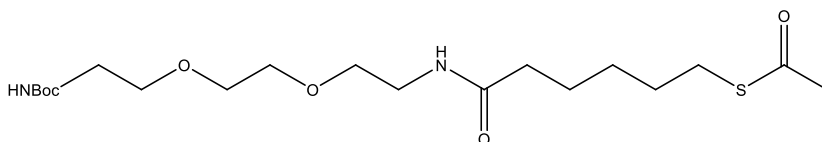
CCF (SiO_2 , MeOH/NH_3 9:1) *Rf* 0.45.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1}) = 3002, 2925, 1717, 1676, 1601 \text{ cm}^{-1}$

$^1\text{H RMN}$ (200 MHz, CDCl_3 , δ) 1.45 (9H, s, CH_3), 2.45 (3H, s, CH_3), 2.89 (2H, t, $\text{H}_2\text{N-CH}_2$), 3.33 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-NHBoc}$), 3.50-3.71 (8H, m, $\text{CH}_2\text{-O}$).

EM-ESI (+): m/z : 249.3 $[\text{M}+1]^+$, 271.3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.3.6 Síntesi de 25



Es dissol 1,695 g (8,9 mmol) d'àcid acetilthiohexanoic en 200 mL CH_2Cl_2 , i se li afegeixen en aquest ordre, 4,0 mL (24,3 mmol) de DIEA, 5,050 g (9,7 mmol) de PyBOP i 110 mg (0,81 mmol) de HOBt. Es deixa reaccionar 10 minuts a temperatura ambient, s'afegeix 2,0 g (8,1 mmol) del compost **24** i es deixa agitant durant 20 hores a temperatura ambient.

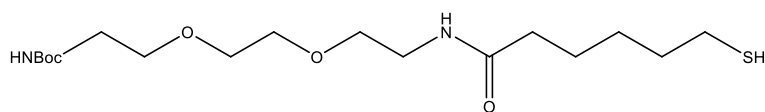
Quan la reacció ha finalitzat, s'evapora el dissolvent a sequedat, es torna a dissoldre amb 100 mL de CH_2Cl_2 i es renta amb HCl 0,05 M (3x75 mL), $\text{NaHCO}_{3\text{sat}}$ (3x75 mL) i NaCl_{sat} (1x75 mL). A continuació s'asseca la fase orgànica amb $\text{Na}_2\text{SO}_{4\text{anh}}$ i s'evapora a sequedat, obtenint-se un oli que es purifica mitjançant cromatografia en columna flash (SiO_2 , des de $\text{AcOEt}/\text{hexà}$ 2:1 fins a AcOEt/MeOH 95:5). S'obté 2,265 g (5,4 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 67%.

CCF (SiO_2 , AcOEt) *Rf* 0,30.

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3 , δ) 1,39 (9H, s, $\text{CO-C}(\text{CH}_3)_3$), 1,41 (2H, dt, $\text{NHCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SAC}$), 1,60 (4H, m, $\text{NHCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SAC}$), 2,20 (2H, t, $\text{NHCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SAC}$), 2,32 (3H, s, S-CO-CH_3), 2,85 (2H, t, $\text{NHCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SAC}$), 3,32 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-NHBoc}$), 3,4-3,7 (10H, m, $\text{CH}_2\text{-O}$), 5,00 (1H, br, NHCO), 6,05 (1H, br, NHCO).

EM-ESI (+): m/z : 421,5 $[\text{M}+1]^+$, 443,5 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.3.7 Síntesi de 26



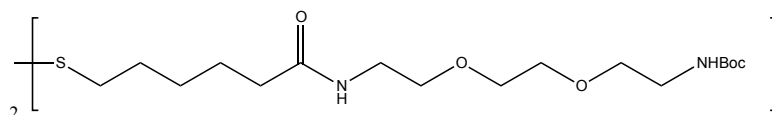
Es dissol 2,18 g (5,2 mmol) del compost **25** en 150 mL d'una barreja de MeOH/NaOH 5M 1:1 i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 2 hores. Finalitzat aquest temps, un cop confirmada la fi de la reacció per ^1H RMN d'una alíquota, s'evapora el MeOH i s'extreu amb CH_2Cl_2 (3x75 mL). S'obté 1,93 g (5,1 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 98%.

CCF (SiO_2 , AcOEt/MeOH 95:5) *Rf* 0,50.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ) 1,39 (9H, s, CO-C-(CH_3) $_3$), 1,41 (2H, dt, NHCO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SH), 1,60 (4H, m, NHCO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SH), 2,21 (2H, t, NHCO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SH), 2,55 (2H, dt, NHCO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SH), 3,32 (2H, m, CH_2 -NHBoc), 3,4-3,7 (10H, m, CH_2 -O), 5,00 (1H, br, NHCO), 6,05 (1H, br, NHCO).

EM-ESI (+): *m/z*: 379,2 [$\text{M}+1$] $^+$, 401,3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

6.3.8 Síntesi de 27



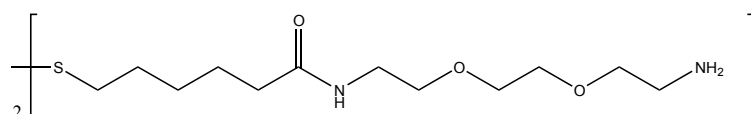
Es dissol 1,50 g (4,0 mmol) del compost **26** en 150 mL d'una barreja de MeOH/NaOH 5 M 1:1 i es va addicionant gota a gota una solució de iode saturada en MeOH fins que el color groguenc perduri. A continuació, es deixa es reaccionar a temperatura ambient durant 1 hora. Un cop finalitzada la reacció, es renta la barreja amb CH_2Cl_2 (5x75 mL) i la fase orgànica s'ajunta i es renta amb NaHSO_3 10% (3x75 mL). La fase orgànica s'evapora a sequedat obtenint 1,47 g (1,95 mmol) del producte desitjat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 99%.

CCF (SiO_2 , AcOEt/MeOH 9:1) *Rf* 0,3.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ) 1,45 (22H, m, CO-C-(CH_3) $_3$, NHCO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SS), 1,60-1,80 (12H, m, NHCO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SS), 2,21 (4H, t, NHCO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SS), 2,68 (4H, t, NHCO- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -SS), 3,32 (4H, m, CH_2 -NHBoc), 3,4-3,7 (20H, m, CH_2 -O), 5,00 (2H, br, NHCO), 6,05 (2H, br, NHCO).

EM-ESI (+): *m/z*: 753,4 [$\text{M}+1$] $^+$, 775,4 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$.

6.3.9 Síntesi de 28

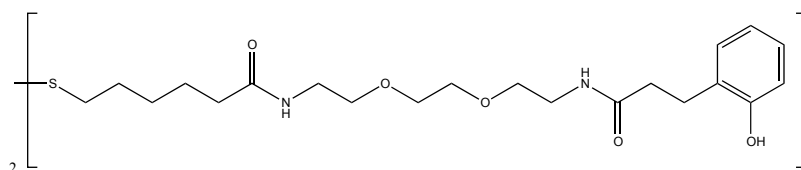


Es dissol 1,47 g (1,95 mmol) del compost **27** en 150 mL de CH₂Cl₂/TFA 95:5 i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 1 hora. A continuació s'evapora el dissolvent a sequedat i es torna a dissoldre amb CH₂Cl₂ per ser rentat amb NaOH 2M (1x50 mL). La fase aquosa es renta diverses vegades amb CH₂Cl₂ (5x50 mL), s'ajunten les fraccions orgàniques i s'evaporen a sequedat. S'obté 1060 mg (1,91 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 98%.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ) 1,41 (4H, dt, NHCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SS), 1,60-1,80 (8H, m, NHCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SS), 2,21 (8H, m, NHCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SS, H₂N-CH₂), 2,68 (4H, t, NHCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SS), 3,4-3,7 (20H, m, CH₂-O), 5,00 (2H, br, NHCO), 6,05 (2H, br, NHCO), 6,80 (4H, br, NH₂).

EM-ESI (+): m/z: 555,3 [M+1]⁺, 577,6 [M+Na]⁺.

6.3.10 Síntesi de 29



Es dissol 618 mg (3,72 mmol) de l'àcid 3-(2-hidroxifenil)propanoic en 200 mL CH₂Cl₂, i se li afegeixen en aquest ordre, 1,3 mL (7,75 mmol) de DIEA, 1,94 g (3,72 mmol) de PyBOP i 42 mg (0,31 mmol) de HOBt. Es deixa reaccionar 10 minuts a temperatura ambient, s'afegeix 860 mg (1,55 mmol) del compost **28** i es deixa agitant durant 20 hores a temperatura ambient.

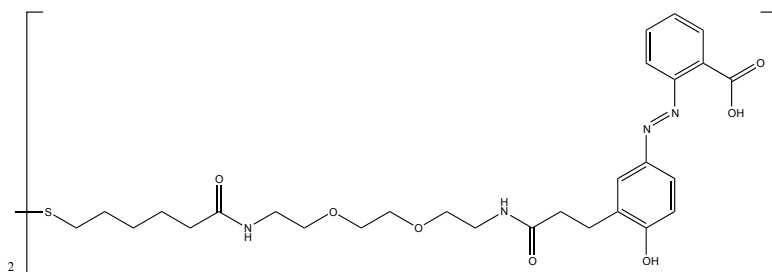
Quan la reacció ha finalitzat, s'evapora el dissolvent a sequedat, es torna a dissoldre amb 100 mL de CH₂Cl₂ i es renta amb HCl 0,05 M (3x75 mL), NaHCO_{3sat} (3x75 mL) i NaCl_{sat} (1x75 mL). A continuació s'asseca la fase orgànica amb Na₂SO_{4anh} i s'evapora a sequedat, obtenint-se un oli que es purifica mitjançant cromatografia en columna flash (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH des de 100:0 fins a 92:8). S'obté 840 mg (0,99 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 64%

CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 9:1) *Rf* 0,5.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ) 1,41 (4H, dt, NHCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SS), 1,60-1,80 (8H, m, NHCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SS), 2,21 (4H, m, NHCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SS) 2,68 (8H, m, NHCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-SS, CH₂-CH₂-Ar), 2,92 (4H, m, CH₂-CH₂-Ar), 3,4-3,7 (24H, m, CH₂-O), 6,10 (2H, br, NHCO), 6,50 (2H, br, NHCO), 6,80-6,90 (4H, m, Ar), 7,00-7,15 (4H, m, Ar), 8,80 (2H, br, OH).

EM-ESI (+): m/z: 851,4 [M+1]⁺, 873,6 [M+Na]⁺.

6.3.11 Síntesi de 30



Primerament es forma la sal de diazoni de l'àcid antranílic dissolent 143 mg (1,04 mmol) d'àcid antranílic en 10 mL d'aigua i 0,25 mL d'àcid clorhídric concentrat. Un cop dissolt es refreda en un bany de gel (pot precipitar parcialment) i se li afegeix gota a gota una solució de 72 mg (1,04 mmol) de NaNO₂ en 10 mL d'aigua freda. Per tal de comprovar que la solució resultant té un excés de NaNO₂ es va realitzar un test amb NaI donant positiu.

Per altra banda es dissolen 440 mg (0,52 mmol) del compost **29** en una barreja 1:1 de MeOH i una solució d'hidròxid de potassi 0,5 M. Es refreda la solució resultant amb un bany de gel. A continuació s'aboca gota a gota la solució de sal de diazoni sobre la solució de fenol apareixent un color vermell intens. Un cop finalitzada l'addició es deixa reaccionar durant 20 min a 0 °C i 20 min a temperatura ambient i, a continuació, s'acidifica la mescla de reacció amb HCl al 10% fins a precipitar totalment el producte resultant. Es filtra el precipitat amb una placa del nº 4 i s'asseca al dessecador. El producte cru el purificarem primer per cromatografia en columna flash (SiO₂, AcOEt/MeOH/AcOH 7:2:1) i després per HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H₂O/MeOH/fòrmic; 75:25:0,1) obtenint 458 mg (0,385 mmol) del producte esperat en forma de sòlid vermell. Rendiment: 74%.

CCF (SiO₂, AcOEt/MeOH/AcOH 7:2:1) *Rf* 0,4.

HPLC (H₂O/MeOH/fòrmic; 75:25:0,1) t=30 min.

IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$ = film NaCl), $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3373; 3069; 2929; 2863; 1724; 1636.

^1H RMN (400 MHz, CD_3OD , δ) 1,41 (4H, dt, $\text{NHCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SS}$), 1,60-1,80 (8H, m, $\text{NHCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SS}$), 2,21 (4H, m, $\text{NHCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SS}$) 2,68 (8H, m, $\text{NHCO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SS}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ar}$), 3,00 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Ar}$), 3,4-3,7 (24H, m, $\text{CH}_2\text{-O}$), 6,90 (2H, d, Ar) 7,50 (2H, dt, Ar), 7,60-7,80 (8H, m, Ar), 7,95 (2H, m, Ar).

^{13}C RMN (100,6 MHz, CDCl_3 , δ): 176,2 (CO); 175,8 (CO); 130,2 (C_{Ar}); 130,1 (C_{Ar}); 130,0 (C_{Ar}); 126,7 (C_{Ar}); 125,4 ($\text{C}_{\text{Ar-CH}_2}$); 117,4 (C_{Ar}); 117,1 (C_{Ar}); 71,4 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 71,2 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 70,7 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 70,7 ($\text{CH}_2\text{-O}$); 40,4 ($\text{CH}_2\text{-NHCO}$); 40,3 ($\text{CH}_2\text{-NHCO}$); 39,4 ($\text{CH}_2\text{-S}_2$); 36,9 ($\text{CH}_2\text{-CONH}$); 36,8 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{Ar}$); 29,9 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{S}_2$); 29,0 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{S}_2$); 27,5 ($\text{CH}_2\text{-Ar}$); 26,5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{CONH}$).

EM-ESI (+): m/z: 1148,2 $[\text{M}+1]^+$, 1170,2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

6.3.12 Procediment general de preparació de monocapes autoensamblades sobre or (SAM)

Per a la formació de SAMs en un elèctrode d'or es va seguir en general el següent procediment experimental:

- Primerament es renta l'elèctrode amb aigua milli-Q
- S'escalfa l'elèctrode d'or amb flama fins a tornar-lo vermell per eliminar restes de matèria orgànica.
- Es refreda de cop submergint-lo en aigua milli-Q.
- Es submergeix l'elèctrode d'or en una solució del tiol o disulfur amb el qual volem realitzar la monocapa en etanol de qualitat espectroscòpica, durant un temps precís.
- Es renta l'elèctrode amb la monocapa formada primer amb etanol i després amb aigua milli-Q a fi d'eliminar l'etanol o les restes superficials de matèria orgànica que no han format monocapa.
- A partir de que tenim la monocapa objectiu formada com s'ha descrit anteriorment, podem enregistrar el voltamograma cíclic utilitzant l'elèctrode d'or amb la monocapa com a elèctrode de treball. Es col·loca l'elèctrode d'or amb la monocapa dins d'una cel·la i submergida en un medi concret sota Argó. En la mateixa cel·la es disposa un elèctrode de Pt com a contraelèctrode i calomelans com a referència (Figura 85).

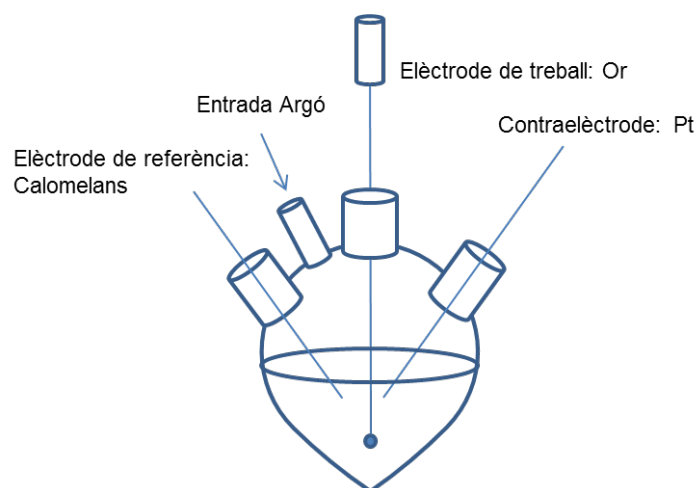
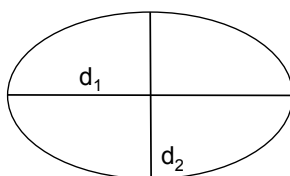


Figura 85. Representació de la cel·la electroquímica utilitzada per a realitzar les monocapes SAMs sobre l'elèctrode d'Or i estudiar-ne les seves propietats mitjançant voltametria cíclica.

6.3.13 *Determinació de la superfície de l'elèctrode d'or.*

Primer es va fer una mesura de la superfície geomètrica que aproximadament té l'elèctrode policristal·lí d'Or que utilitzem:



- Tipus de geometria: esferoide prolat.
- Diàmetres: 2,883 mm (d_1) i 2,524 mm (d_2).
- Superfície calculada geomètricament: 0,2193 cm²

En segon lloc es va determinar la superfície de l'elèctrode mitjançant voltametria cíclica. Aquesta superfície va ser mesurada en H₂SO₄ 0,5 M integrant la càrrega associada a la reducció de la superfície d'Or oxidat produïda prèviament per un escombrat cap a potencial +1,74 V. El factor de conversió utilitzat en els càlculs és de 400 μC cm⁻² (dos electrons per àtom superficial d'Or)^{150.151}. Aquesta determinació es va repetir 5 vegades, obtenint com a resultat:

- Càrrega calculada= 86,4 (±2,6) μC
- Superfície calculada per CV: 0,216 (±0,0065) cm²

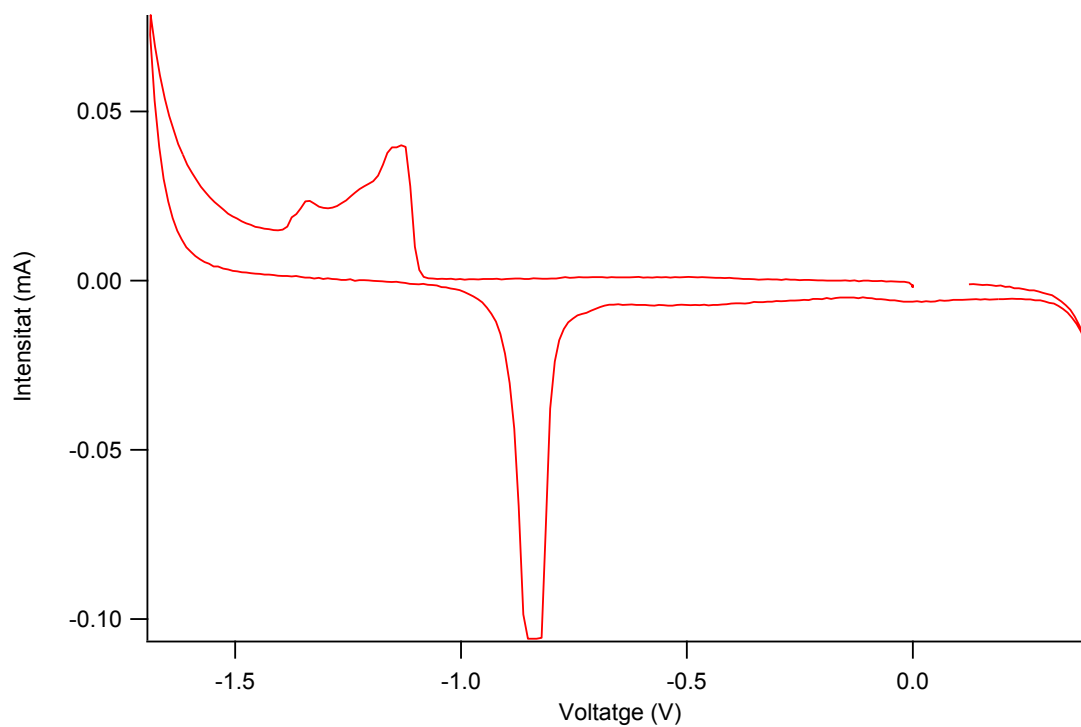
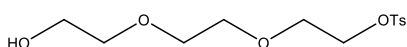


Figura 86. Voltamograma d'una solució de H_2SO_4 0,5 M utilitzant l'elèctrode d'Or policristal·lí, Pt com a contra-elèctrode i calomelans com a referència. Velocitat 100mV/s i resistència 1k Ω .

6.4 Desenvolupament d'una metodologia per a preparar conjugats heterobifuncionals d'avidina i estreptavidina

6.4.1 Metodologia per a la preparació de conjugats heterobifuncionals de (S)Av utilitzant monocapes de Langmuir

6.4.1.1 Síntesi de *p*-toluensulfonat de trietilenglicol **31**



Es dissol 20,0 g (130 mmol) de trietilenglicol i 29 mL (65 mmol) de trietilamina en 100 mL de CH₂Cl₂. Tot seguit, s'afegeix en una sola porció 6,2 g (33 mmol) de clorur de tosil, i la barreja resultant es deixa agitant durant una hora a temperatura ambient.

Un cop finalitzada la reacció, la barreja es renta amb KHSO₄ 1M i amb NaHCO₃ 5%, s'asseca sobre Na₂SO₄ anhidre, i s'evapora el dissolvent fins a sequedat. El cru de reacció es purifica per columna cromatogràfica (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH 5%), obtenint-se 7,7 g (26 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 78%.

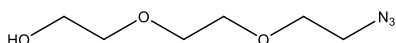
CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 2%) R_f 0,19

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ) 2,38 (1H, t, OH), 2,45 (3H, s, CH₃), 3,52 (2H, t, OCH₂), 3,67 (8H, m, 4 × OCH₂), 4,19 (2H, t, OCH₂), 7,35 (2H, d, ArH, J³ = 8,1 Hz), 7,80 (2H, d, ArH, J³ = 8,1 Hz).

¹³C RMN (75,5 MHz, CDCl₃, δ) 21,5 (CH₃), 61,4, 69,4, 69,1, 72,4 (OCH₂), 127,8, 129,8, 132,7, 144,9 (ArC).

EM-ESI (+): m/z: 305,3 [M+1]⁺, 327,3 [M+Na]⁺.

6.4.1.2 Síntesi de 2-(2-(2-azidoetoxi)etoxi)etanol (**32**)



Es dissolen 7,2 g (23,9 mmol) del compost **31** i 2,3 g (35,8 mmol) d'azida sòdica en 80 mL de dimetilformamida, i es porten a reflux durant 3 hores.

Un cop finalitzada la reacció, deixem refredar a temperatura ambient i evaporem la dimetilformamida. La barreja de reacció es purifica per cromatografia en columna flash

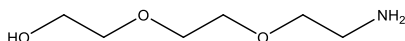
(SiO₂; AcOEt). S'obté 3,3 g (18,9 mmol) del producte desitjat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 80%.

CCF (SiO₂, AcOEt) Rf 0,3.

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃, δ) 2,23 (1H, t, OH) 3,21 (2H, t, CH₂-N₃), 3,60-3,80 (10H, m, CH₂-O).

EM-ESI (+): m/z: 176,3 [M+1]⁺, 198,3 [M+Na]⁺.

6.4.1.3 Síntesi de 2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etanol (**33**)



Es dissolen 3,1 g (17,6 mmol) del compost **32** en 30 mL de THF supersec. Per altra banda, es prepara una dissolució de 5,0 g (19,4 mmol) de trifenilfosfina en 20 mL de THF. Es refreden les dissolucions a 0°C i s'aboca l'azida sobre la trifenilfosfina. Es deixa escalfar la barreja a temperatura ambient i es deixa reaccionar durant 48 hores. S'atura la reacció afegint 570 µL d'aigua (31,7 mmol) i s'evapora el dissolvent a sequedat.

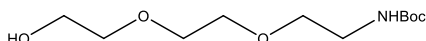
El cru de reacció es renta amb toluè (20x20 mL) fins que la fase aquosa no contingui òxid de trifenilfosfina. S'evapora l'aigua a sequedat obtenint 2,5 g (16,8 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli groguenc. Rendiment: 96%.

CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 3:3:1) Rf 0,25.

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃, δ) 2,91 (2H, t, CH₂-NH₂), 3,60-3,80 (10H, m, CH₂-O).

EM-ESI (+): m/z: 150,3 [M+1]⁺, 172,3 [M+Na]⁺.

6.4.1.4 Síntesi de 2-(2-(2-hidroxi)etoxi)etil)carbammat de tert-butíl (**34**)



Es dissolen 200 mg (1,3 mmol) de compost **33** i 350 mg (1,6 mmol) d'anhidrid de Boc en 20 mL de CH₂Cl₂. Es deixa reaccionar la barreja durant 16 hores i s'evapora el dissolvent fins a sequedat.

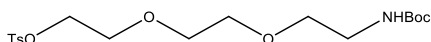
El cru de reacció es purifica mitjançant cromatografia en columna flash (SiO₂; gradient des de CH₂Cl₂ fins CH₂Cl₂/MeOH 9:1), obtenint 268 mg (1,07 mmol) del producte desitjat pur en forma d'oli groguenc. Rendiment: 91%.

CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 90:10) *Rf* 0,50.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃, δ) 1,44 (9H, s, CH₃), 3,32 (2H, m, CH₂-NH), 3,57-3,70 (8H, m, CH₂-O), 3,76 (2H, m, CH₂-OH).

EM-ESI (+): m/z: 250,6 [M+1]⁺, 272,3 [M+Na]⁺.

6.4.1.5 Síntesi de (2-(2-(2-*p*-*p*-toluensulfonatetoxi)etoxi)etil)carbamat de *tert*-butil (35)



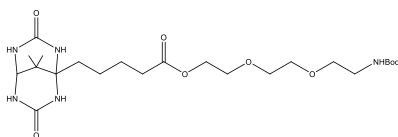
Es dissolen 800 mg (3,2 mmol) de compost **34** i 5,6 mL (12,8 mmol) de trietilamina en 50 mL de CH₂Cl₂. A continuació, s'afegeix en una porció 1,22 g (6,4 mmol) de clorur de tosil i es deixa reaccionar la barreja durant 24 hores a temperatura ambient. Un cop finalitzada la reacció s'evapora el dissolvent fins a sequedat, i es purifica per cromatografia en columna flash (SiO₂; gradient des de hexà/AcOEt 1:1 fins a AcOEt). S'obtenen 1,1 g (2,74 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli lleugerament groguenc. Rendiment: 85%.

CCF (SiO₂, AcOEt) *Rf* 0,80.

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃, δ) 1,44 (9H, s, O-C(CH₃)), 2,45 (3H, s, Ar-CH₃), 3,32 (2H, m, CH₂-NH), 3,50-3,74 (8H, m, CH₂-O), 4,17 (2H, t, CH₂-OTs), 7,35 (2H, d, Ar), 7,79 (2H, d, Ar).

EM-ESI (+): m/z: 404,6 [M+1]⁺, 426,7 [M+Na]⁺.

6.4.1.6 Síntesi de 36



Primerament es prepara la sal potàssica de la DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) dissolent-ne 230 mg (0,81 mmol) i 106 mg (0,81 mmol) de K₂CO₃ en 50mL d'aigua i evaporant el dissolvent a sequedat.

Seguidament, es dissol la sal potàssica **n** en 50mL de DMSO_{anh} i se li afegeixen 325 mg (0,81 mmol) del compost **35** dissolts en 5mL de DMSO_{anh}, deixant reaccionar la barreja a temperatura ambient durant 4 dies.

S'evapora el dissolvent a sequedat sense escalfar a més de 40°C i es purifica directament el cru de reacció per HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H₂O/MeOH; 1:1), obtenint 125 mg (0,24 mmol) del producte esperat pur en forma d'un sòlid blanc. Rendiment: 30%.

HPLC (H₂O/MeOH 1:1) t=30min.

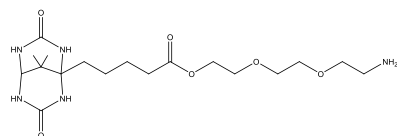
CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 1:2) R_f 0,80.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ) 1,17 (6H, s, C(CH₃)₂), 1,37 (9H, s, O-C(CH₃)₃), 1,40-1,55 (6H, m, C-CH₂-C), 2,30 (2H, t, CH₂-CO₂), 3,06 (2H, m, CH₂-NHBoc), 3,37 (2H, t, O-CH₂-CH₂-NHBoc), 3,51 (4H, m, O-CH₂-CH₂-O), 3,60 (2H, t, CO₂-CH₂-CH₂), 3,79 (1H, t, CH-NHCONH), 4,13 (2H, t, CO₂-CH₂), 6,54 (2H, s, NH-C-(CH₂)₄), 6,75 (1H, br, NH-Boc), 7,03 (2H, br, NH-CH).

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆, δ) 23,1, 23,2, 27,5, 30,0, 30,2, 34,8, 35,2, 41,0, 65,0, 67,8, 70,3, 71,0, 71,1, 71,8, 79,9, 156,1, 156,4, 157,9, 174,7.

EM-ESI (+): m/z: 516,7 [M+1]⁺, 554,7 [M+K]⁺, 535,5 [2M+H+K]²⁺

6.4.1.7 Síntesi de 37



Es dissolen 50 mg (0,10 mmol) de **36** en 5mL (67 mmol) d'àcid trifluoroacètic i s'agita la barreja de reacció durant 2 hores a temperatura ambient, i tot seguit, s'evapora a sequedat el TFA a sequedat.

S'addicionen 10mL d'AcOEt per a precipitar el producte i es separa per centrifugació tres cops. Per últim, es purifica per HPLC el producte impur (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f = 4 mL/min, H₂O/MeOH; 60:40).

S'obtenen 40 mg (0,096 mmol) del producte esperat pur en forma d'un sòlid blanc. Rendiment: 96%.

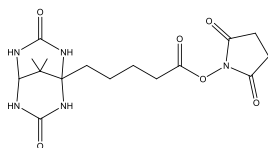
HPLC (H₂O/MeOH 60:40) t=25min

CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 1:2) R_f 0,50.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, δ) 1,04 (6H, s, C(CH₃)₂), 1,40-1,60 (6H, m, C-CH₂-C), 2,30 (2H, t, CH₂-CO₂), 2,95 (2H, m, CH₂-NH₂), 3,40 (2H, t, O-CH₂-CH₂-NH₂), 3,51 (4H, m, O-CH₂-CH₂-O), 3,59 (2H, t, CO₂-CH₂-CH₂), 3,79 (1H, t, CH-NHCONH), 4,15 (2H, t, CO₂-CH₂), 6,52 (2H, br, NH-C-(CH₂)₄), 7,03 (2H, br, NH-CH), 7,73 (1H, br, NH₂).

EM-ESI (+): m/z: 416,4 [M+1]⁺, 831,6 [2M+H]⁺

6.4.1.8 Síntesi de 38



Es dissolen 568 mg (2,00 mmol) de DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**), 254 mg (2,20 mmol) de *N*-hidroxisuccinimida i 824 mg (4,00 mmol) de DCC en 100 mL de DMSO_{anh}, i es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 48 hores.

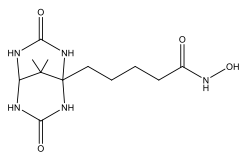
S'atura la reacció evaporant el dissolvent a sequedat, i el cru de reacció es purifica primer mitjançant cromatografia en columna flash (SiO₂; gradient des de CH₂Cl₂/MeOH 9:1 fins 1:1). Després es recristal·litza amb ¹PrOH i es filtra amb una placa de filtració, obtenint 627 mg (1,64 mmol) del producte desitjat pur en forma d'un sòlid blanc. Rendiment: 82%.

CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 1:1) R_f 0,50.

¹H RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ) 1,07 (6H, s, C(CH₃)₂), 1,55 (6H, m, C-CH₂-C), 2,66 (2H, t, CH₂-CO₂), 2,81 (4H, s, CH₂-CO-N), 3,79 (1H, t, CH-NHCONH), 6,55 (2H, br, NH-C-(CH₂)₄), 7,02 (2H, br, NH-CH-NH).

EM-ESI (+): m/z: 382,2 [M+1]⁺, 404,4 [M+Na]⁺

6.4.1.9 Síntesi de 39



A una dissolució de 359 mg (5,25 mmol) d'hydroclorur d'hydroxilamina en 5mL de DMSO, se li afegeix 0,75 mL de trietilamina (5,25 mmol) i una solució de 100mg (0,26 mmol) de **38** dissolts en 40 mL de DMSO.

Es deixa reaccionar una hora a temperatura ambient i es para la reacció evaporant el dissolvent a sequedat. Posteriorment es redissol el cru en 20 mL d'aigua, s'acidifica a pH=2 amb àcid acètic i s'evapora el dissolvent. Finalment, el producte es purifica primer per cromatografia en columna flash (SiO₂; gradient de CH₂Cl₂/MeOH 90:10 a 0:100) i després per HPLC (Kromasil C18, columna semi-preparativa, f=4mL/min, H₂O/MeOH; 90:10), obtenint 69 mg (0,24 mmol) del producte esperat pur en forma d'un sòlid blanc. Rendiment: 91%.

HPLC (H₂O/MeOH 90:10) t_R=17min

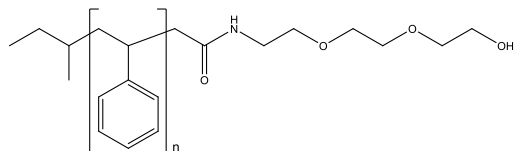
CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 1:1) R_f 0,40.

¹H RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ) 1,04 (6H, s, C(CH₃)₂), 1,32-1,55 (6H, m, C-CH₂-C), 1,93 (2H, t, CH₂-CONHOH), 3,77 (1H, t, CH-NHCONH), 6,50 (2H, br, NH-C-(CH₂)₄), 7,00 (2H, br, NH-CH-NH), 8,65 (1H, br, NH-OH), 10,40 (1H, br, NH-OH).

EM-ESI (+): m/z: 300,1 [M+1]⁺, 599,6 [2M+H]⁺

Anàlisi elemental, C₁₂H₂₁N₅O₄·2H₂O (%) calculat: C: 42,98, H: 7,51, N: 20,88; experimental: C: 43,24, H: 6,87, N: 19,81

6.4.1.10 Síntesi de 41



Es dissolen 100 mg (0,05 mmol) de PS₂₀-CO₂H (**40**), 31 mg (0,07 mmol) de PyBOP i 30 μL (0,2 mmol) de DIEA en 30 mL de CH₂Cl₂, i a continuació se li afegeixen 12 mg (0,08 mmol) de H(OCH₂CH₂)₃NH₂ (**33**). Es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 72 hores.

S'atura la reacció evaporant el dissolvent a sequedat, i posteriorment es redissol el cru de reacció amb 50 mL de CH₂Cl₂, es renta amb aigua (50mL x 2), amb NaHCO_{3sat} (50mL

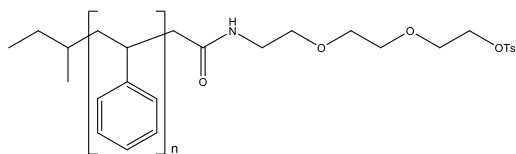
x 2), s'asseca la fase orgànica i s'evapora a sequedat. Es torna a redissoldre el cru en 10 mL de CH_2Cl_2 i es fa precipitar amb uns 100 mL de MeOH/NH_3 97:3. Es separa el precipitat per centrifugació, rentant-lo amb MeOH , obtenint 110 mg (0,055 mmol) del producte esperat pur en forma d'un sòlid blanc esponjós. Rendiment quantitatiu.

CCF (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{TEA}$ 3:3:1) *Rf* 0,70.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ) 0,5-0,8 (6H, br, CH_3), 0,8-1,3 (nH, br, C- CH_2 -C), 1,8-2,0 (nH, br, CH-Ar), 2,68 (2H, t, CH_2 -OH), 2,85-2,95 (1H, br, CH- CH_2 CONH), 3,10 (2H, m, CH_2 -NHCO), 3,3-3,6 (8H, m, CH_2 - CH_2 -O), 6,3-7,3 (nH, br, H-Ar).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ) 42,0, 45,1, 48,0, 62,1, 70,4, 73,3, 93,5, 124,1, 127,9, 130,2.

6.4.1.11 Síntesi de 42



Es dissolen 100 mg (0,05 mmol) de **41** i 200 μL (0,36 mmol) de TEA en 10 mL de CH_2Cl_2 , i a continuació se li afegeixen 18 mg (0,09 mmol) de pTsCl. Es deixa reaccionar a temperatura ambient durant 72 hores.

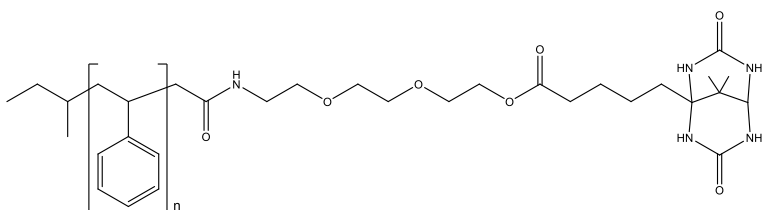
S'atura la reacció evaporant el dissolvent a sequedat, i posteriorment es redissol el cru de reacció amb 2 mL de CH_2Cl_2 i es fa precipitar amb uns 10 mL de MeOH . Es separa el precipitat per centrifugació, rentant-lo amb MeOH . El sobrenedant s'evapora a sequedat i es redissol amb 1 mL de CH_2Cl_2 tornant-lo a fer precipitar amb 10 mL de MeOH i separant-lo amb centrifugació. El producte obtingut es purifica mitjançant cromatografia en columna flash (SiO_2 ; gradient des de CH_2Cl_2 fins a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5), obtenint-se 36 mg (0,016 mmol) del producte esperat pur en forma d'un sòlid blanc esponjós. Rendiment: 34%.

CCF (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99:1) *Rf* 0,50.

^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ) 0,5-0,8 (6H, br, CH_3), 0,8-1,3 (nH, br, C- CH_2 -C), 1,8-2,0 (nH, br, CH-Ar), 2,42 (3H, s, Ar- CH_3), 2,85-2,95 (1H, br, CH- CH_2 CONH), 3,20 (2H, m, CH_2 -NHCO), 3,3-3,6 (8H, m, CH_2 - CH_2 -O), 6,30-7,25 (nH, br, H-Ar), 7,30 (2H, d, H-Ar- CH_3), 7,78 (2H, d, H-Ar- CH_3).

^{13}C RMN (100 MHz, CDCl_3 , δ) 22,3, 40,0, 42,1, 44,0, 68,3, 68,4, 69,7, 124,1, 126,2, 127,9.

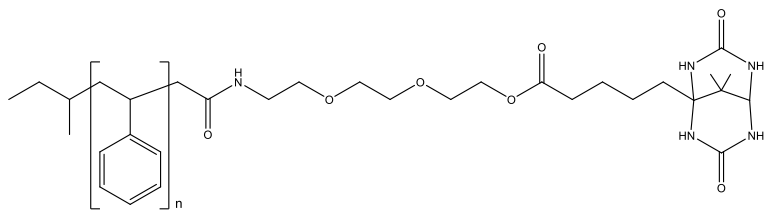
6.4.1.12 Síntesi de 43



Primerament es prepara la sal potàssica de la DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) dissolent-ne 10 mg (0,034 mmol) i 5 mg (0,034 mmol) de K₂CO₃ en 5mL d'aigua i evaporant el dissolvent a sequedat.

Seguidament, es dissol la sal potàssica de **5** en 10mL de DMSO_{anh} i se li afegeixen 36 mg (0,016 mmol) de PS₂₀-sp-OTs (**42**) dissolts en 5mL de DMSO_{anh}. Es deixa reaccionant a temperatura ambient durant 4 dies.

S'evapora el dissolvent a sequedat i es torna a dissoldre en THF quedant una suspensió de la sal de la DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) que no es dissol i que es separa per centrifugació. Les aigües s'evaporen a sequedat i es redissolen amb 10 mL CH₂Cl₂, i acte seguit s'afegeix 100 mL de MeOH que fan precipitar el polímer, que es separa per centrifugació. S'obtenen 34 mg (0,015 mmol) del producte esperat pur en forma d'un sòlid blanc esponjós. Rendiment: 92%.



CCF (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH 9:1) *R_f* 0,50.

¹H RMN (200 MHz, DMSO-d₆, δ) 1,20 (6H, s, C(CH₃)₂), 1,25-1,55 (6H, br, CH₃), 1,40-1,60 (nH, br, C-CH₂-C), 1,55-1,62 (6H, m, C-CH₂-C), 1,63-1,95 (nH, br, CH-Ar), 2,31 (2H, t, CH₂-CONHOH), 2,85-2,95 (1H, br, CH-CH₂CONH), 3,20 (2H, m, CH₂-NHCO), 3,3-3,6 (8H, m, CH₂-CH₂-O), 3,72 (1H, t, CH-NHCONH), 3,90 (1H, br, NHCO), 4,18 (2H, t, CH₂-OCO), 6,00 (2H, br, NH-C-(CH₂)₄), 7,00 (2H, br, NH-CH-NH), 6,3-7,2 (nH, br, H-Ar).

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆, δ) 23,1, 23,2, 30,0, 30,2, 34,8, 35,2, 42,0, 45,1, 48,0, 62,1, 65,0, 67,8, 70,3, 70,4, 71,0, 71,1, 71,8, 73,3, 79,9, 93,5, 124,1, 127,9, 130,2, 156,1, 156,4, 157,9,.

6.4.1.13 *Estudis de trencament de l'enllaç ester del compost amfifílic (43) amb hidroxilamina en la interfase aire-aigua (monocapa de Langmuir)*

Es va preparar una monocapa de 0,55 mg de PS₂₀-sp-O₂C-C₄-C-DMPDU (**43**) aplicat en solució clorofòrmica, sobre una solució de tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a pH=8,5 a 40°C amb hidroxilamina 10mM. Després de deixar la monocapa 12 hores, es va rentar la solució amb cloroform per eliminar restes de polímer i es va evaporar la fase aquosa a sequedat. Es va re-dissoldre la fase aquosa amb fase mòbil H₂O/MeOH 90:10 i es va analitzar l'àcid hidroxàmic producte del trencament per HPLC-MS/ESI detectant-se el producte però no es va poder quantificar ja que la concentració d'àcid hidroxàmic va resultar ser inferior al límit de quantificació.

6.4.1.14 *Estudi del trencament de l'enllaç ester en un sistema bifàsic aigua/cloroform*

Es va preparar una monocapa de PS₂₀-sp-O₂C-C₄-C-DMPDU (**43**) en la interfície d'una fase aquosa i una de clorofòrmica.

La fase clorofòrmica va constar d'una solució de 9,6 mL de PS₂₀-sp-O₂C-C₄-C-DMPDU (**43**) 8,5x10⁻⁷M en cloroform. La fase aquosa va constar de 10 mL d'una solució de bicarbonat d'amoni 10 mM a pH 8,5 i hidroxilamina 10 mM. Es va deixar durant 12 hores a 40°C i després de separar la fase aquosa, rentar-la amb cloroform i assecar-la es va re-dissoldre amb fase mòbil H₂O/MeOH 90:10 i es va analitzar l'àcid hidroxàmic producte del trencament per HPLC-MS/ESI recuperant un 91±3% del teòric.

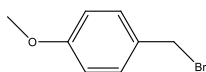
6.4.2 *Metodologia basada en resines per a la síntesi en fase sòlida*

Metodologia general

Totes les reaccions realitzades en fase sòlida s'han dut a terme a temperatura ambient i ocasionalment amb un agitador orbital. Les reaccions s'han dut a terme en xeringues de polipropilè de 5 mL, que porten incorporats una doble placa filtrant de polietilè porós. Després de cada etapa, els excessos de reactius, dissolvents o subproductes s'eliminen mitjançant rentats amb dissolvents i per filtració al buit.

Les resines utilitzades han estat adquirides a Novabiochem i són la "NovaPEG Wang Resin" i la "NovaSyn TG Bromo Resin".

6.4.2.1 Síntesi de 44



Es dissol 4,0 g (28,8 mmol) d'alcohol 4-metoxibenzílic en 50 mL d'èter dietílic anhidre. Tot seguit, s'addiciona gota a gota una solució de 1,35 mL de tribromur de fòsfor (14,4 mmol) dissolts en 10 mL d'èter dietílic durant 20 minuts a temperatura ambient i, a continuació, es deixa reaccionar durant dues hores més a la mateixa temperatura. Un cop la reacció ha finalitzat s'aboca la mescla de reacció en 300 mL d'aigua-gel, separem la fase etèria de l'aquosa, i la rentem amb 2 volums de 50 mL d'una solució saturada de NaHCO₃. La fase etèria l'assequem amb MgSO_{4anh.} i evaporem el dissolvent a sequedat.

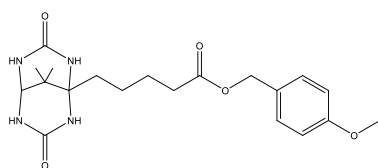
El cru de reacció el purifiquem per destil·lació al buit (118 °C a 2 mmHg), obtenint 6,59 g (26,5 mmol) del producte esperat pur en forma d'oli incolor. Rendiment: 92%.

CCF (SiO₂, AcOEt/hexà 1:9) *R_f* 0,50.

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃, δ) 3,81 (3H, s, OCH₃), 4,51 (2H, s, CH₂Br), 6,87 (2H, d, Ar, *J*=8,6 Hz), 7,32 (2H, d, Ar, *J*=8,6 Hz).

EM-ESI (+): *m/z*: 249,3 [M+1]⁺, 271,3 [M+Na]⁺.

6.4.2.2 Síntesi de 45



Primerament es prepara la sal potàssica de la DMPDU-C-C₄-CO₂H (**5**) dissolent-ne 400 mg (1,41 mmol) i 195 mg (1,41 mmol) de K₂CO₃ en 100mL d'aigua i evaporant el dissolvent a sequedat.

Seguidament, es dissol la sal potàssica **n** en 20mL de DMSO_{anh} i se li afegeixen 350 mg (1,41 mmol) de **44**, deixant reaccionar la barreja a temperatura ambient durant 3 dies.

S'evapora el dissolvent a sequedat sense escalfar a més de 40°C i es purifica directament el cru de reacció recristal·litzant tres cops seguits en MeOH (0,3mL de MeOH per cada 1

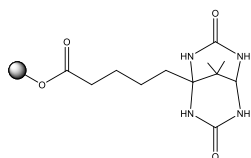
mg de producte) obtenint 508 mg (1,13 mmol) del producte esperat pur en forma d'un sòlid blanc. Rendiment: 80%.

HPLC (H₂O/MeOH 4:6) t=21min.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆, δ) 1,03 (6H, s, C(CH₃)₂), 1,40-1,55 (6H, m, C-CH₂-C), 2,31 (2H, t, CH₂-CO₂), 3,75 (3H, s, OCH₃), 5,01 (2H, s, CH₂Bn), 6,51 (2H, s, NH-C-(CH₂)₄), 6,92 (2H, d, Ar J=8,5 Hz), 6,99 (2H, br, NH-CH), 7,30 (2H, d, Ar, J=8,5 Hz).

EM-ESI (+): m/z: 452,7 [M+1]⁺, 490,7 [M+K]⁺.

6.4.2.3 Síntesi de 46



Es pesen 100 mg (0,03 mmol) de resina NovaSyn TG Bromo Resin i es renta 5 cops amb CH₂Cl₂ (1mLx1min), 3 cops amb DMF (1mLx1min), 3 cops en MeOH (1mLx1min), 3 cops amb CH₂Cl₂ (1mLx1min), 5 cops amb DMSO_{anh} (1mLx1min) i finalment s'infla amb DMSO_{anh} durant 15 minuts.

Paral·lelament, es prepara la sal de cessi de la DMPDU-C₄-CO₂H (**5**) dissolent-ne 42,6 mg (0,15 mmol) i 48,6 mg (0,15 mmol) de Cs₂CO₃ en 100mL d'aigua i evaporant el dissolvent a sequedat.

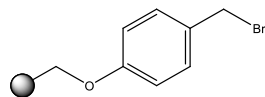
Seguidament, es dissol la sal de cessi de la DMPDU-C₄-CO₂H (**5**) en 20mL de ó DMSO_{anh} i s'afegeix a la resina deixant reaccionar la barreja a temperatura ambient durant 3 dies amb agitació orbital i sota argó.

Per eliminar l'excés de reactiu, subproductes i el dissolvent es filtra i es renta 5 cops amb DMF_{anh} ó DMSO_{anh} (1mLx1min) i 5 cops amb aigua (1mLx1min).

Per a determinar la substitució de lligand en la resina es va utilitzar la hidroxilamina per a trencar l'enllaç èster formant-se l'àcid hidroxàmic de la DMPDU-C₄-CO₂H (**5**), el qual podem quantificar mitjançant mètodes cromatogràfics. Per a realitzar el trencament, s'afegeix 1 mL d'una solució de NH₂OH 10 mM dissolta en tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a pH=8,5. Es manté a temperatura ambient durant quatre hores amb agitació ocasional i finalment es filtra recollint la barreja resultant. Seguidament es fan dos rentats de 0,5 mL cadascun i s'ajunta amb l'anterior solució.

L'anàlisi de l'àcid hidroxàmic es fa mitjançant HPLC-MS/ESI (ESI+, flux de 0,8 mL/min, fase mòbil H₂O/MeOH 90:10, Columna C18). El grau de substitució determinat va ser de 0,28 mmol/g, que correspon a un rendiment del 95% d'acoblament amb el lligand.

6.4.2.4 Síntesi de 47



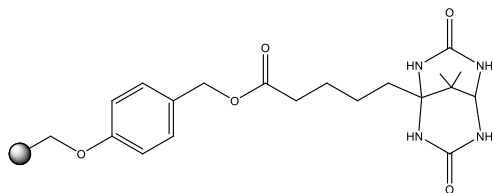
Inicialment, es pesen 100 mg (0,079 mmol) de resina Wang amb una funcionalització de 0,79 mmol/g i es renta 5 cops amb CH₂Cl₂ (1mLx1min), 3 cops amb DMF (1mLx1min), 3 cops en MeOH (1mLx1min), 3 cops amb CH₂Cl₂ (1mLx1min), i per últim la inflem amb 1 mL de CH₂Cl₂ durant 15 minuts.

Per altra banda es procedeix a preparar el cocktail de bromació, dissolent 2,23 g (23,5 mmol) de NBS en 25 mL de CH₂Cl₂ (concentració 0,5 M) i refredant-ho a 0 °C sota Argó. A continuació, s'afegeixen gota a gota 1,9 mL (25,85 mmol) de sulfur de dimetil (concentració resultant de 0,55 M), i deixem la barreja amb agitació a 0 °C durant 20 minuts fins a obtenir una solució groga.

S'afegeix 1 mL del cocktail a la resina deixant reaccionar dues hores a 0 °C, i passat aquest temps es filtra l'excés de reactius i es renta 5 cops amb CH₂Cl₂ (1mLx1min), 3 cops amb THF (1mLx1min), 2 cops en dioxan (1mLx1min), 2 cops amb THF (1mLx1min) i 5 cops amb CH₂Cl₂ (1mLx1min).

Un cop realitzat aquest procediment no es realitza cap anàlisi del producte obtingut ni cap quantificació del grau de funcionalització, ja que en el següent pas ja es determinarà amb l'ancorament de la DMPDU.

6.4.2.5 Síntesi de 48



La síntesi d'aquest compost va ser realitzat tant en DMF i en DMSO.

Primerament pesem 100 mg de resina Wang bromada (**47**) i la rentem 5 cops amb CH_2Cl_2 (1mLx1min), 5 cops amb DMF_{anh} ó DMSO_{anh} (1mLx1min) i finalment la inflem amb DMF_{anh} ó DMSO_{anh} durant 15 minuts.

Paral·lelament, es prepara la sal de cessi de la DMPDU- C_4 - CO_2H (**5**) dissolent-ne 112,3 mg (0,395 mmol) i 128 mg (0,395 mmol) de Cs_2CO_3 en 100mL d'aigua i evaporant el dissolvent a sequedat.

Seguidament, es dissol la sal de cessi de la DMPDU- C_4 - CO_2H (**5**) en 20mL de DMF_{anh} ó DMSO_{anh} i s'afegeix a la resina deixant reaccionar la barreja a temperatura ambient durant 3 dies amb agitació orbital i sota argó.

Per eliminar l'excés de reactiu, subproductes i el dissolvent es filtra i es renta 5 cops amb DMF_{anh} ó DMSO_{anh} (1mLx1min) i 5 cops amb aigua (1mLx1min).

Per a quantificar quanta substitució de lligand té la resina es va pensar en utilitzar la hidroxilamina per a trencar l'enllaç èster formant-se l'àcid hidroxàmic de la DMPDU, el qual podem quantificar mitjançant mètodes cromatogràfics.

Per a procedir amb el trencament, s'afegeix 1 mL d'una solució de NH_2OH 10 mM dissolta en tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a pH=8,5. Es manté a temperatura ambient durant quatre hores amb agitació ocasional i finalment es filtra recollint la barreja resultant. Seguidament es fan dos rentats de 0,5 mL cadascun i s'ajunta amb l'anterior solució.

L'anàlisi de l'àcid hidroxàmic es fa mitjançant HPLC-MS/ESI (ESI+, flux de 0,8 mL/min, fase mòbil $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 90:10, Columna C18). La funcionalització de les resines realitzades en DMF i DMSO van ser de 0,27 mmol/g (NovaPEG Wang-DMPDU A) i 0,75 mmol/g (NovaPEG Wang-DMPDU B) respectivament.

6.4.2.6 Ancoraments amb un defecte d'avidina

6.4.2.6.1 Resina NovaSyn TG-DMPDU (46)

Primer, es renten 10 mg de resina funcionalitzada a DMPDU (46) vàries vegades amb PB 100 mM pH=7,0 i s'addiciona 1,3 mg d'avidina (amb activitat de 14,3 unit/mg) dissolts en 1mL i deixant-la unir durant una hora amb agitació ocasional. A continuació es filtra la barreja i es fan dos rentats de 0,5 mL amb aigua, cadascun d'ells durant 30 min per finalment ajuntar-los amb la solució anterior (en total tenim 2mL). Es valora la solució resultant amb HABA ($1,03 \times 10^{-03}$ M), determinant la quantitat d'avidina que està immobilitzada a la resina.

A la resina amb avidina immobilitzada se li afegeix 1 mL d'una solució de NH_2OH 10 mM dissolta en tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a pH=8,5. Es manté a temperatura ambient durant quatre hores amb agitació ocasional i finalment es filtra recollint la barreja resultant. Seguidament es fan tres rentats de 0,5 mL cadascun i s'ajunta amb l'anterior solució. Es valora la solució resultant amb HABA ($1,03 \times 10^{-03}$ M), determinant la quantitat d'avidina que s'ha desancorat de la resina.

Concepte	Quantitat (mol)
1. Grau de funcionalització amb DMPDU	280×10^{-8} mol DMPDU
2. Total avidina afegida	$7,6 \times 10^{-8}$ mol subunitats
3. Avidina eliminada amb els rentats	$2,7 \times 10^{-8}$ mol subunitats
4. Avidina ancorada	
• Mètode a	$4,9 \times 10^{-8}$ mol subunitats
• Mètode b	$4,2 \times 10^{-8}$ mol subunitats
5. Percentatge d'avidina ancorada	60%
6. Percentatge de DMPDU ancorada a avidina	0,8%
7. Relació molar DMDPU:subunitats Av	37:1

Taula 17. Ancorament de l'avidina a la resina Nova Syn TG DMPDU amb 0,28 mmol/g de funcionalització de DMPDU (46).

6.4.2.6.2 Resina NovaPEG Wang-DMPDU-A

Es renten 11 mg de NovaPEG-WANG-DMPDU-A vàries vegades amb PB 100 mM pH=7,0 i s'addiciona 1,3 mg d'avidina (amb activitat de 14,3 unit/mg) dissolts en 1mL i deixant-la unir durant una hora amb agitació ocasional. A continuació es filtra la barreja i es fan dos rentats de 0,5 mL, cadascun d'ells durant 30 min per finalment ajuntar-los amb

la solució anterior (en total tenim 2 mL). Es valora la solució resultant amb HABA ($1,03 \times 10^{-03}$ M), determinant la quantitat d'avidina que està immobilitzada a la resina.

A la resina amb avidina immobilitzada se li afegeix 1 mL d'una solució de NH_2OH 10 mM dissolta en tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a $\text{pH}=8,5$. Es manté a temperatura ambient durant quatre hores amb agitació ocasional i finalment es filtra recollint la barreja resultant. Seguidament es fan tres rentats de 0,5 mL cadascun i s'ajunta amb l'anterior solució. Es valora la solució resultant amb HABA ($1,03 \times 10^{-03}$ M), determinant la quantitat d'avidina que s'ha desancorat de la resina.

Concepte	Quantitat
1. Grau de funcionalització amb DMPDU	297×10^{-8} mol DMPDU
2. Total avidina afegida	$7,6 \times 10^{-8}$ mol subunitats
3. Avidina eliminada amb els rentats	$2,6 \times 10^{-8}$ mol subunitats
4. Avidina ancorada	
• Mètode a	$5,0 \times 10^{-8}$ mol subunitats
• Mètode b	$5,6 \times 10^{-8}$ mol subunitats
5. Percentatge d'avidina ancorada	70%
6. Percentatge de DMPDU ancorada a avidina	0,9%
7. Relació molar DMDPU:subunitats Av	39:1

Taula 18. Ancorament de l'avidina a la resina Wang DMPDU A amb 0,27 mmol/g de funcionalització de DMPDU

6.4.2.6.3 Resina NovaPEG Wang-DMPDU-B

Es renten 11 mg de NovaPEG-WANG-DMPDU-B varies vegades amb PB 100 mM $\text{pH}=7,0$ i s'addiciona 2,7 mg d'avidina (amb activitat de 14,3 unit/mg) dissolts en 1mL i deixant-la unir durant una hora amb agitació ocasional.

A continuació es filtra la barreja i es fan dos rentats de 0,5 mL amb aigua, cadascun d'ells durant 30 min per finalment ajuntar-los amb la solució anterior (en total tenim 2mL). Es valora la solució resultant amb HABA ($1,03 \times 10^{-03}$ M), determinant la quantitat d'avidina que està immobilitzada a la resina.

A la resina amb avidina immobilitzada se li afegeix 1 mL d'una solució de NH_2OH 10 mM dissolta en tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a $\text{pH}=8,5$. Es manté a temperatura ambient durant quatre hores amb agitació ocasional i finalment es filtra recollint la barreja

resultant. Seguidament es fan tres rentats de 0,5 mL cadascun i s'ajunta amb l'anterior solució. Es valora la solució resultant amb HABA ($1,03 \times 10^{-03}$ M), determinant la quantitat d'avidina que s'ha desancorat de la resina.

Concepte	Quantitat
1. Grau de funcionalització amb DMPDU	$8,25 \times 10^{-6}$ mol DMPDU
2. Total avidina afegida	16×10^{-8} mol subunitats
3. Avidina eliminada amb els rentats	No es detecta
4. Avidina ancorada	
• Mètode a	16×10^{-8} mol subunitats
• Mètode b	16×10^{-8} mol subunitats
5. Percentatge d'avidina ancorada	100%
6. Percentatge de DMPDU ancorada a avidina	1,0%
7. Relació molar DMDPU:subunitats Av	52:1

Taula 19. Ancorament de l'avidina a la resina Wang DMPDU B amb 0,75 mmol/g de funcionalització de DMPDU

6.4.2.7 Ancorament a la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B amb un excés d'avidina

Es pesen i es renten 0,10 mg de cada resina NovaPEG-WANG-DMPDU-B 0,75 mmol/g varies vegades amb PB 100 mM pH=7,0 i s'addiciona 5,4 mg d'avidina (amb activitat de 14,3 unit/mg) dissolts en 1mL i deixant-la unir durant una hora amb agitació ocasional.

A continuació es filtra la barreja i es fan dos rentats de 0,5 mL d'aigua cadascun d'ells durant 30 min per finalment ajuntar-los amb la solució anterior (en total tenim 2mL). Després, diluïm la solució a valorar 10 cops i la valorem amb HABA ($1,03 \times 10^{-03}$ M), determinant la quantitat d'avidina que està immobilitzada a la resina. Aquest experiment es realitza per duplicat per a confirmar la sevreproduïbilitat.

A la resina amb Avidina immobilitzada se li afegeix 1 mL d'una solució de NH_2OH 10 mM dissolta en tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a pH=8,5. Es manté a temperatura ambient durant quatre hores amb agitació ocasional i finalment es filtra recollint la barreja resultant. Seguidament es fan tres rentats de 0,5 mL d'aigua i s'ajunta amb l'anterior solució. Es valora la solució resultant amb HABA ($1,03 \times 10^{-03}$ M), determinant la quantitat d'avidina que s'ha desancorat de la resina.

Concepte	Quantitat
1. Grau de funcionalització amb DMPDU	$7,5 \times 10^{-8}$ mol DMPDU
2. Total avidina afegida	$32,8 \times 10^{-8}$ mol subunitats
3. Avidina eliminada amb els rentats	$18,3 \times 10^{-8}$ mol subunitats
4. Avidina ancorada	
• Mètode a	$14,5 \times 10^{-8}$ mol subunitats
• Mètode b	$14,5 \times 10^{-8}$ mol subunitats
5. Percentatge d'avidina ancorada	44%
6. Percentatge de DMPDU ancorada a avidina	97%
7. Relació molar DMPDU:subunitats Av	1:4,4

Taula 20. Ancorament de l'avidina a la resina Wang DMPDU B amb 0,75 mmol/g de funcionalització de DMPDU

6.4.2.8 Unió de biotina-4-fluoresceïna a l'avidina immobilitzada en la resina NovaPEG Wang-DMPDU-B.

Després d'haver immobilitzat l'avidina a la resina NovaPEG-WANG-DMPDU-B, es va realitzar el següent:

Primerament es va afegir a la resina NovaPEG-WANG-DMPDU-B amb l'avidina ancorada provinent de l'experiment anterior, 430 μ L ($6,9 \times 10^{-8}$ mol) d'una solució de Bt-FI $1,6 \times 10^{-4}$ M que es deixa reaccionar durant 1 hora, i tot seguit es van realitzar 2 rentats de 1 mL de tampó PB. Es va enregistrar un espectre de UV-Vis, que no va presentar absorbància a les longituds d'ona corresponents a la Bt-FI.

Posteriorment, s'addicionen 470 μ L ($7,5 \times 10^{-8}$ mol) d'una solució de Bt-FI $1,6 \times 10^{-4}$ M que es deixa reaccionar durant 1 hora, i tot seguit es van realitzar 2 rentats de 1 mL de tampó PB. Es va enregistrar un espectre de UV-Vis, i a partir de l'absorbància a 280 nm es va determinar que l'avidina desancorada en els rentats era de $2,19 \times 10^{-8}$ mol de subunitats de proteïna, corresponent al 15% d'avidina afegida inicialment.

Es va afegir 1 mL ($1,4 \times 10^{-7}$ mol) d'una solució de biotina $1,4 \times 10^{-4}$ M, que es deixa reaccionar durant 1 hora, i tot seguit es van realitzar 2 rentats de 1 mL de tampó PB. Es va enregistrar un espectre de UV-Vis, i a partir de l'absorbància a 280 nm es va determinar que l'avidina desancorada en els rentats era de $2,16 \times 10^{-8}$ mol de subunitats de proteïna, corresponent al 15% d'avidina afegida inicialment

Tot seguit, s'afegeix a la resina unida a Avidina:Bt-FI, 1 mL de solució de NH_2OH 10 mM i tampó bicarbonat d'amoni 10 mM a $\text{pH}=8,5$ durant 4 hores. Després es filtra i es fan 2 rentats de 1 mL de tampó PB. Es va enregistrar un espectre de UV-Vis, i a partir de l'absorbància a 280 nm es va determinar que l'avidina dels rentats era de $10,2 \times 10^{-8}$ mol de subunitats, corresponent al 70% d'avidina afegida inicialment.

6.4.2.9 Formació del conjugat heterobifuncional d'avidina amb fluoresceïna i BSA

Als rentats provinents del trencament de l'enllaç èster entre la resina anterior i la DMPDU amb hidroxilamina, se'ls hi afegeix 100 μL ($5,2 \times 10^{-8}$ mol) d'una solució $5,2 \times 10^{-4}$ M de Bt-BSA dissolta en tampó PB 100 mM a $\text{pH}=7,0$. Després d'una hora, s'afegeixen volums successius d'HABA $3,4 \times 10^{-3}$ M fins arribar a 1000 μL enregistrant un espectre UV-Vis després de cada addició, sense que es detectés banda d'absorció a 500 nm.

Aquests experiments van ser realitzats per duplicat per a confirmar la seva reproduïbilitat.

Concepte	Quantitat
Grau de funcionalització amb DMPDU	$7,5 \times 10^{-8}$ mol DMPDU
Avidina ancorada	$14,5 \times 10^{-8}$ mol subunitats
Bt-FI afegida en 1a addició	$6,9 \times 10^{-8}$ mol
Avidina eliminada amb els rentats de 1a addició	n.d.
Bt-FI afegida en 2a addició	$7,5 \times 10^{-8}$ mol
Avidina eliminada amb els rentats de 2a addició	$2,16 \times 10^{-8}$ mol subunitats
Bt Afegida	$1,4 \times 10^{-7}$ mol
Avidina eliminada amb els rentats addició Bt	$2,19 \times 10^{-8}$ mol subunitats
NH_2OH Afegida	$1,0 \times 10^{-5}$ mol
Avidina eliminada després addició NH_2OH	$10,2 \times 10^{-8}$ mol subunitats
Bt-BSA afegida	$5,2 \times 10^{-8}$ mol

Taula 21. Formació del conjugat heterobifuncional d'avidina amb fluoresceïna i BSA

7 CONCLUSIONS

Les conclusions del present treball es resumeixen a continuació:

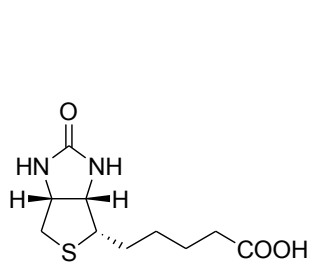
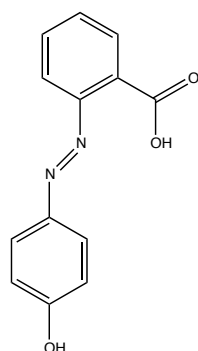
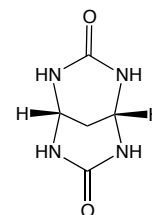
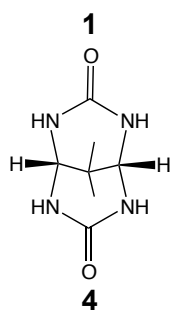
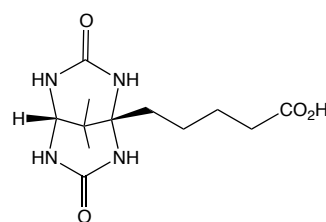
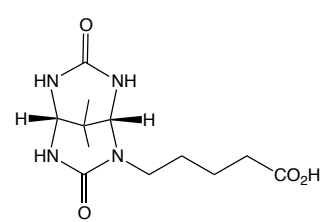
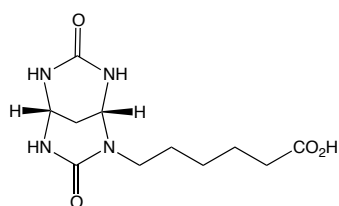
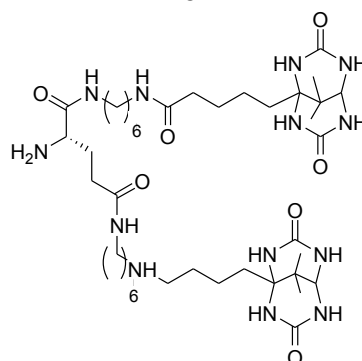
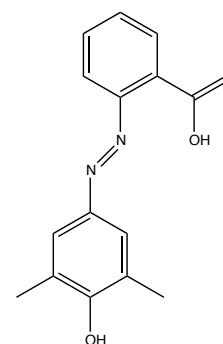
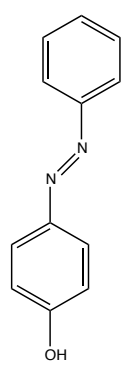
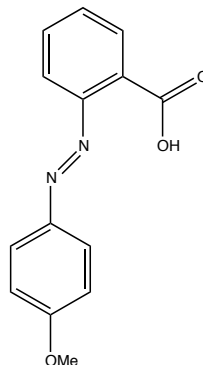
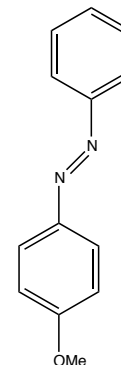
- S'han estudiat espectroscòpicament (UV-Vis, Raman, RMN) els equilibris tautomèrics azo/hidrazona de l'àcid 2-(4'-hidroxifenilazo)benzoic (HABA, **2**) i l'àcid 2-(4'-hidroxi-3',5'-dimetilfenilazo)benzoic (**9**). Aquests equilibris estan influenciats fortament per l'estat de protonació (neutre vs. monoanionic) del compost, la polaritat del medi i la substitució en l'anell d'hidroxifenil. En el cas de les espècies neutres tant de **2** com de **9** en medis apolars, és predominant el TA. Tot i així, en medis polars, mentre que el TA és encara de bon tros predominant per a l'HABA (**2**) neutre, el TH és àmpliament predominant per al 3',5'-dimetil-HABA (**3**) neutre. En el cas de les espècies monoaniòniques, el TH és predominant tant per **2** com per **9** en dissolvents apolars. Per altra banda, augmentant la polaritat del medi, el compost **9** mostra una tendència major que l'HABA (**2**) per continuar sent TH
- S'han estudiat les cinètiques d'isomerització *Z*->*E* tèrmica de l'espècie neutre i monoaniònica de l'àcid 2-(4-metoxifenilazo)benzoic (**11**) en solució en diferents medis. Les interaccions entre el dissolvent i el cromòfor juguen un paper important en quan a la velocitat d'isomerització, sent majors (major constant cinètica) quant més apolar és el dissolvent tant per l'espècie neutra com per la monoaniònica. En canvi, no hi ha gaire diferència entre les constants cinètiques de les isomeritzacions de les espècies neutra i monoaniònica, sent lleugerament majors per a l'espècie neutra.
- S'ha sintetitzat dos compostos amfifílics derivats de l'HABA (**13** i **14**) i s'han estudiat les seves monocapes de Langmuir. En comprimir la monocapa de l'isòmer (*E*)-**14** s'observa la progressiva formació de dominis mentre que no s'observen en comprimir la monocapa de l'isòmer (*Z*)-**14**. En canvi, al comprimir la monocapa del compost **13** s'observa un comportament diferenciat, la formació de dominis en forma d'agulla, que podríem atribuir al tautòmer hidrazona d'aquest compost.
- S'han sintetitzat dos disulfurs, un d'ells (**30**) amb el grup HABA com a grup terminal, i l'altre (**23**) amb una cadena de trietilenglicol com a grup terminal. S'han preparat les SAMs dels compostos **23** i **30** i també les SAMs mixtes d'aquests dos composts sobre or. Totes aquestes SAMs s'han caracteritzat mitjançant voltamperometria cíclica. S'ha estudiat mitjançant voltamperometria cíclica la interacció de l'avidina sobre aquestes SAMs mixtes observant-se un desplaçament del pic de reducció del grup terminal de

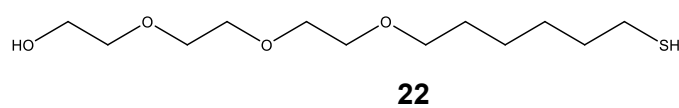
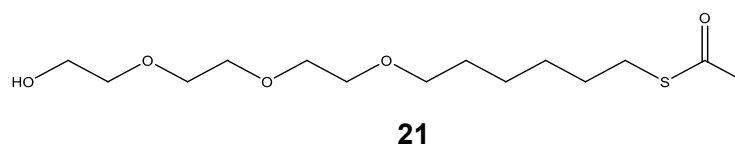
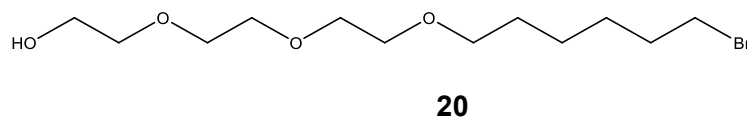
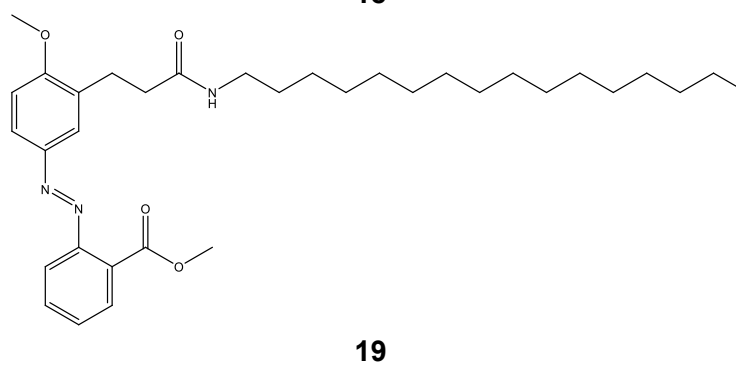
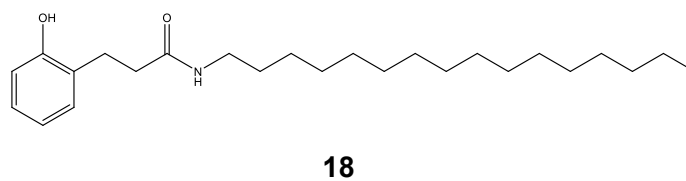
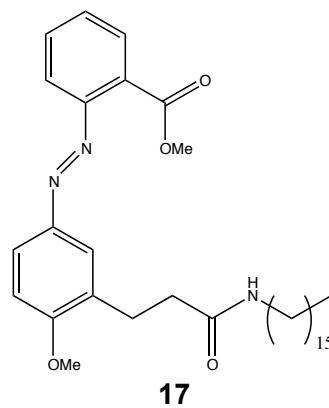
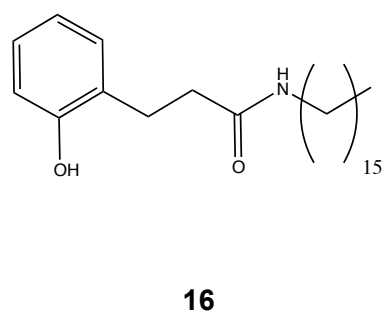
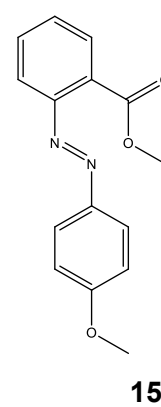
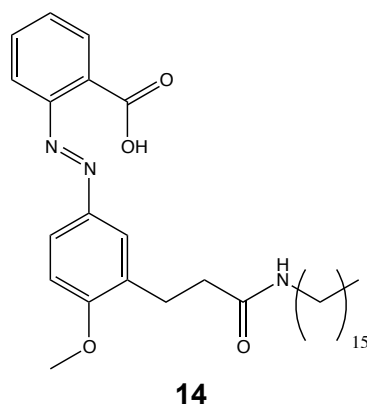
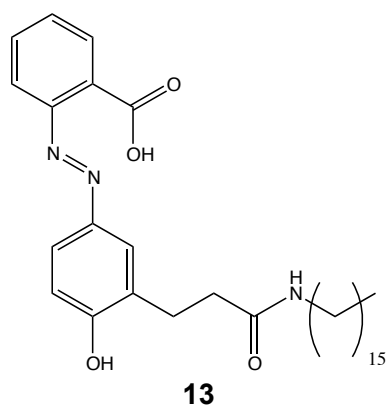
l'HABA cap a potencials més negatius per l'efecte de la seva unió a avidina. S'ha determinat que la relació molar de **30:23** en solució etanòlica per tal que la interacció de la SAM mixta amb l'avidina sigui òptima, és de 1,0:3,1.

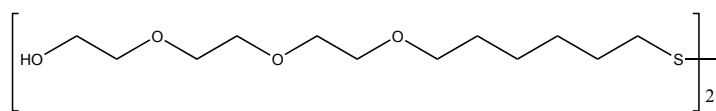
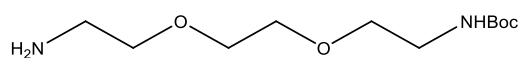
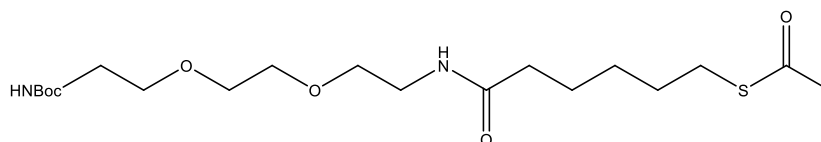
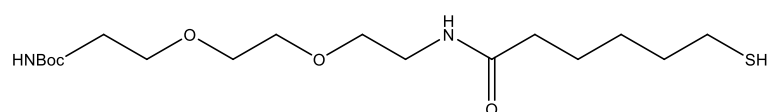
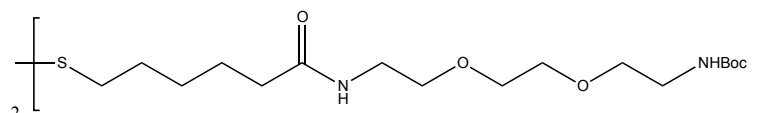
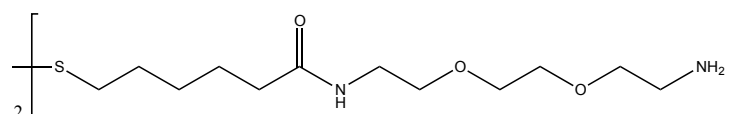
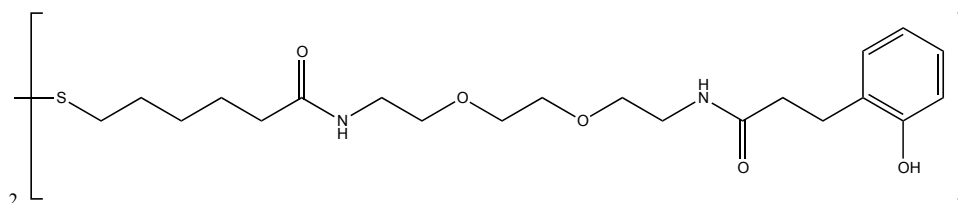
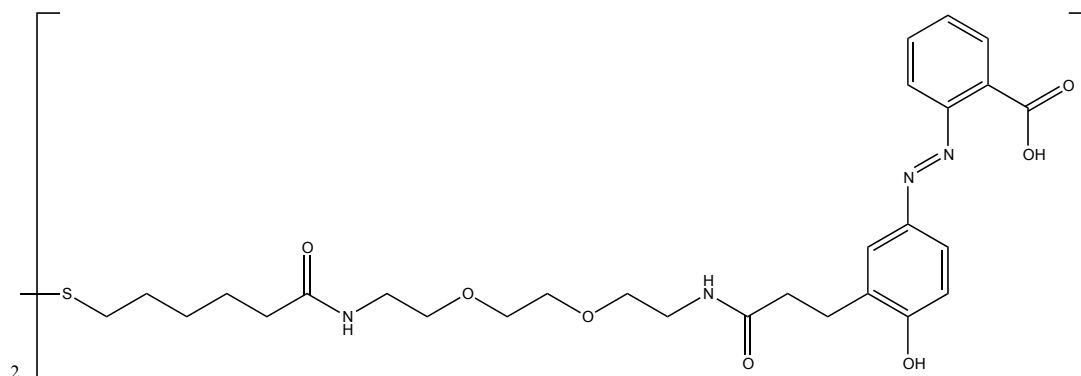
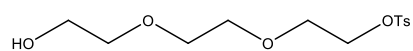
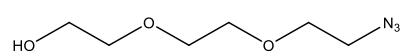
- S'ha desenvolupat una metodologia basada en lligands d'avidina de diferent afinitat, per a preparar conjugats heterobifuncionals mitjançant la unió seqüencial dels dos components biotinilats a l'avidina. Aquesta metodologia utilitza lligands d'avidina de moderada afinitat per bloquejar, mitjançant una unió de tipus divalent, la meitat dels llocs d'unió de l'avidina i permetre la unió del primer component biotinilat als llocs d'unió desocupats. A continuació, la transformació del tipus d'unió de divalent a monovalent fa disminuir la seva afinitat per l'avidina i permet desplaçar-los amb el segon component biotinilat, generant el conjugat heterobifuncional amb avidina com a linker entre els dos compostos funcionals.

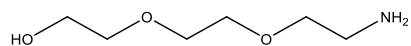
Els millors resultats s'han obtingut utilitzant la resina NovaPEG Wang funcionalitzada amb el lligand DMPDU, per tal d'immobilitzar l'avidina a través d'una unió del tipus divalent. Una vegada incorporat el primer component biotinilat, el trencament amb hidroxilamina de l'enllaç ester que uneix el lligand DMPDU a la resina ha alliberat el conjugat monofuncional d'avidina. Aquest conjugat monofuncional incorpora el segon component biotinilat desplaçant el lligand DMPDU i generant el conjugat heterobifuncional amb avidina com a linker entre els dos compostos funcionals

8 ESTRUCTURES

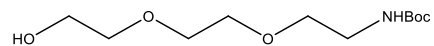
**1****2****3****4****5****6****7****8****9****10****11****12**



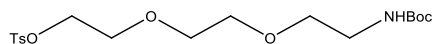
**23****24****25****26****27****28****29****30****31****32**



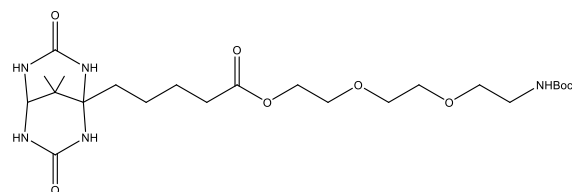
33



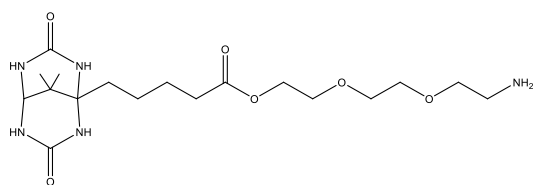
34



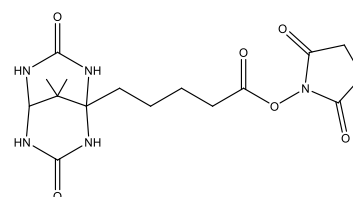
35



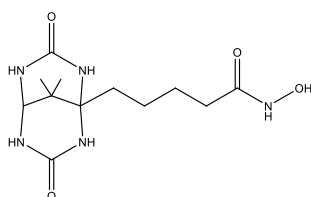
36



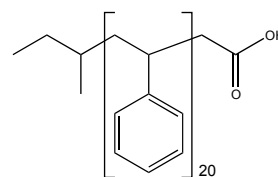
37



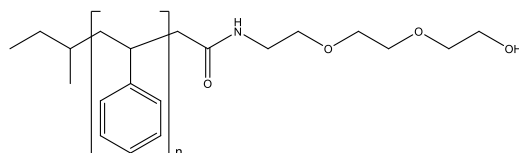
38



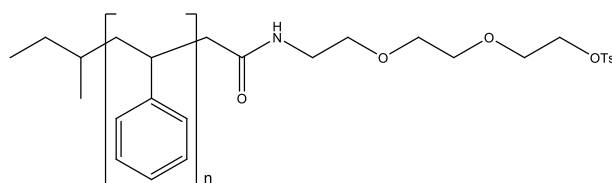
39



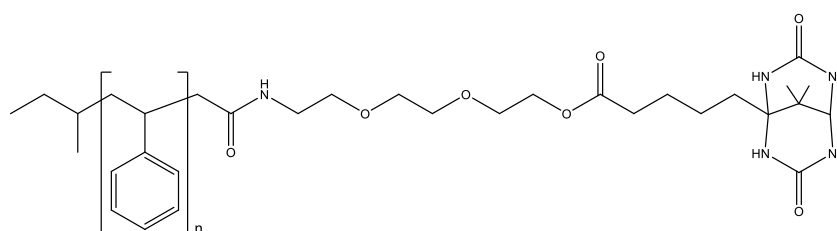
40



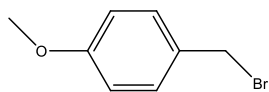
41



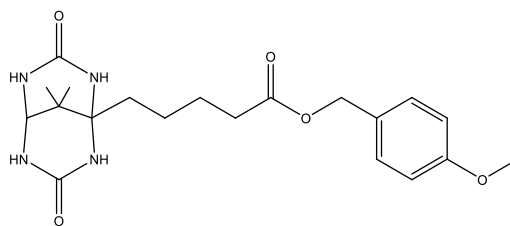
42



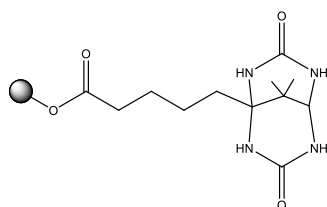
43



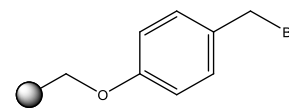
44



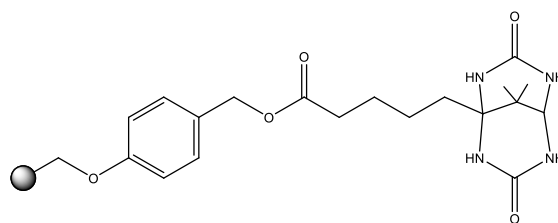
45



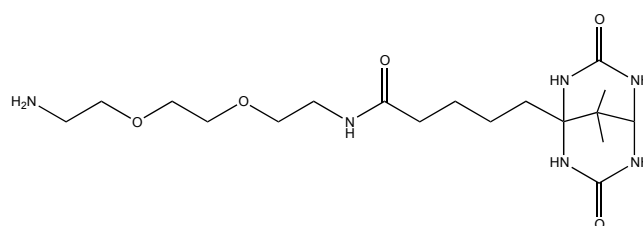
46



47



48



49

9 BIBLIOGRAFIA

-
- (1) Feiters, M. C.; Nolte, R. J. M. *Advances in Supramolecular Chemistry* **2000**, *6*, 41-156.
- (2) Green, N. M. *Advances in Protein Chemistry* **1975**, *29*, 85-133.
- (3) Dugas, H. *Biorganic Chemistry*; 3rd. Edition ed.; Springer, 1996.
- (4) Weber, P. C.; Ohlendorf, D. H.; Wendoloski, J. J.; Salemme, F. R. *Science (Washington, DC, United States)* **1989**, *243*, 85-8.
- (5) Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Sussman, J. L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, *90*, 5076-80.
- (6) Brüchner, A. T.; University, Y., Ed. New Haven, CT, 1992.
- (7) Wilchek, M.; Bayer, E. A.; Livnah, O. *Immunology Letters* **2006**, *103*, 27-32.
- (8) Green, N. M. *Methods in Enzymology* **1990**, *184*, 51-67.
- (9) Rosano, C.; Arosio, P.; Bolognesi, M. *Biomolecular Engineering* **1999**, *16*, 5-12.
- (10) Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *Protein Science* **1997**, *6*, 1157-1166.
- (11) Freitag, S.; Le Trong, I.; Klumb, L. A.; Chu, V.; Chilkoti, A.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *Biomolecular Engineering* **1999**, *16*, 13-19.
- (12) Pazy, Y.; Kulik, T.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Livnah, O. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 30892-30900.
- (13) Kuhn, B.; Kollman, P. A. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 3786-3791.
- (14) Freitag, S.; Le Trong, I.; Chilkoti, A.; Klumb, L. A.; Stayton, P. S.; Stenkamp, R. E. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *279*, 211-221.
- (15) Livnah, O.; Bayer, E. A.; Wilchek, M.; Sussman, J. L. *FEBS Letters* **1993**, *328*, 165-8.
- (16) Green, N. M. *Biochemical Journal* **1965**, *94*, 23c-24c.
- (17) Wilchek, M.; Bayer, E. A. *Methods in Enzymology* **1990**, *184*, 5-13.
- (18) Weber, P. C.; Wendoloski, J. J.; Pantoliano, M. W.; Salemme, F. R. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 3197-200.
- (19) Hidalgo-Fernandez, P.; Ayet, E.; Canal, I.; Farrera, J.-A. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2006**, *4*, 3147-54.
- (20) Katz, B. A.; Liu, B.; Cass, R. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 7914-7920.
- (21) Jansen, R. J.; de Gelder, R.; Rowan, A. E.; Scheeren, H. W.; Nolte, R. J. M. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 2643-2653.
- (22) Jansen, R. J.; Rowan, A. E.; de Gelder, R.; Scheeren, H. W.; Nolte, R. J. M. *Chemical Communications (Cambridge)* **1998**, 121-122.
- (23) H. Zollinger, *Color chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments*, 2nd edn., VCH, Weinheim, **1991**.

- (24) N. Kurita, S. Nebashi and M. Kojima, *Chemical Physics Letters*, 2005, **408**, 197-204.
- (25) M. Nepras, M. Titz, M. Necas, S. Lunak, Jr., R. Hrdina and A. Lycka, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1988**, 53, 213-226.
- (26) A. Lycka, D. Snobl, V. Machacek and M. Vecera, *Organic Magnetic Resonance*, **1981**, 15, 390-393.
- (27) A. Lycka, D. Snobl, V. Machacek and M. Vecera, *Organic Magnetic Resonance*, **1981**, 16, 17-19.
- (28) P. Jacques, H. Strub, J. See and J. P. Fleury, *Tetrahedron*, **1979**, 35, 2071-2073.
- (29) G. Gabor, Y. F. Frei and E. Fischer, *Journal of Physical Chemistry*, **1968**, 72, 3266-3272.
- (30) O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek and J. L. Sussman, *FEBS Letters*, **1993**, 328, 165-168.
- (31) P. C. Weber, *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography*, **1995**, D51, 590-596.
- (32) P. C. Weber, M. W. Pantoliano, D. M. Simons and F. R. Salemme, *Journal of the American Chemical Society*, **1994**, 116, 2717-2724.
- (33) P. C. Weber, J. J. Wendoloski, M. W. Pantoliano and F. R. Salemme, *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, 114, 3197-3200.
- (34) P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski and F. R. Salemme, *Science (Washington, DC, United States)*, **1989**, 243, 85-88.
- (35) N. M. Green, *Biochemical Journal*, **1965**, 94, C23.
- (36) J.-A. Farrera, P. Hidalgo-Fernandez, J. M. Hannink, J. Huskens, A. E. Rowan, N. A. J. M. Sommerdijk and R. J. M. Nolte, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2005**, 3, 2393-2395.
- (37) J. B. Pedersen, S. M. Pedersen and W. E. Lindup, *Biochemical Pharmacology*, **1989**, 38, 3485-3490.
- (38) J. H. Baxter, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1964**, 108, 375-383.
- (39) I. Moriguchi, S. Fushimi, C. Ohshima and N. Kaneniwa, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1970**, 18, 2447-2452.
- (40) E. W. Thomas and J. C. Merlin, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **1979**, 35A, 1251-1255.
- (41) M. R. Mahmoud, S. A. Ibrahim and M. A. Hamed, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **1983**, 39A, 729-733.
- (42) J. C. Merlin and E. W. Thomas, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **1979**, 35A, 1243-1249.
- (43) H. Qian and W. Huang, *Journal of Molecular Structure*, **2005**, 743, 191-195.
- (44) I. M. Klotz, H. A. Fiess, J. Y. C. Ho and M. Mellody, *Journal of the American Chemical Society*, **1954**, 76, 5136-5140.
- (45) Leiserowitz L. and Lahav M., *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 1659-1696

- (46) Ulman A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly* 1st Edition Ed. Academic Press **1991**
- (47) Gareth Roberts, *Langmuir-Blodgett Films*. 1st Edition Ed. Plenum, New York, **1990**.
- (48) Ringsdorf H. And Venzmer J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1269-1285
- (49) Engel A., Heymann J.B. *Journal of Microscopy* **1999**, 193, 28-35
- (50) Imanichi Y., Kimura S., *Journal of American Chemical Society* **1994**, 116, 2185-2186
- (51) Kjaer, K., Vaknin D., *Biophysical Journal* **1993**, 65, 2160-2177
- (52) Ringsdorf H., Kornberg R. *Biophysical Journal* **1991**, 59, 387-396
- (53) Piepenstock M., Lösche M., *Biophysical Journal* **1991**, 60, 1545-1552
- (54) Ringsdorf H., Salesse C., *Thin Solid Films* **1989**, 180, 93-99
- (55) Ringsdorf H., Salesse C., *Biochemistry* **1989**, 28, 8214-8221
- (56) Love, J. C.; Estroff Lara, A.; Kriebel Jennah, K.; Nuzzo Ralph, G.; Whitesides George, M. *Chemical reviews* **2005**, 105, 1103-69.
- (57) R. J. M. Nolte; Farrera, J.-A, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, No. 24
- (58) R. J. M. Nolte; Farrera, J.-A, Resultats pendents de publicació
- (59) Ozin, G.A.; Arsenault A.C. *Nanochemistry: a chemical approach to nanomaterials*, **2005**.
- (60) Whitesides et al, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1103–1169.
- (61) C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, Carrob and R. C. Salvarezza *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 1805–1834
- (62) F. Schreiber, and G. Scoles, *Phys. Rev. B*, **1998**, 57, 12476–12481.
- (63) S. Xu, S. J. N. Cruchon-Dupeyrat and P. E. Laibinis, *J. Chem. Phys.*, **1998**, 108, 5002–5012.
- (64) G. E. Poirier and E. D. Pylant, *Science*, **1996**, 272, 1145–1148.
- (65) R. Yamada and K. Uosaki, *Langmuir*, **1998**, 14, 855–861.
- (66) Jennings, G. K.; Yong, T.-H.; Munro, J. C.; Laibinis, P. E. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, 2950-2957.
- (67) Petrenko, V. F.; Peng, S. *Canadian Journal of Physics* **2003**, 81, 387-393.
- (68) Salomon, A.; Cahen, D.; Lindsay, S.; Tomfohr, J.; Engelkes, V. B.; Frisbie, C. D. *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* **2003**, 15, 1881-1890.
- (69) Aizenberg, J. *Dalton* **2000**, 3963-3968.
- (70) Ostuni, E.; Yan, L.; Whitesides, G. M. *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* **1999**, 15, 3-30.
- (71) Alves, C. A.; Smith, E. L.; Porter, M. D. *Journal American Chemical Society* **1992**, 114, 1222.

- (72) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. *Journal American Chemical Society* **1987**, *109*, 3559.
- (73) Bain, C. D.; G.M., W. *Journal of Physical Chemistry* **1989**, *93*, 1670.
- (74) Mahler, J.; Rafler, G.; Stiller, B. *Materials Science & Engineering, C: Biomimetic and Supramolecular Systems* **1999**, *C8-C9*, 407-410.
- (75) Yu, H.-Z.; Zhang, H.-L.; Liu, Z.-F.; Ye, S.; Uosaki, K. *Langmuir* **1998**, *14*, 619-624.
- (76) Wang, R.; Iyoda, T.; Tryk, D. A.; Hashimoto, K.; Fujishima, A. *Langmuir* **1997**, *13*, 4644-4651.
- (77) Han, S. W.; Kim, C. H.; Hong, S. H.; Chung, Y. K.; Kim, K. *Langmuir* **1999**, *15*, 1579-1583.
- (78) Lenk, T. J.; Hallmark, V. M.; Hoffmann, C. L.; Rabolt, J. F.; Castner, D. G.; Erdelen, C.; Ringsdorf, H. *Langmuir* **1994**, *10*, 4610-17.
- (79) Hartley, G. S.; Le Fevre, R. J. W. *Journal of the Chemical Society* **1939**, 531-5.
- (80) He, P.; Ye, J.; Fang, Y.; Anzai, J.; Osa, T. *Talanta* **1997**, *44*, 885-890.
- (81) U. Drechsler, B. Erdogan and V. M. Rotello, *Chem.–Eur. J.*, **2004**, *10*, 5570–5579.
- (82) M. C. Daniel and D. Astruc, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 293–346
- (83) B.A. Parviz and G. M. Whitesides *Transactions on Advanced Packaging*, **2003**, *26(3)*, 233-241
- (84) E. A. Weiss, and G. M Whitesides *Phil. Trans. R. Soc. A* **2007**, *365*, 1509-1537
- (85) E. Kim, G. M. Whitesides, Larry K. Lee, S. P . Smith, and M. Prentiss *Adv. Mater* **1996** ,*8(2)* 139-142
- (86) R. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov and S. K. Satija, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 9787–9792.
- (87) B. Bonanni, A. R. Bizzarri and S. Cannistraro, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 14574–14580.
- (88) E. T. Castellana and P. S. Cremer, *Surf. Sci. Rep.*, **2006**, *61*, 429–444
- (89) M. Mrksich and G. M. Whitesides, *Science*, **1995**, *13*, 228-235
- (90) He, P.; Ye, J.; Fang, Y.; Anzai, J.; Osa, T. *Talanta* **1997**, *44*, 885-890.
- (91) Supramolecular electrochemistry Gómez-Kaifer, M; Kaifer, A. Ed. Wiley-VCH **1999**, 193-195
- (92) Daniel J. Feld, *Langmuir* **2012**, *28*, 939–949
- (93) J. Gruber *Bioconjugate Chem.* **2013**, *24*, 1656–1668
- (94) J.Tulla-Puche, F. Albericio, *The Power of Functional Resins in Organic Synthesis*,**2008**, 1st Edition (Wiley-VCH)
- (95) Soper S., *Analyst*, **2014**, *139*, 1355
- (96) *Bioconjugate Techniques* G.Hermanson **2013** Ed.3, Academic Press
- (97) Fassina, *J. Mol. Recognit.* **2010**, *23*, 551–558
- (98) H. Zollinger, *Color chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments*, 2nd edn., VCH, Weinheim, **1991**.

- (99) N. Kurita, S. Nebashi and M. Kojima, *Chemical Physics Letters*, **2005**, 408, 197-204.
- (100) M. Nepras, M. Titz, M. Necas, S. Lunak, Jr., R. Hrdina and A. Lycka, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1988**, 53, 213-226.
- (101) A. Lycka, D. Snobl, V. Machacek and M. Vecera, *Organic Magnetic Resonance*, **1981**, 15, 390-393.
- (102) A. Lycka, D. Snobl, V. Machacek and M. Vecera, *Organic Magnetic Resonance*, **1981**, 16, 17-19.
- (103) P. Jacques, H. Strub, J. See and J. P. Fleury, *Tetrahedron*, **1979**, 35, 2071-2073.
- (104) G. Gabor, Y. F. Frei and E. Fischer, *Journal of Physical Chemistry*, **1968**, 72, 3266-3272.
- (105) O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek and J. L. Sussman, *FEBS Letters*, **1993**, 328, 165-168.
- (106) P. C. Weber, *Acta Crystallographica, Section D: Biological Crystallography*, **1995**, D51, 590-596.
- (107) P. C. Weber, M. W. Pantoliano, D. M. Simons and F. R. Salemme, *Journal of the American Chemical Society*, **1994**, 116, 2717-2724.
- (108) P. C. Weber, J. J. Wendoloski, M. W. Pantoliano and F. R. Salemme, *Journal of the American Chemical Society*, **1992**, 114, 3197-3200.
- (109) P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski and F. R. Salemme, *Science (Washington, DC, United States)*, **1989**, 243, 85-88.
- (110) N. M. Green, *Biochemical Journal*, **1965**, 94, C23.
- (111) J.-A. Farrera, P. Hidalgo-Fernandez, J. M. Hannink, J. Huskens, A. E. Rowan, N. A. J. M. Sommerdijk and R. J. M. Nolte, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2005**, 3, 2393-2395.
- (112) J. B. Pedersen, S. M. Pedersen and W. E. Lindup, *Biochemical Pharmacology*, **1989**, 38, 3485-3490.
- (113) J. H. Baxter, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1964**, 108, 375-383.
- (114) I. Moriguchi, S. Fushimi, C. Ohshima and N. Kaneniwa, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **1970**, 18, 2447-2452.
- (115) E. W. Thomas and J. C. Merlin, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **1979**, 35A, 1251-1255.
- (116) M. R. Mahmoud, S. A. Ibrahim and M. A. Hamed, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **1983**, 39A, 729-733.
- (117) J. C. Merlin and E. W. Thomas, *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **1979**, 35A, 1243-1249.
- (118) H. Qian and W. Huang, *Journal of Molecular Structure*, **2005**, 743, 191-195.
- (119) I. M. Klotz, H. A. Fiess, J. Y. C. Ho and M. Mellody, *Journal of the American Chemical Society*, **1954**, 76, 5136-5140.

- (120) Zbaida, C.F.Brewer, W.G.Levine *Drug Metabolism and Disposition*, **1994**, 22 (3), 412.
- (121) E.Fierz, L.Blangey, H.Streiff, *Helvetica Chimica Acta*, **1946**, 29 (7), 1718.
- (122) J.March, *Advanced Organic Chemistry*, 4a ed. Willey, **1992**.
- (123) C.F.Fieser, M.Fieser, *Advanced Organic Chemistry*, **1961**, Ed.Reinhold, 717.
- (124) H.H.Strogh, G. Westphal *Chemische Berichte* **1964**, 83.
- (125) G.Lunn, E.B.Sansone *J.Org.Chem.*, **1984**, 49, 3470.
- (126) I.D.Entwistle, R.A.Johnstone, A.H.Wilby, *Tetrahedron*, **1982**, 38 (3), 419.
- (127) S.Karmakar, A.Chakravorty, *Inorg.Chem.*, **1996**, 35 (7), 1935.
- (128) R.Tsuji, M.Nakagawa, A.Nishida *Heterocycles*, **2002**, 58, 587.
- (129) P.Ballesteros, J.Elguero, R.M.Claramunt, *J.Chem.Soc. Perkin Trans. II*, **1986**, 1677.
- (130) T.M.Fyles, C.Hu, *Journal of Supramolecular Chemistry*, **2003**, 1, 207.
- (131) J.A.Farrera, I.Canal, P.Hidalgo, M.L. Pérez-García, O.Huertas, F.J.Luque, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 2277 – 2285
- (132) Y. Kishimoto and J. Abe, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 4227.
- (133) J.Garcia-Amoros, A.Sanchez, W.Massad, S.Nonell, D. Velasco, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, 12, 13238–13242
- (134) M. Kojima, S. Nebashi, K. Ogawa and N. Kurita, *J. Phys. Org.Chem.*, **2005**, 18, 994.
- (135) A. Gray *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 13144–13151
- (136) F.Sagués, R.Albalat, J.Claret, J.Crusats, J.Ignés-Mullol, *Langmuir* **2004**, 20, 8668-8674
- (137) G.M.Whitesides *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1103–1169
- (138) Rosa Olivas Castellà *Master en Química Orgànica Avançada* **2006**
- (139) Zbaida S; Levine W.G. *Chemical research in toxicology*, **1991**, 4, 82-8
- (140) R.N. Goyal, V. Bansa *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1995**, 385, 25-32
- (141) I.Fistric, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2001**, 26, 987–994
- (142) M.Baizer, *Organic electrochemistry* **1973**
- (143) Akuyra, *Journal of the American Chemical Society* **1979**, 90, 1968
- (144) Grunze, M. *Langmuir* **1999**, 15, 5440.
- (145) Azebara, H.; Yoshimoto, S.; Hokari, H.; Akiba, U.; Taniguchi, I.; Fujihira, M. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, 473, 68.
- (146) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 3559.
- (147) G.M.Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 2597.
- (148) A.Kaifer, M.Gómez-Kaifer, *Supramolecular Electrochemistry* **1999**

- (149) Corey, E. J.; Kim, C. U.; Takeda, M. *Tetrahedron Lett.* **1972**, 4339–4342.
- (150) Alonso. *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, 435, 241-254
- (151) Brummer *J. ElectroChem. Soc.*, **1964**, 111, 1122-28