Universidad de Alcalá
COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

(FOR EVALUATION OF THE ACT DOCTORAL THESIS)

Año académico (*academic year*): 2016/17

DOCTORANDO *(candidate PHD)*: **PEÑA GONZÁLEZ, CORNELIA EMERITINA**
D.N.I./PASAPORTE (*Id.Passport*): ******1314M**
PROGRAMA DE DOCTORADO *(Academic Committee of the Programme)*: **D343-DOCTORADO EN QUÍMICA INORGÁNICA MOLECULAR**
DEPARTAMENTO DE *(Department)*: **QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN *(Phd title)*: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 03/02/17, reunido el tribunal de evaluación, constituido por los miembros que suscriben el presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral **con Mención Internacional** (*In today assessment met the court, consisting of the members who signed this Act, the candidate defended his doctoral thesis with mention as International Doctorate*), elaborada bajo la dirección de (*prepared under the direction of*) JAVIER DE LA MATA DE LA MATA // JAVIER SÁNCHEZ-NIEVES FERNÁNDEZ

Sobre el siguiente tema *(Title of the doctoral thesis)*: *FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CON DENDRONES DE NATURALEZA CARBOSILANO Y SU APLICACIÓN EN BIOMEDICINA*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL[1] de (**no apto, aprobado, notable** y **sobresaliente**) *(After the defense and defense of the thesis, the court agreed to grant the GLOBAL RATING (fail, pass, good and excellent)*: SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, a ...3.... de ...FEBRERO.....de 2017

Fdo. *(Signed)*: CARMEN M CASADO Fdo. *(Signed)*: M.F. OCTAVIANI Fdo. *(Signed)*: J. PÉREZ SERRANO

FIRMA DEL ALUMNO (candidate's signature),

Fdo. *(Signed)*: C.E. PEÑA GONZÁLEZ

Con fecha 22 de febrero de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada

[1] La calificación podrá ser "**no apto**" "**aprobado**" "**notable**" y "**sobresaliente**". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad. (*The grade may be "**fail**" "**pass**" "**good**" or "**excellent**". The panel may confer the distinction of "cum laude" if the overall grade is "Excellent" and has been awarded unanimously as such after secret voting.*).

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

Universidad de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 22 de febrero, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *PEÑA GONZÁLEZ, CORNELIA EMERITINA*, el día 3 de febrero de 2017, titulada *FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CON DENDRONES DE NATURALEZA CARBOSILANO Y SU APLICACIÓN EN BIOMEDICINA*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 22 de febrero de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ · COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO

Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:
Doctorando: PEÑA GONZÁLEZ, CORNELIA EMERITINA
Secretario del Tribunal: JORGE PÉREZ SERRANO.
Directores de Tesis: JAVIER DE LA MATA DE LA MATA // JAVIER SÁNCHEZ-NIEVES FERNÁNDEZ.

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ, PATRIMONIO DE LA HUMANIDAD

Universidad de Alcalá

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y QUÍMICA INORGÁNICA

Unidad Docente de Química Inorgánica

Tesis Doctoral

FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CON DENDRONES DE NATURALEZA CARBOSILANO Y SU APLICACIÓN EN BIOMEDICINA

Memoria presentada en la Universidad de Alcalá para optar por el grado de Doctor en Química por la Licenciada ***Cornelia E. Peña González.***

Dirigida por los doctores F. Javier de la Mata de la Mata y Javier Sánchez-Nieves Fernández.

D. F. JAVIER DE LA MATA DE LA MATA, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, y

D. JAVIER SÁNCHEZ-NIEVES FERNÁNDEZ, Investigador Contratado CIBER-BBN del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada "**Funcionalización de nanopartículas metálicas con dendrones de naturaleza carbosilano y su aplicación en biomedicina**" ha sido realizada por la licenciada Cornelia E. Peña González en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá con nuestra inmediata dirección e informamos favorablemente y autorizamos su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, a 15 de Enero de 2017

Fdo. Dr. F. Javier de la Mata

Fdo. Dr. Javier Sánchez-Nieves Fernández

Dª. CAROLINA BURGOS GARCÍA, Profesor Titular de Universidad y Directora del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada "**Funcionalización de nanopartículas metálicas con dendrones de naturaleza carbosilano y su aplicación en biomedicina.**" ha sido realizada por la licenciada Cornelia E. Peña González en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, y dirigida por los Dres. F. Javier de la Mata de la Mata y Javier Sánchez-Nieves Fernández, y da su conformidad para la presentación de la misma como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, a 15 de Enero de 2017

Fdo. Dra. Carolina Burgos García

AGRADECIMIENTOS

Todo comenzó a mis 15 años con una simple pregunta respondida chistosamente **¿Cuál es tu sueño?** A lo que respondí *"Ganarme un Nobel"* ja ja ja, gracias Jefferson Chaer pues desde entonces estuvimos de acuerdo en que hay que soñar en grande para no perder los sueños de vista.

Durante todo el camino recorrido hasta este momento he contado con la ayuda de muchas personas, tantas que, aunque tuviera miles de páginas para mencionarles a cada uno no podría terminar nunca, de modo que, empezaré por decir gracias a **"TODOS"**. A todo aquel que lea esta tesis y recuerde una risa, una lágrima, un abrazo, un hola, una mirada, un silencio; todos fueron momentos necesarios y oportunos para estar aquí ahora agradeciéndoles por haber formado parte de esta experiencia.

A mi **madre Altagracia González** por todo su esfuerzo y dedicación, por darme todo, por amarme incondicionalmente. Gracias por apoyarme en cada paso, por tu trabajo inagotable y por decidir que el sacrificio de verte lejos de nosotras era necesario para poder brindarnos la oportunidad que quizás tú no tuviste. Gracias por cada hora de trabajo y cada momento de tristeza que fuiste capaz de soportar con la sola idea de imaginarnos en un futuro próspero. Gracias por TODO madre querida, fuiste una persona excepcional y muchos estarán de acuerdo conmigo al atreverme a decir que tu partida fue triste pero tu amor inagotable siempre estará aquí. Te amaré siempre mami.

Emma mi luz, llegaste a mi vida y desde entonces toda tristeza desaparece cuando miro esa carita sonriente. Mi chiquinolina eres el centro de mi mundo, gracias por rescatarme.

Fermín A. Holguín Reinoso, esposo y más que nada amigo, muchas gracias por soportar mis cambios de humor y por tu apoyo en cada momento, no imagino mi vida sin ti. Todos estos años y aún no recuerdo un solo momento en el que no hayas estado para apoyar mis decisiones y ayudarme a levantar de mis caídas. Gracias por tu aceptación, por amarme y enseñarme a amarme a mí misma, te estaré eternamente agradecida. Espero tener la dicha de seguir viendo tu rostro cada mañana por el resto de mis días.

A mi segunda madre, mi manita **Carol** nuestras diferencias son muchas, pero has sido mi mayor apoyo y fan número uno. Tus frases de aliento me han empujado hasta aquí, espero que nunca te rindas conmigo (por necia que sea), de más está decirte que eres indispensable en mi vida.

A mi tía Denys por adoptarme aquí en Madrid, has sido como una madre para mí todos estos años, gracias por todo el apoyo y por compartir conmigo uno de los momentos más dolorosos de mi vida, te adoro tiita hermosa.

A mis primas Cristina y Kenia que más que primas han sido hermanas aquí en Madrid, ahora toca celebrar churnias (jajaja), las quiero.

A mi padre **Carlos M. Peña Belliard** por sus consejos y su tolerancia a mi comportamiento.

Gracias a **toda mi familia**, lo siento pero sus nombres no pueden faltar aquí: A mis **abuelas**: Eusebia y Cornelia; a mi querido **abuelo** Julián González (estás aunque no estés, TE AMO papá); **Hermanos** (Carlos M., Carlos A., Carlos R., Manuel A., María T., Gladys M., María M., María A., Carlisa, Marian); ***tíos*** (Carmen R., Blanca, María T., Rosa, Milagros, María, Generosa, Luis y Borgen); **sobrinos** (Carlos J. y Héctor M, Julián J., Yandel L., Jade M. y Denzel); **primos** (Kylsi, Amín, Arnaldo, Alfida, Ferlenny, Rosfenny, Ronnifer, Julissa, Ismari, Ismel, Carolin, Luis M., Osvaldo, Lisbeth, Ángel, Verónica, Borgen); **los peques** (Lara, Gael, Evan, Sebastián, Helen, Gaby, Amir, Abel, Serafín, Leonardo) y todos los demás que siempre han dicho presente: Isidro, Luis, Nelson, Wanda Martínez, Wanda Carvajal, Ury, Mary, Iris etc. Perdón si olvido alguno, me encanta tener una familia enorme, pero es difícil recordar tantos nombres.

A mis compis de travesuras: *Daysi, Ana Heidi, Miguel Caldentey* (te llevaré siempre en mi corazón amigo), *Adrián, Ricardo* y *Legni*, que grato fueron nuestros momentos juntos.

A *Cristina Díaz, Carmen Medina* y *Conrado Depratt*, ustedes se encargaron de que me enamorara de la química.

A *Claudimar* y *Yosra*, por su amistad y por los almuerzos tan entretenidos, gracias por acogerme al llegar aquí, sin ustedes probablemente no habría seguido adelante.

A mis queridos *atrevid@s*, los amo con todo mi corazón y este agradecimiento no sería el mismo si no le dedicara unas palabras a cada uno de ustedes: *Tania*, ese mes en Novosibirsk estará guardado siempre en mi memoria, me ayudaste a crecer y a ver la vida desde una perspectiva diferente, me encanta saber que cuento con tu amistad y espero seguir contando con ella muchísimos años más. *María Fernández*, tu sinceridad perfectamente mezclada con tu gran corazón me calmó la tristeza de muchos días, gracias por preocuparte por mí, por tu generosidad y cariño, besito guapa. *Isabel*, tu tranquilidad dio a nuestro grupo el perfecto equilibrio, definitivamente sin ti el grupo no estaría completo. *Carlos Gutiérrez*, mi compi de labo en el módulo de los extranjis, gracias por tu alegría y por la música, los días contigo jamás fueron aburridos, llenas de alegría todos los espacios, te echaré de menos. *Marta Maroto*, tu compañía hizo los viajes a casa más amenos, gracias por compartir tus conocimientos y tu amistad conmigo, por escucharme cada vez que lo necesitaba, espero encontrar una excusa para seguir dando viajes en autobús contigo (a ver que me invento), te adoro Marotita. A *Silvia* mi Princess, por sus abrazos gigantes que me llenaron de energía tantas veces. Cada vez que escuche "I want you want me" me acordaré de nuestros días en Rusia y de lo bien que la pasamos. Gracias por tu entusiasmo, es admirable ver como afrontas cada día con esa sonrisa enorme y esas ganas de comerte el mundo, te quiero guapis. A *Jorge*, por lo fácil que resultó enseñarte y por ser un estudiante y amigo ejemplar, siempre serás mi estudiante preferido. *Andrea Barrios* mi ciela hermosa, lo nuestro fue amistad a primera vista, jeje, gracias por los ratitos de alivio que me brindaste durante todo este tiempo. A los que acaban de llegar pero que siento como si siempre hubieran estado: *Gabriel, Tamara, Natalia* y *Yael*.

A *Víctor*, nunca me he reído tanto como el día en el que supe que para ti me llamaba "OBDULIA" (aún sigo riendo cada vez que lo recuerdo). Esos ratos de conversación en el laboratorio contigo y *Mariano* me sacaron muchas sonrisas y me ayudaron a liberar mucha tensión, muchas gracias chicos.

A *Beatriz* por su amistad sincera y su gran apoyo personal y emocional, espero me toque la dicha de volver a trabajar contigo, eres simplemente genial.

A *Camino* por dejarme compartir sus horas de conocimiento y su gran amistad, eres un cielo y espero que esta amistad perdure.

Tengo que agradecer especialmente a *Javier Sánchez-Nieves* por su mente brillante, gracias por los constantes debates, has sido indispensable en el desarrollo de este trabajo, gracias por tu paciencia y por todo lo que me has enseñado en estos años. Espero que sepas que cuando sea grande quiero ser como tú. Este grupo no sería el mismo sin ti.

A *Paula Ortega*, muchas gracias por tu apoyo, en todas las formas posibles, no tengo palabras para expresarte mi agradecimiento.

A *Javier de la Mata* y *Rafael Gómez* por confiar en mí y concederme la oportunidad de formar parte del grupo ***BioInDen*** espero no haberles defraudado, gracias a ustedes más que un grupo de investigación somos una gran familia.

Por último y quizás debió ser el primero por ser el más importante, a ***Dios***, tus pruebas me han hecho crecer, pero siempre has estado conmigo.

El éxito es la habilidad de ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo.

Winston Churchill

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

Páginas

ÍNDICE i

ÍNDICE DE ABREVIATURAS x

ÍNDICE DE COMPUESTOS xii

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS xv

CAPÍTULO I. SÍNTESIS DE DENDRONES CARBOSILANO IÓNICOS CON UN GRUPO -SH EN EL PUNTO FOCAL **1**

1.1. Introducción 3

1.1.1. Sistemas dendríticos 3

1.1.1a. Dendrímeros 3

1.1.1b. Dendrones o cuñas dendríticas 8

1.1.1c. Estructuras dendríticas de naturaleza carbosilano 11

1.1.1d. Aplicaciones 20

1.2. Presentación y objetivos 20

1.3. Síntesis y caracterización de dendrones carbosilano con un grupo -SH en el punto focal 21

1.3.1. Técnicas de caracterización utilizadas 23

1.3.2. Dendrones $MeCOSG_nV_m$ 24

1.3.3. Dendrones catiónicos 28

1.3.3a. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}NMe_2\cdot HCl)_m$ 28

1.3.3b. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}NMe_2)_m$ 31

1.3.3c. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}NMe_3I)_m$ 34

1.3.3d. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}NMe_3Cl)_m$ 36

1.3.3e. Dendrones $HSG_n(S\text{-}NMe_2R^+)_m$ 37

1.3.3f. Dendrones catiónicos marcados con fluoresceína 40

1.3.4. Dendrones aniónicos 51

1.3.4a. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}SO_3Na)_m$ 52

1.3.4b. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}CO_2Me)_m$ 54

1.3.4c. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}Suc)_m$ 56

1.3.4d. Dendrones $HSG_n(S\text{-}SO_3Na)_m$ 58

1.3.4e. Dendrones $HSG_n(S\text{-}CO_2Me)_m$ 60

1.3.4f. Dendrones $HSG_n(S\text{-}CO_2H)_m$ 61

1.3.4g. Dendrones $HSG_n(S\text{-}Suc)_m$ 63

1.3.4h. Dendrones $HSG_n(S\text{-}CO_2Na)_m$ 65

1.3.4i. Dendrones $HSG_n(S\text{-}SucNa)_m$ 66

1.4. Conclusiones 68

CAPÍTULO II. DENDRONIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CON CUÑAS DENDRÍTICAS DE NATURALEZA CARBOSILANO 69

2.1. Introducción 71

2.1.1. Nanopartículas 71

2.1.1a. Tipos de nanopartículas 72

2.1.1b. Síntesis de nanopartículas de Au y Ag 75

2.1.1c. Funcionalización de nanopartículas 77

2.1.1d. Técnicas de caracterización 83

2.1.1e. Aplicaciones 88

2.2. presentación y objetivos 90

2.3. Síntesis y caracterización de nanopartículas metálicas de oro y plata 91

2.3.1. Metodologías Sintéticas 92

2.3.1a. Método directo bifásico 92

2.3.1b. Método directo en una sola fase 92

2.3.1c. Método de intercambio 92

2.3.2. Preparación de nanopartículas funcionalizadas con ligandos dodecanotiolato 92

2.3.2a. AuNPs-dodecanotiolato 92

2.3.2b. AgNPs-dodecanotiolato 96

2.3.3. Nanopartículas catiónicas 98

2.3.3a. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos amonio (-NMe_2·HCl) 99

2.3.3b. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos amino (-NMe_2) 103

2.3.3c. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos amonio (-NMe_3^+) 104

2.3.3d. AgNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos amonio (-NMe_3^+) 114

2.3.4. Nanopartículas aniónicas 116

2.3.4a. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos sulfonato (-SO_3Na) 117

2.3.4b. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos carboxilato terminales (-CO_2^-) 127

2.4. Conclusiones 133

CAPÍTULO III. APLICACIONES BIOMÉDICAS 135

3.1. Introducción 137

3.1.1. AuNPs y AgNPs como agentes terapéuticos 138

3.1.1.a. Agentes antibacterianos 138

3.1.1.b. Agentes anticancerígenos 141

3.1.1.c. Agentes antivirales: VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) 143

3.1.2. AuNPs y AgNPs como transportadores de ácidos nucleicos 146

3.1.2.a. Terapia génica: VIH 148

3.1.2.b. Terapia génica: cáncer 150

3.1.3. AuNPs en separación de proteínas 150

3.2. Presentación y objetivos 151

3.3. Estudios biomédicos de sistemas sintetizados 152

3.3.1. Biocompatibilidad de los sistemas catiónicos con células sanguíneas 152

3.3.1.a. Actividad hemolítica 153

3.3.1.b. Inducción a la agregación plaquetaria 157

3.3.1.c. Proliferación de linfocitos 158

3.3.1.d. Relación estructura-actividad 159

3.3.2. Aplicación de los sistemas sintetizados como agentes terapéuticos 161

3.3.2.a. Capacidad antibacteriana 161

3.3.2.b. Capacidad anticancerígena 164

3.3.2.c. Capacidad antiviral 167

3.3.3. Aplicación de los sistemas sintetizados como transportadores de ácidos nucleicos 173

3.3.3.a. Terapia génica: Cáncer 174

3.3.3.b. Terapia génica: VIH 185

3.3.4. Aplicación AuNPs en separación de proteínas 189

3.3.4.a. Proteína seroalbúmina bovina (BSA) 190

3.3.4.b. Proteína lisozima (LYZ) 191

3.3.4.c. Proteína mioglobina (MYO) 192

3.3.4.d. Extracción de proteínas procedente de semillas de melocotón 193

3.4. Conclusiones 193

CHAPTER IV. EXPERIMENTAL SECTION 197

4.1. Experimental material and methods 199

4.1.1. General working conditions 199

4.1.2. Materials 199

4.1.3. Instrumental Techniques 199

4.1.4. Purification Methods 202

4.1.4a. Nanofiltration systems 202
4.1.4b. Dialysis systems 203
4.1.5. Biomedical assays 203
4.1.5a. Antibacterial activity 203
4.1.5b. Anticancer activity 205
4.1.5c. Nanoconjugates formation between nucleic acid and dendritic systems 205

4.2. synthesis and characterization of compounds 209

4.2.1. Carbosilane dendrons with peripheral vinyl groups 209
4.2.1a. General protocol 209
$MeCOSG_1V_2$ (**1**) 209
$MeCOSG_2V_4$ (**2**) 210
$MeCOSG_3V_8$ (**3**) 210
$MeCOSG_4V_{16}$ (**4**) 211
4.2.2. Cationic carbosilane dendrons 212
4.2.2a. General protocol for $(MeCOS)G_n(S\text{-}NMe_2\cdot HCl)_m$ 212
$(MeCOS)G_1(S\text{-}NMe_2\cdot HCl)_2$ (**5**) 213
$(MeCOS)G_2(S\text{-}NMe_2\cdot HCl)_4$ (**6**) 213
$(MeCOS)G_3(S\text{-}NMe_2\cdot HCl)_8$ (**7**) 214
$(MeCOS)G_4(S\text{-}NMe_2\cdot HCl)_{16}$ (**8**) 215
4.2.2b. General protocol for $(MeCOS)G_n(S\text{-}NMe_2)_m$ 215
$(MeCOS)G_1(S\text{-}NMe_2)_2$ (**9**) 215
$(MeCOS)G_2(S\text{-}NMe_2)_4$ (**10**) 216
$(MeCOS)G_3(S\text{-}NMe_2)_8$ (**11**) 216
$(MeCOS)G_4(S\text{-}NMe_2)_{16}$ (**12**) 217
4.2.2c. General protocol for $(MeCOS)G_n(S\text{-}NMe_3I)_m$ 218
$(MeCOS)G_1(S\text{-}NMe_3I)_2$ (**13I**) 218
$(MeCOS)G_2(S\text{-}NMe_3I)_4$ (**14I**) 218
$(MeCOS)G_3(S\text{-}NMe_3I)_8$ (**15I**) 219
$(MeCOS)G_4(S\text{-}NMe_3I)_{16}$ (**16I**) 219
4.2.2d. General protocol for $(MeCOS)G_n(S\text{-}NMe_3Cl)_m$ 220
$(MeCOS)G_1(S\text{-}NMe_3Cl)_2$ (**13Cl**) 220
$(MeCOS)G_2(S\text{-}NMe_3Cl)_4$ (**14Cl**) 220
$(MeCOS)G_3(S\text{-}NMe_3Cl)_8$ (**15Cl**) 221
$(MeCOS)G_4(S\text{-}NMe_3Cl)_{16}$ (**16Cl**) 221
4.2.2e. General protocol for focal point deprotection 222
$HSG_1(S\text{-}NMe_2HCl)_2$ (**17**) 222
$HSG_2(S\text{-}NMe_2HCl)_4$ (**18**) 222
$HSG_3(S\text{-}NMe_2HCl)_8$ (**19**) 223
$HSG_1(S\text{-}NMe_3I)_2$ (**23I**) 223

$HSG_2(S\text{-}NMe_3I)_4$ (**24I**) 224
$HSG_3(S\text{-}NMe_3I)_8$ (**25I**) 224
$HSG_4(S\text{-}NMe_3I)_{16}$ (**26I**) 225
$HSG_1(S\text{-}NMe_3Cl)_2$ (**23Cl**) 225
$HSG_2(S\text{-}NMe_3Cl)_4$ (**24Cl**) 226
$HSG_3(S\text{-}NMe_3Cl)_8$ (**25Cl**) 226
$HSG_4(S\text{-}NMe_3Cl)_{16}$ (**26Cl**) 227
4.2.2f. General protocol for $HSG_n(S\text{-}NMe_2)_m$ 227
$HSG_1(S\text{-}NMe_2)_2$ (**20**) 228
$HSG_2(S\text{-}NMe_2)_4$ (**21**) 228
$HSG_3(S\text{-}NMe_2)_8$ (**22**) 229
4.2.2g. Fluorescein labelled dendrons 230
$(MeCOS)G_4V_{15}(S\text{-}NH_3Cl)$ (**27**) 230
$(MeCOS)G_4(S\text{-}NH_3Cl)(S\text{-}NMe_2\cdot HCl)_{15}$ (**28**) 231
$(MeCOS)G_4(S\text{-}NH_2)(S\text{-}NMe_2)_{15}$ (**29**) 231
$(MeCOS)G_4(S\text{-}NHFITC)(S\text{-}NMe_2)_{15}$ (**30**) 232
$(MeCOS)G_4(NHFITC)(S\text{-}NMe_3I)_{15}$ (**31I**) 232
$(MeCOS)G_4(S\text{-}NHFITC)(S\text{-}NMe_3Cl)_{15}$ (**31Cl**) 233
$HSG_4(S\text{-}NHFITC)(S\text{-}NMe_3Cl)_{15}$ (**32Cl**) 233
4.2.3. Anionic carbosilane dendrons 234
4.2.3a. General protocol for $(MeCOS)G_n(S\text{-}SO_3Na)_m$ 235
$(MeCOS)G_1(S\text{-}SO_3Na)_2$ (**33**) 235
$(MeCOS)G_2(S\text{-}SO_3Na)_4$ (**34**) 235
$(MeCOS)G_3(S\text{-}SO_3Na)_8$ (**35**) 236
4.2.4b. General protocol for $(MeCOS)G_n(S\text{-}CO_2Me)_m$ 237
$(MeCOS)G_1(S\text{-}CO_2Me)_2$ (**36**) 237
$(MeCOS)G_2(S\text{-}CO_2Me)_4$ (**37**) 237
$(MeCOS)G_3(S\text{-}CO_2Me)_8$ (**38**) 238
4.2.3c. General protocol for $(MeCOS)G_n(S\text{-}Suc)_m$ 238
$(MeCOS)G_1(S\text{-}Suc)_2$ (**39**) 239
$(MeCOS)G_2(S\text{-}Suc)_4$ (**40**) 239
$(MeCOS)G_3(S\text{-}Suc)_8$ (**41**) 240
4.2.3d. General protocol for focal point deprotection 240
$HSG_1(S\text{-}SO_3Na)_2$ (**42**) 240
$HSG_2(S\text{-}SO_3Na)_4$ (**43**) 241
$HSG_3(S\text{-}SO_3Na)_8$ (**44**) 241
$HSG_1(S\text{-}CO_2Me)_2$ (**45**) 242
$HSG_2(S\text{-}CO_2Me)_4$ (**46**) 242
$HSG_3(S\text{-}CO_2Me)_8$ (**47**) 243

4.2.3e. General protocol for deprotection of focal point and peripheral groups 243
$HSG_1(S\text{-}CO_2H)_2$ (**48**) 243
$HSG_2(S\text{-}CO_2H)_4$ (**49**) 244
$HSG_3(S\text{-}CO_2H)_8$ (**50**) 244
$HSG_1(S\text{-}Suc)_2$ (**51**) 245
$HSG_2(S\text{-}Suc)_4$ (**52**) 245
$HSG_3(S\text{-}Suc)_8$ (**53**) 246
4.2.3d. General protocol for $HSG_n(S\text{-}CO_2Na)_m$ and $HSG_n(S\text{-}SucNa)_m$ 246
$HSG_1(S\text{-}CO_2Na)_2$ (**54**) 246
$HSG_2(S\text{-}CO_2Na)_4$ (**55**) 247
$HSG_3(S\text{-}CO_2Na)_8$ (**56**) 247
$HSG_1(S\text{-}SucNa)_2$ (**57**) 248
$HSG_2(S\text{-}SucNa)_4$ (**58**) 248
$HSG_3(S\text{-}SucNa)_8$ (**59**) 249
4.2.4. Metal Nanoparticles 249
4.2.4a. Direct biphasic method 250
4.2.4b. One-pot direct method 250
4.2.4c. Ligand exchange method 250
$Au_{678}(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_{256}$ (**60**) 251
$Ag_{1103}(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_{390}$ (**61**) 251
$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_2(NMe_2{\cdot}HCl)_4)_z)$ (**62**) 251
$Au_x(S\text{-}G_1(S\text{-}NMe_2{\cdot}HCl)_2)_y$ (**63**) 252
$Au_x(S\text{-}G_2(S\text{-}NMe_2{\cdot}HCl)_4)_y$ (**64**) 252
$Au_x(S\text{-}G_3(S\text{-}NMe_2{\cdot}HCl)_8)_y$ (**65**) 252
$Au_x(S\text{-}G_2(S\text{-}NMe_2)_4)_y$ (**66**) 253
$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_2(NMe_3^+)_4)_z)$ (**67**) 253
$Au_{1338}(SG_1(S\text{-}NMe_3I)_2)_{94}$ (**68I**) 253
$Au_{4599}(SG_2(S\text{-}NMe_3I)_4)_{2335}$ (**69I**) 254
$Au_{3416}(SG_3(S\text{-}NMe_3I)_8)_{1952}$ (**70I**) 254
$Au_{180}(SG_1(S\text{-}NMe_3Cl)_2)_{59}$ (**68Cl**) 255
$Au_{329}(SG_2(S\text{-}NMe_3Cl)_4)_{132}$ (**69Cl**) 255
$Au_{247}(SG_3(S\text{-}NMe_3Cl)_8)_{123}$ (**70Cl**) 255
$Ag_{143}(SG_1(S\text{-}NMe_3Cl)_2)_{36}$ (**71Cl**) 256
$Ag_{788}(SG_2(S\text{-}NMe_3Cl)_4)_{165}$ (**72Cl**) 256
$Ag_{1792}(SG_3(S\text{-}NMe_3Cl)_8)_{557}$ (**73Cl**) 257
$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_1(SO_3Na)_2)_z)$ (**74**) 257
$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_2(SO_3Na)_4)_z)$ (**75**) 257
$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_3(SO_3Na)_8)_z)$ (**76**) 258
$Au_{427}(S\text{-}G_1(S\text{-}SO_3Na)_2)_{140}$ (**77a**) 258

$Au_{1441}(S\text{-}G_1(S\text{-}SO_3Na)_2)_{255}$ (**77b**) 259
$Au_{1214}(SG_2(S\text{-}SO_3Na)_4)_{139}$ (**78**) 259
$Au_{834}(SG_3(S\text{-}SO_3Na)_8)_{47}$ (**79**) 259
$Au_xG_2(S\text{-}(CO_2Me)_4)_y(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y$ (**80**) 260
$Au_xG_2(S\text{-}(CO_2Me)_4)_y$ (**81**) 260
$Au_{1090}G_1(S\text{-}(CO_2Na)_2)_{206}$ (**82**) 260
$Au_{3416}G_2(S\text{-}(CO_2Na)_4)_{648}$ (**83**) 261
$A_{3702}G_3(S\text{-}(CO_2Na)_8)_{356}$ (**84**) 261

CHAPTER V. SUMMARY AND CONCLUSIONS 263

5.1. Introduction 265

5.2. Results and discussion 266

5.2.1. Carbosilane dendrons 266
5.2.2. Metal nanoparticles 268
5.2.3. Biomedical applications 270
5.2.3a Cationic Systems biocompatibility with blood cells 270
5.2.3b Applications as therapeutics agents 271
5.2.3c Applications as nucleic acids carriers 275
5.2.3d Applications in protein separation 284

5.3. Conclusions 287

BIBLIOGRAFÍA 291

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A continuación, se encuentran recogidas de manera alfabética las abreviaturas que aparecerán a lo largo de esta Memoria, para facilitar de este modo el seguimiento de los capítulos, tablas, esquemas y figuras incluidas en ella.

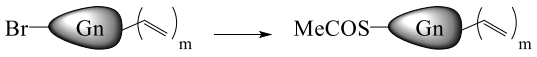
Abreviatura	***Nombre completo***
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico
AgNPs	Nanopartículas de plata
ARN/RNA	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonuclieco mensajero
ARNpi/siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
ARNv	Ácido ribonucleico viral
ASH/HAS	Albúmina de suero humano
ATP	Trifosfato de adenosina
AuNPs	Nanopartículas de oro
Bcl-xL/Bcl-xL-FAM	ARNpi Bcl-xL sin marcar/marcado con fluoresceína
BSA	Albúmina de suero bovino
Cat.	Catalizador
CXCR4/CCR5	Receptor de quimiocina de tipo 4/de tipo 5
CD4	Glicoproteína expresada por algunas células T y células dendríticas
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMB/MBC	Concentración mínima bactericida
CMI/MIC	Concentración mínima inhibitoria
CMSP/PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
Col.	Colaboradores
D	Diámetro
DC	Dicroísmo circular
DE/SD	Desviación estándar
Dercha.	Derecha
DEXT.	Dextrano
DLA	Dalton's lymphoma ascites
DLS	Dynamic light scattering
DMPA	2-dimetoxi-2-fenilacetofenona
DOSY	Diffusion-ordered spectroscopy
δ	Desplazamiento químico
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h	Hora
HeLa	Línea celular derivada de cáncer cérvico-uterino
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HT29	Línea celular derivada de adenocarcinoma de colón
hν	Radiación electromagnética
IC_{50}	La concentración media máxima inhibitoria (medida de la eficacia de una sustancia en la inhibición de una función biológica o bioquímica específica)
IR	Infrarrojo

Izq.	Izquierda
L	Ligandos o dendrones
LYZ	Lisozima
M	Metal
MCF-7	Línea celular derivada de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Línea celular derivada de adenocarcinoma de mama metastásico dependiente de hormonas
MDM	Monocyte-Derived Macrophages (macrófagos derivados de monocitos humanos)
Me	Grupo metilo
MS	Mass Spectrometry
MTT	Bromuro3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MWCO	Molecular Weight Cut-Off (término usado para describir un tamaño de poro de una membrana)
MYO	Mioglobina
N_{Ag}	Número de átomos de plata
N_{Au}	Número de átomos de oro
Nefpi	ARNpi Nef
N_L	Número de ligandos o dendrones
MNPs	Nanopartículas metálicas
NT	No tratada
Obt.	Obtenido
ºC	Grados Celsius
PEG	Polietilenglicol
PHA-M	Fitohemaglutinina M
PM Aprox./Av.MW	Peso Molecular Aproximado
ppm	Partes por millón
R5-VIH$_{NLAD8}$	Aislado viral presente mayoritariamente en la fase aguda de la infección por VIH
RMN/NMR	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Reactive Oxygen Species
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SPR	Surface Plasmon Resonance
T-20	Fuzeon (antiviral VIH)
ta	Temperatura ambiente
TEM	Transmission Electron Microscopy
TOABr	Bromuro de tetraoctilamonio
Trp	Triptófano
TZM.bl	Línea celular HeLa de ingeniería genética que expresa CD4, CCR5 y CXCR4
UV-Vis	Ultravioleta visible
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH/HIV	Virus de Inmunodeficiencia Humana
X4-VIH-1$_{NL4.3}$	Aislado viral presente mayoritariamente en la fase crónica de la infección por VIH
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy
λ	Longitud de onda

ÍNDICE DE COMPUESTOS

Capítulo I

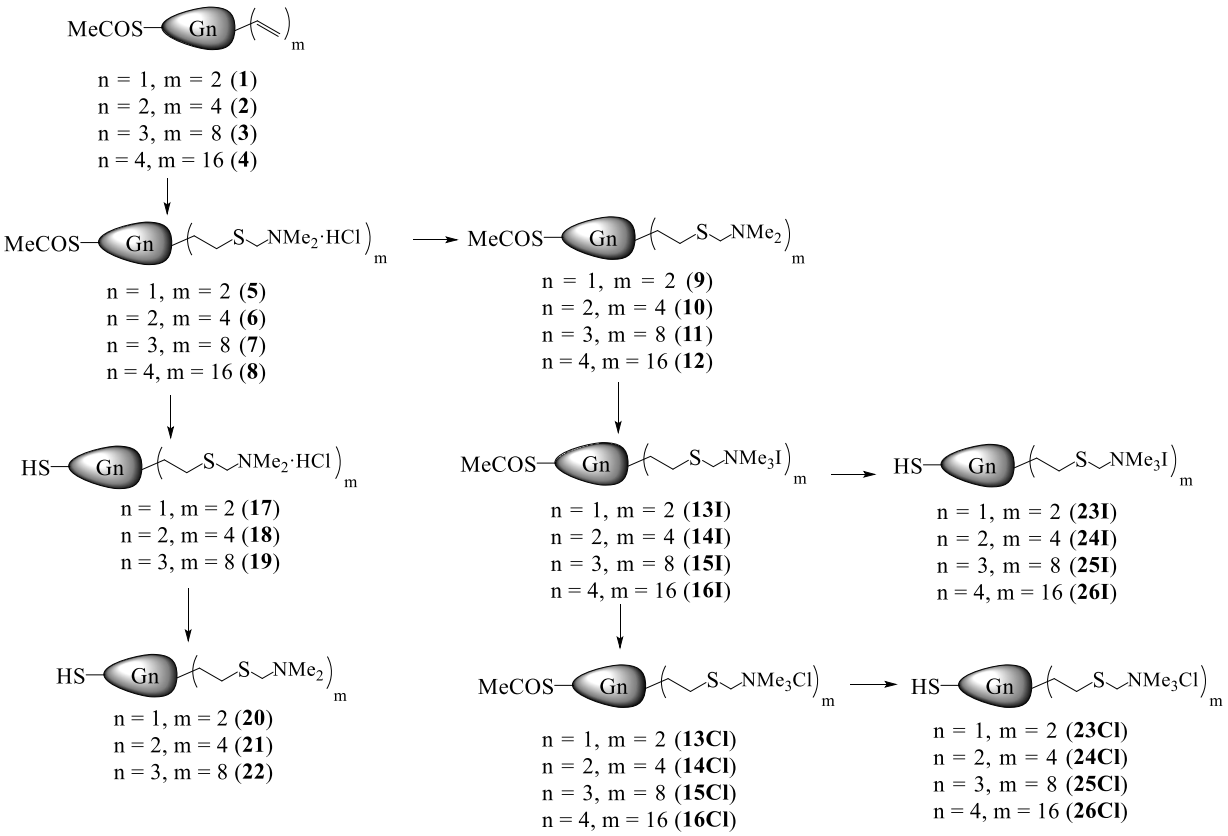
Dendrones MeCOSGnVm

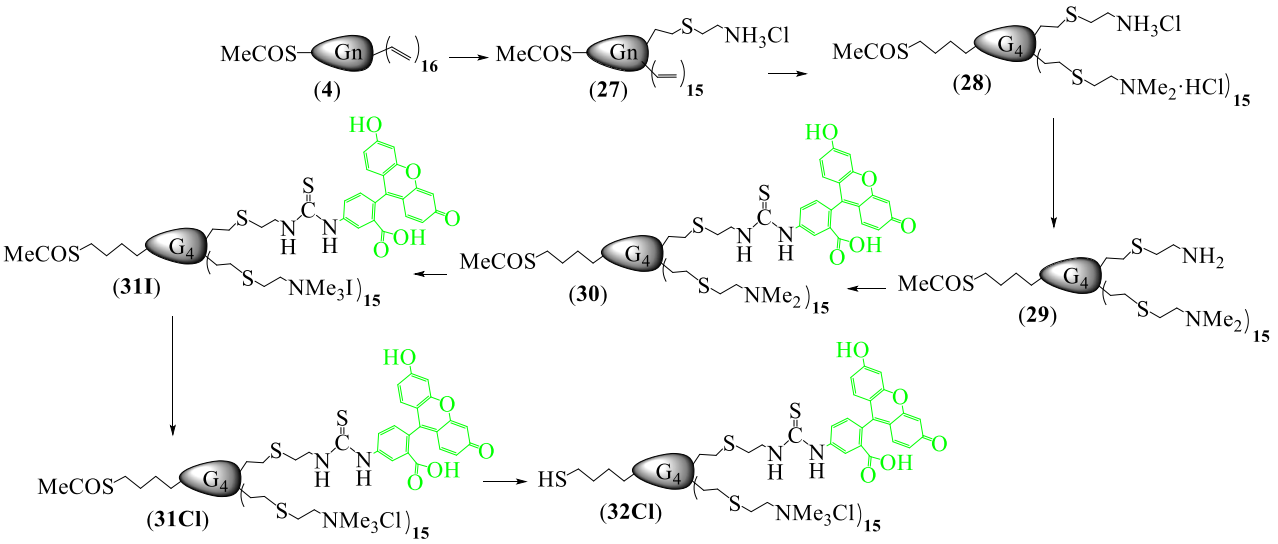


n = 1, m = 2 (**I**)
n = 2, m = 4 (**II**)
n = 3, m = 8 (**III**)
n = 4, m = 16 (**IV**)

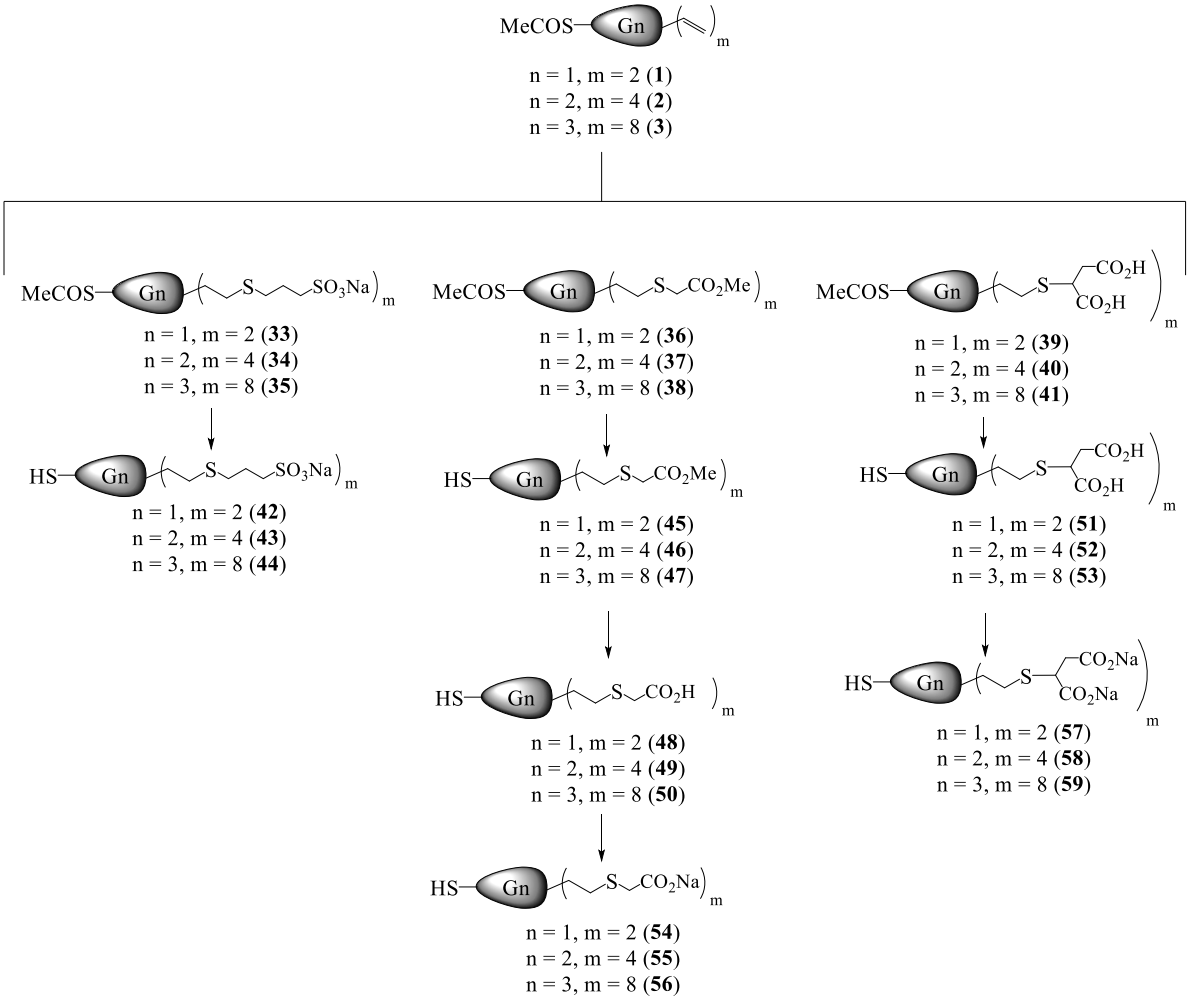
n = 1, m = 2 (**1**)
n = 2, m = 4 (**2**)
n = 3, m = 8 (**3**)
n = 4, m = 16 (**4**)

Dendrones Catiónicos



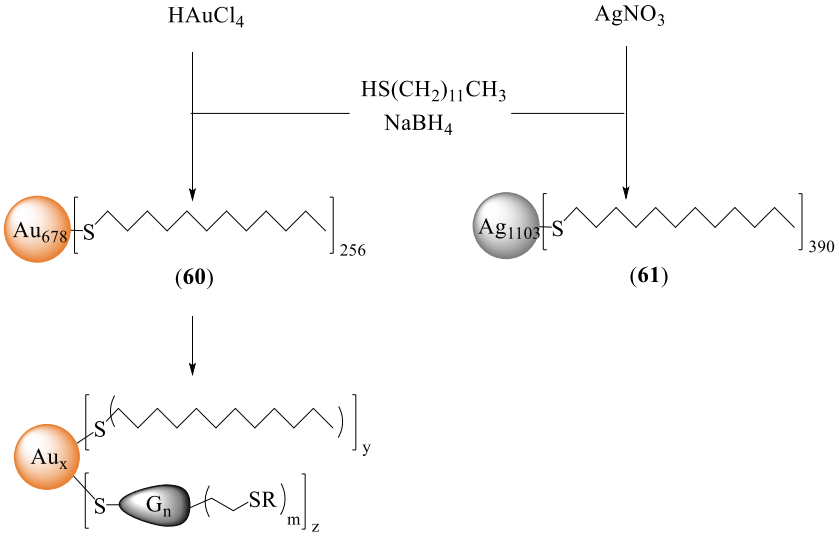


Dendrones aniónicos



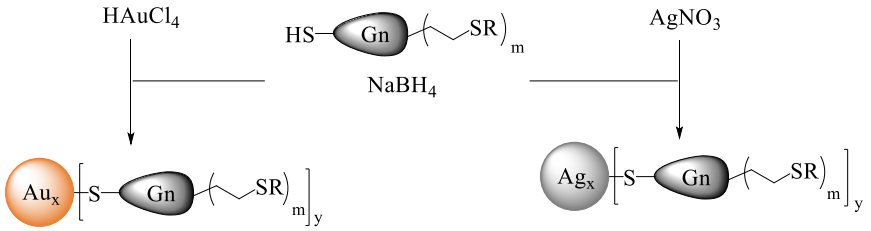
Capítulo II

Nanopartículas funcionalizadas por el método de intercambio



n = 2, m = 4, R = -$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (**62**)
n = 2, m = 4, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**67**)
n = 1, m = 2, R = $(CH_2)_3SO_3Na$ (**74**)
n = 2, m = 4, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**75**)
n = 3, m = 8, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**76**)
n = 2, m = 4, R = -CH_2CO_2Me (**80**)

Nanopartículas funcionalizadas por el método directo



n = 1, m = 2, R = -$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (**63**)
n = 2, m = 4, R = -$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (**64**)
n = 3, m = 8, R = -$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (**65**)
n = 1, m = 2, R = -$(CH_2)_2NMe_2$ (**66**)
n = 1, m = 2, x = 338, y = 94, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**68I**)
n = 2, m = 4, x = 4599, y = 2335, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**69I**)
n = 3, m = 8, x = 3416, y = 1952, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**70I**)
n = 1, m = 2, x = 180, y = 59, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**68Cl**)
n = 2, m = 4, x = 329, y = 132, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**69Cl**)
n = 3, m = 8, x = 247, y = 123, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**70Cl**)
n = 1, m = 2, x = 427, y = 140, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**77a**)
n = 1, m = 2, x = 1441, y = 255, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**77b**)
n = 2, m = 4, x = 1214, y = 121, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**78**)
n = 3, m = 8, x = 834, y = 41, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**79**)
n = 2, m = 4, R = -CH_2CO_2Me (**81**)
n = 1, m = 2, x = 1090, y = 206, R = -CH_2CO_2Na (**82**)
n = 2, m = 4, x = 3416, y = 648, R = -CH_2CO_2Na (**83**)
n = 3, m = 8, x = 3702, y = 356, R = -CH_2CO_2Na (**84**)

n = 1, m = 2, x = 143, y = 36, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**71Cl**)
n = 2, m = 4, x = 788, y = 165, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**72Cl**)
n = 3, m = 8, x = 1792, y = 557, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**73Cl**)

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

Una de las tecnologías más prometedoras del siglo XXI es la nanotecnología. La nanotecnología es un término colectivo para referirse a desarrollos tecnológicos en la escala nanométrica (0.1-100 nm). Una de las ramas más explotadas dentro de esta tecnología es la Nanomedicina, la cual utiliza nanosistemas para el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades. Existen una gran variedad de nanoestructuras que se utilizan en nanomedicina como son: polímeros, dendrímeros, liposomas, nanotubos, nanorods, quantum dots, nanopartículas metálicas, etc. Estas últimas son consideradas plataformas multifacéticas ya que no solo se pueden introducir variedad de ligandos en su superficie, sino que también poseen propiedades inherentes que las hacen útiles tanto a nivel diagnóstico como terapéutico. Dentro de estos sistemas las nanopartículas de oro (AuNPs) y plata (AgNPs) han recibido especial atención en el campo de la biomedicina. Las propiedades inherentes de las AuNPs sumado a su biocompatibilidad,[1] su citotoxicidad,[2-4] biodistribución[5,6] y excreción[7-9] *in vivo* han convertido estos sistemas en materiales especialmente atractivos en diferentes campos de la biomedicina. Las AgNPs por su parte han demostrado poseer propiedades antimicrobianas de amplio espectro siendo de especial interés en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.[10] La dendronización de nanopartículas metálicas permite la introducción de grupos capaces de dotarla de propiedades que podrían resultar de interés en medicina. En este sentido, las AuNPs y AgNPs presentan una gran afinidad por ligandos con grupos tiol los cuales son capaces de unirse fuertemente a la superficie metálica de la nanopartícula.

Nuestro grupo de investigación ha diseñado dendrímeros de naturaleza carbosilano con grupos catiónicos y aniónicos en la superficie que han demostrado ser potencialmente útiles para aplicaciones biomédicas. La modificación de estos sistemas con el objetivo de obtener grupos tiol que servirían para la posterior funcionalización de nanopartículas metálicas de oro y plata dan como resultado esta Tesis Doctoral. Los dendrones obtenidos son capaces de anclarse en la superficie de nanopartículas metálicas, evitar la agregación de las mismas y conferirles características útiles para su aplicación en medicina.

Este trabajo es el fruto de un proyecto de investigación del grupo BioInDen de la Universidad de Alcalá, en el que han colaborado varios grupos de Investigación los cuales se citan a continuación:

- Grupo de Inmunobiología Molecular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón dirigido por la Doctora Mª Ángeles Muñoz-Fernández.
- Departamento General de Biofísica de la Universidad de Lodz (Polonia) con la colaboración del grupo dirigido por la Dra. Maria Bryszewska.
- El Instituto de Química, Biología y Medicina Fundamental de Novosibirsk, Rusia (ICBFM) dirigido por la Dra. Aliya G. Venyaminova.
- El Departamento de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad de Alcalá con la colaboración de los Dres. Juan Soliveri de Carranza, José Luis Copa Patiño y Jorge Pérez Serrano.
- El Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá con la colaboración de las Dras. María Luisa Marina y Concepción García.

OBJETIVOS Y DISTRIBUCIÓN DE LA MEMORIA

En la búsqueda de nuevos sistemas dendríticos con propiedades terapéuticas se han planteado los siguientes objetivos para este proyecto:

Objetivo general:

Funcionalización de nanopartículas metálicas de oro y plata con dendrones de naturaleza carbosilano con grupos funcionales periféricos aniónicos y catiónicos para ser evaluados posteriormente en determinadas aplicaciones biomédicas.

Objetivos particulares:

I. Sintetizar y caracterizar dendrones aniónicos y catiónicos de naturaleza carbosilano con punto focal -SH.
II. Funcionalizar y caracterizar nanopartículas de oro y plata con los dendrones previamente sintetizados.

III. Estudio biomédico de los sistemas sintetizados como agentes antibacterianos, antivirales y anticancerígenos, así como en el transporte de material genético. Dichos sistemas además serán utilizados en estudios preliminares de separación de proteínas desde muestras complejas.

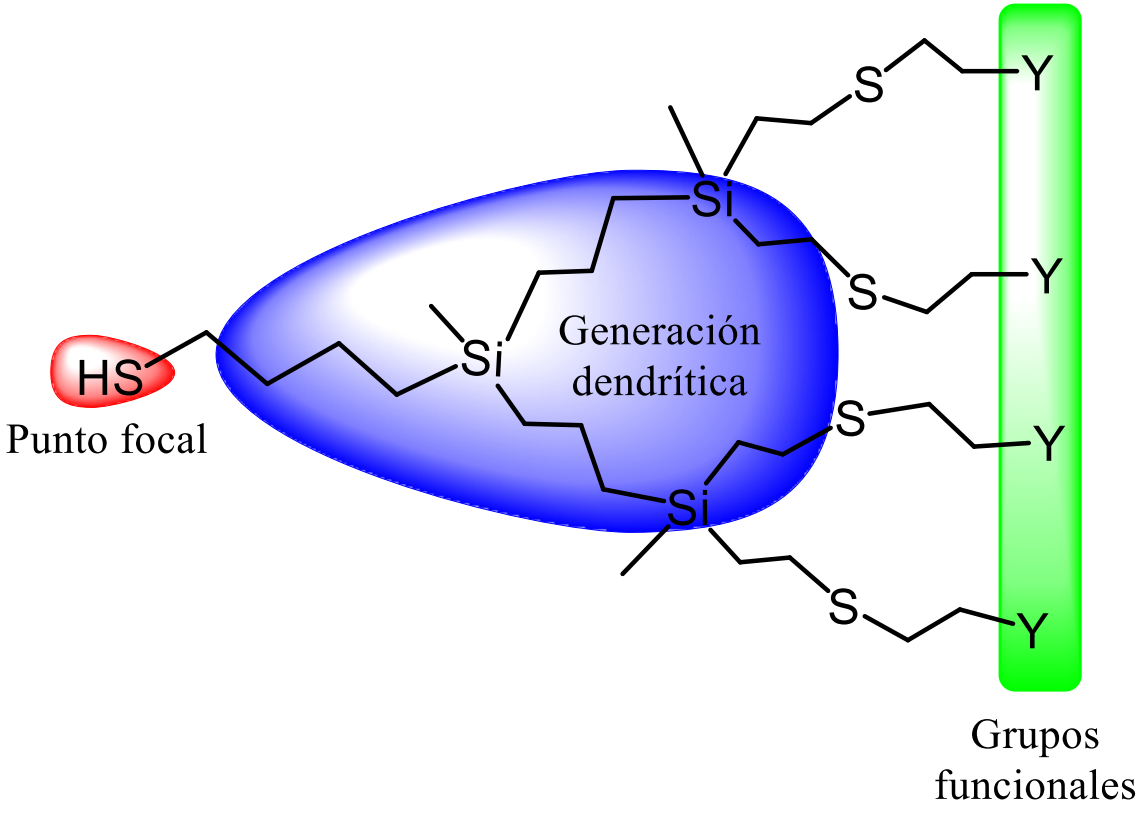
El trabajo realizado para la consecución de los objetivos anteriores se describirá en la memoria con la siguiente distribución:

En el ***Capítulo I*** se describe la síntesis y caracterización de dendrones de naturaleza carbosilano bifuncionalizados, con grupos aniónicos o catiónicos en la periferia y un grupo -SH en el punto focal.

En el ***Capítulo II*** se trata la síntesis y caracterización de nanopartículas de oro y plata funcionalizadas con los dendrones previamente sintetizados para obtener nanopartículas de tipo aniónicas y catiónicas.

En el ***Capítulo III*** se presentan todos los resultados obtenidos en los estudios biomédicos realizados para las estructuras obtenidas en este trabajo.

Capítulo I



Síntesis de dendrones carbosilano iónicos con un grupo -SH en el punto focal

1.1. INTRODUCCIÓN

1.1.1. Sistemas dendríticos

En el año 1978 Vögtle y col.,[11] introdujeron por primera vez el concepto de química dendrítica, basada en la obtención de sistemas hiperramificados de estructura controlada. Este nuevo procedimiento sintético, denominado *síntesis en cascada*, consistía en la realización de un crecimiento controlado a través de una serie de reacciones repetitivas.

Esta nueva química permitió la síntesis de diversas estructuras dendríticas, las cuales pueden ser clasificadas de acuerdo a su topología en polímeros hiperramificados, polímeros dendronizados, dendrigraft, dendrímeros y dendrones. Dentro de éstas, los polímeros hiperramificados suelen ser irregulares y polidispersos, mientras que los dendrones y dendrímeros poseen una estructura monodispersa y regular. Los polímeros dendronizados y los dendrigraft se encuentran en medio de estas dos estructuras, presentando una polidispersidad que varía de acuerdo a su preparación (Fig. 1.1).[12,13]

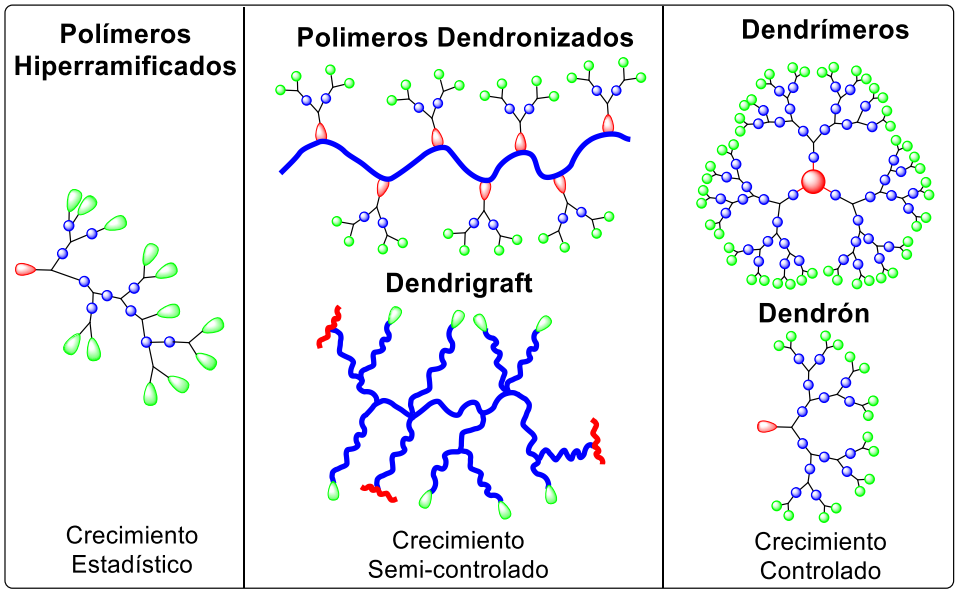


Figura 1.1. Representación estructural de sistemas dendríticos

1.1.1a. Dendrímeros

El término dendrímero lo introdujo Tomalia[14] para referirse a macromoléculas poliméricas de estructura química precisa. Estas macromoléculas de tamaño nanoscópico también han sido descritas por Svenson y col.[15] como “proteínas artificiales”, debido a su monodispersidad y otras propiedades biomiméticas.

Estructura de los dendrímeros

Los dendrímeros están compuestos de múltiples unidades monoméricas que emanan de un núcleo central y que se ramifican generación tras generación. Estas macromoléculas se construyen a partir de una unidad molecular inicial a la cual se van uniendo otras por medio de una serie de reacciones químicas repetitivas para terminar formando una estructura esférica ramificada. Cada nueva rama que se añade crea una nueva generación con un mayor número de grupos funcionales y aproximadamente el doble del peso molecular que la generación previa. Las propiedades de estos compuestos dependen tanto de la naturaleza y topología del núcleo de crecimiento, como de los segmentos añadidos y los grupos terminales que estos posean. Los dendrímeros poseen tres componentes claramente diferenciados (Fig. 1.2):

i) Un núcleo desde donde emanan las unidades de ramificación.

ii) Capas interiores (generaciones), compuestas por unidades de ramificación que se repiten.

iii) Superficie dendrítica (grupos terminales), parte más externa que habitualmente contribuye de modo más importante a su comportamiento.

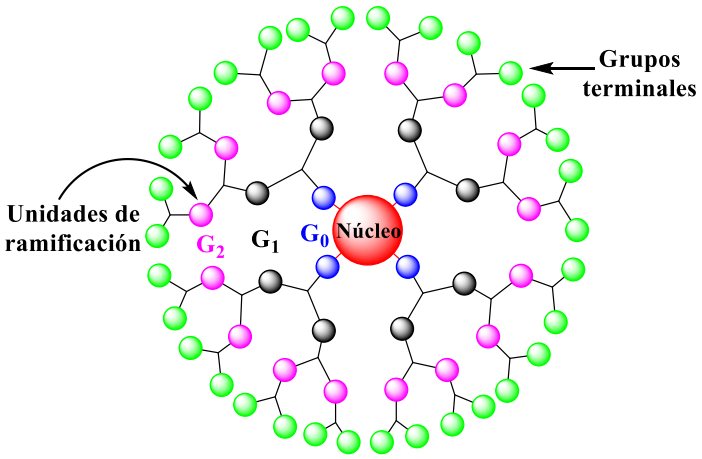


Figura 1.2. Estructura general de un dendrímero esférico

En principio, la metodología sintética de los dendrímeros genera sistemas monodispersos a diferencia de los polímeros lineales. No obstante, durante su formación pueden producirse defectos y, por lo tanto, la polidispersidad puede variar. Estos defectos pueden deberse a la incompleta funcionalización de una rama, a procesos de isomerización, reacciones secundarias, etc. Por ello, es importante elegir para la síntesis de dendrímeros reacciones

selectivas que funcionen con rendimientos muy altos, principalmente si se quieren conseguir generaciones superiores.

Clasificación de dendrímeros

Los dendrímeros pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza de las unidades funcionales que formen su estructura interna. En este sentido, existen diversos ejemplos en bibliografía,[16] como son los poliéteres,[17] los poliamida (PAMAM),[14] los poliamina (PPI),[18] los que contienen átomos de fósforo,[19,20] los dendrímeros con átomos de silicio[21-23] que serán los comentados en este trabajo, entre otros (Fig. 1.3).

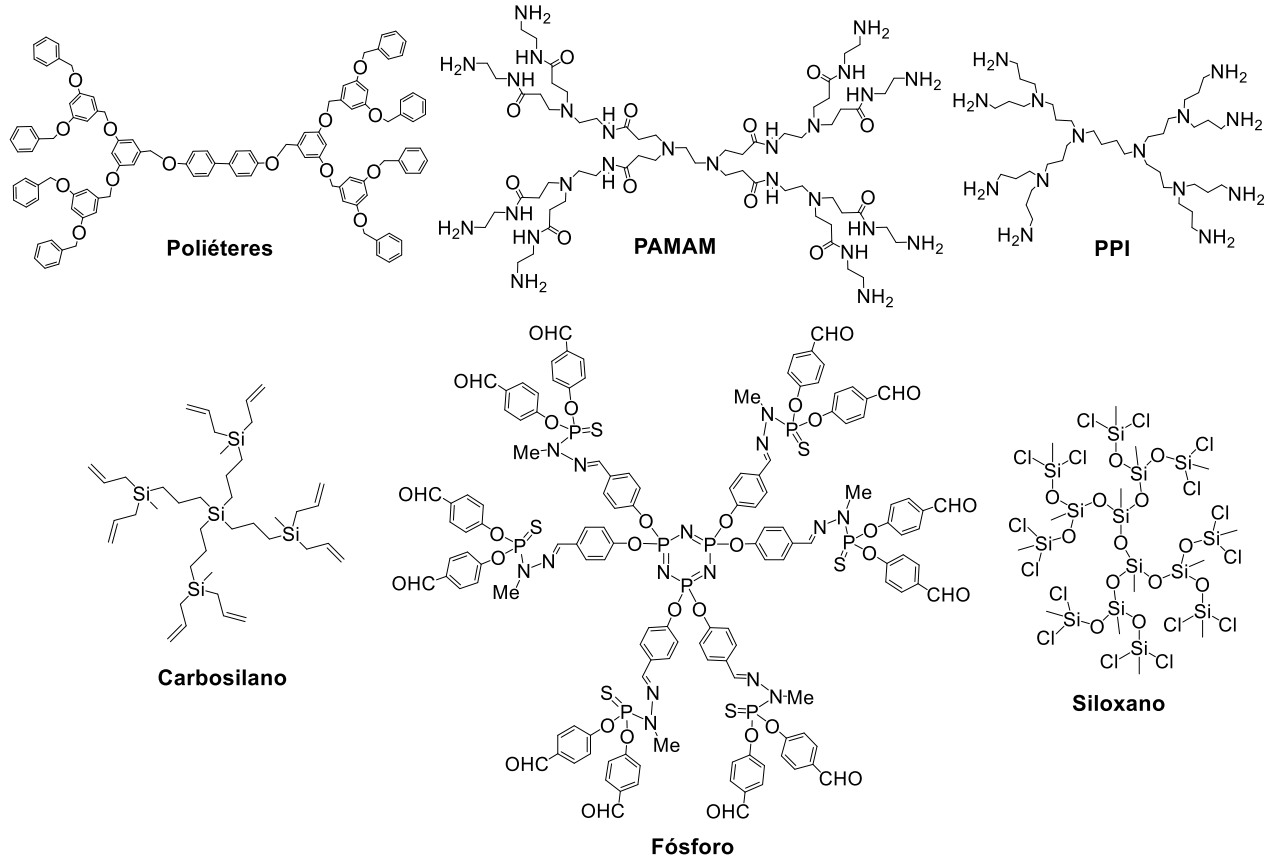
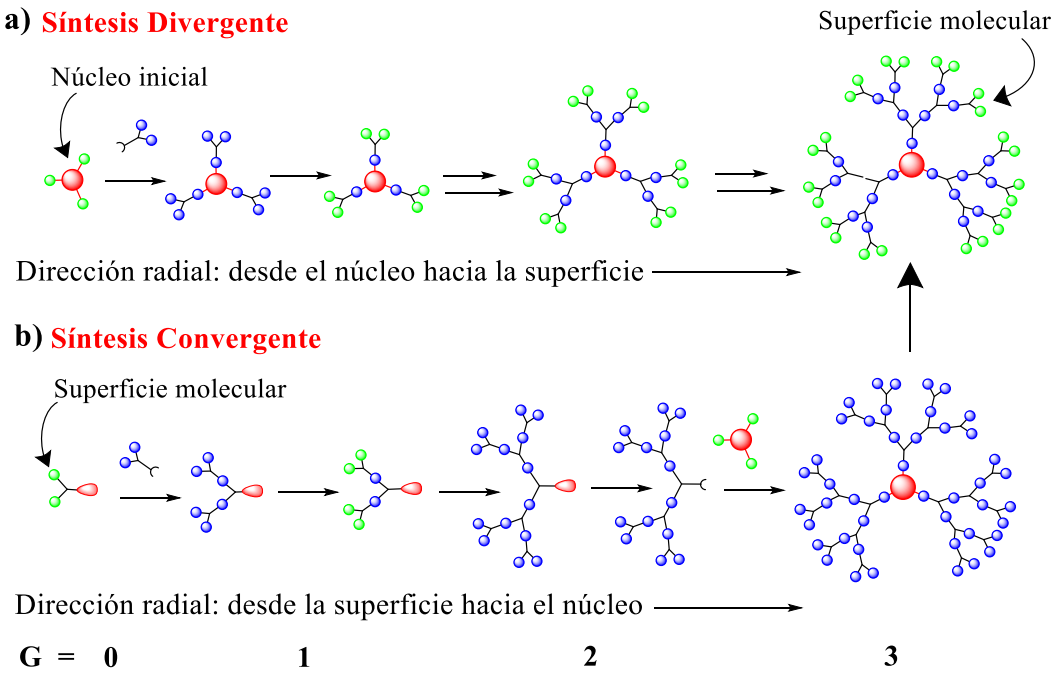


Figura 1.3. Estructuras dendríticas con diferentes unidades funcionales

Síntesis de dendrímeros

Existen varios tipos de metodologías sintéticas para la obtención de moléculas dendríticas. Las estrategias tradicionales son la divergente y convergente (Esq. 1.1).



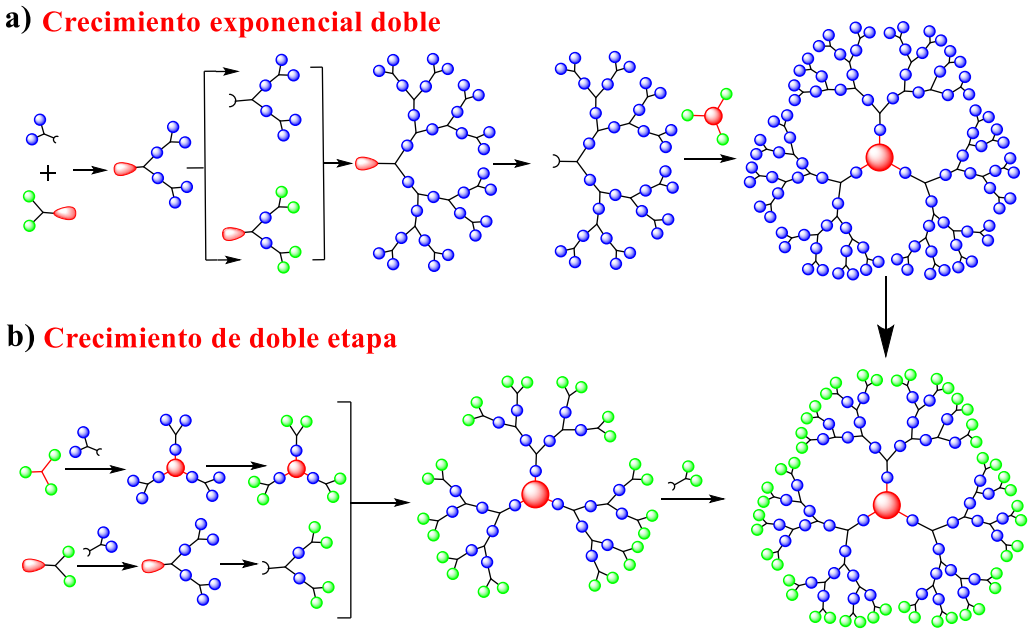
Esquema 1.1. Metodologías sintéticas tradicionales

En el método *divergente*, descrito por primera vez por Tomalia,[14,24] el crecimiento de la molécula dendrítica comienza a partir de un núcleo reactivo desde el cual se hace crecer el dendrímero por reacción con un determinado monómero. La nueva periferia de la molécula es activada para hacerla reaccionar con más monómeros. Por lo tanto, desde el núcleo las ramas van divergiendo hacia la superficie (Esq. 1.1a).[7,15] En este método de síntesis, el principal inconveniente es la funcionalización incompleta de los grupos terminales, que se produce con mayor facilidad en generaciones mayores, lo que provoca defectos en la estructura dendrítica. Para prevenir que esto ocurra, es necesario utilizar exceso de reactivos en cada paso de reacción dificultando los procesos de purificación.

Por otra parte, en el método *convergente*, el crecimiento se inicia en lo que sería la periferia de la molécula dendrítica y continúa hacia el interior de la misma, al unirse gradualmente las unidades de la superficie con más monómeros los cuales conformaran la estructura interna del dendrímero. Estas moléculas así creadas se denominan *dendrones o cuñas dendríticas* (Fig. 1.4), y serán comentados con más detalle más adelante. Cuando el crecimiento del dendrón tiene el tamaño o generación deseada, varios de ellos se unen a un núcleo polifuncional apropiado dando lugar al dendrímero (Esq. 1.1b). Los pioneros de este tipo de ruta sintética fueron Hawker y Fréchet.[17] Esta metodología ha permitido la obtención de un gran número de dendrímeros con núcleos diversos.[25] La purificación de los derivados

obtenidos por esta ruta sintética es relativamente sencilla y la probabilidad de que se formen defectos en la estructura es bastante baja. Sin embargo, la última etapa de acoplamiento de los dendrones al núcleo se puede ver comprometida debido a efectos estéricos, lo que impide la obtención de dendrímeros de altas generaciones.

Otras metodologías utilizadas para la síntesis de estructuras dendríticas que derivan de las tradicionales mencionadas anteriormente, son las llamadas técnicas de crecimiento acelerado (Esq. 1.2).[26]



Esquema 1.2. Metodologías sintéticas de crecimiento acelerado

El avance más reciente viene con el llamado "crecimiento exponencial doble" (Esq. 1.2a), que utiliza un monómero de tipo AB_2 con grupos de protección ortogonales, lo que permite la preparación de monómeros por el método convergente y divergente desde un único material inicial. Esta metodología permite crecer el dendrón en dirección convergente o divergente dependiendo de lo que se desee, aprovechando de este modo los aspectos positivos de ambas metodologías. De esta manera es posible obtener dendrímeros grandes en solo unos cuantos pasos, pero es tan rápida que solo puede repetirse una o dos veces antes de que resulte imposible hacer crecer más el dendrímero.[27-29]

Otra metodología de crecimiento acelerado utilizada es la de "crecimiento de doble etapa" (Esq. 1.2b). En ésta, dos monómeros AB_2 y CD_2 son utilizados, donde A y D reaccionan para formar un enlace bajo condiciones en las que B y C son estables. En esta técnica sintética, tanto la metodología divergente como la convergente pueden ser utilizadas. Sin embargo, el principal problema de esta metodología radica en encontrar una serie de reacciones que cumplan con los criterios mencionados anteriormente.[30,31]

1.1.1b. Dendrones o cuñas dendríticas

Los *dendrones* o *cuñas dendríticas* tienen por sí mismos también importancia como macromoléculas. A diferencia de los dendrímeros, la estructura de las cuñas dendríticas es de tipo cónica, definida así por presentar un único grupo reactivo en el punto focal y múltiples grupos funcionales en la periferia (Fig. 1.4). Este tipo de estructuras, además de presentar las mismas propiedades que los dendrímeros, permiten la realización de reacciones ortogonales por la presencia de dos funciones claramente diferenciadas. El procedimiento sintético seguido para la obtención de dendrones o cuñas dendríticas es el mismo que el utilizado para la obtención de dendrímeros.

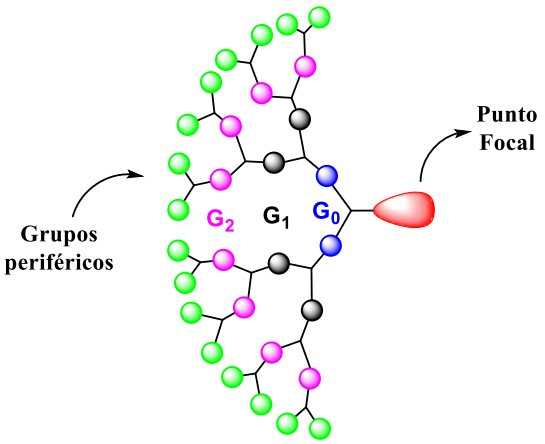


Figura 1.4. Representación estructural de un dendrón o cuña dendrítica

Variaciones adecuadas en la síntesis y en la secuenciación de crecimiento asimétrico permiten un control en el número y la colocación de los diferentes grupos periféricos de la estructura dendrítica. Dadas las características de multifuncionalidad periférica y la presencia de un único grupo reactivo en el punto focal, los dendrones pueden ser utilizados en campos muy diversos. De este modo, es posible unirlos a otras estructuras, como por ejemplo, a otro dendrón,[32] polímeros,[33] nanopartículas,[34-36] entre otros.

La interacción covalente o supramolecular de dendrones con compuestos de tipo dendrítico o no dendrítico, es lo que se conoce como *dendronización*. Algunos ejemplos de dendrones que han sido utilizados como bloques de construcción, espaciadores o como agentes de funcionalización se muestran en la Figura 1.5.[34,37-40]

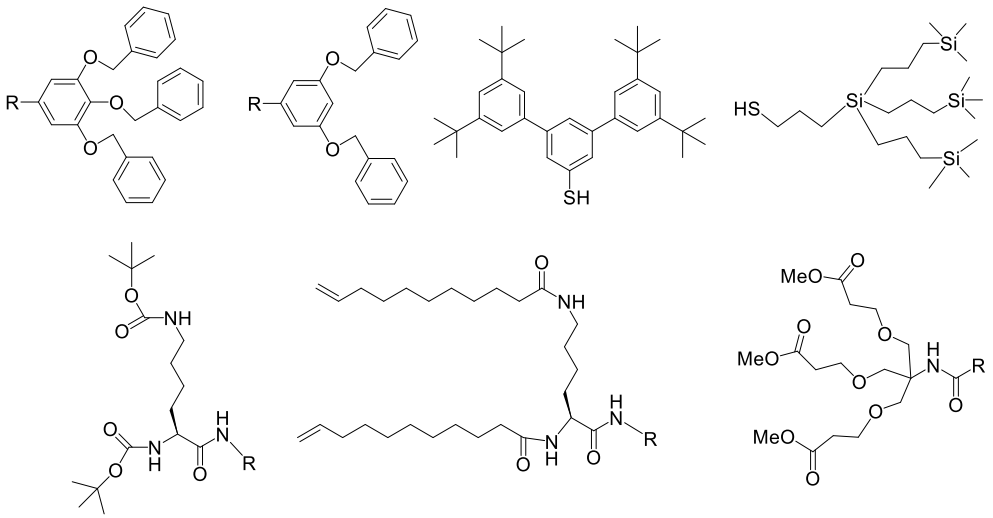


Figura 1.5. Diferentes tipos de dendrones utilizados en procesos de dendronización

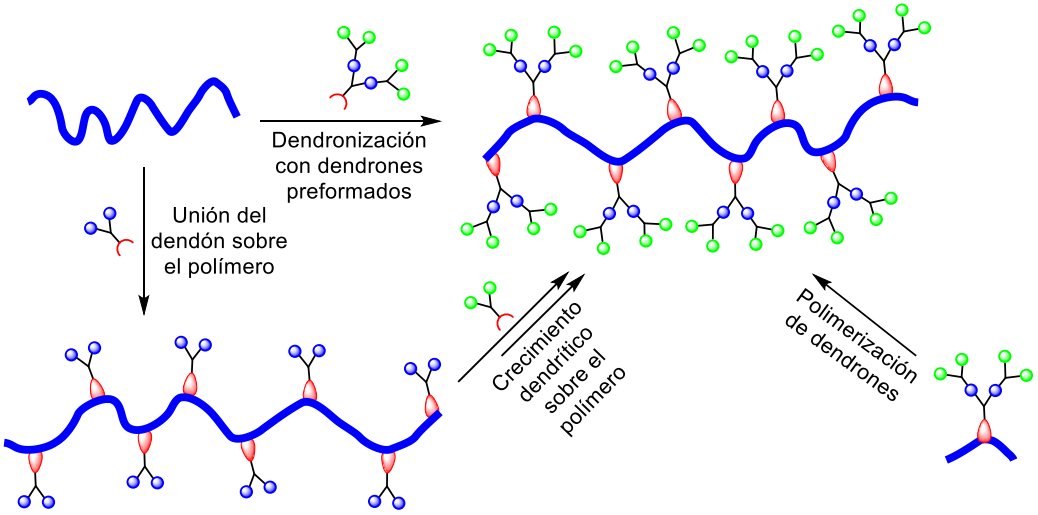
En el proceso de dendronización, una de las características más importantes es la presencia de un gran número de grupos funcionales en la periferia, estando estos grupos, una vez introducidos, más expuestos que en el caso de los dendrímeros esféricos análogos.[33] Una vez realizada la dendronización, estos grupos de la periferia pueden ser utilizados para introducir otras funcionalidades por medio de estrategias relativamente sencillas y rápidas. Materiales hiperramificados y polifuncionales se han sintetizado utilizando la técnica de dendronización.[33,41]

Dendronización de polímeros

El primer ejemplo de polímeros dendronizados fue introducido simultáneamente en 1991 por Tomalia[42] y Gauthier.[43] No obstante, Hawker fue el primero en notar que las estructuras híbridas formadas por la interacción de dendrones y polímeros lineales era interesante y debía ser el siguiente paso en la síntesis de estructuras poliméricas.[44]

Los polímeros dendronizados se forman típicamente a partir de un polímero lineal que contiene grupos de anclaje reactivos colgantes donde se unen los dendrones.

Para la obtención de polímeros dendronizados se han utilizado dos métodos de síntesis; en el primero, los dendrones son anclados en el polímero, estos dendrones pueden estar preformados o bien pueden hacerse crecer sobre el polímero; en el segundo, los dendrones poseen en su punto focal una función capaz de polimerizar (Esq. 1.3).



Esquema 1.3. Métodos de síntesis de polímeros dendronizados

La incorporación de estructuras dendríticas sobre soportes poliméricos es una forma efectiva de amplificar la multiplicidad de grupos funcionales a lo largo de la superficie polimérica. Una de las características principales de los polímeros dendronizados es la polivalencia que aporta la estructura dendrítica y que les permite adaptarse a diferentes entornos como por ejemplo a la superficie de organismos patógenos.[45]

El tamaño de los polímeros dendronizados varía dependiendo de la naturaleza específica de los dendrones introducidos y de la generación dendrítica de los mismos. Como resultado, la dendronización de polímeros lineales es un método novedoso para crear estructuras alternativas por lo que el interés de la síntesis de soportes dendronizados ha aumentado significativamente.[46,47] Este hecho se refleja en el uso de estos sistemas en diferentes campos tales como catálisis,[48] nanomateriales,[49] electroquímica,[50] así como también formación de nanoconjugados con material genético.[51]

Dendronización de nanopartículas

Las estructuras dendríticas son capaces de estabilizar nanopartículas dando como resultado diferentes tipos de nanocompuestos.[52] En la dendronización de nanopartículas inorgánicas, los dendrones pueden unirse covalentemente por el punto focal, el cual contiene un grupo funcional capaz de anclarse a la superficie de la nanopartícula situándose alrededor de la misma, o bien por medio de interacciones electrostáticas entre grupos iónicos (Fig. 1.6).[53]

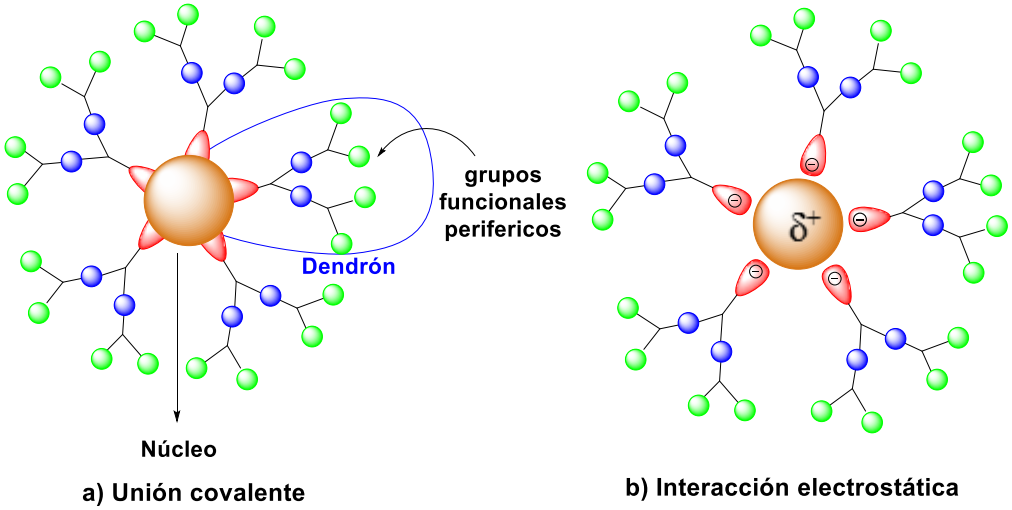


Figura 1.6. Representación de nanopartículas dendronizadas

El núcleo de estos sistemas puede estar constituido por diferentes nanopartículas inorgánicas tales como nanopartículas metálicas (ej. Au,[54] Pd,[55] Pt[56]), óxidos metálicos (ej. óxidos de hierro[36]), sílice,[57] entre otros. A diferencia de la estabilización con dendrímeros esféricos, los grupos funcionales periféricos quedan totalmente disponibles, pudiendo ser utilizados para posteriores funcionalizaciones o bien proporcionando características útiles para diferentes aplicaciones.[58,59]

1.1.1c. Estructuras dendríticas de naturaleza carbosilano

De los dendrímeros basados en heteroátomos, los primeros en ser sintetizados fueron los que contenían silicio en su estructura, entre ellos, se encuentran los de tipo carbosilano (Si-C), siloxano (Si-O), silano (Si-Si) y silazanos (Si-N) (Fig. 1.7).[60,61]

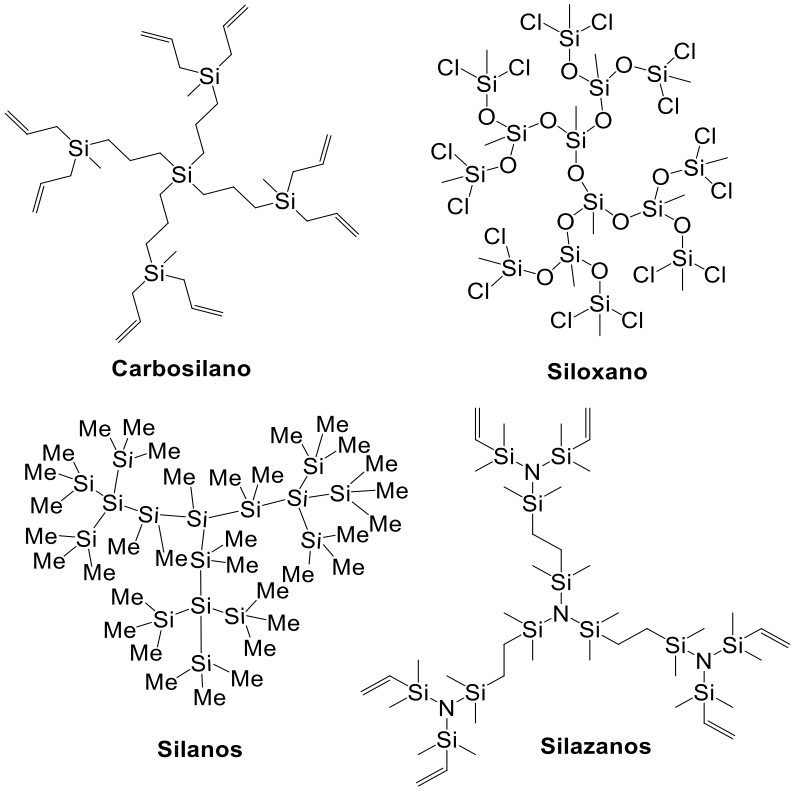
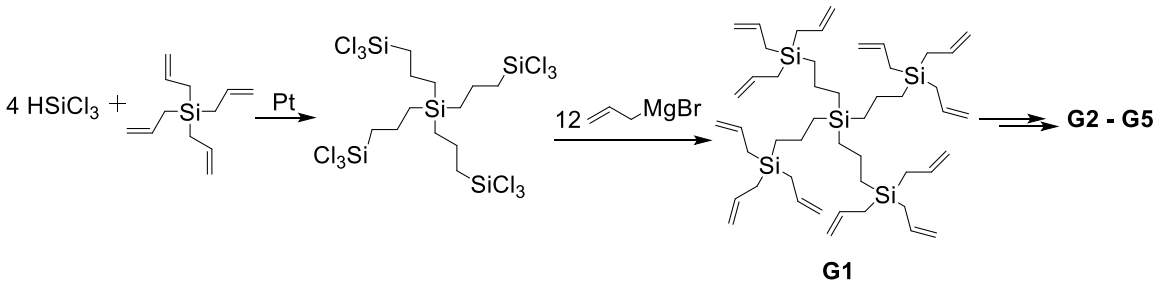


Figura 1.7. Dendrímeros basados en silicio

Dentro de esta familia de dendrímeros, los derivados carbosilano representan una clase especial, ya que su facilidad de síntesis y estabilidad química permite la modificación de los grupos terminales. Por otra parte, la estructura carbosilano presenta una polaridad muy baja, característica útil para aplicaciones biomédicas ya que puede facilitar el paso a través de las membranas celulares.

Síntesis de estructuras dendríticas de naturaleza carbosilano

Las estructuras dendríticas de tipo carbosilano se sintetizan generalmente por el método divergente, esto es, mediante la repetición secuencial de reacciones de hidrosililación y alquenilación de Grignard (Esq.1.4).[22,62]



Esquema 1.4. Síntesis general de dendrímeros carbosilano

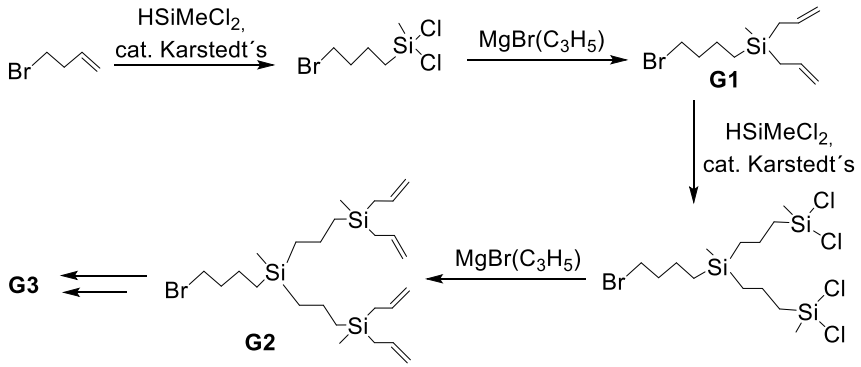
La metodología de síntesis que se utiliza para construir el esqueleto carbosilano brinda una alta flexibilidad y versatilidad, pues pueden ser modificados tanto los reactivos de hidrosililación y alquenilación, como el núcleo o punto focal del mismo sin cambiar las condiciones de reacción drásticamente.[22,61-67]

En estos compuestos, el grado de ramificación se controla a través de la variación del silano utilizado en la reacción de hidrosililación, mientras que la distancia entre los puntos de ramificación del dendrímero es controlada por el reactivo de alquenilación elegido.

Por otra parte, la presencia de grupos terminales silicio-cloro, alilo o vinilo, puede ser utilizada para la introducción de grupos funcionales en la periferia del dendrímero. Esta característica permite el uso de estructuras carbosilano como bloques de construcción con diferentes grupos funcionales, lo que ha permitido la síntesis de materiales como cristales líquidos,[68] catalizadores[69] y sensores.[70-72]

Otros métodos de síntesis que han sido utilizados incluyen rutas sintéticas mixtas (estrategia divergente/convergente). En estos, los dendrones o cuñas dendríticas se sintetizan por el método divergente, mientras que la presencia de un grupo funcional reactivo en el punto focal permite por medio del método convergente unir estos dendrones a diversos núcleos funcionales, obteniéndose así las estructuras dendríticas deseadas.[73-75]

El hecho de poder obtener dendrones carbosilano con diferentes funcionalidades en el punto focal ha facilitado la síntesis de dendrímeros de tipo carbosilano. En este sentido, se han sintetizado dendrímeros carbosilano con grupos periféricos catiónicos y aniónicos utilizando la ruta sintética mixta. En primer lugar, se parte del 4-bromobuteno y por medio del método divergente se obtienen dendrones de generación 1-3 con grupos alilo periféricos (Esq.1.5). A continuación, utilizando el método convergente, los dendrones se unen a un núcleo de 1, 3, 5-trihidroxibenceno. La posterior funcionalización de los grupos alilos permite obtener dendrímeros con diferentes grupos periféricos (Fig.1.8).[75-77]



Esquema 1.5. Síntesis de dendrones carbosilano con grupos alilos periféricos

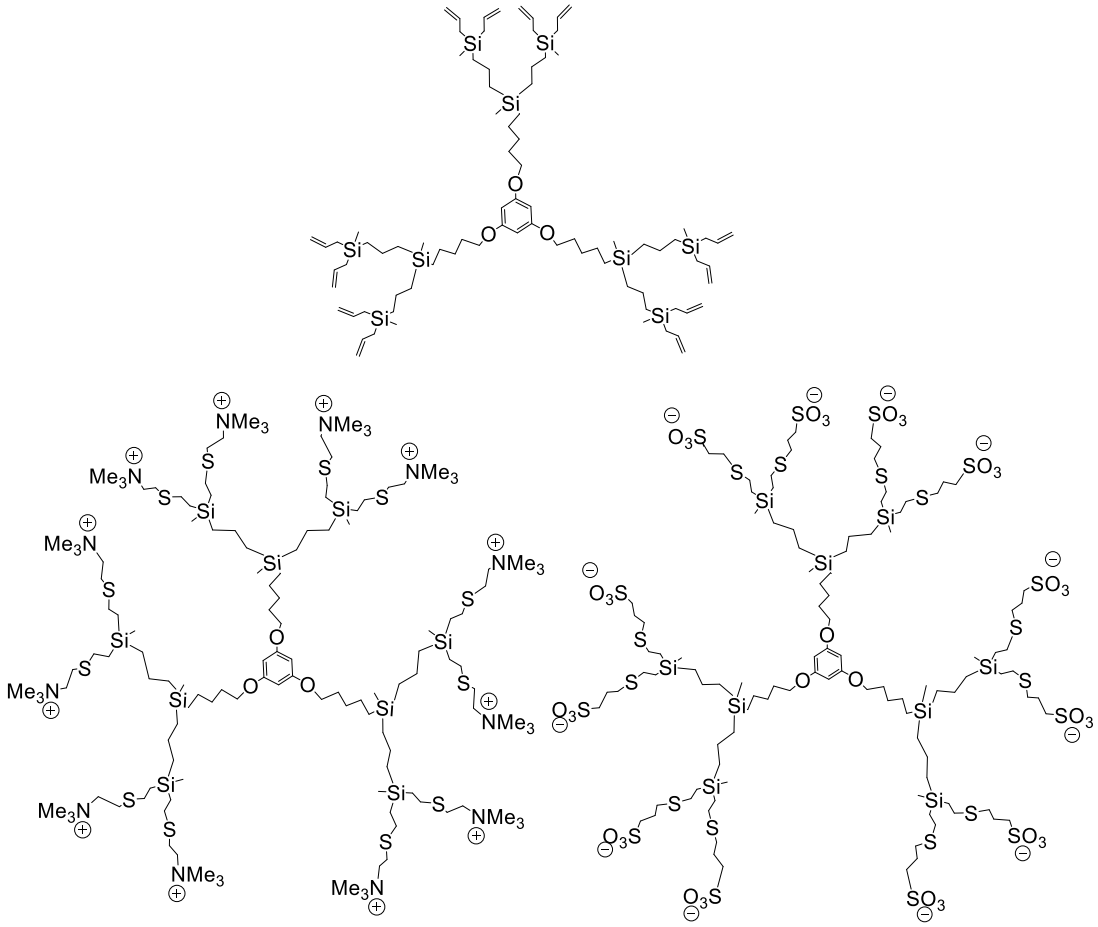
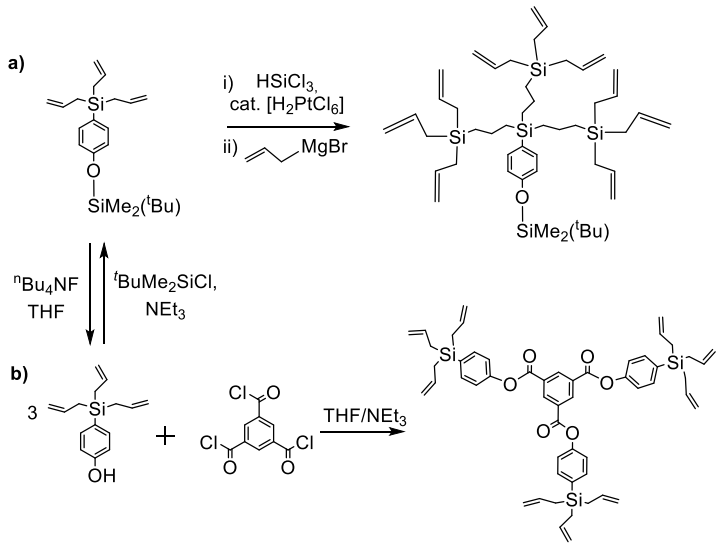


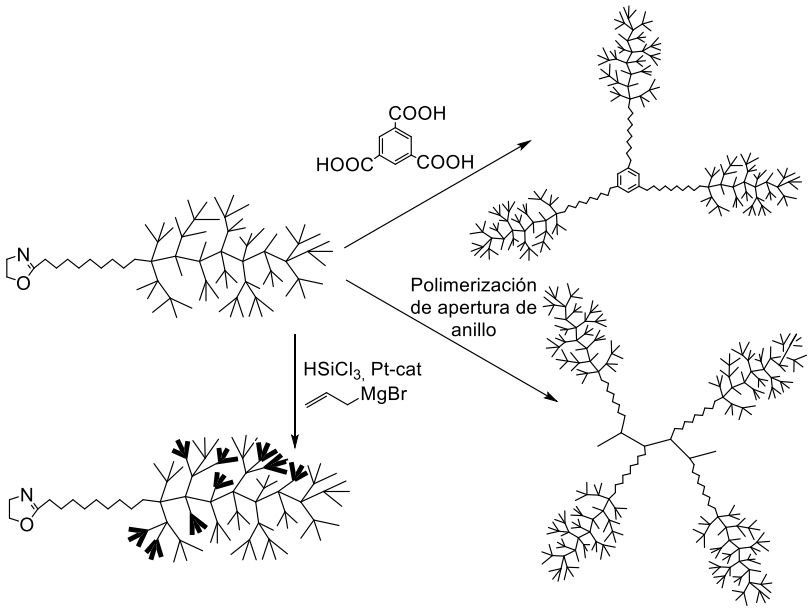
Figura 1.8. Dendrímeros carbosilano con diferentes grupos periféricos sintetizado mediante una metodología mixta

En 1998 Gossage y col. sintetizaron una unidad carbosilano versátil que puede ser utilizada como bloque de construcción de dendrímeros. Ésta nueva estructura sirve como punto de iniciación para el crecimiento de estructuras dendríticas por el método divergente (Esq. 1.6a), así como también, para ser utilizada como punto de anclaje en la síntesis convergente de dichos sistemas (Esq. 1.6b). Dendrones carbosilano con núcleo poliéster de primera a tercera generación fueron sintetizados utilizando dicha unidad.[78,79]



Esquema 1.6. Síntesis de dendrones por métodos (a) convergente y (b) divergente a partir de la misma unidad carbosilano

Otro tipo de compuestos también sintetizados utilizando dendrones carbosilano fueron los polímeros dendronizados, comentados anteriormente. Lach y col. sintetizaron un dendrón de tipo carbosilano polimérico que poseía un núcleo de oxazolina. Este macromonómero fue utilizado para la obtención de nuevas estructuras carbosilano, por medio de diferentes procedimientos sintéticos, tales como, acoplamiento con un núcleo (ácido 1, 3, 5-bencenotricarboxílico), polimerización de apertura de anillo del grupo oxazolina, copolimerización con 2-fenil-1,3-oxazolina[80] y modificación química de los grupos vinilo.[81,82] (Esq. 1.7).



Esquema 1.7. Representación de síntesis de macromoléculas preparadas a partir del dendrón polimérico con oxazolina en el punto focal

Estrategias de funcionalización

La superficie de las estructuras dendríticas de naturaleza carbosilano ha sido funcionalizada por diferentes estrategias sintéticas, como hidrosililación,[83] alcohólisis,[21] reacciones click azida-alquino[84] y click tiol-eno.[76] Siendo esta última, la vía sintética que ha sido utilizada en este trabajo.

Reacciones tipo click

El concepto de reacciones "*click"* fue introducido por Sharpless[85] para hacer referencia a un grupo de reacciones de amplio alcance, relativamente sencillas, las cuales utilizan como productos de partida reactivos fácilmente disponibles y cuya purificación suele ser simple o innecesaria ya que la conversión es cuantitativa o casi cuantitativa. Este tipo de reacciones poseen alta regioselectividad, alto rendimiento, fácil iniciación y suelen realizarse con poco o ningún disolvente, pudiendo ser consideradas ambientalmente benignas.

Los ejemplos más comunes de *"Química click"* corresponden a reacciones en las cuales se forma un enlace C-heteroátomo, dentro de las cuales se incluyen las siguientes transformaciones químicas: reacciones de cicloadición de especies insaturadas (cicloadiciones 1-3 dipolares como las azida-alquino catalizadas por cobre, Diels-Alder), reacciones de sustitución nucleofílica (apertura de anillos de ciclos tensionados tales como epóxidos), reacciones de carbonilos no aldólicas (formación de ureas, tioureas, heterociclos aromáticos, éteres de oxima, hidrazonas y amidas) y reacciones de adición a enlaces múltiples C-C (epoxidación, dihidroxilación y adiciones tipo Michael como las tiol-eno/ino).

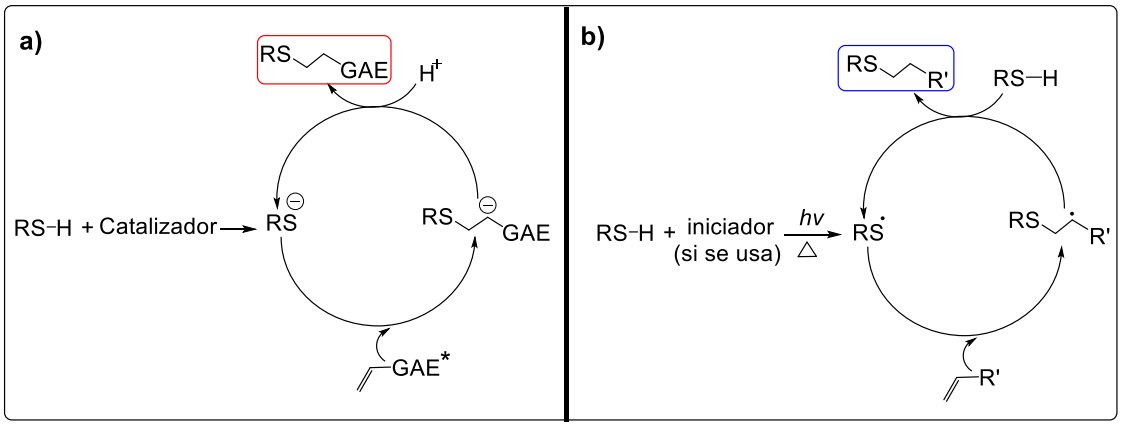
Reacción de adición click tiol-eno

La química tiol-eno tiene una larga historia que comienza con los estudios realizados por Posner en 1905 donde observó la adición de tioles a olefinas.[86] Desde entonces, estas reacciones han sido ampliamente estudiadas. Kharasch y col. jugaron un papel importante en esta investigación, desarrollando un proceso de elucidación para su mecanismo de reacción.[87] No obstante, el interés por este tipo de reacciones ha aumentado significativamente en los últimos años debido a que poseen características que la colocan dentro de las denominadas reacciones tipo *click*.

En la reacción tiol-eno/tiol-ino, un enlace S-H reacciona con un doble o triple enlace C-C.[88,89] Una de las grandes ventajas que ofrece este tipo de química es que diferentes sistemas pueden ser sintetizados incluyendo estructuras poliméricas y dendrímeros.[90-93] Existen una gran cantidad de tioles comerciales que pueden ser utilizados para la obtención de compuestos con múltiples funcionalidades. Además, estas reacciones evitan el uso de catalizadores de metales potencialmente tóxicos tan comúnmente utilizados en otras reacciones de tipo "click".[94,95]

Las reacciones tiol-eno pueden realizarse en condiciones variadas, ya sea por generación de radicales,[91] por medio de reacciones catalizadas por agentes nucleófilos,[96,97] sin el uso de agentes catalíticos en disolventes muy polares (agua, DMF, DMSO),[98] donde se produce la disociación del tiol de manera espontánea generándose de este modo el tiolato, o incluso por medio de reacciones de catálisis supramolecular.[99] La reactividad puede variar significativamente dependiendo de cómo sean los sustituyentes en el enlace C-C, y la fortaleza en el enlace S-H. Sin embargo, un gran número de tioles con múltiples funcionalidades han sido empleados.[100,101] En las reacciones tiol-eno pueden participar la gran mayoría de grupos funcionales alquenos.[90]

Dependiendo de las condiciones de reacción y de los reactivos utilizados, las reacciones tiol-eno pueden tener lugar tanto por mecanismo iónico como por un mecanismo de radical libre (Esq. 1.8). Ambos mecanismos están influenciados por la estructura básica del tiolato.

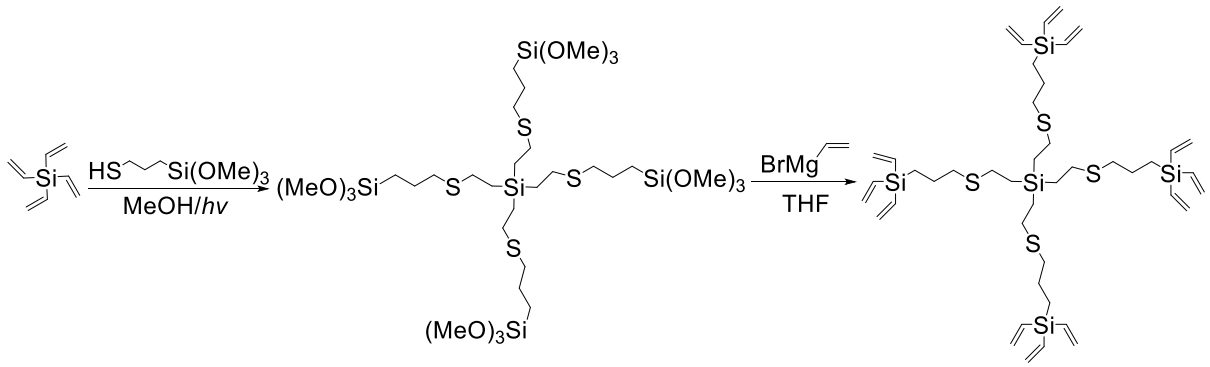


Esquema 1. 8. Representación esquemática de mecanismos de reacción a) Adición tiol-eno tipo Michael, b) Acoplamiento tiol-eno tipo radical libre. *GAE: grupos aceptores de electrones: éster, amida, ciano

Schlaad y col. fueron los primeros en modificar un polímero utilizando una reacción de tipo click tiol-eno, en el cual un esqueleto polimérico bien definido se hizo reaccionar con varios tioles.[102] Un estudio posterior fue realizado por Stenzel y col., en el que glicopolímeros eran enlazados a tioles por medio de una combinación de reacciones de polimerización ARFT (Siglas en inglés RAFT Reversible Adition-Fragmentation chain-Transfer) y reacciones click tiol-eno.[103]

Glicopolímeros también han sido obtenidos por medio de la reacción de tioles con varios grupos funcionales.[104,105] Del mismo modo, dicha reacción se ha utilizado para la modificación de estructuras de polioxazolinas y polibutadieno[106] y para la construcción de glicodendrones.[107] Este tipo de reacción también se ha utilizado para la síntesis de compuestos dendríticos, utilizándose tanto para la construcción del esqueleto dendrítico, como en la introducción de grupos funcionales terminales, demostrándose así la eficiencia de este tipo de reacciones.

En el caso concreto de dendrímeros carbosilano, el grupo de Son ha seguido esta metodología para sintetizar este tipo de derivados.[89] Este grupo también ha sintetizado dendrímeros carbosilano utilizando la reacción tiol-eno, no solo para la funcionalización de los grupos periféricos sino también durante el crecimiento de la estructura dendrítica (Esq. 1.9).[88]



Esquema 1. 9 Síntesis de dendrímeros carbosilano con átomos de azufre en su esqueleto

Otro ejemplo de dendrímeros carbosilano son los sistemas sintetizados en nuestro grupo de investigación, los cuales por medio de su funcionalización vía click tiol-eno se le introdujeron grupos iónicos en la periferia permitiendo su solubilidad en agua (Fig. 1.9).[76,77]

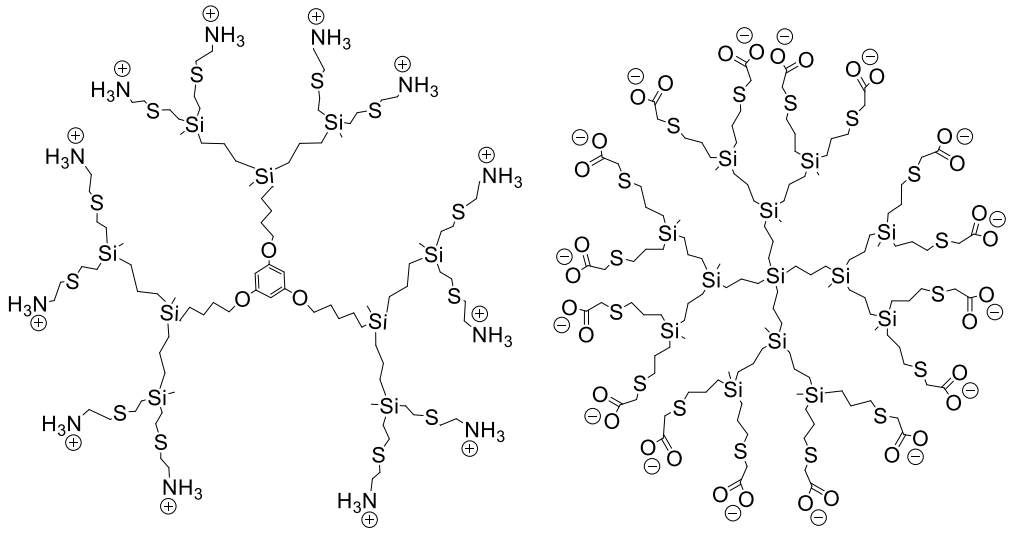


Figura 1.9. Dendrímeros carbosilano funcionalizados vía click tiol-eno

Mecanismo de radical libre

Este tipo de reacciones procede de la misma manera que las reacciones típicas por radicales: generación de radicales libres, iniciación, propagación, transferencia de cadena y terminación. La labilidad del enlace S-H en el tiol es lo que permite su ruptura, pudiendo ésta ser promovida tanto directamente, por fotólisis o termólisis, como indirectamente, por medio de la generación por calentamiento o luz de radicales alquilos nucleófilos que se generan con el uso de agentes iniciadores. Esta reacción es exotérmica y está favorecida por la formación de un enlace fuerte C-S (~370 kJ·mol^{-1}) a partir del enlace π débil del grupo "eno" (~264 kJ·mol^{-1}).[108,109]

Una vez producida la ruptura homolítica inicial del enlace S-H en la etapa de iniciación, el hidrogeno se transfiere a uno de los radicales libres generados inicialmente. Los radicales tiilo resultantes (RS$^{\bullet}$) que son muy electrófilos, se adicionan al doble enlace C-C (etapa de propagación) dando lugar a la formación de un intermedio radical β-tioéter y seguido por la transferencia de la cadena a un segundo grupo tiol (etapa 2 de propagación), dando como producto final el compuesto tiol-eno en orientación anti-Markovnikov. En este mecanismo, el radical RS$^{\bullet}$ se regenera, lo que permite que la reacción continúe de manera cíclica (Esq. 1.8b).

La velocidad de reacción está influenciada directamente por la estructura química del tiol y de la olefina (interna, terminal, conjugada, no-conjugada y sustituyentes), uniéndose los radicales tiilo más rápidamente a los dobles enlaces ricos en electrones (terminales y mono sustituidos) que a los que son electrónicamente deficientes (por ejemplo los acrilatos).[91,94]

1.1.1d. Aplicaciones

El alto nivel de control de la estructura dendrítica, su forma, su alta ramificación, su densidad y su superficie funcional convierte a los sistemas dendríticos en candidatos ideales en campos tan variados como nanotecnología,[13] catálisis,[48] biomedicina,[110] entre otros. La estructura química que poseen los dendrímeros les permite ofrecer dos ambientes químicos claramente diferenciados, su interior y la superficie.[111] Por ejemplo, en el caso de dendrímeros con un interior hidrófobo funcionalizados en la periferia con grupos hidrófilos, se puede conseguir dotar a estos derivados de solubilidad en agua facilitando por tanto su solubilidad en este medio debido a la periferia hidrófila.[21,112-114]

En nuestro grupo de investigación se han obtenidos sistemas dendríticos de naturaleza carbosilano con potenciales características para su uso como transportadores de fármacos con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad o bien lograr la liberación controlada de los mismos,[115] en terapia génica para transportar ADN y ARN al interior de la célula,[112,116] como agentes antivirales frente al VIH,[77,117] así como también como agentes antibacterianos, convirtiéndolos en sistemas de gran potencial cuyo estudio aún necesita ser explorado.[76,118]

1.2. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

1.2.1. Presentación

Dendrímeros de naturaleza carbosilano funcionalizados en su periferia con grupos catiónicos y aniónicos han sido sintetizados en nuestro grupo de investigación. Dentro de estos, los dendrímeros carbosilano catiónicos han mostrado utilidad como agentes de transfección de ácidos nucleicos, como agentes terapéuticos con actividad antibacteriana o anticancerígenos.[84,112,116,119] Por otro lado, los derivados aniónicos han presentado una gran actividad como agentes antivirales. [120,121]

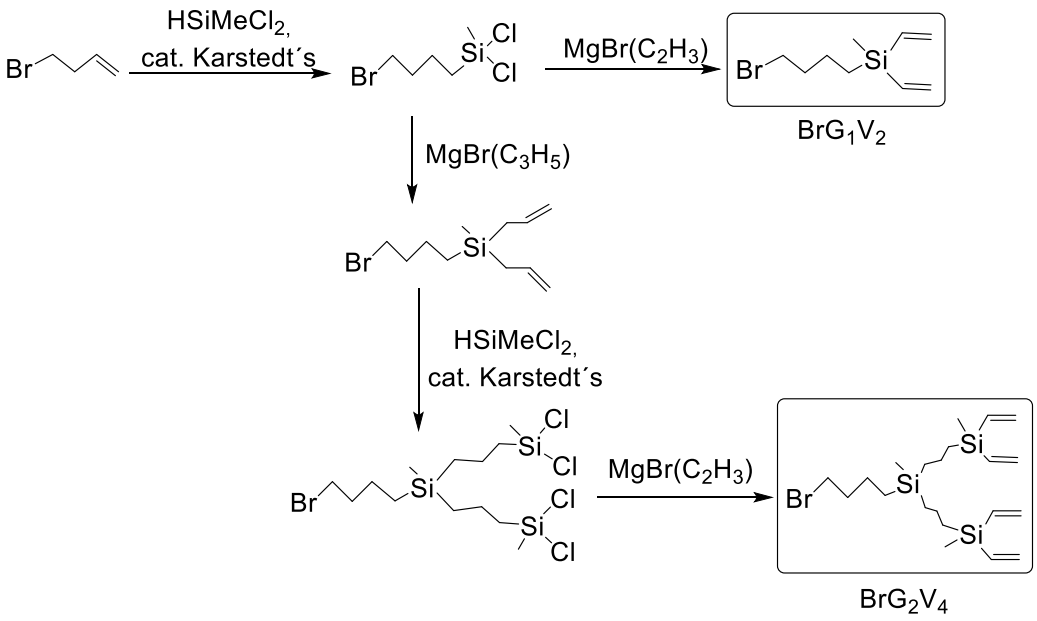
En este *Capítulo*, siguiendo nuestra línea de investigación, se describe la síntesis de dendrones de naturaleza carbosilano bifuncionalizados, con grupos catiónicos o aniónicos en la periferia y con un grupo tiol (-SH) en el punto focal. Para ello, se han preparado, primeramente, dendrones que poseen un grupo tiol protegido (MeCOS-) en el punto focal y grupos vinilo en la periferia que han permitido introducir grupos funcionales catiónicos o aniónicos, por medio de una reacción de adición tiol-eno (*click tiol-eno)* en la superficie dendrítica. Posteriormente, la desprotección del grupo MeCOS- ha posibilitado la obtención de dendrones iónicos con un grupo HS- en el punto focal. Los sistemas obtenidos serán utilizados posteriormente para la dendronización de nanopartículas metálicas (*Capítulo II*).

1.2.2. Objetivos

- Sintetizar y caracterizar dendrones carbosilano con un grupo -SH en el punto focal y grupos catiónicos en la periferia, introducidos por medio de una reacción de adición click tiol-eno de tioles con grupos catiónicos.
- Sintetizar y caracterizar dendrones carbosilano con grupo -SH en el punto focal y grupos aniónicos en la periferia, introducidos por medio de una reacción de adición click tiol-eno de tioles con grupos aniónicos o que contienen precursores de grupos aniónicos cuyo posterior tratamiento permite obtener los derivados aniónicos.

1.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRONES CARBOSILANO CON UN GRUPO -SH EN EL PUNTO FOCAL

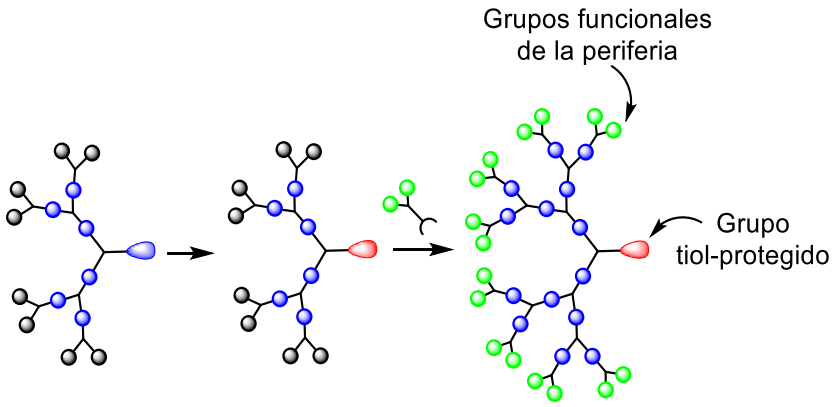
Para alcanzar nuestro objetivo, hemos utilizado dendrones carbosilano previamente sintetizados en nuestro grupo de investigación que poseen un enlace Br-C en el punto focal y grupos vinilos en la periferia. Estos grupos periféricos serán utilizados para la introducción de grupos funcionales catiónicos y aniónicos. La síntesis de estos dendrones se lleva a cabo por medio de una secuencia de reacciones de hidrosililación y alquenilación utilizando 4-bromo-1-buteno como producto de partida (Esq. 1.10).[75,122].



Esquema 1.10. Síntesis de dendrones carbosilano BrG_nV_m con grupos vinilo terminales

Debido a la reactividad que presentan los derivados tiol, ha sido necesario introducir en el punto focal un precursor del grupo tiol para evitar la interacción de éste grupos con los grupos vinilo presentes en la estructura. No obstante, el uso de muchos grupos protectores está limitado y depende básicamente de la compatibilidad de los procesos de introducción y desprotección con el resto de grupos funcionales.[123,124]

La presencia del enlace Br-C hace posible la introducción del grupo MeCOS- (tioacetato), precursor del grupo tiol deseado, el cual no interacciona con los grupos vinilo presentes, ni interfiere en la reacción tiol-eno que se utiliza para la funcionalización de la periferia con grupos iónicos y cuya posterior reacción de desprotección es compatible con los grupos funcionales periféricos introducidos (Esq. 1.11).



Esquema 1.11. Representación esquemática de síntesis de dendrones bifuncionalizados

Para nombrar los dendrones sintetizados en este trabajo, utilizaremos la nomenclatura abreviada XG_nY_m, la cual se detalla a continuación:

- **X =** grupo funcional presente en el punto focal.
- **G_n** = generación dendrítica, donde **n** está determinada por el número de capas de átomos de silicio.
- **Y_m** = grupos funcionales periféricos, donde **Y** representa la naturaleza química del grupo y **m** el número de grupos funcionales presentes.

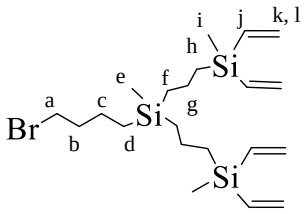
1.3.1. Técnicas de caracterización utilizadas

Para la caracterización de los compuestos obtenidos en este primer *Capítulo* se ha utilizado principalmente resonancia magnética nuclear (RMN de ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$, $\{^{1}H\text{-}^{29}Si\}$, $\{^{1}H\text{-}^{15}N\}$, 1D, 2D). Los espectros bidimensionales se realizaron en los dendrones de primera generación, extrapolando posteriormente las asignaciones realizadas a los dendrones de generaciones superiores. Otras técnicas analíticas también utilizadas fueron el análisis elemental y la espectrometría de masas (MS). En algunos casos las técnicas espectroscópicas de ultravioleta-visible (UV-Vis) o de infrarrojo (IR) fueron utilizadas para determinar la presencia de señales de grupos funcionales detectables por dichas técnicas. En el *Capítulo IV* se encuentran descritos tanto el procedimiento sintético como los datos completos de caracterización para todos los dendrones carbosilano obtenidos.

Los compuestos aquí sintetizados poseen el mismo tipo de estructura interna, por lo cual el desplazamiento químico en RMN de las señales correspondientes a estos átomos será prácticamente el mismo, con la única diferencia de un ensanchamiento de las señales al aumentar la generación, lo que provoca un solapamiento de las señales más cercanas. Es por esto que en la discusión de los resultados para la caracterización por RMN solo se comentarán las señales correspondientes a la periferia, a excepción de los dendrones precursores en cuyo caso también se describe la señal correspondiente al grupo metileno más cercano al punto focal.

Para posteriores comparaciones con respecto al esqueleto dendrítico, las señales obtenidas por RMN de ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$, $\{^{1}H\text{-}^{29}Si\}$ correspondientes al dendrón BrG_2V_4 de segunda generación se encuentran asignadas en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Señales de RMN ($CDCl_3$) del compuesto BrG_2V_4



	ASIGNACIÓN	ppm
RMN ^{1}H	-SiC*H*$_3$ (**e**)	-0.09
	-SiC*H*$_3$ (**i**)	0.11
	BrCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$S- (**d**)	0.44
	-SiC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si- (**f**)	0.55
	-SiCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si- (**h**)	0.69
	-SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si- (**g**)	1.32
	BrCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$S- (**c**)	
	BrCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$S- (**b**)	1.85
	BrC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$S- (**a**)	3.38
	-SiC*H*C*H*$_2$(**k, l**)	5.68, 6.08
RMN $^{13}C\{^{1}H\}$	-Si*C*H$_3$ (**e, i**)	-5.2, -5.1
	BrCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$S- (**d**)	12.9
	-Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si- (**f**)	18.3-18.7
	BrCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$S- (**c**)	22.3
	Br*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$S- (**a**)	33.6
	BrCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$S- (**b**)	36.4
	-SiCH*C*H$_2$(**l**)	132.6
	-Si*C*HCH$_2$(**l**)	137.1
RMN $\{^{1}H\text{-}^{29}Si\}$	-*Si*CH$_3$	1.9
	-*Si*CHCH$_2$	-13.5

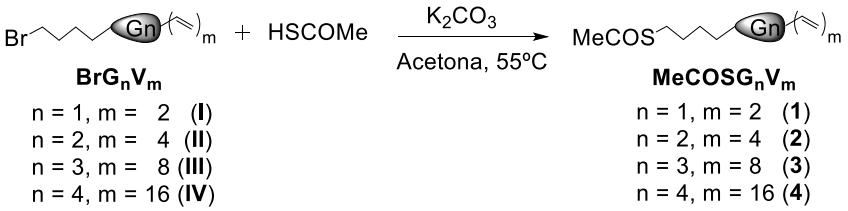
1.3.2. Dendrones $MeCOSG_nV_m$

Para la síntesis de los dendrones de interés, hemos partido de derivados de primera a cuarta generación que presentan un enlace C-Br en el punto focal y grupos vinilo en la periferia (BrG_nV_m), sintetizados previamente en nuestro grupo de investigación.[122] Los grupos funcionales de la periferia se introducen por medio de reacciones tipo *click tiol-eno*, y por lo tanto, como se ha explicado anteriormente, se debe evitar la presencia del sustituyente tiol en el punto focal ya que éste puede interferir en este proceso. Además, debido a la reactividad de las funciones amino y carboxilato frente a los enlaces C-Br, es necesario preparar primero dendrones carbosilano con un grupo precursor de funciones tiol en el punto focal. También, es necesaria la desprotección de dicho grupo justo en el momento

de su uso, debido a que los tioles son relativamente inestables, pudiendo oxidarse a los correspondientes disulfuros.[125]

El grupo protector elegido en nuestro caso es el tioacetato (MeCOS-). La introducción de este grupo se realiza en condiciones suaves. Además, este grupo es compatible con las reacciones de funcionalización de los grupos periféricos y su posterior desprotección puede realizarse tanto en condiciones básicas (NaOH, KOH, K_2CO_3, EtONa, MeONa/MeOH, EtOH, butanol, etc.) como en condiciones ácidas (HCl/MeOH).

El enlace Br-C en el punto focal de los dendrones aquí utilizados permite introducir el grupo protector tioacetato (MeCOS-) por medio de una reacción de sustitución nucleofílica. Los dendrones BrG_nV_m (n = 1, m = 2 (**I**); n = 2, m = 4 (**II**); n = 3, m = 8 (**III**); n = 4, m = 16 (**IV**)) se hacen reaccionar con HSCOMe y K_2CO_3 en acetona a 55ºC (Esq. 1.12). Su posterior purificación por medio de una extracción éter/agua permite obtener los compuestos deseados $MeCOSG_nV_m$ (n = 1, m = 2 (**1**); n = 2, m = 4 (**2**); n = 3, m = 8 (**3**); n = 4, m = 16 (**4**)) como aceites anaranjados con altos rendimientos. Todos los compuestos así obtenidos son solubles en disolventes orgánicos (alcanos, éteres, halogenados, aromáticos) (Fig. 1.10).



Esquema 1.12. Síntesis de dendrones carbosilano con un grupo MeCOS- en el punto focal

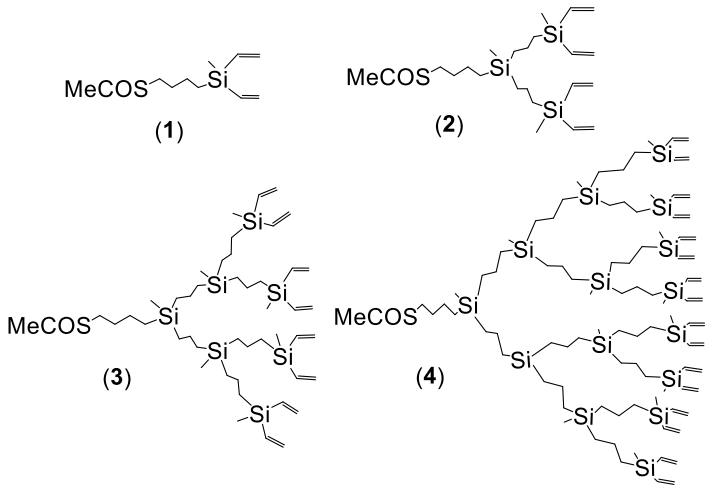


Figura 1.10. Estructuras de dendrones $MeCOSG_nV_m$ (**1**-**4**)

En la Tabla 1.2 se recogen los datos obtenidos por RMN de ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$ y $\{^{1}H\text{-}^{29}Si\}$ para los derivados **1-4**.

Tabla 1.2. Señales de RMN ($CDCl_3$) de los compuestos **1-4**

	ASIGNACIÓN	**ppm**			
		(**1**)	(**2**)	(**3**)	(**4**)
RMN ^{1}H	-SiC*H*$_3$	0.11	-0.11, 0.11	-0.11, 0.11	-0.11, 0.11
	-SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si-	0.62	0.42	0.50	0.52
	-SiC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si-	-	0.47		
	-SiCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si-	-	0.56	0.68	0.69
	-SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si-	1.37	1.31	1.29	1.31
	-SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si-	-			
	-SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si-	1.57	1.55		
	C*H*$_3$COS-	2.29	2.30	2.29	2.29
	-SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si-	2.83	2.80	2.84	2.85
	-SiC*H*CH$_2$	5.67, 6.01	5.65, 6.13	5.67, 6.02	5.69, 6.08
RMN $^{13}C\{^{1}H\}$	-SiCH$_3$	-5.4	-5.2, 1.0	-5.2, -5.0, 1.9	-4.9, -5.1, -1.0
	-SCH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si-	13.5	13.5	13.5	13.5
	-SiCH$_2$CH$_2$CH$_2$Si-	-	18.3, 18.5, 18.7	18.3, 18.4, 18.5, 18.7, 18.8, 18.9	18.3, 18.4, 18.5, 18.7, 18.8, 19.0
	-SCH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si-	23.0	23.2	23.3	23.3
	-SCH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si-	8.7	28.8	28.8	28.8
	CH$_3$COS-	30.6	30.7	30.7	30.7
	-SCH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si-	33.0	33.3	33.3	33.3
	-SiCHCH$_2$	132.9	132.9	132.8	132.6
	-SiCHCH$_2$	136.7	137.2	137.1	137.2
	CH$_3$COS-	196.0	196.0	195.9	195.9
RMN $\{^{1}H\text{-}^{29}Si\}$	-SiCH$_3$	-13.0	-13.6, 1.6	-13.2, 1.7	-13.5, 0.9, 1.1, 1.7

En el espectro de RMN de ^{1}H, el cambio del grupo Br- del punto focal por el grupo MeCOS- ocasiona una variación significativa en el desplazamiento de los protones del grupo metileno (-C*H*$_2$-) unido directamente a la nueva función introducida, desplazando su señal que aparecía en torno a 3.40 ppm hasta 2.83 ppm. Además, aparece una nueva señal en torno a 2.30 ppm correspondiente al grupo metilo del nuevo grupo introducido (Fig. 1.11).

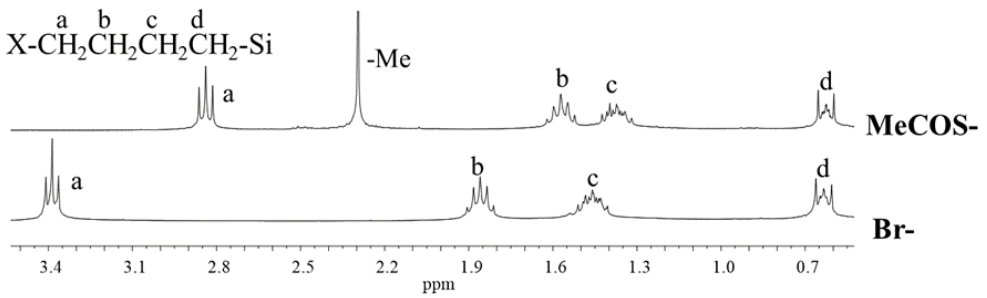


Figura 1.11. Espectros de RMN de ^{1}H en $CDCl_3$ de dendrones de primera generación con grupos MeCOS- y Br- en el punto focal

Por otro lado, en el espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ se observa un comportamiento similar para el átomo de carbono del grupo -*C*H_2-X, desplazándose desde 36.2 ppm hasta 28.7 ppm. Igualmente, se observan dos nuevas señales correspondientes al nuevo grupo introducido, una debida al grupo metilo en torno a 30.6 ppm y otra debida al grupo carbonilo en torno a 199.0 ppm (Fig. 1.12).

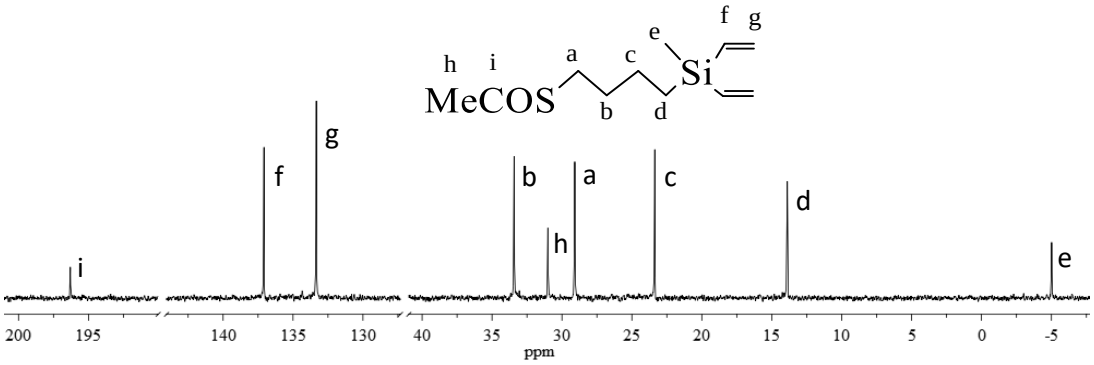


Figura 1. 12. Espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ en $CDCl_3$ del compuesto **1**

En el espectro HMBC $\{^{1}H\text{-}^{29}Si\}$ cabe destacar la presencia de una señal correspondiente a los átomos de silicio de la periferia en torno a -13.0 ppm lo que indica que en esta reacción los grupos vinilo periféricos no se ven afectados.

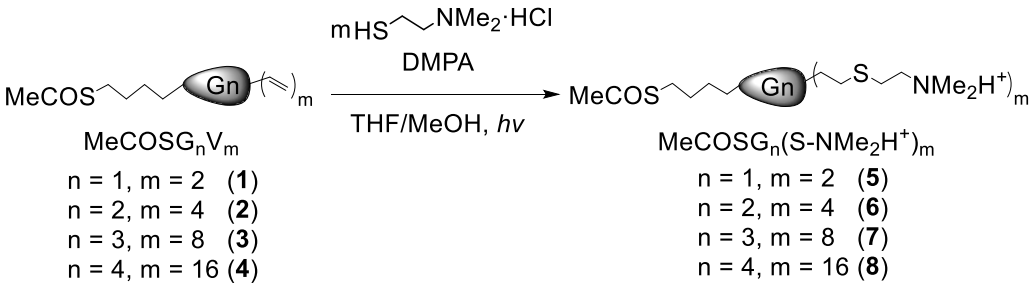
Una vez obtenidos los dendrones con punto focal MeCOS- y grupos vinilo en la periferia, se ha llevado a cabo la funcionalización de la superficie de los mismos mediante la introducción de grupos catiónicos (-NMe_2H^+, -NMe_3^+) y aniónicos (-CO_2^-, -SO_3^-) o de sus respectivos precursores. Para ello, se han utilizado reacciones de adición de tipo *click tiol-eno*, ya que como se ha mencionado previamente, esta metodología resulta ideal para la síntesis de estos dendrones.

1.3.3. Dendrones catiónicos

El objetivo de este apartado es obtener dendrones catiónicos con grupos amonio -NMe_2H^+ y -NMe_3^+. Para su obtención partimos del derivado tiol comercial hidrocloruro de 2-(dimetilamino) etanotiol ($HS(CH_2)_2NMe_2 \cdot HCl$).

1.3.3a. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}NMe_2 \cdot HCl)_m$

El primer paso en la síntesis de dendrones con grupo -SH en el punto focal y grupos catiónicos en la periferia, es la introducción de los grupos catiónicos a los dendrones con grupos vinilo previamente sintetizados, $MeCOSG_nV_m$ (**1-4**). Para ello, se preparó una disolución en una mezcla de disolventes THF/MeOH de los dendrones $MeCOSG_nV_m$ (**1-4**), y se les adicionó gradualmente (50% cada 2 horas) el derivado tiol $HS(CH_2)_2NMe_2 \cdot HCl$ y 2, 2-dimetoxi-2-fenilacetofenona (DMPA) que actúa como fotoiniciador. La mezcla de reacción se desoxigenó y se dejó reaccionar bajo luz ultravioleta ($\lambda = 350$ nm) y con agitación constante durante 4 horas. (Esq. 1.13).



Esquema 1.13. Síntesis de dendrones catiónicos (**5-8**)

La posterior purificación por nanofiltración de los crudos de reacción da como resultado la formación de los compuestos deseados $MeCOSG_n(S\text{-}NMe_2H^+)_m$ (n = 1, m = 2 (**5**); n = 2, m = 4 (**6**); n = 3, m = 8 (**7**); n = 4, m = 16 (**8**)), como sólidos amarillos higroscópicos y solubles en agua, que se obtuvieron con rendimientos moderados (Fig. 1.13).

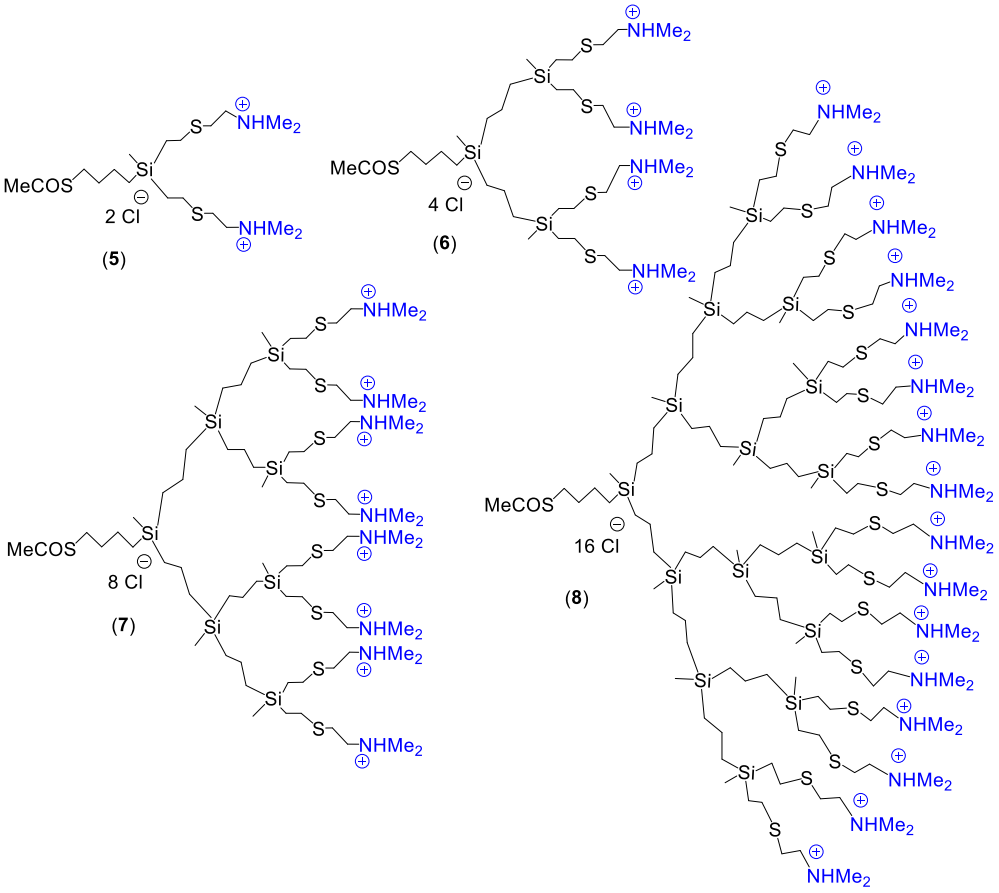
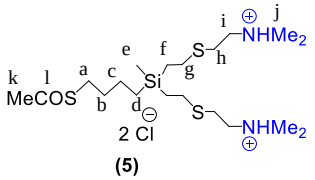


Figura 1.13. Estructuras propuestas para compuestos **5-8**

La obtención de los nuevos derivados (**5-8**) se verificó por RMN de ^{1}H y $^{13}C\{^{1}H\}$ donde se observan los cambios ocasionados debido a la nueva cadena formada y los nuevos grupos introducidos (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Selección de señales de RMN de **^{1}H** y $^{13}C\{^{1}H\}$ en D_2O de los compuestos **5-8**



	ASIGNACIÓN	ppm			
		(5)	(6)	(7)	(8)
RMN ^{1}H	-SiC*H*$_2$CH$_2$S- (**f**)	0.87	0.89	0.88	0.87
	-SiCH$_2$C*H*$_2$S- (**g**)	2.62	2.65	2.64	2.61
	-SC*H*$_2$CH$_2$N- (**h**)	2.85	2.84	2.86	2.82
	-NC*H*$_3$ (**j**)	2.85	2.84	2.86	2.74
	-SCH$_2$C*H*$_2$N- (**i**)	3.33	3.30	3.32	3.17
RMN $^{13}C\{^{1}H\}$	-SiC*H*$_2$CH$_2$S- (**f**)	14.0	14.2	14.4	14.3
	-SC*H*$_2$CH$_2$N- (**h**)	25.4	25.5	25.5	25.9
	-SiCH$_2$C*H*$_2$S- (**g**)	26.9	27.1	27.2	27.1
	-NC*H*$_3$ (**j**)	42.8	42.8	42.8	43.0
	-SCH$_2$C*H*$_2$N- (**i**)	56.4	56.5	56.6	56.9

La espectroscopía de RMN de ^{1}H permite observar la transformación de los grupos vinilo periféricos por medio de la desaparición de sus resonancias en torno a 5-6 ppm y la aparición de dos nuevas resonancias correspondientes a los grupos metileno de la nueva cadena formada en la adición tiol-eno en torno a 0.87 ppm (-SiCH_2-) y 2.62 ppm (-CH_2S-). Además, se observó la presencia del fragmento -S$(CH_2)_2NMe_2H^+$ por las señales encontradas en torno a 2.85 ppm (-SCH_2CH$_2$N-, -NCH_3), 3.33 ppm (-SCH$_2$CH_2N-) y 12.36 (-$NMe_2 \cdot H^+$) ppm respectivamente (Fig. 1.14).

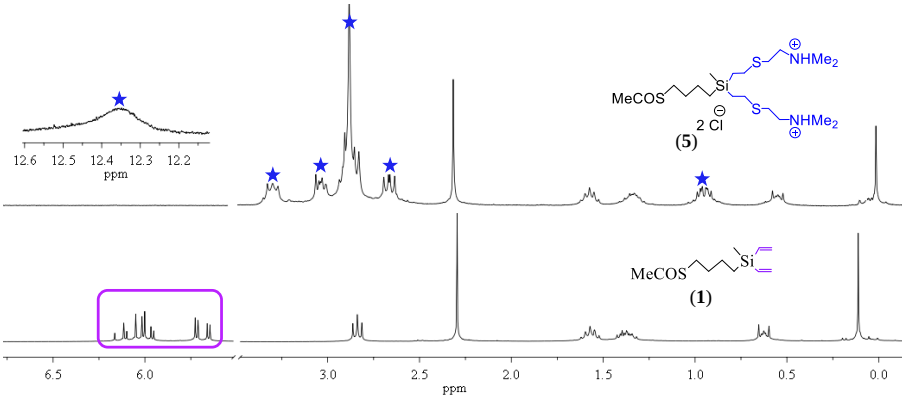


Figura 1.14. Espectros de RMN de ^{1}H en $CDCl_3$ de los compuestos **1** y **5**

En el espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ también se confirma la formación de los compuestos **5-8,** observándose las resonancias de la nueva cadena formada en torno a 14.0 ppm (-Si*C*H$_2$CH$_2$S-) y 26.9 ppm (-SiCH$_2$*C*H$_2$S-), y la presencia de las señales debidas al nuevo fragmento introducido -S$(CH_2)_2NMe_2H^+$ en torno a 25.4 ppm (-S*C*H$_2$CH$_2$N-), 42.8 ppm (-N*C*H$_3$) y 56.4 ppm (-SCH$_2$*C*H$_2$N-) (Fig. 1.15). La realización de espectros bidimensionales HSQC $\{^{1}H$-$^{13}C\}$ permitió asignar correctamente las señales de los grupos metileno más cercanos al átomo de nitrógeno (Fig. 1.16).

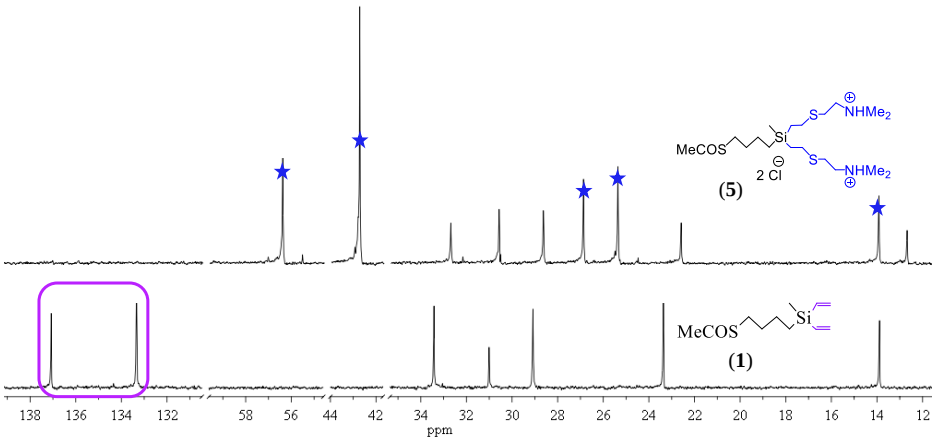


Figura 1.15. Espectros de RMN $^{13}C\{^{1}H\}$ en $CDCl_3$ de compuestos **1** y **5**

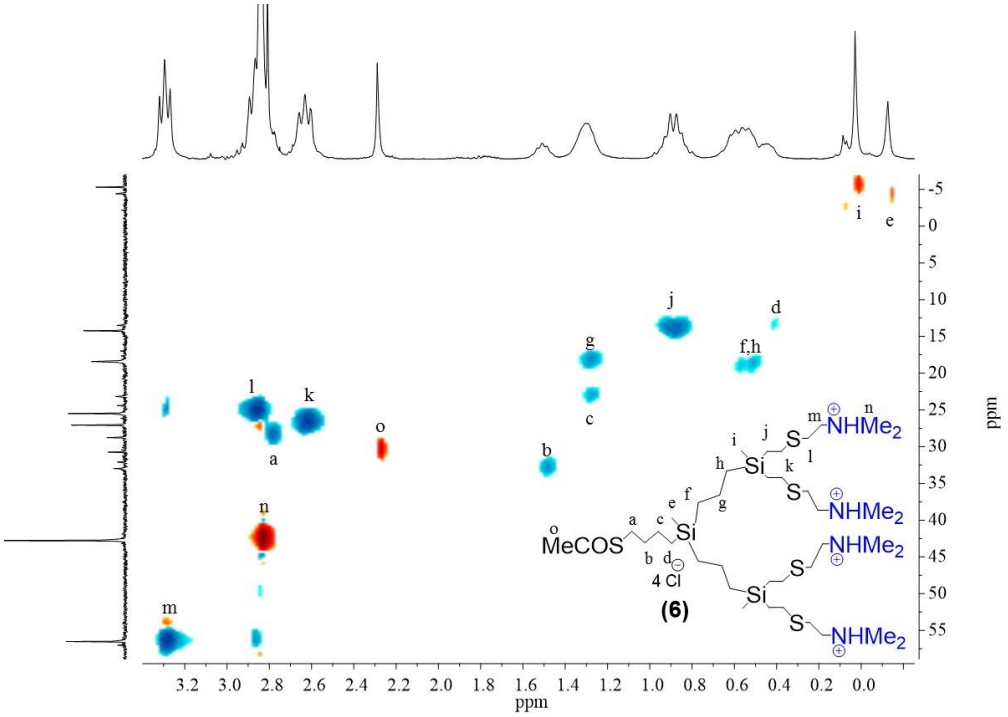
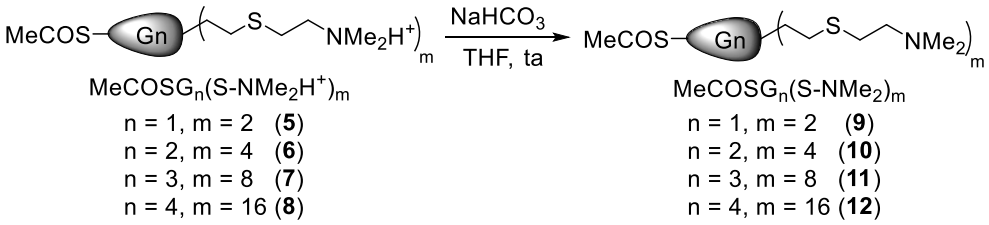


Figura 1.16. Espectro HSQC {^{1}H-^{13}C} en D_2O del compuesto **6**

Un cambio apreciable también se observó en el espectro de HMBC {^{1}H-^{29}Si}, donde la señal correspondiente a los átomos de silicio más externos se desplaza desde -13.0 ppm hasta 2.3 ppm. Además, el espectro HMBC {^{1}H-^{15}N} se puede observar la señal correspondiente al nitrógeno presente en el grupo -NMe_2H^+ en torno a 39.5 ppm.

1.3.3b. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}NMe_2)_m$

Los dendrones (**5-8**) con grupos -NMe_2H^+ periféricos previamente sintetizados fueron tratados con $NaHCO_3$ (Esq. 1.14) permitiendo obtener tras su purificación, por extracción con disolvente orgánico y agua, los dendrones neutros $MeCOSG_n(S\text{-}NMe_2)_m$ (n = 1, m = 2 (**9**); n = 2, m = 4 (**10**); n = 3, m = 8 (**11**); n = 4, m = 16) (**12**)) (Fig. 1.17). Dichos compuestos se obtuvieron como aceites viscosos solubles en disolventes orgánicos con buenos rendimientos.



$MeCOSG_n(S\text{-}NMe_2H^+)_m$
n = 1, m = 2 (**5**)
n = 2, m = 4 (**6**)
n = 3, m = 8 (**7**)
n = 4, m = 16 (**8**)

$MeCOSG_n(S\text{-}NMe_2)_m$
n = 1, m = 2 (**9**)
n = 2, m = 4 (**10**)
n = 3, m = 8 (**11**)
n = 4, m = 16 (**12**)

Esquema 1.14. Síntesis de dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}NMe_2)_m$ (**9-12**)

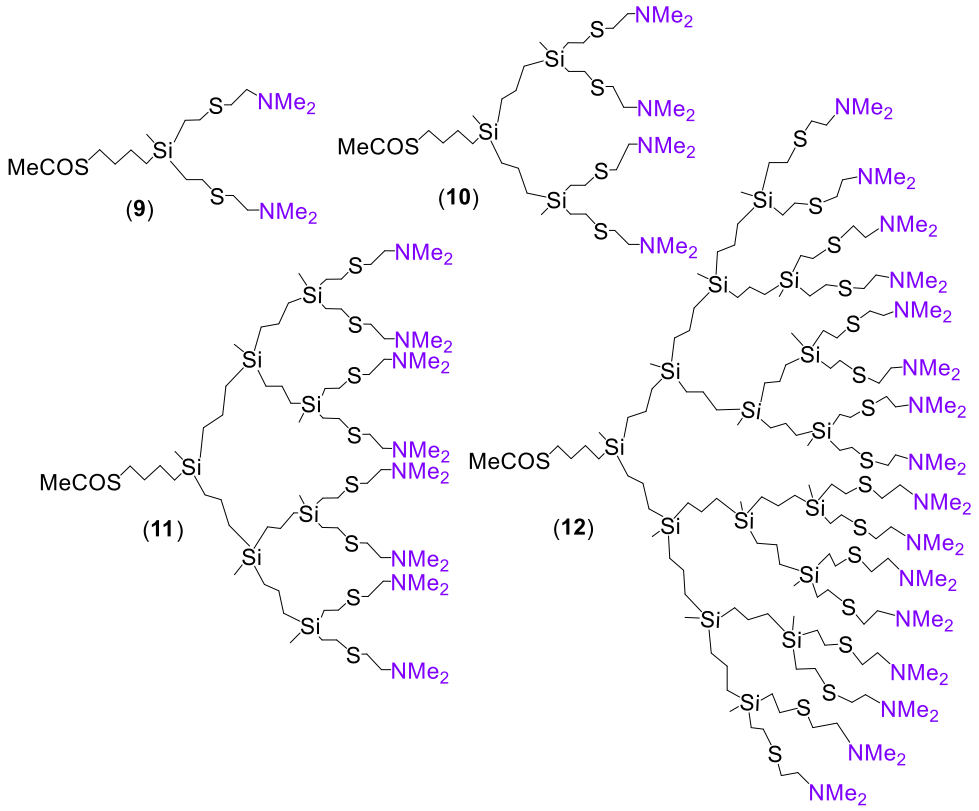


Figura 1.17. Representación estructural de los dendrones neutros (**9-12**)

La formación de estos derivados se confirmó al observar en su espectro de RMN de ^{1}H un desplazamiento a menor frecuencia de la señal correspondiente a los grupos metilo unidos al nitrógeno (-NMe_2), que se observan en torno a 2.27 ppm, como consecuencia de la desaparición de la carga positiva que había sobre el átomo de nitrógeno. El mismo comportamiento se observa para los grupos -$SiCH_2CH_2S$-, -SCH_2CH_2N- y -SCH_2CH_2N-, cuyas señales aparece ahora en torno a 2.49 ppm y 2.52 ppm respectivamente.

En el espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ se observa también, un desplazamiento de las señales correspondientes a los grupos cercanos al nitrógeno, las cuales aparecen en torno a 27.7 ppm (-$SiCH_2CH_2S$-), 29.6 ppm (-SCH_2CH_2N-), 45.2 ppm (-NCH_3) y 59.1 ppm (-SCH_2CH_2N-) respectivamente (Fig. 1.18, Tabla 1.4).

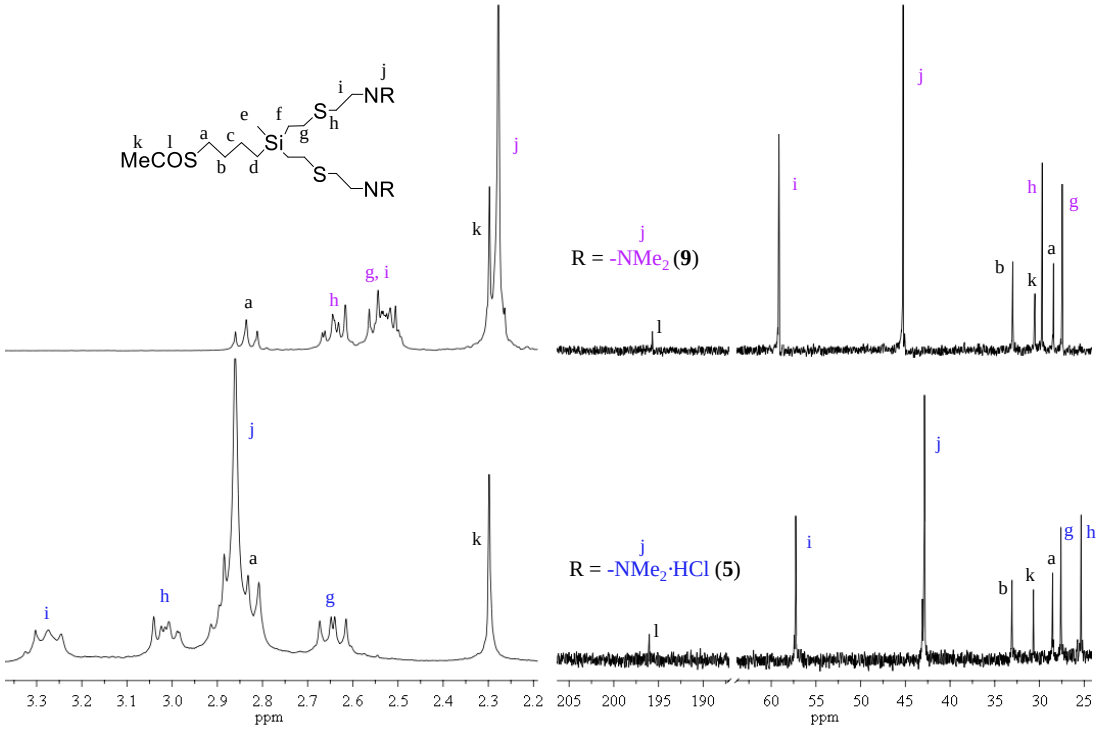
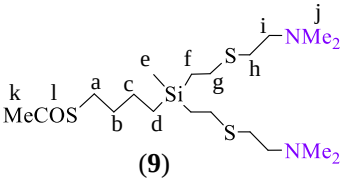


Figura 1.18. Espectros de RMN de ^{1}H (izq.) y RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ (dercha.) en $CDCl_3$ de los derivados **5** y **9**

Tabla 1.4. Selección de señales de RMN de ^{1}H, $^{13}C\{^{1}H\}$ en $CDCl_3$ de los compuestos **9**-**12**



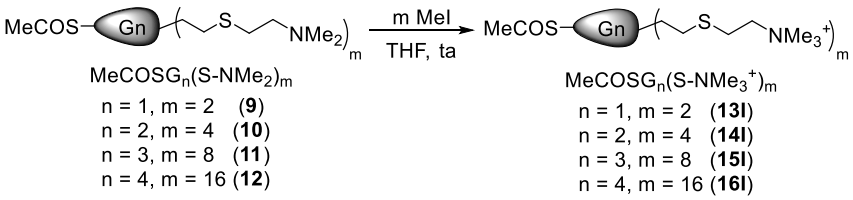
(**9**)

	ASIGNACIÓN	ppm			
		(**9**)	(**10**)	(**11**)	(**12**)
RMN ^{1}H	-SiC*H*$_2$CH$_2$S- (**f**)	0.87	0.87	0.88	0.87
	-SiCH$_2$C*H*$_2$S- (**g**)	2.49	2.57	2.56	2.53
	-SCH$_2$C*H*$_2$N- (**i**)	2.49	2.57	2.56	2.53
	-NC*H*$_3$ (**j**)	2.27	2.23	2.25	2.22
	-SC*H*$_2$CH$_2$N- (**h**)	2.52	2.67	2.56	2.53
RMN $^{13}C\{^{1}H\}$	-SiCH$_2$CH$_2$S- (**f**)	14.5	14.5	14.7	14.6
	-SiCH$_2$CH$_2$S- (**g**)	27.7	27.1	26.9	27.7
	-SCH$_2$CH$_2$N- (**h**)	29.6	29.2	29.8	29.8
	-NCH$_3$ (**j**)	45.2	44.8	45.4	45.4
	-SCH$_2$CH$_2$N- (**i**)	59.1	58.7	59.2	59.3

En estos compuestos destaca el desplazamiento a menor frecuencia de la resonancia correspondiente al átomo de nitrógeno que en los espectros de HMBC $\{^{1}H$-$^{15}N\}$ se desplaza desde 39.5 ppm hasta 27.8 ppm.

1.3.3c. Dendrones MeCOSG$_n$(S-NMe$_3$I)$_m$

Dado que uno de los objetivos es la obtención de estructuras carbosilano con grupos catiónicos en la periferia, que permitan la solubilidad de los sistemas en medio acuoso, los compuestos previamente sintetizados y que poseen grupos -NMe$_2$ fueron cuaternizados. La cuaternización con MeI nos debe permitir la obtención de derivados catiónicos, cuya carga positiva se mantenga independientemente del medio en el que se encuentren, garantizando su solubilidad en agua a cualquier pH. Esto puede ser muy importante para su uso en determinadas aplicaciones biomédicas. Para esto, a una disolución en THF de los compuestos **9-12** se les añadió MeI. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas obteniéndose las cuñas catiónicas MeCOSG$_n$(S-NMe$_3$I)$_m$ (n = 1, m = 2 (**13I**); n = 2, m = 4 (**14I**); n = 3, m = 8 (**15I**); n = 4, m = 16) (**16I**)) como sólidos de color naranja, solubles en agua y con altos rendimiento (Esq. 1.15, Fig. 1.19).



Esquema 1.15. Síntesis de dendrones (**13I-16I**)

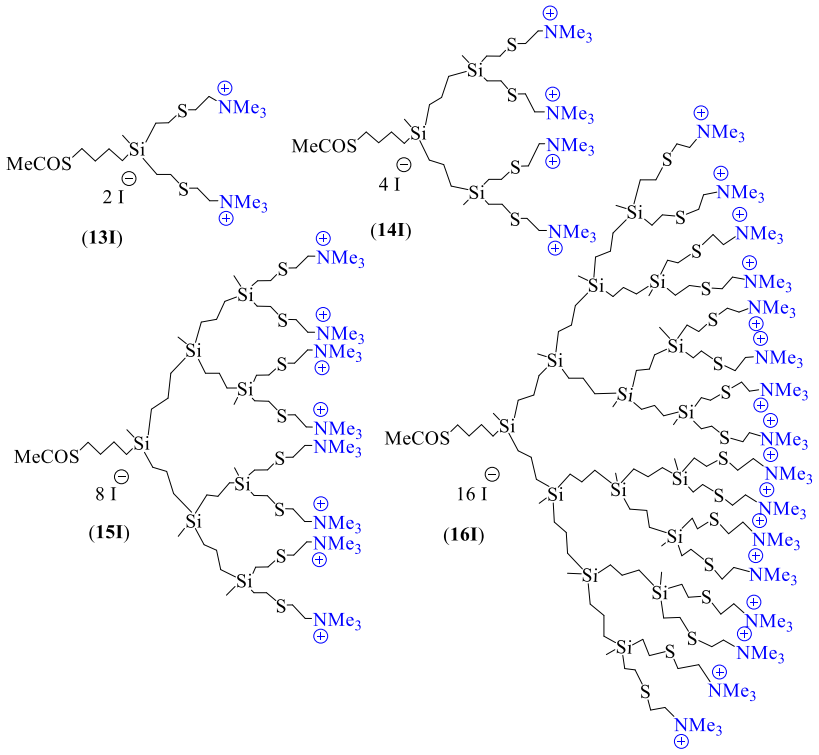


Figura 1.19. Estructuras propuestas para los compuestos **13I-16I**

El espectro de RMN de ^{1}H muestra un cambio significativo en la señal correspondiente a los grupos metilo unidos al átomo de nitrógeno (-NC*H*$_3$), los cuales aparecen en torno a 3.13 ppm, como consecuencia de la existencia nuevamente de una carga positiva sobre este átomo. Otras señales que también se ven afectadas son las correspondientes a los grupos metileno -SiCH$_2$C*H*$_2$S-, -SC*H*$_2$C*H*$_2$N- que también se desplazan a campo más bajo, apareciendo en torno a 2.69, 2.95 y 3.56 ppm respectivamente.

En el espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ la metilación del átomo de nitrógeno permite observar un cambio en las señales correspondientes a los grupos -S*C*H$_2$CH$_2$N-, -SiCH$_2$*C*H$_2$S-, -N*C*H$_3$ y -SCH$_2$*C*H$_2$N- cuyas señales aparecen en torno a 24.3, 27.8, 53.5 y 65.7 ppm respectivamente. (Fig. 1.20).

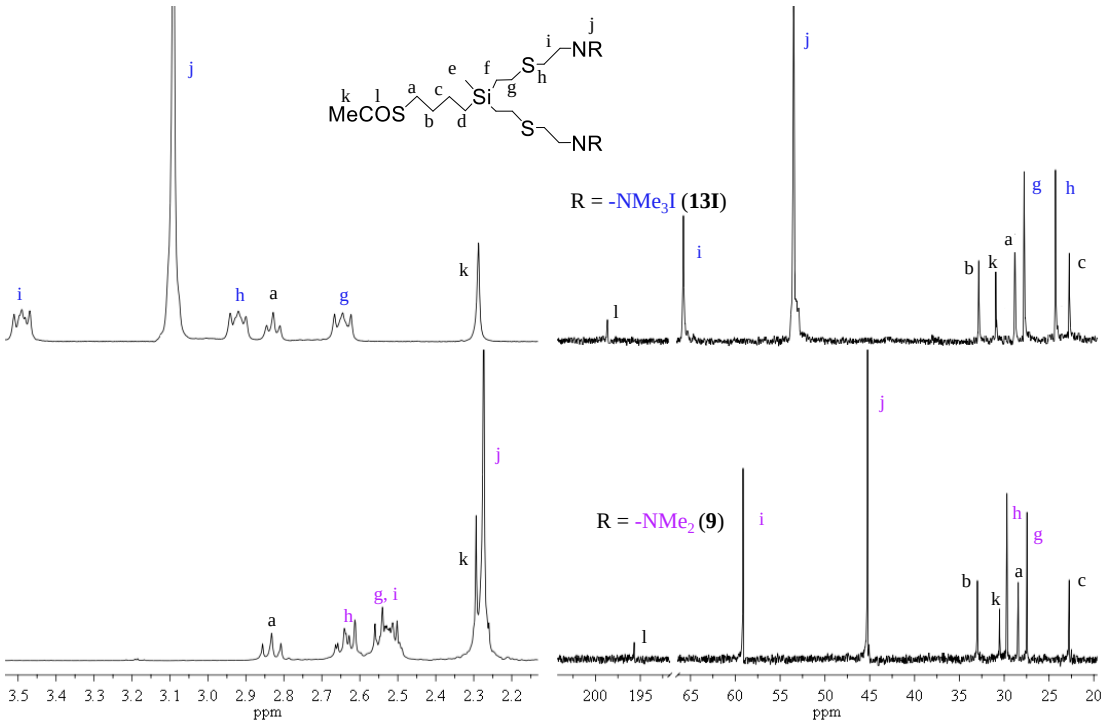
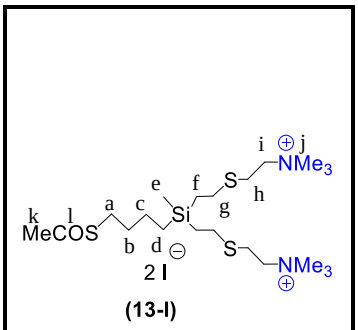


Figura 1.20. Espectros de RMN de ^{1}H (izq.) y RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ (dercha.) de **9** ($CDCl_3$) y **13I** (D_2O)

Los desplazamientos químicos obtenidos en RMN de ^{1}H y $^{13}C\{^{1}H\}$ de los compuestos **13I-16I** para las señales más importantes están recogidos en la Tabla 1.5. Finalmente, un cambio notable también pudo observarse en el espectro HMBC $\{^{1}H\text{-}^{15}N\}$, donde la señal del nitrógeno de los grupos funcionales periféricos se desplaza desde 27.8 ppm hasta 49.2 ppm.

Tabla 1.5. Selección de señales de RMN de ^{1}H, ^{13}C{^{1}H} en D_2O de los compuestos **13I-16I**



(13-I)

	ASIGNACIÓN	ppm			
		(13I)	**(14I)**	**(15I)**	**(16I)**
RMN ^{1}H	-SiC*H*$_2$CH$_2$S- (**f**)	0.89	1.01	0.97	0.96
	-SiCH$_2$C*H*$_2$S- (**g**)	2.69	2.82	2.79	2.77
	-SC*H*$_2$CH$_2$N- (**h**)	2.95	3.07	3.05	3.02
	-NC*H*$_3$ (**j**)	3.13	3.27	3.23	3.22
	-SCH$_2$C*H*$_2$N- (**i**)	3.56	3.74	3.71	3.69
RMN ^{13}C{^{1}H}	-SiC*H*$_2$CH$_2$S- (**f**)	14.5	15.1	15.0	15.3
	-SC*H*$_2$CH$_2$N- (**h**)	24.3	24.7	24.7	24.8
	-SiCH$_2$C*H*$_2$S- (**g**)	27.8	28.2	28.1	28.4
	-NC*H*$_3$ (**j**)	53.5	53.8	53.7	53.8
	-SCH$_2$C*H*$_2$N- (**i**)	65.7	65.8	65.8	65.9

1.3.3d. Dendrones MeCOSG$_n$(S-NMe$_3$Cl)$_m$

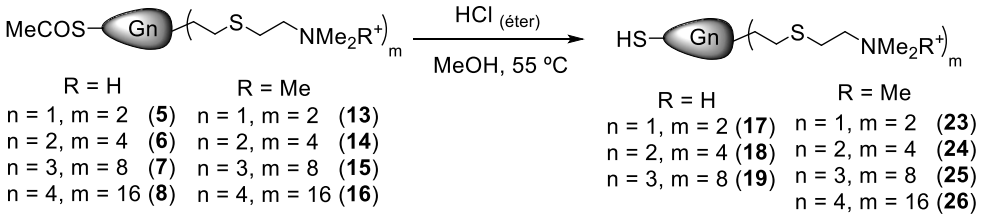
Uno de los objetivos de este trabajo es la síntesis de nanopartículas metálicas dendronizadas con nuestras cuñas carbosilano catiónicas. La presencia de aniones yoduro dificulta la preparación de estas, como se comentará en el *Capítulo II*. Por esta razón, se decidió obtener los dendrones anteriores con el anión cloruro.

Para el cambio del anión en los dendrones **13I-16I** se utilizó la resina de intercambio iónico amberlita™ (IRA-402, forma-Cl), la cual tiene la capacidad de sustituir los aniones I^- presentes en disolución por Cl^-. De este modo, el tratamiento en disolución acuosa de los compuestos MeCOSG$_n$(S-NMe$_3$I)$_m$ con amberlita™ (IRA-402, forma-Cl) durante 12 horas, da como resultado los compuestos MeCOSGn(NMe$_3$Cl)$_m$ (n = 1, m = 2 (**13Cl**); n = 2, m = 4 (**14Cl**); n = 3, m = 8 (**15Cl**); n = 4, m = 16) (**16Cl**)), los cuales poseen la misma estructura, pero con el anión cloruro en lugar del yoduro.

Como es de esperar, no se observan variaciones significativas en los espectros de RMN con respecto a los dendrones que poseen yoduro como anión. No obstante, el espectro de masas ESI-negativo muestra la ausencia de aniones I^- en el producto final.

1.3.3e. Dendrones $HSG_n(S\text{-}NMe_2R^+)_m$

Una vez formados los derivados dendríticos con grupos catiónicos periféricos y un grupo MeCOS-, se procedió a la desprotección del punto focal, es decir, a la formación del grupo -SH. Para ello, a una disolución en MeOH de las cuñas previamente sintetizadas (**5-8**, **13I/Cl-16I/Cl**), se le añadió HCl en éter. La mezcla se dejó reaccionar a 55ºC y agitación durante 12 horas (Esq. 1.16), obteniendo los derivados catiónicos $HSG_n(S\text{-}NMe_2R^+)_m$ (R' = H, n = 1, m = 2 (**17**); n = 2, m = 4 (**18**); n = 3, m = 8 (**19**); R = Me, n = 1, m = 2 (**23**); n = 2, m = 4 (**24**); n = 3, m = 8 (**25**); R = Me, n = 4, m = 16 (**26**) con buenos rendimientos. En la Figura 1.21 se representa la estructura propuesta para los dendrones catiónicos de segunda generación con punto focal -SH.



Esquema 1.16. Síntesis de dendrones con grupo -SH en el punto focal (**17-19, 23-26**)

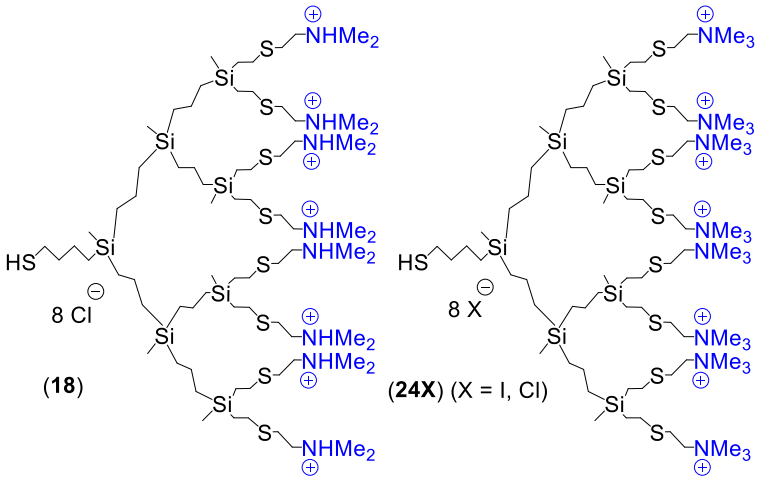


Figura 1.21. Dendrones catiónicos de segunda generación con grupo -SH en el punto focal

La desprotección del punto focal en estas reacciones puede seguirse por espectroscopía de RMN de ^1H donde puede observarse claramente, la desaparición de la señal correspondiente al grupo metilo presente en el punto focal (MeCOS-) y la aparición de la señal correspondiente al protón del grupo -SH en torno a 1.26 ppm. Además, otro cambio importante es el desplazamiento del metileno unido al átomo de azufre del punto focal, el cual se desplaza desde 2.86 ppm hasta 2.46 ppm.

Los espectros de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ confirma la formación de los derivados deseados, ya que la señal del carbono de los grupos metilo y carbonilo del punto focal (MeCOS-) no se observan, y las señales correspondientes a las unidades metileno más cercanas al punto focal (-S$CH_2CH_2CH_2CH_2$Si-) se desplazan observándose ahora en torno a 23.2 y 36.4 ppm aproximadamente (Fig. 1.22).

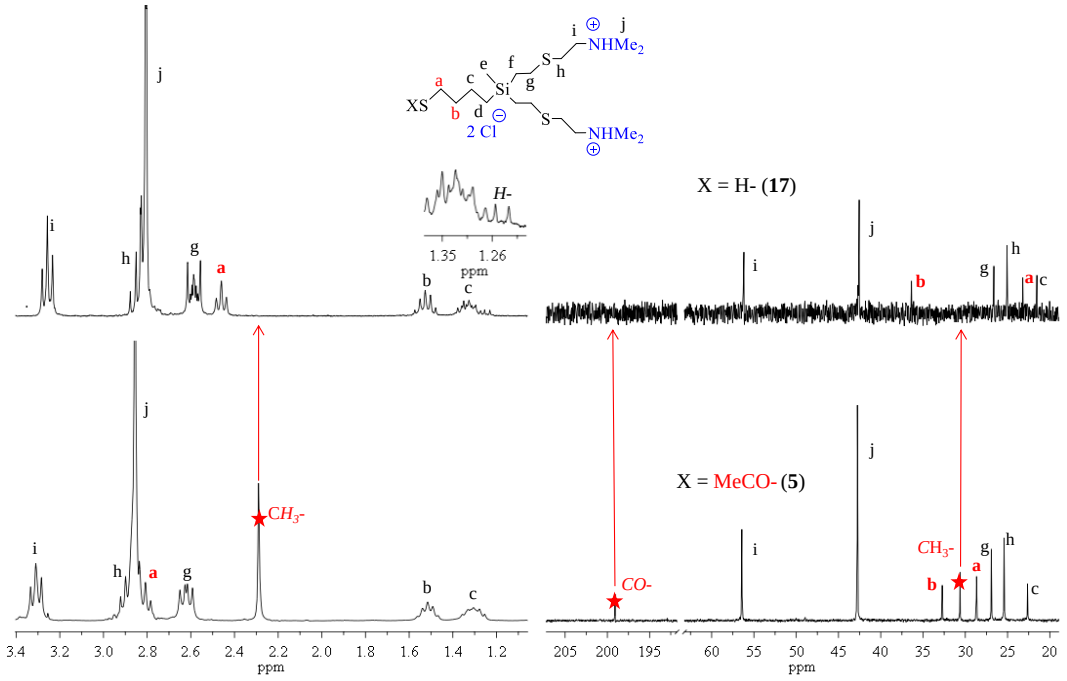
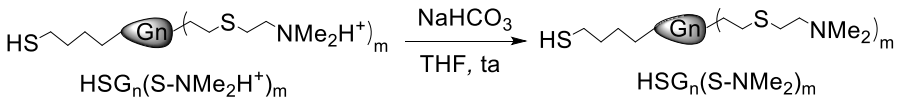


Figura 1.22. Espectros de RMN de ^1H (izq.) y RMN de $^{13}C\{^1H\}$ (dercha.) en $CDCl_3$ de los derivados **5** y **17**

El tratamiento de los compuestos catiónicos **17-19** con una base ($NaHCO_3$) permite sintetizar los dendrones neutros $HSG_n(S\text{-}NMe_2)_m$ (n = 1, m = 2 (**20**); n = 2, m = 4 (**21**); n = 3, m = 8 (**22**)) con buenos rendimientos (Fig. 1.23, Esq. 1.17).



$HSG_n(S\text{-}NMe_2H^+)_m$

n = 1, m = 2 (**17**)
n = 2, m = 4 (**18**)
n = 3, m = 8 (**19**)

$HSG_n(S\text{-}NMe_2)_m$

n = 1, m = 2 (**20**)
n = 2, m = 4 (**21**)
n = 3, m = 8 (**22**)

Esquema 1.17. Síntesis de dendrones neutros **20-22** con grupo -SH en el punto focal

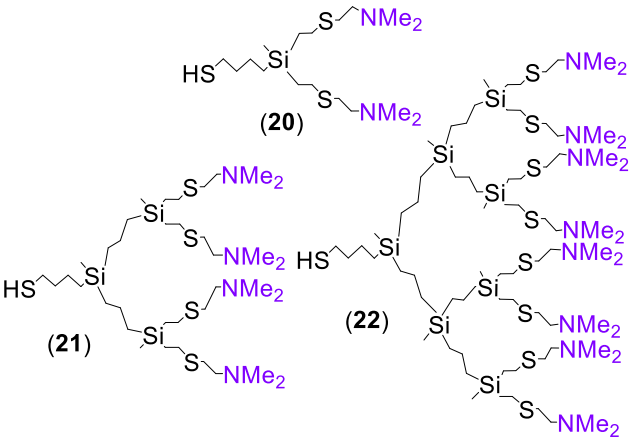


Figura 1.23. Estructuras propuestas para los compuestos **20**-**22**

En el espectro de RMN de ^{1}H puede observarse claramente la obtención de los nuevos derivados **20**-**22**, ya que se aprecia un desplazamiento a menor frecuencia de la señal correspondiente a los grupos metilo unidos al nitrógeno (-NMe_2), que ahora se observan en torno a 2.24 ppm, debido una vez más a la desaparición de la carga positiva sobre el átomo de nitrógeno. El mismo comportamiento se observa para los grupos -Si$CH_2$$CH_2$S-, -S$CH_2$$CH_2$N- y -S$CH_2$$CH_2$N- cuyas señales se observan ahora en torno a 2.59 ppm (Fig. 1.24). Es importante destacar que el grupo tiol no se ve afectado observándose la señal correspondiente al protón de este grupo en torno a 1.30 ppm.

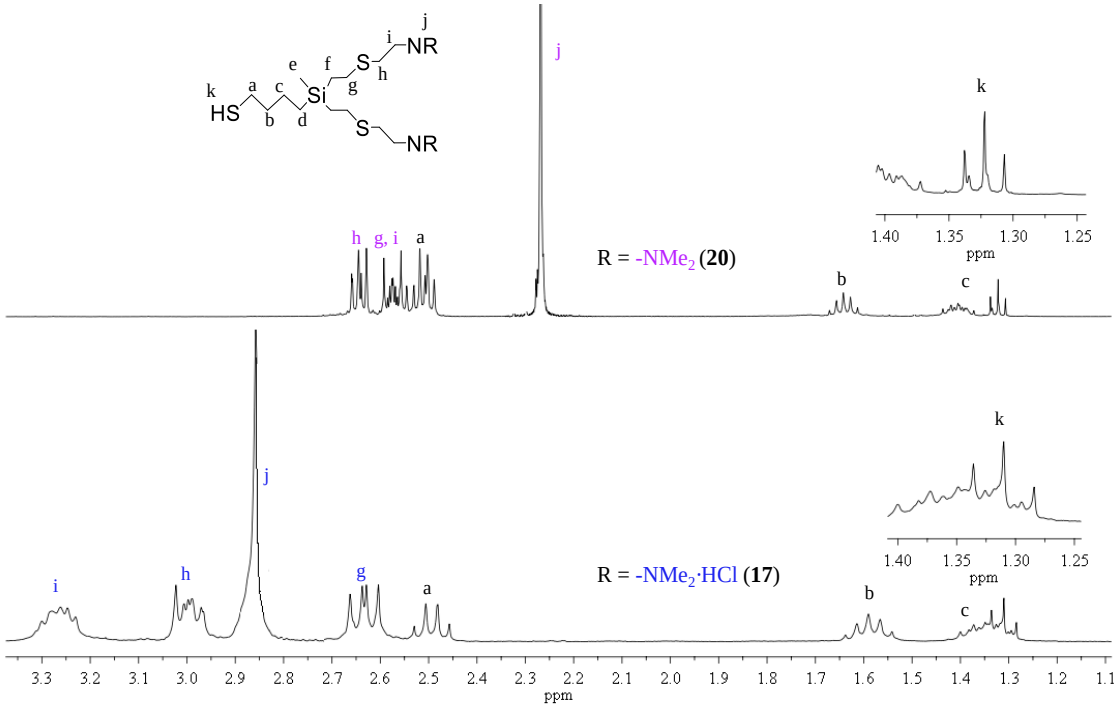


Figura 1.24. Espectros de RMN de ^{1}H ($CDCl_3$) de compuestos **17** y **20**

De igual manera, los espectros de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ de **20**-**22** presentan las resonancias correspondientes a la formación de estos dendrones, análogas a los derivados neutros **9**-**12** para las señales correspondientes a los grupos periféricos.

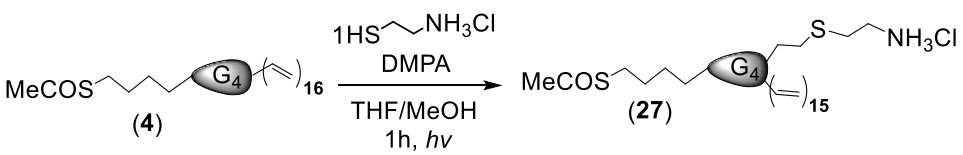
1.3.3f. Dendrones catiónicos marcados con fluoresceína

Isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un derivado de la fluoresceína utilizado frecuentemente para unirlo a diferentes moléculas obteniéndose nuevos compuestos fluorescentes. La función isotiocianato presente en esta molécula es reactiva frente a grupos nucleófilos como -NH_2 formando un enlace tiourea estable en disoluciones acuosas.

Teniendo esto en cuenta, se han sintetizado dendrones catiónicos con un grupo -SH en el punto focal y una molécula de fluoresceína en la periferia que le confiere propiedades fluorescentes. La obtención de este tipo de derivados permitiría la detección de nuestros compuestos por técnicas de fluorescencia como la microscopía de fluorescencia utilizada ampliamente en aplicaciones biomédicas.

Dendrón (MeCOS)G_4V_{15}(S-NH_3Cl)

Para la obtención de dendrones catiónicos marcados con fluoresceína y con punto focal -SH se eligió como producto de partida el compuesto **4** (MeCOSG_4V_{16}) que posee 16 grupos vinilo periféricos y un precursor de la función -SH en el punto focal. La estrategia *click tiol-eno* fue utilizada para introducir una función -NH_3^+, que se realiza de manera estadística y que permite la unión posterior de la FITC. Para ello, sobre una disolución del compuesto **4** en una mezcla de THF/MeOH se adicionó 1 equivalente del derivado tiol hidrocloruro de cisteamina ($HS(CH_2)_2NH_3Cl$) y DMPA. La mezcla de reacción en atmósfera inerte se expuso a la luz ultravioleta (λ = 350 nm) durante 1 hora (Esq. 1.18). La adición de este primer tiol conduce a la formación del derivado **27** (MeCOS)G_4V_{15}(S-NH_3Cl) (Fig. 1.25).



Esquema 1.18. Síntesis del compuesto **27**

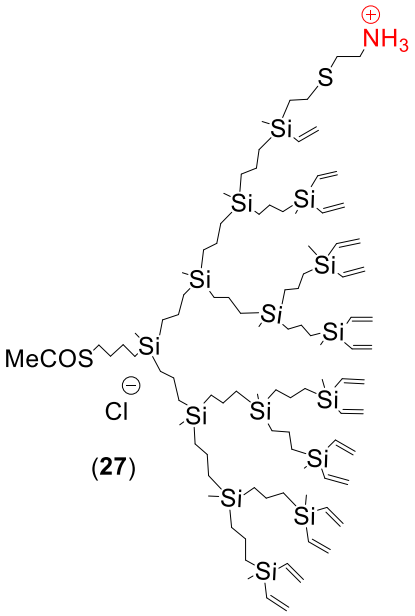


Figura 1.25. Estructura propuesta para el compuesto **27**

La introducción de un único grupo -NH_3^+ en el compuesto **27** se confirma en el espectro de RMN de ^{1}H donde se observan las señales de la nueva cadena formada en torno a 0.9 ppm (-SiC*H*$_2$-) y 2.53 ppm (-C*H*$_2$S-). Además, aparecen las resonancias correspondientes al nuevo fragmento introducido (-S(CH$_2$)$_2$NH$_3$Cl) en torno a 2.84 (-SC*H*$_2$CH$_2$N), 3.17 (-SCH$_2$C*H*$_2$N-) y 8.43 (-N*H*$_3$) ppm respectivamente (Fig. 1.26).

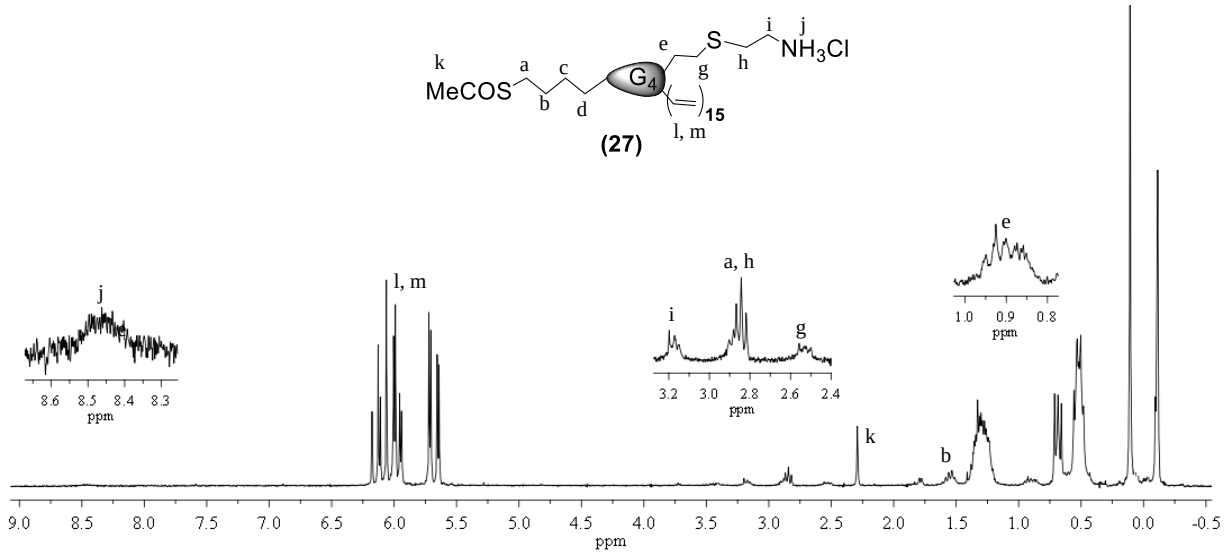
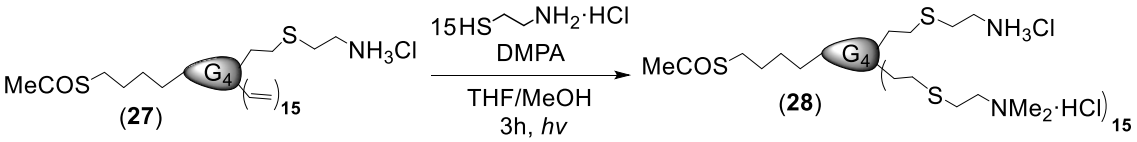


Figura 1.26. Espectro de RMN de ^{1}H en $CDCl_3$ del compuesto **27**

Dendrón (MeCOS)G_4(S-NH_3Cl)(S-NMe_2·HCl)$_{15}$

Una vez confirmada la formación del compuesto **27** y sin aislar el mismo, se procede a la adición de un segundo tiol, $HS(CH_2)_2NMe_2$·HCl, en las mismas condiciones que las utilizadas para los compuestos **5-8**, para completar la funcionalización de los 15 grupos vinilos periféricos restantes (Esq. 1.19). La posterior purificación por nanofiltración permite obtener el derivado catiónico **28** (MeCOS)G_4(S-NH_3Cl)(S-NMe_2·HCl)$_{15}$ con un rendimiento del 89% como un sólido amarillo (Fig. 1.27).



Esquema 1.19. Síntesis del derivado catiónico **28**

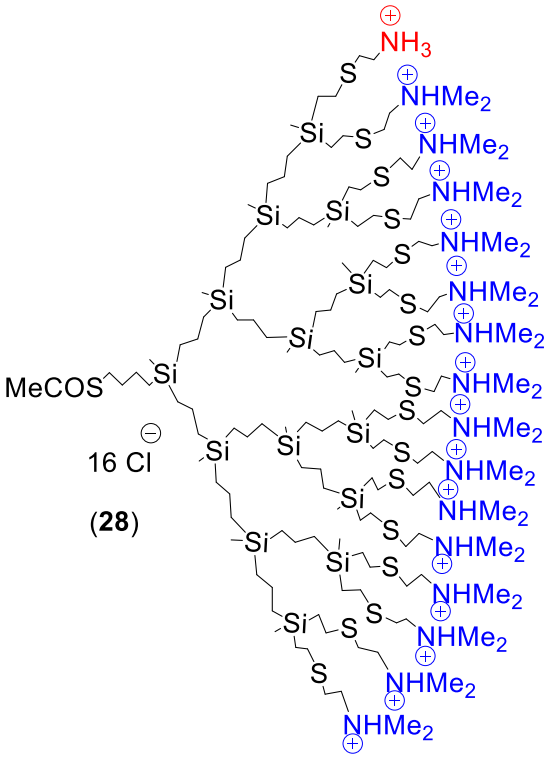
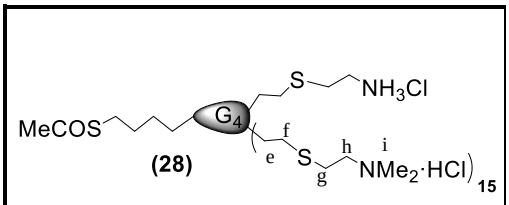


Figura 1.27. Estructuras propuestas para el compuesto **28**

La caracterización de este derivado se realizó por RMN (Tabla 1.6, Fig.1.28). La presencia de las resonancias de los nuevos grupos introducidos son análogas a las encontradas para los derivados de tipo MeCOSG_n(S-NMe_2·HCl)$_m$ comentadas en el apartado 1.3.3a.

Tabla 1.6. Selección de señales de RMN de ^{1}H y $^{13}C\{^{1}H\}$ en D_2O del compuesto **28**



ASIGNACIÓN	ppm	
	^{1}H	^{13}C
-Si*CH*$_2$CH$_2$S- (**e**)	0.85	14.4
-SiCH$_2$*CH*$_2$S- (**f**)	2.60	27.1
-S*CH*$_2$CH$_2$N- (**g**)	2.81	25.9
-SCH$_2$*CH*$_2$N- (**h**)	3.15	56.9
-NCH$_3$ (**i**)	2.73	43.6

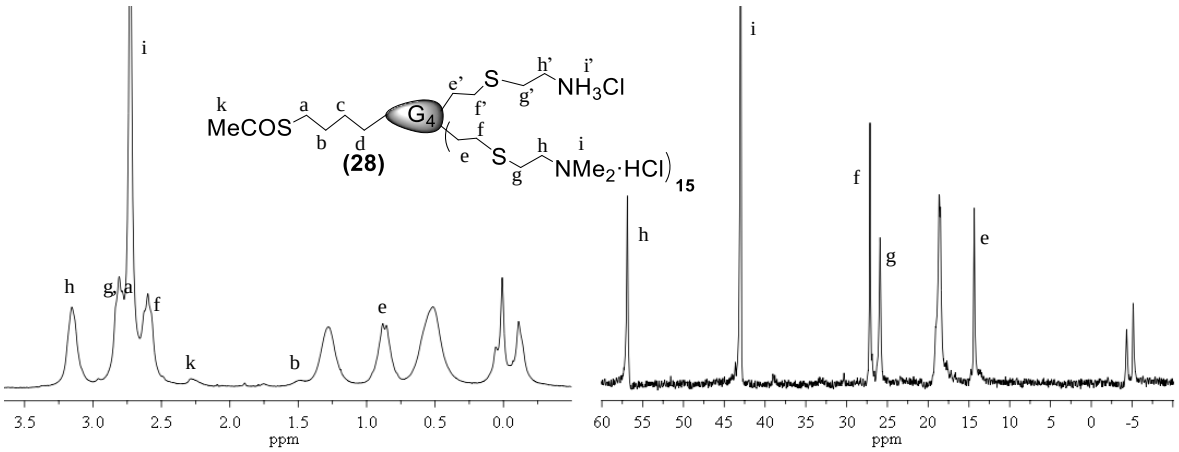
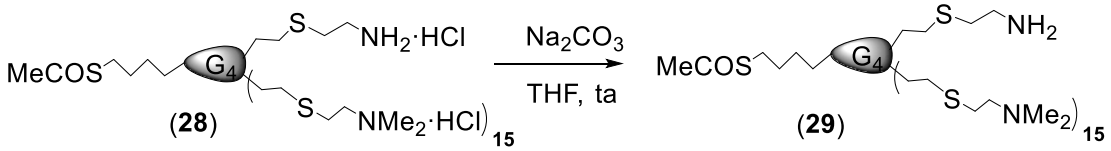


Figura 1.28. Espectro de RMN de ^{1}H (izq.) y RMN de ^{13}C (dercha.) en D_2O del compuesto **28**

Dendrón (MeCOS)G$_4$(S-NH$_2$)(S-NMe$_2$)$_{15}$

Una vez obtenido el derivado catiónico **28** y teniendo en cuenta la necesidad de obtener un grupo -NH$_2$ que nos permitirá la introducción del grupo fluoróforo, procedimos al tratamiento de esté con una base, lo que permite la obtención del compuesto **29** (MeCOS)G$_4$(S-NH$_2$)(S-NMe$_2$)$_{15}$ como un aceite soluble en disolventes orgánicos y con un rendimiento de 63% (Esq. 1.20, Fig. 1.29).



Esquema 1.20. Esquema de síntesis del compuesto **29**

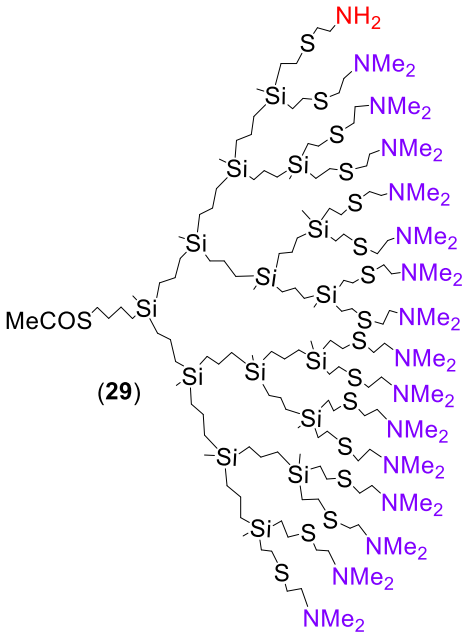
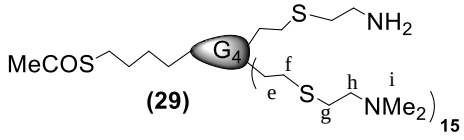


Figura 1.29. Estructura propuesta para el dendrón neutro **29**

El espectro de RMN de ^{1}H confirma la formación del derivado **29** observándose un desplazamiento de las señales similar al observado en los compuestos análogos **9**-**12** para los grupos metilo unidos directamente al nitrógeno (-NMe_2), así como también para las correspondientes a los grupos metileno cercanos a este (-SiCH_2CH_2S-, -SCH_2CH_2N- y -SCH_2CH_2N-) (Tabla 1.7, Fig. 1.30). Otra observación importante es la señal correspondiente a la unidad metileno adyacente al grupo -NH_2, la cual se observa ahora en torno a 2.84 ppm.

Por otro lado, en el espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ puede observarse un desplazamiento hacia campo más bajo de las señales correspondientes a los grupos metileno más cercanos al nitrógeno. Del mismo modo las señales correspondientes a los grupos metilo unidos al nitrógeno también se ven desplazados debido a la desaparición de la carga positiva sobre el átomo de nitrógeno (Tabla 1.7, Fig. 1.30).

Tabla 1.7. Señales de RMN de ^{1}H y $^{13}C\{^{1}H\}$ en D_2O del compuesto **29**



ASIGNACIÓN	ppm	
	^{1}H	^{13}C
-Si$CH_2$$CH_2$S- (**e**)	0.88	14.8
-Si$CH_2$$CH_2$S- (**f**)	2.51	27.8
-S$CH_2$$CH_2$N- (**g**)	2.51	29.9
-S$CH_2$$CH_2$N- (**h**)	2.51	59.4
-NCH_3 (**i**)	2.25	45.5

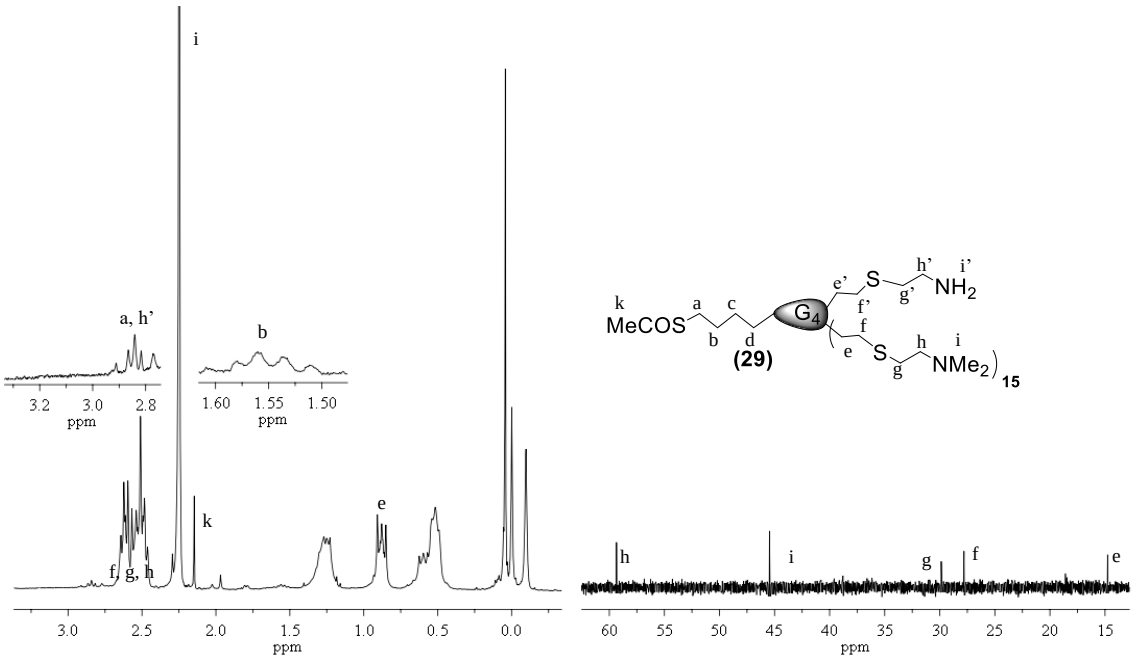


Figura 1.30. Espectro de RMN de ^{1}H (izq.) y RMN de ^{13}C (dercha.) en $CDCl_3$ del dendrón **29**

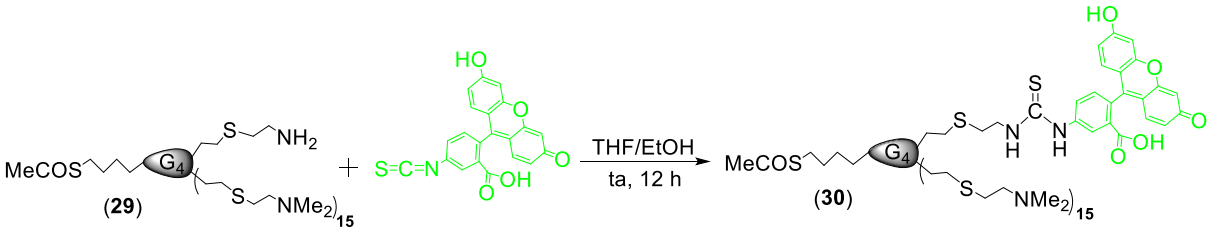
Un cambio apreciable se observa en el espectro HMBC {^{1}H-^{15}N}, donde la señal correspondiente al nitrógeno del grupo -NMe_2 aparece ahora en torno a 27.8 ppm. Desafortunadamente, no pudo observarse la resonancia del otro grupo amino, -NH_2.

La presencia del grupo -NH_2 es esencial para la posterior introducción del grupo FITC. Para verificar la presencia de este grupo se realizó el *test de Kaiser*, que es una técnica colorimétrica sencilla y útil para determinar la presencia de aminas primarias. En esta prueba, se utiliza ninhidrina (2,2-dihidroxi indano-1,3-diona) que en presencia de aminas primarias produce un color azul intenso.[126,127] La prueba se realizó sobre una muestra del crudo de reacción observándose una coloración azul, indicando así la presencia del grupo -NH_2 deseado.

Dendrón (MeCOS)G_4(S-NHFITC)(S-NMe_2)$_{15}$

Para la obtención del dendrón con un grupo fluoróforo partimos del derivado **29**. La adición nucleófila del grupo amino presente en dicho derivado sobre el grupo isotiocianato de FITC, permite la introducción del grupo fluoróforo deseado. Para esto, a una disolución del compuesto **29** en una mezcla de THF/EtOH y en un matraz de color topacio se le añadió FITC en exceso (10%). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Al igual que en la reacción del derivado **29**, se realizó un test de Kaiser al crudo de

reacción. En este caso, no se observó la coloración azul característica en presencia de aminas primarias, por lo cual, se puede afirmar que no hay presencia de grupos -NH_2 y que la reacción ha terminado. Tras la evaporación de los disolventes y la eliminación por filtración de los residuos no solubles en THF, el compuesto (MeCOS)G_4(NHFITC)(S-NMe_2)$_{15}$ se obtuvo como un líquido aceitoso de color anaranjado (Esq. 1.21, Fig. 1.31).



Esquema 1.21. Esquema sintético para la obtención del derivado **30**

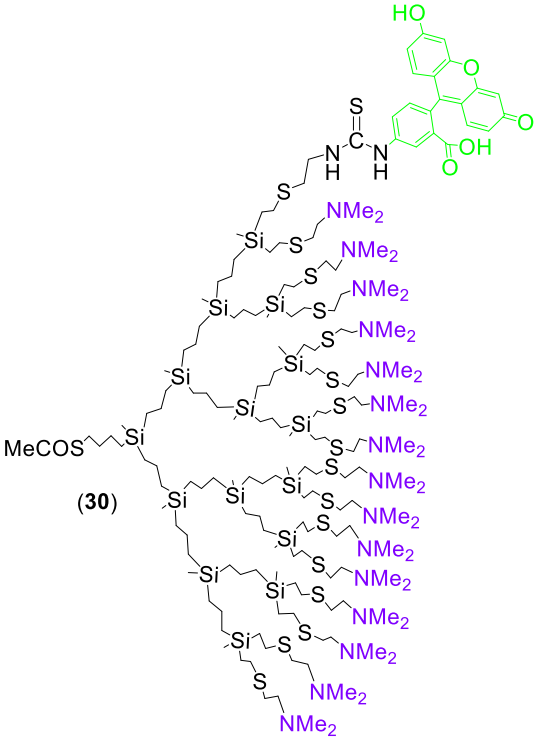


Figura 1.31. Estructura propuesta para el compuesto **30**

Para confirmar la formación del compuesto **30** se realizó un experimento de RMN DOSY-2D que nos permitió corroborar que la fluoresceína se encontraba unida al dendrón, pues solo se observa un coeficiente de difusión para todas las señales. El espectro de RMN de ^{1}H permite verificar la presencia de las señales correspondientes a los anillos del grupo fluoróforo en torno a 5.5-6.5 ppm. Un cambio apreciable también es observado en el desplazamiento de la señal correspondiente al grupo metileno adyacente al grupo -NH_2, la cual aparece ahora en torno a 3.44 ppm (Fig. 1.32).

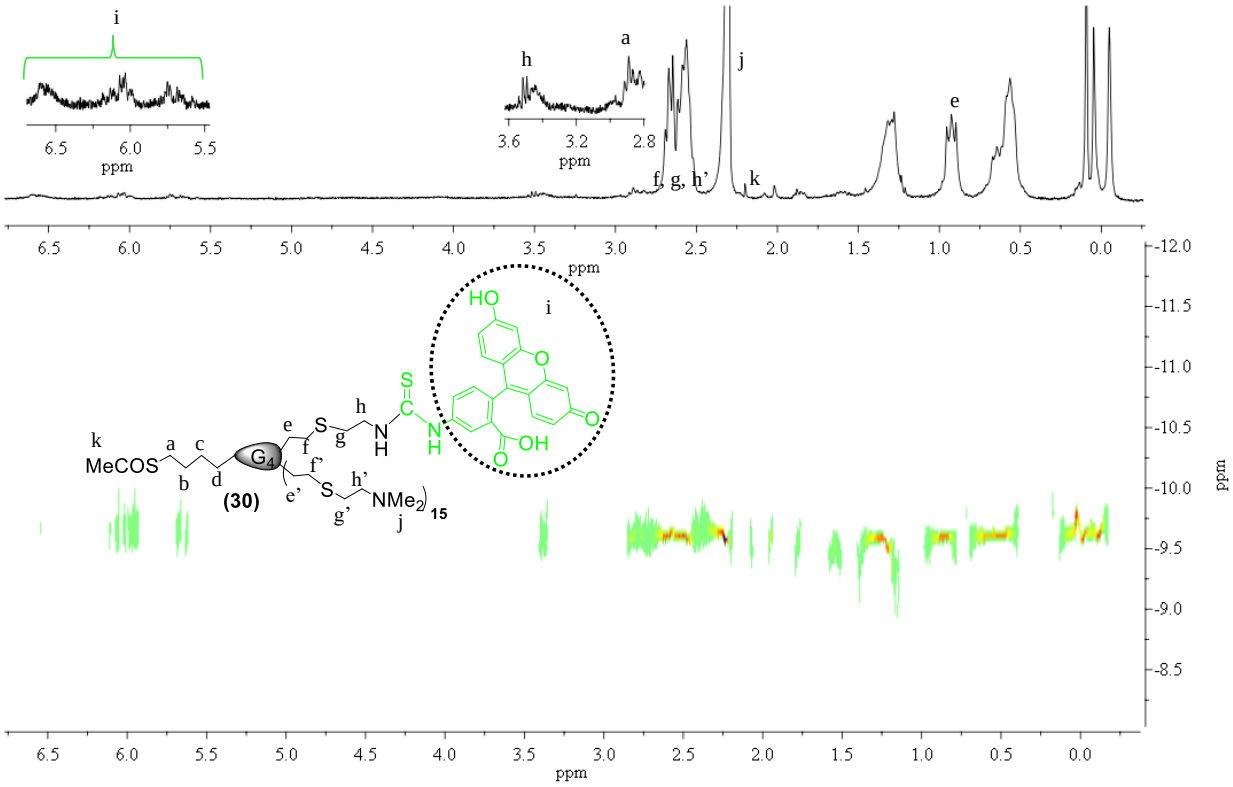
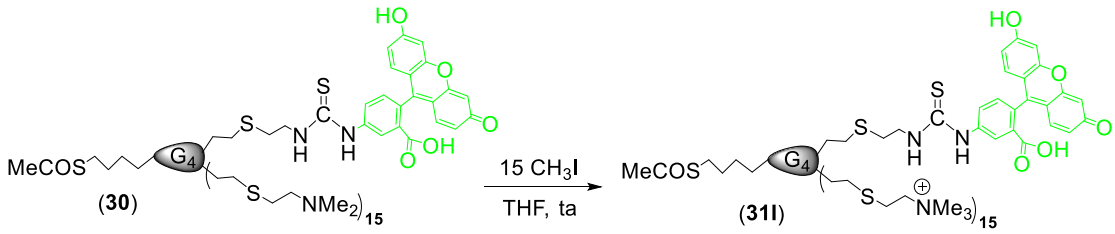


Figura 1.32. Espectro RMN de ^{1}H (arriba) y DOSY-2D (abajo) del derivado **30** en $CDCl_3$

Dendrón (MeCOS)G$_4$(S-NHFITC)(S-NMe$_3$Cl)$_{15}$

Una vez obtenido el derivado **30**, que posee un grupo fluoróforo en la periferia y teniendo en cuenta que nuestro objetivo es la obtención de sistemas catiónicos solubles en agua, se procedió a la cuaternización del mismo. Para esto, a una disolución en THF del derivado **30** se le adicionó MeI y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas (Esq. 1.22). La posterior purificación por nanofiltración permite obtener el derivado catiónico **31I** (MeCOS)G$_4$(NHFITC)(S-NMe$_3$I)$_{15}$ como un sólido de color naranja, soluble en agua (Fig. 1.33).



Esquema 1.22. Síntesis del dendrón catiónico con un grupo fluoróforo en la periferia

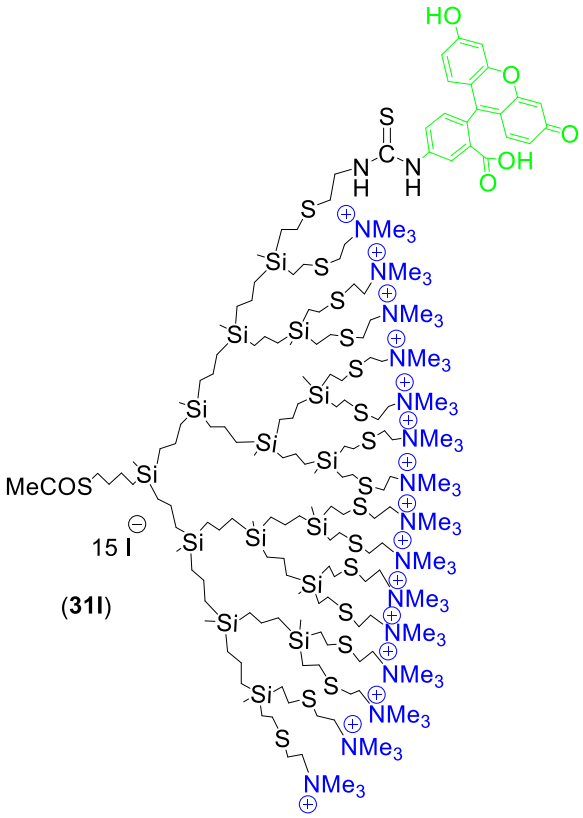


Figura 1.33. Estructura propuesta para compuesto **31I**

En el espectro de RMN de ^{1}H del derivado **31I** se observan las señales correspondientes a los anillos del grupo fluoróforo en torno a 5.5-8.0 ppm y las señales correspondientes al esqueleto dendrítico (Fig. 1.34).

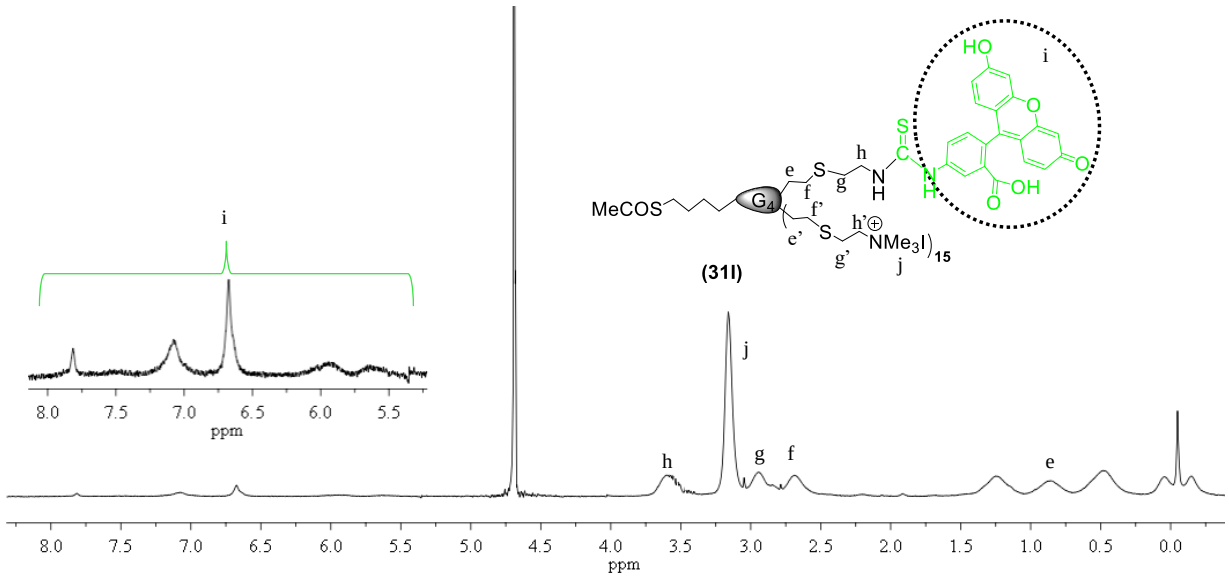
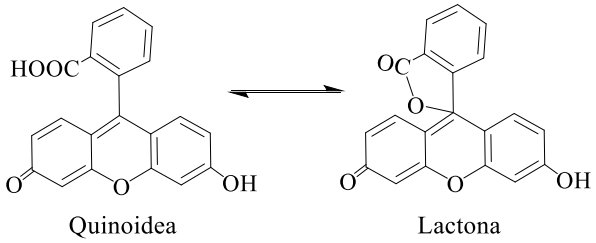


Figura 1.34. Espectro RMN de ^{1}H (D_2O) del compuesto **31I**

En las señales correspondientes al grupo fluoróforo se observa una ligera diferencia en comparación con el espectro observado en el derivado **30**. Esto puede deberse a las características estructurales de la fluoresceína, la cual puede presentar diferentes isómeros en función de los sustituyentes y el medio en el que se encuentra (Esq. 1.23).[128] La forma lactona de la fluoresceína no presenta color en la región ultravioleta visible.[129] Además, en disolventes polares como el agua la fluoresceína se presenta principalmente en su forma quinoidea,[130] por esta razón las estructuras propuestas para los compuestos con un grupo fluoróforo se han representado con la fluoresceína en su forma quinoidea.



Esquema 1.23. Especies de la fluoresceína en disolución

El intercambio del anión I^- por Cl^- en el derivado **31I** utilizando la resina de intercambio iónico amberlita™ (IRA-402, forma-Cl), permitió obtener el dendrón catiónico $(MeCOS)G_4(NHFITC)(S\text{-}NMe_3Cl)_{15}$ con un rendimiento de 69%. El espectro de RMN de ^1H del compuesto **31Cl** muestra las mismas señales que las observadas para el compuesto **31I**. Para el compuesto **31Cl** en el espectro infrarrojo, la banda correspondiente al grupo isotiociato de la fluoresceína que aparece en torno a 2038 cm^{-1} no se observa**,** lo que confirma que la fluoresceína presente en el mismo no está libre (Fig. 1.35).

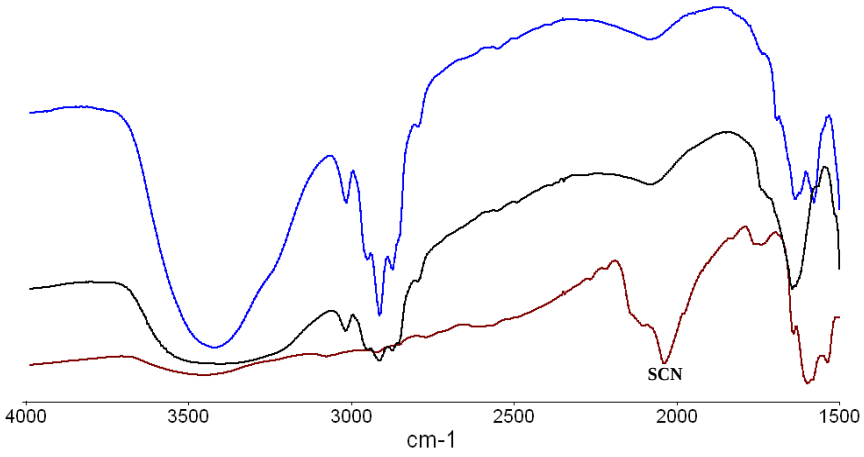


Figura 1.35. Espectro IR de **FITC** (rojo) y los dendrones **16Cl** (negro) y **31Cl** (azul)

La espectroscopía ultravioleta visible resultó útil en la caracterización de los dendrones con un grupo fluoresceína. Los espectros de UV-visible obtenidos para los derivados (**31)** con un grupo fluoresceína en su estructura fueron comparados con los espectros de los compuestos análogos (**16Cl** y **26Cl**) que no poseían fluoresceína y con FITC libre.

En el espectro IR de la FTIC libre aparece una señal intensa a 504 nm, la misma señal pudo observarse en los derivados que contenían fluoresceína en su estructura **31Cl** y **32Cl**, mientras que para los derivados **16Cl** y **26Cl** que no poseen fluoresceína esta señal no se observa (Fig. 1.36).

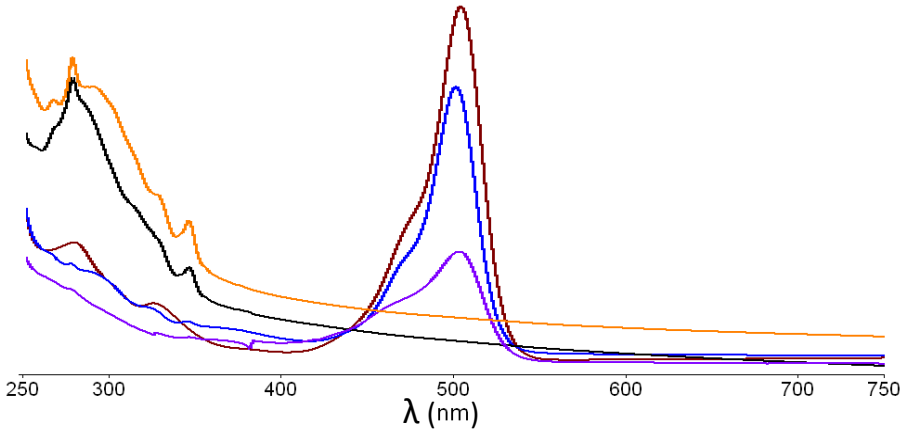
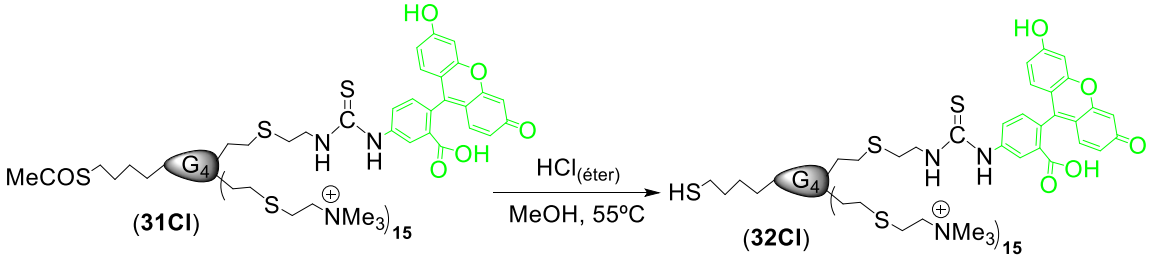


Figura 1.36. Espectro UV-Vis (H_2O) de los **FITC** (rojo) y de los dendrones **16Cl** (negro), **26Cl** (amarillo), **31Cl** (azul) y **32Cl** (morado)

Dendrón $HSG_4(S\text{-}NHFITC)(S\text{-}NMe_3Cl)_{15}$

Una vez obtenido el derivado **31Cl** procedimos a la desprotección del punto focal. Igual que para los compuestos (**17-19**, **23-25I**, **23-26Cl**), a una disolución en MeOH del dendrón **31Cl** en un matraz topacio, se le adicionó HCl en éter y la mezcla de reacción se agitó a 55ºC durante 12 horas. Posteriormente, se eliminó el disolvente a vacío, obteniéndose el derivado **32Cl** (Esq. 1.24, Fig.1.37).



Esquema 1.24. Síntesis del compuesto **32** con grupo fluoróforo en la periferia

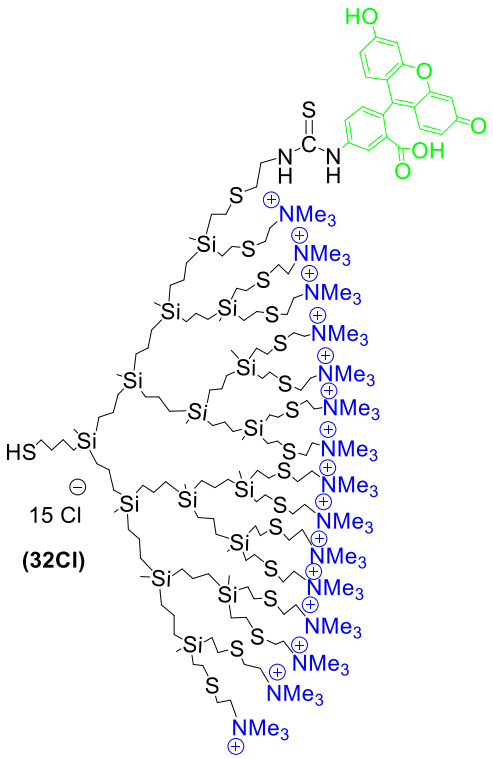


Figura 1.37. Estructura propuesta para el dendrón **32Cl**

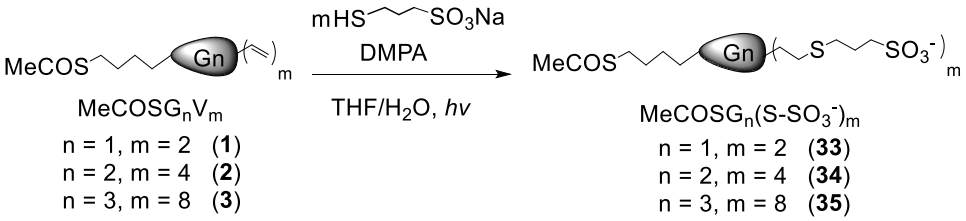
Teniendo en cuenta que el derivado **32Cl** corresponde a un dendrón carbosilano de cuarta generación, resulta difícil seguir la reacción de desprotección del punto focal por RMN de ^{1}H ya que las señales correspondientes al grupo tioacetato son poco intensas con respecto a las demás señales del esqueleto carbosilano y de los demás grupos catiónicos periféricos. No obstante, como el procedimiento para su obtención es el mismo que el descrito anteriormente, se puede afirmar la formación del mismo, observándose un espectro de RMN de ^{1}H similar al obtenido para los derivados **31I/Cl**. Además, en el espectro UV-visible se observa la banda a 504 nm correspondiente a la FTIC, lo que indica que durante el proceso de desprotección este grupo no se ve afectado (Fig. 1.36).

1.3.4. Dendrones aniónicos

Siguiendo la misma aproximación sintética de tipo *click tiol-eno* utilizada para la síntesis de dendrones catiónicos, se obtuvieron dendrones con grupos aniónicos o precursores de éstos en la periferia. Para la síntesis de los dendrones aniónicos se utilizaron los derivados tiol comerciales 3-mercapto-1-propanosulfonato de sodio ($HSCH_2CH_2CH_2SO_3Na$), metil tioglicolato ($HSCH_2CO_2Me$) y ácido mercaptosuccínico, -Suc, ($HOOCCH(SH)CH_2COOH$).

1.3.4a. Dendrones MeCOSG$_n$(S-SO$_3$Na)$_m$

A una disolución en THF de los dendrones precursores MeCOSG$_n$V$_m$ (**1-3**) se les adicionó gradualmente (25% cada hora) una disolución acuosa del tiol 3-mercapto-1-propanosulfonato de sodio (HS(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na) y DMPA (10%). Esta mezcla se desoxigenó y se expuso a la luz ultravioleta (λ = 350 nm) durante 4 horas (Esq. 1.25). Los crudos de reacción fueron purificados por nanofiltración, obteniéndose los derivados aniónicos deseados MeCOSG$_n$(S-SO$_3$Na)$_m$ (n = 1, m = 2 (**33**); n = 2, m = 4 (**34**); n = 3, m = 8 (**35**)) como sólidos amarillos solubles en agua (Fig. 1.38).



Esquema 1.25. Síntesis de dendrones **33-35**

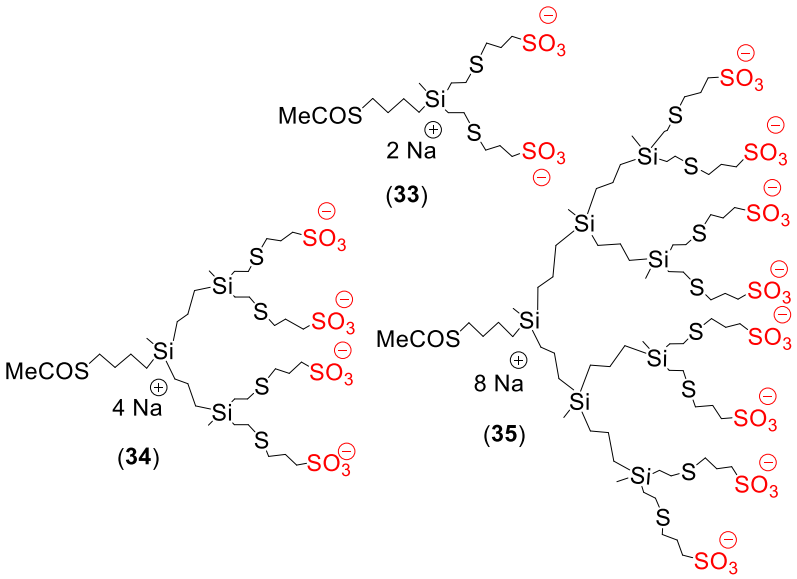
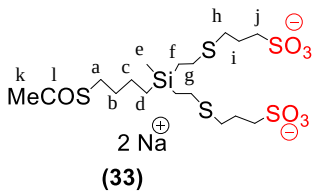


Figura 1.38. Estructuras propuestas para los derivados **33-35**

La formación de los derivados **33-35** pudo verificarse por RMN de ^{1}H y ^{13}C{^{1}H} donde se observan las señales correspondientes a la nueva cadena formada y los nuevos grupos introducidos (Tabla 1.8).

Tabla 1. 8. Selección de señales de RMN de ^{1}H y $^{13}C\{^{1}H\}$ en D_2O de los compuestos **33-35**



(33)

	ASIGNACIÓN	ppm		
		(33)	**(34)**	**(35)**
RMN ^{1}H	-SiC*H*$_2$CH$_2$S- (**f**)	0.84	0.84	0.83
	-SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$S- (**i**)	1.92	1.91	1.89
	-SiCH$_2$C*H*$_2$S- (**g**)	2.58	2.56	2.54
	-SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$S- (**h**)	2.58	2.56	2.54
	-SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$S- (**j**)	2.93	2.88	2.87
RMN $^{13}C\{^{1}H\}$	-SiCH$_2$CH$_2$S- (**f**)	14.1	14.3	14.3
	-SCH$_2$CH$_2$CH$_2$S- (**i**)	24.1	24.3	24.3
	-SiCH$_2$CH$_2$S- (**g**)	26.8	26.9	26.9
	-SCH$_2$CH$_2$CH$_2$S- (**h**)	29.9	30.1	30.2
	-SCH$_2$CH$_2$CH$_2$S- (**j**)	50.1	50.1	50.1

En el espectro de RMN de ^{1}H se observa la desaparición de las resonancias correspondientes a los grupos vinilo periféricos en torno a 5-6 ppm y la aparición de dos nuevas resonancias correspondientes a los grupos metileno de la nueva cadena formada en la adición tiol-eno en torno a 0.84 ppm (-SiC*H*$_2$-) y 2.58 ppm (-C*H*$_2$S-). Además, también se observó la presencia del nuevo fragmento introducido -S(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na por las señales encontradas en torno a 1.92, 2.58 y 2.93 ppm (-SC*H*$_2$C*H*$_2$C*H*$_2$S-) (Fig.1.39).

En cuanto al espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$, se aprecia un comportamiento similar, observándose las resonancias para la nueva cadena formada entorno a 14.1 y 26.8 ppm (-SiCH$_2$CH$_2$S-), y la presencia de las señales debidas al nuevo fragmento introducido en torno a 24.1, 29.9 y 50.1 ppm (-SCH$_2$CH$_2$CH$_2$S-), así como también la desaparición de las señales correspondientes a los grupos vinilo periféricos (Fig.1.39).

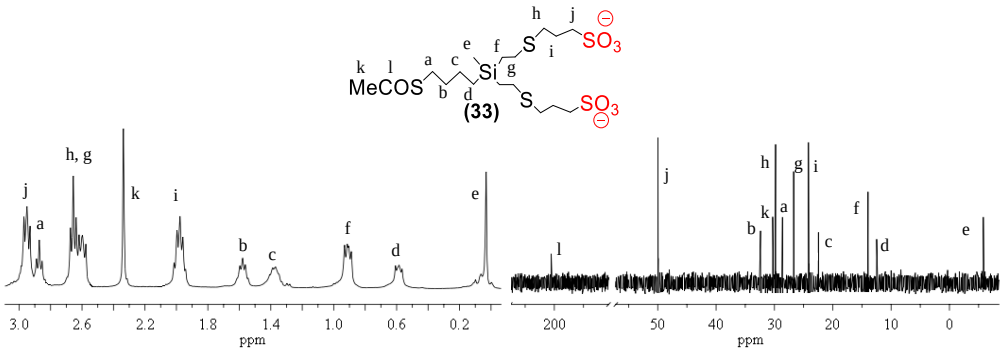


Figura 1.39. Espectros de RMN de ^{1}H (izq.) y $^{13}C\{^{1}H\}$ (dercha.) del compuesto **33** en D_2O

La realización de espectros bidimensionales HSQC {^{1}H-^{13}C} nos permitió asignar las señales de los grupos metileno más cercanos al átomo de azufre del grupo sulfonato (Fig. 1.40).

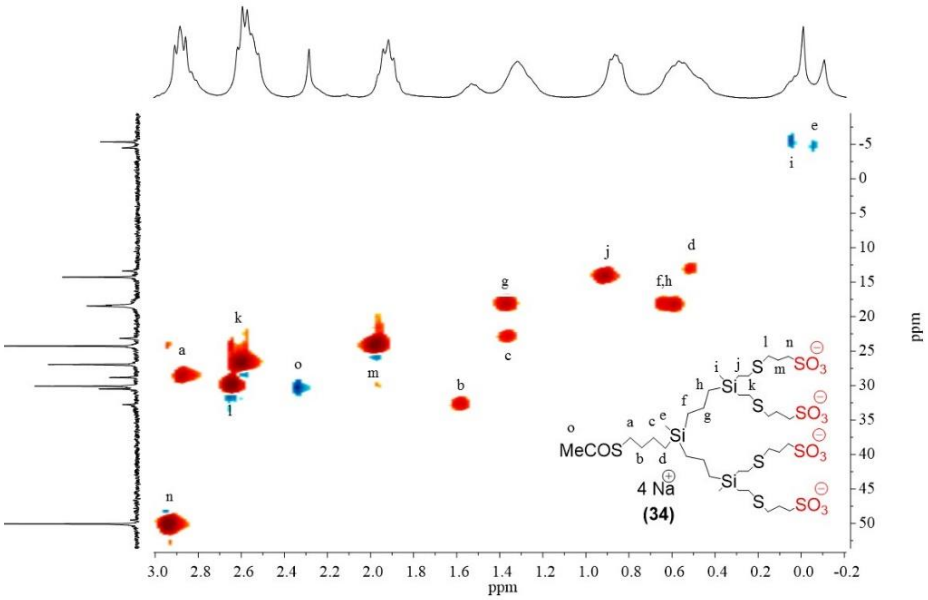
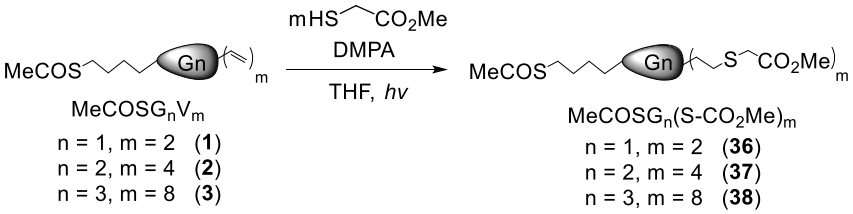


Figura 1.40. Espectro HSQC {^{1}H-^{13}C} del compuesto **34** en D_2O

El espectro HMBC {^{1}H-^{29}Si} muestra el mismo comportamiento para los átomos de silicio más externos que el observado para los dendrones catiónicos, donde la señal correspondiente a éstos se ve desplazada desde -13.0 ppm en el caso de los sustituyentes vinilo hasta 2.8 ppm después de la funcionalización. Respecto a la espectroscopía IR, en el espectro infrarrojo de estos dendrones se observa una banda correspondiente al grupo carbonilo del punto focal a 1692 cm^{-1}.

1.3.4b. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}CO_2Me)_m$

Dentro del trabajo de esta tesis, se plantea la síntesis de nanopartículas aniónicas utilizando distintas estrategias. Una de ellas corresponde al uso de dendrones con grupos periféricos éster. En este sentido, se sintetizaron este tipo de dendrones con grupos periféricos éster por medio de la adición del derivado tiol metil tioglicolato $HSCH_2CO_2Me$ a los compuestos $MeCOSG_nV_m$ (**1**-**3**) en THF, en atmósfera inerte y bajo luz ultravioleta (λ = 350 nm) con agitación durante 4 horas (Esq. 1.26). La purificación del crudo de reacción por cromatografía de exclusión de tamaño, con THF como eluyente, permitió obtener los correspondientes dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}CO_2Me)_m$ (n = 1, m = 2 (**36**); n = 2, m = 4 (**37**); n = 3, m = 8 (**38**)) con rendimientos moderados (60-70%) (Fig. 1.41).



Esquema 1. 26. Síntesis de dendrones **36-38**

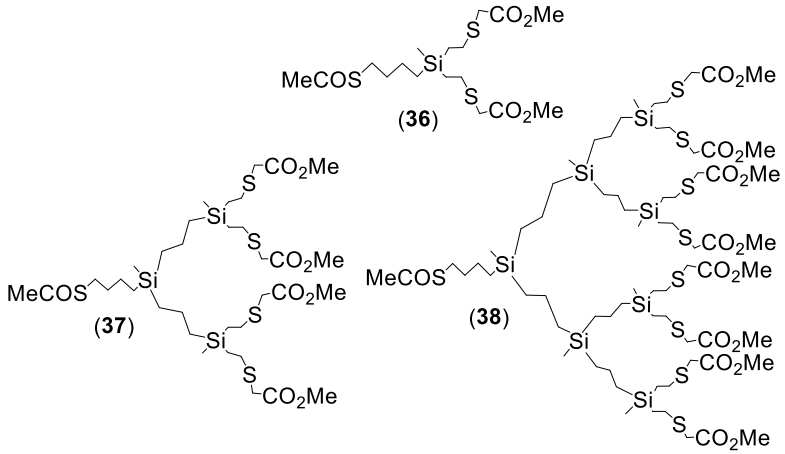
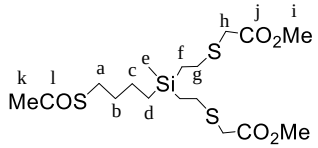


Figura 1.41. Estructuras propuestas para los dendrones **36-38**

Los espectros de RMN de ^{1}H y $^{13}C\{^{1}H\}$ permitieron verificar la formación de los derivados **36-38** observándose las señales correspondientes al esqueleto dendrítico y la de los grupos funcionales periféricos. Los desplazamientos químicos obtenidos para estos derivados están recogidos en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9. Señales de RMN de ^{1}H y $^{13}C\{^{1}H\}$ en $CDCl_3$ de compuestos **36-38**



	ASIGNACIÓN	ppm		
		(**36**)	(**37**)	(**38**)
RMN ^{1}H	-SiC*H*$_2$CH$_2$S- (**f**)	0.88	0.84	0.87
	-SiCH$_2$C*H*$_2$S- (**g**)	2.63	2.60	2.63
	-SC*H*$_2$CO$_2$CH$_3$ (**h**)	3.22	3.18	3.21
	-CO$_2$C*H*$_3$ (**i**)	3.71	3.67	3.70
RMN $^{13}C\{^{1}H\}$	-SiCH$_2$CH$_2$S- (**f**)	13.8	13.9	14.0
	-SiCH$_2$CH$_2$S- (**g**)	28.1	28.1	28.2
	-SCH$_2$CO$_2$CH$_3$ (**h**)	33.3	33.1	33.2
	-CO$_2$CH$_3$ (**i**)	52.4	52.2	52.4
	-CO$_2$CH$_3$ (**j**)	171.0	170.8	171.0

En el espectro de RMN de ^{1}H se observaron las señales correspondientes a los grupos metileno **f** y **g** formados por la adición tiol-eno (Tabla 1.9). Dos nuevas señales correspondientes a los grupos metileno **h** y metilo **i** de la nueva cadena introducida aparecen en torno a 3.21 y 3.71 ppm respectivamente.

Por otro lado, en el espectro de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ se observa un comportamiento similar, caracterizado por la desaparición de las resonancias correspondientes a los grupos vinilo y la aparición de las señales correspondientes a los grupos **f** y **g** en torno a 13.8 y 28.1 ppm. Las señales correspondientes a los grupos **h** y **i** de la nueva cadena introducida, se observaron en torno a 33.3 y 52.4 ppm respectivamente. Además, aparece una nueva señal **j** correspondiente al grupo carbonilo del éster en torno a 171.0 ppm (Fig. 1.42).

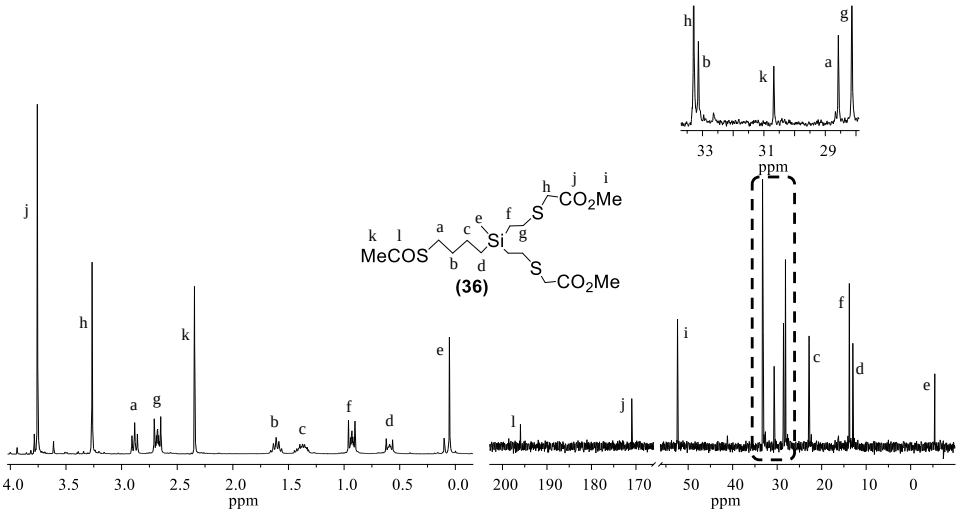
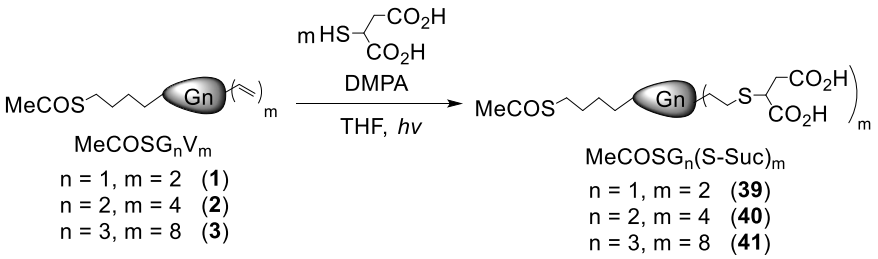


Figura 1.42. Espectros RMN de ^1H (izq.) y $^{13}C\{^1H\}$ (dercha.) ($CDCl_3$) del compuesto **36**

El desplazamiento observado en el espectro HMBC $\{^1H\text{-}^{29}Si\}$ para los átomos de silicio más externos desde -13.0 hasta 2.4 ppm también confirma la funcionalización de los grupos vinilos terminales. En el espectro infrarrojo se observan las bandas correspondientes a los grupos carbonilo del punto focal y de la periferia a 1692 y 1737 cm^{-1}.

1.3.4c. Dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}Suc)_m$

También se han sintetizado dendrones precursores con grupos carboxílicos. A diferencia de los derivados **36**-**38**, estos nuevos dendrones poseen el doble de grupos funcionales por rama en la periferia, lo que permite obtener dendrones de la misma generación con el doble de grupos funcionales en la periferia. Para su obtención, se preparó una disolución en THF de los dendrones $MeCOSG_nV_m$ (**1**-**3**), a los que se les adicionó ácido mercaptosuccínico ($HCO_2CH(SH)CH_2CO_2H$) y DMPA. Las mezclas de reacción se agitaron en atmósfera inerte bajo luz ultravioleta (λ = 350 nm) durante 4 horas (Esq. 1.27). La posterior purificación por cromatografía de exclusión de tamaño (eluyente THF) permite obtener los dendrones $MeCOSG_n(S\text{-}Suc)_m$ (n = 1, m = 2 (**39**); n = 2, m = 4 (**40**); n = 3, m = 8 (**41**)) (Fig. 1.43).



Esquema 1.27. Síntesis de dendrones precursores aniónicos **39-41**

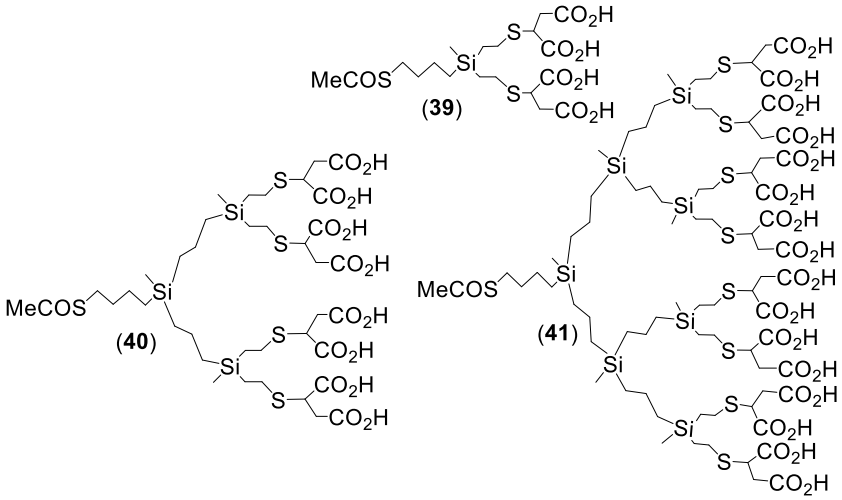
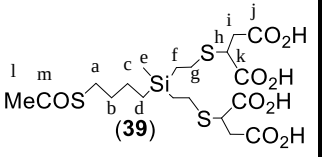


Figura 1.43. Estructuras propuestas para dendrones **39-41**

Al igual que para los derivados **36-38** la espectroscopía de RMN de ^{1}H y $^{13}C\{^{1}H\}$ permiten verificar la transformación de los grupos vinilo periféricos, observándose una vez más, las señales correspondientes a los grupos metileno **f** y **g** formados por la adición tiol-eno (Tabla 1.10).

Tabla 1.10. Selección de señales de RMN de **^{1}H** y $^{13}C\{^{1}H\}$ en CD_3OD de compuestos **39-41**



	ASIGNACIÓN	ppm (39)	ppm (40)	ppm (41)
RMN ^{1}H	-SiC*H*$_2$CH$_2$S- (**f**)	0.94	0.95	0.95
	-SCHC*H*$_2$CO$_2$H (**i**)	2.63 2.89	2.64 2.89	2.65 2.90
	-SiCH$_2$C*H*$_2$S- (**g**)	2.76	2.77	2.77
	-SC*H*CH$_2$CO$_2$H (**h**)	3.64	3.64	3.64
RMN $^{13}C\{^{1}H\}$	-Si*C*H$_2$CH$_2$S- (**f**)	14.9	15.1	15.1
	-SiCH$_2$*C*H$_2$S- (**g**)	28.0	28.1	28.1
	-SCH*C*H$_2$CO$_2$H (**i**)	37.3	37.3	37.3
	-S*C*HCH$_2$CO$_2$H (**h**)	42.7	42.7	42.7
	-SCH*C*O$_2$H (**k**)	174.3	174.3	174.3
	-SCHCH$_2$*C*O$_2$H (**j**)	175.4	175.4	175.4

Otras señales observadas en el espectro de RMN de ^{1}H fueron las correspondientes a los grupos de la nueva cadena introducida **i** e **h** que aparecen en torno a 2.63, 2.89 ppm (-SCHC*H*$_2$CO-) y 3.64 ppm (-SC*H*CH$_2$CO-) ppm respectivamente. De igual forma, en el espectro de RMN de ^{13}C, pueden apreciarse las nuevas señales correspondientes a los grupos carboxílicos **k** y **j** en torno a 174.3 y 175.3 ppm, al igual que la de los grupos **i** e **h** cuyas señales aparecen entorno a 37.3 y 42.7 ppm (Fig. 1.44).

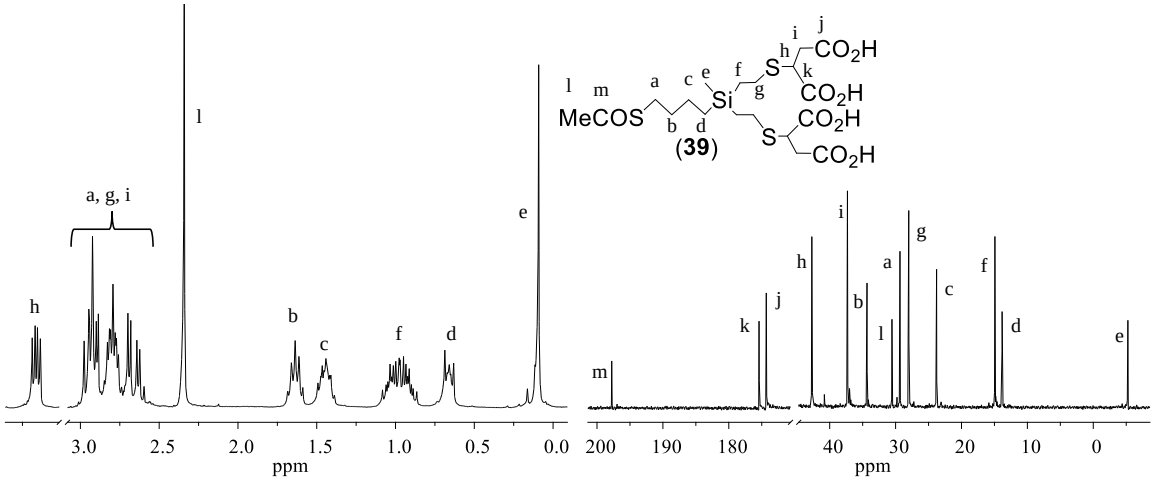
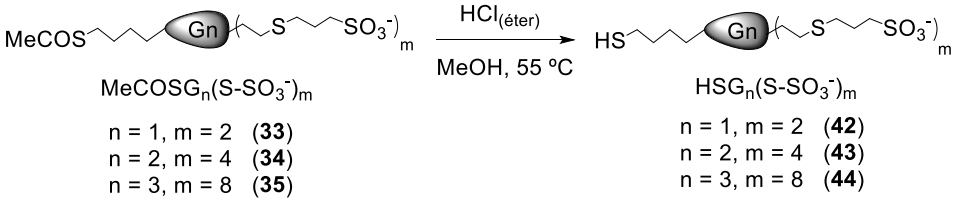


Figura 1.44. Espectros RMN de ^{1}H (izq.) y $^{13}C\{^{1}H\}$ (dercha.) (CD_3OD) del derivado **39**

Una vez más, el desplazamiento de la señal de los átomos de silicio más externos observados en el espectro HMBC $\{^{1}H$-$^{29}Si\}$ que ahora aparecen en torno a 3.12 ppm ayuda a confirmar la funcionalización de los grupos vinilos.

1.3.4d. Dendrones $HSG_n(S\text{-}SO_3Na)_m$

La desprotección del punto focal de los derivados $MeCOSG_n(S\text{-}SO_3Na)_m$ se realizó siguiendo el mismo procedimiento sintético que el descrito para los derivados catiónicos. A una disolución en MeOH de los dendrones **33-35** se le adicionó HCl en éter, la mezcla de reacción se agitó durante 12 horas a 55ºC. La purificación por nanofiltración de los crudos de reacción permiten obtener los dendrones aniónicos $HSG_n(S\text{-}SO_3Na)_m$ (n = 1, m = 2 (**42**); n = 2, m = 4 (**43**); n = 3, m = 8 (**44**)) con excelentes rendimientos (Esq. 1.28, Fig. 1.45).



Esquema 1.28. Síntesis de dendrones **42-44**

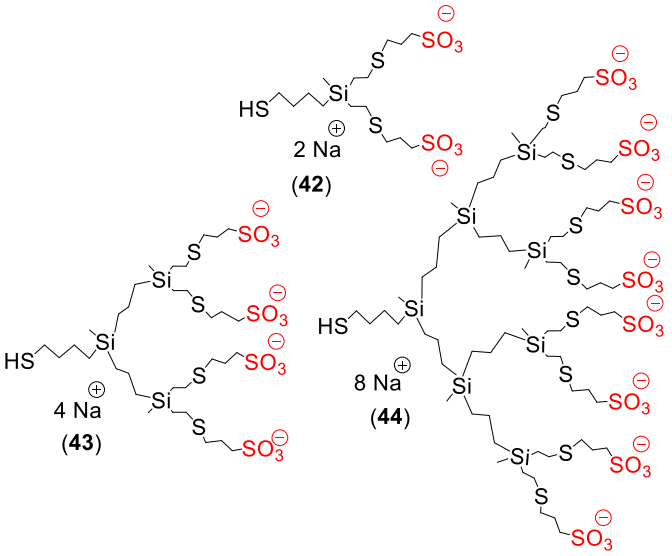


Figura 1.45. Estructuras propuestas para los dendrones **42-44**

La confirmación de la desprotección del punto focal pudo verificarse por RMN de ^{1}H donde se observa la desaparición de la señal debida al metilo del punto focal (MeCO-). Otro cambio importante es el desplazamiento de la señal correspondiente al metileno más cercano al átomo de azufre del punto focal (HSCH_2-) el cual se desplazan a campo más alto, apareciendo ahora en torno a 2.50 ppm (Fig. 1.46).

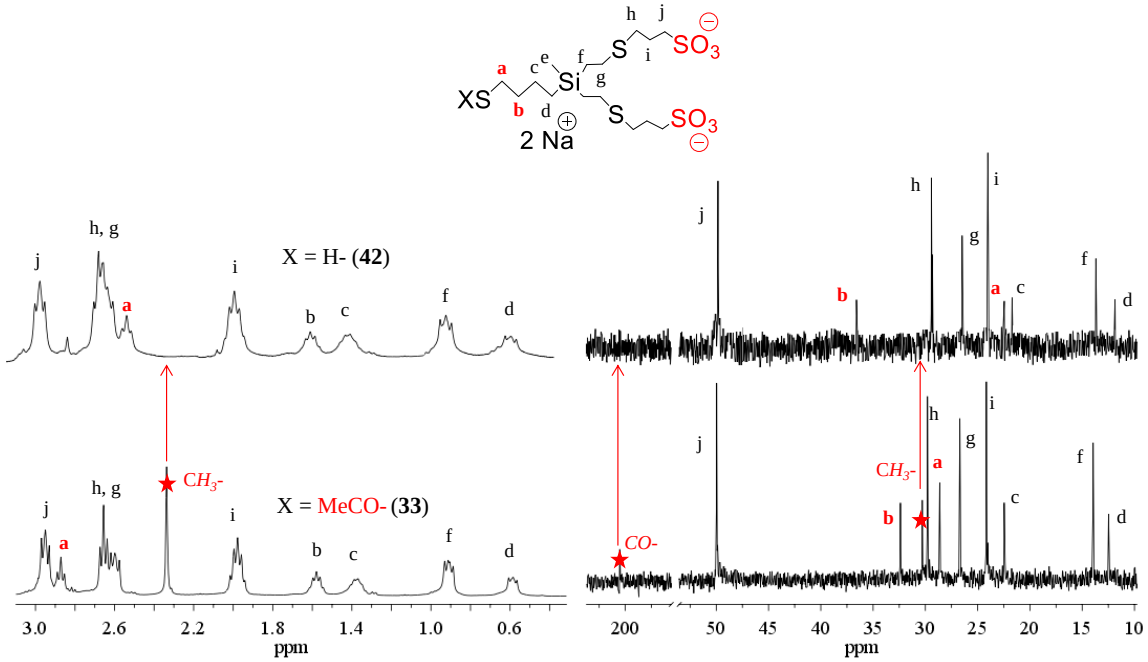


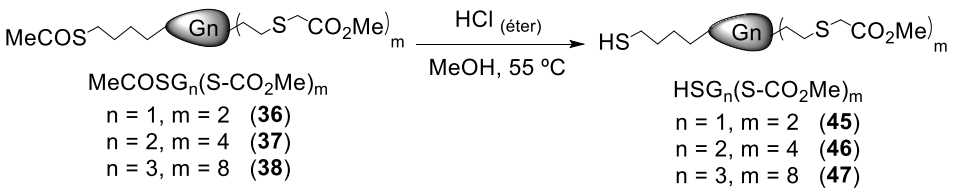
Figura 1.46. Espectros de RMN de ^{1}H (izq.) y $^{13}C\{^{1}H\}$ (dercha.) de **33** y **42** en D_2O

En el espectro de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ se observa un comportamiento similar al observado para RMN de ^1H. Las señales correspondientes a los grupos metilo y carbonilo del fragmento situado previamente en el punto focal no se observan. También, pudo apreciarse un desplazamiento de las señales correspondientes a los protones de los grupos metileno más cercanos al átomo de azufre situado en el punto focal (HS*C*H_2*C*H_2-) cuyas señales aparecen ahora en torno a 24.6 y 36.6 ppm respectivamente (Fig. 1.46).

En el espectro infrarrojo de este derivado, la banda correspondiente al grupo carbonilo del punto focal no se observa, mostrando nuevamente la desaparición del grupo tioacetato y su trasformación en un grupo tiol.

1.3.4e. Dendrones $HSG_n(S\text{-}CO_2Me)_m$

Para desproteger el punto focal en los derivados neutros $MeCOSG_n(S\text{-}CO_2Me)_m$ se utilizó el mismo procedimiento descrito hasta el momento. Este procedimiento permitió desproteger el punto focal, pero los grupos éster de la periferia permanecieron intactos, obteniéndose los derivados $HSG_n(S\text{-}CO_2Me)_m$ (n = 1, m = 2 (**45**); n = 2, m = 4 (**46**); n = 3, m = 8 (**47**)) (Esq. 1.29, Fig. 1.47).



Esquema 1.29. Esquema de síntesis de compuestos **45-47**

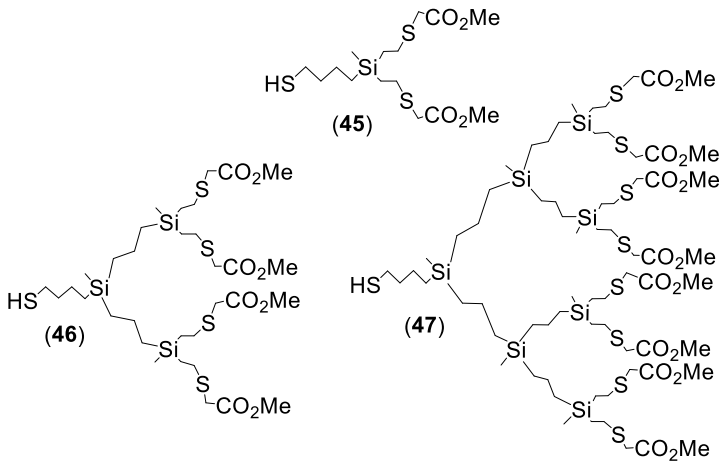


Figura 1.47. Estructuras propuestas para dendrones **45-47**

Al igual que para los derivados **42-44**, para los nuevos compuestos **45-47** la transformación del grupo tioacetato del punto focal en un grupo tiol se siguió por RMN de ^{1}H y de $^{13}C\{^{1}H\}$, donde además de observar la desaparición del grupo tioacetato y el cambio en el desplazamiento de las señales de los grupos metileno cercano a este, se puede observar la aparición de la señal correspondiente al protón del grupo tiol en torno a 1.30 ppm (Fig. 1.48).

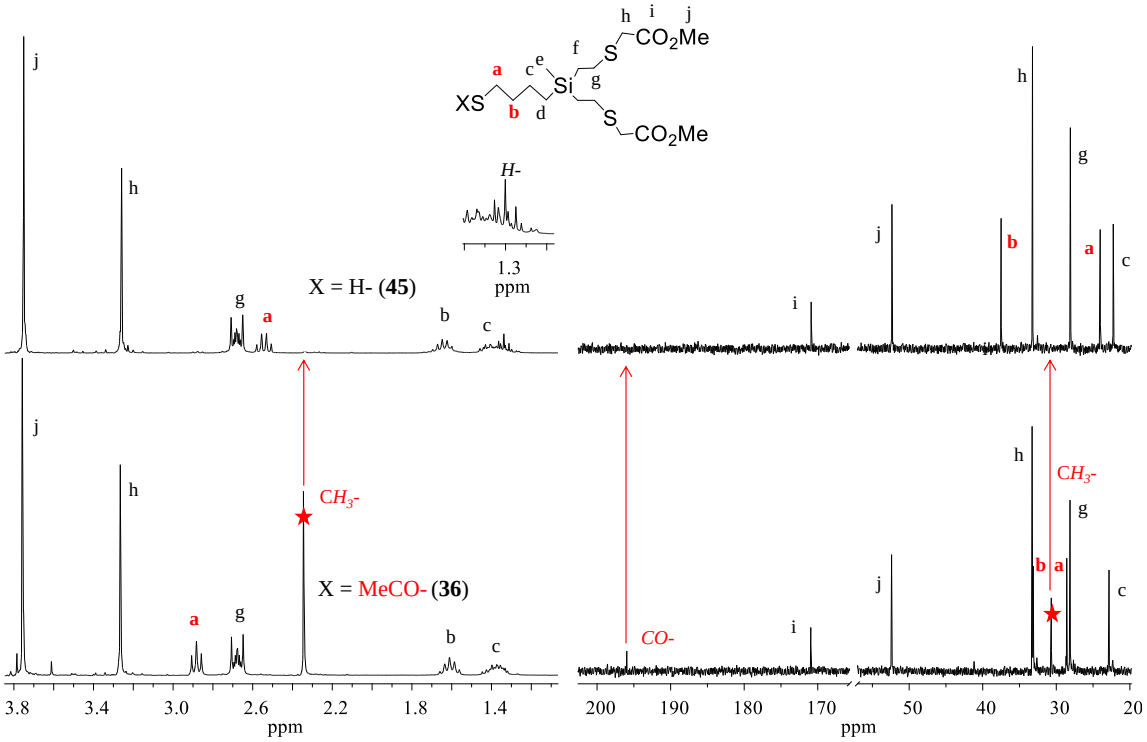


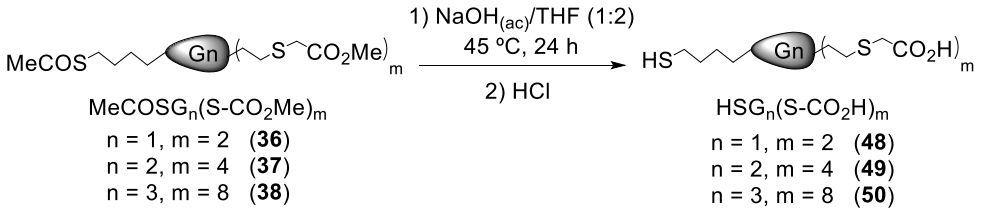
Figura 1.48. Espectros de RMN de ^{1}H (izq.) y $^{13}C\{^{1}H\}$ (dercha.) de los derivados **36** y **45** en $CDCl_3$

En el espectro infrarrojo, solo se observa una banda a 1737 cm^{-1} correspondientes al grupo carbonilo de la periferia, mientras que la banda que aparecía a 1692 cm^{-1} correspondiente al grupo tioacetato ya no se observa.

1.3.4f. Dendrones $HSG_n(S\text{-}CO_2H)_m$

La metodología sintética de desprotección utilizada hasta el momento no nos permitió la obtención de dendrones aniónicos, ya que los grupos éster periféricos seguían estando presentes tras la desprotección. En este sentido, se utilizó una nueva estrategia por medio de la cual fue posible desproteger todos los grupos funcionales presentes.

Los dendrones (**36**-**38**) se añadieron en una mezcla de NaOH (ac.) (12 eq. por cada grupo a desproteger) y THF (v/v = 1:2) y la mezcla se agitó a 45ºC durante 24 horas. Posteriormente, el THF se evaporó a vacío y el residuo acuoso resultante se acidificó con HCl. El precipitado obtenido se lavó con éter y se secó, obteniendo los derivados $HSG_n(S\text{-}CO_2H)_m$ (n = 1, m = 2 (**48**); n = 2, m = 4 (**49**); n = 3, m = 8 (**50**)) con buenos rendimientos (Esq. 1.30, Fig. 1.49).



Esquema 1.30. Síntesis de dendron**es 48**-**50**

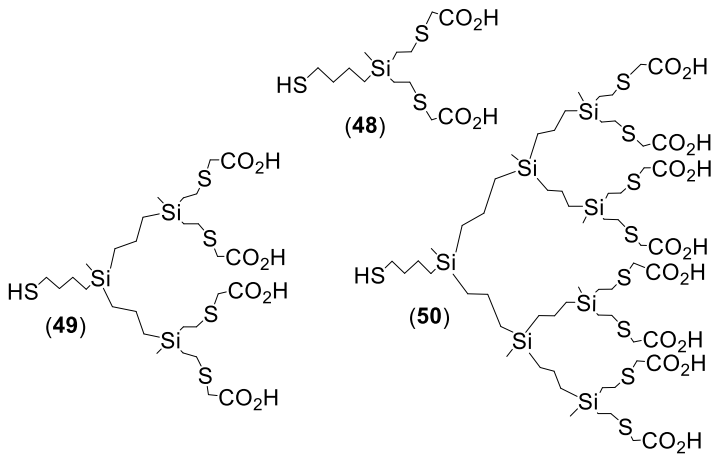


Figura 1.49. Estructuras propuestas para los dendrones **48**-**50**

La espectroscopía de RMN de ^1H y de $^{13}C\{^1H\}$ al igual que para derivados anteriores, permite verificar la desaparición de las señales correspondientes al grupo tioacetato, el desplazamiento de las resonancias de los grupos metileno más cercanos al punto focal y la aparición de la señal correspondiente al protón del grupo tiol en torno a 1.39 ppm. Además, las señales debidas al grupo metilo periférico presente en los derivados precursores **36**-**38** tampoco se observan, confirmándose así la formación de los compuestos **48**-**50** (Fig. 1.50).

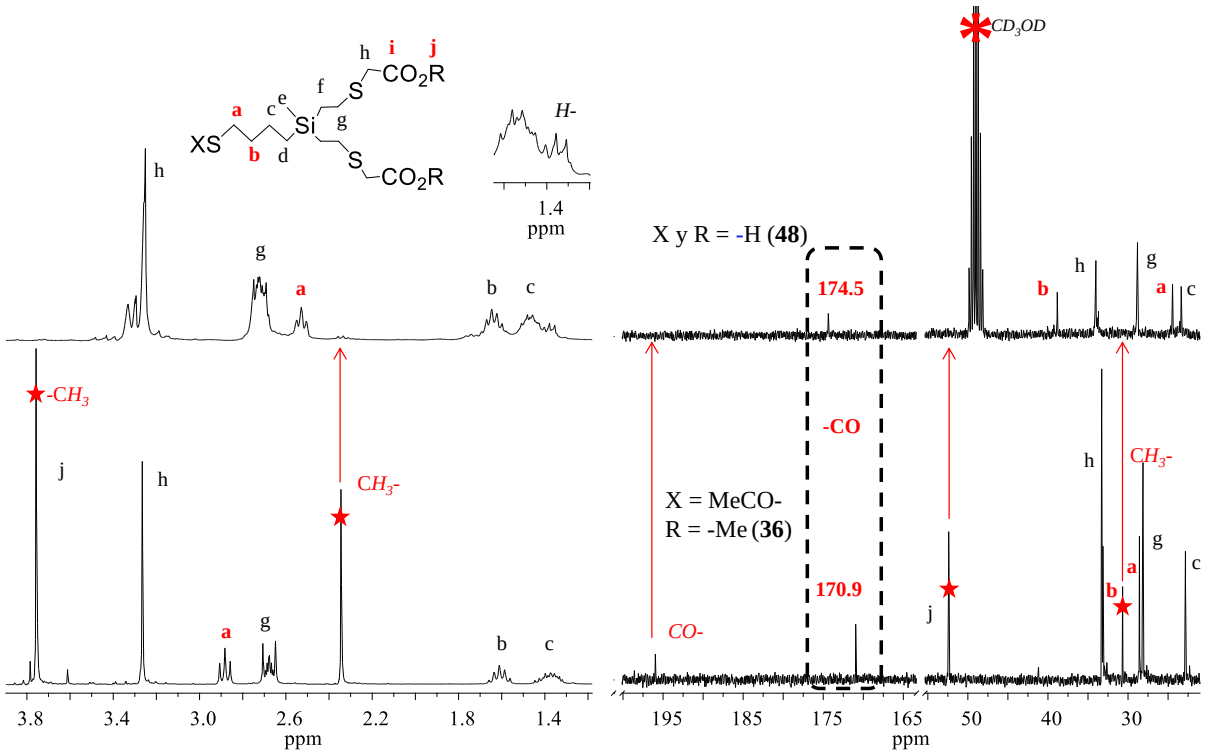
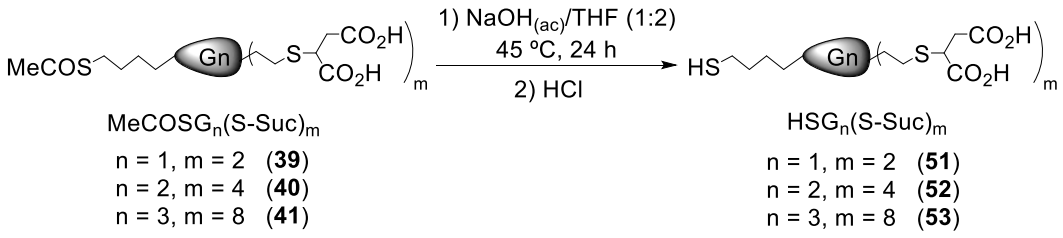


Figura 1. 50. Espectros de RMN de 1H (izq.) y $^{13}C\{^{1}H\}$ (dercha.) de los compuestos **36** ($CDCl_3$) y **48** (CD_3OD)

1.3.4g. Dendrones $HSG_n(S\text{-}Suc)_m$

A partir de los derivados **39-41** se prepararon dendrones con grupos carboxílicos en la periferia y con un grupo tiol en el punto focal. Debido a que utilizando el procedimiento empleado hasta el momento para desproteger el punto focal utilizando de MeOH/HCl se producía la parcial esterificación de los grupos ácidos periféricos, se utilizó el mismo procedimiento sintético empleado para obtener los derivados **48-50**, obteniéndose de este modo los derivados $HSG_n(S\text{-}Suc)_m$ (n = 1, m = 2 (**51**); n = 2, m = 4 (**52**); n = 3, m = 8 (**53**)) con buenos rendimientos (Esq. 1.31, Fig. 1.51).



Esquema 1.31. Síntesis de dendrones **51-53**

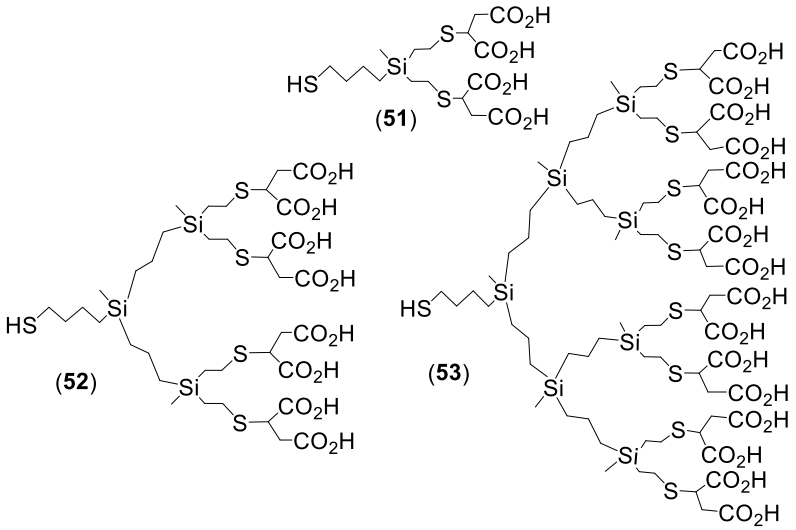


Figura 1.51. Estructura propuesta para los dendrones **51-53**

En los espectros de RMN de ^{1}H y $^{13}C\{^{1}H\}$ se observó el mismo comportamiento que para derivados anteriores, lo que permite corroborar la formación de los compuestos deseados **51-53** (Fig.1.52).

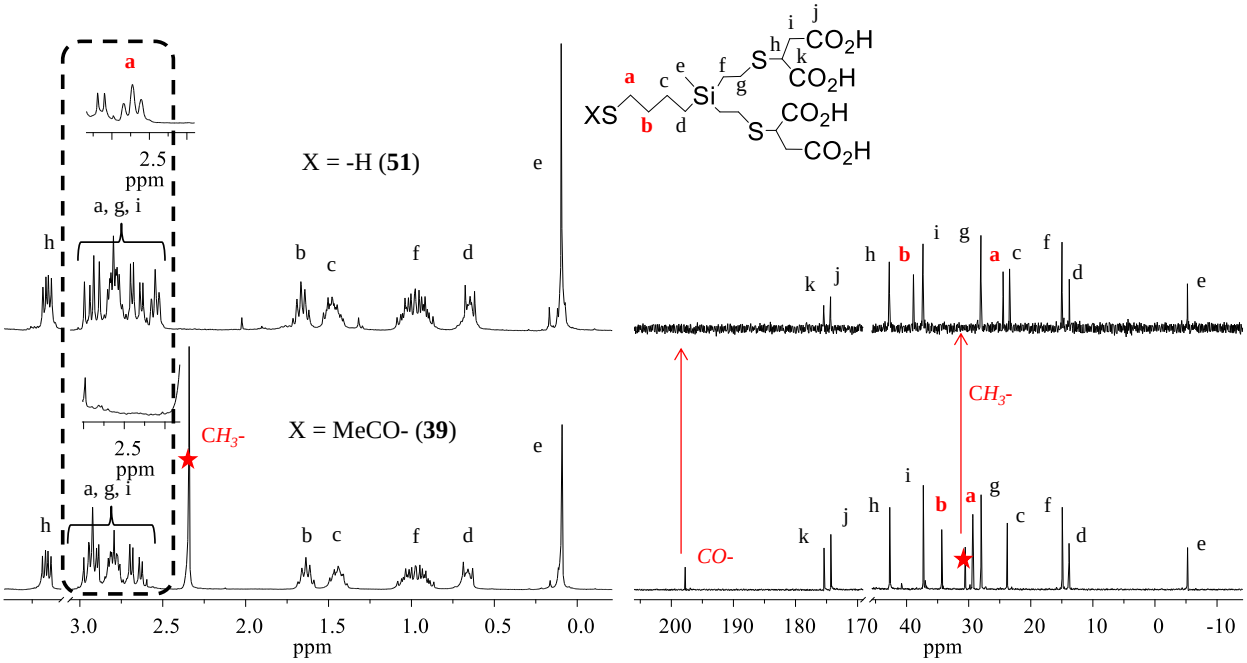
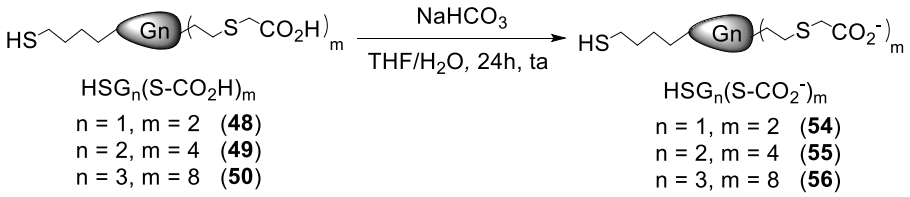


Figura 1.52. Espectros de RMN de ^{1}H (izq.) y $^{13}C\{^{1}H\}$ (dercha.) de los compuestos **39** y **51** en CD_3OD

1.3.4h. Dendrones $HSG_n(S\text{-}CO_2Na)_m$

El tratamiento con una base ($NaHCO_3$) de los dendrones **48-50** permite obtener los derivados aniónicos $HSG_n(S\text{-}CO_2Na)_m$. Para ello, se preparó una disolución en una mezcla de disolvente THF/H_2O de los derivados previamente sintetizados $HSG_n(S\text{-}CO_2H)_m$ (**48-50**), la mezcla se agitó bajo atmósfera inerte y a temperatura ambiente durante 24 horas (Esq. 1.32). La posterior purificación por nanofiltración de los crudos de reacción permite obtener los dendrones aniónicos solubles en agua con grupos carboxilato periféricos $HSG_n(S\text{-}CO_2Na)_m$ (n = 1, m = 2 (**54**); n = 2, m = 4 (**55**); n = 3, m = 8 (**56**)) con buenos rendimientos (Fig. 1.53).



Esquema 1.32. Síntesis de dendrones aniónicos **54-56**

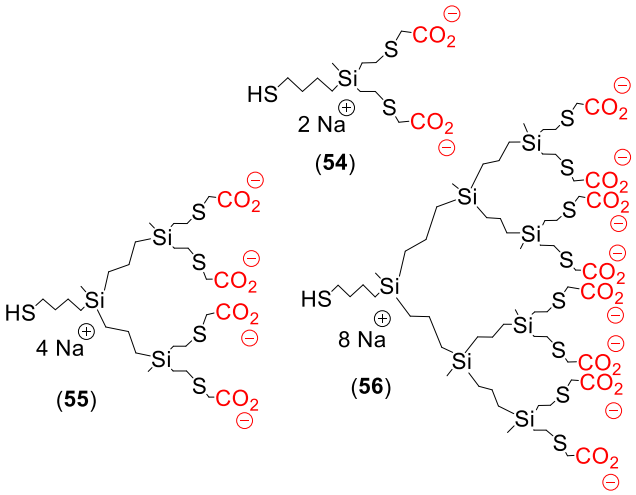


Figura 1.53. Representación estructural para dendrones aniónicos **54-56**

Aunque las señales observadas por RMN de ^1H no muestran ningún cambio entre los derivados con grupos periféricos carboxílicos y los nuevos derivados con grupos carboxilato, el cambio en la solubilidad de los sistemas apunta a la obtención de los derivados aniónicos deseados. Además, en el espectro de RMN de $^{13}C\{^1H\}$ se puede observar la formación de dichos derivados por el cambio en las resonancias correspondientes al grupo carbonilo y al grupo metileno cercano a este, cuyas señales se desplazan a campo más bajo, observándose ahora en torno a 178.0 y 38.4 ppm (Fig.1.54).

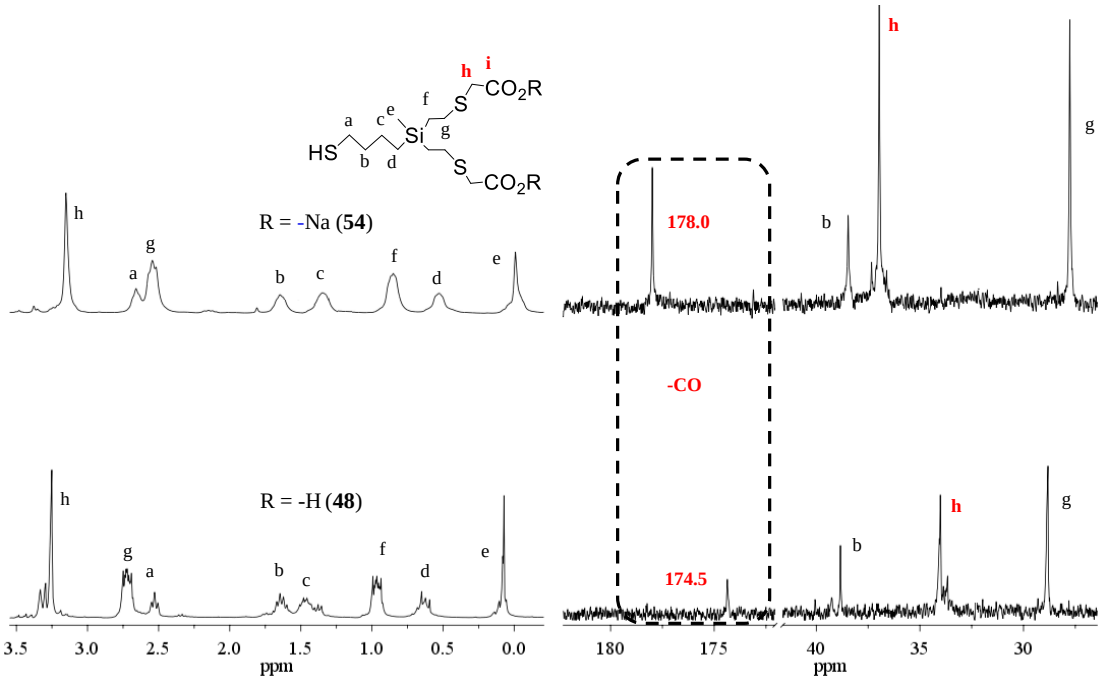
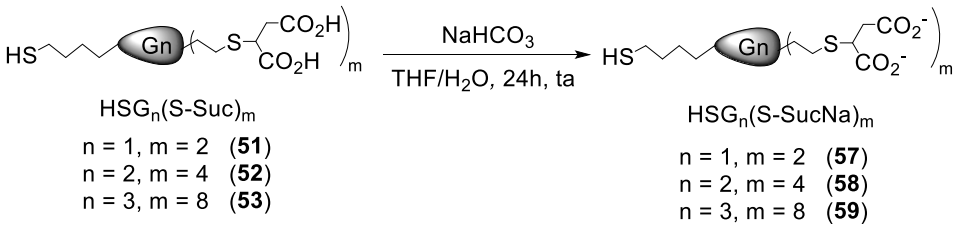


Figura 1.54. Espectros de RMN de ^{1}H (izq.) y $^{13}C\{^{1}H\}$ (dercha.) de los derivados **48** (CD_3OD) y **54** (D_2O)

1.3.4i. Dendrones $HSG_n(S\text{-}SucNa)_m$

Siguiendo la misma ruta sintética que la utilizada para la obtención de los derivados **54-56**, se obtuvieron dendrones con grupos carboxilato a partir de los compuestos $HSG_n(S\text{-}Suc)_m$ (**51-53**) (Esq.1.33). Los crudos de reacción se purificaron utilizando nanofiltración, lo que permitió obtener los compuestos aniónicos deseados $HSG_n(S\text{-}(Suc^-))_m$ (n = 1, m = 2 (**57**); n = 2, m = 4 (**58**); n = 3, m = 8 (**59**)) como sólidos amarillos con buenos rendimientos (Fig.1.55). Al igual que en los derivados **54-56** estos compuestos resultan ser solubles en agua.



Esquema 1.33. Síntesis de dendrones **57-58**

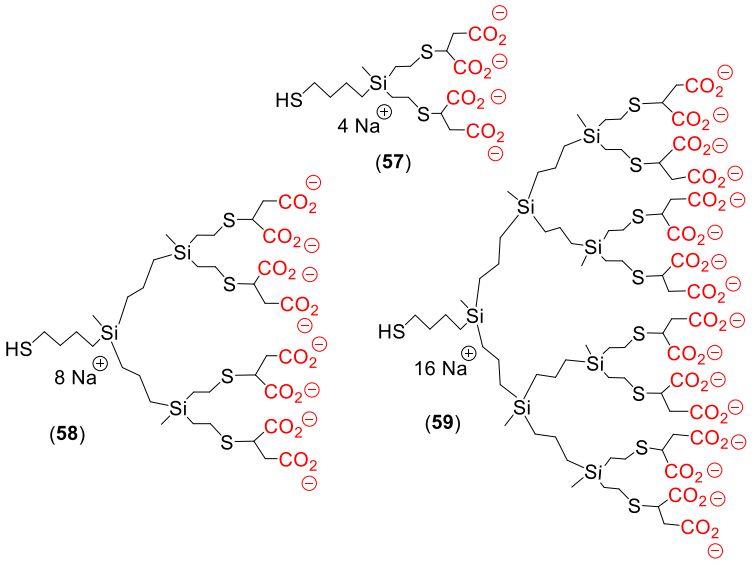


Figura 1.55. Estructuras propuestas para derivados **57-59**

Una vez más en el espectro de RMN de ^{1}H no se observan cambios significativos entre los sistemas con grupos periféricos carboxílicos y los nuevos derivados con grupos carboxilato. Sin embargo, el espectro de RMN de $^{13}C\{^{1}H\}$ permite confirmar la formación de los derivados deseados por el cambio en las resonancias correspondientes a los grupos carbonilo y a los grupos -CH- y -CH_2- cercanos a estos, cuyas señales se desplazan a campo más bajo observándose ahora en torno a 179.6 ppm (-SCH*C*O_2^-), 179.8 ppm (-SCHCH_2*C*O_2^-), 40.8 ppm (-SCH*C*$H_2CO_2^-$) y 47.4 ppm (-S*C*H$CH_2CO_2^-$) respectivamente (Fig.1.56).

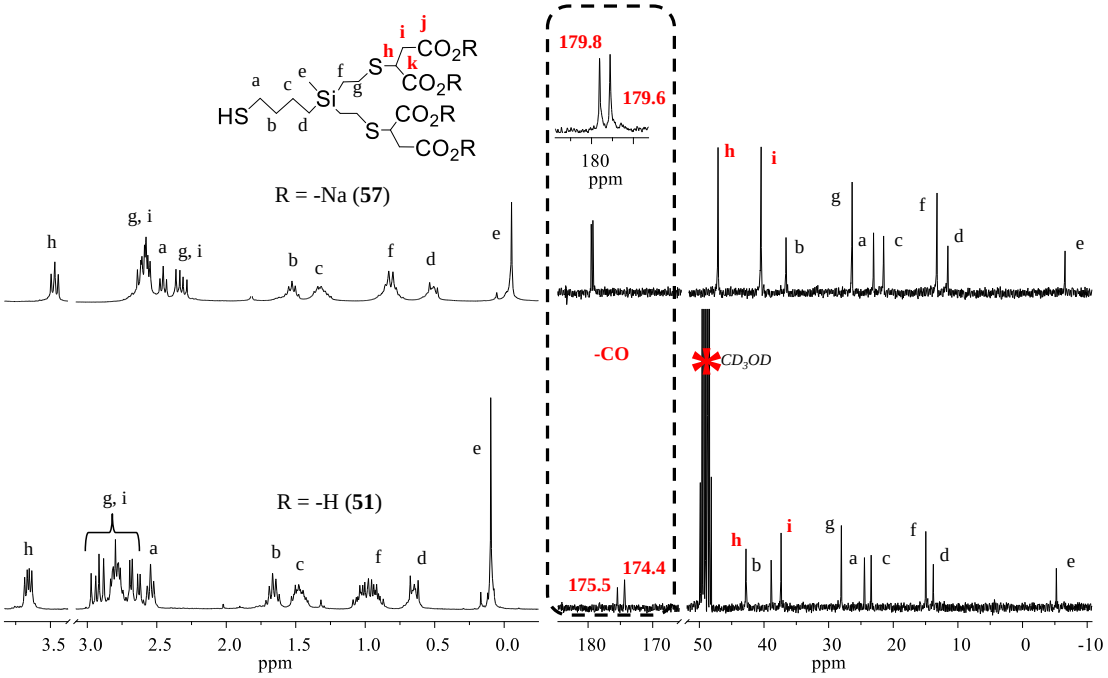


Figura 1.56. Espectros de RMN de ^{1}H (izq.) y $^{13}C^{131}$ (dercha.) de los dendrones **51** (CD_3OD) y **57** (D_2O)

1.4. CONCLUSIONES

- Se ha establecido una ruta sintética relativamente sencilla para la obtención de dendrones iónicos con un grupo -SH en el punto focal por medio de los siguientes pasos generales:

    1- Sustitución del átomo de bromo en el punto focal de los dendrones precursores por un grupo MeCOS-.

    2- Adición tiol-eno en las funciones vinilo de los dendrones con derivados tiol que presentan las funciones de interés o sus precursores.

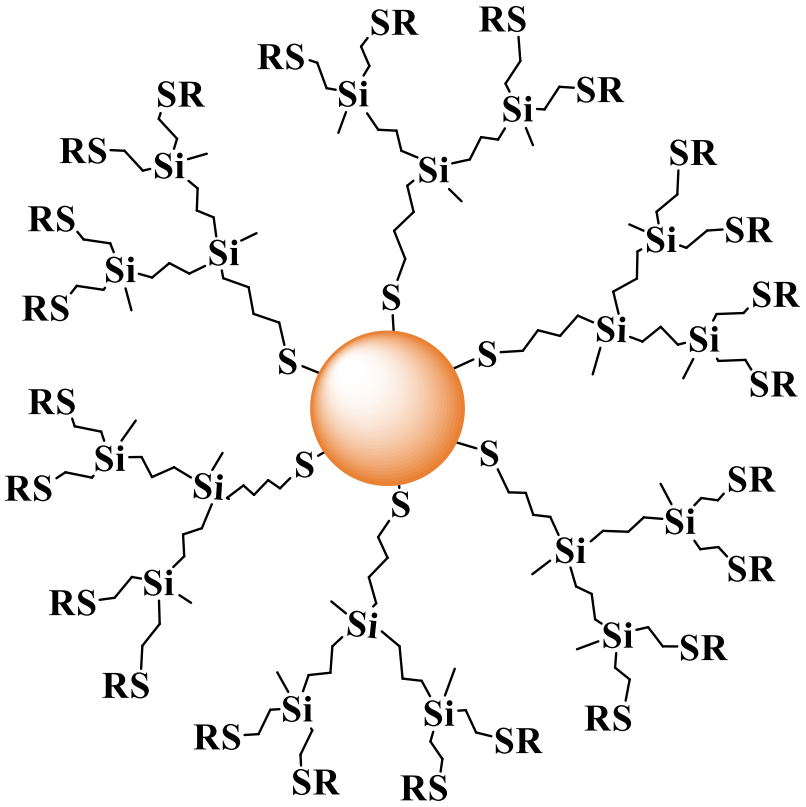
    3- Transformación de la periferia, si fuera necesario, en los grupos de interés catiónicos o aniónicos.

    4- Desprotección del punto focal y formación de un grupo tiol.

- La reacción de adición click tiol-eno ha permitido la heterofuncionalización de los sistemas, logrando obtener dendrones de cuarta generación con grupos catiónicos y una molécula de fluoresceína en la periferia.

- El grupo -SH en el punto focal de los sistemas obtenidos permitirá utilizarlos como precursores para la dendronización de nanopartículas metálicas (*Capítulo II*).

Capítulo II



Dendronización de nanopartículas metálicas con cuñas dendríticas de naturaleza carbosilano

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. Nanopartículas

En los últimos años, el uso del prefijo "*nano"* en diferentes campos del conocimiento ha aumentado significativamente. Nanomedicina, nanotecnología, nanociencia, nanoquímica son solo algunos de los ejemplos que podríamos mencionar y que encontramos no sólo en publicaciones científicas, sino también en periódicos o revistas cotidianas, convirtiéndose en un término conocido incluso para aquellos que no son expertos en el tema.

La palabra "*nano"* proviene de la palabra en latín *nanus*, cuyo significado literal es enano. En el sistema internacional de unidades (SI), el término *"nano*" se utiliza para designar una reducción del tamaño 10^9 veces, es decir, en el mundo nano se mide en nanómetros (nm) y este campo abarca sistemas cuyo tamaño se encuentra por encima de las dimensiones moleculares y por debajo de las macroscópicas (Fig. 2.1). En nanotecnología, una partícula es una unidad de material que se comporta como un todo con respecto a sus propiedades físicas y químicas.[132,133] De acuerdo a su tamaño, éstas se clasifican en partículas gruesas (>2500 nm), partículas finas (100-2500 nm) y *nanopartículas* (1-100 nm),[2b, 3] entre las que se encuentran las que se comentarán en este *Capítulo*.

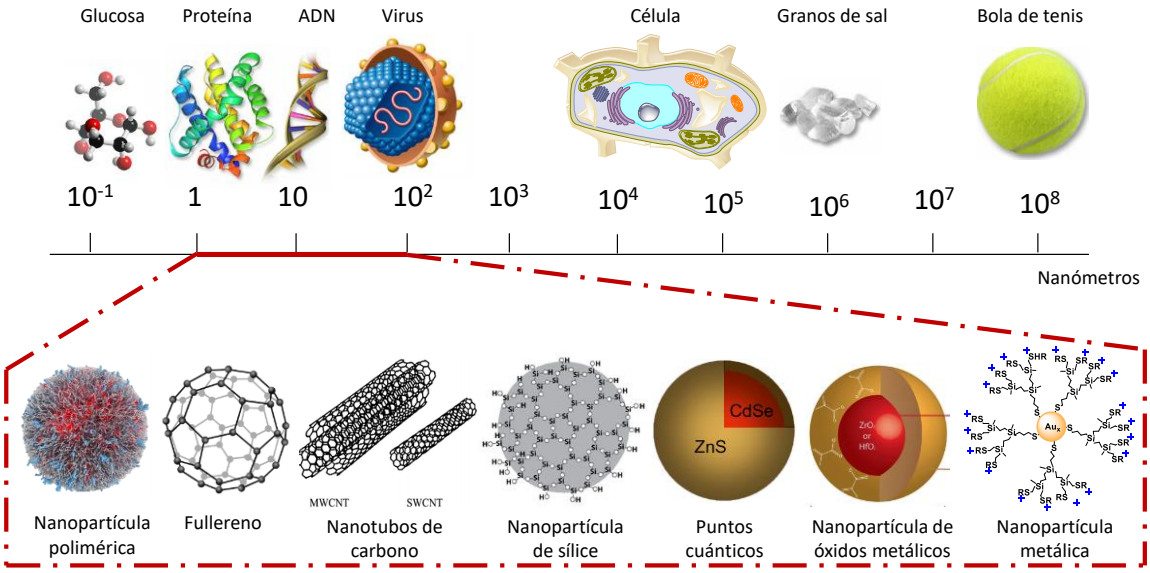


Figura 2.1. Escala nanométrica (comparación de tamaño de nanopartículas)

2.1.1a. Tipos de nanopartículas

Hoy en día existen un gran número de nanopartículas tales como: nanopartículas poliméricas,[134] basadas en carbono,[135-137] de sílice,[138] puntos cuánticos,[139] basadas en óxidos metálicos,[140] y las nanopartículas metálicas[141] (Fig. 2.1).

Por ser el objetivo del trabajo que se presenta en esta memoria, comentaremos las características de las nanopartículas metálicas, las cuales poseen interesantes propiedades estructurales, electrónicas, magnéticas, ópticas y catalíticas, siendo ampliamente utilizadas en campos tan variados como la biomedicina,[142,143] catálisis[144] y fabricación de sensores[145] entre otros.

Las propiedades tanto físicas como químicas de las nanopartículas metálicas dependen no solo de su tamaño,[146] sino también de su composición y su forma.[147] Es por esto que en el proceso de síntesis de nanopartículas es fundamental controlar el tamaño y la forma de las mismas.

Por lo general, las propiedades dependientes del tamaño están directamente relacionadas con los átomos de la superficie. A escala nanométrica, las propiedades electrónicas, ópticas y químicas pueden ser muy diferentes que a mayor tamaño.[148] En una nanopartícula, el número de átomos en la superficie es comparable con el número de átomos que se encuentra en el interior de la misma,[149] por lo cual, estos sistemas a menudo poseen propiedades ópticas inesperadas puesto que son lo suficientemente pequeños como para limitar sus electrones y producir efectos cuánticos.[150]

Las nanopartículas metálicas muestran una fuerte banda de absorción en la región visible[151] que está asociada con un fenómeno de excitación coherente y colectiva de los electrones libres en la banda de conducción y que produce una oscilación en fase, conocida como resonancia del plasmón superficial (SPR, Surface Plasmon Resonance).

A nivel microscópico, lo que sucede es que el campo electromagnético alternante de la luz incidente interacciona con la partícula, induciendo una polarización en la superficie de ésta (Fig. 2.2). La diferencia neta de carga que se genera sobre los bordes de las partículas, actúa como una fuerza restauradora, creando una oscilación dipolar de electrones con una

frecuencia de resonancia única. La energía de la resonancia del plasmón superficial depende tanto de la densidad de electrones libres como del medio dieléctrico que rodea a la partícula.

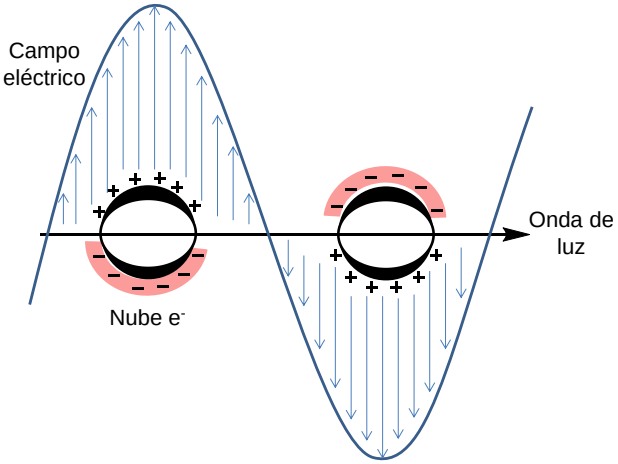


Figura 2.2. Representación de la resonancia del plasmón superficial

El tamaño de estos sistemas influye significativamente en su comportamiento. En este sentido, la SPR no se observa en partículas de tamaño inferior a 1-2 nm (dimensiones quantum), ya que sus electrones están en niveles de energía discretos. Así pues, si el diámetro de las nanopartículas metálicas aumenta, la resonancia del plasmón superficial se desplaza gradualmente a mayores longitudes de onda.[152,153] Por lo tanto, si las nanopartículas difieren en tamaño, sus características ópticas también cambiarán significativamente. La forma de las nanopartículas influye también en la naturaleza de la banda SPR.

Otro factor determinante en el comportamiento de las nanopartículas son los ligandos estabilizadores, el cual está íntimamente relacionado con su aplicación final. La superficie de una nanopartícula puede ser funcionalizada con una gama de diferentes moléculas, que además de evitar la agregación permiten conferir diferentes características. Este proceso de estabilización puede realizarse de manera electrostática, estérica o covalente (Fig.2.3).

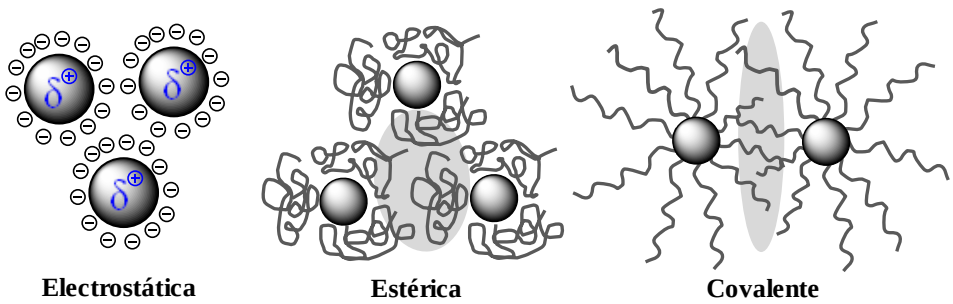


Figura 2.3. Tipos de estabilización de nanopartículas

En la estabilización electrostática, la adsorción de aniones en la superficie de la nanopartícula metálica permite crear una doble capa eléctrica que provoca una repulsión electrostática que evita que las nanopartículas se agreguen. Las nanopartículas estabilizadas electrostáticamente pueden cambiar e incluso agregarse por simples cambios de pH. Sin embargo, en algunas aplicaciones biomédicas este hecho puede resultar favorable, como en el caso de nanopartículas cuyo cambio de pH permite el transporte y liberación de medicamentos cargados tanto positiva como negativamente.[154,155]

Por otro lado, la estabilización estérica puede lograrse por medio de surfactantes o polímeros que rodean la nanopartícula formando una barrera estérica que evita que las nanopartículas entren en contacto evitando así su agregación.[156,157]

La estabilización covalente se logra por la unión directa de los ligandos a la superficie metálica, permitiendo obtener sistemas estables independiente del pH.[158] Sin embargo, muchos de estos sistemas no son solubles en agua. Es por esto que se han preparado nanopartículas en las cuales los agentes estabilizantes se unen a la superficie de la partícula mediante enlaces covalente pero que contienen grupos polares (generalmente iónicos) que facilitan su solubilidad en medios acuosos.[159,160]

En la última década, las nanopartículas de oro (AuNPs) y plata (AgNPs) han recibido especial atención por sus atractivas propiedades electrónicas y químicas y sus posibles aplicaciones en el desarrollo de nuevas tecnologías. Las AuNPs presentan una baja toxicidad y alta biocompatibilidad,[161] lo que ha permitido su uso en transporte y liberación de fármacos, terapia génica, imagen, entre otros campos de interés biomédico.[143,162,163] Por otro lado, las AgNPs también muestran características llamativas para su aplicación en biomedicina, siendo utilizadas ampliamente como agentes antibacterianos, antivirales y anticancerígenos.[164-167]

Debido a los requerimientos de control, tamaño y forma de las nanopartículas para sus posteriores aplicaciones, se han desarrollado diferentes métodos de síntesis para la obtención de dichos sistemas.

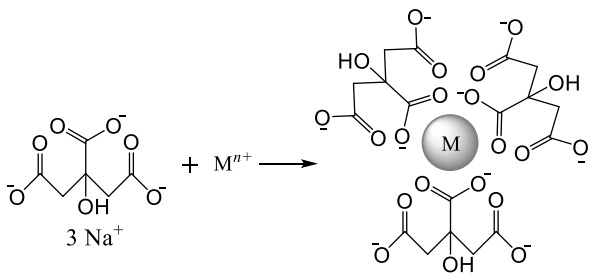
2.1.1b. Síntesis de nanopartículas de Au y Ag

Uno de los problemas asociados a las nanopartículas es la elevada tendencia que presentan a flocular en presencia de electrolitos. Por tanto, es necesario tomar las precauciones necesarias en su preparación con el fin de evitar la formación de agregados o su precipitación.

La preparación de AuNPs y AgNPs generalmente implica la reducción química de una sal en medio acuoso u orgánico para generar el núcleo metálico. El paso clave es la estabilización de dicho núcleo con moléculas que se unen a la superficie de la misma aumentando su estabilidad y neutralizando las fuerzas electrostáticas de las mismas. Ya que como se ha mencionado anteriormente, las propiedades que poseen las nanopartículas pueden verse afectadas al variar su tamaño, es deseable la preparación de sistemas con un rango de distribución de tamaño pequeño. Para lograr esto, es necesaria la generación rápida de partículas iniciales, seguida de un crecimiento lento.[168] No obstante, si el tamaño de las nanopartículas disminuye, su agregación aumentará debido al aumento de la energía superficial. Por esta razón, después de alcanzar el tamaño deseado es necesario estabilizar la superficie mediante la adición de agentes estabilizantes.[169]

Método de Turkevitch

Probablemente, uno de los métodos más populares para síntesis de nanopartículas es el *método de Turkevitch*,[170] actualizado más tarde por Frends.[171] Este método consiste en la reducción de una sal que contiene los iones metálicos utilizando citrato de sodio en agua. En esta síntesis, el citrato utilizado además de actuar como agente reductor también hace la función de agente estabilizante (Esq. 2.1).[172,173]



Esquema 2.1. Síntesis de nanopartículas método Turkevitch

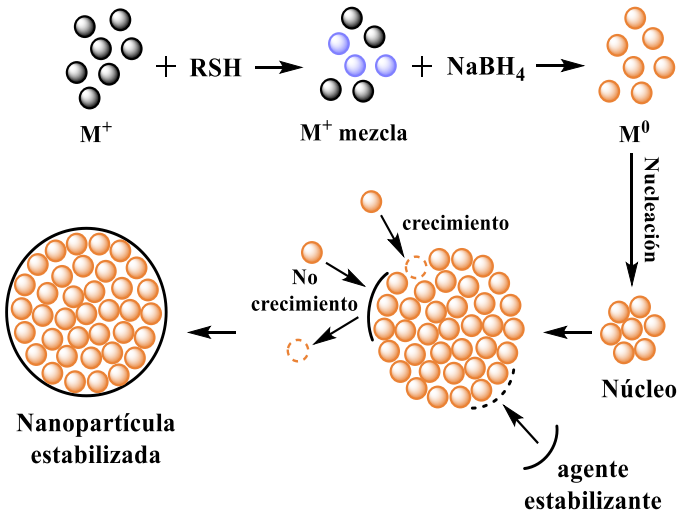
Esta estrategia produce AuNPs con un rango de dispersión de tamaño pequeño, logrando obtenerse nanopartículas de entre 2 y 100 nm según las condiciones de reacción.[171,174] Una gran cantidad de nanopartículas se han sintetizado utilizando este método, aunque para nanopartículas mayores de 30 nm se observaron variaciones en cuanto a polidispersidad y morfología.[175] Un cambio en el pH de la soluciones que contienen el ion metálico también permite manipular el tamaño de las nanopartículas obtenidas.[176]

Nanopartículas de plata también han sido sintetizadas utilizando este método.[177-179] Sin embargo, estos sistemas mostraban un limitado control en cuanto a tamaño se refiere.[180] Así, en las mismas condiciones en las cuales se obtienen AuNPs esféricas con una distribución estrecha de tamaño, para AgNPs se obtienen sistemas con una distribución ancha (60-200 nm) y con diferentes formas.

Método de Brust-Schiffrin

Otro método ampliamente utilizado para la síntesis de nanopartículas es el *método de Brust-Schiffrin*,[181] el cual se inspira en una publicación previa de Faraday.[182] Este es un método bifásico que utiliza ligandos tiol que se enlazan fuertemente al metal, debido al carácter ácido/base blando que poseen ambos.[183]

En este método de síntesis, al igual que en el método de Turkevitch, se utilizan iones metálicos de una sal disueltos en agua. Los iones son transferidos a una fase orgánica por la acción de un agente de transferencia de fase, por ejemplo, el bromuro de tetraoctilamonio (TOABr). Seguidamente, los iones metálicos se reducen en presencia de tioles (ligandos estabilizantes) por la acción del agente reductor ($NaBH_4$), formándose las nanopartículas deseadas (Esq.2.2).[184] El punto de inicio es la generación de átomos metálicos, lo que origina la formación del núcleo de la nanopartícula. El núcleo formado ofrece una superficie capaz de asimilar tanto agentes estabilizantes como nuevos átomos metálicos. La reducción de los iones metálicos puede originarse tanto por la acción de tioles adicionados para su posterior estabilización, como directamente por la acción del agente reductor. No obstante, la formación inicial del núcleo se produce solamente al añadir el agente reductor. [185]



Esquema 2.2. Representación de la formación de una nanopartícula

Esta técnica sintética permite obtener nanopartículas térmicamente estables con una distribución pequeña de tamaño y estables al aire. Además, las nanopartículas obtenidas pueden ser aisladas y redisueltas sin que se agreguen o se descompongan, algo bastante deseable para su posterior manipulación.[181] Nanopartículas con tamaños entre 1 y 10 nm se pueden sintetizar utilizando este método ajustando la proporción agente estabilizante/metal. Posteriormente se han realizado estudios de esta ruta de síntesis observándose que a mayores ratios molares agente estabilizante/oro, se obtenían partículas de menor tamaño. Además, la adición rápida del agente estabilizante y la disminución en la temperatura de la mezcla de reacción conducía a la formación de nanopartículas más pequeñas y con menores rangos de dispersión de tamaño.[186,187] Una modificación de este procedimiento sintético de dos fases es la reacción en una sola fase descrita por Brust en la que se utiliza el *p*-mercaptofenol como agente estabilizante.[188] A partir de este estudio, un gran número de investigaciones se han dedicado al diseño de nanopartículas con otros agentes estabilizantes tales como tioles,[189] aminas,[190] silanos,[191] fosfinas[192] y disulfuros.[131,193]

2.1.1c. Funcionalización de nanopartículas

La introducción, modificación y sustitución de los agentes estabilizantes en la superficie de las nanopartículas resulta útil para introducir grupos funcionales específicos para su posterior aplicación. Este proceso puede realizarse por medio de una reacción de intercambio de ligando sobre una nanopartícula preformada, ya sea por el método de Turkevitch o por el

de Brust-Schiffrin,[194,195] o bien introduciendo directamente agentes estabilizantes durante el proceso de formación de la nanopartícula que poseen grupos funcionales útiles para su posterior aplicación. En este sentido, es conocido el uso de tioles en la funcionalización de nanopartículas metálicas[196,197] por la alta afinidad que tiene el azufre por algunos de metales (Au, Ag) confiriéndole a las nanopartículas una alta estabilidad.

Funcionalización con dendrímeros

El uso de dendrímeros como agentes estabilizantes en la obtención de nanopartículas metálicas ha sido descrito en bibliografía.[198] En algunos casos, los dendrímeros actúan como plantillas anidando las nanopartículas en el interior de sus ramas y evitando de este modo su agregación (Fig.2.4).[199] Las nanopartículas funcionalizadas de esta forma suelen llamarse nanopartículas estabilizadas con dendrímeros (siglas en inglés DENs).[200,201] Por ejemplo, se han descrito este tipo de sistemas con dendrímeros tipo Fréchet,[202-204] PAMAM[205-207] y PPI.[208-210]

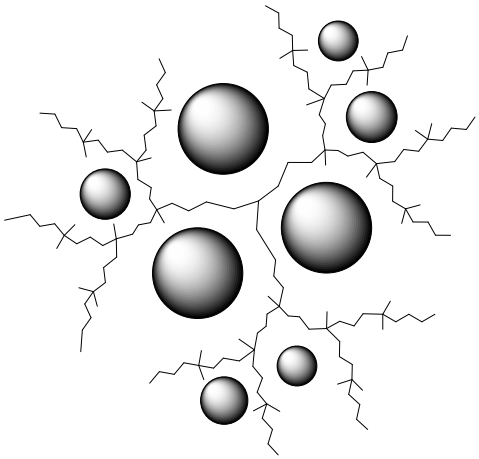


Figura 2.4. Representación esquemática de estabilización de nanopartículas utilizando dendrímeros como plantillas

Otra forma de estabilización de nanopartículas con dendrímeros es por medio de la adición de grupos funcionales periféricos que interactúen con la superficie de la nanopartícula para evitar su agregación. En ésta, el dendrímero se comporta como un agente tensioactivo (Fig.2.5).[211] Normalmente, este método da como resultado nanopartículas más grandes y con una distribución de tamaño de partícula más amplia en comparación con la estabilización por una sola molécula de dendrímero en la que el dendrímero actúa como plantilla.

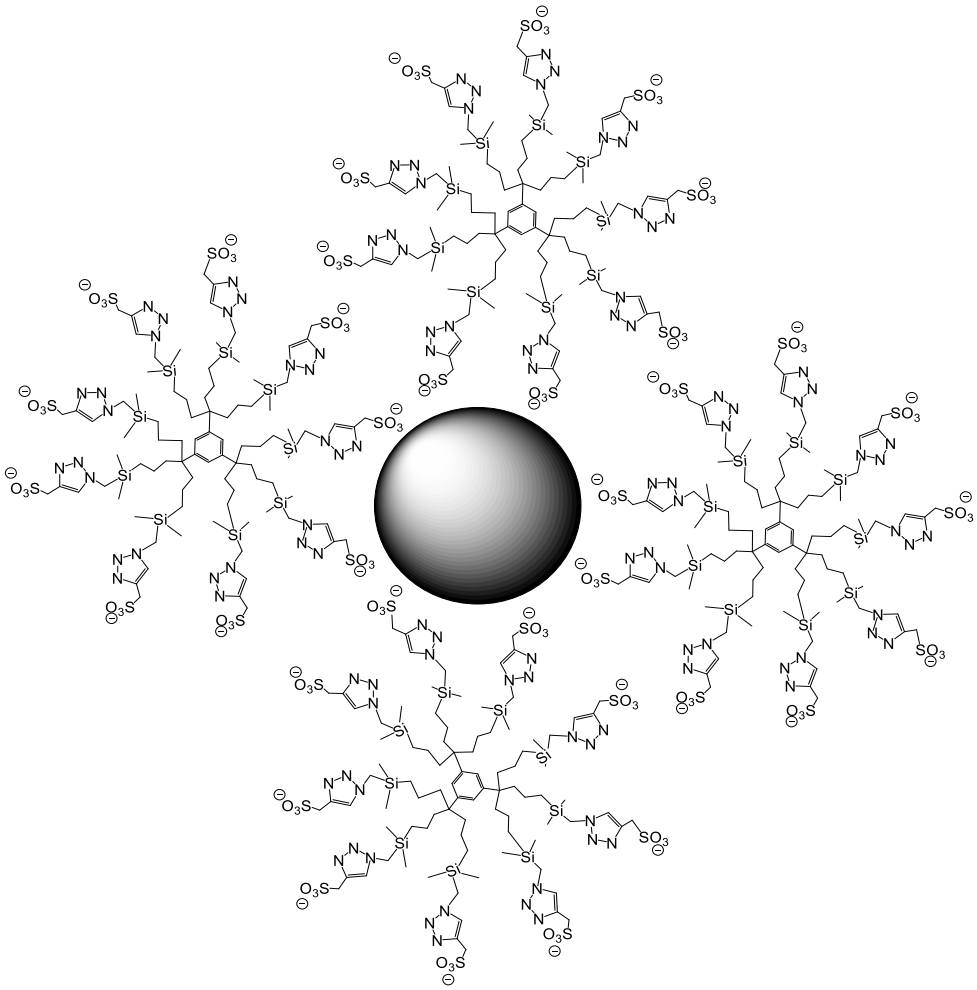


Figura 2.5. Nanopartícula funcionalizada con dendrímero como agente tensioactivo

La generación dendrítica y algunos otros factores influyen en la formación de la nanopartícula. Por ejemplo, en algunas nanopartículas de oro estabilizadas de este modo, se observó una dependencia de su tamaño con la proporción de grupos amino con respecto a $HAuCl_4$ y a los grupos amino situados en el interior del dendrímero. El tamaño de las nanopartículas disminuía al disminuir la generación dendrítica y por ende, la concentración menor de grupos amino permitía la formación de nanopartículas más pequeñas.[212,213]

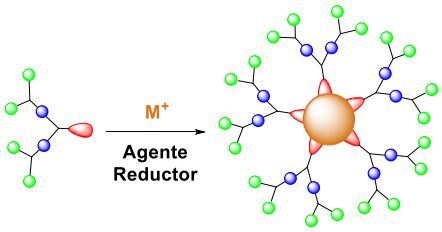
En la funcionalización de nanopartículas utilizando este método no necesariamente debe formarse la nanopartícula en presencia del dendrímero, pudiendo sintetizarse las nanopartículas utilizando otros surfactantes que pueden ser reemplazados posteriormente por los dendrímeros, debido a un mayor número de grupos capaces de actuar de forma quelato y/o debido a un incremento de la entropía, ya que un dendrímero puede poseer varios grupos funcionales liberándose varias moléculas de otros surfactantes por cada moléculas de dendrímero unido.[214]

Funcionalización con dendrones

La funcionalización de nanopartículas con dendrones, comúnmente denominada dendronización de nanopartículas, está basada en el método descrito por Brust.[181] La obtención de nanopartículas utilizando dendrones aumenta la estabilidad de los sistemas y modifica algunas de sus propiedades.[215-217] Los dendrones con grupos funcionales adecuados en el punto focal, pueden utilizarse como ligandos y unirse a la nanopartícula formando sistemas estables. Existen actualmente tres estrategias sintéticas para la obtención de nanopartículas dendronizadas, las cuales se describen a continuación.[218]

Método directo

La primera estrategia sintética es el *método directo* que consiste en un solo paso de reacción en el cual los dendrones poseen en el punto focal un grupo funcional adecuado para su anclaje sobre la superficie de la nanopartícula (Esq. 2.3).[54,215,219-221]



Esquema 2.3. Síntesis de nanopartículas por el método directo

Las nanopartículas funcionalizadas por este método contienen un único tipo de ligando en su superficie. Estos sistemas no son monodispersos, formando sistemas de nanopartículas con distribución estadística de diferentes tamaños cada uno de los cuales posee un número ligeramente diferente de dendrones.

Las características como el tamaño, estructura y polidispersidad de estas nanopartículas dependen directamente de los dendrones utilizados para su funcionalización.[222] Así, el tamaño[223-225] y la forma[216,226] del núcleo puede controlarse por el efecto dendrítico, es decir, cada generación de dendrón nos lleva a la obtención de una nanopartícula con un tamaño específico de núcleo. Las nanopartículas sintetizadas por este método poseen grandes espacios vacíos cerca del núcleo, lo que les confiere propiedades para su uso como plantillas o capsulas.[227] Además, una parte de la superficie de la nanopartícula permanece disponible haciéndolas apropiadas para el uso en catálisis[81] y vehiculización de otras moléculas.[222,228,229]

Dendrones de tipo Fréchet con grupo tiol en el punto focal se han utilizado para la obtención de nanopartículas de oro por el método directo.[230] Del mismo modo, nanopartículas funcionalizadas con dendrones que poseían un grupo 4-piridona en el punto focal fueron obtenidas, observándose que el tamaño de las nanopartículas aumentaba al aumentar la generación.[181] Utilizando esta metodología Rosell y col. han obtenido nanopartículas dendronizadas con cuñas de naturaleza carbosilano estables tanto en disolución como en polvo y con una distribución de tamaño estrecha, cuyos tamaños eran de aproximadamente 2.5 nm (Fig. 2.6).[34]

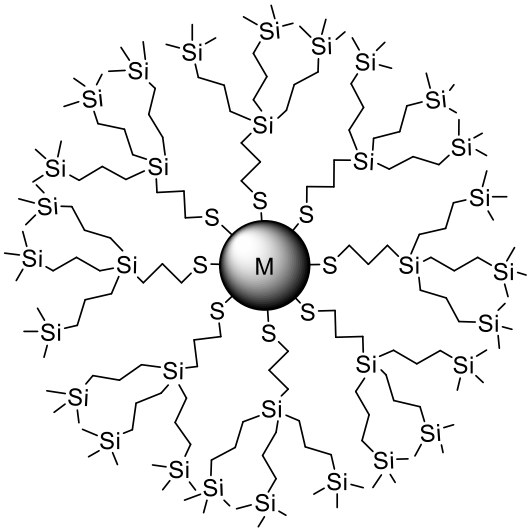
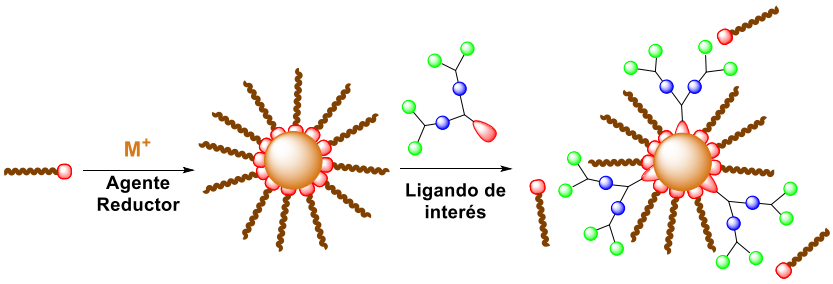


Figura 2.6. Representación de nanopartícula funcionalizada con cuñas carbosilano

Intercambio de ligando

En esta metodología sintética los ligandos de una nanopartícula preformada son parcialmente sustituidos por otros ligandos de interés (Esq. 2.4).[38,231-233] Este tipo de estrategia ha demostrado ser bastante eficaz para la introducción de diferentes funcionalidades y ha sido utilizada para la obtención de nanopartículas solubles en medio acuoso o en medio orgánico, con núcleos metálicos de diferentes tamaños y con diferentes funcionalidades en su periferia.[234,235] La reacción de intercambio de ligandos permite mantener el tamaño y la dispersión de tamaño de las partículas iniciales añadiendo además nuevas características. El mecanismo fue estudiado inicialmente por Murray, [194] aunque más adelante otros grupos estudiaron el intercambio de tioles, fosfinas o dimetilaminopiridina por tioles.[236-240]

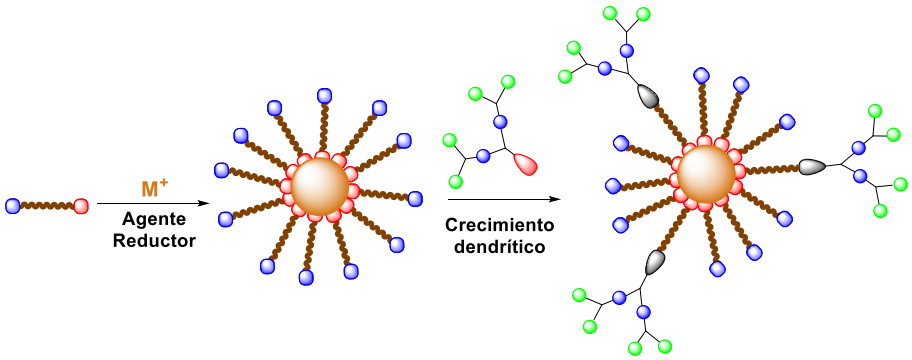


Esquema 2.4. Método de intercambio de ligandos

La obtención de nanopartículas dendronizadas por medio de intercambio de ligandos está limitada por varios factores dentro de los cuales podemos mencionar la dificultad para la incorporación de ligandos cargados,[217] el control del tamaño del núcleo independientemente del ligando utilizado para la funcionalización y la sustitución completa de los ligandos presentes en la nanopartícula precursora.[235] El grado de sustitución, es decir, la carga dendrítica, depende tanto de aspectos termodinámicos como cinéticos (ej. impedimento estérico) los cuales están relacionados con las características de los ligandos entrantes y salientes.[218]

Crecimiento dendrítico sobre nanopartículas preformadas

La dendronización de la nanopartícula puede realizarse por la modificación de grupos reactivos presentes en los ligandos que se encuentran en la superficie de la nanopartícula sintetizada.[241,242] Esta estrategia comienza con la síntesis de nanopartículas que presentan moléculas que poseen grupos periféricos funcionales,[241] los cuales son utilizados como puntos de anclaje para el crecimiento dendrítico (Esq. 2.5).[243]



Esquema 2.5. Dendronización de nanopartícula por crecimiento dendrítico

Este crecimiento dendrítico puede llevarse a cabo mediante una metodología convergente que permite la introducción de dendrones funcionalizados convenientemente en el punto focal. Por ejemplo, se han sintetizado nanopartículas funcionalizadas con ligandos que poseían grupos carboxílicos terminales, que permitieron la posterior introducción de dendrones por medio de una reacción de esterificación.[244-247]

Nanopartículas dendronizadas utilizando esta metodología, pero con un crecimiento dendrítico divergente construyendo la estructura paso a paso sobre la nanopartícula también se han sintetizado. En este sentido, dendrones tipo PAMAM G_0-G_3 se hicieron crecer directamente sobre la superficie de nanopartículas de magnetita, lo que confirió a dichas nanopartículas una mayor estabilidad y solubilidad en disolventes orgánicos.[242]

2.1.1d. Técnicas de caracterización

Para la caracterización de nanopartículas es necesario utilizar una combinación de técnicas estructurales, ya que un sólo método no permite caracterizar con exactitud sistemas tan complejos. Por ello, es importante aclarar qué información puede obtenerse de cada una de estas técnicas, teniendo en consideración que sólo serán descritas las utilizadas para la caracterización de los sistemas preparados en este trabajo, que son los más utilizados para la caracterización de nanopartículas en general.

Espectroscopía Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

La espectroscopía UV-Vis estudia las transiciones electrónicas debida a interacciones con fotones. Las propiedades ópticas de las nanopartículas cuya SPR (ver 2.1.1a) se encuentra en el rango visible han sido extensamente estudiadas por espectroscopía de UV-Vis.

En las nanopartículas, las propiedades ópticas son dependientes del tamaño, observándose un desplazamiento al disminuir el tamaño de la nanopartícula, permitiendo por medio de la espectroscopía de UV-Vis determinar los tamaños de estos sistemas.[248-252]

Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas más grandes se pueden explicar por la teoría de Mie.[253] En este sentido, Rothenberg presentó un método para estimar el tamaño de nanoclusters por medio de espectroscopía UV-Vis y la teoría de Mie, el cual permite la estimación del tamaño directamente de los espectros UV-Vis. Los resultados obtenidos se han validado mediante microscopía de transmisión electrónica.[254] Sin embargo, en el caso de nanopartículas metálicas más pequeñas, cercanas a 2 nm, el tamaño no puede ser determinado por esta técnica.

Para AuNPs y AgNPs, la SPR también es sensible al medio circundante y a los grupos periféricos de la nanopartícula.[254-256] De manera experimental, AuNPs (5-20 nm) y AgNPs (3-60 nm) exhiben una banda de absorción UV-Vis intensa característica aproximadamente a 520-540 nm y 400-420 nm respectivamente, la cual disminuye en intensidad y energía al disminuir el tamaño de las MNPs.[257-259]

Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

La microscopía de transmisión electrónica, TEM, es una herramienta potente que ha sido utilizada para determinar el tamaño y la forma de todo tipo de nanopartículas.[260-262] Esta técnica utiliza un haz de electrones centrado y transmitido por medio de una muestra ultrafina, permitiendo medir parámetros como tamaño y distribución de tamaño del núcleo metálico.[263-265] El contraste en esta técnica está dado por la densidad electrónica y como ésta es mucho mayor para el núcleo metálico que para la capa de ligandos periféricos éstos no se pueden observar directamente.

Para que los datos cuantitativos sean significativos, es necesario procesar cientos de nanopartículas. Además, hay que tener en cuenta que si se observa alguna agregación sobre una rejilla TEM, esta puede deberse a una agregación secundaria en la superficie y no refleja necesariamente el estado de la muestra en disolución.[266]

Esta técnica suele ser la que se utiliza inicialmente para determinar el diámetro y distribución de tamaño. Una vez que se obtiene un grupo representativo de imágenes, la siguiente tarea consiste en contar tantas partículas como sea posible, idealmente unos pocos miles, para obtener un valor representativo de la magnitud y distribución por tamaño de la

muestra. Para evitar el conteo tedioso y poco representativo de nanopartículas "a ojo y mano", es preferible utilizar un método asistido por ordenador. Estudios sobre el uso de este tipo de software para un conteo de nanopartículas rápido y fiable han sido realizados.[267] Un cálculo posterior permite estimar el número de átomos en el núcleo, así como los ligandos de la superficie, asumiendo una forma esférica y la densidad del metal igual a su densidad a granel.[111,268-270]

Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se emplea para determinar la variación en la masa de una muestra al ser sometida a un programa de temperaturas bajo atmósfera controlada. La pérdida o ganancia de masa en función de la temperatura, aporta información sobre la estabilidad térmica y composición de una muestra. Este análisis permite obtener información sobre el comportamiento de las nanopartículas frente a la temperatura y comprobar si existe materia orgánica en su superficie. Al analizar la curva de descomposición, se obtiene la cantidad de masa que se descompone y la masa residual de la muestra. Para las MNPs, la masa que se descompone corresponde a los ligandos que estabilizan la nanopartícula, mientras que la masa residual o contenido de cenizas corresponde al metal.[257]

Se ha demostrado que los análisis por TGA producen una fracción de peso orgánico para las nanopartículas que es consistente con sus análisis elementales.[269] A partir del tamaño promedio del núcleo obtenido por TEM y el porcentaje orgánico obtenido por TGA se puede estimarse la cantidad de ligandos en la superficie de la nanopartícula. Para nanopartículas de forma esférica, se puede incluso calcular un peso molecular aproximado. En el apartado 2.3.2a se encuentra descrito un ejemplo para la realización de dicho cálculo.

Difusión de luz dinámica (DLS)

Es una técnica para la determinación del tamaño en suspensión que mide el movimiento browniano de las nanopartículas y lo relaciona con su tamaño nanométrico. Por medio de la medición de las fluctuaciones de intensidad a lo largo del tiempo se puede determinar el coeficiente de difusión traslacional y posteriormente el diámetro hidrodinámico. La fluctuación de intensidad depende del tamaño de la nanopartícula. Como consecuencia del

movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, provocando cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas (Fig.2.7).

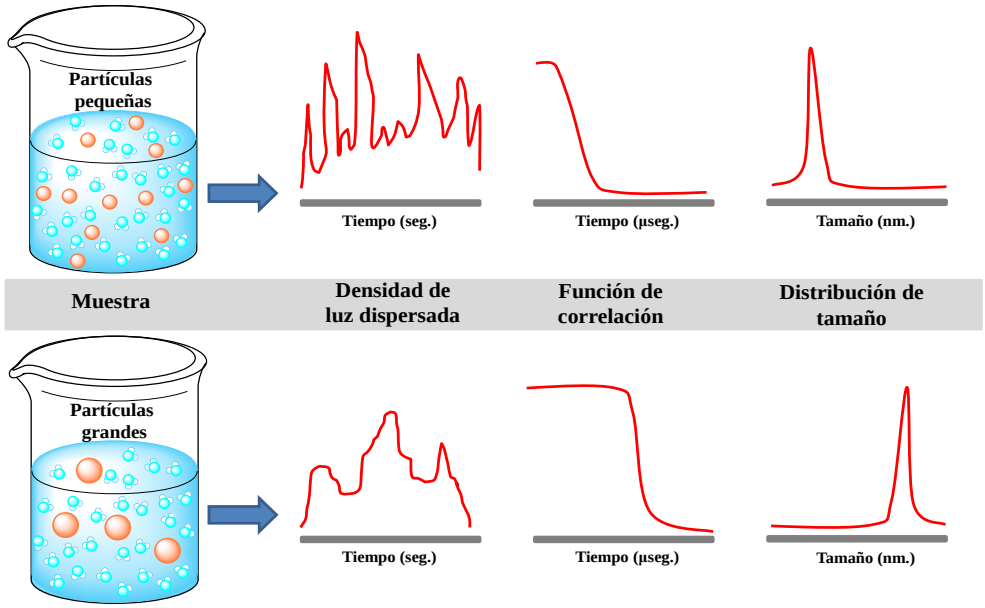


Figura 2.7. Representación de DLS para nanopartículas pequeñas (arriba) y nanopartículas grandes (abajo)

Este método de análisis se ha utilizado ampliamente para la caracterización de sistemas de nanopartículas en suspensión con tamaños entre 2-500 nm. No obstante, la polidispersidad de las muestras puede distorsionar los resultados, pues con la presencia de al menos una nanopartícula de gran tamaño, el valor de la distribución de tamaño enmascara el valor real.[271-273]

Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos X (XPS)

Es una de las técnicas utilizada para la caracterización de superficies que proporciona información sobre los elementos presentes en una muestra, así como sobre su estado de oxidación y/o situaciones del entorno. La superficie de la muestra se irradia con fotones provenientes de una fuente de rayos X en condiciones de ultra alto vacío. La incidencia de un fotón sobre los átomos situados más superficialmente en la muestra provoca, por efecto fotoeléctrico, la emisión de fotoelectrones (Fig.2.8) con una energía de enlace específica en términos de elemento y nivel atómico.

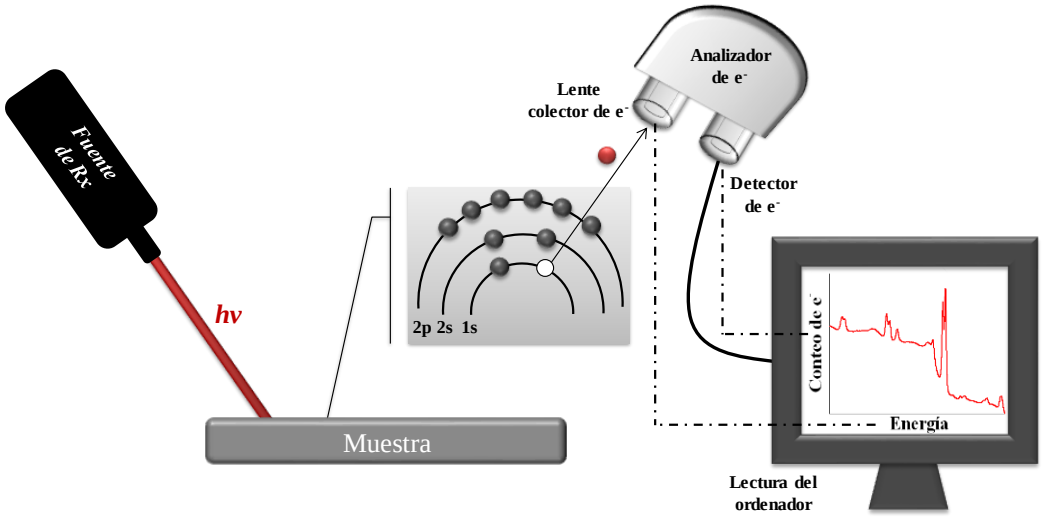


Figura 2.8. Diagrama de espectrofotómetro XPS

La energía de enlace de los picos asociados a la emisión de fotoelectrones está muy bien definida, permitiendo identificar el estado de oxidación de cationes y aniones. Esta energía determina el espectro XPS de un compuesto químico. Así, átomos no equivalentes del mismo elemento (diferencia en el estado de oxidación, en las moléculas que lo rodean o en la posición en la red) provocan un cambio apreciable en la energía de enlace. La caracterización de nanopartículas por XPS permite obtener información importante acerca de los grupos funcionales localizados en la superficie.[274]

Potencial Z

El potencial Z es una técnica que mide el potencial electrostático en la doble capa eléctrica que rodea una nanopartícula en disolución (Fig.2.9). Las nanopartículas con un potencial zeta entre -10 y 10 mV se consideran aproximadamente neutras, mientras que las nanopartículas con potenciales zeta mayores de 30 mV o inferiores a -30 mV se consideran fuertemente catiónicas y fuertemente aniónicas respectivamente.[275] Las nanopartículas con un potencial zeta cuyo valor absoluto sea mayor de 30 mV han demostrado ser estables en suspensión. El potencial zeta también se puede utilizar para determinar si un material cargado es encapsulado en el centro de la nanopartícula o en la superficie.[276]

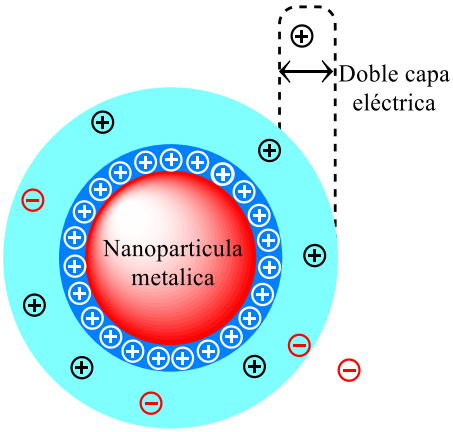


Figura 2.9. Representación de la doble capa en Potencial Z

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Esta técnica permite el estudio de los ligandos que se encuentran en la superficie de la nanopartícula. En el caso de la síntesis de nanopartículas por el método de intercambio, un aspecto importante es la confirmación de que dicho intercambio ha tenido lugar y poder además cuantificar dicho intercambio. En este sentido, la técnica de RMN es particularmente útil debido a la relación directa entre las señales del espectro de RMN y la cantidad de grupos presentes.[277-280] Sin embargo, para lograr resultados cuantitativos, es necesaria en muchos casos la previa digestión de la nanopartículas debido a la anchura que presentan las señales que se encuentran más cercanas a la superficie metálica, pues la cercanía de los protones a ésta produce una relajación más rápida dando como resultado un ensanchamiento de las señales.[281]

2.1.1e. Aplicaciones

Los recientes avances en el estudio de las nanopartículas han conducido a su aplicación en diversos campos (Fig.2.10). Estos sistemas han sido utilizados como sensores tanto biológicos como químicos,[282-284] en terapia y diagnóstico médico,[285-290] en imagen,[145,291] y en catálisis,[292-294] entre otros campos.

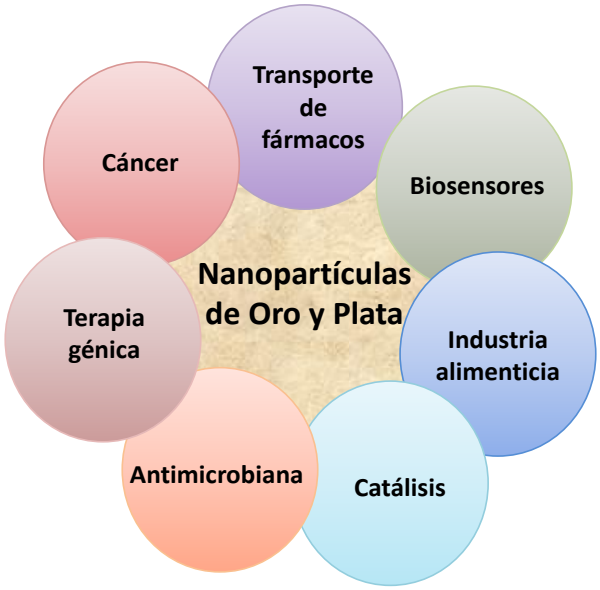


Figura 2.10. Aplicaciones de resientes de nanopartículas de Oro y Plata

En concreto, las AuNPs debido a su biocompatibilidad han demostrado ser herramientas muy útiles en varias aplicaciones biomédicas como detección, análisis y tratamiento de enfermedades. Los recientes avances en AuNPs han dado lugar a una serie de aplicaciones muy importantes, como por ejemplo, en la terapia binaria del cáncer.[295-297] Estos sistemas también han sido utilizados en terapia génica, por ejemplo, en tratamientos *in vivo* para el transporte de ADN a células de retina.[298] Otro ejemplo es su uso para la detección de secuencias específicas de ADN y ARN.[299]

Por otra parte, estudios realizados en células cancerígenas y no cancerígenas mostraron que las AgNPs eran capaces de causar la muerte celular programada *in vitro* induciendo la muerte celular por medio de la ruta apoptótica.[300] AgNPs también han demostrado ser efectivas contra bacterias Gram+ y Gram- dentro de las que se pueden mencionar: Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus.[301]

En el *Capítulo III* de esta memoria se incidirá en las aplicaciones biomédicas de estas nanopartículas metálicas.

2.2. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

2.2.1. Presentación

La investigación de nanopartículas es actualmente un área de interés científico debido a una amplia variedad de aplicaciones potenciales en biomedicina. El uso de estos sistemas se basa en sus características importantes y únicas, tales como su relación de superficie a masa, que es mucho más grande que la de otras partículas y materiales, lo que les permite soportar una gran cantidad de ligandos en su superficie. Además, la facilidad de intercambiar los ligandos superficiales o de introducir varios en una misma nanopartícula permite el uso de estos sistemas en transporte de fármacos,[302-304] terapia génica,[305-307] diagnóstico,[308-310] o como agentes terapéuticos per se,[311] entre otros.[312]

2.2.2. Objetivos

En nuestro grupo de investigación se han sintetizado sistemas dendríticos de naturaleza carbosilano con grupos periféricos catiónicos y aniónicos que han demostrado tener propiedades atractivas en aplicaciones biomédicas.[112,116,119-121] Por ello, el objetivo principal de este trabajo es aportar las características de estos sistemas dendríticos a nanopartículas metálicas mediante procesos de dendronización intentando encontrar nuevas propiedades en estos compuestos nanoestructurados que mejoren o amplíen las propiedades de ambos sistemas por separado.

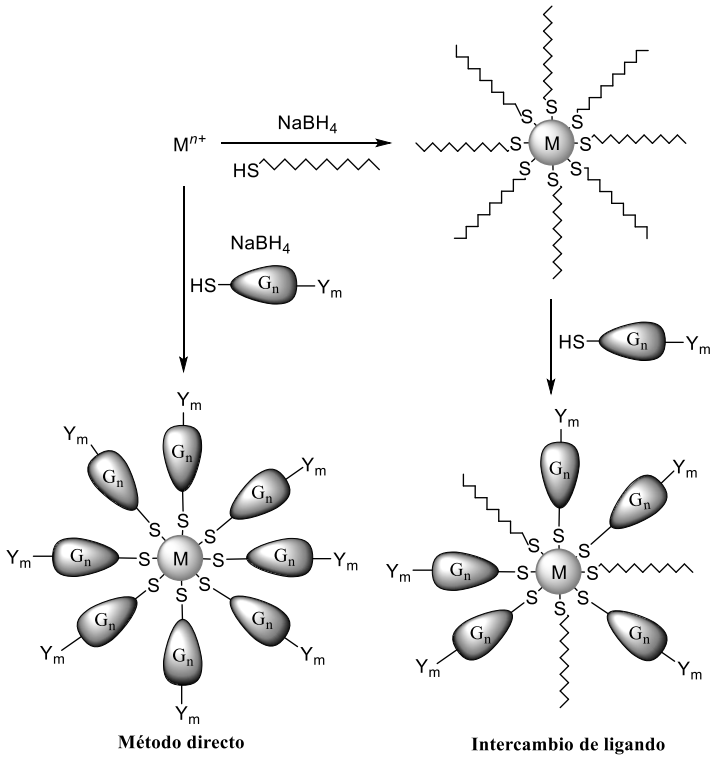
En este capítulo hemos utilizado los dendrones carbosilano previamente sintetizados (*Capítulo I)* que poseen un grupo tiol, -SH, en el punto focal para la dendronización de nanopartículas metálicas de oro y plata.

El objetivo principal mencionado anteriormente, se puede desglosar en los siguientes objetivos particulares, que nos hemos planteado para el desarrollo de este *Capítulo*.

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas catiónicas y aniónicas de oro por medio de procesos de dendronización con cuñas de naturaleza carbosilano.
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de plata catiónicas por medio de procesos de dendronización con cuñas de naturaleza carbosilano.

2.3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE ORO Y PLATA

Para la obtención de nanopartículas metálicas de oro y plata, hemos utilizado los dendrones de naturaleza carbosilano previamente sintetizados (*Capítulo I*) y que poseen un grupo -SH en el punto focal. Las nanopartículas se obtuvieron utilizando dos estrategias sintéticas, el método directo o bien el de intercambio de ligando a nanopartículas preformadas cubiertas con ligandos dodecanotiolato (Esq. 2.6).



Esquema 2.6. Síntesis de nanopartículas metálicas

Para nombrar las nanopartículas sintetizadas en este capítulo utilizaremos la nomenclatura abreviada $M_x(G_nY_m)_y$, la cual se detalla a continuación:

- **M_x =** metal del cual está formado el núcleo metálico, donde **x** representa el número de átomos de dicho metal.
- **G_n** = generación dendrítica, donde **n** está determinada por el número de capas átomos de silicio.
- **Y_m** = grupos funcionales periféricos, donde **Y** representa la naturaleza química del grupo y **m** el número de grupos funcionales presentes.
- **y** = número de dendrones presentes en la superficie de la nanopartícula.

2.3.1. Metodologías Sintéticas

Para la obtención de nanopartículas metálicas de oro y plata se utilizaron tres aproximaciones sintéticas las cuales se describen brevemente a continuación y que se encuentran recogidas con más detalle en el *Capítulo IV*:

2.3.1a. Método directo bifásico

En este método los iones metálicos de las sales son transferidas desde la fase acuosa a la fase orgánica utilizando un agente de transferencia de fase. Una vez transferidos, los iones metálicos son reducidos en presencia de los ligandos protectores.[181]

2.3.1b. Método directo en una sola fase

En esta metodología la reducción de los iones metálicos se realiza en fase acuosa en la que tanto la sal que contiene estos iones como los ligandos protectores son solubles.[188]

2.3.1c. Método de intercambio

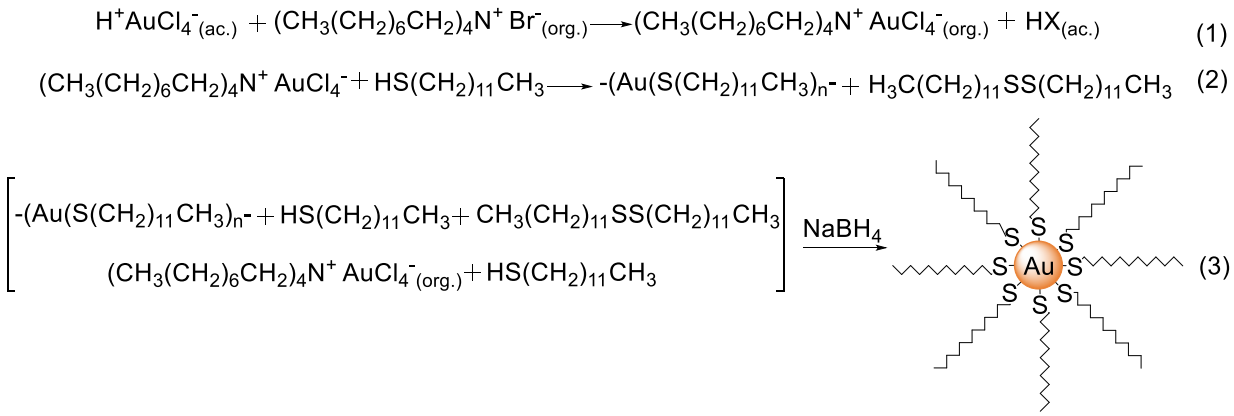
En este procedimiento se utiliza una nanopartícula preformada en la cual los ligandos de la superficie son intercambiados por los dendrones.[231]

2.3.2. Preparación de nanopartículas funcionalizadas con ligandos dodecanotiolato

2.3.2a. AuNPs-dodecanotiolato

Para la obtención de nanopartículas de oro funcionalizadas con ligandos dodecanotiolato se utilizó el método directo bifásico, descrito anteriormente en bibliografía. La relación Au/L utilizada para la obtención de las nanopartículas precursoras ha sido de 1:1, puesto que a esta ratio se logran obtener sistemas con un tamaño de aproximadamente 2 nm. Para ello, a una disolución acuosa de $HAuCl_4$ se le adicionó una disolución en tolueno de bromuro de tetraoctilamonio (TOABr). La mezcla se agitó hasta que los iones metálicos fueron transferidos de la fase acuosa a la fase orgánica (Esq.2.7 (1)), fácil de identificar pues una vez que todos los iones son transferidos el color pasa de la fase acuosa a la fase orgánica. A

continuación, se adicionó dodecanotiol ($HS(CH_2)_{11}CH_3$) el cual produce la reducción de algunos iones Au^{III} a Au^{I} (Esq. 2.7 (2)). Seguidamente, se adicionó una disolución acuosa de borohidruro sódico ($NaBH_4$) que reduce tanto los iones Au^{I} como los Au^{III} presentes a Au^0 (Esq. 2.7 (3)). La fase orgánica que contiene las nanopartículas se separó de la acuosa y se concentró. Las nanopartículas se precipitaron con etanol, eliminando de este modo el dodecanotiol libre. El residuo obtenido se secó dando lugar a las nanopartículas deseadas (**60**) como un polvo que puede resuspenderse en disolventes orgánicos (tolueno, hexano, entre otros).



Esquema 2.7. Síntesis de AuNPs (**60**) funcionalizadas con dodecanotiol

En el espectro de absorción UV-Vis no se observó la señal a 300 nm correspondiente a los iones Au^{III} lo que evidencia la total reducción de estos a Au^0. No obstante, la banda de SPR característica para AuNPs es casi imperceptible lo que apunta a que las nanopartículas formadas poseen un tamaño cercano a 3 nm de diámetro, ya que para sistemas pequeños la SPR normalmente no es detectable (Fig. 2.11).

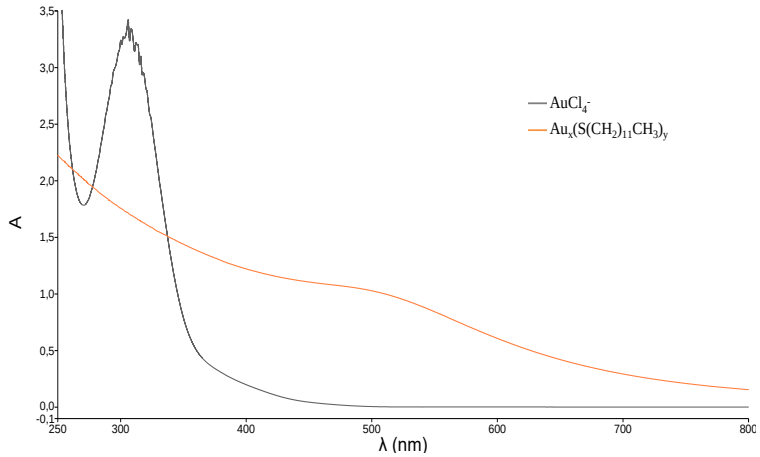


Figura 2.11. Espectros UV-Vis de iones Au^{III} (gris) y de las AuNPs (**60**)

La microscopía de transmisión electrónica (TEM) permite observar que las AuNPs (**60**) obtenidas son esféricas y que poseen un diámetro promedio de 2.8 nm justificando baja intensidad de la banda perteneciente a la SPR (conteo de nanopartículas utilizando el programa Imagen J) (Fig. 2.12).

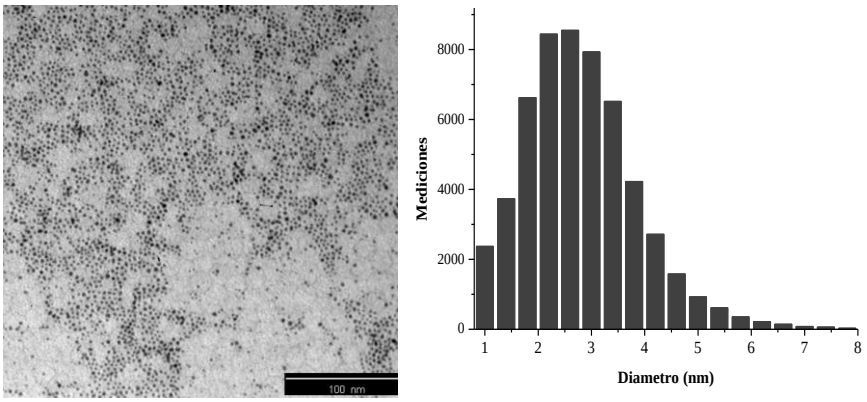


Figura 2.12. Imagen TEM y diagrama de distribución de tamaño de las AuNPs (**60**)

Por otro lado, la espectroscopía de IR permitió verificar la presencia de los ligandos dodecanotiolato en la superficie de la nanopartícula, observándose en el espectro de IR de AuNPs (**60**) las bandas de vibración, tensión y flexión de los enlaces C-H correspondientes a los grupos metileno y metilo de los ligandos dodecanotiolato a 2922 cm^{-1} y 1465 cm^{-1} respectivamente (Fig. 2.13).

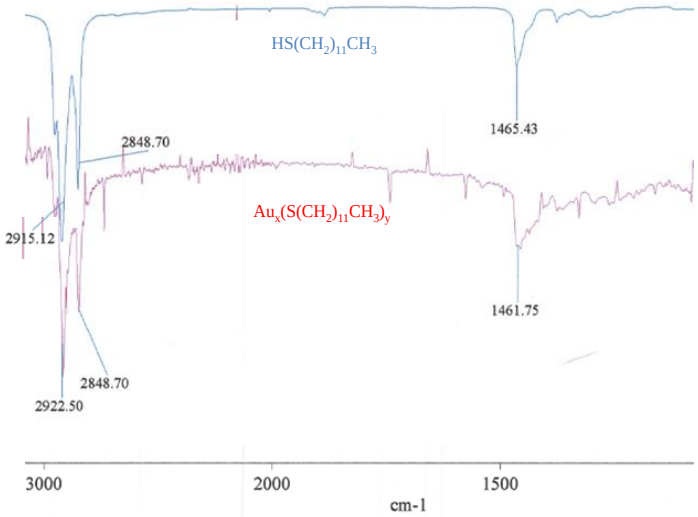


Figura 2.13. Espectros IR de dodecanotiol (azul) y de AuNPs (**60**) (rojo)

Los análisis obtenidos por termogravimetría (TGA), permitieron determinar los porcentajes de materia orgánica (dendrones en la superficie metálica) y el residuo (cantidad de metal en el núcleo) presentes en la nanopartícula. Con estos datos, y el diámetro promedio

obtenido para las nanopartículas por TEM, se pudo determinar el peso molecular aproximado de las nanopartículas obtenidas. Cabe destacar que para la determinación de este peso molecular se ha asumido que las nanopartículas son esféricas. De este modo, el peso molecular se ha calculado como sigue:[313]

1- A partir de los valores de peso atómico y densidad del átomo de oro se calculó el número de átomos presentes en 1 nm^3:

Pm Au = 196.96 g/mol,

ρ Au = 19.3 g/cm^3

N. Avogadro = 6.02×10^{23} átomos/mol

$(19.3\ \cancel{g}/cm^3)/(196.96\ \cancel{g}/mol) = (0.098\ mol/\cancel{cm}^3)(1\ \cancel{cm}^3/1 \times 10^{21} nm^3)$

$= (9.799 \times 10^{-23}\ \cancel{mol}/nm^3)(6.022 \times 10^{23}\ átomos/\cancel{mol}) =$ 59 átomos/nm^3

2- Utilizando la fórmula del volumen de la esfera, a partir del diámetro promedio obtenido por TEM (2.8 nm) se calculó el número de átomos de oro presentes en el núcleo metálico:

$$N_{Au} = (59\ átomos/nm^3)(4/3\ \pi)(D/2)^3 = (59\ átomos/\cancel{nm}^3)(4/3\ \pi)(2.8\ \cancel{nm}/2)^3$$
$$= 678{,}14\ átomos \approx 678\ átomos$$

3- Por último, el número de ligandos presentes en la superficie de la nanopartícula se calculó utilizando la relación Au/ligando, obtenida en el análisis termogravimétrico:

$$N_L = N_{Au}/(Au/L) = 678/(2.65) = 255.84 \approx 256\ ligandos$$

De esta forma se establece la fórmula molecular para las AuNPs (**60**) con grupos dodecanotiolato $Au_{678}(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_{256}$ y su peso molecular aproximado 185097.28 g/mol.

El espectro de RMN de ^1H también permitió corroborar la presencia de los ligandos dodecanotiolato, observándose las señales correspondientes a los grupos metileno intermedios y al grupo metilo terminal en torno a 0.84 ppm y 1.22 ppm respectivamente. También se observa la desaparición de la señal correspondiente al protón del grupo tiol y al metileno más cercano a este. Además, la presencia del núcleo metálico provoca un ensanchamiento de las señales (Fig.2.14).

Este mismo comportamiento se observa en todas MNPs descritas en este *Capítulo* y por tanto no volveremos a mencionarlo cuando describamos la caracterización de cada una de ellas.

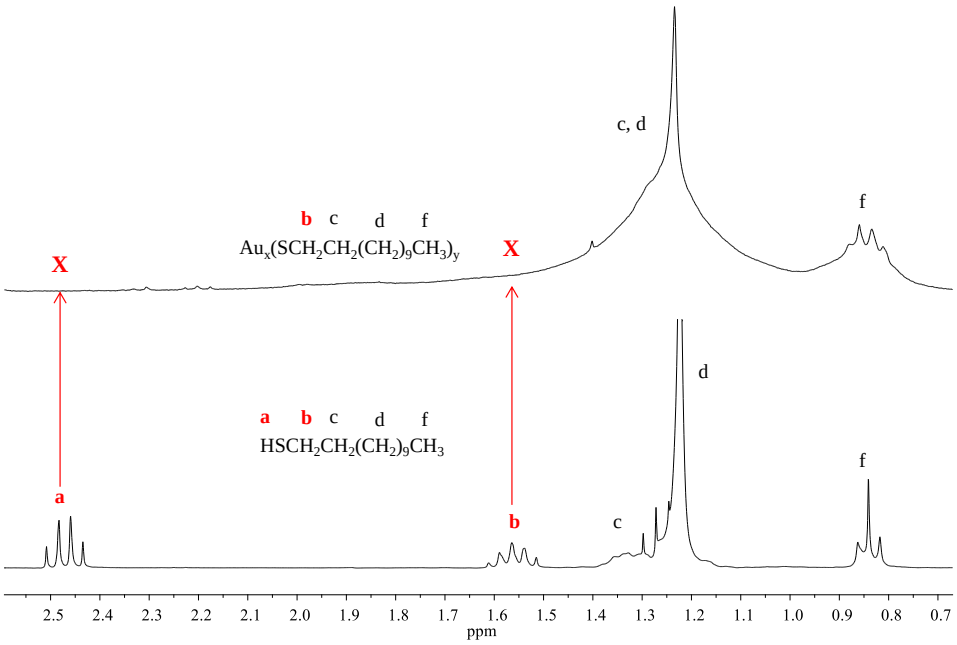
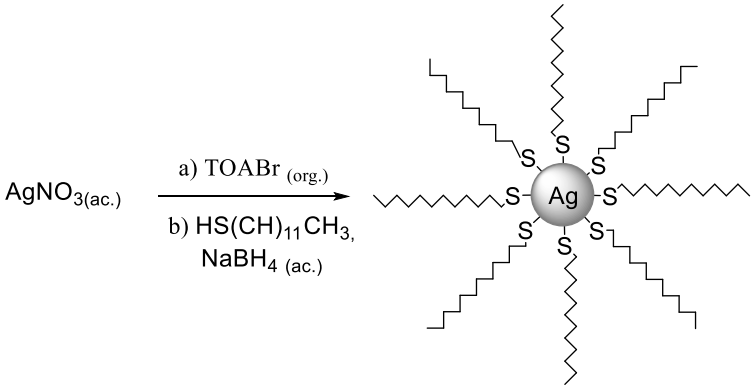


Figura 2.14. Espectros de RMN ^{1}H en CDCl3 de la AuNPs **60** y el dodecanotiol

2.3.2b. AgNPs-dodecanotiolato

Las nanopartículas de plata funcionalizadas con dodecanotiolato fueron sintetizadas utilizando el método directo bifásico. Así, la reducción del $AgNO_3$ en presencia de dodecanotiol permite obtener las AgNPs (**61**) decoradas con ligandos dodecanotiolato (Esq. 2.8).



Esquema 2.8. Síntesis de AgNPs **61**

El espectro de UV-Vis para las AgNPs **61** muestra la banda de SPR característica para nanopartículas de plata en torno a 445 nm, esto permite confirmar la formación del compuesto deseado (Fig. 2.15)

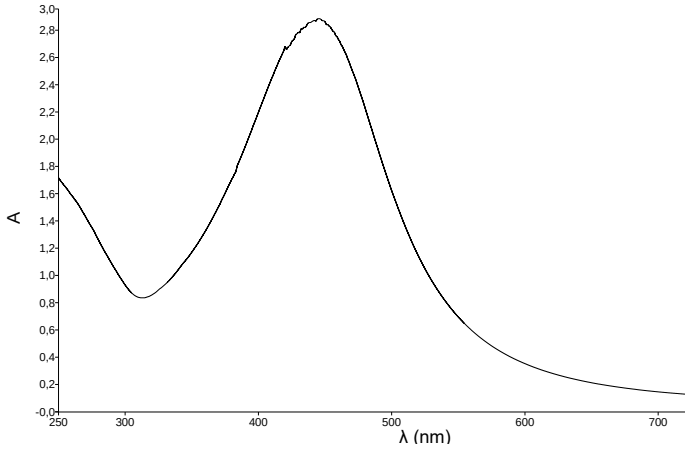


Figura 2.15. Espectros UV-Vis de AgNPs **61**

Las imágenes TEM de la AgNPs **61**, muestran que las nanopartículas obtenidas eran esféricas y que poseían un diámetro promedio de 3.3 nm (Fig. 2.16).

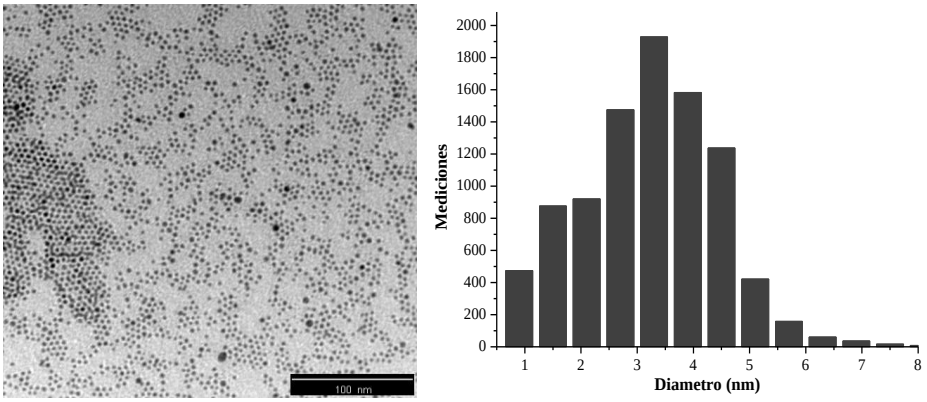


Figura 2.16. Imagen TEM y diagrama de distribución de tamaño de AgNPs **61**

Al igual que para las AuNPs **60**, los análisis de TGA junto al valor promedio del diámetro obtenido por TEM, permitieron calcular el peso molecular aproximado de las AgNPs utilizando las mismas ecuaciones descritas previamente y teniendo en cuenta que en 1 nm^3 hay 58.6 átomos de plata. Así, se obtuvo una fórmula molecular para las nanopartículas **61** de $Ag_{1103}(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_{390}$ y un peso molecular aproximado de 197855.52 g/mol.

El espectro de RMN de ^{1}H nos permitió observar la presencia de los ligandos dodecanotiolato de la superficie, observándose las señales correspondientes a los grupos metileno y al grupo metilo en torno a 0.85 y 1.19 ppm respectivamente y la ausencia de la señal del grupo -SC*H*$_2$ más cercana al núcleo metálico (Fig. 2.17).

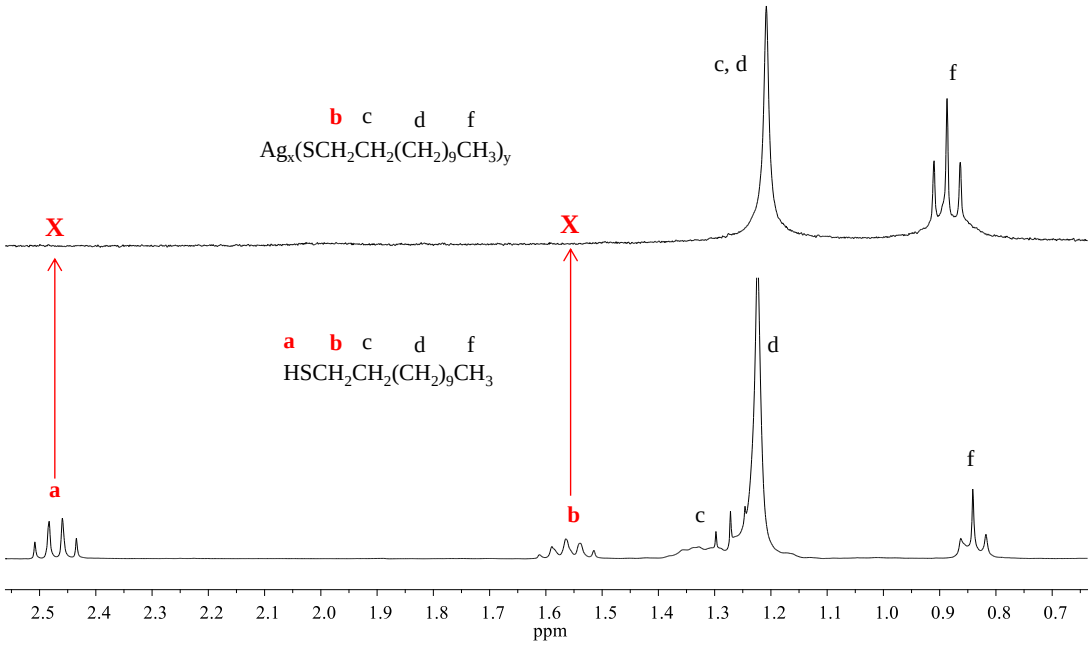


Figura 2.17. Espectro de RMN ^{1}H en CDCl3 de AgNPs **61** y el dodecanotiol

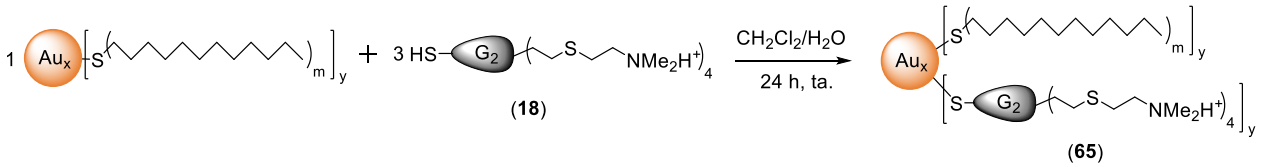
2.3.3. Nanopartículas catiónicas

Para la obtención de nanopartículas metálicas de oro y plata catiónicas se eligieron los dendrones con grupos funcionales en la superficie, -NMe$_2$H$^+$, -NMe$_2$, -NMe$_3^+$. La síntesis de estos sistemas se ha intentado por los tres métodos descritos en el apartado 2.3.1. En el caso de las nanopartículas sintetizadas por el método de intercambio dado que el interés es lograr la mayor sustitución posible de los ligandos tiolato en las AuNPs previamente formadas, se utilizó una ratio molar L$_{tiolato}$/L de 1:3. En el caso de las nanopartículas sintetizadas por el método directo la ratio molar M/L elegida fue 1:1, el mismo que para de las MNPs **60** y **61** y que de acuerdo a la información encontrada en bibliografía permitiría la obtención de sistemas con un diámetro cercano a 2 nm.

2.3.3a. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos amonio (-NMe₂·HCl)

Método de intercambio

En un primer intento para la obtención de dichos sistemas, se utilizó el método de intercambio. De este modo, a una disolución de las AuNPs **60** en CH_2Cl_2 se le adicionó una disolución acuosa del dendrón de segunda generación **18**, la mezcla se agitó a temperatura ambiente (Esq.2.9). La finalización del proceso de intercambio se identificó por la transferencia del color negro característico de las nanopartículas desde la fase orgánica a la fase acuosa, este tiempo fue de 24 horas. Una vez separadas las fases, la fase acuosa se lavó con CH_2Cl_2 para eliminar todo el dodecanotiol liberado. La purificación por diálisis permitió obtener las AuNPs, $Au_xG_2(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}(NMe_2{\cdot}HCl)_4)_z$ (**62**) que resultaron ser solubles en agua.



Esquema 2.9. Síntesis de AuNPs **62**

Las imágenes obtenidas por TEM permitieron determinar el diámetro promedio de estos sistemas cuyo valor fue de 2.4 nm, similar al observado en las AuNPs precursoras (Fig.2.18).

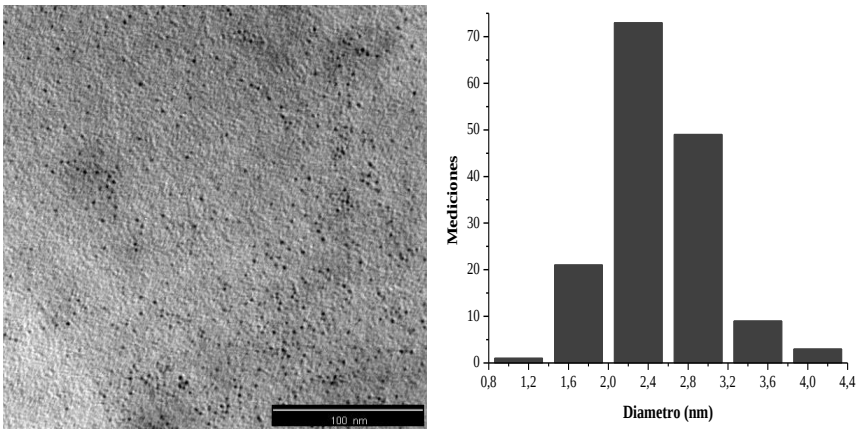


Figura 2.18. Imagen TEM y diagrama de distribución de tamaño de AuNPs **62**

En el espectro de RMN de ^{1}H obtenido para AuNPs **62** se pueden observar las señales correspondientes a los dendrones introducidos. Las señales correspondientes a los grupos metileno cercanos al nitrógeno y las del grupo metilo unido directamente a este, se ven ligeramente desplazadas a campo más alto, lo que indica que no todos los nitrógenos presentes están protonados (Fig.2.19). Esto puede deberse a la perdida de cloruro de hidrógeno durante los procesos de síntesis y purificación de las nanopartículas.

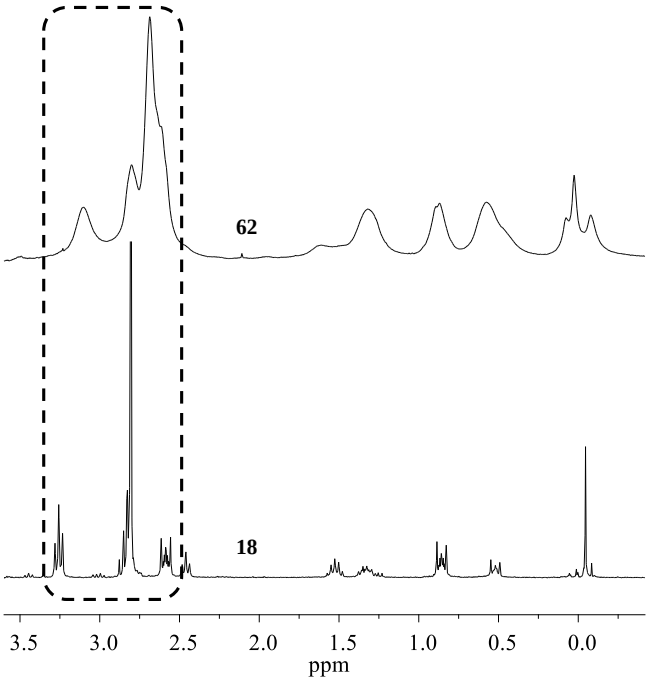
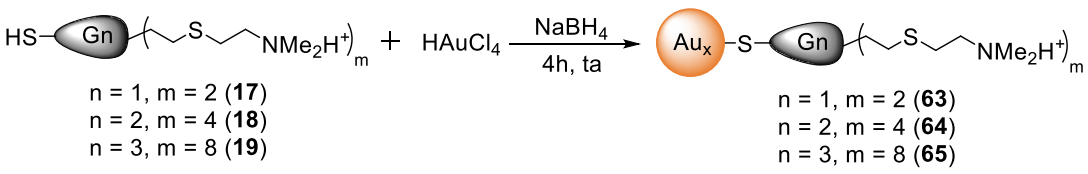


Figura 2.19. Espectro de RMN de ^{1}H de los compuestos **18** ($CDCl_3$) y **62** (D_2O)

Método directo en una sola fase

La presencia de dos ligandos diferentes sobre la misma nanopartícula en el derivado **62**, uno de ellos sin aparente actividad biológica, condujo a proponer la obtención de nanopartículas estabilizadas solamente con los dendrones catiónicos de interés. Así, se intentó una segunda estrategia sintética utilizando el método directo en una sola fase lo que permitió obtener las nanopartículas $Au_xG_n(S\text{-}(NMe_2{\cdot}HCl)_m)_y$ (n = 1, m = 2 (**63**); (n = 2, m = 4 (**64**); (n = 3, m = 8 (**65**) solubles en agua (Esq. 2.10, Fig.2.20).



Esquema 2.10. Síntesis de AuNPs **63-65** con grupos funcionales $-NMe_2H^+$

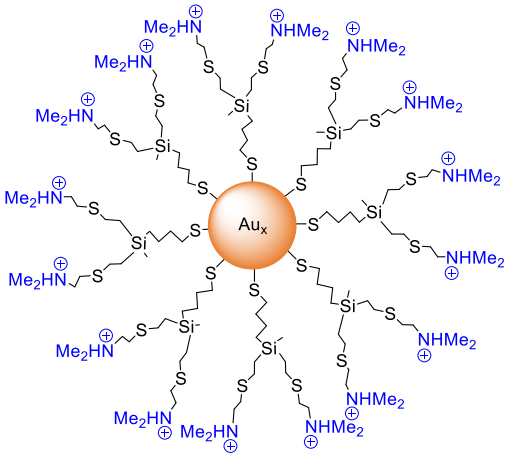


Figura 2.20. Representación de AuNPs **63**

La caracterización por UV-Vis de las AuNPs **63-65** permite verificar la presencia de la banda SPR característica de este tipo de sistemas, observándose dicha banda a 525.9 nm, 532.8 y 548.8 para nanopartículas dendronizadas con cuñas de primera, segunda y tercera generación respectivamente (Fig.2.21). Cabe destacar que la intensidad de la banda SPR para la AuNPs **65** disminuye bastante con respecto a sus análogos **63** y **64**, comportamiento que podría deberse a una disminución en el tamaño de las mismas.

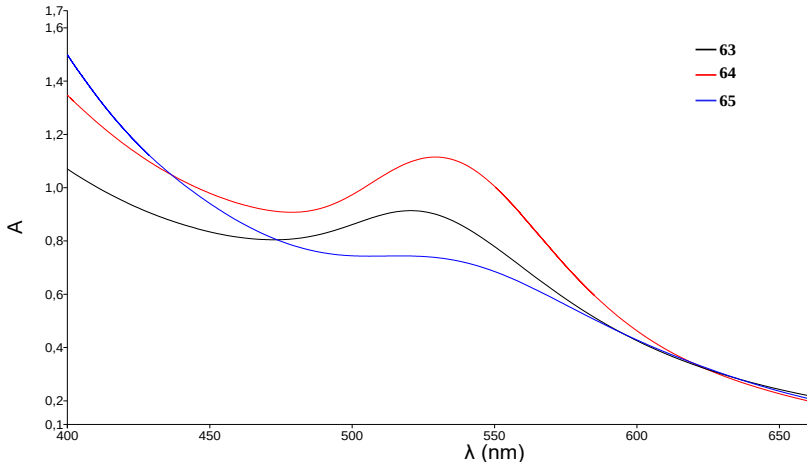


Figura 2.21. Espectros UV-Vis de AuNPs **63-65**

Por otro lado, las imágenes TEM obtenidas para las AuNPs **63-65** muestran la presencia de nanopartículas cuyo diámetro promedio fue de 2.9 nm (**63**), 6.7 nm (**64**) y 2.3 nm (**65**) (Fig.2.22). El menor tamaño observado en las AuNPs **65** concuerda con los resultados obtenidos por UV-Vis. Sin embargo, en la mayoría de las imágenes obtenidas se observó la presencia de un residuo que dificultó el tratamiento por Imagen J de las imágenes obtenidas. Este residuo posiblemente corresponde a BH_4^- que no pudo eliminarse durante los procesos de purificación por interacción con los grupos amonio presentes en los dendrones.

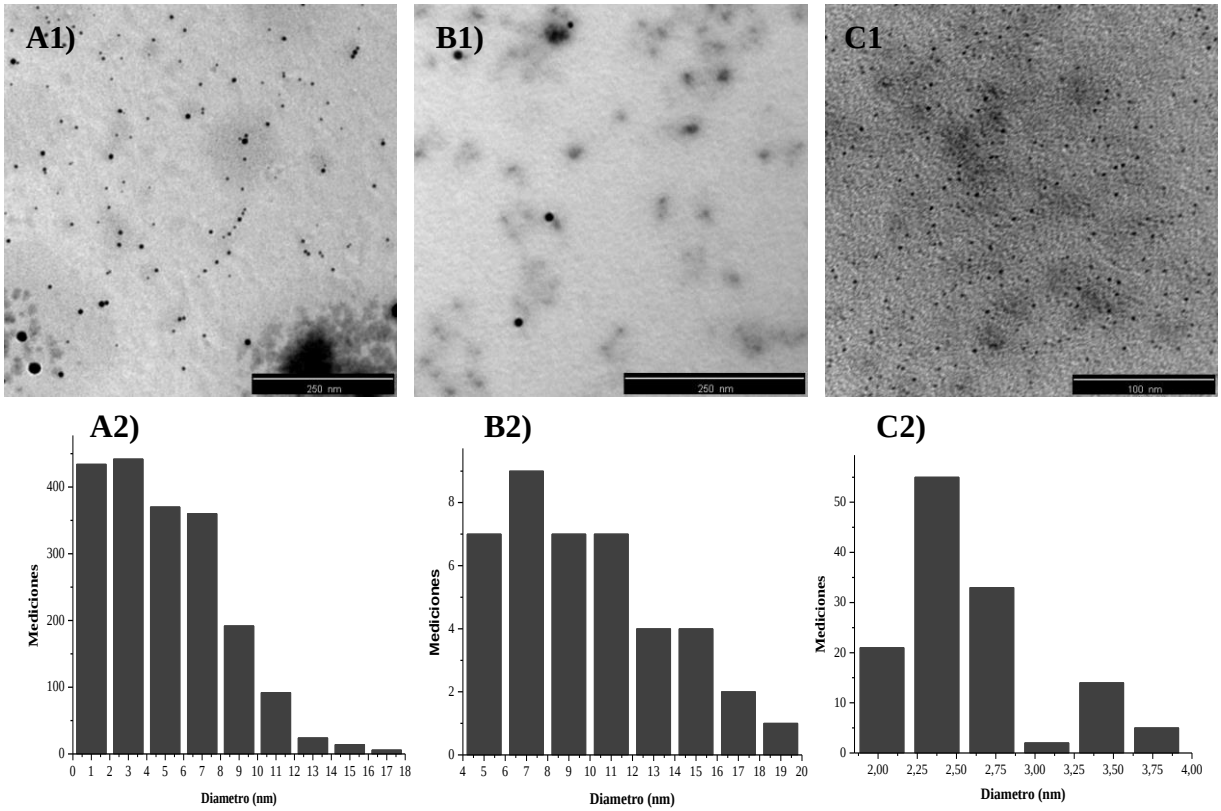


Figura 2.22. Imágenes TEM y diagrama de distribución de tamaño de AuNPs **63** (A), **64** (B) y **65** (C)

Los espectros de RMN de ^{1}H muestran el mismo comportamiento que el observado para las AuNPs **62**, es decir, un desplazamiento a menor frecuencia de los grupos metilo unidos al átomo de nitrógeno, lo que nos indica una vez más que no todos los nitrógenos poseen una carga positiva (Fig. 2.23).

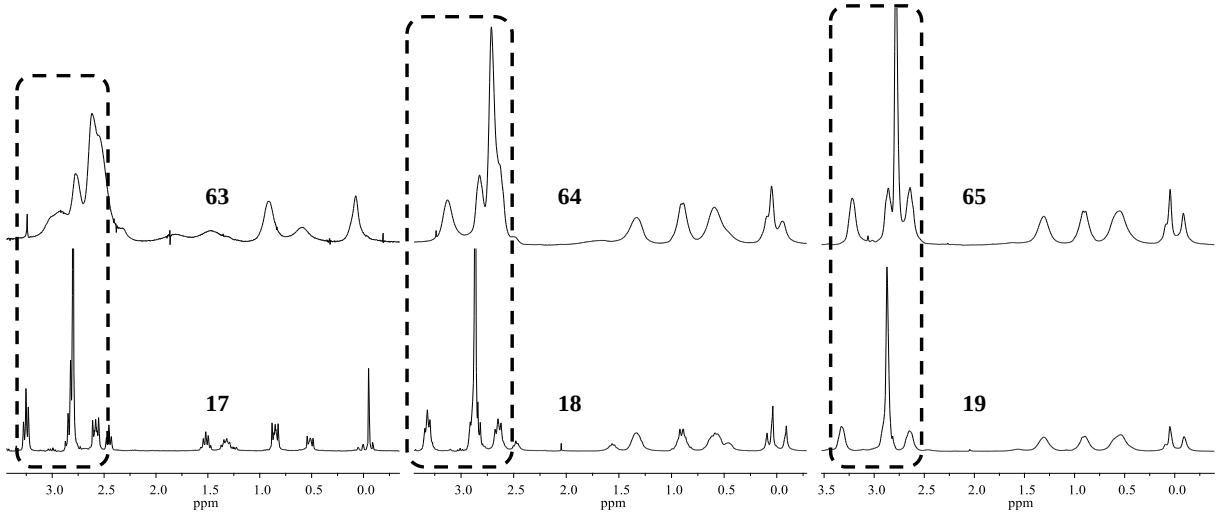


Figura 2.23. Comparación de espectros de RMN de ^{1}H de los dendrones **17-19** (17 $CDCl_3$ y 18-19 D_2O) con AuNPs **63-65** (D_2O)

Para confirmar esta suposición, AuNPs **63** se trataron con HCl y el espectro de RMN de ^1H obtenido se comparó con el espectro correspondiente al dendrón. Así al observar un desplazamiento a mayor frecuencia de las señales correspondientes a los grupos metileno y metilo unidos directamente a nitrógeno, corroboraba la parcial desprotonación de los grupos amonio durante la reacción o la purificación (Fig.2.24). En este fenómeno, como se mencionó previamente, podrían estar interviniendo los restos de $NaBH_4$ utilizado durante el proceso de síntesis.

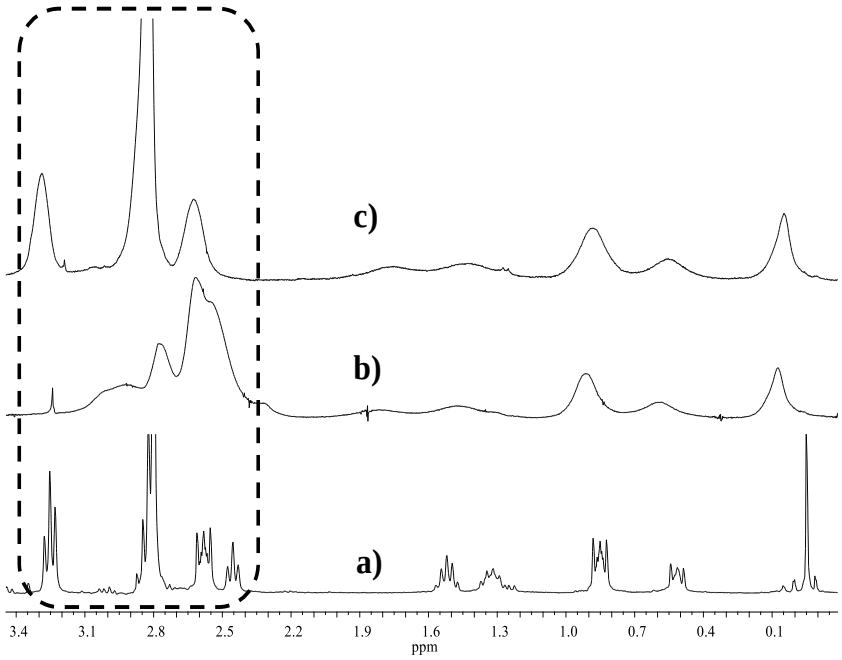


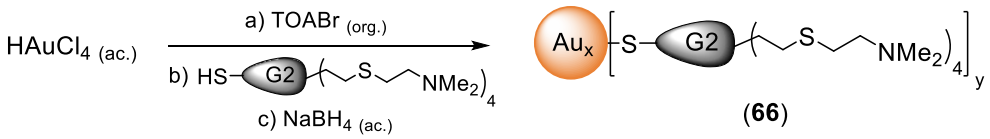
Figura 2.24. Espectros de RMN de ^1H del dendrón **17** en $CDCl_3$ (a), AuNPs **63** en D_2O antes (b) y después (c) de añadir HCl

Por tanto, la estabilidad de las AuNPs **63-65** está condicionada por el pH del medio, ya que la solubilidad en medio acuoso es debido a la presencia de grupos catiónicos, por lo que un aumento en el pH provoca su precipitación haciendo a estos sistemas relativamente inestables y dificultando de este modo su uso para posteriores aplicaciones.

2.3.3b. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos amino (-NMe$_2$)

Otra metodología llevada a cabo para la síntesis de nanopartículas catiónicas fue la obtención previa de nanopartículas funcionalizadas con dendrones que poseían grupos amino terminales neutros, -NMe_2, cuya posterior cuaternización conduciría a la formación de los sistemas catiónicos deseados. Para la síntesis de estos sistemas precursores se utilizó el

método directo bifásico 2.3.1a (Esq.2.11). Las nanopartículas obtenidas precipitaron de la disolución, resultando ser insolubles en todos los disolventes orgánicos.



Esquema 2.11. Síntesis de AuNPs **66**

El tratamiento de las imágenes obtenidas por TEM permitió determinar un tamaño promedio de 1.88 nm para estas nanopartículas (Fig.2.25).

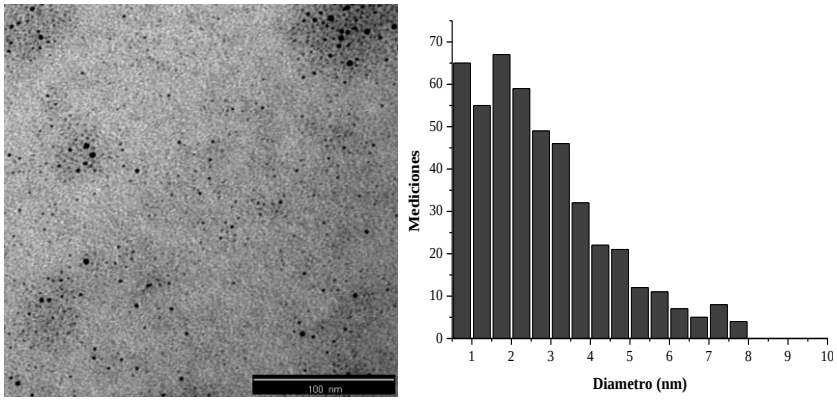


Figura 2.25. Imagen TEM y diagrama de distribución de tamaño de AuNPs **66**

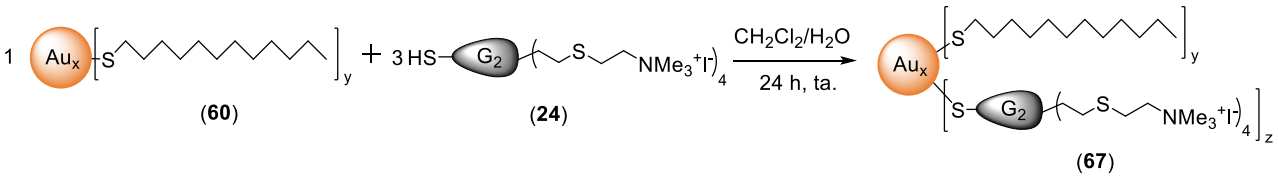
Dado que el interés de este trabajo es la obtención de sistemas catiónicos, las AuNPs **66** se hicieron reaccionar con MeI para la transformación de los grupos amino terminales en grupos amonio. Desafortunadamente, este tratamiento no condujo a la formación de las nanopartículas catiónicas deseadas, por lo cual se descartó esta metodología para la obtención de dichos sistemas.

2.3.3c. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos amonio (-NMe_3^+)

En vista de que las metodologías sintéticas planteadas anteriormente no permitieron obtener nanopartículas catiónicas estables, se intentó una nueva ruta sintética partiendo de los dendrones catiónicos que poseen grupos funcionales periféricos de tipo -NMe_3^+ (HSG_n(S-NMe_3^+)), (**23-25**).

Método de intercambio

La primera ruta sintética seguida para la obtención de dichos sistemas fue el método de intercambio. De este modo, a una disolución de las AuNPs **60** en CH_2Cl_2 se le adicionó una disolución acuosa del dendrón de segunda generación **24I**, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas (Esq.2.12). Normalmente, la finalización del proceso de intercambio suele apreciarse por la transferencia del color negro característico de las nanopartículas desde la fase orgánica a la fase acuosa, no obstante, en nuestro caso se produjo un precipitado de color negro, mientras las fases tanto orgánica como acuosa se tornaron incoloras. El precipitado formado resulto ser parcialmente soluble en DMSO e insoluble en todos los demás disolventes probados.



Esquema 2.12. Síntesis de AuNPs **67**

La obtención de imágenes por TEM del precipitado formado nos permitió verificar la presencia de las nanopartículas. Sin embargo, estas nanopartículas poseían diferentes formas y tamaños lo que indicaba una transformación descontrolada de las AuNPs durante el proceso de intercambio (Fig.2.26).

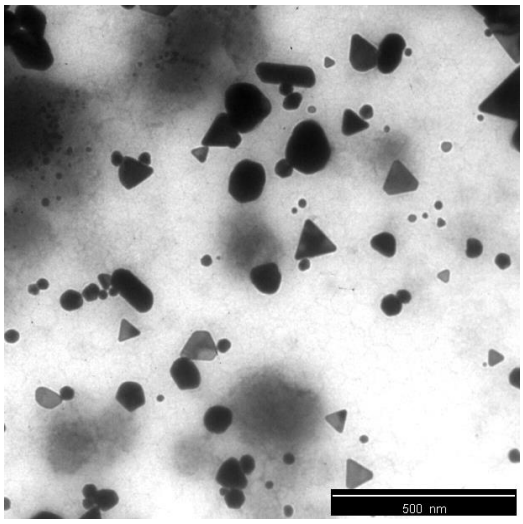
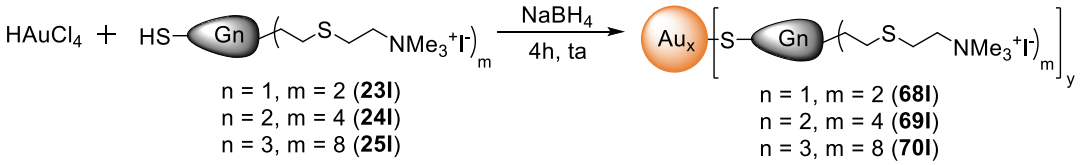


Figura 2.26. Imagen TEM obtenida para AuNPs **67**

Método directo en una sola fase

Una segunda metodología sintética empleada para la obtención de nanopartículas catiónicas con grupos periféricos -NMe_3^+, se realizó siguiendo el método directo en una sola fase partiendo de los dendrones **23I-25I** lo que permitió tras la purificación por diálisis (MWCO 10,000) de los crudos de reacción obtener las correspondientes AuNPs, $Au_xG_n(S\text{-}(NMe_3I)_m)_y$ (n = 1, m = 2 (**68I**); (n = 2, m = 4 (**69I**); (n = 3, m = 8 (**70I**) en dispersión acuosa (Esq.2.13).



Esquema 2.13. Síntesis de AuNPs catiónicas (**68I-70I**)

Cabe destacar que durante el proceso de adición de los dendrones se observó la formación de un precipitado de color marrón, el cual probablemente es resultado de la reducción de algunos iones Au^{III} a Au^0 por la acción de los aniones yoduro presentes en nuestros dendrones. No obstante, la posterior adición del $NaBH_4$ da lugar a la formación de las nanopartículas catiónicas esperadas.

Los datos físico-químicos de caracterización de las AuNPs **68I-70I** se encuentran recogidos en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Datos físico-químicos obtenidos para las AuNPs **68I-70I**

	UV-Vis (nm)	Ratio Molar Au/L[a]		D (nm)[b]	Formula Molecular[c]	PM Aprox. ($gmol^{-1}$)[c]	N[d]	PZ[e] (mV)
		Teó.	Obt.					
68I	536.2	1:1	3.6:1	2.2	$Au_{338}(C_{19}H_{45}I_2N_2S_3Si)_{94}$	130461.94	188	+43.8
69I	541.9	1:1	2.0:1	5.3	$Au_{4599}(C_{41}H_{97}I_4N_4S_5Si_3)_{2335}$	4171176.44	9340	+46.1
70I	534.8	1:1	1.8:1	4.8	$Au_{3416}(C_{85}H_{201}I_8N_8S_9Si_7)_{1952}$	6208667.84	15616	+53.1

a) L = dendrones; b) diámetro obtenido por TEM; c) Obtenido por TEM y TGA; d) número de grupos -NMe_3^+ por NP; e) Potencial Z

La caracterización por espectroscopía UV-Vis permite verificar la formación de las nanopartículas **68I-70I**, observándose en los espectros UV-Vis la banda SPR para dichos sistemas, la cuales aparecen a 536.2 nm, 541.9 nm y 534.8 nm respectivamente (Fig.2.27).

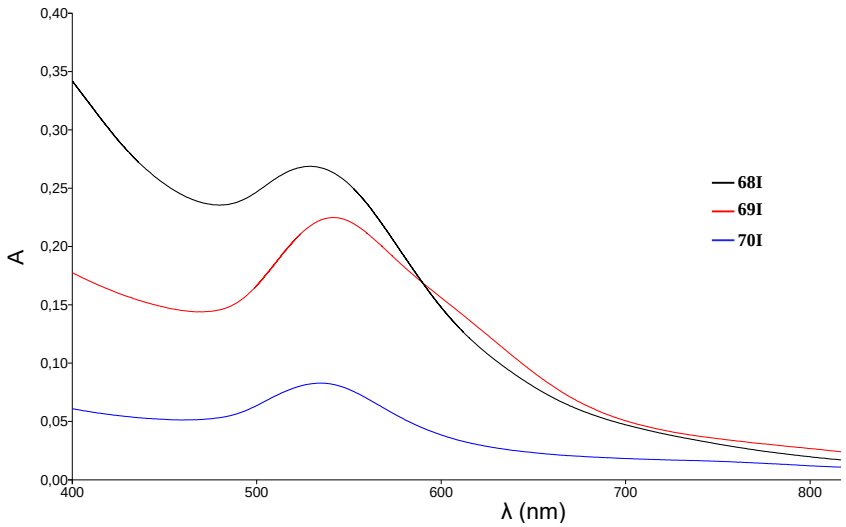


Figura 2.27. Espectros UV-Vis de AuNPs **68I-70I**

Las imágenes obtenidas por TEM de los compuestos **68I-70I** muestran para las AuNPs dendronizadas con las cuñas de segunda y tercera generación un diámetro promedio mayor, observándose tamaños de 2.2 nm (**68I**), 5.3 nm (**69I**) y 4.8 nm (**70I**) (Fig.2.28).

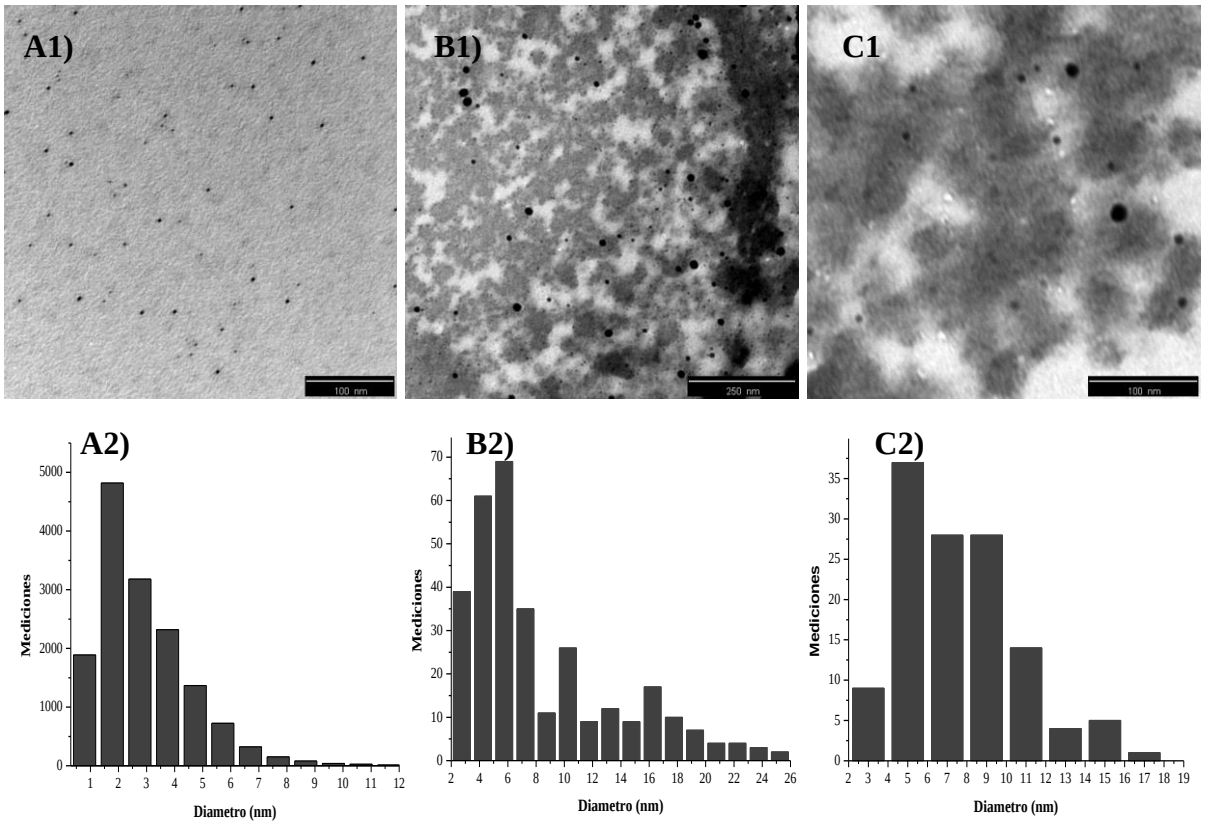


Figura 2.28. Imágenes TEM y diagrama de distribución de tamaño de AuNPs **68I** (A), **69I** (B) y **70I** (C)

La caracterización por RMN de ^{1}H permite comprobar la presencia de los dendrones utilizados para la funcionalización de las nanopartículas, observándose en los espectros las señales correspondientes a los mismos. (Fig.2.29).

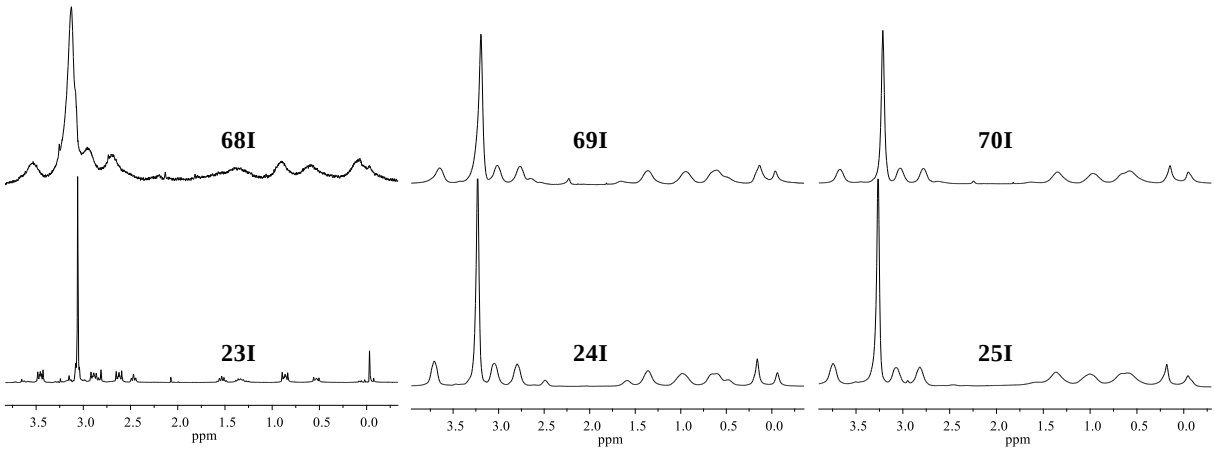


Figura 2.29. Comparación de espectros de RMN de ^{1}H en D_2O de los dendrones **23I**-**25I** con AuNPs **68I**-**70I**

Los análisis obtenidos por termogravimetría (TGA) permitieron determinar los porcentajes de materia orgánica (dendrones en la superficie metálica) y el residuo (cantidad de metal en el núcleo) presentes en la nanopartícula. Con estos datos junto a los del tamaño obtenidos por TEM se determinaron los pesos moleculares aproximados y el número de cargas presentes en el sistema (Tabla 2.1). Finalmente, los valores obtenidos de potencial Z confirman la presencia de cargas positivas en la superficie de estas nanopartículas.

Los resultados obtenidos para las nanopartículas **68I**-**70I** muestran un incremento en el número de grupos catiónicos por átomo de oro de la nanopartícula al aumentar la generación dendrítica. Probablemente esto sea debido a efectos estéricos, pues cuanto menor es la generación dendrítica del dendrón más cerca quedan las cargas de la superficie metálica (parcialmente positiva) y mayor es la repulsión, lo que produce sistemas con un menor número de dendrones en su superficie.

Las AuNPs obtenidas aumentan de tamaño y cambian de forma con el tiempo, posiblemente debido al carácter reductor de los aniones yoduro. La influencia de los haluros en la morfología de nanopartículas metálicas ha sido estudiada ampliamente.[314,315] En el caso del yoduro, la presencia de éste en la disolución promueve el crecimiento de la nanopartícula

hacia la formación de nanoprismas. No obstante, dependiendo de la concentración de yoduro se pueden formar mezclas de nanopartículas con diferentes morfologías.[316,317]

El comportamiento de los sistemas **68I**-**70I** concuerda con lo descrito previamente en bibliografía,[320,321] observándose en las imágenes TEM obtenidas para dichos sistemas que al aumentar de generación, el crecimiento y cambio en la morfología de los sistemas es más notable debido al aumento de la concentración del anión yoduro en los mismos (Fig.2.30).

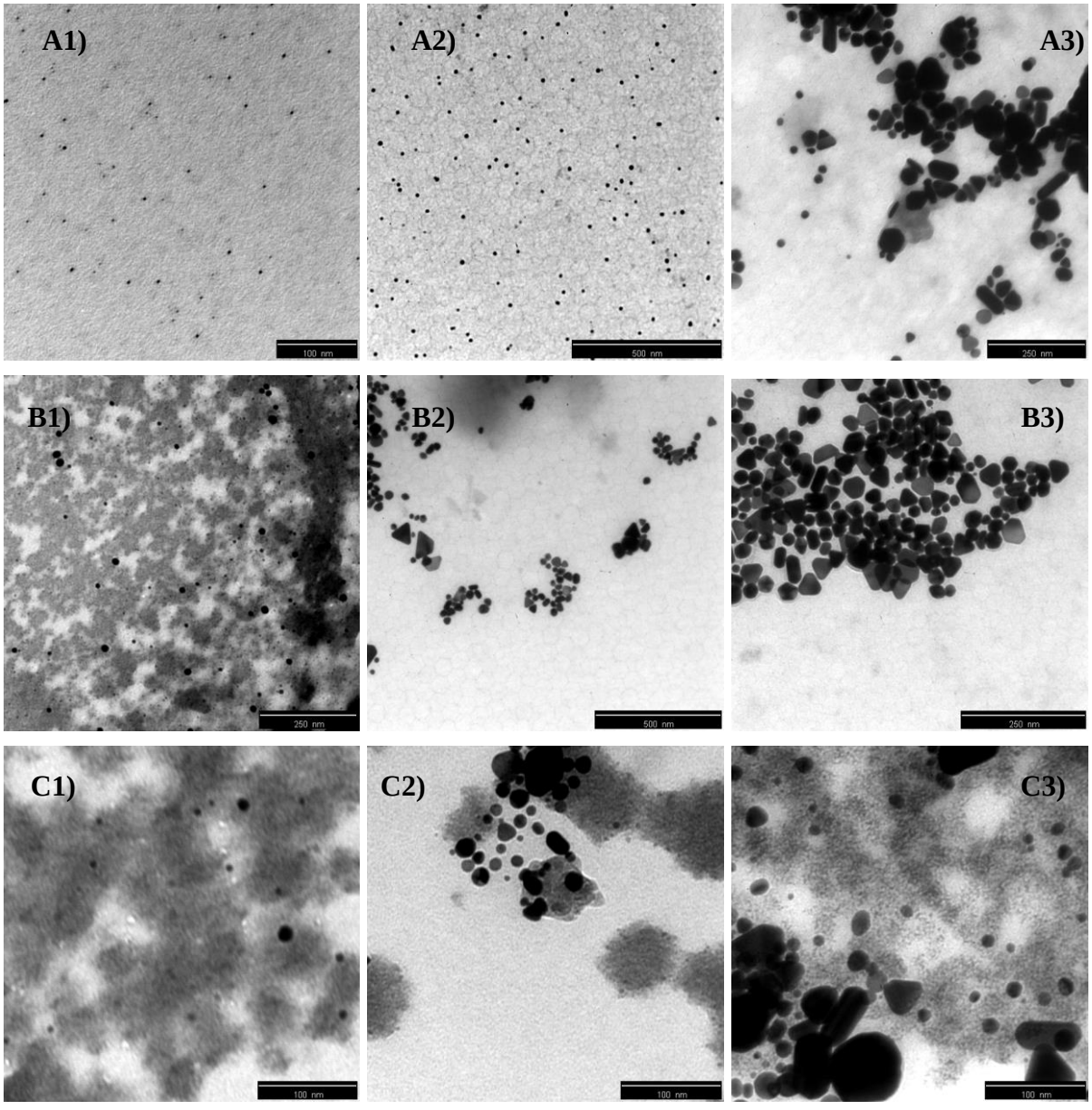
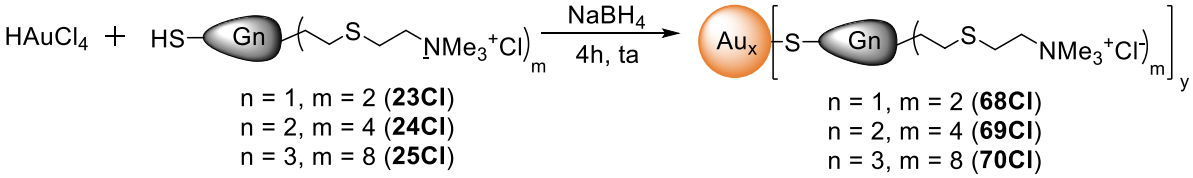


Figura 2.30. Imágenes TEM a los 0, 4 y 8 meses de AuNPs A) **68I**, B) **69I**, C) **70I**

Como el objetivo de nuestro trabajo es la obtención de nanopartículas esféricas, y en vista de que la presencia del anión yoduro por su carácter reductor afecta la estabilidad de nuestros sistemas haciendo que éstos evolucionen hacia otras morfologías, se realizó un intercambio del anión yoduro por cloruro, pues se ha observado que la presencia de cloruro en comparación con yoduro o bromuro, no produce cambios significativos en los sistemas.[314] La preparación de estos sistemas se llevó a cabo una vez más utilizando el método directo en una sola fase partiendo de los dendrones **23Cl-25Cl** (Esq.2.14). La purificación por diálisis (MWCO 10,000) de los crudos obtenidos permitió obtener AuNPs, $Au_xG_n(S\text{-}NMe_3Cl)_m)_y$ (n = 1, m = 2 (**68Cl**); (n = 2, m = 4 (**69Cl**); (n = 3, m = 8 (**70Cl**) solubles en agua.



Esquema 2.14. Síntesis de AuNPs **68Cl-70Cl**

La primera diferencia importante entre estos sistemas con cloruro como contraión y los previamente sintetizados con yoduro se observa durante el proceso de adición de los dendrones a la disolución que contienen los iones Au^{III}. En este caso, no aparece precipitado, lo que en un principio apunta a que los iones cloruro no están interfiriendo en el proceso de formación de las nanopartículas.

En los espectros de UV-Vis de las nanopartículas **68Cl-70Cl** se observaron las bandas SPR a 528.1 nm, 533.7 nm y 543.1 nm respectivamente. No obstante, la banda correspondiente a la nanopartícula **68Cl** presenta una menor intensidad en comparación con las obtenidas utilizando dendrones de segunda y tercera generación. Este comportamiento puede ser atribuido a un menor tamaño de las nanopartículas **68Cl** (Fig.2.31).

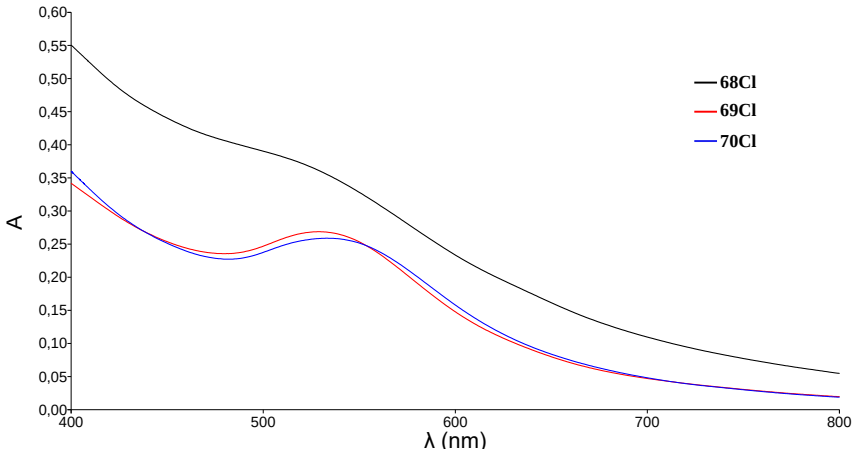


Figura 2.31. Espectros UV-Vis de AuNPs **68Cl-70Cl**

El tratamiento de las imágenes TEM permite determinar el tamaño de las nanopartículas **68Cl-70Cl**, obteniéndose un diámetro promedio de 1.8 nm, 2.2 nm y 2.0 nm respectivamente (Fig.2.32).

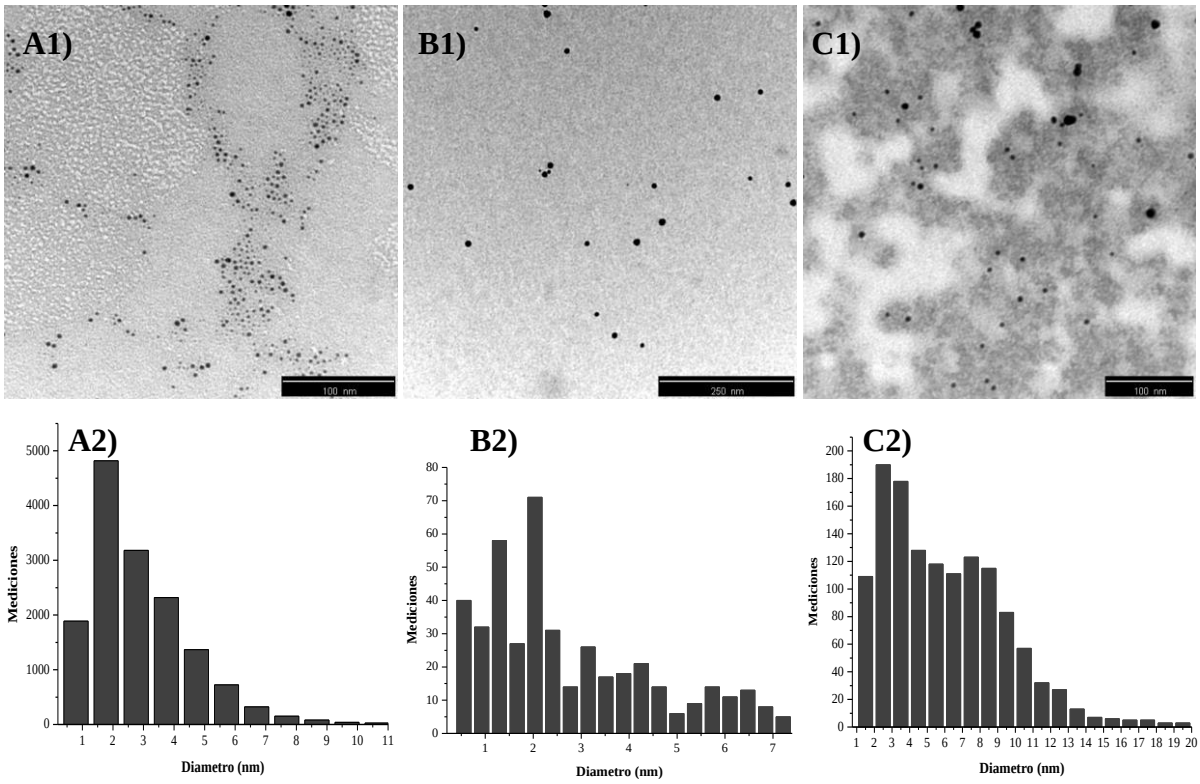


Figura 2.32. Imágenes TEM y diagrama de distribución de tamaño de AuNPs **68Cl** (A), **69Cl** (B) y **70Cl** (C)

Una vez más, la comparación de los espectros de RMN de ^{1}H de los dendrones precursores con las nanopartículas funcionalizadas permite confirmar la presencia de estos en los sistemas **68Cl-70Cl** sintetizados (Fig.2.33)

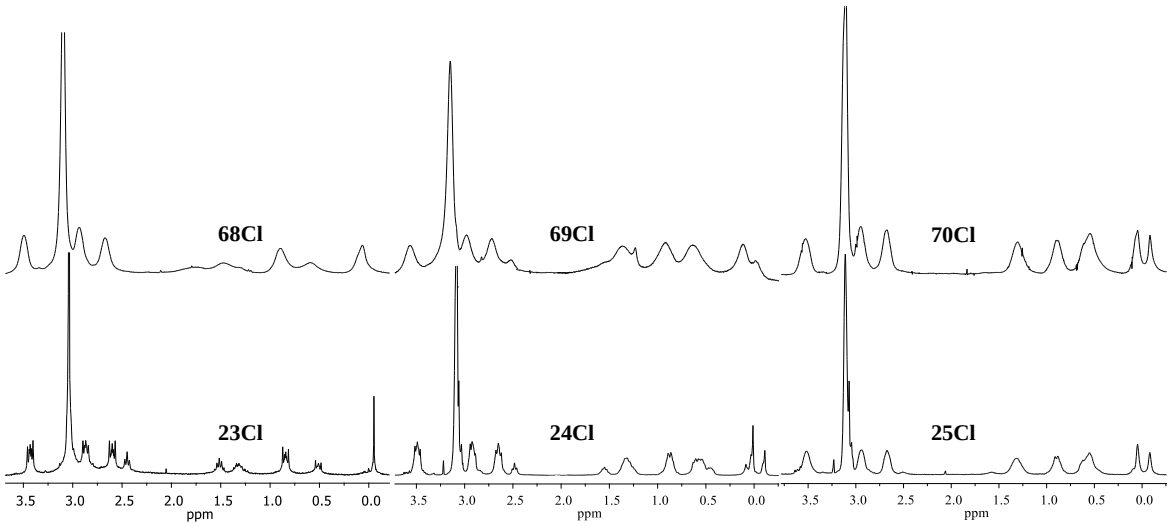


Figura 2.33. Comparación de espectros de RMN de ^{1}H en D_2O de los dendrones **23Cl-25Cl** con AuNPs **68Cl-70Cl**

Al igual que para los compuestos que poseían como anión yoduro, los datos obtenidos por TEM y TGA para las AuNPs **68Cl-70Cl** muestran un aumento en el número de dendrones de la superficie conforme aumenta la generación dendrítica. Los valores de potencial Z confirman una vez más la carga positiva de los sistemas. Para estas nanopartículas, además del diámetro promedio obtenido por TEM, se determinó el diámetro hidrodinámico por DLS, observándose un aumento de tamaño al aumentar la generación dendrítica de las cuñas utilizadas para la funcionalización (Tabla 2.2). La diferencia de los diámetros obtenidos por TEM y DLS radica en el hecho de que consisten en dos técnicas diferentes. Por un lado, el TEM permite observar solo el tamaño del núcleo metálico. Por otro lado, el DLS determina el tamaño en suspensión de los sistemas. El DLS suele utilizarse para determinar el tamaño en nanopartículas cuyos tamaños se encuentran entre 2-500 nm y nuestros sistemas poseen un tamaño promedio menor. Además, la polidispersidad de las muestras puede distorsionar los resultados, pues la presencia de al menos una nanopartícula de mayor tamaño apantalla las nanopartículas más pequeñas.

Tabla 2.2. Datos obtenidos para las nanopartículas **68Cl-70Cl**

	UV-Vis (nm)	Ratio Molar Au/L[a]		D (nm)[b]	D (nm)[c]	Formula Molecular[d]	PM Aprox. ($gmol^{-1}$)[d]	N[e]	ZP[f] (mV)
		Teó.	Obt.						
68Cl	528.1	1:1	3.1:1	1.8	4.85	$Au_{180}(C_{19}H_{45}Cl_2N_2S_3Si)_{59}$	6471.64	118	+50.0
69Cl	533.7	1:1	2.5:1	2.2	15.69	$Au_{329}(C_{41}H_{97}Cl_4N_4S_5Si_3)_{132}$	201105.68	528	+63.7
70Cl	543.1	1:1	2.0:1	2.0	21.04	$Au_{247}(C_{85}H_{201}Cl_8N_8S_9Si_7)_{123}$	307482.94	984	+59.6

a) L = dendrones; b) diámetro obtenido por TEM; c) diámetro obtenido por DLS; d) Obtenido por TEM y TGA; e) número de grupos $-NMe_3^+$ por NP; f) Potencial Z

A diferencia de las nanopartículas que poseían como contraión I^-, los sistemas **68Cl-70Cl** muestran una mayor estabilidad. En las imágenes TEM se observó que el tamaño y la morfología de los sistemas se mantienen casi inalteradas después de 6 meses de estar preparadas. (Fig.2.34). Este cambio para las AuNPs **69Cl-70C**l es más notable al cabo de un año de su síntesis. No obstante, en el caso de **68Cl** este comportamiento no se observa debido probablemente a la menor concentración de cloruro presente en este sistema (Fig.2.35). Este comportamiento debe ser tenerse en cuenta a la hora de estudiar sus aplicaciones en biomedicina.

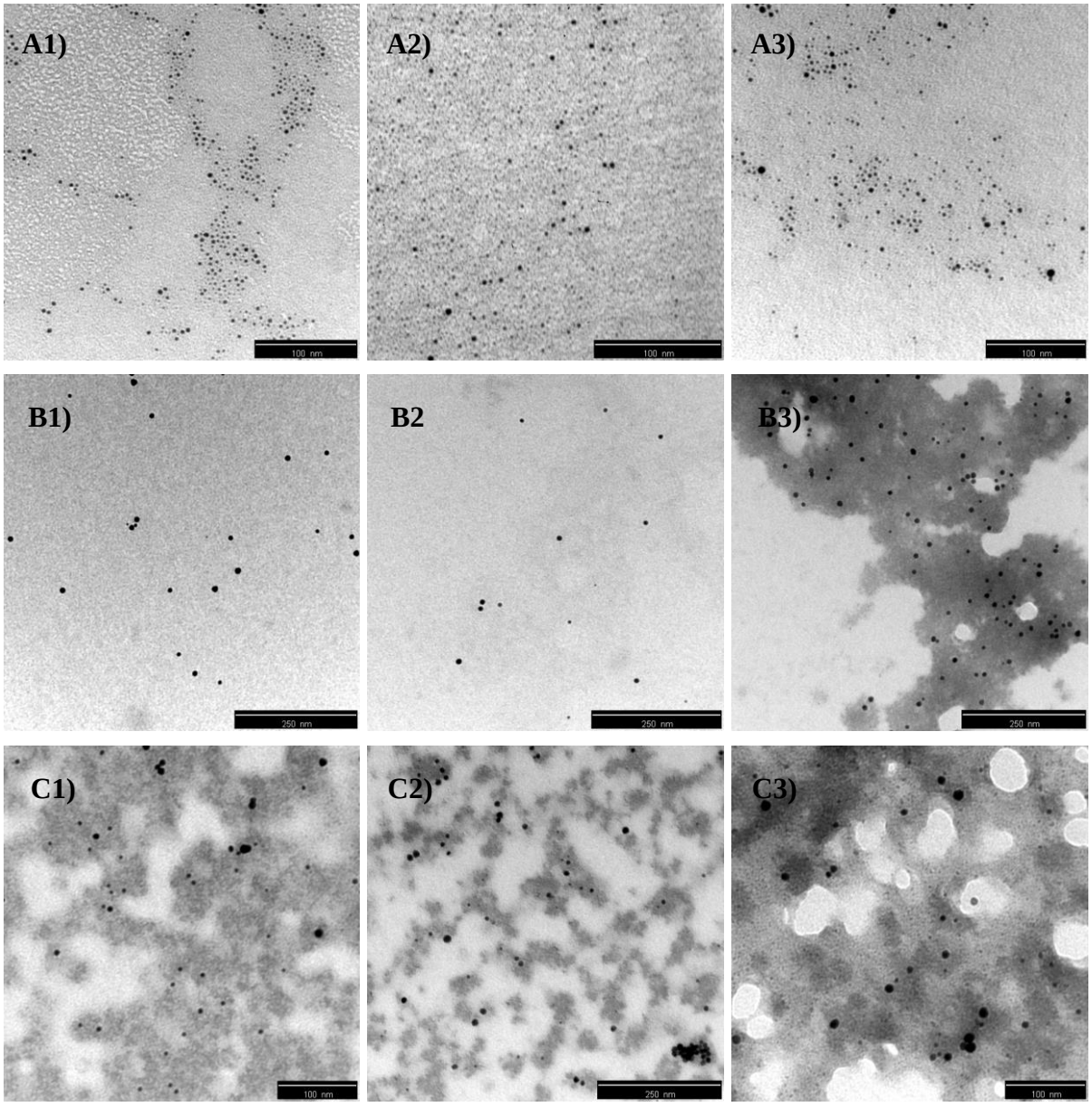


Figura 2.34. Imágenes TEM a los 0, 3 y 6 meses de los compuestos A) **68Cl**, B) **69Cl**, C) **70Cl**

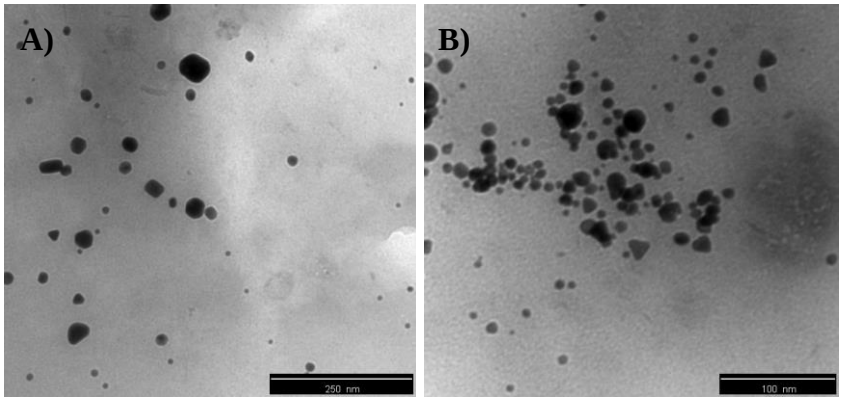
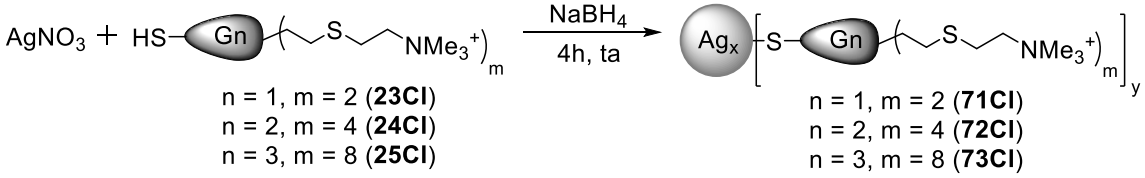


Figura 2.35. Imágenes TEM de compuestos **69Cl** (A) y **70Cl** (B) al año de su síntesis

2.3.3d. AgNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos amonio (-NMe_3^+)

Como se ha observado que los sistemas más estables se obtienen a partir de los dendrones **23Cl-25Cl**, para la obtención de AgNPs catiónicas se han utilizado estos sistemas como precursores para su estabilización. La estrategia sintética es la misma utilizada para las AuNPs **68Cl-70Cl** (2.3.1b), con la única diferencia de que se parte de una disolución de nitrato de plata ($AgNO_3$) como fuente de iones metálicos (Esq.2.15). De este modo se obtuvieron las nanopartículas $Ag_xG_n(S\text{-}NMe_3Cl)_m)_y$ (n = 1, m = 2 (**71Cl**); (n = 2, m = 4 (**72Cl**); (n = 3, m = 8 (**73Cl**) solubles en agua. Los datos obtenidos para las AgNPs **71Cl-73Cl** están recogidos en la Tabla 2.3.



Esquema 2.15. Síntesis de AgNPs catiónicas **71Cl-73Cl**

Tabla 2.3. Datos físico-químicos obtenidos para las nanopartículas **71Cl-73Cl**

	Uv-Vis (nm)	Ratio Molar Au/L[a]		D (nm)[b]	D (nm)[c]	Formula Molecular[d]	PM Aprox. ($gmol^{-1}$)[d]	N[e]	ZP[f] (mV)
		Teó.	Obt.						
71Cl	447.8	1:1	4.0:1	1.7	11.70	$Ag_{143}(C_{19}H_{45}Cl_2N_2S_3Si)_{36}$	33309.85	72	+53.4
72Cl	415.8	1:1	4.8:1	3.0	18.17	$Ag_{788}(C_{41}H_{97}Cl_4N_4S_5Si_3)_{165}$	255383.86	660	+41.0
73Cl	445.5	1:1	3.2:1	3.9	43.82	$Ag_{1792}(C_{85}H_{201}Cl_8N_8S_9Si_7)_{557}$	1365420.42	4456	+60.1

a) L = dendrones; b) diámetro obtenido por TEM; c) diámetro obtenido por DLS; d) Obtenido por TEM y TGA; e) número de grupos -Nme_3^+ por NP; f) Potencial Z

Los diámetros promedios obtenidos por el tratamiento de las imágenes TEM de las AgNPs **71Cl-73Cl** fueron de 1.7 nm, 3.0 nm y 3.9 nm respectivamente (Fig.2.36), observándose un aumento en el diámetro de las AgNPs al aumentar la generación dendrítica de las cuñas utilizadas para la funcionalización. Es decir, dendrones más grandes, favorecen la formación de nanopartículas de mayor tamaño.

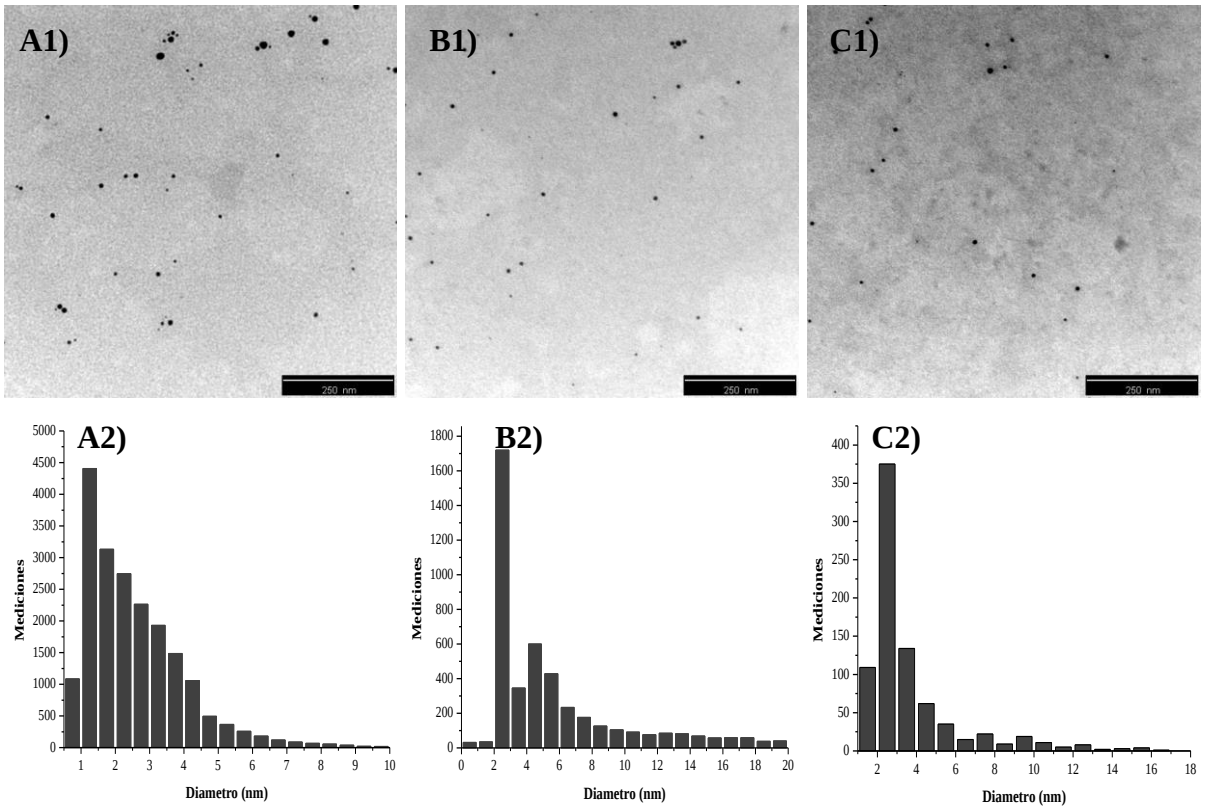


Figura 2.36. Imágenes TEM y diagrama de distribución de tamaño de AgNPs **71Cl** (A), **72Cl** (B) y **73Cl** (C)

Al igual que en casos anteriores, la presencia de los dendrones pudo ser determinada por RMN de ^{1}H de las nanopartículas, observándose la presencia de las señales correspondientes a los dendrones presentes en los sistemas **71Cl-73Cl** (Fig.2.37).

La tendencia observada hasta el momento para las AuNPs catiónicas también se mantiene en estos sistemas, apreciándose una vez más un aumento del número de dendrones en la superficie de la nanopartícula al aumentar la generación dendrítica.

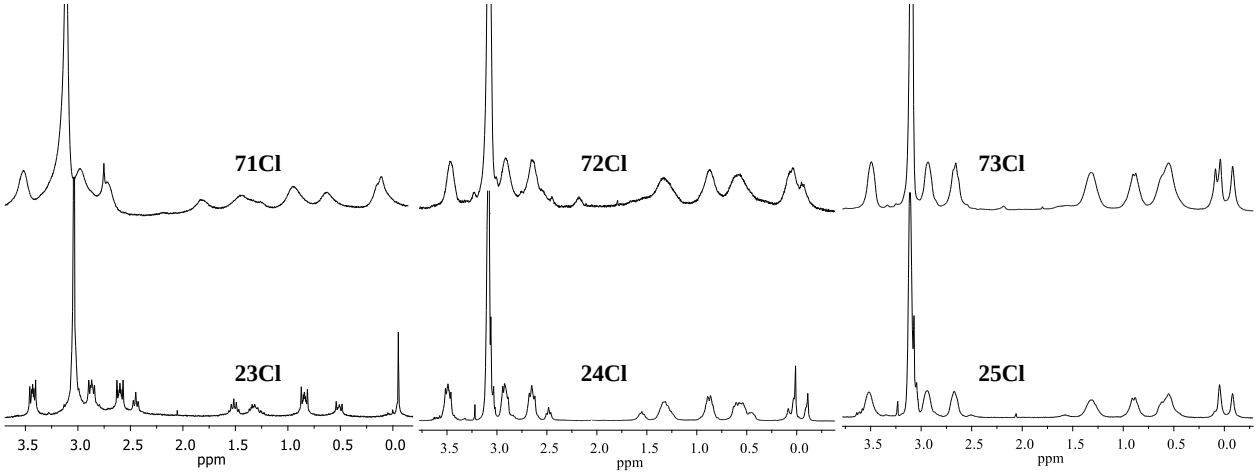


Figura 2.37. Comparación de espectros de RMN de ^{1}H en D_2O de los dendrones **23Cl-25Cl** con las AgNPs **71Cl-73Cl**

Cabe destacar que las AgNPs catiónicas obtenidas, mostraron una menor estabilidad en el tiempo que las AuNPs análogas, observándose por TEM un cambio significativo de los sistemas a los 3 meses en el caso de **71Cl** y a los 2 meses para los sistemas **72Cl** y **73Cl** respectivamente (Fig.2.38). Este comportamiento era de esperar, debido a la mayor facilidad de oxidación que presentan las AgNPs en comparación con las AuNPs.[318]

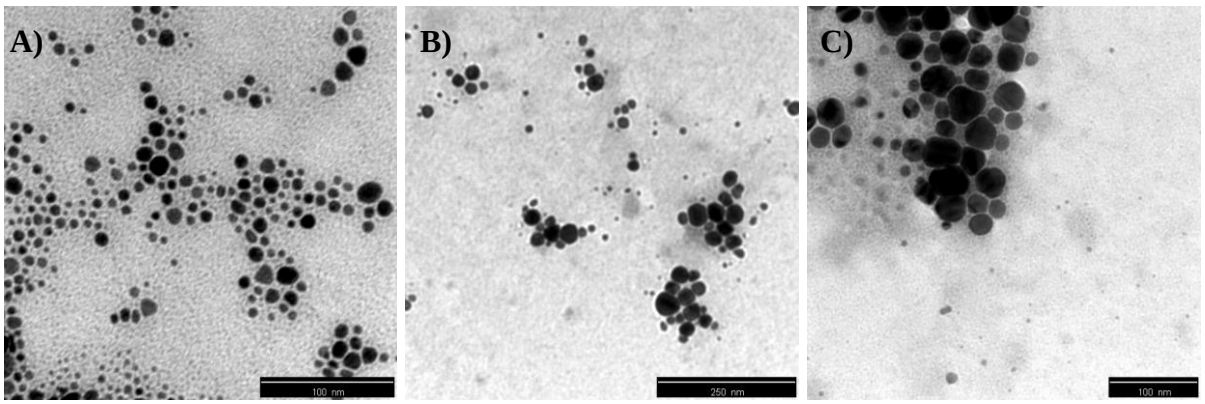


Figura 2.38. Imágenes TEM de nanopartículas **71Cl** a los 2 meses (A), **72Cl** (B) y **73Cl** a los tres meses (C)

2.3.4. Nanopartículas aniónicas

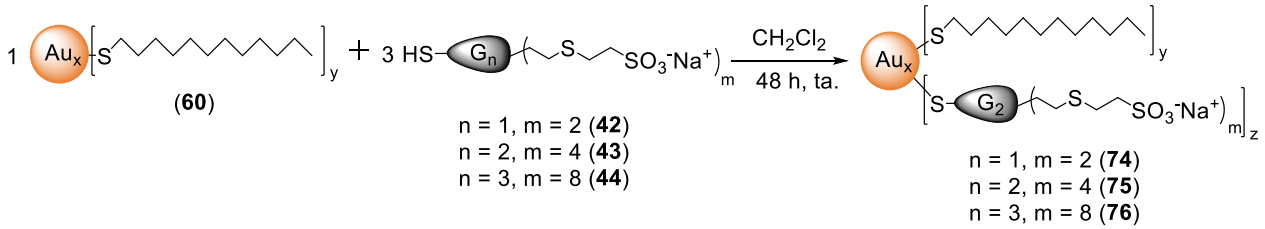
Al igual que para las nanopartículas catiónicas, la síntesis de los sistemas aniónicos se ha llevado a cabo utilizando los métodos descritos en el apartado 2.3.1. Para la obtención de estas nanopartículas aniónicas se eligieron los dendrones con grupos funcionales $-SO_3Na$, $-CO_2Me$, $-CO_2Na$ descritos en el *Capítulo I*. En el caso de las nanopartículas sintetizadas por el método de intercambio se utilizó una proporción molar $L_{tiolato}/L$ de 1:3.

2.3.4a. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos periféricos sulfonato (-SO_3Na)

Método de intercambio

La síntesis de las nanopartículas con grupos sulfonato periféricos se realizó primeramente utilizando el método de intercambio. Para ello, a una disolución en CH_2Cl_2 de las nanopartículas precursoras **60**, se le añadió una disolución acuosa de los dendrones con grupos sulfonato terminales, **42-44**. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que el color se transfirió de la fase orgánica a la fase acuosa, lo que indica la finalización del intercambio y la formación de las nanopartículas deseadas (Esq.2.16).

La fase orgánica se separó de la acuosa y la fase acuosa se lavó con CH_2Cl_2. La purificación por diálisis (MWCO 10,000) de los crudos obtenidos permitió obtener las nanopartículas deseadas $Au_xG_n(S\text{-}SO_3Na)_m)_y$ (n = 1, m = 2 (**74**); (n = 2, m = 4 (**75**); (n = 3, m = 8 (**76**). Estas nanopartículas resultaron ser solubles en agua y se almacenaron en suspensión durante largos periodos de tiempo (más de un año a 4 ºC). Los datos de caracterización obtenidos para los sistemas **74-76** se encuentran recogidos en la Tabla 2.4.



Esquema 2.16. Síntesis de nanopartículas aniónicas **74-76** con grupos sulfonato periféricos

Tabla 2.4. Datos físico-químicos obtenidos para las nanopartículas **74-76**

	Uv-Vis (nm)	D (nm)[a]	ZP[b] (mV)
74	540.7	1.7	-57.0
75	543.9	1.8	-30.1
76	534.9	1.0	-63.9

a) Diámetro obtenido por TEM; b) Potencial Z

El diámetro promedio de los sistemas **74-76** obtenidos por TEM fue de 1.2 nm, 1.8 nm y 1.0 nm respectivamente (Fig.2.39). Esto supone una disminución de tamaño respecto al inicial de la nanopartícula.

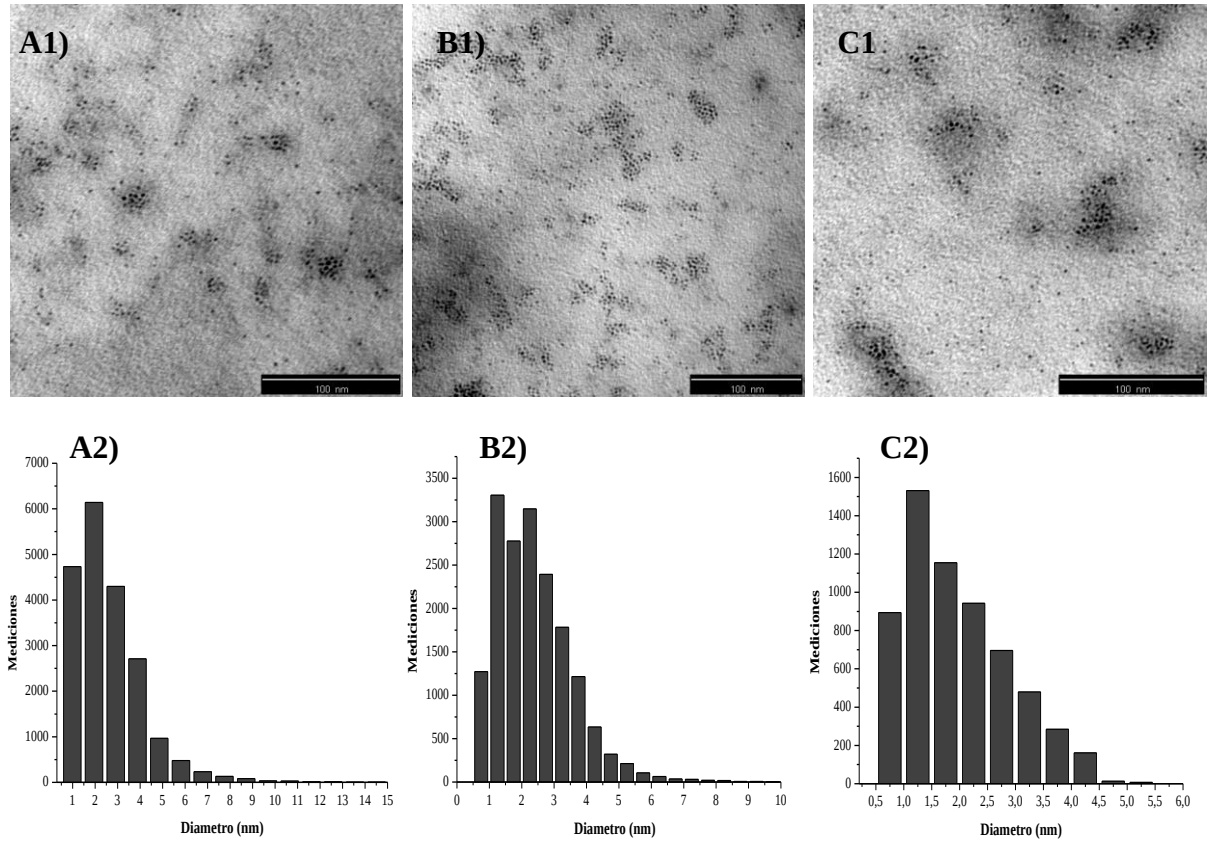


Figura 2.39. Imagen TEM y diagrama de distribución de AuNPs **74** (A), **75** (B) y **76** (C)

Los espectros de RMN de ^{1}H para las AuNPs aniónicas **74-76** al igual que las MNPs catiónicas, presentan las mismas señales que las de los dendrones precursores **42-44** con un ligero ensanchamiento y la desaparición de la señal correspondiente al grupo metileno más cercana a la superficie metálica, pudiendo confirmar de este modo la presencia de los dendrones en las nanopartículas obtenidas (Fig.2.40).

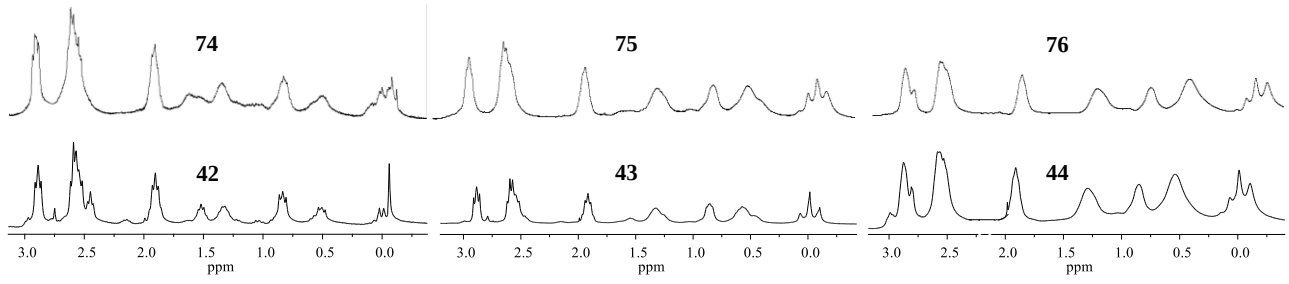
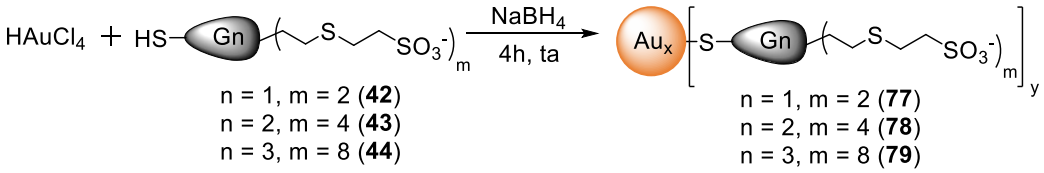


Figura 2.40. Comparación de espectros de RMN de ^{1}H en D_2O de los dendrones **42-44** con AuNPs **74-76**

La relación entre los dendrones y el ligando dodecanotiolato no se puede obtener de manera directa por RMN de ^{1}H, debido al solapamiento y anchura de algunas de las señales de ambos sistemas. Por ello, fue necesario realizar la descomposición con I_2 de las nanopartículas para poder estimar el porcentaje de intercambio de los sistemas.[319,320] Para ello, disoluciones acuosas de 50 mg (5mL) de las AuNPs **74-76** se añadieron sobre una disolución acuosa de I_2 (3 mg) en presencia de NaI (para aumentar la solubilidad del I_2), y las mezclas de reacción se agitaron durante 3 horas. La descomposición de las AuNPs **74-76**, produce la liberación de los tioles que la protegen originando la formación de tres tipos de disulfuros: dendrón-S-S-dodecil, dendrón-S-S-dendrón y dodecil-S-S-dodecil. Por esta razón, el crudo de reacción obtenido, se extrajo con Et_2O y ambas fracciones (acuosa y orgánica) se llevaron a sequedad. La realización de RMN de ^{1}H de ambas fracciones, utilizando dioxano como patrón interno permitió estimar la relación S-dendrón/S-dodecil por medio de la comparación de integrales de las señales que se encuentran en la región $\delta = 1.30$ ppm, donde aparecen las señales de los grupos metileno del dodecanotiolato y las señales de los grupos metileno -$SCH_2CH_2C\mathit{H_2}CH_2Si$- y -$SiCH_2C\mathit{H_2}CH_2Si$- del dendrón, con las señales de la región $\delta = 2.90$ ppm, que corresponden al metileno más cercano al grupo sulfonato -CH_2SO_3. Esta relación S-dendrón/S-dodecil resultó ser de 12.5:1 para las nanopartículas **74** y **75** y de 7.7:1 para las **76**.

Método directo en una sola fase

Para la obtención de las AuNPs con grupos sulfonato periféricos por el método directo en una sola fase, se siguió la misma metodología sintética utilizada para las MNPs catiónicas. Así, disoluciones acuosas de los dendrones precursores **42-44** se adicionaron sobre disoluciones acuosas de $HAuCl_4$, seguido de una reducción con $NaBH_4$ (Esq.2.17). Al igual que para las MNPs catiónicas, se utilizó una ratio Au/L 1:1. Los crudos de reacción se purificaron por diálisis (MWCO 10,000). Sin embargo, utilizando la ratio molar 1:1 solo fue posible obtener nanopartículas con el dendrón de primera generación ($Au_xG_1(S\text{-}(SO_3Na)_2)_y$ (**77a**), mientras que para los dendrones de segunda y tercera generación las imágenes TEM realizadas no mostraban presencia de nanopartículas.



Esquema 2.17. Síntesis de nanopartículas aniónicas **77-79**

El diámetro aproximado de las nanopartículas **77a** (determinado por el tratamiento de las imágenes TEM) fue de 2.4 nm (Fig.2.41).

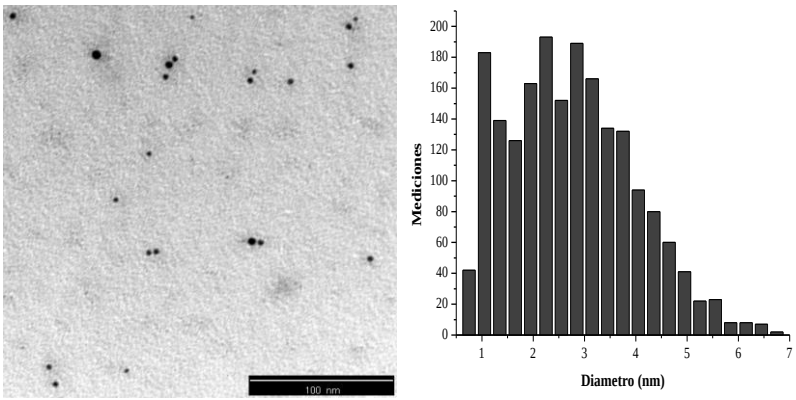


Figura 2.41. Imagen TEM y diagrama de distribución de AuNPs **77a**

La no formación de las nanopartículas aniónicas con los dendrones de segunda y tercera generación puede deberse a que estos sistemas poseen en la periferia un sistema con cierta capacidad quelante como es el grupo $-S(CH_2)_3SO_3^-$.[321,322] Con el objetivo de contrarrestar este efecto y obtener las nanopartículas aniónicas deseadas, los ratios molares Au/L se modifican tomando en consideración el número de grupos sulfonato presentes en los dendrones utilizados. Así, los nuevos ratios molares Au/L fueron 2:1 para el dendrón **42**, 4:1 para el **43** y 8:1 para el **44**. Para ello, se siguió la misma metodología sintética descrita hasta el momento (Esq.2.17). Después de la purificación de los crudos de reacción por diálisis (MWCO 10,000), se obtuvieron las nanopartículas $Au_xG_n(S\text{-}(SO_3Na)_m)_y$ (n = 1, m = 2 (**77b**); (n = 2, m = 4 (**78**); (n = 3, m = 8 (**79**) solubles en agua. Los datos de caracterización físico-químicos obtenidos para las nanopartículas aniónicas **77-79** están recogidos en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5. Datos físico-químicos obtenidos para las nanopartículas **77-79**

	UV-Vis (nm)	Ratio Molar Au/L[a]		D (nm)[b]	Formula Molecular[c]	PM Aprox. (gmol^{-1})[c]	N[e]	ZP[f] (mV)
		Teó.	Obt.					
77a	522.3	1:1	3.0:1	2.4	$Au_{427}(C_{15}H_{31}Na_2O_6S_5Si)_{140}$	159953.92	280	-22.8
77b	525.9	2:1	5.7:1	3.6	$Au_{1441}(C_{15}H_{31}Na_2O_6S_5Si)_{255}$	421978.36	510	-31.4
78	525.6	4:1	10.0:1	3.4	$Au_{1214}(C_{33}H_{69}Na_4O_{12}S_9Si_3)_{121}$	307482.94	484	-29.1
79	523.6	8:1	20.2:1	3.0	$Au_{834}(C_{69}H_{145}Na_8O_{24}S_{17}Si_7)_{41}$	257929.14	328	-40.1

a) L = dendrones; b) diámetro obtenido por TEM; c) diámetro obtenido por DLS; d) Obtenido por TEM y TGA; e) número de grupos $-SO_3^-$ por NP; f) Potencial Z

Los espectros UV-Vis de las AuNPs **74-79** se puede apreciar que en las nanopartículas obtenidas por el método de intercambio, **74-76**, la banda SPR no se observa, mientras que para las AuNPs obtenidas por el método directo, **77-79** si puede apreciarse, observándose en torno a 525-550 nm (Fig. 2.42).

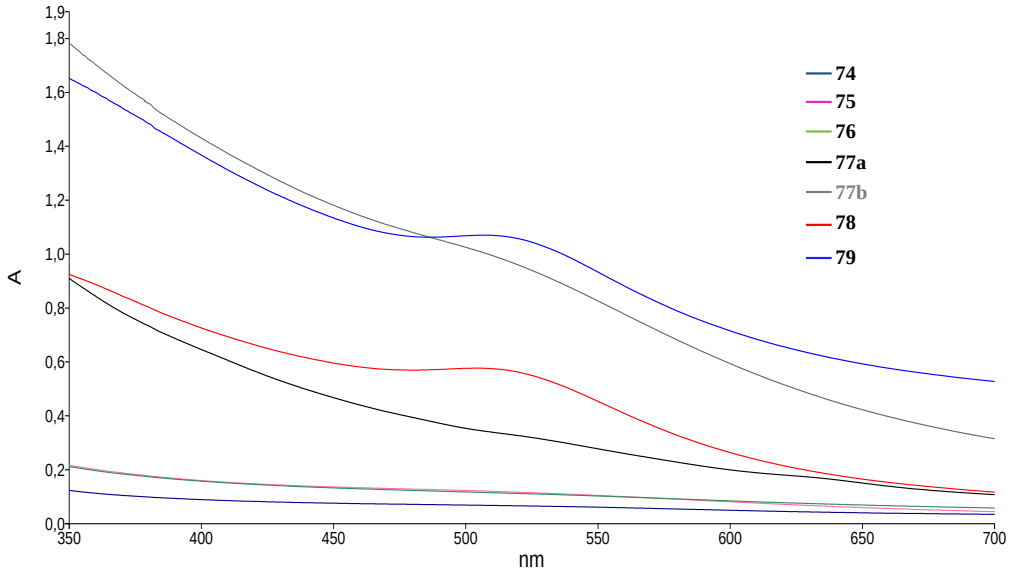


Figura 2.42. Espectros UV-Vis AuNPs aniónicas con grupos sulfonato periféricos

El tratamiento de las imágenes TEM de las nanopartículas **77b-79** permitió determinar el diámetro aproximado de estos sistemas, observándose diámetros de 3.6 nm, 3.4 nm y 3.0 nm respectivamente (Fig.2.43). En cuanto a los espectros de RMN de ^{1}H de los compuestos **77-79**, se pueden observar de nuevo las señales correspondientes a los dendrones como muestra la Figura 2.44, lo que indica el éxito de la dendronización de las nanopartículas.

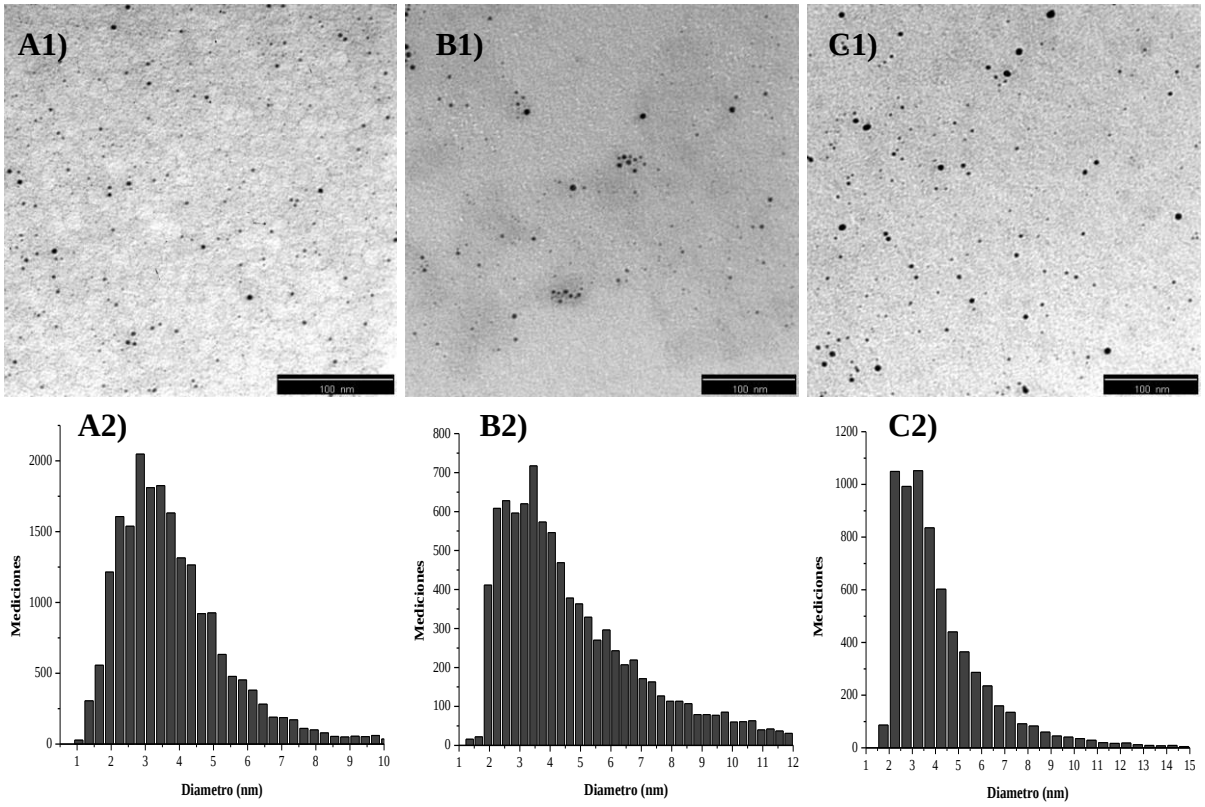


Figura 2.43. Imagen TEM y diagrama de distribución de AuNPs **77b** (A), **78** (B) y **79** (C)

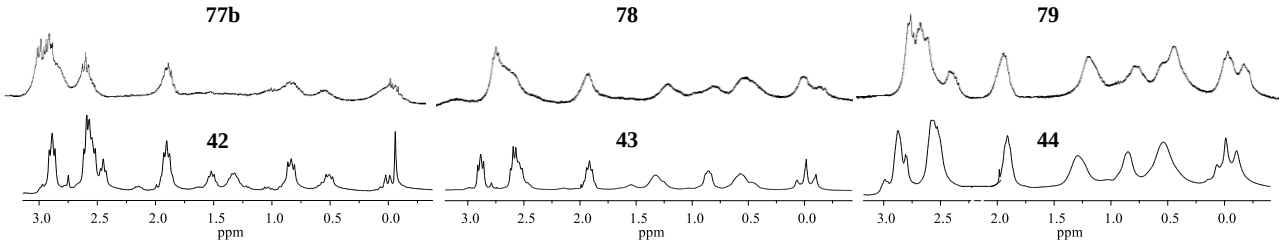


Figura 2.44. Comparación de espectros de RMN de ^{1}H en D_2O de los dendrones **42-44** con las nanopartículas **77b-79**

Como puede observarse, los valores de potencial Z para estos nuevos sistemas son menores que los observados para los sistemas **74-76**, no obstante, son lo suficientemente negativos para justificar la estabilidad observada en las AuNPs e indicar la presencia de los grupos sulfonato periféricos.

Al comparar los datos de caracterización obtenidos por TGA y TEM para los sistemas **77a** y **77b**, podemos concluir que una disminución de la proporción del dendrón en la síntesis produce un aumento de tamaño de la nanopartícula. Por otro lado, para las nanopartículas **77b-79**, la disminución del dendrón en la proporción utilizada da como resultado una ligera disminución en el tamaño de las nanopartículas y como consecuencia un menor número de

grupos sulfonato están presentes en la superficie de las mismas (510 para **77b**, 484 para **78** y 328 para **79**). No obstante, la proporción de número de átomos de oro con respecto a grupos sulfonato es similar para los tres sistemas observándose valores de 2.8 para **77b** y 2.5 en el caso de las nanopartículas **78** y **79**.

Para los sistemas **77b**-**79** se realizó la caracterización mediante espectroscopía XPS en colaboración con la Prof. M. Luisa González Martín del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Extremadura. Esta técnica permitió corroborar la presencia de nuestros dendrones en las AuNPs, así como también la formación del enlace entre el átomo de azufre y la superficie de oro de nuestras nanopartículas. En la Tabla 2.6 se encuentran recogidos los datos de XPS para los compuestos **77b**-**79**.

Tabla 2.6. Datos XPS obtenidos para las nanopartículas **77**-**79**

	Energías de enlace				
	C 1s	**Au**		**S 2p$_{3/2}$**	
		4f$_{7/2}$	**4f$_{5/2}$**		
77b	285.2	84.5	88.0	163.2	168.3
78	285.3	84.8	88.2	163.5	168.4
79	284.9	84.3	87.0	163.4	168.4

En la región C 1s se observó una sola señal en torno a 285.0 eV, la cual corresponde a los enlaces C-C presentes en los compuestos. En cuanto a la región Au 4f, pueden observarse dos picos asignados para Au 4f$_{7/2}$ y Au 4f$_{5/2}$ originados por el núcleo metálico de las AuNPs en torno a 84.5 y 88.0 eV.[323] Por otro lado, la región S 2p muestra dos picos asociados a S 2p$_{3/2}$ y S 2p$_{1/2}$, uno en torno a 163.3 eV debido a los átomos de S unidos a Au y el otro en torno a 168.4 eV que corresponde a los átomos de S presentes en los grupos sulfonato de los dendrones respectivamente.[324-326] Este último representa una mayor contribución que la observada para los átomos de S unidos a Au, debido a que en los compuestos es mayor el número de grupos sulfonato. Además, se observa un incremento en la contribución de la misma al aumentar la generación, como era de esperar, pues al aumentar la generación el número de grupos sulfonato también aumentan (Fig. 2.45).

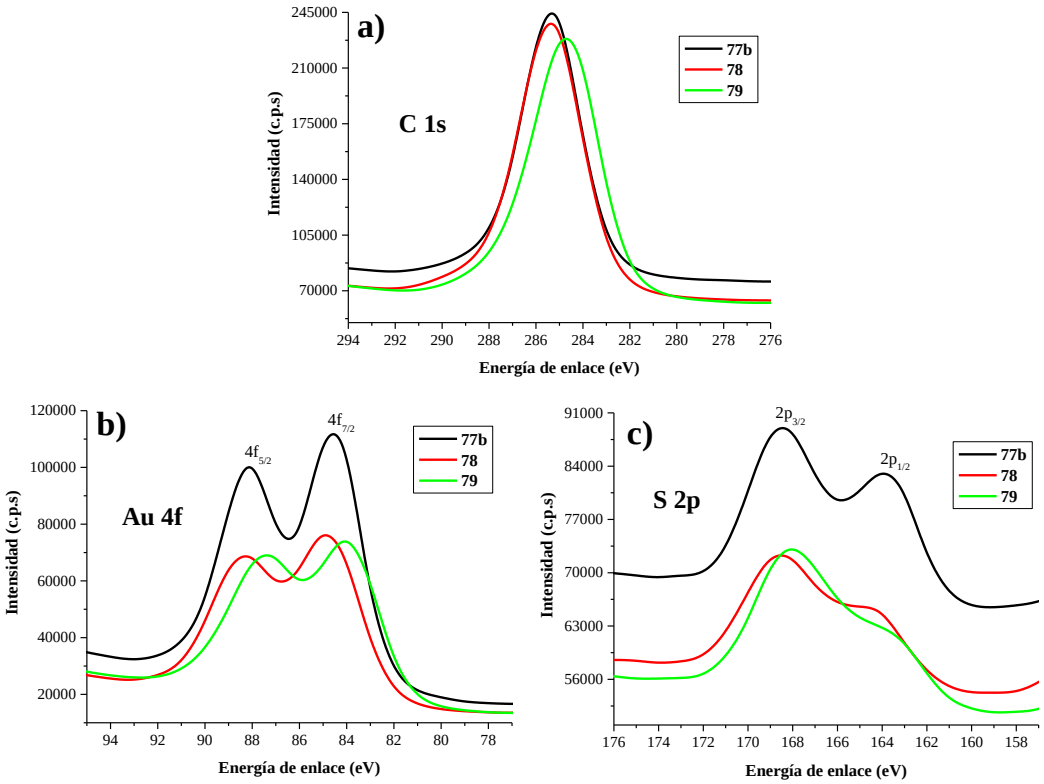


Figura 2.45. Espectros XPS de alta resolución de las regiones: a) C 1s, b) Au 4f y C) S 2p de AuNPs **77b-79**

Otra técnica útil para de la caracterización de estas AuNPs aniónicas fue la Resonancia de Espín Electrónica (EPR por sus siglas en inglés), puesto que permitiría verificar la disponibilidad de los grupos sulfonato periféricos en las AuNPs para su posterior interacción con diferentes sistemas. Los estudios de EPR fueron realizados con la colaboración de la Prof. M. Francesca Ottaviani de la Universidad de Urbino, Italia. Para ello, se realizó el análisis de los espectros obtenidos por EPR tanto de las AuNPs **77-79** como de los dendrones utilizados para su funcionalización **42-44,** al añadir cantidades crecientes de Cu^{II} con respecto a una concentración de grupos sulfonato de 0.001 M. Para determinar la estructura y coordinación de los complejos formados con nuestros compuestos, los datos obtenidos fueron comparados con estudios previos de nuestro grupo de investigación con dendrímeros carbosilano con grupos sulfonato terminales, en los cuales se obtuvieron resultados similares para los complejos de Cu^{II}.[321,322,327,328] Los resultados obtenidos para los dendrones puros fueron comparados con aquellos obtenidos para las AuNPs. Al igual que en dendrímeros previamente sintetizados en nuestro grupo de investigación, los resultados obtenidos por EPR muestran una dependencia en la coordinación del Cu^{II} con las ratios molares SO_3^-/Cu^{II}.[321,322]

En todos los espectros obtenidos se observaron diferentes componentes correspondientes a Cu^{II} con diferentes entornos de coordinación. En la Figura 2.46 se muestra un ejemplo del espectro obtenido para el dendrón de segunda generación **43** a 150 K. Todas las señales corresponden a un entorno de coordinación plano cuadrado distorsionado para el $Cu\text{-}O_4$. La coordinación octaédrica comúnmente observada para estos complejos de Cu^{II} se completaría con moléculas de agua.

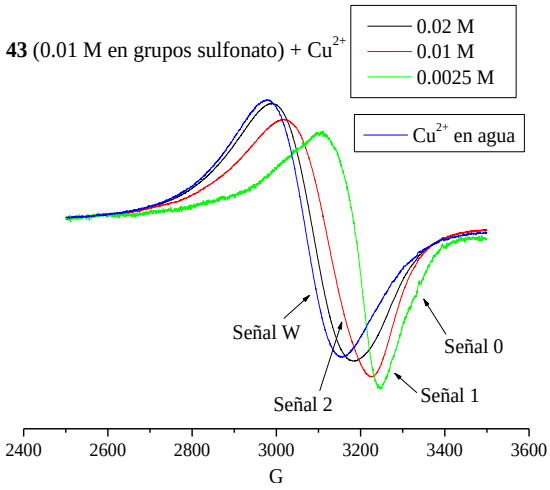


Figura 2.46. Espectro EPR obtenido a 150 K del dendrón **43**

La señal W corresponde al acuocomplejo de Cu^{II}. La señal 0 es atribuida a iones Cu^{II} actuando como puentes entre varios dendrones, que solo se observó en los dendrones **43** y **44** de segunda y tercera generación a bajas concentraciones de Cu^{II}. La señal 1 corresponde a una coordinación de tipo $Cu\text{-}O_4$ con grupos sulfonato de la periferia, mientras que moléculas de agua ocupan los otros sitios de coordinación. Esta señal se observó tanto en los dendrones **42-44** como en las AuNPs **75-77**. La señal 2 corresponde a una contribución debida a diferentes grupos que contienen azufre (tiol del punto focal y sulfonato de la periferia) y solo se observa en los dendrones **43** y **44** de segunda y tercera generación. El dendrón **42** es probablemente demasiado pequeño y la aproximación de diferentes grupos al mismo tiempo no se observa.

El cálculo de los porcentajes relativos de los componentes espectrales para las diferentes muestras permitió obtener aún más información (Fig. 2.47). Al comparar los resultados obtenidos para los dendrones libres con los de la AuNPs dendronizadas se obtienen diferencias significativas, observándose que la disponibilidad de los grupos sulfonato aumentaba al aumentar la generación dendrítica de los sistemas.

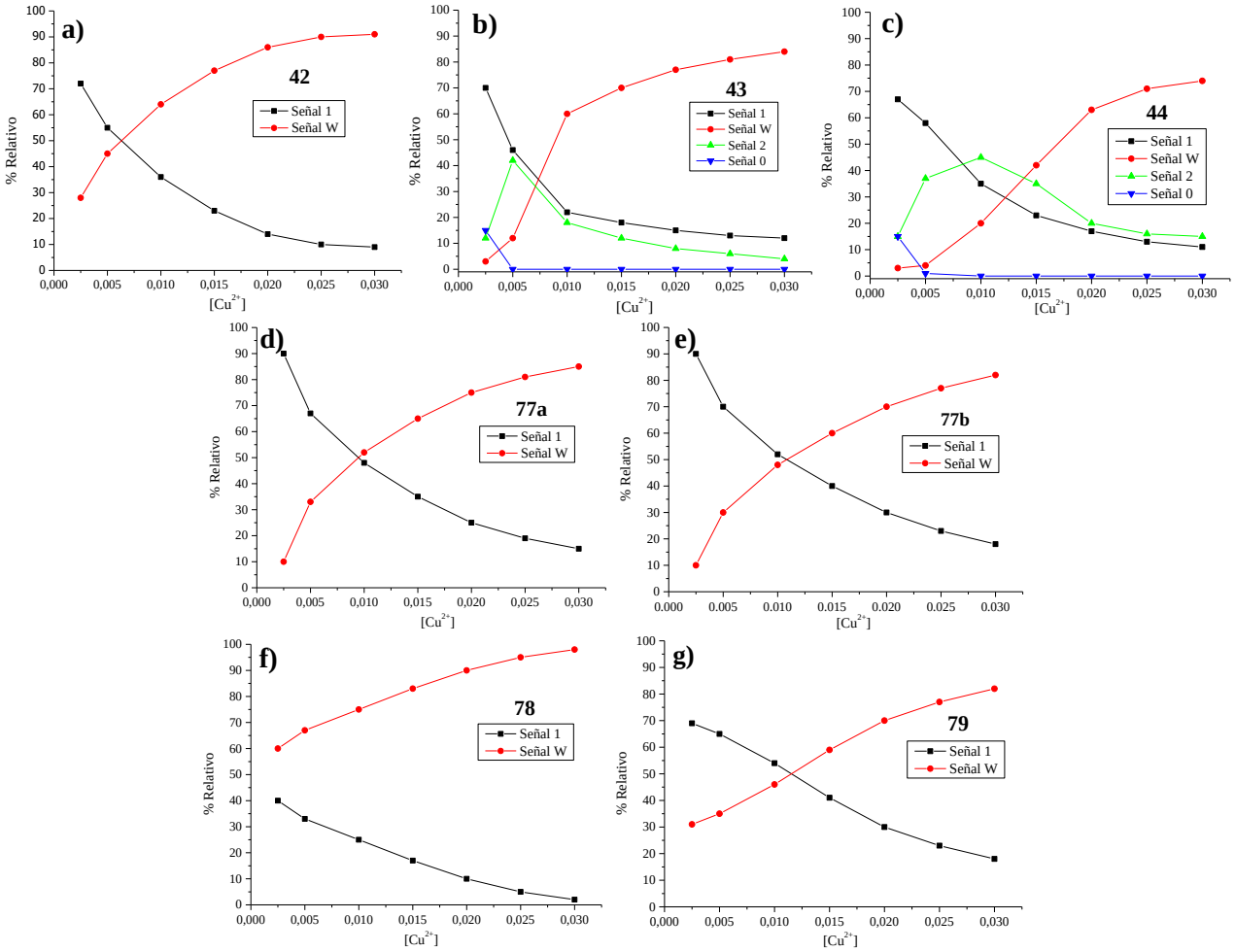


Figura 2.47. Porcentajes relativos de las diferentes señales que constituyen los espectros de EPR a 150 K en función de la concentración de CuII para: a) **42**, b) **43**, c) **44**, d) **77a**, e) **77b**, f) **78** y g) **79**

Para las AuNPs **77** (**a y b**) funcionalizadas con cuñas de primera generación, se aprecia una mayor complejación en las AuNPs en comparación con el dendrón puro, observándose que a ratio molar SO_3^-/Cu^{II} de 4 el dendrón posee un 70% de los grupos sulfonato complejados, mientras las AuNPs poseen un 90%. Aunque las diferencias entre las AuNPs **77a** y **77b** son mínimas, los grupos sulfonato de las AuNPs **77a** interaccionan peor que las AuNPs **77b**, esto probablemente debido a la presencia de una mayor saturación de la superficie de la AuNPs en el caso de **77a**.

En el caso de la AuNPs **78**, la complejación es mucho menor que para las AuNPs **77a-77b** y **79**, observándose que a una ratio molar SO_3^-/Cu^{II} de 4 sólo el 40% de los grupos sulfonato esta complejado. Esto puede deberse a la estructura de los dendrones y a su ordenamiento sobre la superficie de la AuNPs. No obstante, en el dendrón **43** la capacidad de interacción de los grupos sulfonato es también mucho menor en comparación con sus

análogos **42** y **44** por lo que no sorprende que se mantenga el mismo comportamiento. Cabe destacar, que este tipo de comportamiento ha sido observado antes en compuestos dendríticos y se suele atribuirse a plegamientos de la estructura para evitar repulsiones estéricas.[329] En cuanto a la AuNPs **79** se observa una vez más una mayor capacidad de interacción de los grupos sulfonato en comparación con su dendrón precursor de tercera generación.

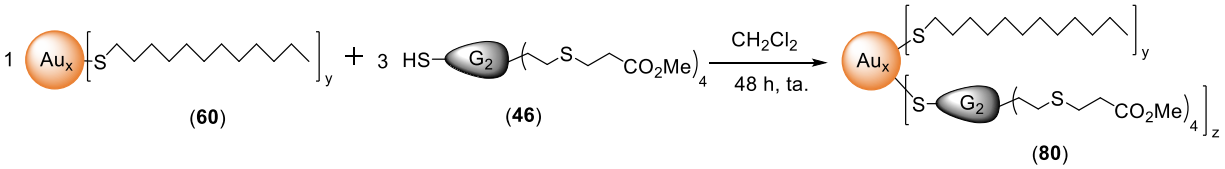
A partir de los resultados obtenidos por medio de ésta técnica se puedo concluir que los grupos sulfonato presentes en las AuNPs **77-79** están disponibles para poder interaccionar con diferentes sistemas.

2.3.4b. AuNPs funcionalizadas con dendrones con grupos carboxilato terminales (-CO_2^-)

Los grupos carboxilato son otra función aniónica ampliamente utilizada en aplicaciones biomédicas. El interés por la obtención de este tipo de sistemas radica en la facilidad de modificación de los grupos periféricos por cambios en el pH. Con la intención de introducir este grupo, inicialmente se consideró funcionalizar nanopartículas con dendrones que poseían grupos tipo éster, -CO_2Me, que actuarían como precursores de grupos carboxilato, -CO_2^-. Además de estos sistemas también se utilizaron dendrones que ya poseían la función -CO_2^-.

Método de intercambio

La primera metodología sintética utilizada para la síntesis de AuNPs aniónicas con grupos éster, -CO_2Me fue el método de intercambio. Para comprobar si era posible la obtención de dichos sistemas, se utilizó el dendrón de segunda generación con grupos -CO_2Me en la periferia (**46**). Así, a una disolución en CH_2Cl_2 del compuesto **60** se le adicionó el dendrón **46** disuelto en CH_2Cl_2, la mezcla se mantuvo bajo agitación en atmósfera inerte durante 48 horas (Esq.2.18). La mezcla resultante se concentró a vacío y el residuo se lavó varias veces con hexano, obteniéndose las nanopartículas $Au_xG_2(S\text{-}(CO_2Me)_4)_y(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y$ (**80**).



Esquema 2.18. Síntesis de AuNPs **80** por el método de intercambio

La comparación de los espectros de UV-Vis obtenidos para las AuNPs **80** y la AuNPs precursora **60** muestra que para ambos sistemas la banda SPR observada es similar (Fig.2.48).

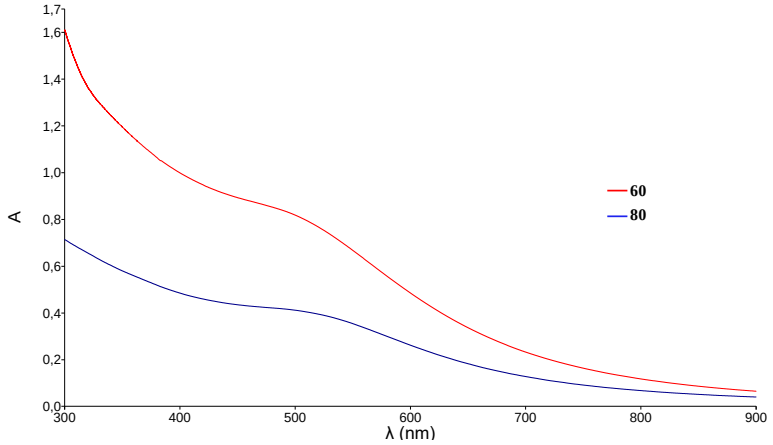


Figura 2.48. Espectros UV-Vis de AuNPs **60** y **80**

Las imágenes obtenidas por TEM permitieron verificar que el tamaño de las nanopartículas, después de la reacción de intercambio permanecía prácticamente constante, obteniéndose un diámetro aproximado para el compuesto **80** de 2.2 nm (Fig.2.49).

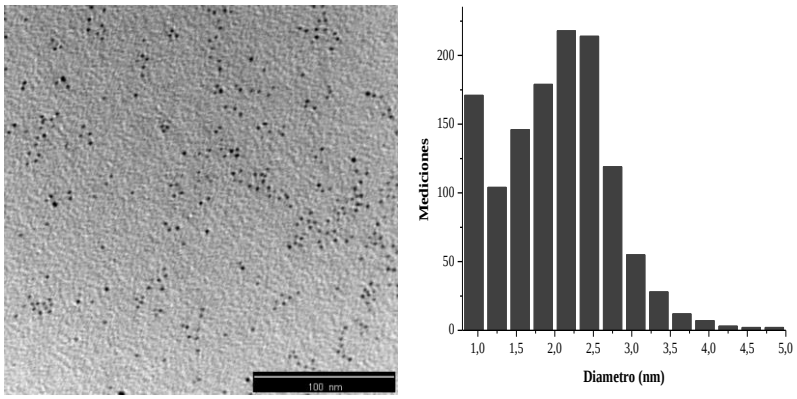


Figura 2.49. Imagen TEM y diagrama de distribución de tamaño de AuNPs **80**

El espectro de RMN de ^{1}H obtenido para AuNPs **80** permite observar la unión de nuestros ligandos a la AuNPs por la presencia de las señales correspondientes a éste.

La cantidad relativa de dendrón con respecto a dodecanotiol también pudo estimarse a partir de los espectros de RMN de ^{1}H por comparación de las integrales de las señales a 3.20 ppm correspondientes a los grupos metilo de los grupos éster de la periferia (-CO_2CH_3) y las señales que aparecen en torno a 0.80-1.50 ppm asignadas a los grupos metilo y metileno del dodecanotiol ($SCH_2(CH_2)_{10}CH_3$) y algunos grupos metileno del dendrón de partida (-$SiCH_2CH_2CH_2Si$-, -$SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$-). Esta comparación indica que la sustitución fue de aproximadamente un 50% (Fig.2.50).

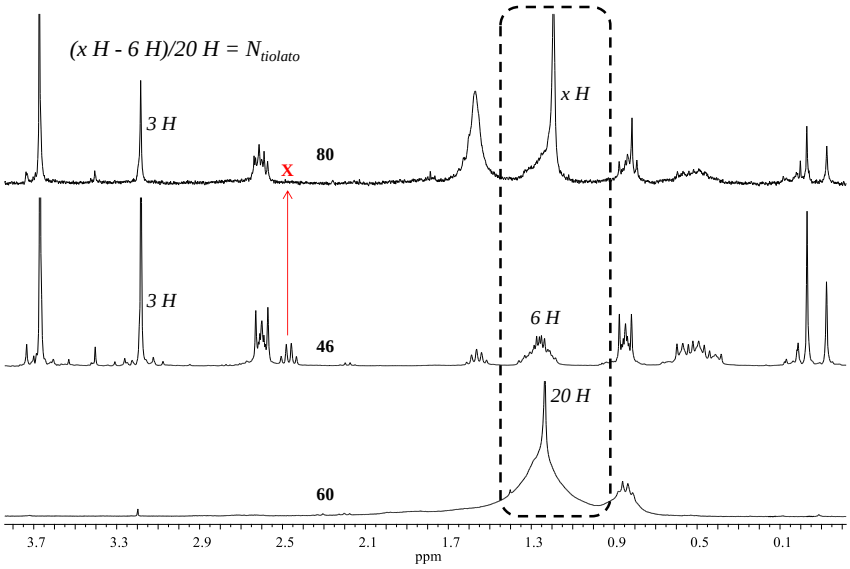
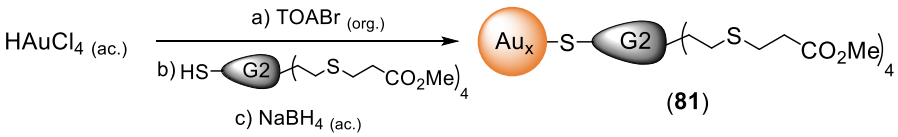


Figura 2.50. Espectros de RMN de ^{1}H en $CDCl_3$ de la AuNPs **80** y **60** y dendrón **46**

Método directo bifásico

Debido a que por el método de intercambio sólo se logró obtener un 50% de sustitución de los grupos dodecanotiolato presentes en la nanopartícula precursora, se intentó obtener AuNPs por el método directo. Para ello, se utilizó la misma metodología utilizada en el caso de las nanopartículas neutras **66** (2.3.3b). Así, a una disolución acuosa de $HAuCl_4$ se le adicionó una disolución en tolueno de TOABr. A continuación, se separaron las fases y a la fase orgánica se le adicionó el dendrón $HSG_2(S\text{-}CO_2Me)_4$ (**46**). Seguidamente, se adicionó una disolución acuosa de $NaBH_4$ con goteo lento y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4h (Esq.2.19). El crudo de reacción se concentró a vacío y las nanopartículas obtenidas se hicieron precipitar con hexano.



Esquema 2.19. Síntesis de nanopartículas **81**

Las imágenes TEM obtenidas permitieron determinar el diámetro promedio de las nanopartículas **81**, observándose un tamaño aproximado de 1.4 nm (Fig.2.51).

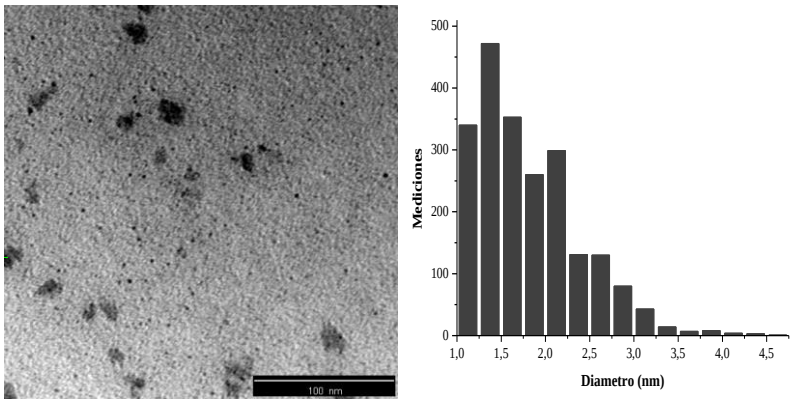


Figura 2.51. Imagen TEM y diagrama de distribución de tamaño de nanopartícula **81**

El espectro de RMN de ^{1}H de la nanopartícula **81** muestra nuevamente la dendronización de las AuNPs. Lamentablemente, en esta ocasión no pudimos purificar completamente las AuNPs sintetizadas, ya que fue imposible eliminar completamente el agente de transferencia de fase utilizado, TOABr. (Fig.2.52).

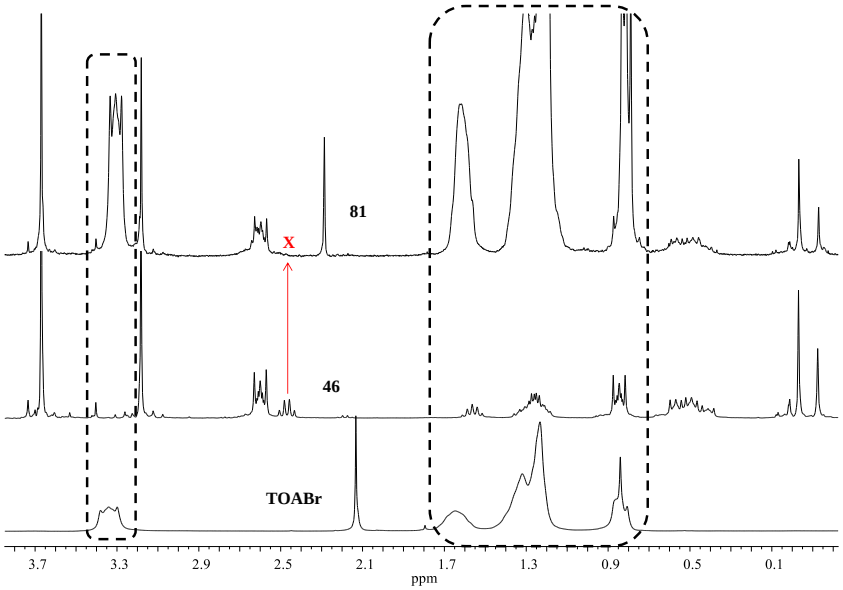
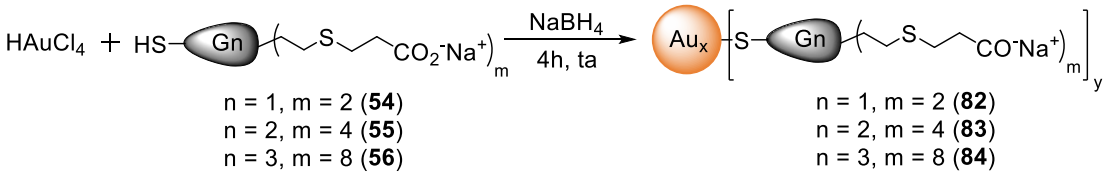


Figura 2.52. Comparación de espectros de RMN de ^{1}H en $CDCl_3$ del dendrón **46**, la nanopartícula **81** y el agente de transferencia de fase TOABr

Para obtener los sistemas aniónicos deseados, las nanopartículas **80** y **81** obtenidas previamente, fueron tratadas con NaOH en un intento de desproteger los grupos éster periféricos. No obstante, este tratamiento no condujo a la obtención de los sistemas aniónicos deseados, confirmándose por TEM la descomposición de las nanopartículas tras este tratamiento.

Método directo en una sola fase

Debido a que el tratamiento de los derivados **80** y **81** no condujo a la obtención de los sistemas aniónicos deseados, intentamos la obtención de dichos sistemas utilizando el método directo en una sola fase. Para ello, se partió de dendrones carbosilano con grupos periféricos carboxilato, $-CO_2^-$ (**54-56**), lo que nos permitió obtener las nanopartículas aniónicas deseadas $Au_XG_2((S\text{-}CO_2Na)_m)_y$ (n = 1, m = 2 (**82**); (n = 2, m = 4 (**83**); (n = 3, m = 8 (**84**)) (Esq.2.20). Los datos de caracterización físico-químicos obtenidos para las nanopartículas aniónicas **82-84** están recogidos en la Tabla 2.7.



Esquema 2.20. Síntesis de AuNPs aniónicas **82-84**

Tabla 2.7. Datos físico-químicos obtenidos para las nanopartículas **77-79**

	UV-Vis (nm)	Ratio Molar Au/L[a]		D (nm)[b]	Formula Molecular[c]	PM Aprox. ($gmol^{-1}$)[c]	N[e]
		Teó.	Obt.				
82	521.3	2:1	5.3:1	3.3	$Au_{1090}(C_{13}H_{23}Na_2O_4S_3Si)_{206}$	299885.94	412
83	525.8	4:1	5.3:1	4.8	$Au_{3416}(C_{29}H_{53}Na_4O_8S_5Si_3)_{648}$	1234158.32	2592
84	526.2	8:1	10.4:1	4.9	$Au_{3702}(C_{61}H_{113}Na_8O_{16}S_9Si_7)_{356}$	1359853.32	2848

a) L = dendrones; b) diámetro obtenido por TEM; c) diámetro obtenido por DLS; d) Obtenido por TEM y TGA; e) número de grupos $-SO_3^-$ por NP

El tratamiento de las imágenes TEM obtenidas para las AuNPs aniónicas con grupos carboxilato (**82-84**) permitió obtener el diámetro promedio de dichos sistemas, observándose un tamaño de 3.3 nm para **82**, 4.8 para **83** y 4.9 nm en el caso de **84** (Fig.2.53). A pesar de observar AuNPs en las imágenes TEM, las AuNPs **83** funcionalizados con dendrones de segunda generación resultaron ser parcialmente solubles, mientras que las AuNPs **84** funcionalizadas con dendrones de tercera generación resultaron ser totalmente insolubles en

agua después de su purificación por diálisis. Teniendo en cuenta que los sistemas carboxilato son susceptibles a cambios en función del pH, este comportamiento posiblemente sea debido a una protonación de los grupos carboxilato periféricos.

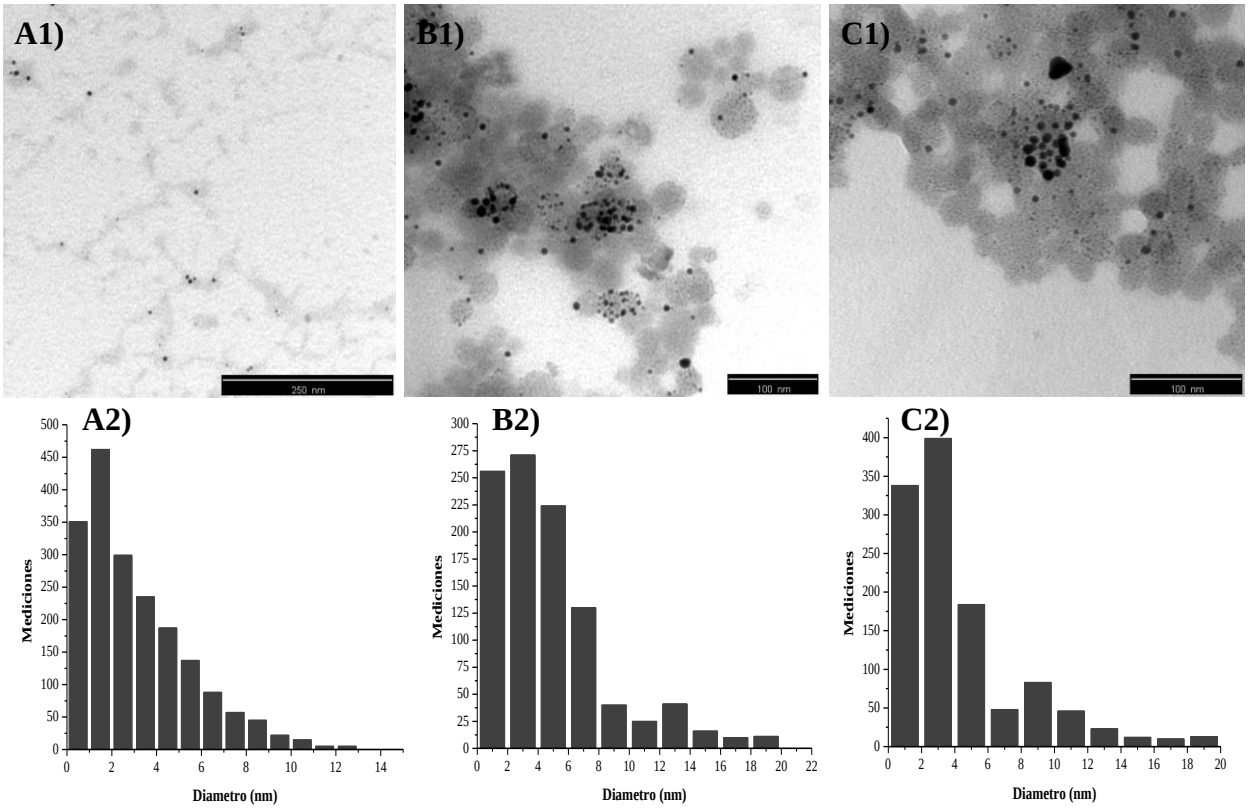


Figura 2.53. Imagen TEM y diagrama de distribución de AuNPs **82** (A), **83** (B) y **84** (C)

Para comprobar esta hipótesis, se realizó un ensayo de variación de pH con la AuNPs **82** funcionalizadas con dendrones de primera generación y que eran totalmente solubles en agua incluso después del proceso de purificación por diálisis. Así, en una disolución acuosa de AuNPs **82** se varió el pH en un rango de 11 a 2, observándose que a pH = 5 la disolución comenzaba a tornarse turbia y que finalmente las AuNPs precipitaban a un pH de 2. En el proceso inverso (de pH 2 a 11), se observó el comportamiento opuesto.

Las imágenes TEM de las AuNPs **82** después del tratamiento acido-base no mostraron cambios significativos en cuanto a forma y tamaño, demostrándose que el cambio en el pH de las AuNPs no altera su morfología ni su tamaño (Fig. 2.54).

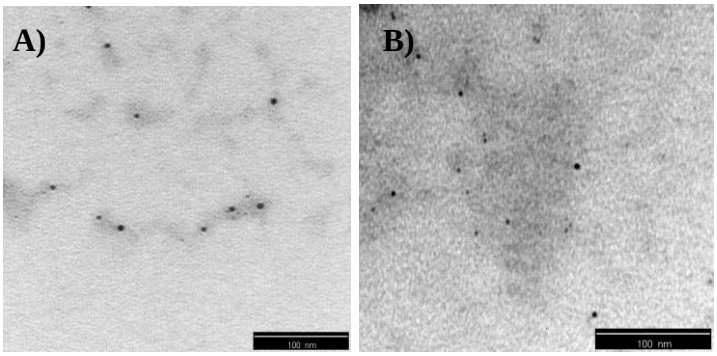


Figura 2.54. Imagen TEM de AuNPs **82** A) antes y B) después de tratamiento acido-base

2.4. CONCLUSIONES

- Se han sintetizado AuNPs con grupos periféricos amonio, $-NMe_2H^+$ y $-NMe_3^+$, tanto por el método directo como por el método de intercambio. La proporción Au/L utilizada conduce a la obtención de nanopartículas con diámetros de entre 2-5 nm. Los datos obtenidos por TEM y TGA permiten determinar la fórmula molecular aproximada de los sistemas obtenidos. Además, se ha demostrado la influencia del contraión en la estabilidad de los sistemas, observándose que las AuNPs que contenían el anión Cl^- poseían una mayor estabilidad.

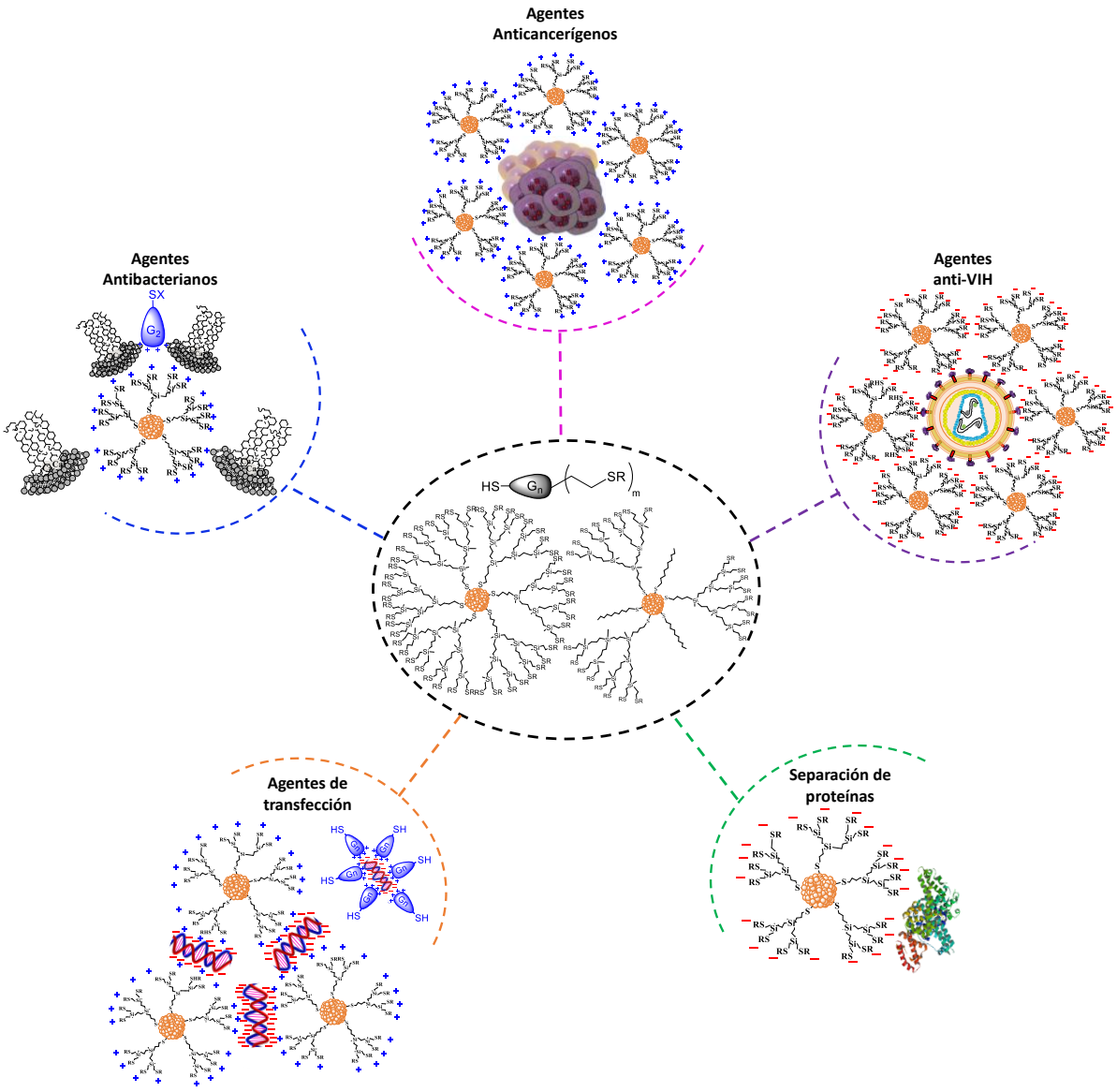
- Se han sintetizado AgNPs catiónicas con grupos periféricos amonio $-NMe_3^+$, de primera, segunda y tercera generación por el método directo. La estabilidad de estos sistemas resulto ser menor que sus análogos AuNPs.

- Se obtuvieron AuNPs aniónicas con grupos periféricos sulfonato, $-SO_3^-$, utilizando los métodos directo y de intercambio. Por el método de intercambio se logró una sustitución de aproximadamente un 90%. Por otro lado, en el método directo la misma proporción Au/L utilizada en el caso de las AuNPs catiónicas solo permitió obtener AuNPs funcionalizada con dendrones de primera generación **77a**. Un ajuste en la proporción Au/L en función del número grupos sulfonato presentes en los dendrones permitió obtener las AuNPs funcionalizadas con dendrones de primera, segunda y tercera generación **77b-79** cuyo diámetro aproximado fue de 2-4 nm. El estudio por XPS corroboró la presencia de nuestros dendrones en la superficie de las AuNPs. La disponibilidad de los grupos sulfonato periféricos para su posterior interacción con otros sistemas, se comprobó por EPR, observándose que las AuNPs **78**

funcionalizadas con dendrones de segunda generación poseían los grupos sulfonato menos disponibles que las AuNPs **77** y **79** funcionalizada con dendrones de primera y tercera generación.

- Se han preparado AuNPs aniónicas con grupos carboxilato, $-CO_2^-$, periféricos por el método directo. La solubilidad para el sistema **82** funcionalizado con dendrones de primera generación mostró ser dependiente del pH, observándose que el tamaño y la forma de las AuNPs no se ven afectadas por esta modificación.

Capítulo III



Aplicaciones biomédicas

3.1. INTRODUCCIÓN

La *Nanomedicina* es un área enfocada al desarrollo de nanodispositivos y nanomateriales para su uso en aplicaciones biomédicas tales como, imagen, transporte de moléculas y diagnóstico.[330-333] Dentro de estos nanomateriales se encuentran las nanopartículas metálicas (MNPs) que destacan especialmente debido a sus propiedades físicas, su gran superficie con respecto a su volumen y su fácil funcionalización con una gran variedad de ligandos.[334] La funcionalización de MNPs depende fundamentalmente de la aplicación en la que se pretendan utilizar. En algunas MNPs, los ligandos funcionales localizados en la superficie interactúan directamente con moléculas biológicas permitiendo su uso como agentes terapéuticos per se.[335] Dentro de estos sistemas, las MNPs de oro (AuNPs) y plata (AgNPs) han recibido una atención especial.

El oro coloidal presenta una alta estabilidad química y una gran biocompatibilidad lo que ha promovido su uso en la síntesis de nanosistemas con fines terapéuticos.[143] En el caso de las AuNPs la toxicidad depende además de la forma y el tamaño, de los ligandos superficiales de los sistemas sintetizados.[161,336-338] No obstante, su fácil síntesis y funcionalización ha permitido obtener sistemas potencialmente útiles en aplicaciones biomédicas,[143,339] dentro de las que destacan su uso en terapia del cáncer,[340] como agentes de transporte de ácidos nucleicos,[341] como agentes antibacterianos[342] y como agentes antivirales.[343,344]

En cuanto a las AgNPs, éstas han mostrado una capacidad biocida efectiva,[345] donde los núcleos metálicos de plata actúan como reservorios de iones Ag^+, aumentando la capacidad antibacteriana de estos sistemas en comparación con las sales de plata.[10] Al igual que las AuNPs, las AgNPs han mostrado poseer actividad antiviral[346] y anticancerígena[347] en función de los ligandos anclados en su superficie. En cuanto a su toxicidad, algunos estudios han demostrado que depende tanto del tamaño como de la concentración.[348,349]

Otros sistemas nanoscópicos que también han mostrado resultados prometedores en el campo de la biomedicina son las estructuras dendríticas.[110,350,351] Al igual que en las MNPs, su aplicación está íntimamente relacionada con los grupos funcionales situados en la periferia. Dentro de las estructuras dendríticas, las de tipo carbosilano sintetizados en nuestro grupo de investigación, con grupos periféricos catiónicos, han mostrado ser útiles como

agentes antibacterianos,[76,118] anticancerígenos,[352] transporte de fármacos[113] y transporte de ácidos nucleicos,[353] mientras que los sistemas con grupos periféricos aniónicos han sido utilizados como agentes antivirales.[77,117]

La funcionalización de MNPs con estructuras dendríticas ha permitido obtener nuevos nanosistemas que también presentan resultados prometedores en cuanto a aplicaciones biomédicas respecta.[313,354,355] En este sentido, se han sintetizado MNPs funcionalizadas con sistemas dendríticos de tipo carbosilano catiónicos y aniónicos buscando un efecto cooperativo entre ambas estructuras para de esta forma intentar potenciar la actividad terapéutica que nuestros sistemas dendríticos ya poseen.

3.1.1. AuNPs y AgNPs como agentes terapéuticos

3.1.1.a. Agentes antibacterianos

A pesar de los avances en el descubrimiento de fármacos, las infecciones causadas por bacterias continúan siendo un problema de salud mundial que afecta a millones de personas anualmente. El uso y el abuso de antibióticos han traído consigo la aparición de cepas bacterianas patógenas que poseen resistencia a uno o varios antibióticos haciendo necesario el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. Las MNPs han mostrado ser sistemas potencialmente activos frente a bacterias.[356] Dentro de estos sistemas, las AuNPs y las AgNPs muestran una actividad de amplio espectro, actuando frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas.[311,357] Existen diferentes factores que influyen en la actividad antibacteriana de MNPs entre los que se encuentran la forma, el tamaño y los ligandos superficiales.[337,358,359]

Con respecto al tamaño, algunos estudios han demostrado que las nanopartículas más pequeñas poseen mejor actividad antibacteriana, pues permite que éstas alcancen fácilmente el contenido nuclear de la bacteria aumentando la acción bactericida.[251,360]

En cuanto a la carga superficial, se ha observado que MNPs con grupos funcionales que presentan cargas positivas poseen una mayor actividad que aquellos funcionalizados con grupos neutros o aniónicos.[361] En este sentido, las estructuras dendríticas de tipo carbosilano sintetizadas en nuestro grupo de investigación serían candidatos ideales para la

funcionalización de MNPs, pues además de tener cargas positivas periféricas poseen un esqueleto hidrofóbico que aumenta su interacción con la membrana bacteriana.[362] Aunque el mecanismo de acción de las estructuras de naturaleza carbosilano no está totalmente establecido, se ha aceptado la hipótesis de que su actividad antibacteriana pueda deberse a que causan el desplazamiento de cationes fundamentales de la membrana (Ej. Ca^{2+}) debido a la presencia de cargas positivas en estos sistemas, favorecido además por el carácter hidrofóbico del esqueleto que facilita la interacción con la membrana bacteriana.[363] Por lo que, teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, cabe esperar que el uso dendrones catiónicos de naturaleza carbosilano en la funcionalización de MNPs pueda conducir a la formación de nanocompuestos con actividad antibacteriana efectiva.

Otro factor que influye de manera determinante en la capacidad antibacteriana es el tipo de bacteria que se trate. Una de las características más significativas en este sentido es la pared celular. La diferencia fundamental en cuanto a la pared celular, radica en las características químicas y estructurales que existen en las mismas. De acuerdo a la estructura, componentes y funciones de la membrana, las bacterias se dividen en dos grandes categorías: Gram-(+) y Gram-(-).

La pared celular de las bacterias Gram-(+) contiene una pequeña multicapa (20-50 nm) de peptidoglicano (PG) que cubre la membrana citoplasmática y en la que se encuentra unidos los ácidos teicoicos que están presentes solamente en bacterias Gram-(+). Además, posee ácidos lipoteicoicos que se extienden hasta la membrana citoplasmática (Fig.3.1a). Por otro lado, la pared celular de las bacterias Gram-(-) es más compleja tanto química como estructuralmente. En éstas bacterias, la pared celular abarca la membrana citoplasmática sobre la que se encuentra el espacio periplásmico en medio del cual se localiza una fina capa de PG. Además, posee una membrana externa compuesta de lipopolisacáridos que les confiere una mayor resistencia (Fig.3.1b). Estas diferencias presentes en la estructura de la pared celular juegan un papel importante en lo que respecta a la tolerancia o susceptibilidad de las bacterias frente a las nanopartículas.

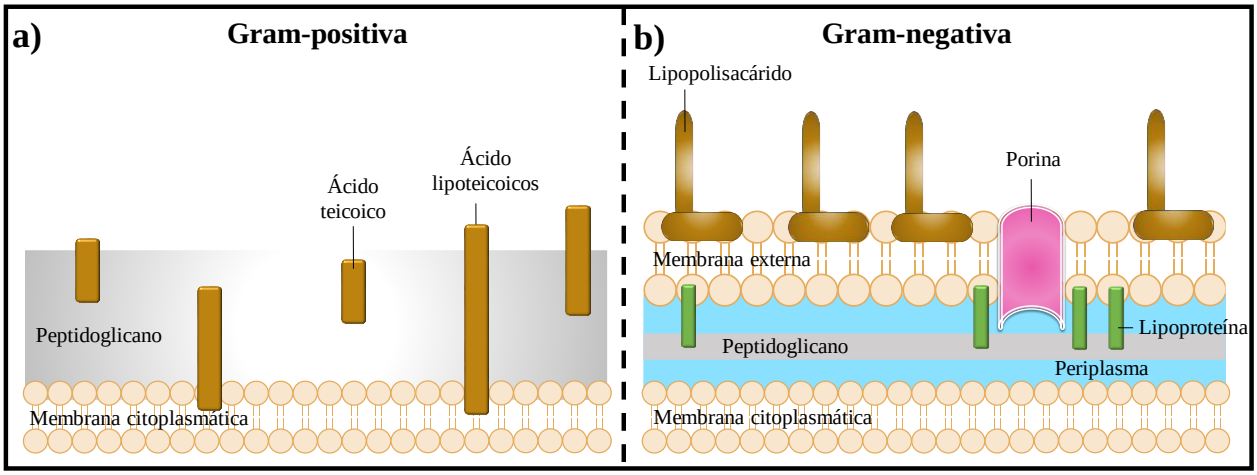


Figura 3.1. Estructura de pared celular bacteriana: a) Gram-(+) y b) Gram-(-)

Mecanismos de acción de AuNPs y AgNPs frente a bacterias

Una característica especialmente atractiva de las MNPs es su actividad frente a bacterias resistentes. Estos sistemas, a diferencia de los fármacos comunes, poseen varios puntos de acción que hace difícil a la bacteria desarrollar resistencias.[360,364,365] Sin embargo, a pesar de las excelentes propiedades antibacterianas que presentan las MNPs su mecanismo de acción no está totalmente establecido, debido a su complejidad y al gran número de factores que influyen en éste, aunque se han propuestos diferentes mecanismos para explicar el comportamiento bactericida de dichos compuestos (Fig.3.2).[365]

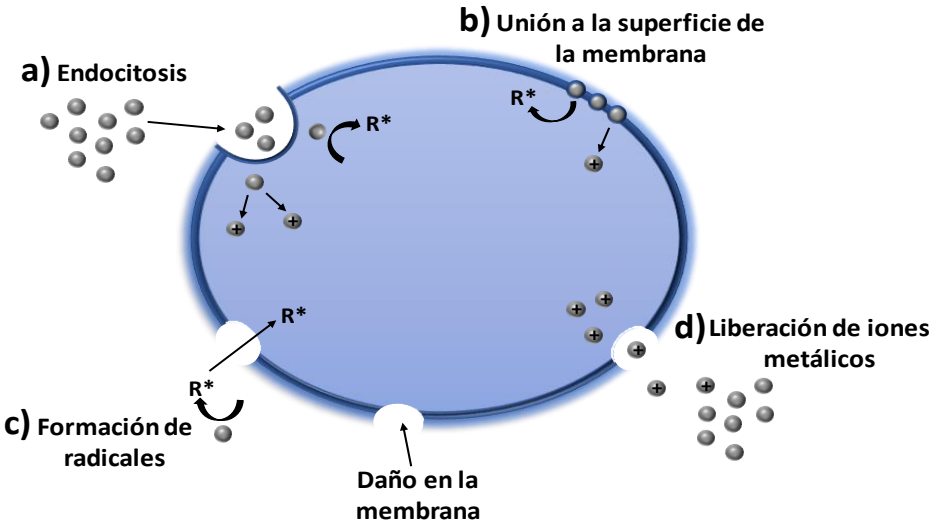


Figura 3.2. Representación de mecanismos asociados al comportamiento antibacteriano de nanopartículas metálicas: a) endocitosis, b) unión a la superficie de la membrana, c) Formación de radicales y d) liberación de iones metálicos

El primer mecanismo es la incorporación directa de las MNPs en la célula por endocitosis. Una vez dentro de la célula, las MNPs pueden formar especies iónicas por la interacción con proteínas intracelulares o inducir la formación de radicales libres.[366,367] La alta concentración intracelular provoca un estrés oxidativo que produce daños tanto en la membrana lipídica como en el ADN (Fig.3.2a).[359]

Otro mecanismo sugerido, es la unión de MNPs a la pared celular de las bacterias, penetrando posteriormente en éstas y causando daños estructurales en la membrana como su permeabilidad y respiración, que posteriormente conduce a la lisis celular.[367-369] Además, pueden causar un daño físico directo en la membrana celular por acumulación (Fig.3.2b).

Un tercer mecanismo es la formación de radicales libres. Estudios de EPR realizados utilizando AgNPs sugieren la formación de éstos cuando las bacterias establecen contacto con las AgNPs. Los radicales libres formados podrían ser los responsables de daños en la membrana por medio de la formación de poros causando de este modo la lisis celular (Fig.3.2c).[359,370,371]

Por último, otro mecanismo que también puede ser considerado como el causante de la lisis celular es la liberación de iones metálicos de las MNPs. Los iones liberados pueden dañar la membrana celular directamente debido a un bloqueo de la cadena respiratoria, colapsando la membrana e impidiendo la producción de ATP. Además, pueden promover la formación de especies reactivas de oxigeno (ROS por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) las cuales dañan la membrana lipídica y el ADN.[359,372,373]

3.1.1.b.Agentes anticancerígenos

La facilidad de poder funcionalizar la superficie de las MNPs con un gran número de ligandos y su heterofuncionalidad permiten la introducción de una gran variedad de grupos activos frente al cáncer. La citotoxicidad de las MNPs está relacionada con su interacción con la membrana celular, una característica inicialmente mediada por su fuerte atracción electrostática a la bicapa cargada negativamente, observándose una mayor citotoxicidad en MNPs con carga superficial positiva.[337]

Los sistemas tumorales contienen vasculatura con fugas y alta permeabilidad debido a una mayor angiogénesis causada por diferentes citoquinas.[374] Esta permeabilidad permite que las MNPs sean capaces de llegar al tumor.[375,376] Una vez allí, estos sistemas tienden a acumularse en la matriz extracelular antes de entrar en la célula fenómeno conocido como "efecto de permeabilidad y retención aumentado" (efecto EPR por sus siglas en inglés) (Fig.3.3).[377,378] Después de su asociación con las células tumorales pueden destruirlas ya sea por inducción fototérmica, daño mecánico o por medio del transporte de diferentes agentes anticancerígenos.[379-382]

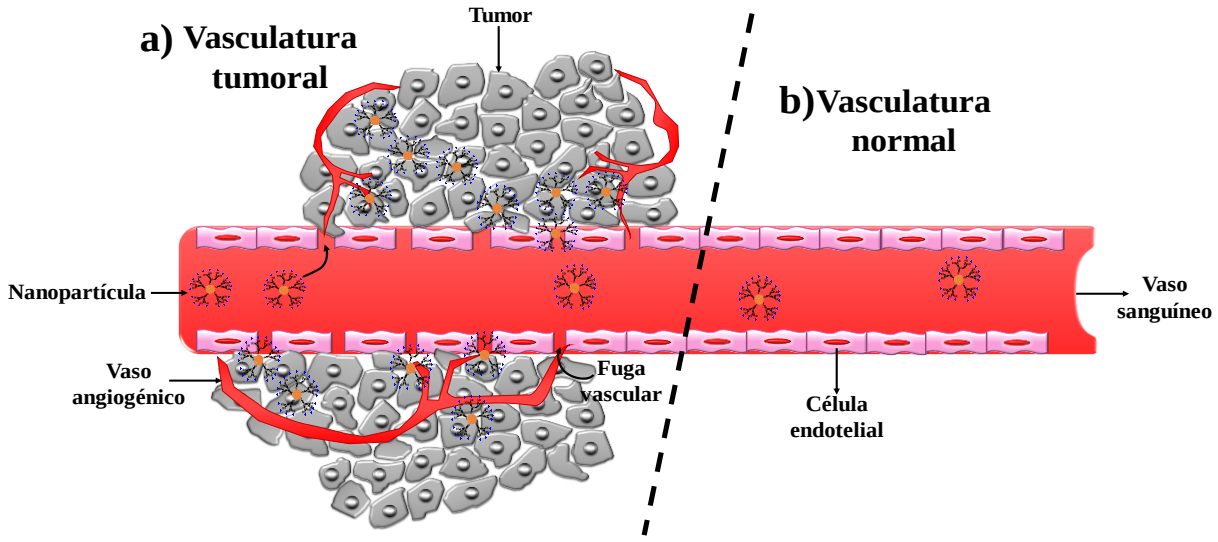


Figura 3.3. Representación de vasculatura tumoral (a), vasculatura normal (b) y paso de MNPs al tumor por fuga vascular

Las AuNPs han mostrado actividad anti-angiogénica y anti-tumoral. Algunos estudios revelan que AuNPs funcionalizadas con tetrahidroborato (BH_4^-) se unen a factores de crecimiento pro-angiogénicos inhibiendo de este modo la angiogénesis tumoral.[383] Otros estudios demostraron que éstas AuNPs eran capaces de causar una disminución en la proliferación celular del mieloma múltiple.[384] Sistemas de AuNPs funcionalizadas con el anticuerpo anti-VEGF (VEGF, por Vascular Endothelial Growth Factor) mostraron ser más eficaces que el anticuerpo solo, induciendo la apoptosis de células B en la leucemia linfática crónica.[385] Experimentos *in vitro* realizados con AuNPs preparadas por biosíntesis indican que estos sistemas son capaces de causar la muerte en células de cáncer de mama metastásico (MDA-MB-23).[386]

En cuanto a las AgNPs, éstas interaccionan con las mitocondrias interrumpiendo la cadena respiratoria mediante la generación de especies ROS y la supresión de la síntesis de ATP causando de este modo daños en el ADN.[348,349] Al igual que las AuNPs, las AgNPs han demostrado poseer actividad anti-tumoral y anti-angiogénica. En este sentido, AgNPs sintetizadas por biosíntesis mostraron ser agentes activos frente al cáncer tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo capaces de inhibir la viabilidad y proliferación en células DLA (Dalton's lymphoma ascites).[387] Otros estudios realizados con AgNPs funcionalizadas con BH_4^-, mostraron que estos sistemas eran potencialmente tóxicos frente a células de adenocarcinoma de colon humano (HT29), induciendo la muerte celular por apoptosis.[388] Se han realizado estudios de actividad citotóxica de AgNPs sintetizadas utilizando bacterias frente a células de cáncer de mama metastásico (MDA-MB-231) observándose que estos sistemas son capaces de aumentar la generación de ROS y activar la caspasa-3 causando posteriormente la apoptosis celular.[389]

3.1.1.c. Agentes antivirales: VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana)

El VIH es un virus que ataca el sistema inmune debilitándolo y causando el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Como resultado, las personas infectadas se vuelven más susceptible a contraer infecciones y enfermedades. Este virus, sigue siendo un problema de salud pública mundial importante, ya que en la actualidad 36.7 millones de personas están infectadas con el VIH y 35 millones han muerto por enfermedades relacionadas con el SIDA.[390] A pesar de los esfuerzos realizados no existe una vacuna capaz de prevenir la infección del VIH. Además, las terapias actuales utilizadas en su tratamiento traen consigo resistencias, efectos secundarios y elevados costes. El uso de MNPs puede ser una alternativa viable en el desarrollo de sistemas capaces de evitar la infección o bien de actuar en etapas tempranas de la infección.[346,391,392]

Estructura y replicación del VIH

La partícula viral del VIH es esférica y posee un diámetro aproximado de 100-120 nm. El virus está conformado por una envoltura externa integrada por una bicapa de fosfolípidos en la que se anclan las proteínas gp120 y gp41.[393] Estas proteínas interactúan de forma no covalente formando trímeros dispuestos de manera que la proteína gp41 queda unida a la

bicapa mientras que la gp120 se encuentra en el exterior del virus.[394,395] Una matriz proteica formada de proteína p17 se encuentra localizada entre el núcleo y la envoltura externa. El núcleo viral contiene la cápsula de proteína viral p24 la cual rodea dos cadenas simples de ARN del VIH y las enzimas necesarias para su replicación, tales como la transcriptasa inversa y la integrasa (Fig.3.4).[396,397]

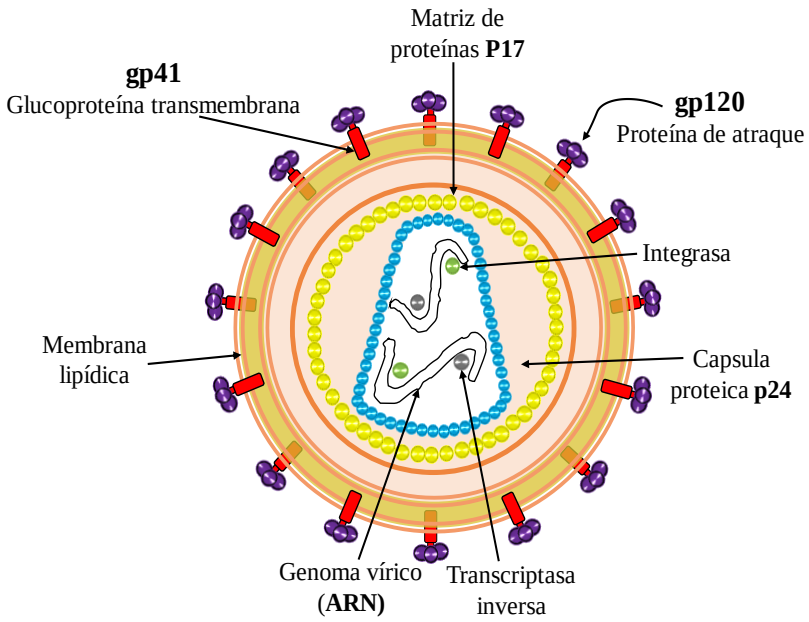


Figura 3.4. Representación de la estructura del virus VIH

Una vez el virus logra entrar al organismo tiene lugar la replicación, proceso que transcurre en varias etapas. La primera etapa es la de **acoplamiento**, donde la proteína gp120 de la envoltura viral se une a los receptores CD4 en la membrana de los linfocitos T (CD4+), macrófagos, células dendríticas, monocitos y en general a cualquier célula que exprese en su superficie el receptor CD4 (serie linfocitaria), y activa otras proteínas presentes en la membrana de la célula (denominadas correceptores, como el CCR5 o el CXCR4). Posteriormente se produce la **fusión** de la envoltura viral con la membrana celular, permitiendo de esta manera la entrada de la cápsula viral. La tercera etapa es la **transcripción inversa** que se produce dentro de la célula, donde la cadena simple de ARN viral (ARNv) se transforma en una doble cadena de ADN vírico (provirus). A continuación, tiene lugar la etapa de **integración**, donde el provirus se integra al genoma celular mediante una serie de reacciones complejas que son catalizadas por la enzima integrasa. El provirus integrado puede permanecer latente por tiempo indefinido o puede tener lugar la **transcripción**, en la

cual el provirus utiliza las enzimas de la célula para producir ARNv, el cual puede ser usado para la producción de proteínas virales etapa denominada de **traducción**. Las proteínas generadas junto con el genoma del virus, ensamblan nuevos viriones teniendo lugar la etapa de **ensamblaje**. Eventualmente, las células infectadas se lisan y finalmente tiene lugar la **salida de viriones** de la célula anfitriona (Fig.3.5).

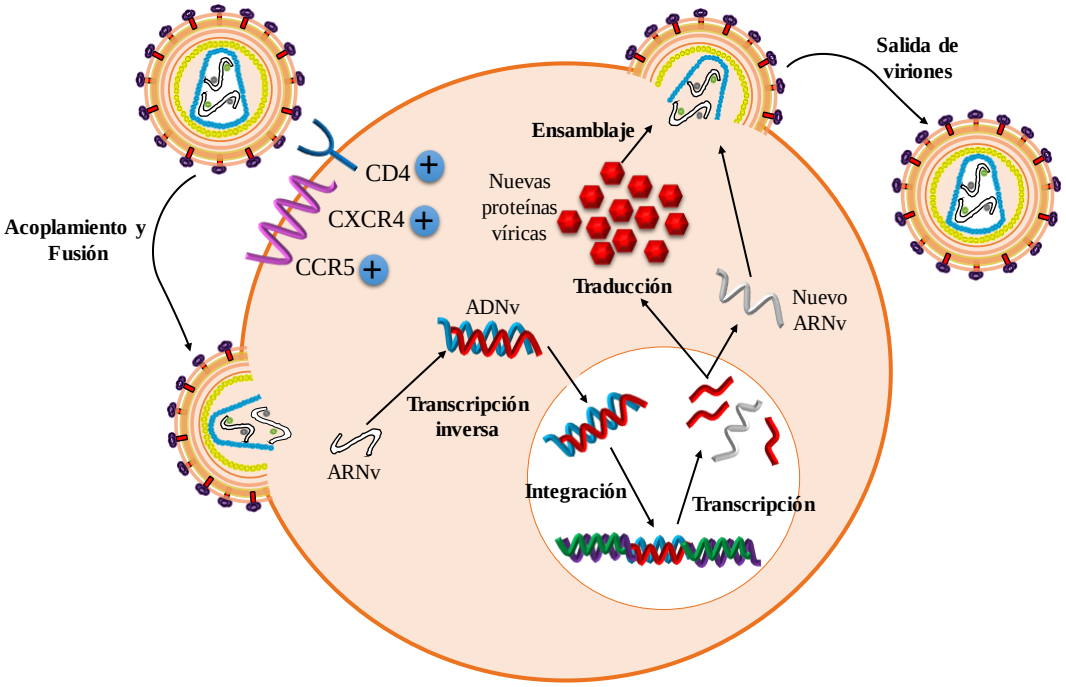


Figura 3.5. Ciclo de replicación del VIH

La infección viral produce la muerte de las células T, debilitando de este modo el sistema inmune de las personas infectadas y haciéndolas susceptibles a enfermedades oportunista que pueden causar la muerte.

Estudios *in vitro* realizados con AuNPs con grupos periféricos aniónicos mostraron que estos sistemas eran capaces de evitar el acoplamiento y fusión del virus con los linfocitos T, ya que se unían a las proteínas gp120.[80,398] Del mismo modo, AgNPs funcionalizadas con polivinilpirrolidona (PVP) interactúan con el virus inhibiendo su capacidad de infectar la célula por unión a las proteínas gp120.[392,399]

En conclusión, las AuNPs y AgNPs adecuadamente funcionalizadas son capaces de inhibir el VIH en una etapa temprana de su ciclo de replicación (acoplamiento y fusión) lo que las convierte en sistemas bastantes atractivos pues podrían ser eficaces independientemente del tipo de tropismo que presente el virus.

3.1.2. AuNPs y AgNPs como transportadores de ácidos nucleicos

La terapia génica es una técnica prometedora en el tratamiento de diferentes enfermedades difíciles de curar, como las enfermedades genéticas hereditarias, diferentes tipos de cáncer e infecciones virales como el VIH.[400-402] En ésta, el transporte de material genético a las células diana permite reemplazar un gen que no se encuentra, mutado o mal expresado.

ADN plásmido y minivectores de ADN pueden ser utilizados para reparar genes defectuosos, mientras que ARN de interferencia pequeño (ARNpi) pueden ser utilizados para silenciar la expresión génica y la producción de proteínas (Fig. 3.6).[403-405]

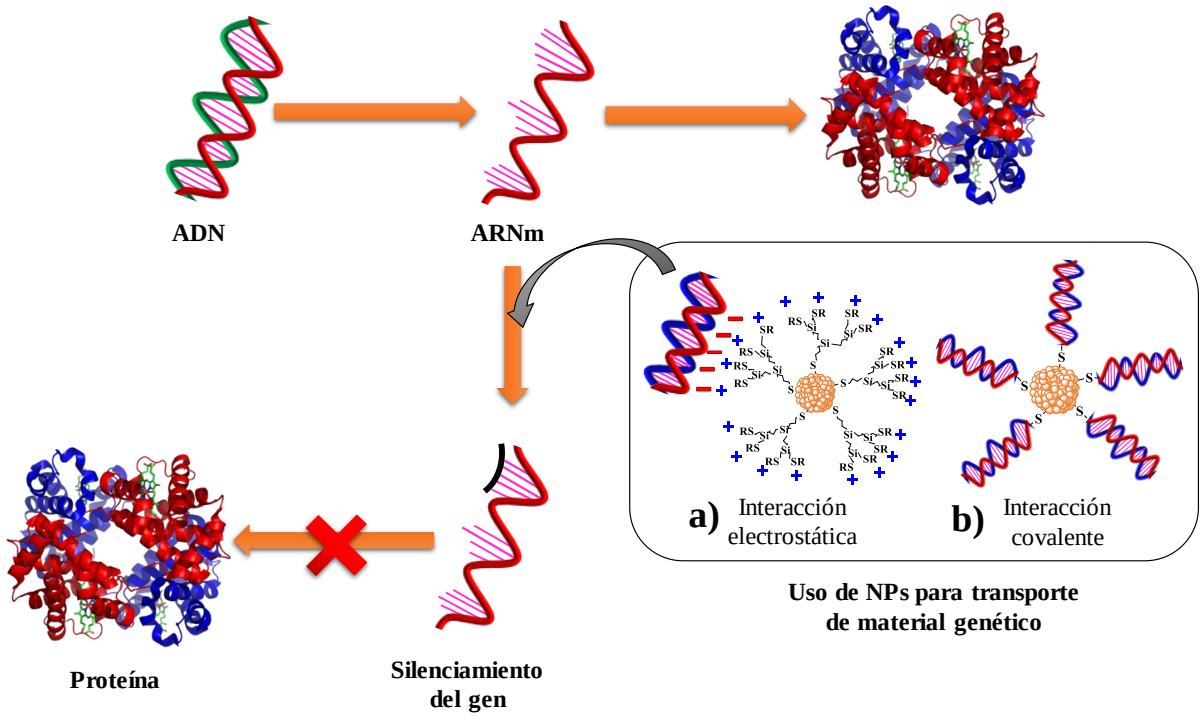


Figura 3.6. Uso de MNPs en silenciamiento de genes: a) interacción electrostática y b) interacción covalente

No obstante, la incapacidad de transportar el material genético hasta la célula diana o bien hasta lugares intracelulares como el núcleo o las mitocondrias, representa uno de los principales obstáculos en la terapia génica, debido a la fácil degradación de los ácidos nucleicos por acción enzimática y a su baja permeabilidad celular.[406-408] Es por esto, que se han desarrollado alternativas para el transporte del material genético, como es el uso de MNPs.[409] Una de las ventajas que poseen estos sistemas radica en su multifuncionalidad, cualidad que les hace atractivos para el transporte de ácidos nucleicos.[410]

El transporte del material genético puede lograrse por medio de interacciones ya sea covalentes o electrostáticas (Fig.3.6 a, b).[411,412] No obstante, las interacciones covalentes tienden a disminuir la actividad biológica en los sistemas formados, pues suelen ocupar sitios reactivos en el ácido nucleico.[413] Por el contrario, la interacción de tipo electrostática entre el material genético y el agente de transfección se considera ventajosa, ya que por lo general emplea la mezcla simple del ácido nucleico con el agente de transfección, eliminando así la necesidad de utilizar sitios reactivos u optimizar procedimientos sintéticos para su obtención. Dentro de estos sistemas, los que poseen carga superficial positiva son los más adecuados debido a que los ácidos nucleicos poseen fuerte carga negativa (grupos fosfato).[337,414,415]

Los nanoconjugados formados por interacciones no covalentes entre AuNPs/AgNPs y ácidos nucleicos generalmente están formados por MNPs catiónicas las cuales pueden facilitar la entrada por procesos de endocitosis. A continuación, se produce la fusión del endosoma tardío con el lisosoma y posteriormente el material genético es liberado en el citoplasma tras la inflamación y ruptura del lisosoma (Fig.3.7). [399,403,416]

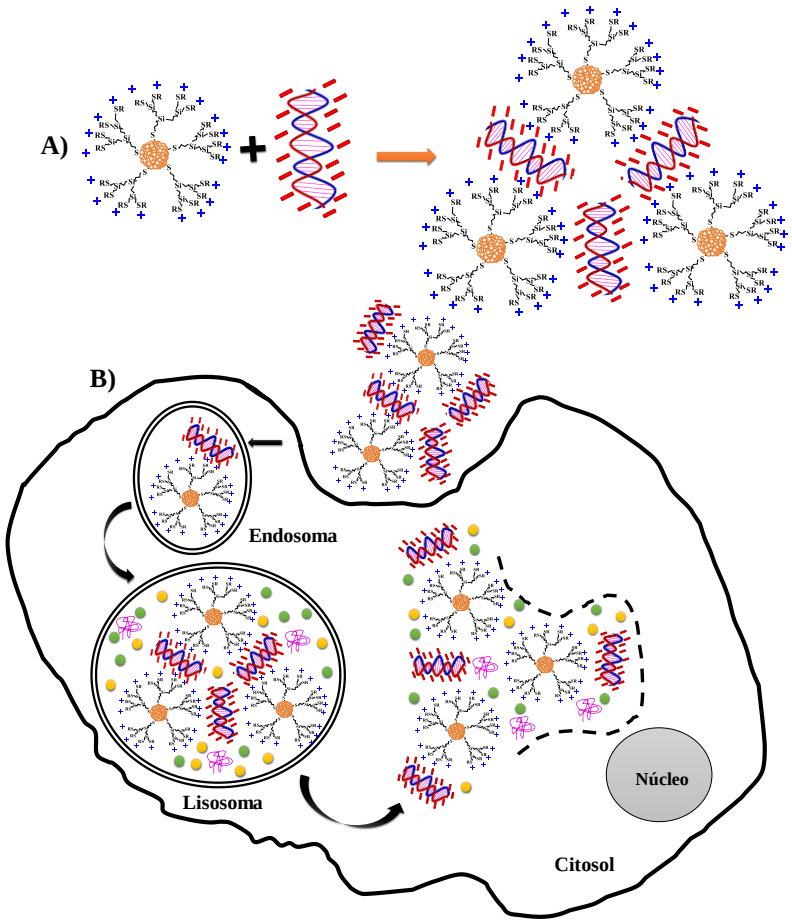


Figura 3.7. Representación esquemática de A) Formación de nanoconjugado MNPs-ARNpi y B) Entrada en la célula por endocitosis y posterior liberación por rotura liposomal

AuNPs modificadas con ARNpi han demostrado ser sistemas eficaces en la administración citoplasmática de ARNpi y en el silenciamiento de genes.[417-420] Del mismo modo, estos sistemas han demostrado ser estructuras potencialmente útiles en el transporte intracelular de oligonucleótidos antisentido[421] y de ARNpi, proporcionando protección contra la degradación por RNasas.[417,421,422] Algunos estudios han demostrado que AuNPs funcionalizadas con grupos amonio pueden ser utilizadas para el transporte de ADN plásmido evitando su degradación por acción de nucleasas y otros agentes químicos.[423,424] A diferencia de las AuNPs, el uso de las AgNPs en terapia génica ha sido poco estudiado. No obstante, debido a su habilidad de producir apoptosis en células cancerosas, el interés en el uso de éstas ha empezado a aumentar. En este sentido, estudios *in vitro* demostraron que AgNPs funcionalizadas con PEG/quitosano aumentaban significativamente la eficiencia en la transfección de ADN plásmido.[415]

3.1.2.a. Terapia génica: VIH

La terapia antirretroviral altamente activa prolonga la vida de las personas infectadas por el VIH, pero requiere tratamiento de por vida y como resultado produce toxicidades acumuladas y mutaciones del virus. Una alternativa prometedora para el tratamiento del VIH es la terapia génica, pues ofrece la posibilidad de prevenir la infección viral o bien interrumpir su proceso de replicación.

En la terapia génica del VIH, el material genético puede dirigirse a cualquiera de las diversas etapas del ciclo de replicación viral, pudiendo interferir en la traducción y transcripción de genes virales impidiendo la producción de proteínas y ARN genómico, o bien ser dirigidos a varias dianas celulares implicadas en la infección, como es el receptor CD4 o los correceptores CCR5 y/o CXCR4 que son los principales responsables de la entrada del virus (Fig.3.8).

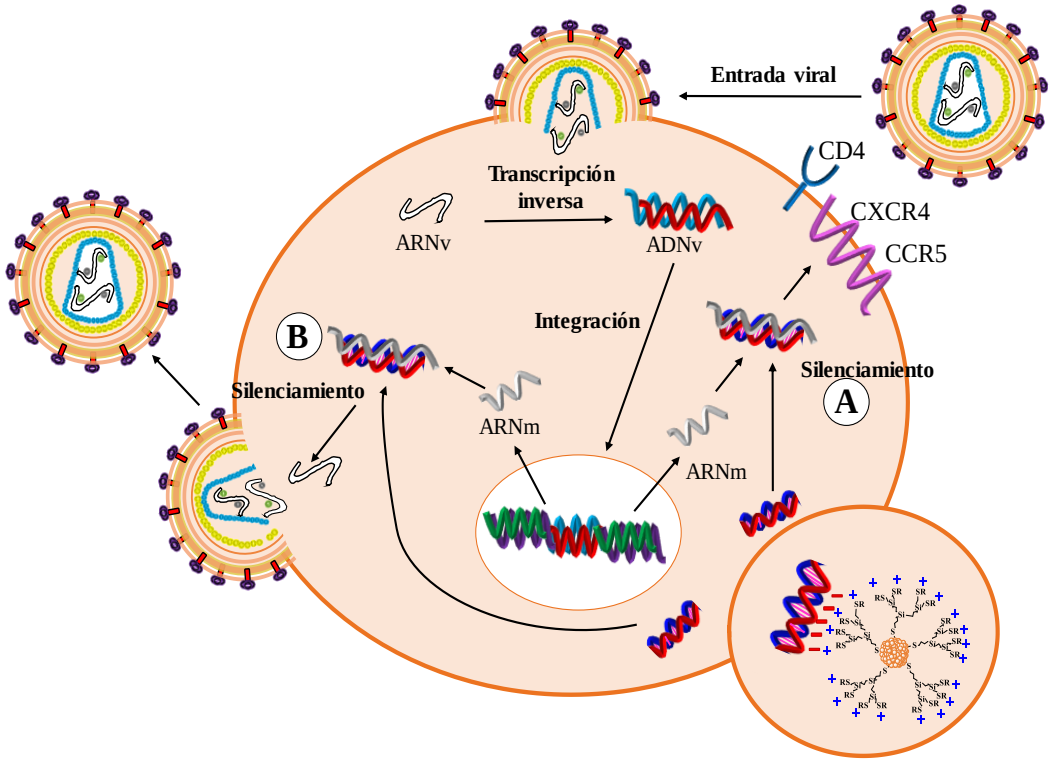


Figura 3.8. Mecanismo de terapia génica: A) Silenciamiento de receptores y correceptores y B) Silenciamiento de ARNv

Transgenes de cadenas cortas y largas de ARN antisentido, que simplemente se emparejan con transcripciones del VIH para formar dúplex no funcionales, han demostrado ser eficaces bloqueando la replicación del VIH en células hematopoyéticas.[425-427] Otros estudios han utilizado ARNpi para el bloqueo de la entrada y replicación del virus por medio de la reducción del receptor CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4.[428-432]

AuNPs catiónicas funcionalizadas con grupos amonio han sido utilizadas para el transporte de ARNpi en terapia génica del VIH. La galectina-1, es una molécula de adhesión expresada en los macrófagos que está implicada en la adsorción del VIH-1.[433,434] Utilizando macrófagos derivados de monocitos humanos (MDM), se ha demostrado que la metanfetamina potencia la producción de genes galectina-1 y la expresión de proteínas, facilitando la infección por VIH-1. Nanoconjugados formados con AuNPs y ARNpi galactina-1 fueron capaces de reducir la expresión de la metanfetamina potenciada por la galectina-1 y prevenir parcialmente los efectos de la metanfetamina en la producción de antígeno p24 y la expresión génica del VIH-1 en MDM disminuyendo la infectividad del VIH.[435] A diferencia de las AuNPs de las cuales existen algunos estudios sobre su interacción con material nucleico para su uso en terapia génica contra el VIH, las AgNPs han sido muy

poco estudiadas. No obstante, estudios preliminares han demostrado que estos sistemas pueden ser buenos candidatos para el transporte de material genético.[415,436,437]

3.1.2.b. Terapia génica: cáncer

En el tratamiento del cáncer, la terapia génica utiliza material genético para bloquear o silenciar genes específicos de las células cancerosas que generalmente se encuentran sobreexpresados. Algunos tipos de terapia génica tienen como objetivo aumentar la capacidad natural del cuerpo para atacar éstas células. En este sentido, el uso de ADN antisentido y ARNpi han surgido como potentes herramientas para bloquear la función génica y silenciar secuencias específicas jugando un papel importante en la disminución de genes de expresión de las células cancerosas.[403,416,438]

AuNPs han demostrado ser excelentes candidatos en terapia génica del cáncer, siendo capaces de transportar ADN antisentido en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata y en una línea celular de neuroblastoma humano.[439] Estudios *in vitro* han demostrado que estos sistemas son capaces de transportar ADN plásmido en células MCF-7 de cáncer de mama.[440] Del mismo modo, AuNPs con grupos periféricos amina se han utilizado para formar nanoconjugados con ARNpi-PEG observándose que dichos sistemas eran capaces de transportar el material genético dentro de células de carcinoma de próstata humano.[420] Estas AuNPs también se han utilizado para el transporte de microARN en células de neuroblastoma y de cáncer de ovario observándose un aumento de 10-20 veces en la transfección en comparación con liposomas convencionales.[441] En cuanto a las AgNPs, se ha observado que sistemas funcionalizados con quitosano y poliacrilamida son capaces de formar nanoconjugados con ADN y transportarlo eficientemente en células de adenocarcinoma humano (A549) y en células de cáncer cérvico-uterino (HeLa).[415]

3.1.3. AuNPs en separación de proteínas

Las proteínas vegetales contribuyen sustancialmente como fuente de alimento, pues contienen aminoácidos esenciales para satisfacer las necesidades fisiológicas humanas. Actualmente, muchas proteínas vegetales versátiles se utilizan como agentes medicinales. Estas proteínas pueden ser extraídas de fuentes naturales como frutas y vegetales, pero el

proceso de extracción y purificación es bastante complejo debido a numerosas interferencias presentes como son compuestos fenólicos, lípidos, polisacáridos, entre otros.[442,443] La obtención de estas proteínas incluye varias etapas que van desde la homogenización de la muestra hasta su aislamiento y purificación. Este proceso resulta ser largo y tedioso e incluye el uso de una gran cantidad de disolventes lo que incrementa además el coste para su obtención.[444] Es por esto, que se están intentando diseñar nuevos métodos para la separación de dichos compuestos teniendo en cuenta que son moléculas bastante heterogéneas.

Las MNPs han sido propuestas como nuevos sistemas para la separación de proteínas pues la facilidad de introducir funcionalidades específicas ofrece la posibilidad de diseñar sistemas únicos de separación.[445,446] En este sentido, AuNPs han demostrado ser sistemas con aplicaciones potenciales en la preconcentración y preseparación de proteínas desde muestras complejas.[447,448] Un ejemplo de esto es el uso de AuNPs (reducción/estabilización con citrato de sodio) en la preconcentración de proteínas presentes en la orina como una alternativa al ácido tricloroacético como medio de precipitación.[449] Del mismo modo, AuNPs catiónicas resultaron ser útiles en el diagnóstico de cáncer de vejiga por medio de la detección de hialuronidasa en orina.[450] AuNPs funcionalizadas con grupos bien aniónicos o bien catiónicos se utilizaron para extraer de manera selectiva desde soluciones diluidas péptidos cargados tanto positiva como negativamente.[451]

3.2. PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

3.2.1. Presentación

El uso de MNPs en aplicaciones biomédicas ha aumentado significativamente en los últimos años.[452,453] Dentro de estos sistemas, las AuNPs y AgNPs han demostrado poseer potencial aplicación en diversos campos de la medicina dentro de los que podemos mencionar su uso como agentes terapéuticos frente a bacterias, VIH o cáncer, así como también su uso como agentes de transfección en terapia génica.[37,141,142] De igual forma, estructuras dendríticas de naturaleza carbosilano sintetizados en nuestro grupo de investigación también han mostrado ser útiles en aplicaciones biomédicas. Así pues, dendrímeros carbosilano catiónicos han mostrado utilidad como agentes de transfección de ácidos nucleicos y como agentes terapéuticos con actividad antibacteriana.[112,116,119] En

cuanto a los sistemas aniónicos, se ha podido demostrar su potencial actividad como agentes antivirales.[120,121] Con esto en mente, en este trabajo se han sintetizado nanopartículas de oro y plata funcionalizadas con dendrones de naturaleza carbosilano catiónicos y aniónicos para determinar si la presencia de ambos sistemas incrementa la actividad biológica que los sistemas dendríticos y las MNPs poseen por separado.

3.2.2. Objetivos

El objetivo principal de este *Capítulo* es evaluar la actividad de los nanosistemas sintetizados (dendrones y MNPs dendronizadas) frente a tres patologías como son la resistencia antimicrobiana, el VIH y el cáncer. También, se pretende explorar la utilidad de estos sistemas en otras aplicaciones no estudiadas hasta ahora en nuestro grupo de investigación, como es la concentración y separación de proteínas vegetales en mezclas complejas. Este objetivo puede desglosarse en varios objetivos particulares:

- Estudiar la capacidad de dendrones, AuNPs y AgNPs dendronizadas como agentes terapéuticos frente a bacterias, VIH y cáncer.
- Estudiar el uso de dendrones, AuNPs y AgNPs dendronizadas como agentes transportadores de ácidos nucleicos con actividad frente al VIH y cáncer.
- Estudiar el uso de AuNPs dendronizadas en la separación de proteínas.

3.3. ESTUDIOS BIOMÉDICOS DE SISTEMAS SINTETIZADOS

3.3.1. Biocompatibilidad de los sistemas catiónicos con células sanguíneas

La evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad de los nuevos compuestos con los componentes de la sangre es una parte necesaria para el desarrollo preclínico temprano. Es por esto que se ha realizado el estudio de la interacción de nuestros sistemas utilizando diferentes células sanguíneas como son los eritrocitos, plaquetas y linfocitos permitiendo determinar la citotoxicidad de nuestros sistemas en dichas células, información relevante para su posterior aplicación biomédica.

3.3.1.a. Actividad hemolítica

La actividad hemolítica permite evaluar el daño causado en los eritrocitos (células rojas de la sangre) por efecto de los compuestos analizados, permitiendo de este modo determinar su biocompatibilidad. Se han evaluado las actividades hemolíticas de nuestros compuestos con potencial aplicación biomédica. Estos estudios se realizaron en el Departamento General de Biofísica de la Universidad de Lodz (Polonia) con la colaboración de la Dra. Maria Bryszewska.

La actividad hemolítica se determinó midiendo el porcentaje de hemoglobina presente después de haber incubado las muestras con los dendrones (**23Cl-25Cl**) y las AuNPs funcionalizadas con dichos dendrones (**68Cl-70Cl**) a concentraciones 0.05, 0.5, 1, 5, 10, 20 µM y en diferentes tiempos de exposición (2 y 24 horas). En el caso de las AuNPs, éstas se expresan con respecto al dendrón presente para facilitar la comparación con los datos obtenidos para los dendrones libres.

Los resultados obtenidos se encuentran representados en gráficas en la Figura 3.9. De manera general, se observa una actividad hemolítica dependiente de la concentración y del tiempo de exposición para todos los sistemas estudiados.

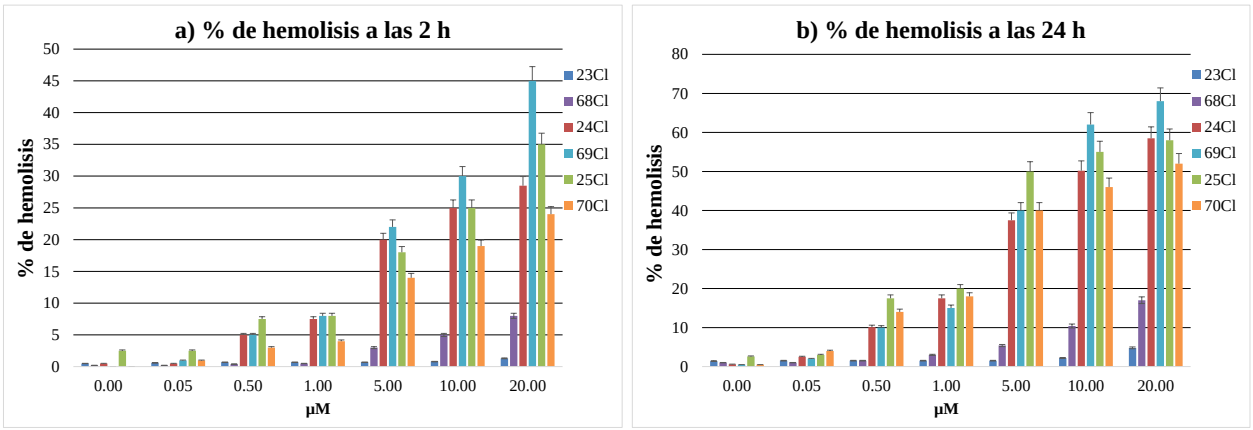


Figura 3.9. Actividad hemolítica a 2 h (a) y 24 h (b) de los compuestos analizados (concentración en las AuNPs se expresan con respecto a los dendrones)

Para los dendrones, la actividad hemolítica es mayor al aumentar la generación dendrítica. Este comportamiento se ha observado anteriormente en estructuras dendríticas catiónicas y puede estar relacionado con el aumento de la concentración de la carga de los sistemas.[454] En el caso del dendrón de primera generación (**23Cl**) el porcentaje de hemolisis

fue menor del 5% en todas las concentraciones probadas, tanto a 2 h como a las 24 h. No obstante, para los dendrones de segunda y tercera generación (**24Cl** y **25Cl**) el porcentaje de hemolisis aumenta significativamente, observándose más de un 20% de hemolisis a una concentración de 5 µM tanto a las 2 h como a las 24 h.

Por otro lado, para las AuNPs (**68Cl-70Cl**) no se observa una dependencia de la actividad hemolítica con la generación dendrítica, donde el mayor porcentaje de hemolisis lo presentan las AuNPs funcionalizadas con el dendrón de segunda generación (**69Cl**). Sin embargo, se mantiene la tendencia de mayor porcentaje de hemolisis al aumentar la concentración y el tiempo de exposición. Para las AuNPs, el porcentaje de hemolisis aumenta en todos los casos con respecto al valor observado para los dendrones libres, esto debido probablemente a la presencia del núcleo metálico. En el caso particular de la AuNPs funcionalizada con el dendrón de primera generación (**68Cl**) a pesar de observarse un aumento en el porcentaje de hemolisis, éste valor es menor del 20% en todas las concentraciones probadas.

Cabe destacar que como los valores de actividad hemolítica para las AuNPs se han determinado a la misma concentración que para los dendrones libres, se puede determinar la influencia de la dendronización en la actividad hemolítica. En el caso del dendrón de primera generación (**23Cl**) y su AuNPs correspondiente (**68Cl**) el valor del porcentaje de hemolisis aumenta ligeramente en el caso de la AuNPs, observándose un mayor aumento de hemolisis a las 24 h. Para el dendrón de segunda generación (**24Cl**) y su correspondiente AuNPs (**69Cl**), se observó el mismo comportamiento anteriormente descrito, aunque el porcentaje de hemolisis en este caso es claramente mayor. En cuanto al dendrón de tercera generación (**25Cl**) y la AuNPs funcionalizada con éste (**70Cl**), el porcentaje de hemolisis resultó ser menor en la AuNPs que en el dendrón libre.

La actividad hemolítica causada por los sistemas también se evaluó en presencia de albúmina de suero humano (ASH), ya que es la proteína de mayor abundancia en el plasma sanguíneo y puede interaccionar con nuestros sistemas. Para ello se eligieron las concentraciones 5 y 10 µM de dendrones (**23Cl-25Cl**) y las correspondientes AuNPs funcionalizadas con dichos dendrones (**68Cl-70Cl**) (Fig.3.10). La concentración de ASH (2

mg/mL) se eligió con el objetivo de alcanzar la relación de concentración hematocrito/albúmina encontrada en condiciones fisiológicas.

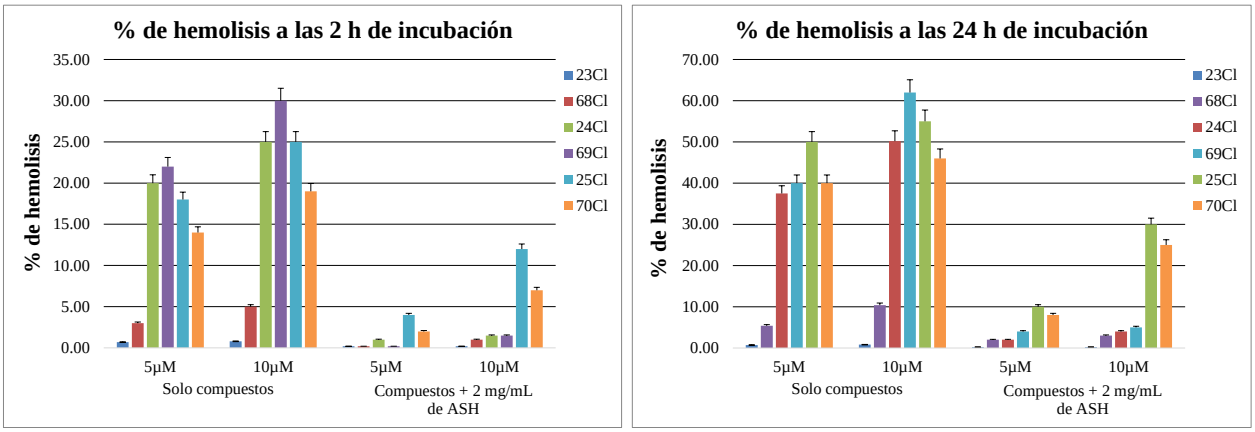


Figura 3.10. Actividad hemolítica de dendrones (**23Cl-25Cl**) y AuNPs funcionalizadas (**68Cl-70Cl**) en ausencia y presencia de ASH

El porcentaje de hemolisis causado tanto por los dendrones (**23Cl-25Cl**) como por las AuNPs (**68Cl-70Cl**) disminuye considerablemente en presencia de ASH observándose la mayor disminución para el dendrón de segunda generación (**24Cl**) y para la AuNPs funcionalizada con éste (**69Cl**).

Para tratar de explicar este comportamiento se realizaron ensayos de fluorescencia que sirvieron para determinar el grado de interacción entre la ASH y los diferentes compuestos. La ASH tiene dos residuos de triptófano que emiten fluorescencia en el rango de 310 a 425 nm con un máximo a 340 nm. La interacción entre la ASH y los diferentes compuestos debe ocasionar un cambio en la fluorescencia de la ASH.

Para la realización de los ensayos de fluorescencia se prepararon disoluciones de 0.1 μM de las AuNPs (**68Cl-70Cl**) a las cuales se les adicionaron cantidades conocidas de ASH para obtener ratios finales ASH/AuNPs de 1:1; 2:1; 3:1; 5:1; 10:1; 20:1; 50:1 y 100:1. A continuación se recogieron los espectros de emisión de fluorescencia en el rango de 310-500 nm, teniendo en cuenta que en estas condiciones las AuNPs no presentaron fluorescencia. Las intensidades de fluorescencia (en λ = 340 nm) se normalizaron como F_0/F, donde F es la intensidad de la fluorescencia de la proteína en presencia de la AuNPs y F_0 es la de la proteína libre.

Al comparar los espectros de fluorescencia del ASH libre y del ASH en combinación con las diferentes AuNPs, se observó que la presencia de las AuNPs disminuye la intensidad de la fluorescencia de la ASH sin cambiar la posición de máxima emisión (Fig.3.11a). En cuanto a la intensidad de fluorescencia (F_0/F) se observó un aumento exponencial hasta alcanzar un valor constante en forma similar para todas las AuNPs. No obstante, los valores obtenidos dependen del tipo de AuNPs del que se trate (Fig3.11b).

La mayor extinción de la fluorescencia del ASH (~45 %) se observó en la AuNPs funcionalizada con el dendrón de segunda generación (**69Cl**) en comparación con las AuNPs funcionalizadas con dendrones de primera (**68Cl**) y tercera generación (**70Cl**) cuyos valores de extinción de la fluorescencia fueron de ~12,5 % y ~11,5 % respectivamente. Este comportamiento probablemente se deba a que este sistema es el que posee mayor tamaño de núcleo metálico. Un efecto similar se ha observado en la interacción de estas MNPs con ácidos nucleicos y otras proteínas como se discutirá posteriormente.

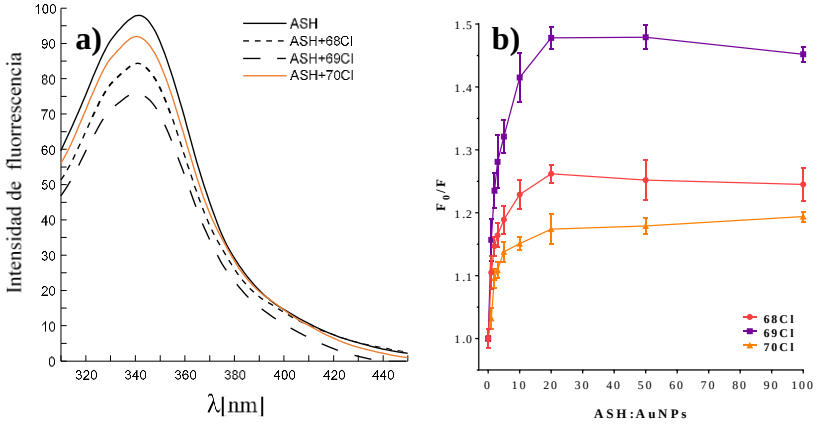


Figura 3.11. Gráficas de fluorescencia de ASH libre y en presencia de las AuNPs (**66Cl-68Cl**). a) Espectros de fluorescencia de ASH libre (1 µM) y ASH + AuNPs (0.1 µM), b) Representación de intensidades F_0/F (λ =340) en función de la relación molar ASH/AuNPs

Ensayos realizados con los dendrones libres (**23Cl-25Cl**) a la misma concentración que en el caso de las AuNPs, no mostraron ninguna influencia en la fluorescencia, es decir, que la disminución de la fluorescencia observada en el caso de las AuNPs se debe a la presencia del núcleo metálico.

En resumen, los resultados muestran que el porcentaje de hemolisis aumenta al aumentar la generación dendrítica, esto debido al aumento del número de cargas en los sistemas. Además, la actividad hemolítica es mayor para las AuNPs que para los dendrones libres lo que puede ser una causa de la presencia del núcleo metálico, efecto más acusado para los sistemas de segunda y tercera generación. No obstante, en presencia de ASH, los porcentajes de hemolisis disminuyen significativamente tanto para los dendrones como para las AuNPs dendronizadas, esto debido probablemente a la interacción de los sistemas con esta proteína, lo que hace que no todas las cargas de los sistemas estén disponibles para interaccionar con el eritrocito disminuyendo así el porcentaje de hemolisis causado.

3.3.1.b. Inducción a la agregación plaquetaria

Las plaquetas son células sanguíneas que tienen un papel central en la hemostasia normal, en la trombosis y en varios trastornos hemorrágicos. Los estudios de agregación de plaquetas *in vitro* al igual que la actividad hemolítica permiten evaluar la biocompatibilidad de nuestros sistemas. Los ensayos de agregación de plaquetas se realizaron en el Departamento General de Biofísica de la Universidad de Lodz con la colaboración de la Dra. Maria Bryszewska.

La agregación plaquetaria inducida por la trombina (control) se midió tanto para los dendrones (**23Cl-25Cl**) como para las AuNPs (**68Cl-70Cl**). La concentración de los compuestos elegida para los ensayos fue de 10 μM, pues a ésta concentración todos los compuestos producen hemolisis a excepción del dendrón de primera generación (**23Cl**) y la AuNPs funcionalizada con dicho dendrón (**68Cl**). Así, a disoluciones de plaquetas (2.0×10^8 células/mL) se le adicionaron los diferentes compuestos junto a la trombina y se incubaron durante 10 minutos. Los resultados de agregación plaquetaria obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Agregación plaquetaria de dendrones y AuNPs

Compuestos	Agregación Plaquetaria	DE
23Cl	2.7	1.2
24Cl	9.3	1.2
25Cl	39.3	8.1
68Cl	35.3	11.2
69Cl	30.6	12.1
70Cl	32.7	4.6

De todos los compuestos estudiados solo los dendrones de primera y segunda generación (**23Cl-24Cl**) no produjeron agregación plaquetaria. La comparación de los resultados obtenidos para los dendrones muestra una dependencia con la generación dendrítica. En cuanto a las AuNPs (**68Cl-70Cl**) los valores obtenidos son mayores que para los dendrones libres. Además, a diferencia de los resultados obtenidos para los dendrones, la dependencia de la agregación plaquetaria con la generación dendrítica ya no se observa.

Con los resultados obtenidos de agregación plaquetaria, podemos concluir que por encima de una concentración 10 μM nuestros sistemas no son biocompatibles, dato que concuerda con el obtenido anteriormente para eritrocitos.

3.3.1.c. Proliferación de linfocitos

Los linfocitos T son células que actúan como agentes reguladores del sistema inmunológico, defendiendo al organismo de antígenos extraños como virus y hongos. La proliferación de células T inicia la respuesta inmune. La prueba de proliferación *in vitro* se utiliza para determinar si las células pueden dividirse tras la exposición a un estímulo adecuado o no, así como para comparar la habilidad de varias poblaciones celulares de dividirse en respuesta al mismo estímulo. Por lo tanto, el estudio de la proliferación en linfocitos causado por nuestros sistemas nos ayuda a determinar que no constituyen un estímulo antigénico no específico.

Células mononucleares de sangre periférica (CMSP), se trataron con diferentes concentraciones de los dendrones de primera a tercera generación (**23Cl-25Cl**) y con las AuNPs funcionalizadas con estos dendrones (**68Cl-70Cl**), en busca de la inducción de la proliferación de linfocitos o de la inhibición de proliferación inducida por el mitógeno fitohemaglutinina (PHA-M). Así, disoluciones de CMSP (1.0×10^8 células/mL) fueron tratadas durante 72 horas con los diferentes compuestos (0.05, 0.5, 1, 5, 10 μM) en presencia o ausencia de PHA-M, para determinar la inhibición o inducción de la proliferación causada por dichos compuestos. Una suspensión de CMSP con una solución de PHA-M (10 mg/mL) se utilizó como control positivo (proliferación), y como control negativo se utilizó una suspensión de CMSP sin tratar.

Los datos obtenidos muestran que ni los dendrones (**23Cl-25Cl**) ni las AuNPs funcionalizadas con dichos dendrones (**68Cl-70Cl**) a ninguna de las concentraciones probadas constituye un estímulo antigénico para las CMSP. Para los dendrones se observó que el de segunda y tercera generación (**24Cl** y **25Cl**) inhiben la proliferación de linfocitos inducida por PHA-M a concentraciones de 1-10 µM. Por otro lado, las AuNPs funcionalizadas con dendrones de primera y tercera generación (**68Cl** y **70Cl**) fueron capaces de inhibir la proliferación celular inducida por PHA-M en todo el intervalo de concentración probado (Fig.3.12).

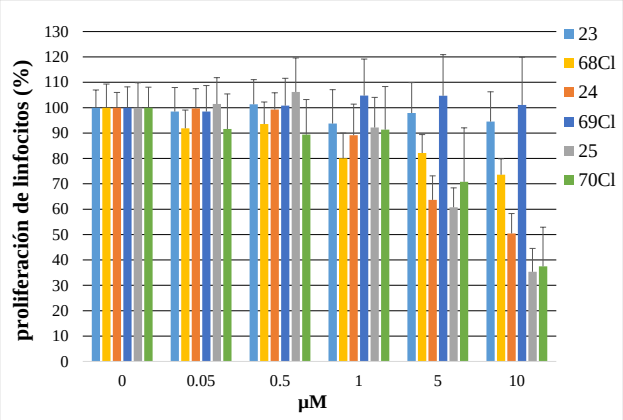


Figura 3.12. Medidas de la proliferación de linfocitos a las 72 h de exposición a los dendrones (**23Cl-25Cl**) y las AuNPs dendronizadas (**68Cl-70Cl**) en presencia de PHA-M

Según los datos obtenidos en este ensayo, nuestros compuestos por sí mismos además de no producir un estímulo en la proliferación de linfocitos son capaces de inhibir la proliferación inducida por el mitógeno PHA-M, por lo cual, dichos sistemas pueden ser candidatos potenciales para ser utilizados en diferentes aplicaciones biomédicas.

3.3.1.d. Relación estructura-actividad

Teniendo en cuenta todos los datos expuestos hasta ahora, puede establecerse una relación estructura-actividad la cual podría estar relacionada con el tamaño de las células, el tipo de interacción con ellas, la topología de los diferentes compuestos y su generación dendrítica.

En cuanto al tamaño de las células, las plaquetas son significativamente más pequeñas (1-2 µm de diámetro) que los eritrocitos (8 µm de diámetro) y los linfocitos (7-10 µm de diámetro para los linfocitos pequeños y de 14-20 µm para los linfocitos grandes).[455] Por lo tanto, para la misma superficie de membrana celular, aquellas células más pequeñas serían cubiertas por una mayor cantidad de compuestos, que en el caso de las plaquetas podría causar un mayor grado de respuesta.

El tipo de interacción de nuestros sistemas con las células estudiadas también es diferente. En el caso de los eritrocitos, el porcentaje de hemolisis es dependiente de la membrana y puede producirse por interacciones no específicas.[456,457] Por otro lado, la agregación de plaquetas es dependiente de receptores y puede ser inducida por factores no específicos.[458,459] En cuanto a los linfocitos, su proliferación es inducida por interleuquinas, mitógenos tales como la fitohemaglutininas y por antígenos.[460,461] Por lo tanto, cabe esperar que los dendrones (**23Cl**-**25Cl**) y las AuNPs funcionalizadas con dichos sistemas (**68Cl**-**70Cl**) sean capaces de inducir directamente la agregación de plaquetas, mientras que su interacción con los linfocitos debería causar una cadena de acontecimientos que incluiría la síntesis de antígenos, su consecuente liberación, la interacción con la célula por medio de receptores y su proliferación.

En cuanto a la topología de los sistemas, la flexibilidad del esqueleto de los dendrones hace más fácil su difusión a través de la superficie celular.[462] Así, dendrones de generaciones superiores cubren mayor superficie celular, lo que podría estar incrementando el efecto sobre los receptores de plaquetas.[463] En cuanto a las AuNPs funcionalizadas con los dendrones, estos sistemas son en general mucho más grandes que los dendrones libres, y poseen núcleos metálicos de tamaños similares entre sí y los dendrones que cubren la superficie de estos núcleos se encuentran distribuidos de manera homogénea. Así, la rigidez causada por el núcleo hace que los dendrones localizados en la superficie sean menos capaces de cubrir la membrana de la plaqueta,[464] y como el número de receptores de las plaquetas es limitado, los dendrones unidos a la superficie de las AuNPs producen efectos estéricos similares independientemente de la generación dendrítica de la que se trate.[465]

3.3.2. Aplicación de los sistemas sintetizados como agentes terapéuticos

3.3.2.a. Capacidad antibacteriana

Las actividades antibacterianas de los diferentes sistemas sintetizados se han realizado en el Departamento General de Biofísica de la Universidad de Lodz con la colaboración de la Prof. Maria Bryszewska y la Dra. Elzbieta Pedziwiatr-Werbicka y en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá con la colaboración de los Profesores Juan Soliveri de Carranza y José Luis Copa Patiño.

Para los ensayos de actividad antibacteriana de los sistemas se utilizaron tanto bacterias Gram-(+) como Gram-(-), así como también dos cepas resistentes de bacterias Gram-(+). Además, estos sistemas también fueron utilizados en ensayos preliminares de actividad antifúngica frente a dos tipos de hongos (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Listado de bacterias y hongos utilizados

	Nombre	Cepa	Descripción	Abrev.
Gram-(+)	*Staphylococcus aureus S*	ATCC 6538P	Línea susceptible	S. a-S
	Staphylococcus aureus R	ZMFKSK	Línea multiresistente	S. a-R
	Staphylococcus haemolyticus R	ZMF SV212	Línea multiresistente	S. h-R
	Enterobacter fecalis	ZMF BD156	Línea aislada de espécimen clínico	E. f
Gram-(-)	*Escherichia coli*	ATCC 8739	Línea susceptible	E. c-S
	Pseudomonas aeuruginosa	ATCC 27853	Línea susceptible	P. a
Hongos	*Candida albicans*	ATCC 10231	Hongo comúnmente utilizado en ensayos	C. a
	Candida glabrata	ZMF40	Hongo aislado de espécimen clínico	C. g

La determinación de la capacidad antibacteriana de los sistemas se realizó utilizando el ensayo de actividad de microdilución en placa M7-A7 del CLSI (siglas en inglés de Clinical and Laboratory Standard Institute), mientras que la actividad antifúngica se realizó utilizando el método de actividad de dilución en caldo M27A3 del CLSI.[466,467] Los resultados son expresados en valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que es la concentración mínima necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano, y valores de Concentración Mínima Bactericida (CMB), la cual hace referencia a la concentración mínima necesaria para producir la muerte de la bacteria.

Los compuestos seleccionados para este estudio han sido los dendrones catiónicos con grupos periféricos -NMe_3^+ (**23Cl-25Cl**) descritos en el *Capítulo I*. En cuanto a las MNPs, se seleccionaron las AuNPs (**68Cl-70Cl**) y AgNPs (**71Cl-73Cl**) las cuales se encuentran completamente descritos en el *Capítulo II*. En este estudio, además, se utilizaron como controles *$AgNO_3$* y *estreptomicina* (antibiótico de amplio espectro). Los valores obtenidos para todos los sistemas se encuentran recogidos en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Valores en ppm de CMI y CMB de compuestos estudiados en bacterias Gram-(+), Gram-(-) y hongos

		Gram-(+)							
		S. a-S		**S. a-R**		**S. h-R**		**E. f**	
Cargas		**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**	**CMI**	**CMB**
2	**23Cl**	7.81	31.25	15.62	15.62	31.25	31.25	31.25	62.5
4	**24Cl**	3.9	15.62	3.9	3.9	7.81	15.62	7.81	15.62
8	**25Cl**	7.81	31.25	15.62	15.62	15.62	15.62	31.25	31.25
118	**68Cl**	53.44	106.87	53.44	53.44	26.71	53.44	427.5	427.5
528	**69Cl**	17.11	34.22	34.22	276.6	17.11	34.22	34.22	34.22
984	**70Cl**	17.85	35.83	14.28	28.56	17.85	35.83	35.83	71.4
72	**71Cl**	0.87	1.75	0.87	0.87	0.44	7	1.75	7
660	**72Cl**	26.63	26.62	13.31	106.5	13.31	13.31	26.62	26.62
4456	**73Cl**	20.19	20.19	20.19	20.19	20.19	323	20.19	20.19
	$AgNO_3$	15.65	15.52	7.81	15.62	3.9	7.81	3.9	7.81
	Estreptomicina	1.95	7.81	15.62	>500	>500	>500	250	>500

	Gram-(-)			
	E. c-S		**P. a**	
	CMI	**CMB**	**CMI**	**CMB**
23Cl	15.62	31.25	250	500
24Cl	7.81	7.81	62.5	62.5
25Cl	31.25	31.25	62.5	62.5
68Cl	106.87	106.87	106.87	213.75
69Cl	34.22	34.22	34.22	34.22
70Cl	35.83	35.83	57.12	57.12
71Cl	0.87	7	1.75	140
72Cl	26.62	53.25	35.5	53.25
73Cl	40.38	323	40.38	161.5
$AgNO_3$	3.9	3.9	7.81	15.62
Estreptomicina	15.61	15.62	7.81	7.81

	Hongos			
	C. a		**C. g**	
	CMI	**CMB**	**CMI**	**CMB**
23Cl	250	250	125	250
24Cl	31.25	250	31.25	62.5
25Cl	31.25	31.25	15.62	31.25
68Cl	1030	1030	1030	1030
69Cl	138.3	276.6	415	415
70Cl	45.57	190.4	47.57	190.4
71Cl	1.75	1.75	1.75	140
72Cl	53.25	53.25	53.25	53.25
73Cl	40.38	40.38	20.19	80.75
$AgNO_3$	3.9	7.81	-	-
Estreptomicina	1.95	1.95	-	-

Para los dendrones estudiados, se observó que el sistema de segunda generación (**24Cl**) muestra los mejores resultados en cuanto a actividad en todos los casos en comparación con los dendrones de primera y tercera generación (**23Cl-25Cl**). Esto es debido probablemente a que posee el balance hidrofóbico/hidofilico idóneo para permitir una mayor interacción con la membrana bacteriana aumentando de este modo su actividad. Este comportamiento concuerda con el observado anteriormente en nuestro grupo de investigación para este tipo de sistemas.[468]

En cuanto a las AuNPs, éstas mostraron una menor actividad que la observada para los dendrones libres. Este comportamiento puede estar relacionado con la presencia del núcleo metálico, el cual confiere una mayor rigidez al sistema provocando la disminución de la interacción de las cargas superficiales de las AuNPs con la membrana bacteriana. De todas las AuNPs, el sistema con mejor actividad corresponde a las funcionalizadas con dendrones de tercera generación (**70Cl**). Esto puede deberse a una mayor concentración de carga en este sistema en comparación con las AuNPs funcionalizadas con dendrones de primera y segunda generación (**68Cl** y **69Cl**).

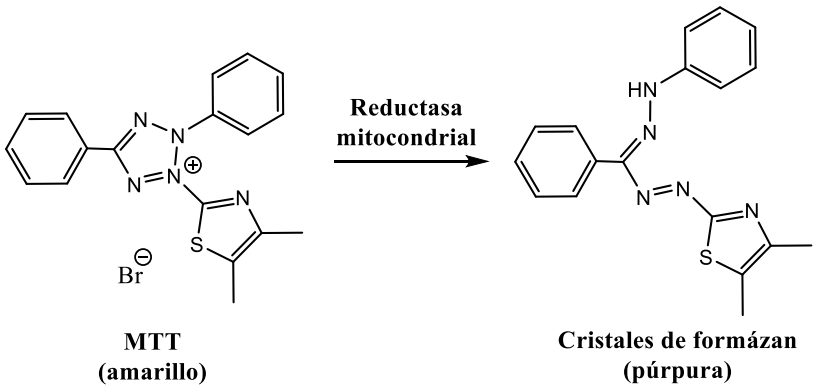
En el caso de las AgNPs, el sistema con mayor actividad fue el obtenido por medio de la funcionalización con dendrones de primera generación (**71Cl**). Además, este sistema resultó ser el más activo de todos los estudiados. Por otro lado, las AgNPs **72Cl** y **73Cl**, funcionalizadas con dendrones de segunda y tercera generación, respectivamente, presentaron una actividad claramente menor que las de sus correspondientes dendrones libres. Teniendo en cuenta lo observado para los dendrones y las correspondientes AuNPs dendronizadas, la mayor actividad de la AgNPs **71Cl** podría deberse a la capacidad de liberación de iones Ag^+ desde el núcleo metálico por poseer los dendrones de primera generación un menor tamaño, lo que hace que el núcleo metálico quede más expuesto facilitando de este modo la liberación de iones.

A pesar del aumento en el número de cargas de las MNPs por funcionalización con los dendrones, solo en el caso del compuesto **71Cl** resultó ser favorable el proceso de dendronización, observándose un aumento significativo en la actividad en la AgNPs funcionalizada con respecto al dendrón libre.

Aunque no se observó un aumento de actividad en las MNPs por su funcionalización con los dendrones, todos los compuestos obtenidos resultaron ser más activos en bacterias resistentes que la estreptomicina, lo que resulta ser bastante prometedor para su uso contra este tipo de bacterias.

3.3.2.b.Capacidad anticancerígena

La actividad anticancerígena se ha determinado por medio del estudio de la capacidad de los compuestos de inhibir el crecimiento celular utilizando el ensayo MTT (Fig.3.14). Éste ensayo valora la actividad metabólica de la célula utilizando una técnica colorimétrica que está basada en la reducción mitocondrial de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio a sales de formazán por parte de las células vivas (Esq.3.1).



Esquema 3.1. Reacción de reducción producida por las células viables en ensayo MTT

Los estudios de actividad anticancerígena se han realizado en la Unidad de Cultivos de la Universidad de Alcalá. Para ello, se han elegido los compuestos catiónicos con grupos funcionales -NMe_3^+ obtenidos en esta memoria (dendrones (**13-15**, **23-25**), AuNPs (**68Cl-70Cl**) y AgNPs (**71Cl-73Cl**)) y se ha determinado su actividad anticancerígena tras 24 horas de incubación en dos líneas celulares de cáncer humano: células de cáncer cérvico-uterino (HeLa) y células de cáncer colorrectal (HT29). La citotoxicidad de los sistemas se ha evaluado utilizando células sin tratar como control (NT).

Los resultados se expresan como IC_{50}, que es la concentración necesaria para inhibir una función biológica o bioquímica específica de las células en un 50%. Los datos de IC_{50} de los sistemas analizados para las líneas celulares HeLa y HT29 se encuentran recogidos en la Tabla 3.4. La mayoría de los compuestos presentan una buena actividad en HeLa, donde los valores de IC_{50} de todos los compuestos analizados a excepción de los dendrones de primera generación (**13** y **23**) se encuentran por debajo de 5 µM, concentración a la cual el porcentaje de hemolisis es menor de 80% (apartado 3.3.1a). No obstante, en el caso de las células HT29 la actividad de los sistemas es mucho menor.

Tabla 3.4. IC_{50} (µM, con respecto a dendrón en el caso de las MNPs) en las líneas celulares HeLa y HT29

		N.-NMe_3^+	**Punto focal/ Núcleo**	**IC_{50} (HeLa) µM**	**IC_{50} (HT29) µM**
G_1	**13I**	2	MeCOS-	88.30 ± 13.46	>100
	13Cl	2	MeCOS-	>100	>100
	23I	2	HS-	19.97 ± 1.68	>100
	23Cl	2	HS-	42.39 ± 7.17	>100
	68Cl	118	Au	0.99 ± 0.07	>100
	71Cl	72	Ag	4.38 ± 0.34	>100
G_2	**14I**	4	MeCOS-	4.35 ± 0.95	23.23 ± 3.40
	14Cl	4	MeCOS-	3.71 ± 1.03	17.20 ± 1.44
	24I	4	HS-	1.11 ± 0.15	19.52 ± 1.58
	24Cl	4	HS-	2.84 ± 0.49	20.43 ± 1.60
	69Cl	528	Au	0.64 ± 0.09	4.30 ± 1.60
	72Cl	660	Ag	1.71 ± 0.40	10.70 ± 2.20
G_3	**15I**	8	MeCOS-	0.62 ± 0.04	4.13 ± 0.18
	15Cl	8	MeCOS-	0.84 ± 0.08	2.77 ± 0.21
	25I	8	HS-	0.54 ± 0.08	17.17 ± 2.02
	25Cl	8	HS-	0.13 ± 0.07	15.47 ± 1.42
	70Cl	984	Au	0.44 ± 0.05	9.61 ± 2.61
	73Cl	4456	Ag	0.48 ± 0.12	13.03 ± 4.14

Citotoxicidad en HeLa

Para la línea celular HeLa los resultados de viabilidad obtenidos se encuentran recogidos en la Figura 3.13. En general, se puede observar una clara dependencia de la actividad con la generación dendrítica de los sistemas.

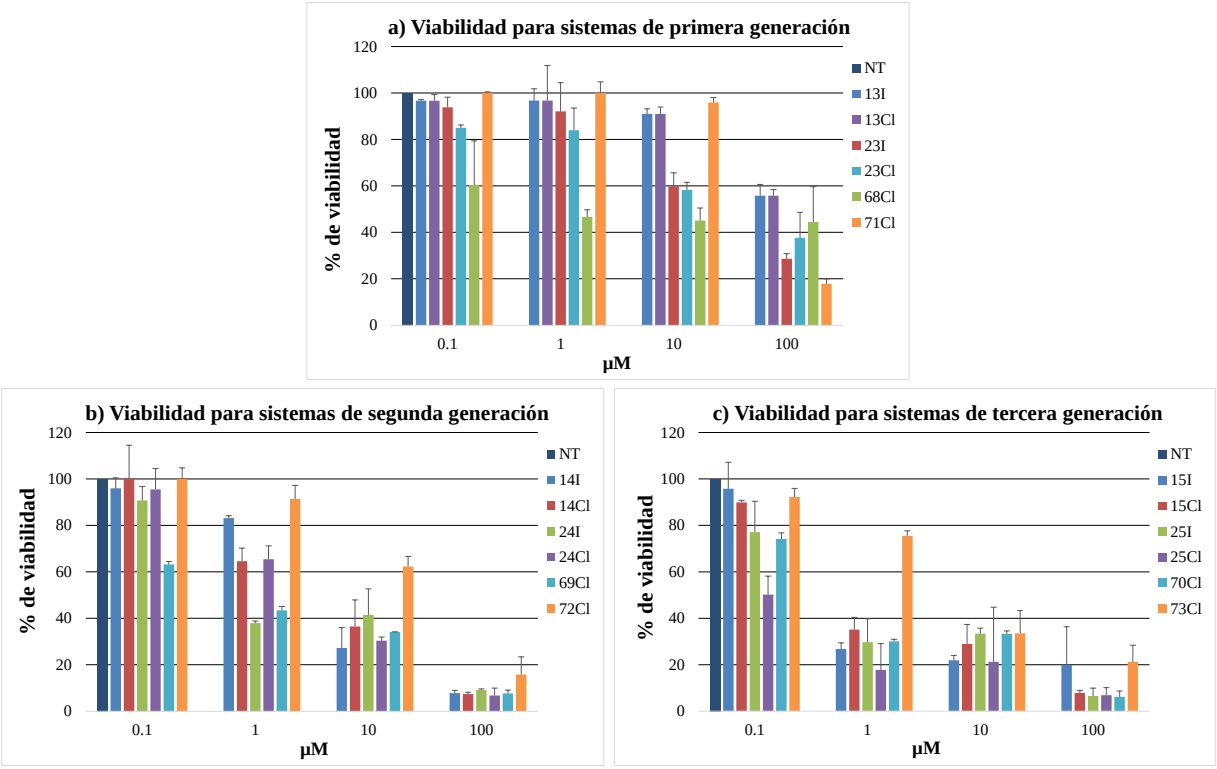


Figura 3.13. Ensayo MTT en células HeLa durante 24 horas con los dendrones (**13-15** y **23-25**), AuNPs (**68Cl-70Cl**) y AgNPs (**71Cl-73Cl**). Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

Para los dendrones no se observaron diferencias significativas de actividad por efecto del anión (I^- o Cl^-), cuyos valores de actividad citotóxica fueron parecidos en ambos casos. En cuanto al punto focal, se observó un aumento en la actividad en aquellos sistemas que poseían un grupo -SH en el punto focal en comparación con sus análogos con grupo MeCOS-. Los dendrones de primera generación (**13** y **23**) solo presentan actividad moderada (30-60 % de viabilidad) a una concentración de 10 µM. En cuanto a los dendrones de segunda y tercera generación (**14-15** y **24-25**) la actividad aumenta significativamente, observándose una actividad de aproximadamente 70%.

Para las MNPs por su parte, se observó una mayor actividad para las AuNPs (**68Cl-70Cl**) que para sus análogas AgNPs (**71Cl-73Cl**), éstas últimas solo presentan actividad a una concentración de 10 µM. La actividad de las MNPs, en comparación con los dendrones libres, muestra para las AuNPs funcionalizadas con los dendrones de primera y segunda generación (**68Cl** y **69Cl**) un aumento en la actividad de aproximadamente el 50%. No obstante, para la AuNPs funcionalizada con el dendrón de tercera generación (**70Cl**) la actividad observada es menor que la del dendrón libre (**25Cl**).

Citotoxicidad en HT29

La actividad observada para los sistemas en la línea celular HT29 es mucho menor que en la línea celular HeLa. Los datos obtenidos para esta línea celular se encuentran recogidos en la Figura 3.14. De todos los sistemas estudiados, solo presentan actividad los de segunda y tercera generación (**24**, **25**, **68Cl**, **69Cl**, **72Cl** y **73Cl**) en la mayor concentración utilizada (100 µM). Para los sistemas de segunda generación la dendronización mejora la actividad, observándose una mayor actividad para las MNPs que para sus correspondientes dendrones libres.

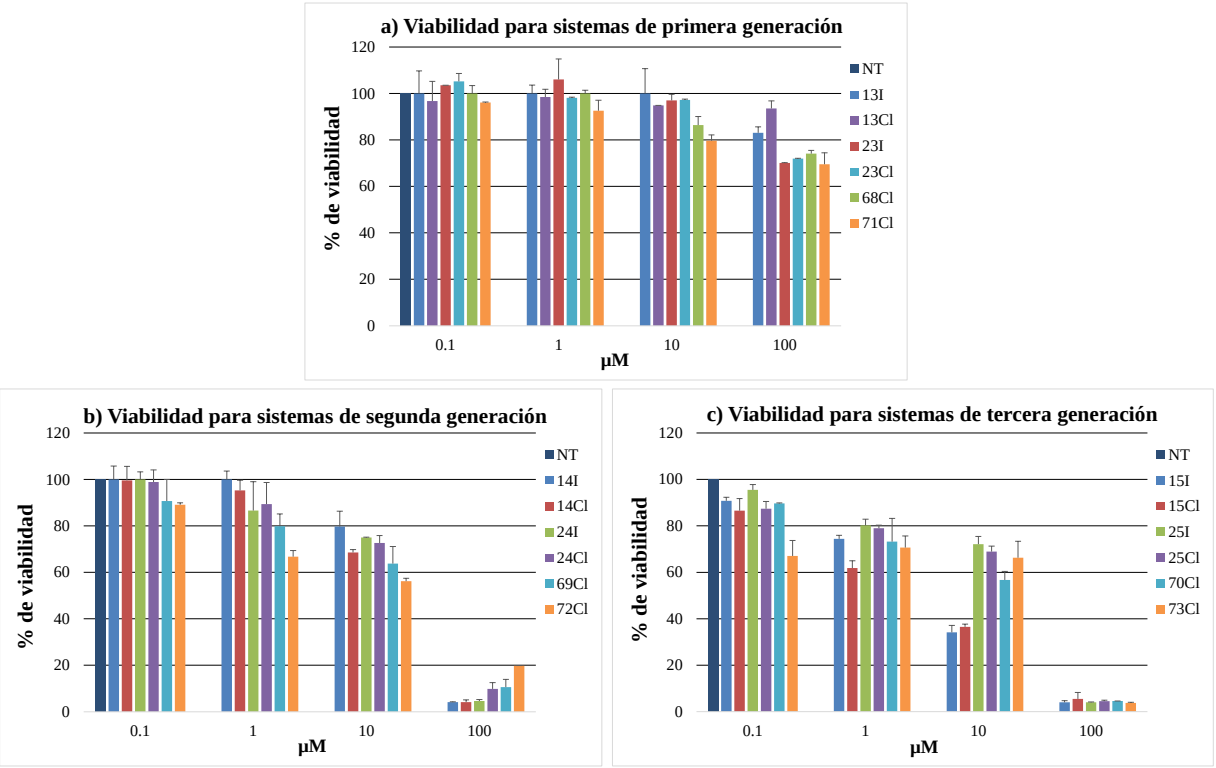


Figura 3.14. Ensayo MTT en células HT29 durante 24 horas con los dendrones (**13-15** y **23-25**), AuNPs (**68Cl-70Cl**) y AgNPs (**71Cl-73Cl**). Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

3.3.2.c. Capacidad antiviral

El estudio de la actividad antiviral de los compuestos frente al VIH se ha realizado en el laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital Gregorio Marañón dirigido por la Dra. Mª Ángeles Muñoz Fernández.

Para este ensayo se eligieron los sistemas aniónicos con grupos sulfonato periféricos (-SO_3^-) (**42-44** y **74-79**), pues estos grupos aniónicos se unen a dominios catiónicos del receptor CD4 y/o de los correceptores CXCR4 y CCR5 de las células dianas, o a las proteínas de la envoltura del virus (ej. Glicoproteína gp120) impidiendo la unión y fusión del mismo.[469] Por ello, estos compuestos podrían ser potencialmente útiles como agentes antivirales frente al VIH.

Biocompatibilidad

Para determinar si los sistemas elegidos son candidatos válidos para su aplicación como agentes antivirales frente al VIH, el primer paso es evaluar su toxicidad. Para ello, se ha realizado el ensayo MTT (apartado 3.3.2b) utilizando células TZM.bl, las cuales son un modelo de la mucosa vaginal que representa la primera barrera de defensa frente a la infección por VIH. Además de estas células, en el caso de la AuNPs también se realizaron ensayos en CMSP como modelo de segunda barrera.

En los ensayos realizados en este apartado se utilizaron como controles: células sin tratar (NT), 10-20% de dimetilsulfóxido como control de muerte celular (DMSO 10-20%) y 20 µM de dextrano como control macromolecular de viabilidad (DEXT). Las concentraciones consideradas no tóxicas serán aquellas en las cuales la viabilidad celular se encuentre por encima del 80% en comparación con el control.

En el caso de los dendrones, se realizó un barrido utilizando diferentes concentraciones (0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 µM). Los resultados obtenidos muestran que los sistemas de primera y segunda generación (**42** y **43**) no resultaron tóxicos en ninguna de las concentraciones utilizadas. Sin embargo, el dendrón de tercera generación (**43**) resultó tóxico en todas las concentraciones probadas, por lo cual, para ensayos posteriores este compuesto fue descartado (Fig.3.15).

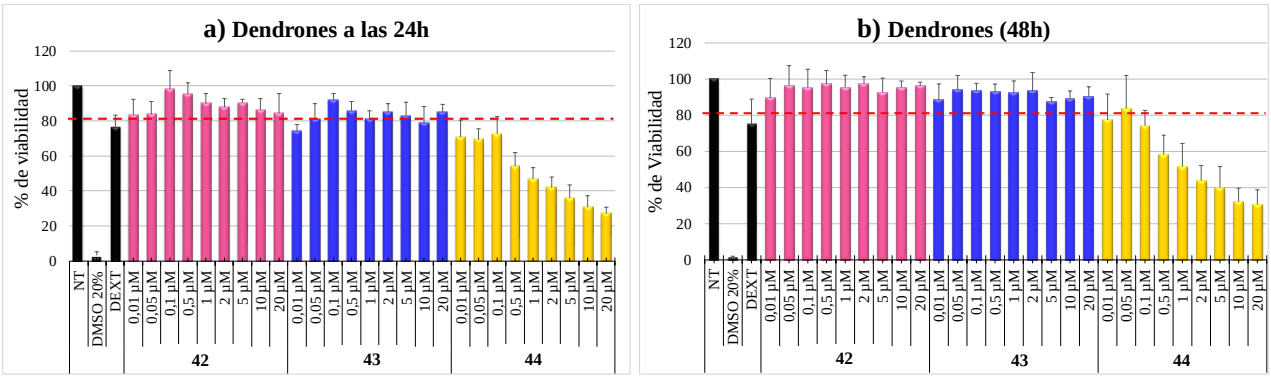


Figura 3.15. Ensayo MTT en células TZM.bl tratadas durante 24 (a) y 48 (b) horas con los dendrones **42-44** en un amplio rango de concentraciones. Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

En cuanto a las AuNPs, se compararon los sistemas obtenidos tanto por el método de intercambio de ligando (**74-76**), como aquellos obtenidos por el método directo (**77b-79**) a diferentes concentraciones. Para las AuNPs obtenidas por el método de intercambio (**74-76**) se observó que la concentración máxima no tóxica para la AuNPs funcionalizada con el dendron de primera generación (**74**) fue de 0.1 µg/mL, mientras que para los sistemas funcionalizados con dendrones de segunda y tercera generación (**75-76**) fue de 0.05 µg/mL (Fig.3.16).

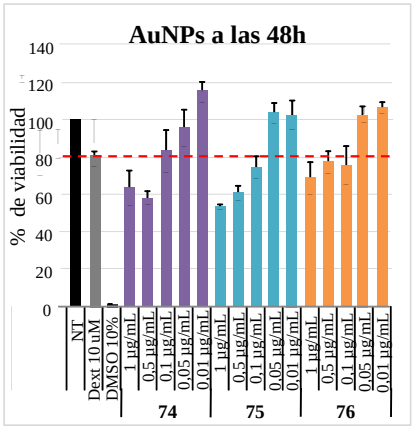


Figura 3.16. Ensayo MTT en células TZM.bl tratadas durante 48 horas con las AuNPs **74-79** en un amplio rango de concentraciones. Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

En cuanto a las AuNPs (**77b-79**) funcionalizadas por el método directo se observó que para la AuNPs funcionalizadas con dendrones de primera generación (**77b**), la concentración máxima no tóxica fue de 10 µg/mL, mientras que para los sistemas funcionalizados con dendrones de segunda y tercera generación (**78** y **79**) esta concentración fue de 0,1 y 0.5 µg/mL respectivamente (Fig.3.17).

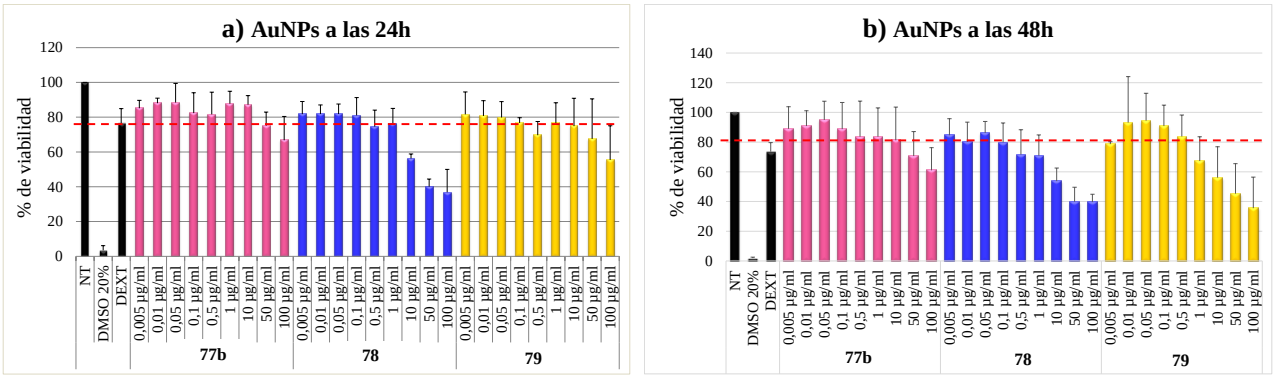


Figura 3.17. Ensayo MTT en células TZM.bl tratadas durante 24 (a) y 48 (b) horas con las AuNPs funcionalizadas por el método directo (**77b-79)** en un amplio rango de concentraciones. Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

La biocompatibilidad de las AuNPs (**74-79**) también se evaluó en CMSP, observándose una viabilidad mayor del 95% en todas las concentraciones probadas (1-100 µg/mL) (Fig.3.18).

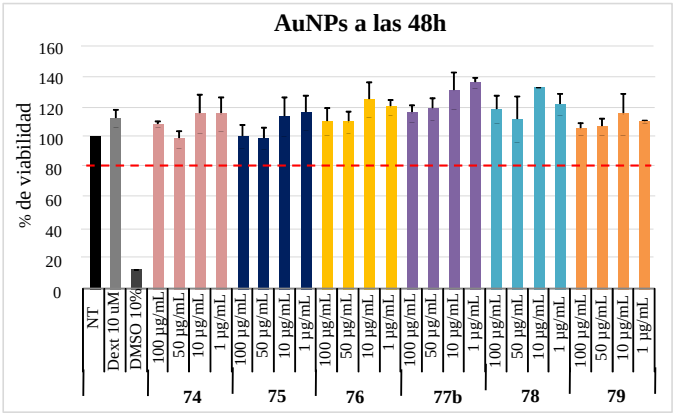


Figura 3.18. Ensayo MTT en CMSP tratadas durante 48 horas con las AuNPs **74-79** en un amplio rango de concentraciones. Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

Inhibición frente al VIH

Una vez determinada la concentración a la que los compuestos son biocompatibles, se procedió a la realización de ensayos para determinar la capacidad que poseen dichos sistemas para inhibir la infección por VIH. Para estos ensayos se utilizaron células TZM-bl y CMSP. Los porcentajes de infección se determinaron utilizando el ensayo basado en la intensidad de luminiscencia por acción de luciferasa. Las medidas de inhibición se realizaron en diferentes aislados virales: el X4-VIH-$1_{NL4.3}$ presente mayoritariamente en la fase crónica de la infección y el R5-VIH_{NLAD8} presente en la fase aguda de la infección.[470,471] Los resultados obtenidos en diferentes aislados virales permiten determinar si la actividad inhibitoria de los

sistemas depende del tipo de tropismo viral del que se trate. En todos los ensayos se utilizaron células sin tratar como control de infección (NT) y como control de inhibición 20 µM de enfuvirtida (T-20), un antirretroviral que inhibe la entrada y fusión del virus.

En el caso de los dendrones (**42-43**) se realizaron los ensayos en TZM.bl a las concentraciones 0.1, 1, 5, 10 y 20 µM.

En los resultados obtenidos se observó que ambos sistemas (**42-43**) eran capaces de inhibir el aislado viral X4-VIH-$1_{NL4.3}$ en un 100% a concentraciones de 20 µM y 5 µM respectivamente, mientras que para el R5-VIH_{NLAD8} solo fue activo el dendrón de segunda generación (**43**), observándose una inhibición del 90% a una concentración de 20 µM (Fig.3.19). En el caso del dendrón de segunda generación (**43**) destaca el aumento en la actividad observado, pues con sistemas similares sintetizados en nuestro grupo de investigación la actividad frente al aislado viral X4-VIH-$1_{NL4.3}$ es 10 veces menor, alcanzándose solo un 70% de inhibición a una concentración de 10 µM.[472]

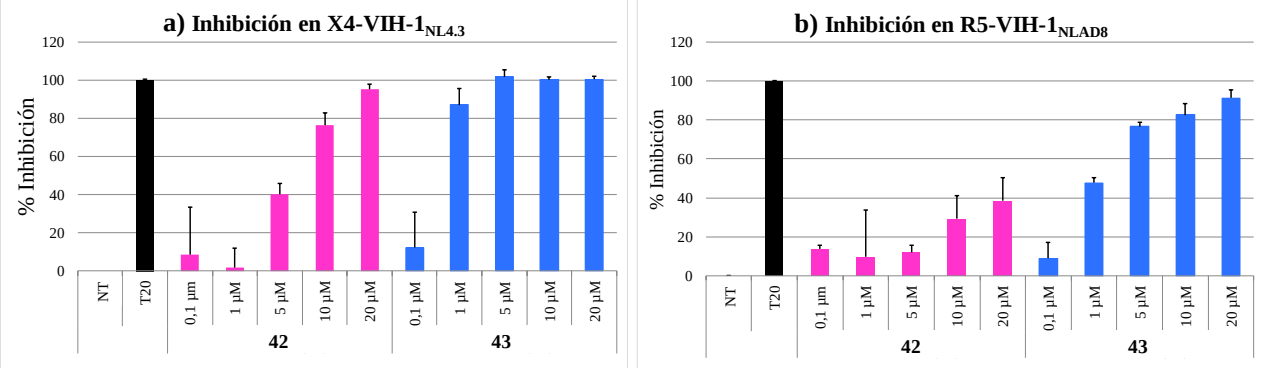


Figura 3.19. Inhibición de infección X4-VIH-$1_{NL4.3}$ (a) y R5-VIH-1_{NLAD8} (b) en células TZM-bl pre-tratadas (1 hora) con los dendrones **42** y **43**. Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

En cuanto a las AuNPs, primeramente, se realizaron ensayos de inhibición en CMSP a una concentración de 100 µg/mL, observándose que las AuNPs sintetizadas por el método directo (**77b-79**) poseían mayor actividad que las obtenidas por el método de intercambio (**74-76**). En esta línea celular las AuNPs más activas fueron las obtenidas por funcionalización con los dendrones de tercera generación (**76** y **79**) (Fig.3.20).

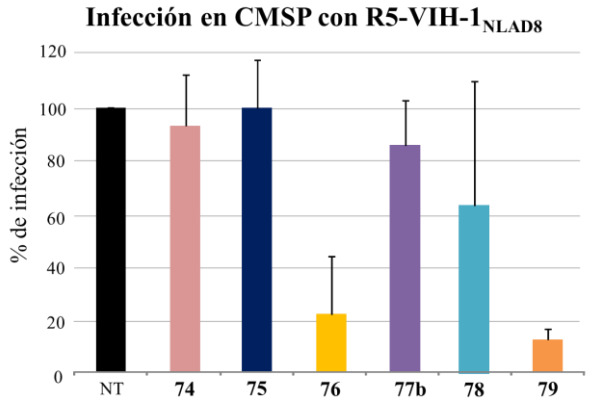


Figura 3.20. Inhibición de infección R5-VIH-1_{NLAD8} en CMSP pre-tratadas (1 hora) con las AuNPs (**74-79**). Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

Los ensayos de inhibición en células TZM-bl solo se realizaron para los sistemas funcionalizados por el método directo (**77b-79**), ya que en esta línea celular resultaron ser mucho menos tóxicos que sus análogos sintetizados por el método de intercambio (**74-76**). Estos sistemas, demostraron ser capaces de inhibir ambos aislados virales, observándose una mayor inhibición frente al aislado viral X4-VIH-$1_{NL4.3}$ (Fig.3.21).

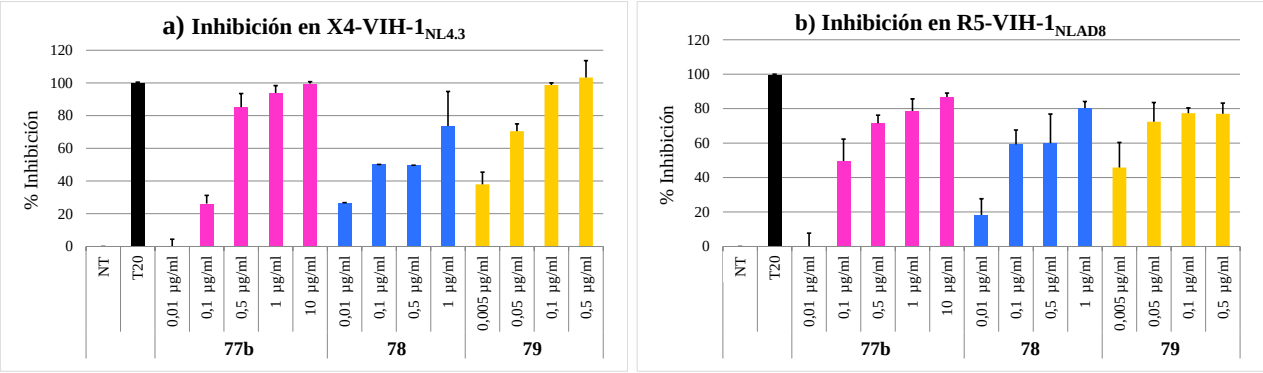


Figura 3.21. Inhibición de infección X4-VIH-$1_{NL4.3}$ (a) y R5-VIH-1_{NLAD8} (b) en células TZM-bl pre-tratadas (1 hora) con las AuNPs funcionalizadas por el método directo (**77b-79**). Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

Para el aislado viral X4-VIH-$1_{NL4.3}$, se observó que las AuNPs funcionalizadas con dendrones de primera (**77b**) y tercera generación (**79**), fueron capaces de inhibir un 100% a una concentración de 10 y 0,1 µM respectivamente. Sin embargo, las AuNPs funcionalizadas con dendrones de segunda generación (**78**), la actividad disminuye, observándose solo un 80% de inhibición a una concentración de 1 µM. En cuanto al aislado viral R5-VIH$_{NLAD8}$, a las mismas concentraciones las AuNPs **77b** y **79** solo fueron capaces de inhibir un 80% del

virus. No obstante, las AuNPs funcionalizadas con dendrones de segunda generación (**78**) muestra la misma actividad que la observada en el aislado viral X4-VIH-$1_{NL4.3}$.

En la Tabla 3.5 se encuentran recogidos los valores de viabilidad de los sistemas y sus correspondientes porcentajes de inhibición en células TZM-bl. La comparación de los resultados obtenidos muestra claramente que las AuNPs dendronizadas (**77b-79**) presentan una mayor capacidad de inhibición frente al VIH que los dendrones libres (**42-44**), siendo además estas AuNPs capaces de inhibir ambos aislados virales. Es decir, el proceso de dendronización mejora la actividad de estos sistemas de una forma notable en este caso.

Tabla 3.5. Valores de viabilidad e inhibición de dendrones (**42-43**) y AuNPs (**77-79**) en TZM.bl

42						77b							
µg/mL	µM	Viabilidad		Inhibición (R5)	Inhibición (X4)	µg/mL	µM	Cc con respecto al dendron		Viabilidad		Inhibición (R5)	Inhibición (X4)
		24h	48h					µg/mL	µM	24h	48h		
5.4×10^{-2}	0.10	100.00	100.00	13.96	8.66	0.01	2.37×10^{-5}	3.27×10^{-3}	6.03×10^{-3}	88.03	90.83	0.00	0.00
0.5428	1.00	100.00	100.00	9.85	1.73	0.10	2.37×10^{-4}	3.27×10^{-2}	6.04×10^{-2}	82.31	88.71	49.64	26.21
2.7140	5.00	100.00	100.00	11.85	40.25	0.50	1.18×10^{-3}	0.1637	0.3026	81.62	83.64	71.48	85.24
5.4280	10.00	100.00	100.00	29.21	76.36	1.00	2.37×10^{-3}	0.3274	0.6043	87.64	83.64	78.58	93.89
10.8560	20.00	100.00	100.00	38.64	95.20	10.00	2.37×10^{-2}	3.2740	6.0428	87.14	81.25	86.75	99.66

43						78							
µg/mL	µM	Viabilidad		Inhibición (R5)	Inhibición (X4)	µg/mL	µM	Cc con respecto al dendron		Viabilidad		Inhibición (R5)	Inhibición (X4)
		24h	48h					µg/mL	µM	24h	48h		
0.1124	0.10	93.57	93.57	8.84	12.20	0.01	2.67×10^{-5}	3.62×10^{-3}	3.22×10^{-3}	81.84	80.14	18.25	26.82
1.1237	1.00	100.00	100.00	47.67	86.91	0.10	2.67×10^{-4}	3.62×10^{-2}	3.22×10^{-2}	81.04	79.86	59.22	50.18
5.6185	5.00	97.22	97.23	76.66	100.00	0.50	1.33×10^{-3}	0.1812	0.1613	74.60	71.65	59.94	49.68
11.2370	10.00	97.08	97.08	82.67	100.00	1.00	2.67×10^{-3}	0.3623	0.3227	76.50	70.93	80.26	73.63
22.4740	20.00	90.41	90.41	91.30	100.00								

44						79							
µg/mL	µM	Viabilidad		Inhibición (R5)	Inhibición (X4)	µg/mL	µM	Cc con respecto al dendron		Viabilidad		Inhibición (R5)	Inhibición (X4)
		24h	48h					µg/mL	µM	24h	48h		
0.2286	0.10	74.29	74.30			0.005	1.94×10^{-5}	1.82×10^{-3}	7.97×10^{-4}	81.62	68.68	45.78	37.98
2.2855	1.00	51.67	51.69			0.05	1.94×10^{-4}	1.82×10^{-2}	7.96×10^{-3}	79.82	94.45	72.38	70.54
11.4275	5.00	39.95	39.95			0.10	3.88×10^{-4}	3.63×10^{-2}	1.59×10^{-2}	76.61	90.83	77.32	98.75
22.8550	10.00	32.15	32.15			0.50	1.93×10^{-3}	0.1815	0.0794	69.67	83.74	77.02	100.00
45.7100	20.00	30.67	30.67										

3.3.3. Aplicación de los sistemas sintetizados como transportadores de ácidos nucleicos

Dentro de los sistemas sintetizados en esta memoria, aquellos que poseen grupos catiónicos en la periferia (-NMe_3^+) son candidatos potenciales para ser utilizados como agentes transportadores de ácidos nucleicos. Para ello, se han realizado diferentes ensayos para determinar su eficiencia en la formación de nanoconjugados con ARNpi para la terapia génica del cáncer y del VIH.

3.3.3.a. Terapia génica: Cáncer

En el caso de los estudios de terapia génica frente al cáncer, los ensayos de formación de nanoconjugados con ARNpi y los compuestos fueron realizados en el Instituto de Química, Biología y Medicina Fundamental de Novosibirsk, Rusia (ICBFM) y en el Departamento General de Biofísica de la Universidad de Lodz (Polonia). Los trabajos realizados en el ICBFM se corresponden con la estancia de la doctoranda en este centro durante un periodo de tres meses con el objetivo de poder presentar esta Tesis bajo el formato de Tesis Internacional.

Para los estudios se eligieron los dendrones catiónicos (**23Cl-25Cl**), las AuNPs (**68Cl-70Cl**) y las AgNPs (**71Cl-73Cl**) funcionalizadas con dichos dendrones cuyos resultados permitirán hacer comparaciones entre ambos sistemas.

Los estudios descritos a continuación se realizaron con el ARNpi antiapoptótico Bcl-xL (40 cargas negativas) que inhibe específicamente la expresión del gen Bcl-xL. Este gen previene la apoptosis de la célula tumoral a través de dos mecanismos diferentes: heterodimerización con una proteína apoptótica inhibiendo su efecto apoptótico[473,474] y formación de poros en la membrana externa mitocondrial ayudando a mantener un estado normal de la membrana bajo condiciones de estrés.[475] Para los ensayos de fluorescencia se utilizó el ARNpi marcado con fluoresceína (Bcl-xL-FAM).

Ensayos de electroforesis en gel de agarosa

Este estudio permite determinar la ratio de carga óptima compuesto/ARNpi necesaria para la formación de los nanoconjugados. El ARNpi (carga negativa) a través de interacciones electrostáticas, se unen a los compuestos (carga positiva) formando los nanoconjugados deseados. La electroforesis permite determinar si hay o no interacción entre los sistemas y el ARNpi. Así, la ausencia de interacción permitirá la migración del ARNpi hacia el polo positivo, mientras que si los compuestos son capaces de formar los nanoconjugados dicha migración no se observará. En este ensayo se ha utilizado como control el mismo ARNpi libre.

Los ensayos se realizaron utilizando diferentes ratios de carga compuesto/ARNpi (Tabla 3.6). En las imágenes de electroforesis la primera columna corresponde a nuestro compuesto libre (D), la segunda al ARNpi libre (Bcl-xL) y las posteriores a éstas a los nanoconjugados formados.

Tabla 3.6. Concentraciones de compuestos (dendrones (**23Cl-25Cl**), AuNPs (**68Cl-70Cl**) y AgNPs (**71Cl-73Cl**)) y de ARNpi Bcl-xL (40 cargas negativas) utilizados en los ensayos

Compuesto	**cargas**	**Compuesto/ARNpi**							
23Cl	2	Ratio molar	100	200	300	400	500	600	700
		Ratio carga	5	10	15	20	25	30	35
24Cl	4	Ratio molar	5	10	15	20	30	40	50
		Ratio carga	0.5	1	1.5	2	3	4	5
25Cl	8	Ratio molar	2.5	5	7.5	10	15	20	25
		Ratio carga	0.5	1	1.5	2	3	4	5
68Cl	118	Ratio molar	0.17	0.34	0.51	0.68	1.02	1.36	1.69
		Ratio carga	0.5	1	1.5	2	3	4	5
69Cl	528	Ratio molar	0.04	0.08	0.11	0.15	0.23	0.30	0.39
		Ratio carga	0.5	1	1.5	2	3	4	5
70Cl	948	Ratio molar	0.02	0.04	0.06	0.08	0.13	0.17	0.21
		Ratio carga	0.5	1	1.5	2	3	4	5
71Cl	72	Ratio molar	0.28	0.56	0.83	1.11	1.67	2.22	2.78
		Ratio carga	0.5	1	1.5	2	3	4	5
72Cl	660	Ratio molar	0.12	0.30	0.36	0.42	0.48	0.54	0.61
		Ratio carga	2	5	6	7	8	9	10
73Cl	4459	Ratio molar	4.5×10^{-3}	9.0×10^{-3}	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05
		Ratio carga	0.5	1	1.5	2	3	4	5

Para los dendrones se observó que el sistema de primera generación (**23Cl**) formaba nanoconjugados a ratio de carga mucho mayor (15:1) que el observado para los dendrones de segunda y tercera generación (4:1) (**24Cl** y **25Cl**) (Fig.3.22).

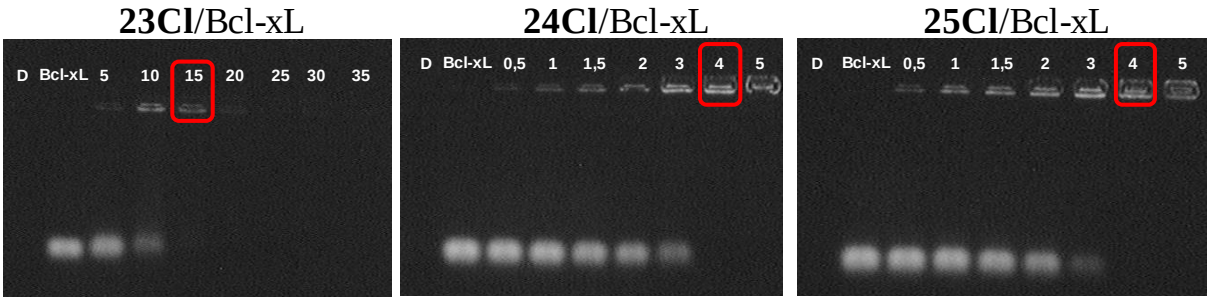


Figura 3.22. Electroforesis en gel de agarosa de los nanoconjugados **23Cl-25Cl**/Bcl-xL para distintos ratio de carga +/- tras un periodo de incubación de 15 minutos

Por otro lado, para las AuNPs (**69Cl-70Cl**) se observó la misma ratio de carga para los tres sistemas (3:1), mientras que para la AgNPs (**71Cl-73Cl**) los sistemas funcionalizados con dendrones de primera y tercera generación necesitaron menores ratios de carga para formar los nanoconjugados que aquellas funcionalizadas con el dendrón de segunda generación (**72Cl**) (Fig.3.23).

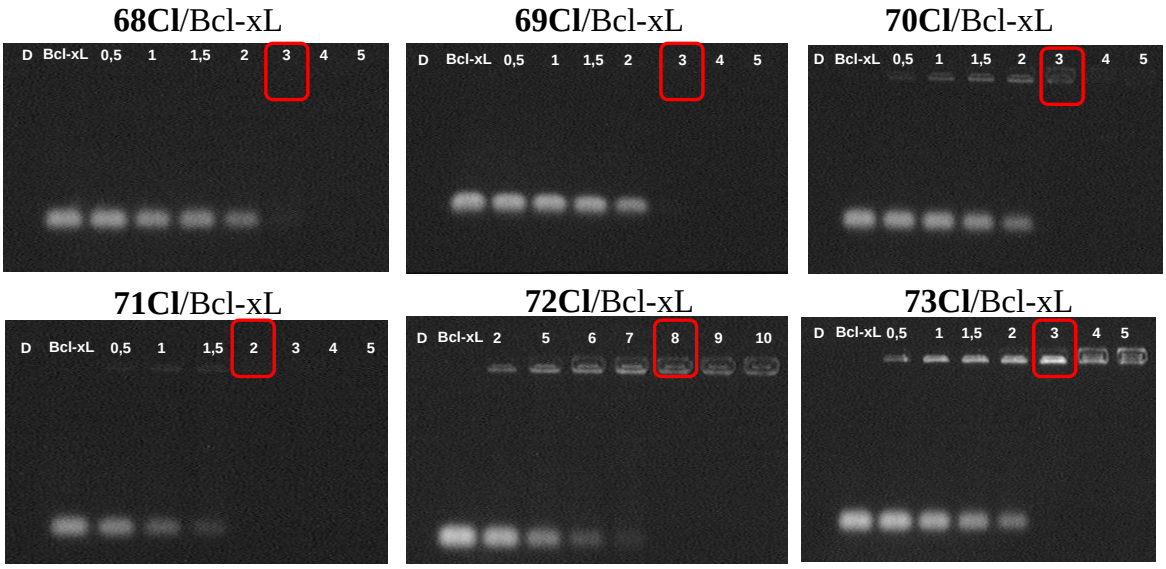


Figura 3.23. Electroforesis en gel de agarosa de los nanoconjugados formados con las AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL) y las AgNPs (**71Cl-73Cl**/Bcl-xL) para distintos ratio de carga +/- tras un periodo de incubación de 15 minutos

Ensayos de fluorescencia

Las ratios de carga necesarios para la formación de los nanoconjugados también se determinaron realizando ensayos de fluorescencia. Las moléculas fluorescentes al ser excitadas con luz polarizada plana emiten de nuevo en un plano fijo, pues la polarización se conserva siempre y cuando la molécula se mantenga fija. En disolución las moléculas se encuentran girando al azar, dependiendo de la velocidad de este movimiento, la polarización de la luz cambia. Si la molécula gira lentamente, el plano de la polarización de la luz emitida es prácticamente el mismo que el de la luz incidente, en cuyo caso la polarización se mantiene. Por el contrario, si la molécula gira muy rápido, el plano es muy distinto al inicial, obteniéndose luz no polarizada. El tamaño de las moléculas también influye en la polarización, en el caso de moléculas pequeñas las cuales giran rápidamente, al ser irradiadas con luz polarizada emiten luz no polarizada, mientras las moléculas grandes que giran más despacio, emiten luz altamente polarizada. Éstas medidas proporcionan información sobre la

movilidad y orientación de las moléculas, donde el término polarización de fluorescencia se refiere a la relación entre la fluorescencia generada en el plano horizontal y el vertical, cuya ecuación es la siguiente:

$$p = (I_{\parallel} - I\perp) / (I_{\parallel} + I\perp)$$

Dónde: $_{\parallel}$ = paralelo a luz polarizada y $\perp$ = perpendicular a la luz polarizada

En el caso de los dendrones (**23Cl-25Cl**) los resultados obtenidos por polarización de fluorescencia para las ratios de carga a las cuales se forman los nanoconjugados con el ARNpi Bcl-xL-FAM, concuerdan básicamente con los obtenidos por electroforesis en gel de agarosa, observándose formación de los nanoconjugados a ratios de carga de 9, 4 y 3 respectivamente (Fig.3.24).

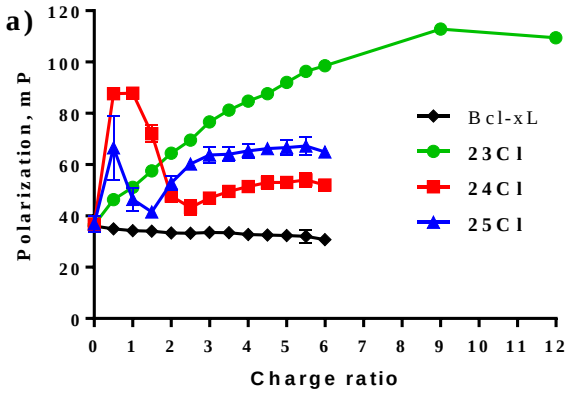


Figura 3.24. Medidas de polarización de fluorescencia para los nanoconjugados formados con los dendrones (**23Cl-25Cl**) y el ARNpi Bcl-xL-FAM a diferentes ratios de carga

En cuanto a las MNPs, se observó la extinción de la fluorescencia, probablemente debido a la presencia de los núcleos metálicos, por lo cual la polarización de fluorescencia no es una medida apropiada. No obstante, se realizaron espectros de intensidad de fluorescencia (500-600 nm) para determinar las ratios de carga a las cuales tiene lugar la formación de los nanoconjugados por medio de la extinción de la fluorescencia. Las intensidades de fluorescencia se normalizaron como F_0/F, donde F es la intensidad de la fluorescencia del Bcl-xL-FAM en presencia de las MNPs y F_0 es el del Bcl-xL-FAM libre.

Como se puede observar en la Figura 3.25, las AuNPs (**68Cl-69Cl**) y las AgNPs (**71Cl-73Cl**) muestran el mismo perfil de extinción con el ARNpi Bcl-xL-FAM. Las ratios de carga a los cuales se forman los nanoconjugados son aquellos en los cuales se observa un valor

constante en la extinción de la fluorescencia. Los valores de ratio de carga óptima para la formación de los nanoconjugados son de nuevo similares a los obtenidos por electroforesis. En el caso de las AuNPs (**68Cl-70Cl**) fueron de 2.5, 3, 3.5 respectivamente, mientras que para las AgNPs (**71Cl-73Cl**) las ratios fueron de 2.5, 4.5 y 3.5.

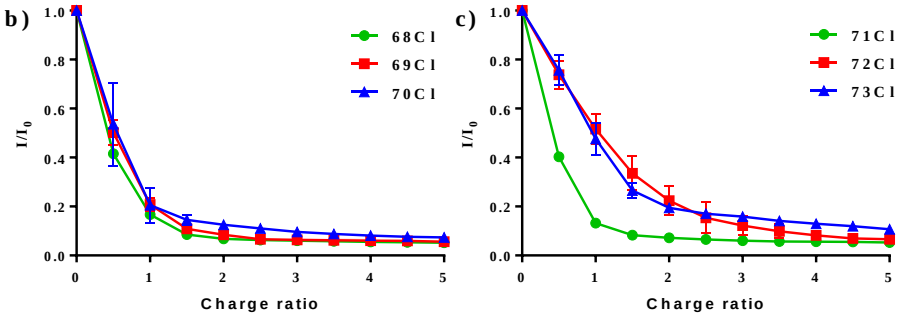


Figura 3.25. Medidas de extinción de la fluorescencia para los nanoconjugados formados con las AuNPs (**68Cl-70Cl**)/Bcl-xL-FAM (a) y las AgNPs (**71Cl-73Cl**)/Bcl-xL-FAM (b) a diferentes ratios de carga

Por otro lado, se observa que la extinción de la fluorescencia para los diferentes MNPs disminuye al aumentar la generación dendrítica. Este comportamiento probablemente se deba a que al aumentar la generación dendrítica aumenta el tamaño de los dendrones los cuales protegen mejor la superficie metálica disminuyendo así la interacción de los compuestos con el ARNpi y por consiguiente la eficiencia en la extinción de la fluorescencia.

Dicroísmo circular

La luz polarizada en un plano está formada por dos componentes polarizados circularmente en sentidos opuestos que se encuentran en fase y poseen la misma amplitud. Una sustancia presenta dicroísmo circular (DC) cuando los componentes circularmente polarizados son absorbidos en diferentes grados, esto produce un desfase entre los componentes provocando la rotación del plano de polarización. La desviación en el plano de la luz polarizada se debe al cambio en el índice de refracción de la luz polarizada de ambos componentes. La distorsión de este plano genera una elipse, por lo cual la luz que pasa a través de la sustancia estará polarizada elípticamente.[476]

Los ácidos nucleicos presentan DC por la presencia de los nucleótidos en su estructura los cuales poseen un azúcar quiral con asimetría intrínseca. La fuerte interacción de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ de las bases cromofóricas con la alta energía en los azúcares produce un DC de baja intensidad que depende principalmente de la geometría de apilamiento de las bases. El cambio en el espectro DC permite estudiar la interacción de los ácidos nucleicos con otras moléculas, información bastante útil en el uso de éstas como agentes de transporte de ácidos nucleicos en terapia génica.

Ensayos de dicroísmo circular (DC) fueron realizados para estudiar el efecto de los compuestos en la estructura secundaria del ARNpi Bcl-xL. Para ello, se registraron los espectros DC en un rango de 200-320 nm durante la formación de los nanoconjugados con los dendrones (**23Cl-25Cl**/Bcl-xL) y las AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL). En estos ensayos se utilizó una concentración de ARNpi Bcl-xL de 1 μM y concentraciones crecientes de los compuestos (dendrones y MNPs). La elipticidad residual media, Θ,[477-479] se expresa como $cm^2{*}dmol^{-1}$ y se calculó utilizando el software proporcionado por Jasco. Los valores máximos de elipticidad para el ARNpi Bcl-xL libre ($\Theta 0$) y para los nanoconjugados Bcl-xL con los dendrones (**23Cl-25Cl**/Bcl-xL) y con las AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL) (Θs), se calcularon y se representan en gráficos como una función de la relación molar de compuesto/ARNpi.

El espectro de DC del ARNpi Bcl-xL presenta un máximo en torno a 260 nm. Durante la formación de los nanoconjugados con los dendrones (**23Cl-25Cl**/Bcl-xL) en los espectros DC se observó que a medida que aumentaba la ratio compuesto/ARNpi disminuía la intensidad de dicho pico y que éste además se desplaza a mayores λ (Fig.3.26A). También se observó que a medida que aumenta la generación dendrítica, el cambio en el pico máximo se observaba a menores ratios compuesto/ARNpi (Fig.3.26B).

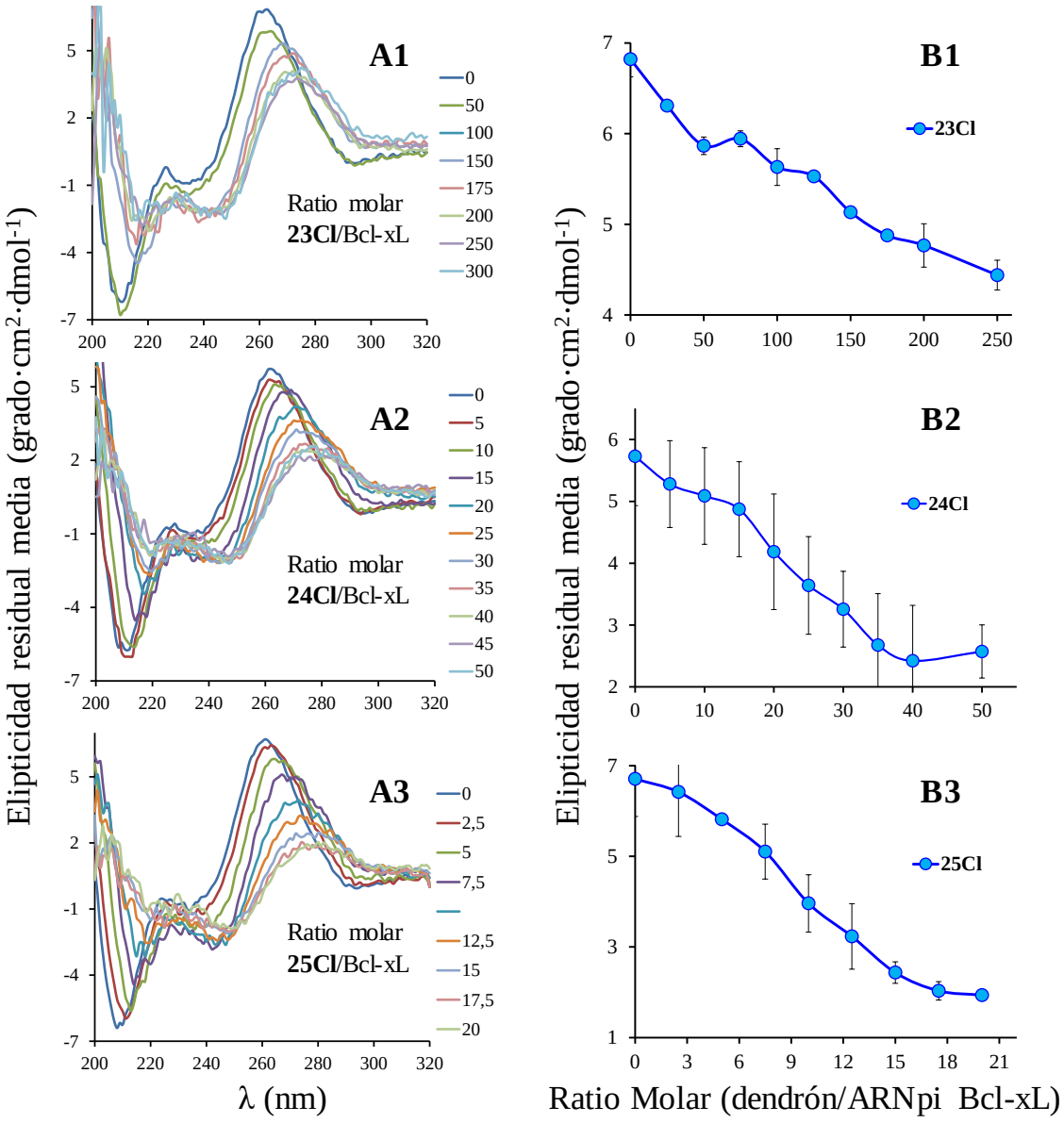


Figura 3.26. Espectros DC (A) y cambios en la elipticidad residual media del ARNpi Bcl-xL en $\lambda = \max_{260\text{-}280\ nm}$ (B) en la formación de los nanoconjugados con los dendrones: **23Cl**/ARNpi Bcl-xL (A1-B1), **24Cl**/ARNpi Bcl-xL (A2-B2) y **25Cl**/ARNpi Bcl-xL (A3-B3). Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes

Para los nanoconjugados formados con las AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL), se observó en los espectros DC el mismo comportamiento descrito para los nanoconjugados formados con los dendrones libres. No obstante, la diferencia en las ratios compuesto/ARNpi al aumentar la generación dendrítica causa un efecto menor en el pico máximo (Fig. 3.27).

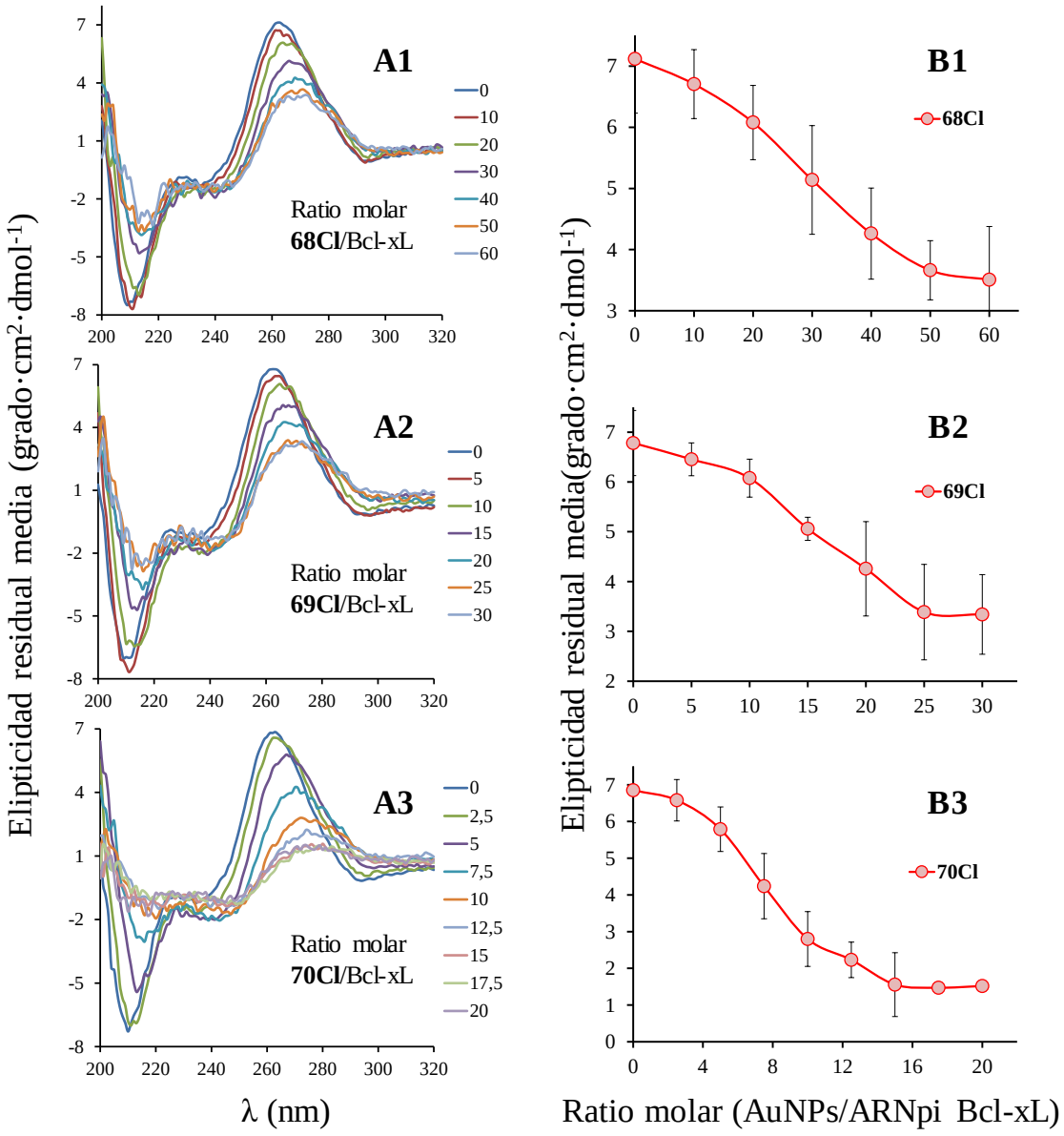


Figura 3.27. Espectros DC (A) y cambios en la elipticidad residual media del ARNpi Bcl-xL en $\lambda = max_{260\text{-}280\ nm}$ (B) en la formación de los nanoconjugados con las nanopartículas: **68Cl**/ARNpi Bcl-xL (A1-B1), **69Cl**/ARNpi Bcl-xL (A2-B2) y **70Cl**/ARNpi Bcl-xL (A3-B3). Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes

Los resultados obtenidos muestran que al aumentar la generación dendrítica la diminución de intensidad del pico máximo se observa a menores ratios compuesto/ARNpi, lo que indica que al aumentar la generación dendrítica de los sistemas disminuye la ratio compuesto/ARNpi necesaria para la formación del nanoconjugado, resultado que de nuevo concuerda con lo observado en los ensayos de electroforesis y en las medidas de fluorescencia.

Ensayos de estabilidad de los nanoconjugados frente a heparina

Uno de los aspectos que debe tenerse en cuenta una vez formados los nanoconjugados es la interacción que estos sistemas pueden tener con otras moléculas dentro del plasma sanguíneo, pues si estos se ven desplazados puede verse afectada la eficacia de transfección de los sistemas. Es por esto, que se han realizado estudios de estabilidad de los nanoconjugados formados frente a diferentes concentraciones de heparina utilizando ensayos de fluorescencia y de dicroísmo circular.

Para los nanoconjugados formados con los dendrones solo se estudiaron los formados con los sistemas de segunda y tercera generación (**24Cl-25Cl**)/Bcl-xL-FAM. De este modo, se procedió a la realización de medidas de polarización de fluorescencia al añadir cantidades crecientes de heparina, lo que permite observar la liberación del ARNpi Bcl-xL-FAM. En este ensayo ambos nanoconjugados (**25Cl-24Cl**/Bcl-xL-FAM) presentaron el mismo comportamiento, observándose liberación del material genético a partir de una concentración de heparina de 20 mg/L. La cantidad máxima liberada de ARNpi Bcl-xL-FAM fue de 80% y se alcanzó a una concentración de heparina de 40 mg/L (Fig.3.28). Este comportamiento concuerda con el observado en bibliografía para estructuras dendríticas de naturaleza carbosilano.[480]

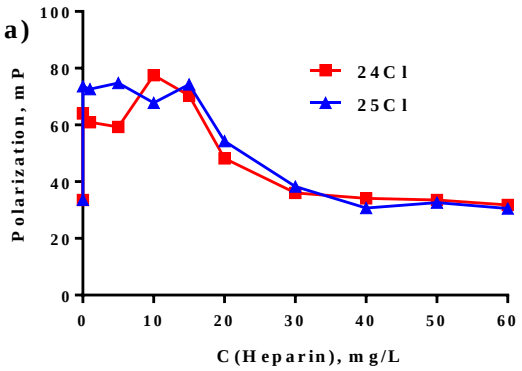


Figura 3.28. Medidas de polarización de fluorescencia observadas en el desplazamiento con heparina del ARNpi Bcl-xL-FAM en los nanoconjugados **23Cl-25Cl**/Bcl-XL-FAM

Por otro lado, para los nanoconjugados formados con las MNPs se realizaron medidas de extinción de la fluorescencia tanto en aquellos formados con AuNPs (**68Cl-70Cl/** Bcl-xL-FAM) como para los formados con AgNPs (**71Cl-73Cl/** Bcl-xL-FAM). En ambos casos se necesitó una mayor cantidad de heparina para desplazar el material genético que la necesitada para los dendrones libres. El desplazamiento del material genético de los nanoconjugados

formados con las AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL-FAM) comenzó a observarse a una concentración de heparina de 40 mg/L, alcanzándose el mayor desplazamiento a una concentración de 60 mg/L de heparina (Fig.3.29a). Para los nanoconjugados formados con las AgNPs (**71Cl-73Cl**/Bcl-xL-FAM) se observó una interacción más débil con el material genético, el cual comenzó a liberarse a una concentración de heparina de 30 mg/L y cuyo valor mayor de liberación tuvo lugar a una concentración de 50 mg/L de heparina (Fig.3.29b).

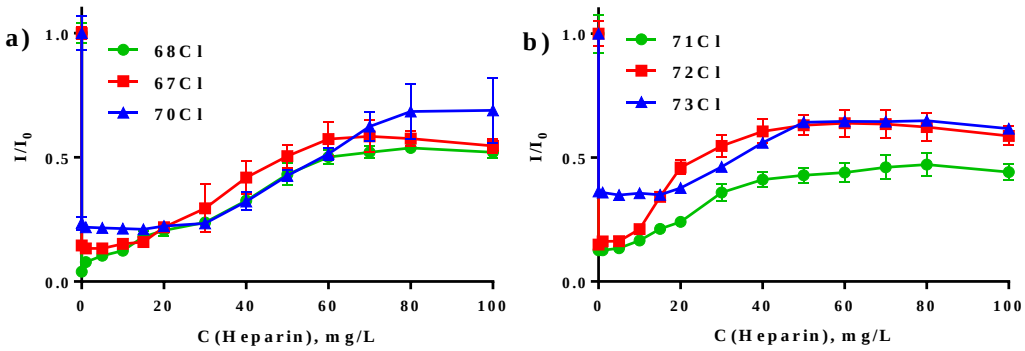


Figura 3.29. Medidas de extinción de la fluorescencia observadas en el desplazamiento con heparina del ARNpi Bcl-xL-FAM de nanoconjugados formados con AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL-FAM) y AgNPs (**71Cl-73Cl**/Bcl-xL-FAM)

Los resultados obtenidos muestran claramente que en los nanoconjugados formados con las AuNPs la interacción es mayor que la observada en los nanoconjugados formados con los dendrones libres y con las AgNPs, lo que se traduce como una mayor estabilidad de los nanoconjugados formados con esos sistemas.

La liberación del material génico por acción de la heparina también se estudió por dicroísmo circular. Para ello, se recolectaron los espectros DC de los nanoconjugados formados por los dendrones (**23Cl-25Cl**/Bcl-xL-FAM) y las AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL-FAM) al adicionarle heparina (164 mg/L).

Los resultados muestran que los espectros de DC obtenidos después de adicionar la heparina eran similares a los obtenidos para el ARNpi Bcl-xL-FAM libre. Éste comportamiento fue considerablemente más débil para el nanoconjugado formado con el dendron de tercera generación (**25Cl**/Bcl-xL-FAM) y para la AuNPs funcionalizada con dicho dendrón (**70Cl**/Bcl-xL-FAM), es decir, la interacción de estos sistemas con el ARNpi es mayor (Fig.3.30).

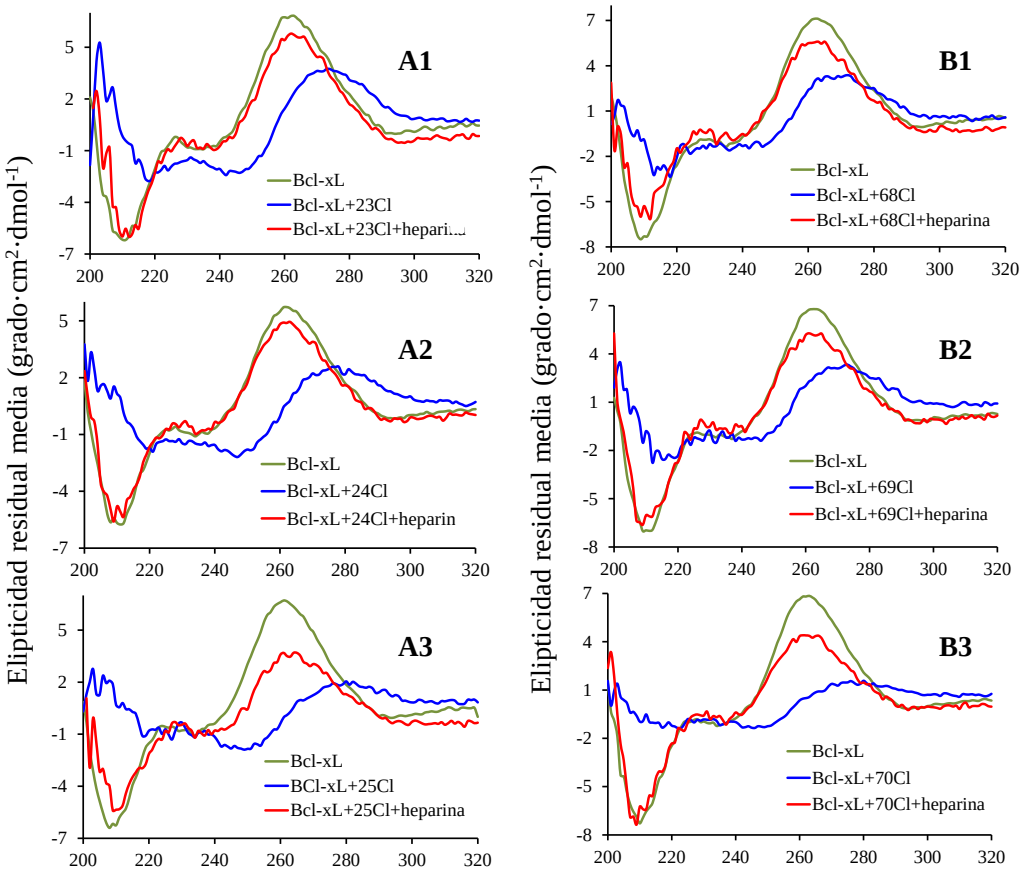


Figura 3.30. Comparación de espectros CD del ARNpi libre, de los nanoconjugados formados con los dendrones: **23Cl-25Cl**/ARNpi Bcl-xL (A) y con las AuNPs **68Cl-70Cl**/ARNpi Bcl-xL (B) y en presencia de heparina. Los resultados representan la media ± DE de tres experimentos independientes

Ensayos de estabilidad de los nanoconjugados frente a RNasa A

Otra de las características que debe poseer un agente de transporte de material genético, es ser capaz de impedir la degradación de éste por enzimas, protegiéndolo hasta su llegada al lugar de acción. En este sentido, se ha estudiado la capacidad que poseen los compuestos de proteger el ARNpi Bcl-xL frente a RNasa A. Para ello se realizaron ensayos de electroforesis en gel de agarosa, utilizando como controles ARNpi Bcl-xL libre (no degradación), ARNpi Bcl-xL + RNasa A (degradación total) y ARNpi Bcl-xL + RNasa A + heparina. En este ensayo se utilizó heparina (820 mg/L) para liberar el ARNpi Bcl-xL del nanoconjugado formado y observar su migración hacia el polo positivo.

Los resultados obtenidos en el caso de los dendrones, muestran que los sistemas de segunda y tercera generación (**24Cl** y **25Cl**) protegen con mayor eficacia el ARNpi Bcl-xL contra la RNasa, mientras que para el dendrón de primera generación (**23Cl**) la capacidad de

proteger es mínima. En el caso de las AuNPs (**68Cl-70Cl**) todos los sistemas fueron capaces de proteger el ARNpi Bcl-xL frente a la degradación por RNasa (Fig.3.31). Estos resultados son bastante prometedores en cuanto al uso de estos sistemas en el transporte de material genético.

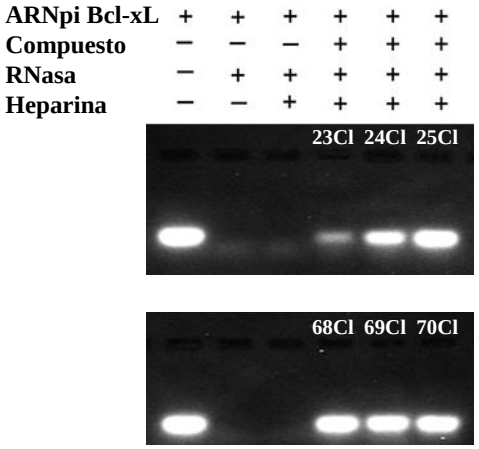


Figura 3.31. Medidas de estabilidad por electroforesis de nanoconjugados formados con los dendrones (**23Cl-25Cl**)/Bcl-xL (arriba) y las AuNPs (**68Cl-70Cl**)/Bcl-xL frente a RNasa

3.3.3.b. Terapia génica: VIH

Para los estudios de terapia génica frente al VIH los ensayos de formación de nanoconjugados con ARNpi y los compuestos fueron realizados en el laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital Gregorio Marañón de Madrid dirigido por la Dra. Mª Ángeles Muñoz Fernández. Para dichos estudios se eligieron los dendrones catiónicos de tercera generación con punto focal MeCOS- (**15Cl**) y HS- (**25Cl**) por poseer estos un mayor número de cargas, mientras que las MNPs al poseer una gran cantidad de cargas solo se seleccionaron las AuNPs (**68Cl**) y AgNPs (**71Cl**) funcionalizadas con dendrones de primera generación y que habían dado los mejores resultados en los ensayos de toxicidad.

El Nef es un gen auxiliar del VIH, su función es esencial para que se produzca una infectividad y patogenicidad viral óptima *in vitro* e *in vivo*.[481] La base molecular de la actividad de Nef se basa en su capacidad para interactuar con la maquinaria del hospedador a través de varios dominios funcionales distribuidos a lo largo de su estructura primaria. La intervención en la expresión de Nef por medio del uso de ARNpi podría ser una nueva estrategia para complementar la actual terapia anti-VIH y poder mejorar los resultados del tratamiento. En este sentido, como se ha mencionado anteriormente (3.1.2a) nuestros

compuestos son sistemas potencialmente útiles para el transporte de material genético frente al VIH.

Se realizaron ensayos para validar la función de los dendrones de tercera generación (**15Cl** y **25Cl**) y las MNPs funcionalizadas con dendrones de primera generación (**68Cl** y **71Cl**) formando nanoconjugados con el ARNpi Nef (42 cargas negativas) y el ARNpi de secuencia aleatoria (random). Además, se han realizados estudios preliminares de su uso como terapia para restringir la replicación viral en CMSP.

Ensayos de electroforesis en gel de agarosa

Los ensayos de electroforesis se realizaron a varias ratios de carga ARNpi/compuesto, observándose la retención del ARNpi a las 2 horas de incubación a ratio 1:2 y una retención casi total a ratio 1:4 tanto para los dendrones (**15Cl** y **25Cl**) como para las MNPs (**68Cl** y **71Cl**) (Fig.3.32a). Pasadas las 24 y 48 horas de incubación se siguió observando una retención del ARNpi por parte de todos los compuestos probados (Fig.3.32b). Un aspecto a destacar es la gran capacidad de retención que presentan los dendrones de tercera generación aquí analizados (**15Cl** y **25Cl**), los cuales forman nanoconjugados a ratios 1:4, valor mucho menor que el observado para dendrones carbosilano catiónicos previamente sintetizados en nuestro grupo de investigación.[482]

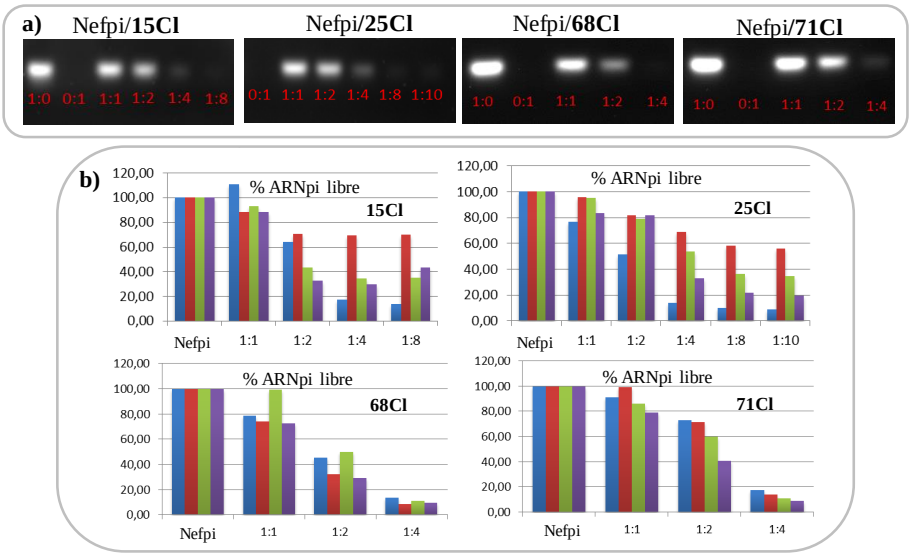


Figura 3.32. a) Electroforesis en gel de agarosa de los nanoconjugados formados con dendrones de tercera generación (Nefpi/**15Cl** y Nefpi/**25Cl**) y con las MNPs funcionalizadas con dendrones de primera generación (Nefpi/**68Cl** y Nefpi/**71Cl**) para distintos ratio de carga negativa/positiva a las 48 horas de incubación. b) Porcentaje de liberación de Nefpi a las 2, 24, 48 y 120 horas

Ensayos de estabilidad de los nanoconjugados frente a heparina

Se realizaron ensayos de electroforesis para determinar la estabilidad de los nanoconjugados frente a heparina. Éste ensayo permitiría obtener información preliminar sobre la liberación del Nefpi. Los resultados obtenidos demostraron que existe una liberación del Nefpi por acción de la heparina para todos los nanoconjugados tras 2h de incubación (Fig.3.33).

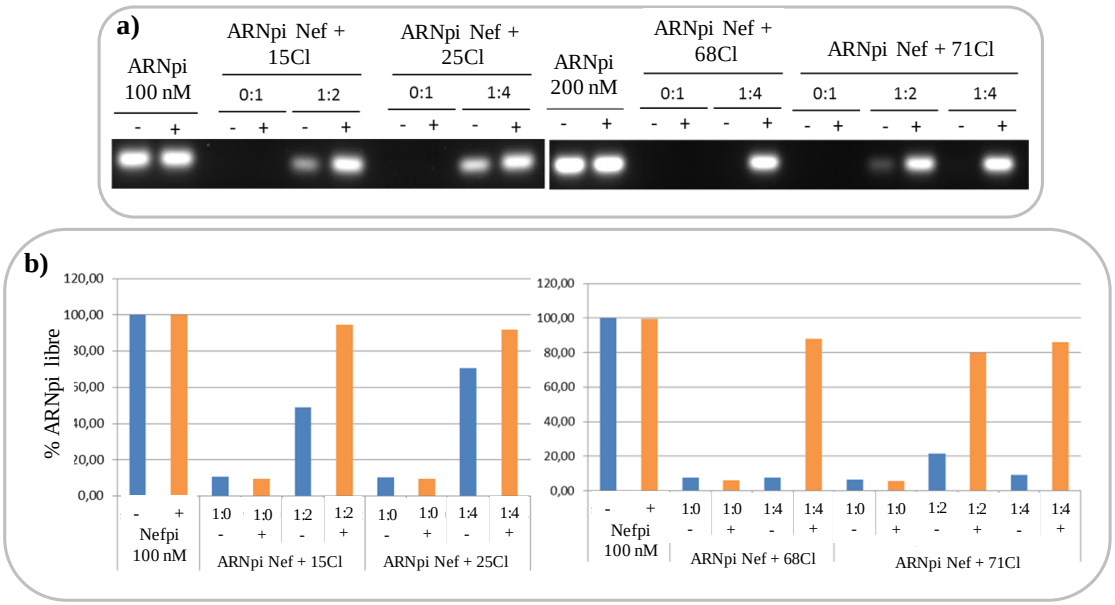


Figura 3.33. a) Electroforesis en gel para los nanoconjugados formados con dendrones de tercera generación (Nefpi/**15Cl** y Nefpi/**25Cl**) y con las MNPs funcionalizadas con dendrones de primera generación (Nefpi/**68Cl** y Nefpi/**71Cl**) en ausencia o presencia de heparina. b) Porcentaje de Nefpi libre en presencia (+) o no (-) de heparina para los diferentes nanoconjugados

Biocompatibilidad y ensayo funcional de los nanoconjugados

Una vez realizados los estudios de biocompatibilidad para los compuestos libres y habiendo comprobado la capacidad que poseen para formar nanoconjugados con Nefpi, es necesario conocer la toxicidad de los sistemas formados.

Para ello, se realizaron ensayos de toxicidad en CMSP para los nanoconjugados formados con los dendrones de tercera generación (Nefpi/**15Cl** y Nefpi/**25Cl**) y con las MNPs funcionalizadas con dendrones de primera generación (Nefpi/**68Cl** y Nefpi/**71Cl**) a ratios de carga adecuado, por lo que se seleccionaron las ratios: 1:4 para Nefpi/**15Cl**, Nefpi/**25Cl** y Nefpi/**68Cl** y 1:2 para Nefpi/**71Cl**. Los resultados obtenidos muestran que las

nanoconjugados formados con los compuestos **25Cl**, **68Cl** y **71Cl** no eran tóxicos a las ratios utilizadas. Sin embargo, el nanoconjugado formado con el dendrón de tercera generación con punto focal MeCOS- (**15Cl**) resultó ser tóxico, por lo cual se descartó para posteriores ensayos (Fig.3.34). Este hecho demuestra que pequeños cambios en la estructura del compuesto pueden producir cambios significativos en la toxicidad del mismo.

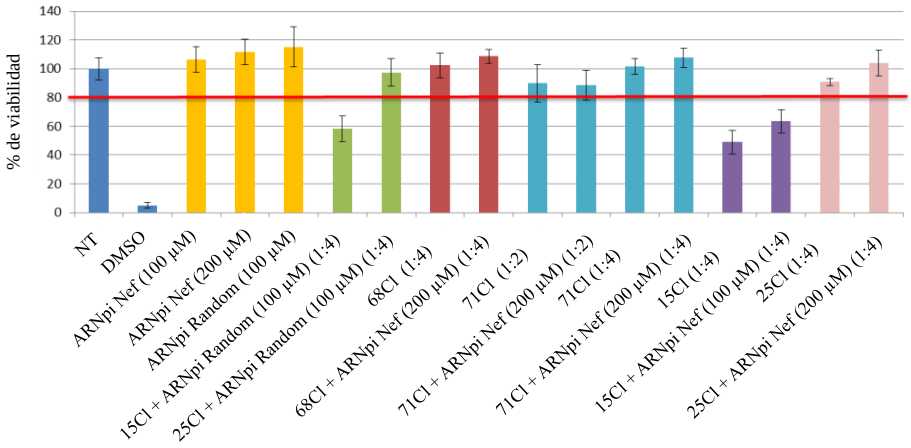


Figura 3.34. Ensayo MTT en CMSP tratadas durante 48 horas con los nanoconjugados formados con dendrones de tercera generación (**15Cl** y **25Cl**) y con las MNPs funcionalizadas con dendrones de primera generación (**68Cl** y **71Cl**). Los resultados mostrados son la media ± DE de tres experimentos independientes

Una vez comprobada la biocompatibilidad de los nanoconjugados, el siguiente paso es evaluar la capacidad que poseen dichos sistemas de inhibir la infección por el VIH. Para ello, se eligieron las MNPs (**68Cl** y **71C**l) y el dendrón de tercera generación (**25Cl**). En este ensayo, los nanoconjugados Nefpi/**25Cl**, Nefpi/**68Cl** y Nefpi/**71Cl**, se incubaron junto con CMSP activadas e infectadas con el aislado viral X4 VIH-$1_{NL-4.3}$ durante 48 horas para comprobar su capacidad de inhibición. La capacidad de inhibición se determinó realizando un inmunoensayo modificado en el que se sensibiliza una superficie con un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína p24 la cual posteriormente se cuantifica colorimétricamente. Esto permite relacionar el porcentaje de inhibición con la cantidad de proteína p24. Así, cuanta más proteína se una a dichos anticuerpos, mayor será el grado de infección y en consecuencia, menor será la capacidad de inhibición de los nanoconjugados.[483]

Como control de infección se utilizaron células infectadas (NT), así como también células tratadas solo con ARNpi para comprobar si estos por si solos eran capaces de inhibir la infección del VIH (Fig.3.35).

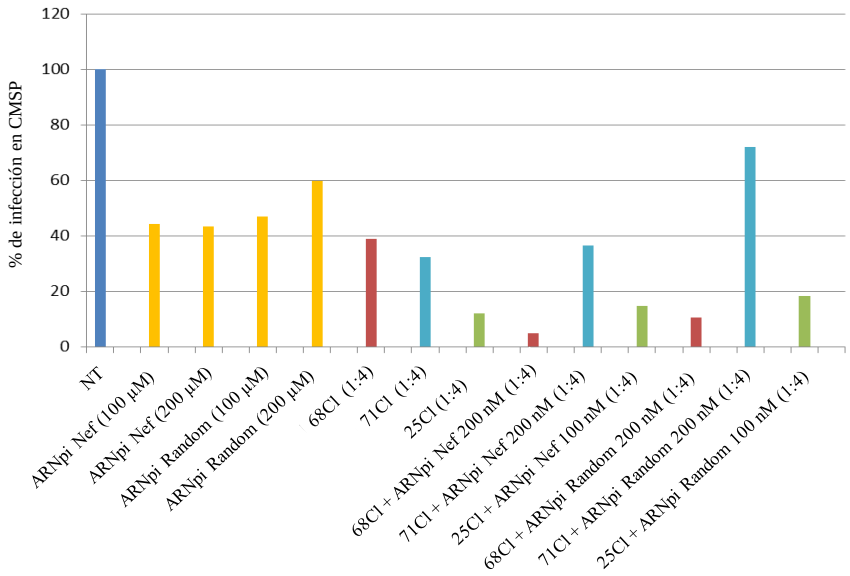


Figura 3.35. Inhibición de la infección por VIH utilizando los nanoconjugados formados con los compuestos **25Cl**, **68Cl** y **71Cl**

Se pudo observar que los ARNpi por sí solos eran capaces de inhibir la infección en un 60%. Nuestros compuestos (**25Cl**, **68Cl** y **71Cl**) por sí solos, también son capaces de inhibir la infección más de un 80% en el caso del dendrón de tercera generación (**25Cl**), un 60% en el caso de la AuNPs (**68Cl**) y un 70% en el caso de la AgNPs (**71Cl**). No obstante, la inhibición aumenta hasta casi un 90% en el caso de los nanoconjugados formados con el ARNpi.

3.3.4. Aplicación AuNPs en separación de proteínas

Los estudios de aplicación de los compuestos en separación de proteínas se realizaron en el Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá con la colaboración de las Dras. María Luisa Marina y Concepción García.

Para este ensayo se eligieron las AuNPs aniónicas funcionalizadas por el método directo con grupos periféricos sulfonato ($-SO_3^-$) (**77b**-**79**) y carboxilato (CO_2^-) (**82**-**84**). Se realizaron ensayos para estudiar la interacción de estos sistemas con proteínas patrón: seroalbúmina bovina, mioglobina y lisozima (BSA, MYO, LYZ por sus siglas en inglés bovine serum albumin, myoglobin, lysozyme, respectivamente) los cuales abarcan un amplio rango de pesos moleculares y puntos isoeléctricos. También se realizaron ensayos preliminares con estos sistemas para extracción de proteínas de muestras vegetales (semilla de melocotón).

Los estudios de las interacciones proteína-AuNPs se realizaron mediante la monitorización de la señal de fluorescencia intrínseca de las proteínas (debida principalmente a la presencia de residuos de triptófano (Trp)) y por medio de la separación de proteínas mediante la técnica de electroforesis en gel utilizando como patrón una mezcla de proteínas comercial que abarca pesos moleculares de 15-250 kDa.

3.3.4.a. Proteína seroalbúmina bovina (BSA)

En los ensayos de fluorescencia realizados se pudo observar una disminución de la intensidad de la fluorescencia intrínseca de la BSA a medida que aumentaba la concentración de la AuNPs a todos los pH empleados. Estos resultados indican que pueden darse cambios conformacionales, unión de ligandos o incluso asociación de proteínas en disolución.[484]

Para las AuNPs con grupos sulfonato (**77b**-**79**) se observó que a pH ácido y neutro el descenso de la fluorescencia es mucho mayor que a pH básico. De estos sistemas la AuNPs (**78**) funcionalizada con dendrones de segunda generación mostró la mayor extinción en comparación con las AuNPs (**77b** y **79**) funcionalizados con dendrones de primera y tercera generación los cuales presentaron valores similares. Esta disminución podría deberse al cambio de conformación que se da en la proteína al pasar de un pH ácido a uno básico en el cual los residuos de Trp no estarían tan accesibles, y por lo tanto, la interacción con la AuNPs no es tan efectiva como sucede a pH ácido (Fig.3.36).[485]

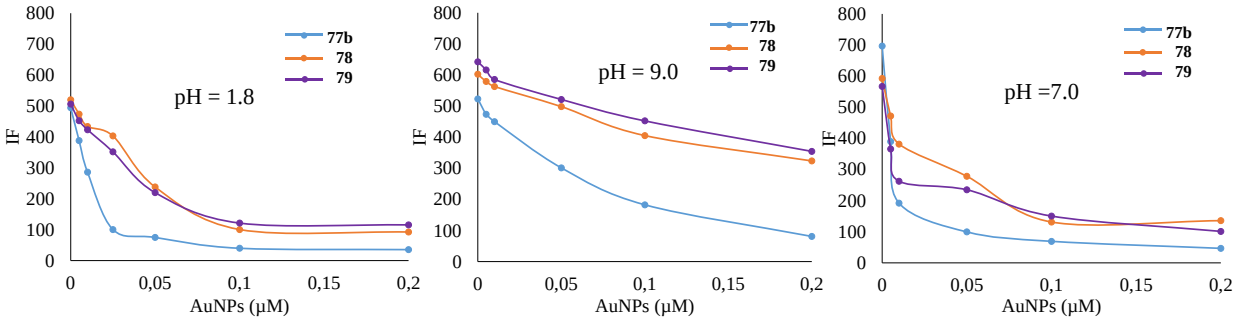


Figura 3.36. Variación en la intensidad de fluorescencia de BSA al añadir concentraciones crecientes de AuNPs (**77b**-**79**) a diferentes pH

Por otro lado, para las AuNPs con grupos carboxilato (**82**-**84**) se realizaron los ensayos a pH ácido y básico, observándose el mismo comportamiento que el observado para las AuNPs con grupos sulfonato (**77b**-**79**) (Fig.3.37a). No obstante, a pH ácido los grupos carboxilato se protonan y se observa la precipitación de las AuNPs, comportamiento más notorio en

AuNPs de segunda y tercera generación (**83** y **84**). Éste comportamiento se observó en todos los ensayos realizados (Fig.3.37b).

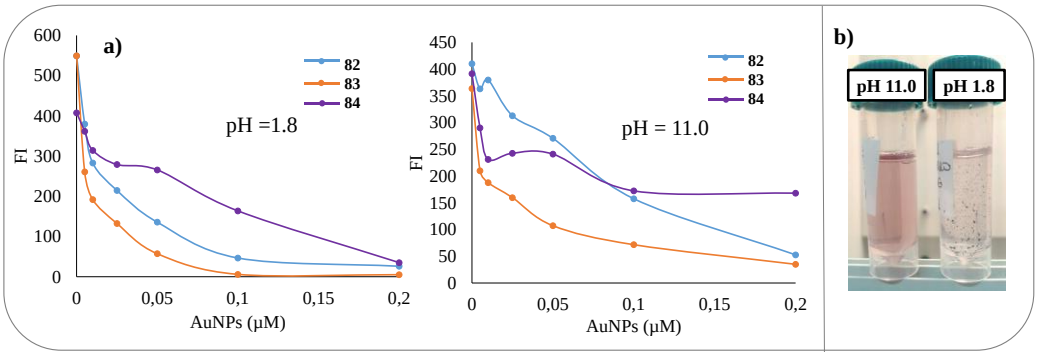


Figura 3.37. a) Variación en la intensidad de fluorescencia de BSA al añadir concentraciones crecientes de AuNPs (**82-84**) a pH ácido y básico y b) Soluciones AuNPs-proteína a pH básico y ácido

Para estudiar la interacción proteína-AuNPs también se realizaron ensayos de electroforesis en gel con los sistemas que poseen grupos sulfonato (**77b-79**). Los resultados obtenidos muestran que a medida que aumenta la relación AuNPs:proteína, la banda del BSA es intensa lo que indica la preconcentración de la proteína a mayor concentración de AuNPs utilizada (Fig.3.38).

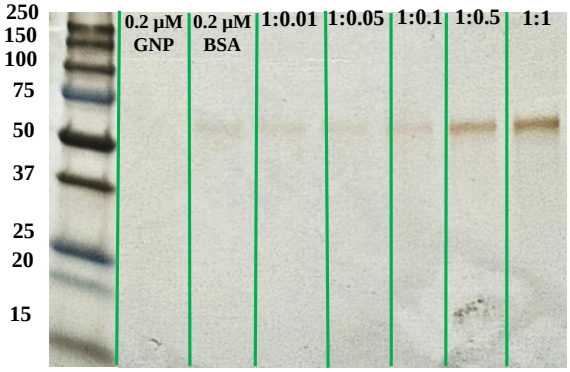


Figura 3.38. Perfil electroforético del BSA en presencia de concentraciones crecientes de AuNPs con grupos sulfonato (**77b-79**)

3.3.4.b. Proteína lisozima (LYZ)

En el caso de la LYZ, se observó el mismo comportamiento que el descrito para la BSA. Por tanto, se observó una disminución de la fluorescencia intrínseca de la LYZ con todas las AuNPs y a todos los pH. Éste comportamiento se observó incluso a concentraciones muy pequeñas de AuNPs (Fig.3.39).

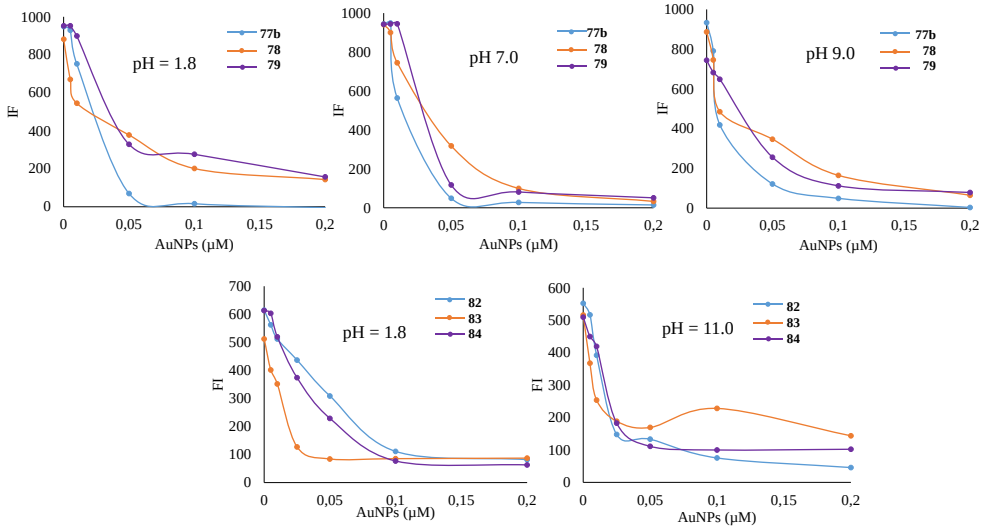


Figura 3.39. Variación en la intensidad de fluorescencia de LYZ al añadir concentraciones crecientes de AuNPs (**77b-79** y **82-84**) a diferentes pH

El descenso de la fluorescencia en este caso es mucho más acusado que en el caso de la BSA, y se da de forma similar a todos lo pH utilizados. Esto puede deberse a que la LYZ es de pequeño tamaño y presenta una carga neta positiva a todos los pH, por lo que posiblemente la interacción electrostática sea mayor para esta proteína incluso a pH básico.

3.3.4.c. Proteína mioglobina (MYO)

Para la MYO a diferencia de LYZ y BSA, solo hubo interacción a pH ácido (Fig.3.40). Esto puede deberse a que a pH neutro y básico la MYO presenta carga neta cero, por ello la interacción que se produce es prácticamente nula. Esto hace pensar que la interacción entre las AuNPs y la proteína se debe específicamente a interacciones electrostáticas.

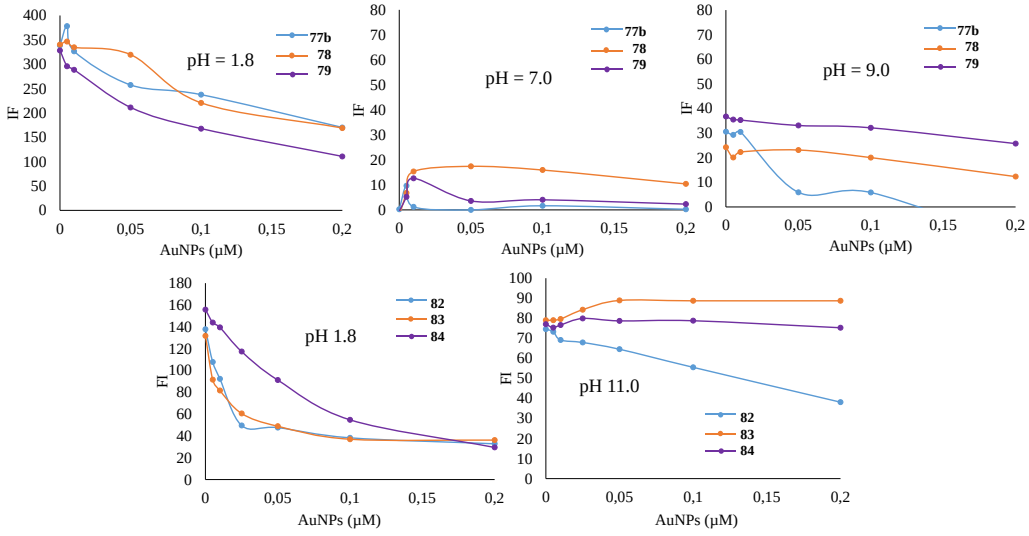


Figura 3.40. Variación en la intensidad de fluorescencia de MYO al añadir concentraciones crecientes de AuNPs (**77b-79** y **82-84**) a diferentes pH

3.3.4.d. Extracción de proteínas procedente de semillas de melocotón

Las AuNPs con grupos sulfonato (**77b-79**) se utilizaron para la extracción de proteínas de muestras reales. Para ello, se procedió a la extracción de proteínas procedentes de la semilla de melocotón utilizando pH ácido y neutro, ya que a estos pH se observó la mayor extinción de la fluorescencia en las proteínas patrón.

Se realizaron ensayos de electroforesis en gel a las muestras obtenidas por extracción utilizando las AuNPs (**77b-79**) y se compararon con los obtenidos por métodos de extracción convencional.[486] Los resultados confirman la interacción de las proteínas contenidas en las semillas de melocotón con las AuNPs, por lo cual estos sistemas podrían ser utilizados para la extracción de proteínas como una alternativa a la extracción convencional con un menor uso de disolventes (Fig.3.41).

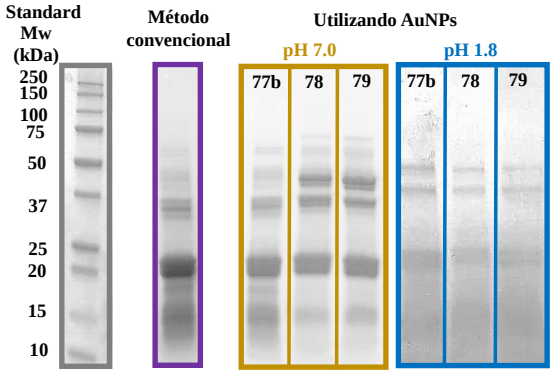


Figura 3.41. Electroforesis de muestras extraídas por el método convencional y utilizando AuNPs (**77b-79**)

3.4. CONCLUSIONES

Dado lo extenso de este Capítulo las conclusiones más relevantes se detallan por apartados.

3.4.1. Biocompatibilidad de sistemas catiónicos con células sanguíneas

Los dendrones mostraron una clara tendencia de aumento de la toxicidad al aumentar la generación dendrítica. Este comportamiento no se mantiene para las AuNPs (**68Cl-70Cl**) funcionalizadas con dichos sistemas. Esto último podría ser debido a que, para estos sistemas, además de la generación dendrítica, también influye el tamaño y exposición del núcleo metálico.

3.4.2. Capacidad antibacteriana

Los estudios antibacterianos muestran que de los sistemas obtenidos los dendrones libres (**23Cl-25Cl**) presentaron una mayor actividad que las correspondientes AuNPs (**68Cl-70Cl**) y AgNPs (**71Cl-73Cl**). Éste comportamiento puede estar relacionado con una mayor rigidez de las MNPs debido a la presencia del núcleo metálico.

De los dendrones, el sistema de segunda generación (**24Cl**) mostró la mejor actividad. Éste comportamiento se ha observado anteriormente en otros sistemas similares sintetizados en nuestro grupo de investigación, relacionado con un adecuado balance hidrofobia/hidrofilia. En cuanto a las MNPs, las AgNPs funcionalizadas con dendrones de primera generación (**71Cl**) mostraron una excelente capacidad antibacteriana, observándose incluso valores mejorados con respecto al dendrón libre. Esto probablemente se deba a la presencia del núcleo metálico de plata, que puede estar liberando iones aumentando la capacidad bactericida del sistema. Para las AgNPs de segunda y tercera generación, no se observa este comportamiento probablemente por el mayor tamaño de los dendrones en la superficie, protegiendo el núcleo metálico y evitando la liberación de iones plata.

3.4.3. Capacidad anticancerígena

En los resultados obtenidos de actividad anticancerígena se observó para los dendrones una clara tendencia de aumento de actividad al aumentar la generación dendrítica de los sistemas.

Las mejores actividades anticancerígenas se observaron para la línea celular HeLa, donde la mejor actividad la presentó el dendrón de tercera generación con punto focal -SH (**25Cl**). No obstante, en estos ensayos se detectó un aumento de la actividad por la dendronización de NPsM, pues se observó un incremento significativo de la actividad para las AuNPs (**68Cl-69Cl**) funcionalizadas con dendrones de primera y segunda generación en comparación con los dendrones libres.

3.4.4. Capacidad antiviral

Los estudios de biocompatibilidad muestran para los dendrones un aumento significativo de esta al aumentar la generación dendrítica. En cuanto a las AuNPs, los sistemas funcionalizados por el método de intercambio (**74**-**76**) presentaron una mayor toxicidad que los obtenidos por el método directo (**77b**-**79**). Por tanto, la presencia de ligandos dodecanotiolatos aumenta la toxicidad.

En cuanto a la capacidad antiviral, los dendrones de segunda y tercera generación (**42**-**43**) fueron capaces de inhibir el aislado viral X4-VIH-$1_{NL4.3}$, mientras que para el R5-VIH_{NLAD8} solo fue activo el dendrón de tercera generación (**43**). Por otro lado, las AuNPs sintetizadas por el método directo (**77b**-**79**) poseían mayor actividad que las obtenidas por el método de intercambio (**74**-**76**).

Al comparar las actividades entre las AuNPs y los dendrones libres, se observa claramente que las AuNPs dendronizadas (**77b**-**79**) presentan una mayor capacidad de inhibición frente al VIH que los dendrones libres (**42**-**44**). Cabe destacar que las AuNPs (**77b**-**79**) presentaron buenas actividades en ambos aislados virales, mostrando que el proceso de dendronización estaría mejorando la actividad de los sistemas dendríticos.

3.4.5. Transporte de ácidos nucleicos

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados para comprobar la formación de nanoconjugados de nuestros sistemas con diferentes ARNpi, muestran que podrían ser agentes potenciales en el transporte de material genético para la terapia génica del cáncer y del VIH.

Para el ARNpi Bcl-xL, el dendrón de primera generación (**23Cl**) presentó los mayores valores de ratio carga en la formación de los nanoconjugados. No obstante, los dendrones de segunda y tercera generación (**24Cl**-**25Cl**) forman nanoconjugados estables a ratios de carga mucho menores que los observados en sistemas de este tipo previamente sintetizados en nuestro grupo de investigación. Esto podría indicar una influencia positiva del punto focal -SH. Las MNPs por su parte, formaron nanoconjugados a ratios menores que los observados para los dendrones libres, como consecuencia de la gran concentración de carga y tamaño.

Los estudios de estabilidad con heparina, muestran que el ARNpi Bcl-xL puede ser liberado del nanoconjugado, necesitándose mayores concentraciones de heparina en el caso de las AuNPs (**68Cl**-**73Cl**) que en los dendrones libres (**23Cl**-**25Cl**). Otro resultado relevante fue la capacidad que mostraron nuestros sistemas de proteger el ARNpi Bcl-xL frente a la degradación por RNasa.

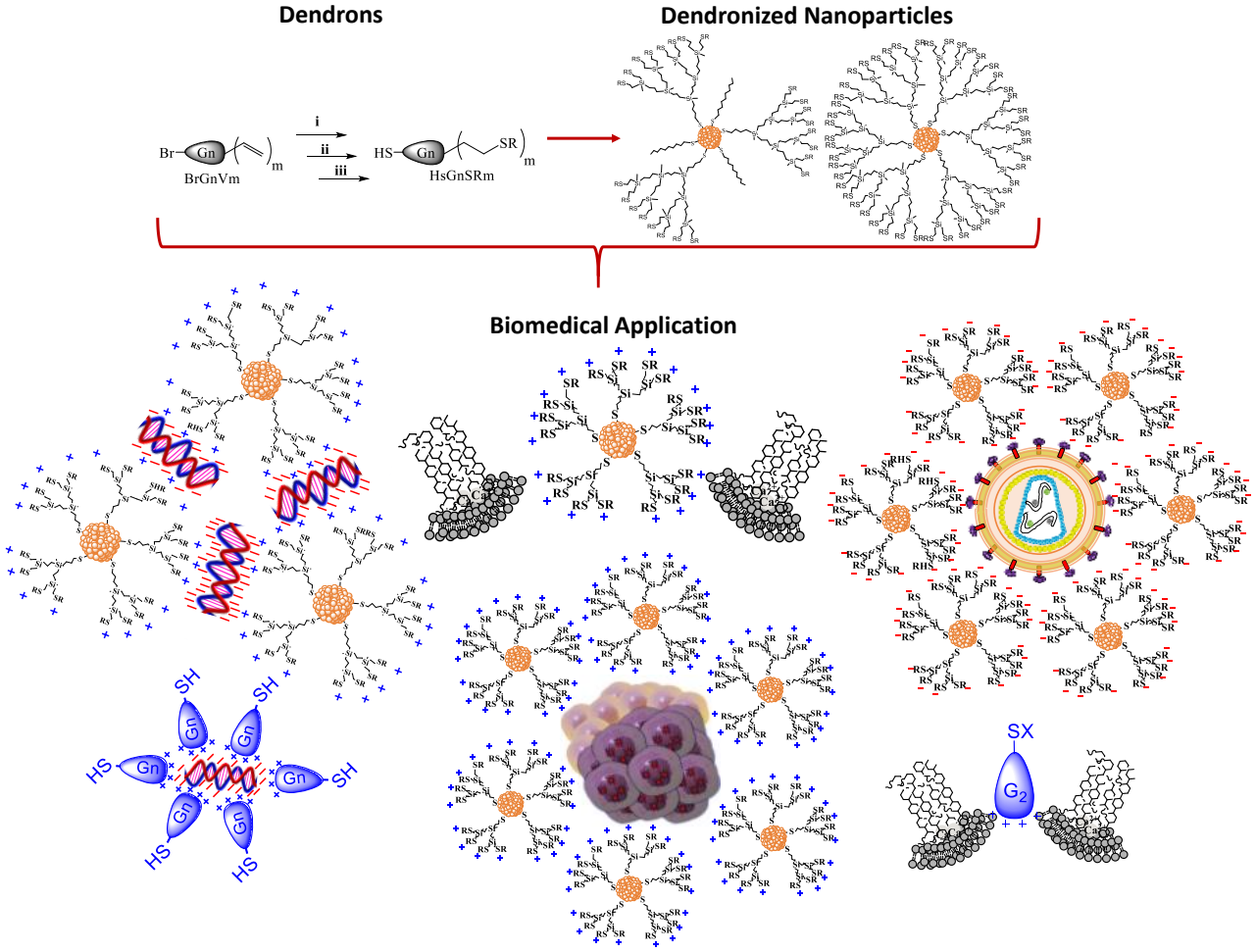
En cuanto al ARNpi Nef, se utilizaron los dendrones de tercera generación (**15Cl** y **25Cl**) y las MNPs funcionalizadas con dendrones de primera generación **(68Cl** y **71Cl**), observándose la formación de los conjugados a ratios de carga similares que los obtenidos en el caso del ARNpi Bcl-xL. Los nanoconjugados obtenidos muestran biocompatibilidades aceptables a las concentraciones utilizadas. Nuestros compuestos (**25Cl**, **68Cl** y **71Cl**) por si solos mostraron ser capaces de inhibir la infección del VIH. No obstante, la inhibición aumenta hasta casi un 90% en el caso de los nanoconjugados demostrando su condición de buenos agentes de transporte.

3.4.6. Separación de proteínas

Las AuNPs con grupos aniónicos sulfonato (**77b**-**79**) y carboxilato (**80**-**82**) fueron capaces de interaccionar con diferentes proteínas. De estos sistemas la AuNPs funcionalizada con dendrones de segunda generación (**78** y **83**) fueron los que mostraron las mejores interacciones.

Se realizó un ensayo preliminar en la separación de proteínas procedentes de semilla de melocotón con las AuNPs con grupos sulfonato (**77b**-**78**), observándose la interacción de las proteínas contenidas en las semillas de melocotón con las AuNPs por electroforesis en gel. Los resultados obtenidos convierten a estos sistemas en compuestos potenciales para la extracción de proteínas con un menor uso de disolventes que en el caso de la extracción convencional, lo que se traduce en un menor coste y menor daño al medio ambiente.

Chapter IV



Experimental section

4.1. EXPERIMENTAL MATERIAL AND METHODS

4.1.1. General working conditions

All the reactions were carried out under inert atmosphere using Schlenck techniques (argon type UN-45, from Air Liquid Company, with quantities of O_2 y $H_2O \leq 3$ ppm). Solvents were collected from drying system MBRAUN Solvent Purification System (MB-SPS) or used as received.

Regarding click thiol-ene reactions, the radiation was accomplished with a HPK 125W Mercury Lamps from Heraeus Noblelight, with a maximum emission of $\lambda = 365$ nm. The solvent used was deoxygenated in all cases, and 2, 2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA) was used as photoinitiator. For metal nanoparticles synthesis, water was deionized and deoxygenated. Deprotections of focal point of dendrons to form -SH group were performed just before use in MNPs synthesis.

4.1.2. Materials

Compounds MeC(O)SH, MeC(O)SK, $HSCH_2CO_2Me$, $HS(CH_2)_3SO_3Na$, $HCO_2CH(SH)CH_2CO_2H$ (HS-*Suc*), $HS(CH_2)_2NMe_2 \cdot HCl$, 2,2'-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DMPA), HCl (4 M in dioxane), HCl (2 M in ether), $NaHCO_3$, K_2CO_3, $AgNO_3$, $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, Amberlite IRA-402 Cl-form ion-exchange resin, were obtained from commercial sources. Compounds BrG_nV_m (n = 1, m = 2; n = 2, m = 4; n = 3, m = 8; n = 4, m = 16) were synthesized as published.[122]

4.1.3. Instrumental Techniques

4.1.3a. Elemental Analysis

Quantitative analyses of C, H, N y S were performed in a micro analyzer LECO CHNS-932, in Alcala University. Data are given in percentage (%).

4.1.3b. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

NMR spectra were recorded on a Varian Unity VXR-300 (300.13 (^{1}H), 75.47 (^{13}C) MHz) or on a Bruker AV400 (400.13 (^{1}H), 100.60 (^{13}C), 79.49 (^{29}Si), 40.56 (^{15}N) MHz). Chemical shifts (δ) are given in ppm. ^{1}H and ^{13}C resonances were measured relative to solvent peaks considering tetramethylsilane TMS = 0 ppm as reference, meanwhile ^{15}N and ^{29}Si resonances were measured relative to external standard liquid NH_3 and TMS, respectively. When necessary, assignment of resonances was done from HSQC, HMBC, COSY, TOCSY and NOESY 1D and 2D NMR experiments.

4.1.3c. UV-Vis Spectroscopy

The UV-visible absorption measurements were performed at Alcalá University using a Perkin-Elmer Lambda 18 UV-Vis spectrophotometer. The spectra were recorded by measuring dilute samples in a quartz cell with a path length of 1 cm. Data are giving in nanometer (nm).

4.1.3d. Mass Spectrometry

Mass Spectra were performed using ESI-TOF or APCI-TOF techniques from a Bruker Ultraflex III and Agilent 6210 TOF LC/MS. Data are given in m/z.

4.1.3e. Thermogravimetric Analysis (TGA)

The thermogravimetric analyses were performed using a Q500 of TGA instruments. Dry and pure samples (2 - 10 mg) were placed into platinum sample holder under nitrogen atmosphere. The measurements were recorded from 25 - 1000 ºC, with heating rate of 10 ºC/min.

4.1.3f. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy were performed at Alcalá University (Microscopy Service) using a ZEISS EM10 TEM with 30 μm lens and a side-mounted 1K CCD Camera, operating at an acceleration voltage of 100 kV and with 0.2 nm resolution. The samples were prepared by dropping a dilute solution containing the nanoparticles on a carbon-coated

copper grid (400 mesh). The samples were dried before observation and measurement (particles size measurements were performed using Image J program).

4.1.3g. Zeta Potential

The zeta-potential of compounds were measured using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) at 25 ºC in a disposable Malvern plastic cuvette. The solutions were prepared by solving 1 mg of each compound in 1 mL of distillate water, which was previously filtered through 0.22 μm syringe filter.

4.1.3h. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)

XPS analyses were performed using a K-Alpha (Thermo Scientific) system, with monochromatic AlKα (1486.68 eV) X-ray source with a spot size of 200 μm and 50.4 W (12 kV × 4.2 mA) power. Dendronized nanoparticle solutions were drop-cast onto aluminium foil for analysis. High resolution and survey spectra were collected at three positions for each sample. The XPS spectra were background subtracted using the Shirley method and deconvoluted using a mixed Gaussian/Lorentzian peak shape with XPS Peak software (version 4.1).

4.1.3i. Electronic paramagnetic resonance (EPR)

EPR spectra were recorded by means of an EMX-Bruker spectrometer operating at X band (9.5 GHz) and interfaced with a PC (software from Bruker for handling the EPR spectra). The temperature was controlled with a Bruker ST3000 variable-temperature assembly cooled with liquid nitrogen. For the EPR analysis, the dendronized nanoparticles were dissolved in Millipore doubly distilled water resulting in a final external sulfonate groups concentration of 0.1 M. $Cu(NO_3)_2 \cdot 2.5\ H_2O$ (Sigma- Aldrich, ACS reagent 98 %) was also dissolved in Millipore doubly distilled water to obtain a final concentration, in the mixture with the dendronized nanoparticles, from 0.1 to 5 equivalents. The samples were left equilibrating from 1 to 24 h (we verified that the spectra did not change in this time range). The EPR tubes have a constant internal diameter of 2 mm and were filled with 50 μL of solution. The EPR spectra were recorded for the different samples at 298 K and 150 K. In all

cases, we controlled the reproducibility of the results by repeating the EPR analysis (three times) in the same experimental conditions for each sample.

4.1.3j. Dynamic light scattering (DLS)

Batch mode hydrodynamic size (diameter) measurements were performed on a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) equipped with Non-Invasive Backscatter optics (NBS). Samples were prepared at 1 mg/mL concentration in filtered MiLiQ water. Before measurements equilibration (typically 5 minutes) to 25°C were performed and then minimum of three measurements per sample were made.

4.1.3k. Fluorescence Polarization

The fluorescence polarization assays were performed in the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS (Novosibirsk, Russia) using the CLARIOstar microplate reader (BMG LABTECH, Germany) in 96-well microplates with the reduced well area (so-called "half-area" plates) (Costar, US).

4.1.4. Purification Methods

In most cases, neutral intermediates compounds were purified using common techniques like extractions, precipitations, etc. However, when solubility of final compounds and impurities were similar, size exclusion chromatography was used to purify them. In those cases, polystyrene as stationary phase (Bio-Beads SX-1 of Bio-Rad) and THF as eluent were used.

For ionic compounds, soluble in water, different methods were used to purify them.

4.1.4a. Nanofiltration systems

The purification of compounds using nanofiltration was performed with an Amicon system by Millipore. Cellulose membranes of different pore sizes depending of the compound (molecular weight cut-off (MWCO) of 500, 1000 and 3000 Da) were used. Thereby, crude reaction dissolved in water was passed through membranes allowing to separate impurities (filtrate) from pure compound.

4.1.4b. Dialysis systems

In the case of purification of nanoparticles by dialysis, Zellutrans Roth system was used. In this cases, cellulose membrane of MWCO 10 kDa was used. Thereby, the reaction crude dissolved in water was placed inside of membrane and put in to water. The water outside of membrane was changed as much as necessary (usually 3 times per day during one week).

4.1.5. Biomedical assays

The biomedical assays here in were performed by the author of this thesis and in some collaborations with different research groups.

The antibacterial activities of compounds synthetized in this thesis were performed in two different research groups: General Department of Biophysics of Lodz University with the collaboration of Prof. Maria Bryszewska and Department of Biomedicine and Biotechnology of Alcalá University in Drs. José Luis Copa Patiño and Juan Soliveri de Carranza group.

Anticancer assays of compounds were performed by the author of this thesis in Unit Cell Cultures of Alcalá University.

Anti-VIH assays were performed in the Laboratory of Molecular Immunology of Hospital General Gregorio Marañón headed by Dr. Mª Ángeles Muñoz Fernández.

Regarding biophysical assays, some of them were performed by the author of this thesis in a stage realized in a group of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine (ICBFM) of Siberian Branch Russian Academy Sciences in Novosibirsk (Russia) leaded by Prof. Alia Venyaminra. The rest of biophysical assays were performed with collaboration of Prof. Maria Bryszewska group in the General Department of Biophysics of Lodz University (Poland).

4.1.5a. Antibacterial activity

Antibacterial assays were performed under sterile conditions in a biological safety cabinet Telstar Bio II-A with laminar flow.

The determination of the antibacterial capacity was performed using the activity assay microdilution M7-A7 CLSI (stands for Clinical and Laboratory Standard Institute), whereas antifungic activity was performed using the method of activity broth dilution CLSI M27A3.[466,467] Antimicrobial activity was assayed against four gram positive, two gram-negative bacterial strains and two strains of yeasts (Table 4.1).

Table 4.1. Types of bacteria and yeast used

	Name	Strain	Description
Gram-(+)	*Staphylococcus aureus S*	ATCC 6538P	Susceptible strain
	Staphylococcus aureus R	ZMFKSK	Multiresistant strain
	Staphylococcus haemolyticus R	ZMF SV212	Multiresistant strain
	Enterobacter fecalis	ZMF BD156	Strain isolated from clinical specimen
Gram-(-)	*Escherichia coli*	ATCC 8739	Susceptible strain
	Pseudomonas aeuruginosa	ATCC 27853	Susceptible strain
Yeast	*Candida albicans*	ATCC 10231	Yeast commonly used for such testing
	Candida glabrata	ZMF40	Yeast isolated from clinical specimen

Analysed compounds were suspended in small amount of demineralized sterile water and then in Mueller Hinton Broth (BioMaxime) for testing of bacteria and in RPMI-1640 Medium (Sigma) for yeasts. Serial two-fold dilutions were prepared in a microtiter tray in range 500-3.9 mg/L.

Test strains were inoculated to each well of microtiter plate at concentration of 10^6 CFU of bacteria and 10^4 CFU of yeasts per 1 mL. After 24 hour of incubation at 37°C for bacteria and 48 hours at 25ºC for yeasts, increase of turbidity in 595 nm was measured with microplate reader (MR 680 Bio-Rad). The MIC (minimal inhibitory concentration) values were the lowest concentrations of the investigated compounds with no measurable optical density increase. MBC (minimal bactericidal concentration) was the lowest concentration of the compound that killed all bacteria/yeast, so there was no growth in subculture on the surface of rich and proper for each organism agar medium in Petri dish after 24 or 28 hours of incubation in appropriate temperature.

4.1.5b. Anticancer activity

The human cervical carcinoma cell line (HeLa) and human colon adenocarcinoma cell line (HT-29) utilized in this assay were donated by Unit Cell Cultures of Alcalá University.

Cells were grown routinely in DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B (all from Sigma-Aldrich) at 37ºC and 5% CO_2. Cells were seeded in 96-well plates (Nunclon Delta Surface, Thermo Fischer Scientific) as monolayers (approximately 5×10^3) and grown for 24 h in complete medium (90 µL).

Solutions of compounds were prepared by diluting a freshly prepared stock solution (in water) of the corresponding compound in aqueous medium (DMEM). Afterward, the intermediate dilutions of the compounds were serially diluted to the appropriate concentration (ranging from 0 to 100 µM) and the cells were incubated for another 24 h.

Cytotoxicity was determined using the MTT assay (MTT 3-(4,5dimethyl 2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide). After incubation, MTT (5.0 mg/mL solution) was added to the cells and the plates were incubated for a further 3.5 h. Then the culture medium was removed and the purple formazan crystals formed by the mitochondrial dehydrogenase and reductase activity of vital cells were dissolved in DMSO. The optical density, directly proportional to the number of surviving cells, was quantified at 570 nm (background correction at 690 nm) using a multiwell plate reader and the fraction of surviving cells was calculated from the absorbance of untreated control cells.

The IC_{50} value indicates the concentration needed to inhibit a biological function of the cells by half and is presented as a mean (±SD) from three independent experiments, each comprising three microcultures per concentration level.

4.1.5c. Nanoconjugates formation between nucleic acid and dendritic systems

The interactions of our compounds with antiapoptotic Bcl-xL siRNA (formed by strains E5 sense (E5s) and E5 antisense (E5a)) were determinate using agarose gel electrophoresis

and fluorescence assays. In these assays siRNA with and without fluorescein were used (Table 4.2)

Table 4.2. siRNA labelled and not labelled with fluorescein

siRNA	Oligonucleotides	Sequences	Extinction coefficient L/mol.cm
Bcl-xL (E2)	*E5s*	5'-CAG GGA CAG CAU AUC AGA Gtt'3'	218.5 x 10^3
	E5a	5'-C UCU GAU AUG CUG UCC CUGtt 3'	192.8 x 10^3
	*E5s-FAM**	5'-CAG GGA CAG CAU AUC AGA Gtt'3'	218.5 x 10^3

*FAM oligonucleotide fluorescein labelled

Standard solutions

10X TBE buffer solution: for TBE 10X preparation, 108 g of tris-borate, 55 g of H_3BO_3 and 7.4 g of Na_2-EDTA was dissolved in 1 L of water.

1% and 3% agarose gel: to prepare 100 mL of agarose gel 1% or 3%, 1 g or 3 g of agarose was dissolved in 100 mL of TBE 1X (10mL of 10X TBE plus 90 mL of water), the mixture was stored at room temperature for 30 minutes. Afterwards, the solution was heated until all agarose was dissolved, then the solution was boiling for 1 minute, with slow agitation 0.001% of ethidium bromide was added to the solution.

Polyacrylamide precursor gel: to prepare polyacrylamide precursor gel, 2.1 g of N, N'-methylene-bis acrylamide, 75 g of acrylamide and 210 g of urea and 50 mL of TBE 10X was dissolved in 500 mL of water (heated carefully until all urea is dissolved).

$(NH_4)_2S_2O_8$ *10%:* to prepare 10% ammonium persulfate solution, 1 g of ammonium persulfate was dissolved in 10 mL of water (a fresh solution was always used).

Dye XC-BP 0.0025%: to prepare 100 mL of XC-BP dye, 0.25 mg of Xylene Cyanol FF and 0.25 mg of Bromo/phenol blue were dissolved in 100 mL of urea solution (8 M in water).

Double strained siRNA formation

Solutions of 50 µM (PBS 1X) were prepared by the incubation of oligonucleotide E5s (sense) and E5a (antisense) strains at 95ºC for 2 minutes. Afterwards solutions were cooled

down to room temperature. In the case of fluorescein-labelled siRNA (Bcl-xL-FAM), the annealing was performed using fluorescein-labelled oligonucleotide sense (E5s-FAM) and not labelled antisense oligonucleotide (E5a).

Evaluation of formation of dendriplexes through agarose gel electrophoresis

Samples were analysed by agarose gel electrophoresis assay (1% agarose, 0.005% ethidium bromide, 89 mM Tris-borate, pH 8.3, 2 mM Na_2EDTA) in TBE 1x buffer (89 mM Tris-borate, pH 8.3, 2 mM Na_2EDTA) at 12 V/cm using horizontal electrophoresis cell SE-2 (Helicon, Russia). The siRNA can be detected by ethidium bromide absorption in UV-light. The gel was photographed using GI-2 gel documentation system (Helicon, Russia) upon transillumination at 254 nm.

To observe dendriplex formation, ethidium bromide must be added to the solution before the addition of compounds, because after dendriplex formation ethidium bromide cannot intercalate into double strained siRNA.

Sample preparation

Each sample were prepared adding 0.8 µL of Bcl-xL siRNA (40 pmol, 50 µM solution) to PBS 1X (dendrons) or PB 1X (dendronized nanoparticles) (µL of PBS 1x were calculated for obtained samples of 10 µL as total volume), to this mixture 0.8 µL of ethidium bromide (400 pmol, 500 µM) was added and the solution was incubated for 15 minutes. Afterwards, different quantities of compounds were added to allow different charge ratios, sample was incubated for another 15 minutes (control sample of compounds was also prepared). For easy manipulation 2 µL of glycerol was added to each sample.

Fluorescence assays

Sample preparation for determination of optimal charge ratio

Each sample were prepared adding 0.6 µL of Bcl-xL-FAM (30 pmol, 50 µM solution) to 29.4 µL PBS 1X (dendrons) or PB 1X (dendronized nanoparticles). Afterwards, different quantities of dendritics compounds were added to allow different charge ratios, samples were

incubated for 5 minutes in each addition and the fluorescence spectra (500-600 nm) or fluorescence polarization were recorded (control sample of Bcl-xL-FAM was also prepared).

Sample preparation for heparin displacement assay

Each sample were prepared adding 0.6 µL of Bcl-xL-FAM (30 pmol, 50 µM solution) to 29.4 PBS 1X (dendrons) or PB 1X (dendronized nanoparticles). Quantities necessary for total complexation of Bcl-xL-FAM and dendritics compounds were added, and sample was incubated for 10 min. fluorescence intensity spectra (500-600 nm) or fluorescence polarization were measured. Afterwards, heparin was added in concentration range of 1 to 100 mg/L, the sample was incubated for 5 min. and fluorescence intensity spectra (500-600 nm) or fluorescence polarization were recorded each time.

Stability of siRNA degradation in dendriplexes by RNase A

Dendriplexes with double-strand Bcl-xL siRNA were prepared to evaluate how dendritic compounds can protect siRNA from degradation by RNase A. For this purpose, five different samples were prepared with a final volume of 10 µL as follow:

- Bcl-xL siRNA (0.8 µL, 50µM) were added in each Eppendorf.

- Quantity necessary of dendritic compound for total complexation of the siRNA were added in Eppendorf 3, 4 and 5, and the samples were mixed and incubated for 15 min.

- RNase A (1 µL (50 mg/L in water)) were added to Eppendorf 2 and 5 and samples were incubated at 37 ºC for 45 min.

- PBS 1X or PB 1X were added in 5 Eppendorf to obtain 10 µL of total volume samples.

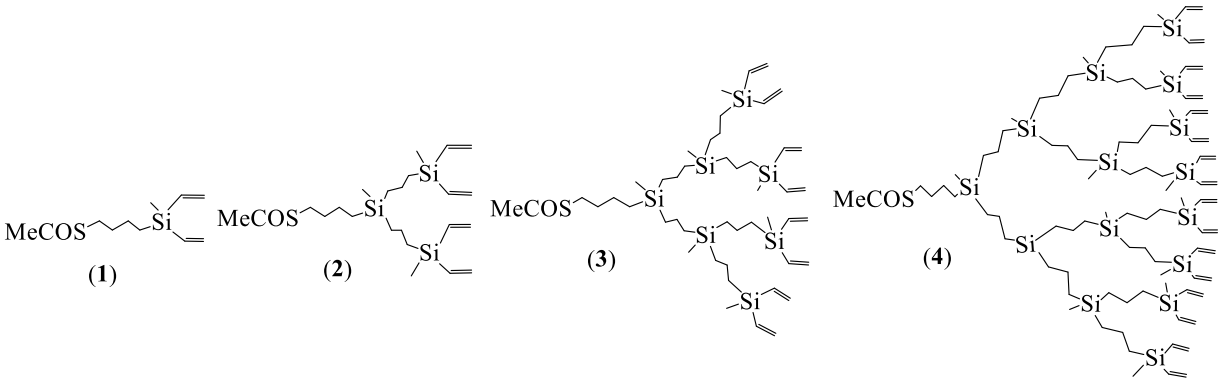
- Sample 2 and 5 were placed in an ice bath, and Ribolok (RNase Inhibitor, 1 µL (10 u/µL)) was added immediately to Eppendorf 2 and 5.

- Heparin (2 µL, 410 mg/L) were added to Eppendorf 4 and 5 and leaved for 2 min.

Afterwards, samples were analysed by agarose gel electrophoresis assay (3% agarose, 0.005% ethidium bromide, 89 mM Tris-borate, pH 8.3, 2 mM Na_2EDTA) in TBE 1x buffer (89 mM Tris-borate, pH 8.3, 2 mM Na_2EDTA) at 12 V/cm using horizontal electrophoresis cell SE-2 (Helicon, Russia).

4.2. SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF COMPOUNDS

4.2.1. Carbosilane dendrons with peripheral vinyl groups



4.2.1a. General protocol

MeCOSH and K_2CO_3 were stirred in acetone (ca. 60 mL) at room temperature for 1 h. Afterward, BrG_nV_m was added and the mixture was stirred at 55°C for 22 h. Volatiles were removed under vacuum and the residue was dissolved in Et_2O. Subsequently brine was added, the organic phase was separate and the aqueous phase was extracted twice with Et_2O. The organic phase was washed with brine and dried over MgSO4. The solution was filtered through celite and the volatiles were removed under vacuum. The same products can be obtained from MeCOSK and BrG_nV_m using the same conditions.

$MeCOSG_1V_2$ (**1**)

Reagents: MeCOSH (2.1 mL, 29.74 mmol), K_2CO_3 (4.93 g, 35.68 mmol) and BrG_1V_2 (5.80 g, 24.78 mmol). The compound was obtained as orange oil (5.04 g, 89 %).

$C_{11}H_{20}OSSi$ (228.43 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ 0.11 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.62 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$*H*$_2$Si), 1.37 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2$*H*$_2$$CH_2$Si), 1.57 (m, 2 H, SCH_2*H*$_2$$CH_2CH_2CH_2$Si), 2.29 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.83 (t, J = 7.2 Hz, 2 H, S*H*$_2$$CH_2CH_2CH_2$Si), 5.67 (m, 2 H, SiC*H*C*H*$_2$), 6.01 (m, 4 H, SiC*H*C*H*$_2$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.4 (Si*C*H$_3$), 13.4 ($SCH_2CH_2CH_2$*C*H_2Si), 23.0 (SCH_2CH_2*C*H_2CH_2Si), 28.7 (S*C*$H_2CH_2CH_2CH_2$Si), 30.6 (*C*H_3COS), 33.0 (SCH_2*C*$H_2CH_2CH_2$Si), 132.9 (SiCH*C*H_2), 136.7 (Si*C*HCH_2), 196.0 (CH_3*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ -13.0 (*Si*CHCH_2). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 57.84; H, 8.88; S, 14.04; Obt.: C, 58.40; H, 8.81; S, 14.17.

$MeCOSG_2V_4$ (**2**)

Reagents: MeCOSH (1.4 mL, 19.04 mmol) and K_2CO_3 (3.16 g, 22.85 mmol) and BrG_2V_4 (7.25 g, 15.87 mmol). Compound obtained as orange oil (6.50 g, 90%)

$C_{23}H_{44}OSSi_3$ (452.92 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.11 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.11 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.42 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.47 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.56 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.31 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1,55 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.30 (s, 3 H, CH_3COS), 2.80 (t, J = 7.2 Hz, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 5.65 (m, 4 H, $SiCHCH_2$), 6.13 (m, 8 H, $SiCHCH_2$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.2, 1.0 ($SiCH_3$), 13.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 18.3, 18.5, 18.7 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 23.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 28.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 30.7 (CH_3COS), 33.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 132.9 ($SiCHCH_2$), 137.2 ($SiCHCH_2$), 196.0 (CH_3COS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ -13.0 ($SiCHCH_2$), 1.6 ($SiCH_3$). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 60.99; H, 9.79; S, 7.08; Obt.: C, 60.86; H, 9.71; S, 7.17.

$MeCOSG_3V_8$ (**3**)

Reagents: MeCOSH (0.2 mL, 2.41 mmol) and K_2CO_3 (0.36 g, 2.61 mmol) and BrG_3V_4 (2.00 g, 2.21 mmol), obtained as orange oil (1.59 g, 80%).

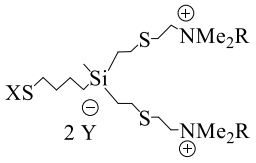
$C_{47}H_{92}OSSi_7$ (901.90 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.11 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), 0.11 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.50 (m, 18 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.68 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.29 (m, 16 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.29 (s, 3 H, CH_3COS), 2.84 (t, J = 7.2 Hz, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 5.67 (m, 8 H, $SiCHCH_2$), 6.02 (m, 16 H, $SiCHCH_2$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.2, -5.0, -1.9 ($SiCH_3$), 13.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 18.3, 18.4, 18.5, 18.7, 18.8, 18.9 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 23.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 28.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 30.7 (CH_3COS), 33.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 132.8 ($SiCHCH_2$), 137.2 ($SiCHCH_2$), 195.9 (CH_3COS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ -13.2 ($SiCHCH_2$), 1.7 ($SiCH_3$). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 62.59; H, 10.28; S, 3.56; Obt.: C, 62.75; H, 9.84; S, 3.06.

$MeCOSG_4V_{16}$ (**4**)

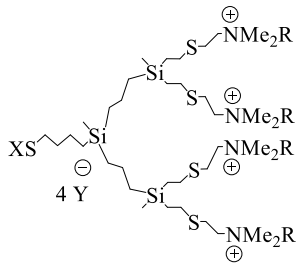
Reagents: MeCOSH (0.02 mL, 0.24 mmol) and K_2CO_3 (0.04 g, 0.29 mmol) and BrG_4V_{16} (0.36 g, 0.20 mmol). The compound was obtained as orange oil (0.31 g, 85%).

$C_{95}H_{188}OSSi_{15}$ (1799.88 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$)**: **^{1}H** δ -0.11 (s, 21 H, SiC*H*$_3$), 0.11 (s, 24 H, SiC*H*$_3$), 0.52 (m, 26 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si, Si$CH_2CH_2CH_2$Si), 0.69 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2CH_2$Si), 1.31 (m, 32 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si, $SiCH_2CH_2CH_2$Si), 2.29 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.85 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, SC*H*$_2$$CH_2CH_2CH_2$Si), 5.69 (m, 16 H, SiC*H*C*H*$_2$), 6.08 (m, 32 H, SiC*H*C*H*$_2$); **^{13}C{^{1}H}**: -4.9, -5.0, -5.1 (Si*C*H_3), 13.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si), 18.3, 18.4, 18.5, 18.7, 18.8, 19.0 (Si*C*H_2*C*H_2*C*H_2Si), 23.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si), 28.8 (S*C*$H_2CH_2CH_2CH_2$Si), 30.7 (*C*H_3COS), 33.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si), 132.6 (SiCH*C*H_2), 137.2 (Si*C*HCH_2), 195.9 (CH_3*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ -13.50 (*Si*$CHCH_2$), 0.90, 1.1, 1.70 (*Si*CH_3). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 63.40; H, 10.53; S, 1.78; Obt.: C, 63.02; H, 10.11; S, 1.54.

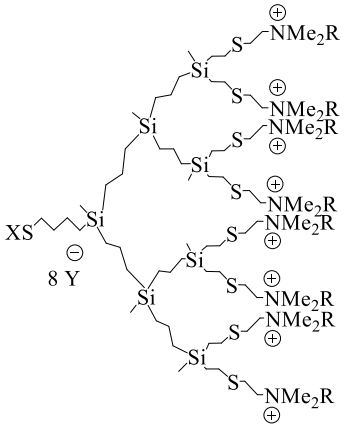
4.2.2. Cationic carbosilane dendrons



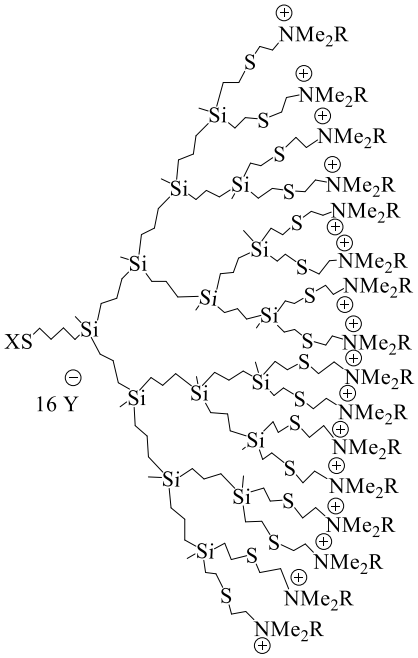
X = MeCO-, Y = Cl^-, R = H- (**5**)
X = MeCO- (**9**)
X = MeCO-, Y = I^-, R = Me- (**13I**)
X = MeCO-, Y = Cl^-, R = Me- (**13Cl**)
X = H-, Y = Cl^-, R = H- (**17**)
X = H- (**20**)
X = H-, Y = I^-, R = Me- (**23I**),
X = H-, Y = Cl^-, R = Me- (**23Cl**)



X = MeCO-, Y = Cl^-, R = H- (**6**)
X = MeCO- (**10**)
X = MeCO-, Y = I^-, R = Me- (**14I**)
X = MeCO-, Y = Cl^-, R = Me- (**14Cl**)
X = H-, Y = Cl^-, R = H- (**18**)
X = H- (**21**)
X = H-, Y = I^-, R = Me- (**24I**)
X = H-, Y = Cl^-, R = Me- (**24Cl**)



X = MeCO-, Y = Cl^-, R = H- (**7**)
X = MeCO- (**11**)
X = MeCO-, Y = I^-, R = Me- (**15I**)
X = MeCO-, Y = Cl^-, R =Me- (**15Cl**)
X = H-, Y = Cl^-, R = H- (**19**)
X = H- (**22**)
X =H, Y = I^-, R = Me- (**25I**)
X = H-, Y = Cl^-, R = Me- (**25Cl**)



X = MeCO-, Y = Cl^-, R = H- (**8**)
X = MeCO- (**12**)
X = MeCO-, Y = I^-, R = Me- (**16I**)
X = MeCO-, Y = Cl^-, R = Me- (**16Cl**)
X = H-, Y = I^-, R =Me- (**26I**)
X = H-, Y = Cl^-, R = Me- (**26Cl**)

4.2.2a. General protocol for (MeCOS)G_n(S-NMe_2·HCl)$_m$

A MeOH solution (ca. 8 mL) of $HS(CH_2)_2NMe_2$·HCl was added to a THF solutions of compounds **1**-**4** in the presence of DMPA (10% per thiol). Thiol and DMPA were added in two times (50% at the beginning and 50% after 2 hour). The reaction mixtures were deoxygenated and stirred under ultraviolet light for 4 h.

(MeCOS)G_1(S-NMe_2·HCl)$_2$ (**5**)

Reagents: HS$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (1.30 g, 9.20 mmol) and compound **1** (1.00 g, 4.38 mmol. After synthesis, all volatiles were removed under vacuum and the residue was dissolved in MeOH and Et_2O was added to precipitate **5**, which was washed with Et_2O, yielding **5** as yellow solid (1.57 g, 70%).

$C_{19}H_{44}Cl_2N_2OS_3Si$ (511.34 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ 0.01 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.55 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.93 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.33 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.56 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.30 (s, 3 H, CH_3COS), 2.65 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.86 (m, 14 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, NCH_3), 3.01 (m, 4 H, SCH_2CH_2N), 3.27 (m, 4 H, SCH_2CH_2N), 12.36 (m, 2 H, $N(CH_3)_2$·HCl). **NMR (D_2O)**: **^{1}H**: δ -0.02 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.53 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.87 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.30 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.50 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.28 (s, 3 H, CH_3COS), 2.62 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.85 (m, 18 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, SCH_2CH_2N, NCH_3), 3.33 (m, 4 H, SCH_2CH_2N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.6 ($SiCH_3$), 12.7 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.0 ($SiCH_2CH_2S$), 22.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 25.4 (SCH_2CH_2N), 26.9 ($SiCH_2CH_2S$), 28.7 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 30.6 (CH_3COS), 32.7 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 42.8 (NCH_3), 56.4 (SCH_2CH_2N), 199.0 (CH_3COS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.3 ($SiCH_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 39.5. **MS:** [M - HCl - Cl^-]$^+$: 439.23. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 44.59; H, 8.67; N, 5.47; S, 18.80; Obt.: C, 41.80; H, 9.09; N, 5.64; S, 14.58**.** Adequate analytical data could not be obtained for this compound because the final product could not be separated from the starting HS$(CH_2)_2NMe_2$·HCl and HCl NMe_2 $(CH_2)_2$ S-S$(CH_2)_2NMe_2$·HCl formed in the reaction (the concentration for both impurities were below 5% by NMR spectroscopy).

(MeCOS)G_2(S-NMe_2·HCl)$_4$ (**6**)

Reagents: HS$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (1.31 g, 9.27 mmol) and compound **2** (1.00 g, 2.21 mmol). Compound was purified by water nanofiltration (MWCO = 500 Da) yielding **6** as yellow solid (1.69 g, 75 %).

6 H, SiC*H*$_3$), 0.47 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.59 (m, 8 H, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.89 (m, 8 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.30 (m, 6 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.51 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.29 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.65 (m, 8H, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 2.84 (m, 34 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SC*H*$_2$CH$_2$N, NC*H*$_3$), 3.30 (m, 8 H, SCH$_2$C*H*$_2$N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.3 (1 Si*C*H$_3$), -4.4 (2 Si*C*H$_3$), 13.5 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.2 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.4 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 23.2 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 25.5 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 27.1 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 28.8 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 30.7 (*C*H$_3$COS), 33.0 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si) , 42.8 (N*C*H$_3$), 56.5 (SCH$_2$*C*H$_2$N), 197.8 (CH$_3$*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.6 (1 *Si*CH$_3$), 2.3 (2 *Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 40.2. **MS:** MS [M - HCl - 3 Cl$^-$]$^{3+}$: 291.84; [M - 2 HCl - 2 Cl$^-$]$^{2+}$: 437.26; [M - 4 HCl]$^+$: 873.52; [M - 3 HCl - H]$^+$: 909.50. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 45.94; H, 9.10; N, 5.50; S, 15.72; Obt.: C, 46.16; H, 9.03; N, 5.30; S, 14.30.

(MeCOS)G$_3$(S-NMe$_2$·HCl)$_8$ (**7**)

Reagents: HS(CH$_2$)$_2$NMe$_2$·HCl (1.32 g, 9.31 mmol) and compound **3** (1.00 g, 1.11 mmol). The purification of compound was carried out using a water nanofiltration with cellulose membrane (MWCO = 1000 Da).

C$_{79}$H$_{188}$Cl$_8$N$_8$OS$_9$Si$_7$ (2035.20 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H**: δ -0.10 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.04 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.53 (m, 28 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.88 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.29 (m, 14 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.52 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.32 (s, br, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.64 (m, 16 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 2.86 (m, 66 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SC*H*$_2$CH$_2$N, NC*H*$_3$), 3.32 (m, 16 H, SCH$_2$C*H*$_2$N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.1 (3 Si*C*H$_3$), -4.3 (4 Si*C*H$_3$), 13.6 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.4 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.5, 18.6, 18.7 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 23.3 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 25.5 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 27.2 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 28.8 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 30.9 (*C*H$_3$COS), 33.2 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 42.8 (N*C*H$_3$), 56.6 (SCH$_2$*C*H$_2$N); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.0 (3 *Si*CH$_3$), 1.7 (4 *Si*CH$_3$), 2.4 (4 *Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 41.2. **MS:** [M - 6 HCl - 2 Cl$^-$]$^{2+}$: 872.49; [M - 5 HCl - 3 Cl$^-$]$^{3+}$: 582.01. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 49.62; H, 9.31; N, 5.51; S, 14.18; Obt.: C, 45.04; H, 9.23; N, 5.34; S, 11.79.

(MeCOS)G_4(S-NMe_2·HCl)$_{16}$ (**8**)

Reagents: $HS(CH_2)_2NMe_2$·HCl (0.14 g, 0.99 mmol) and compound **4** (0.11 g, 0.06 mmol. Compound was purified using a water nanofiltration with cellulose membrane (MWCO = 1000 Da).

$C_{159}H_{380}Cl_{16}N_{16}OS_{17}Si_{15}$ (4066.39 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.10 (s, 21 H, SiC*H*$_3$), 0.02 (s, 24 H, SiC*H*$_3$), 0.53 (m, 58 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.87 (m, 32 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.29 (m, 30 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.51 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.30 (s, br, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.61 (m, 32 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.74 (m, 50 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, NC*H*$_3$), 2.82 (m, 32 H, SCH_2CH_2N) 3.17 (m, 32 H, SCH_2CH_2N); **^{13}C{^{1}H}:** δ -5.1 (7 Si*C*H$_3$), -4.3 (8 Si*C*H$_3$), not observed ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.3 ($SiCH_2CH_2S$), 18.6, 18.5 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), not observed ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 25.9 (SCH_2CH_2N), 27.1 ($SiCH_2CH_2S$), not observed ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), not observed (*C*H$_3$COS), not observed ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 43.0 (NC*H*$_3$), 56.9 (SCH_2CH_2N); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.1 (7 *Si*CH$_3$), 2.4 (8 *Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 41.3. **MS:** [M - 11 HCl - 5 Cl$^-$]$^{3+}$: 1161.67; [M - 12 HCl - 4 Cl$^-$]$^{4+}$: 851.54; [M - 13 HCl - 3 Cl$^-$]$^{5+}$: 697.44; [M - 14 HCl - 2 Cl$^-$]$^{6+}$: 581.35; [M - 15 HCl - Cl$^-$]$^{7+}$: 498.47. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 46.96; H, 9.42; N, 5.51; S, 13.40; Obt.: C, 47.70; H, 9.08; N, 5.12; S, 12.13.

4.2.2b. General protocol for (MeCOS)G_n(S-NMe_2)$_m$

To a THF solutions (ca. 5 mL) of compounds **5-8** was added $NaHCO_3$ and the reaction mixtures were stirred at 25ºC during 12 hours. Afterwards, volatiles were removed under vacuum and the residue was dissolved in Et_2O. Subsequently brine was added, the organic phase was separate and the aqueous phase was extracted twice with Et_2O. The organic phase was washed with brine and dried over $MgSO_4$. The solution was filtered through celite and the volatiles were removed under vacuum.

(MeCOS)G_1(S-NMe_2)$_2$ (**9**)

Reagents: compound **5** (0.96 g, 1.87 mmol) and $NaHCO_3$ (0.63 g, 7.48 mmol. Compound was obtained as orange oil (0.71 g, 86 %).

$C_{19}H_{42}N_2OS_3Si$ (438.83 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.00 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.53 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.87 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.34 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.56 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.27 (s, 12 H, NCH_3), 2.29 (s, 3 H, CH_3COS), 2.49 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$, SCH_2CH_2N), 2.52 (m, 4 H, SCH_2CH_2N), 2.83 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.4 ($SiCH_3$), 13.1 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.5 ($SiCH_2CH_2S$), 22.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.7 ($SiCH_2CH_2S$), 28.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 29.6 (SCH_2CH_2N), 30.7 (CH_3COS), 33.1 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 45.2 (NCH_3), 59.1 (SCH_2CH_2N), 195.9 (CH_3COS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.8 ($SiCH_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 27.8. **MS:** $[M + H]^+$: 439.23. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 52.00; H, 9.65; N, 6.38; S, 21.92; Obt.: C, 51.97; H, 9.60; N, 6.30; S,21.80.

$(MeCOS)G_2(S\text{-}NMe_2)_4$ (**10**)

Reagents: Compound **6** (1.76 g, 1.13 mmol) and $NaHCO_3$ (1.16 g, 13.82 mmol). Compound **9** was obtained as orange oil (1.47 g, 98 %).

$C_{39}H_{88}N_4OS_5Si_3$ (873.72 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.01 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), -0.003 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.55 (m, 10 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.87 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.31 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.56 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.23 (s, 24 H, NCH_3), 2.30 (s, 3 H, CH_3COS), 2.57 (m, 24 H, $SiCH_2CH_2S$, SCH_2CH_2N), 2.67 (m, 4 H, SCH_2CH_2N), 2.80 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$). **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.4 (1 $SiCH_3$), -5.2 (2 $SiCH_3$), 13.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.5 ($SiCH_2CH_2S$), 18.2, 18.3, 18.5 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 22.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.1 ($SiCH_2CH_2S$), 28.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 29.2 (SCH_2CH_2N), 30.1 (CH_3COS), 32.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 44.8 (NCH_3), 58.7 (SCH_2CH_2N), 195.4 (CH_3COS). **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (1 $SiCH_3$), 2.6 (2 $SiCH_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 27.4. **MS:** $[M + H]^+$: 873.50. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 53.61; H, 10.15; N, 6.41; S, 18.35; Obt.: C, 53.69; H, 10.20; N, 6.49; S, 18.40.

$(MeCOS)G_3(S\text{-}NMe_2)_8$ (**11**)

Reagents: Compound **7** (1.14 g, 0.56 mmol) and $NaHCO_3$ (0.75 g, 8.96 mmol). After purification, compound **11** was obtained as orange oil (0.92 g, 94 %).

$C_{79}H_{180}N_8OS_9Si_7$ (1743.51 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ 0.10 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), 0.01 (m, 12 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.52 (m, 26 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.88 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.27 (m, 14 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.55 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.25 (s, 48 H, NCH_3), 2.30 (s, 3 H, CH_3COS), 2.56 (m, 48 H, $SiCH_2CH_2S$, SCH_2CH_2N), 2.85 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$). **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.3 (3 $SiCH_3$), -5.0 (4 $SiCH_3$), 12.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.7 ($SiCH_2CH_2S$), 18.4, 18.5, 18.9 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 23.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 26.9 ($SiCH_2CH_2S$), 28.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 29.8 (SCH_2CH_2N), 30.4 (CH_3COS), 33.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 45.4 (NCH_3), 59.2 (SCH_2CH_2N), 194.1 (CH_3COS). **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.6 (3 *Si*CH_3), 2.8 (4 *Si*CH_3); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 27.1. **MS:** $[M + H]^+$: 1743.9. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 54.42; H, 10.41; N, 6.43; S, 16.55; Obt.: C, 55.47; H, 10.69; N, 6.41; S, 15.87.

$(MeCOS)G_4(S\text{-}NMe_2)_{16}$ (**12**)

Reagents: Compound **8** (0.16 g, 0.04 mmol) with $NaHCO_3$ (0.13 g, 1.24 mmol. Compound **12** was obtained as orange oil (0.11 g, 81 %).

$C_{159}H_{364}N_{16}OS_{17}Si_{15}$ (3483.07 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ - 0.11 (s, 21 H, SiC*H*$_3$), -0.01 (s, 24 H, SiC*H*$_3$), 0.51 (m, 56 H, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.59 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.87 (m, 32 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.26 (m, 30 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.55 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.22 (s, 96 H, NCH_3), 2.28 (s, 3 H, CH_3COS), 2.53 (m, 96 H, $SiCH_2CH_2S$, SCH_2CH_2N), 2.83 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$). **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.3 (3 $SiCH_3$), -5.0 (4 $SiCH_3$), not observed ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.6 ($SiCH_2CH_2S$), 18.3, 18.4, 18.8, 18.9 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), not observed ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.7 ($SiCH_2CH_2S$), not observed ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 29.8 (SCH_2CH_2N), not observed (CH_3COS), not observed ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 45.4 (NCH_3), 59.3 (SCH_2CH_2N), not observed (CH_3COS). **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (7 *Si*CH_3), 2.9 (8 *Si*CH_3). **{^{1}H-^{15}N}**: δ 26.9. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 54.83; H, 10.53; N, 6.43; S, 15.65; Obt.: C, 55.47; H, 10.69; N, 6.41; S, 15.87.

4.2.2c. General protocol for (MeCOS)G$_n$(S-NMe$_3$I)$_m$

To a THF solutions (ca.10 mL) of compounds **9-12** was added CH_3I and the reaction mixtures were stirred at 25ºC for 12 hours. Volatiles were removed under vacuum. The residue was purified by water nanofiltration.

(MeCOS)G_1(S-NMe$_3$I)$_2$ (**13I**)

Reagents: Compound **9** (1.66 g, 3.78 mmol) and CH_3I (2.58 g, 18.15 mmol). After Purification (cell membrane of MWCO = 500 - 1000 Da) compound **13I** was obtained as orange solid (2.60 g, 95%).

$C_{21}H_{48}I_2N_2OS_3Si$ (722.71 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ 0.02 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.56 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.89 (m, 4 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.30 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.52 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.28 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.69 (m, 4 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 2.81 (t, J = 7.1 Hz, 2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.95 (m, 4 H, SC*H*$_2$CH$_2$N), 3.13 (s, 18 H, NC*H*$_3$), 3.56 (m, 4 H, SCH$_2$C*H*$_2$N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.9 (Si*C*H$_3$), 12.9 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.5 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 22.7 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 24.3 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 27.8 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 28.8 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 30.9 (*C*H$_3$COS), 32.8 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 53.5 (N*C*H$_3$), 65.7 (SCH$_2$*C*H$_2$N), 198.5 (CH$_3$*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 3.0 (*Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 49.2. **MS:** [M - I$^-$]$^+$: 595.19, [M - 2 I$^-$]$^+$: 234.14. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 39.40; H, 6.69; N, 3.88; S, 13.31; Obt.: C, 38.93; H, 6.43; N, 3.78; S, 12.99**.**

(MeCOS)G_2(S-NMe$_3$I)$_4$ (**14I**)

Reagents: Compound **10** (1.05 g, 1.21 mmol) and CH_3I (1.64 g, 11.57 mmol). Compound **14I** was obtained as orange solid (1.71 g, 98 %).

$C_{43}H_{100}I_4N_4OS_5Si_3$ (1441.48 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ - 0.06 (s, 3 H, SiC*H*$_3$) 0.18 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.49 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.64 (m, 8 H, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si) 1.01 (m, 8 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.36 (m, 6 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.55 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.33 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.82 (m, 10 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 3.07 (m, 8 H, SC*H*$_2$CH$_2$N), 3.27 (s, 36 H, NC*H*$_3$), 3.74 (m, 8 H, SCH$_2$C*H*$_2$N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.2 (1 Si*C*H$_3$),, -4.0 (2 Si*C*H$_3$), 13.8 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 15.1 (Si*C*H$_2$CH$_2$S),

18.6, 18.8 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 23.3 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 24.7 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 28.2 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 30.1 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 31.3 (*C*H$_3$COS), 33.3 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 53.8 (N*C*H$_3$), 65.8 (SCH$_2$*C*H$_2$N), 195.7 (CH$_3$*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (1 *Si*CH$_3$)., 2.6 (2 *Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 50.9. **MS:** [M - 2 I$^-$]$^{2+}$: 593.20, [M - 3 I$^-$]$^{3+}$: 356.16, [M - 4 I$^-$]$^{4+}$: 233.15. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 35.83; H, 6.99; N, 3.89; S, 11.12; Obt.: C, 35.93; H, 7.05; N, 3.86; S, 11.03**.**

(MeCOS)G$_3$(S-NMe$_3$I)$_8$ (**15I**)

Reagents: Compound **11** (0.88 g, 0.51 mmol) and CH$_3$I (1.37 g, 9.67 mmol). Compound **15I** was obtained as orange solid (1.40 g, 96 %).

C$_{87}$H$_{204}$I$_8$N$_8$OS$_9$Si$_7$ (2879.02 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H**: δ - 0.07 (s, 9 H, SiC*H$_3$*) 0.15 (s, 12 H, SiC*H$_3$*), 0.55 (m, 26 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H$_2$*Si, SiC*H$_2$*CH$_2$C*H$_2$*Si), 0.97 (m, 16 H, SiC*H$_2$*CH$_2$S), 1.32 (m, 14 H, SCH$_2$CH$_2$C*H$_2$*CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H$_2$*CH$_2$Si), 1.50 (m, 2 H, SCH$_2$C*H$_2$*CH$_2$CH$_2$Si), 2.28 (s, br, 3 H, C*H$_3$*COS), 2.79 (m, 18 H, SC*H$_2$*CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H$_2$*S), 3.05 (m, 16 H, SC*H$_2$*CH$_2$N), 3.23 (s, 72 H, NC*H$_3$*), 3.71 (m, 16 H, SCH$_2$C*H$_2$*N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.4 (3 Si*C*H$_3$), -4.1 (4 Si*C*H$_3$), 13.7 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 15.0 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.6, 18.8 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 23.3 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 24.7 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 28.1 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 28.8 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 31.5 (*C*H$_3$COS), 33.3 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 53.7 (N*C*H$_3$), 65.8 (SCH$_2$*C*H$_2$N); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.8 (3 *Si*CH$_3$), 2.8 (4 *Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 51.2. **MS**: [M - 2 I$^-$]$^{2+}$: 1311.28, [M - 3 I$^-$]$^{3+}$: 831.93, [M - 4 I$^-$]$^{4+}$: 592.74, [M - 5 I$^-$]$^{5+}$: 448.81. **Elemental Analysis**: Calcd.: C, 36.29; H, 7.14; N, 3.89; S, 10.02; Obt.: C, 36.64; H, 6.88; N, 3.66; S, 9.90**.**

(MeCOS)G$_4$(S-NMe$_3$I)$_{16}$ (**16I**)

Reagents: Compound **12** (0.08 g, 0.02 mmol) with CH$_3$I (0.11 g, 0.77 mmol). After purification by nanofiltration compound **16I** was obtained as orange solid (0.11 g, 76 %)

C$_{175}$H$_{412}$I$_{16}$N$_{16}$OS$_{17}$Si$_{15}$ (5754.10 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H**: δ - 0.05 (s, 21 H, SiC*H$_3$*) 0.13 (s, 24 H, SiC*H$_3$*), 0.53 (m, 58 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H$_2$*Si, SiC*H$_2$*CH$_2$C*H$_2$*Si), 0.96 (m, 32 H, SiC*H$_2$*CH$_2$S), 1.32 (m, 28 H, SCH$_2$CH$_2$C*H$_2$*CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H$_2$*CH$_2$Si), 1.51 (m, 2 H, SCH$_2$C*H$_2$*CH$_2$CH$_2$Si), 2.29 (s, br, 3 H, C*H$_3$*COS), 2.77 (m, 34 H, SC*H$_2$*CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si,

SiCH$_2$C*H$_2$*S), 3.02 (m, 32 H, SC*H$_2$*CH$_2$N), 3.22 (s, 144 H, NC*H$_3$*), 3.69 (m, 32 H, SCH$_2$C*H$_2$*N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.1 (3 Si*C*H$_3$), -4.9 (4 Si*C*H$_3$), not observed (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.2 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.1, 18.5, 18.6, 18.7 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), not observed (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 27.5 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), not observed (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 27.8 (S*C*H$_2$CH$_2$N), not observed (*C*H$_3$COS), not observed (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 53.3 (N*C*H$_3$), 65.5 (SCH$_2$*C*H$_2$N), not observed (CH$_3$*C*OS). **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (7 *Si*CH$_3$), 2.9 (8 *Si*CH$_3$). **{^{1}H-^{15}N}**: δ 50.9. **Elemental Analysis**: Calcd.: C, 36.53; H, 7.22; N, 3.89; S, 9.47; Obt.: C, 36.64; H, 6.88; N, 3.66; S, 9.90**.**

4.2.2d. General protocol for (MeCOS)G$_n$(S-NMe$_3$Cl)$_m$

To an aqueous solutions of compound **13I-16I** was added Amberlite IRA-402 Cl-form ion-exchange resin and the reaction mixtures were stirred for 12 hours. Afterwards, the solution was filtered and evaporated under vacuum

(MeCOS)G$_1$(S-NMe$_3$Cl)$_2$ (**13Cl**)

Reagents: Compound **13I** (1.32 g, 1.83 mmol and Amberlite IRA-402 (6.63 g). Compound **13Cl** was obtained as yellow solid (0.93 g, 94 %).

C$_{21}$H$_{48}$Cl$_2$N$_2$OS$_3$Si (539.79 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H:** δ - 0.05 (s, 3 H, SiC*H$_3$*), 0.56 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H$_2$*Si), 0.84 (m, 4 H, SiC*H$_2$*CH$_2$S), 1.30 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$C*H$_2$*CH$_2$Si), 1.50 (m, 2 H, SCH$_2$C*H$_2$*CH$_2$CH$_2$Si), 2.26 (s, 3 H, C*H$_3$*COS), 2.61 (m, 4 H, SiCH$_2$C*H$_2$*S), 2.85 (m, 2 H, SC*H$_2$*CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.90 (m, 4 H, SC*H$_2$*CH$_2$N), 3.02 (s, 18 H, NC*H$_3$*), 3.45 (m, 4 H, SCH$_2$C*H$_2$*N). **MS:** [M - 2 Cl$^-$]$^{2+}$: 234.44, [M - Cl$^-$]$^+$: 503.22. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 46.73; H, 8.96; N, 5.19; S, 17.82; Obt.: C, 46.58; H, 8.82; N, 5.05; S, 17.70**.**

(MeCOS)G$_2$(S-NMe$_3$Cl)$_4$ (**14Cl**)

Reagents: Compound **14I** (0.301 g, 0.25 mmol) with Amberlite IRA-402, Cl-form ion-exchange resin (3.01 g). Compound **14Cl** was obtained as yellow solid (0.26 g, 98 %).

C$_{43}$H$_{100}$Cl$_4$N$_4$OS$_5$Si$_3$ (1075.67 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H:** δ -0.09 (s, 3 H, SiC*H$_3$*), 0.04 (s, 6 H, SiC*H$_3$*), 0.57 (m, 10 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H$_2$*Si, SiC*H$_2$*CH$_2$C*H$_2$*Si) 0.90 (m, 8 H, SiC*H$_2$*CH$_2$S), 1.34 (m, 6 H, SCH$_2$CH$_2$C*H$_2$*CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H$_2$*CH$_2$Si), 1.55 (m, 2 H,

$SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.33 (s, 3 H, CH_3COS), 2.68 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.86, (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.95 (m, 8 H, SCH_2CH_2N), 3.11 (s, 36 H, NCH_3), 3.52 (m, 8 H, SCH_2CH_2N). **MS:** $[M - 4\ Cl^-]^{4+}$: 233.15, $[M - 3\ Cl^-]^{3+}$: 322.52, $[M - 2\ Cl^-]^{2+}$: 502.27, $[M - Cl^-]^+$: 1039.48. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 48.01; H, 9.37; N, 5.21; S, 14.90; Obt.: C, 47.89; H, 9.48; N, 5.41; S, 15.02**.**

$(MeCOS)G_3(S\text{-}NMe_3Cl)_8$ (**15Cl**)

Reagents: **15I** (0.59 g, 0.20 mmol) with Amberlite IRA-402, Cl-form ion-exchange resin (11.77 g). Compound **15Cl** was obtained as yellow solid (0.44 g, 99 %).

$C_{87}H_{204}Cl_8N_8OS_9Si_7$ (2147.38 $g.mol^{-1}$). **NMR (D_2O): ^1H:** δ -0.08 (s, 9 H, $SiCH_3$), 0.05 (s, 12 H, $SiCH_3$), 0.55 (m, 22 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.89 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.31 (m, 16 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.57 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.33 (s, br, 3 H, CH_3COS), 2.65 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.93 (m, 18 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, SCH_2CH_2N), 3.07 (s, 72 H, NCH_3), 3.50 (m, 16 H, SCH_2CH_2N). **MS:** $[M - 6\ Cl^-]^{6+}$: 322.2, $[M - 5\ Cl^-]^{5+}$: 393.3, $[M - 4\ Cl^-]^{4+}$: 501.30, $[M - 3\ Cl^-]^{3+}$: 680.00, $[M - 2\ Cl^-]^{2+}$: 1037.50. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 48.66; H, 9.58; N, 5.22; S, 13.44; Obt.: C, 48.66; H, 9.22; N, 5.10; S, 12.44**.**

$(MeCOS)G_4(S\text{-}NMe_3Cl)_{16}$ (**16Cl**)

Reagents: Compounds **16I** (0.08 g, 0.01 mmol) Amberlite IRA-402, Cl-form ion-exchange resin (3.36 g). Compound **16Cl** was obtained as yellow solid (0.06 g, 98 %).

$C_{175}H_{412}Cl_{16}N_{16}OS_{17}Si_{15}$ (4290.83 $g.mol^{-1}$). **NMR (D_2O): ^1H:** δ -0.08 (s, 9 H, $SiCH_3$), 0.05 (s, 12 H, $SiCH_3$), 0.55 (m, 22 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.89 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.31 (m, 16 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.57 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.33 (s, br, 3 H, CH_3COS), 2.68, (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.95 (m, 18 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, SCH_2CH_2N), 3.11 (s, 72 H, NCH_3), 3.53 (m, 16 H, SCH_2CH_2N). **MS:** $[M - 8\ Cl^-]^{8+}$: 500.00, $[M - 7\ Cl^-]^{7+}$: 577.00, $[M - 6\ Cl^-]^{6+}$: 679.00, $[M - 5\ Cl^-]^{5+}$: 822.00. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 48.99; H, 9.68; N, 5.22; S, 12.70; Obt.: C, 48.30; H, 8.19; N, 4.98; S, 12.64.

4.2.2e. General protocol for focal point deprotection

To a MeOH solution (ca. 10 mL) of compounds (**17-26**) was added HCl (2 M in ether or 4 M in dioxane solution) and reaction mixtures were stirred at 55°C overnight. Afterward, volatiles were removed under vacuum and residue were washed with ether.

$HSG_1(S\text{-}NMe_2HCl)_2$ (**17**)

Reagents: Compound **5** (1.00 g, 1.96 mmol and HCl (2.9 mL, 11.73 mmol). Compound **17** was obtained as yellow solid (0.69 g, 75 %).

$C_{17}H_{42}Cl_2N_2S_3Si$ (469.72 g.mol^{-1}). **NMR (CD_3Cl): ^{1}H**: δ 0.02 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.54 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.96 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.32 (m, 1 H, *H*S), 1.36 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.61 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.51 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.66 (4 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.87 (s, 12 H, NCH_3), 3.02 (m, 4 H, SCH_2CH_2N), 3.27 (4 H, SCH_2CH_2N), 12.35 (m, 2 H, $N(CH_3)_2\cdot HCl$); **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.05 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.52 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.86 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.34 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.54 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.46 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.58 (4 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.80 (m, 16 H, SCH_2CH_2N, NCH_3), 3.26 (4 H, SCH_2CH_2N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -6.5 ($SiCH_3$), 11.7 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 13.5 ($SiCH_2CH_2S$), 21.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 23.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 25.1 (SCH_2CH_2N), 26.6 ($SiCH_2CH_2S$) 36.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 42.7 (NCH_3), 56.2 (SCH_2CH_2N) ; **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.9 ($SiCH_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 40.2. **MS:** $[M - HCl - Cl^-]^+$: 397.22. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 43.47; H, 9.01; N, 5.96; S, 20.48; Obt.: C, 42.99; H, 9.53; N, 5.97; S, 19.91.

$HSG_2(S\text{-}NMe_2HCl)_4$ (**18**)

Reagents: Compound **6** (1.18 g, 1.16 mmol) and HCl (1.7 mL, 6.93 mmol). Compound **18** was obtained as yellow solid (0.96 g, 85 %)

$C_{37}H_{90}Cl_4N_4S_5Si_3$ (977.53 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.09 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.04 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.46 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.59 (m, 8H, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.89 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.34 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.56 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.48 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.65 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.87

(m, 32 H, SC*H*$_2$CH$_2$N, NC*H*$_3$), 3.32 (m, 4 H, SCH$_2$C*H*$_2$N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.5 (1 Si*C*H$_3$), -4.7 (2 Si*C*H$_3$), 13.2 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.1 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.2, 18.4 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 22.5 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 23.8 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 25.4 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 27.0 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 37.0 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 42.8 (N*C*H$_3$), 56.4 (SCH$_2$*C*H$_2$N) ; **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.8 (1 *Si*CH$_3$), 2.4 (2 *Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 40.1. **MS:** [M- HCl - 3 Cl$^-$]$^{3+}$: 277.84; [M - 2 HCl - 2 Cl$^-$]$^{2+}$: 416.25; [M- 3 HCl - Cl$^-$]$^+$: 831.51; [M - 3 HCl - H]$^+$: 867. 49. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 43.46; H, 9.28; N, 5.73; S, 16.40; Obt.: C, 43.90; H, 9.26; N, 5.44; S, 15.95.

HSG$_3$(S-NMe$_2$HCl)$_8$ (**19**)

Reagents: Compound **7** (1.02 g, 0.50 mmol) and HCl (0.7 mL, 3.00 mmol). Compound **19** was obtained as yellow solid (0.71 g, 78 %).

C$_{77}$H$_{186}$Cl$_8$N$_8$S$_9$Si7 (1993.16 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H**: δ -0.09 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), 0.05 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.54 (m, 28 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.92 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.31 (m, 14 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$S), 1.57 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.46 (m, 2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.65 (m, 16 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 2.87 (m, 64 H, SiC*H*$_2$CH$_2$N, NC*H*$_3$), 3.33 (m, 16 H, SCH$_2$C*H*$_2$N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.1 (3 Si*C*H$_3$), -4.3 (4 Si*C*H$_3$), 13.5 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.4 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.5, 18.6 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 22.6 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 24.0 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 25.5 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 27.1 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 37.6 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 42.7 (N*C*H$_3$), 56.5 (SCH$_2$*C*H$_2$N); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (3 *Si*CH$_3$), 2.6 (4 *Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 40.1. **MS:** [M - 3 HCl - 5 Cl$^-$]$^{+5}$: 341.22, [M - 4 HCl - 3 Cl$^-$]$^{+4}$: 435.26, [M - 4 HCl - 4 Cl$^-$]$^{+4}$: 426.27, [M - 5 HCl - 2 Cl$^-$]$^{+3}$: 580.01, [M - 5 HCl - 3 Cl$^-$]$^{+3}$: 568.01, [M - 6 HCl - Cl$^-$]$^{+2}$: 887.49. **Elemental analysis:** Calcd.: C, 46.40; H, 9.41; N, 5.62; S, 14.48; Obt.: C, 45.95; H, 11.18; N, 5.11; S, 11.78.

HSG$_1$(S-NMe$_3$I)$_2$ (**23I**)

Reagents: Compound **13I** (1.00 g, 1.38 mmol) and HCl (3.9 mL, 7.74 mmol). Compound **23I** was obtained as orange solid (0.82 g, 88 %).

C$_{19}$H$_{46}$I$_2$N$_2$OS$_3$Si (680.67 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H**: δ -0.03 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.53 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.86 (m, 4 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.34 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.53 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.47 (m, 2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si) 2.62 (m, 4 H,

$SiCH_2C\mathit{H}_2S$), 2.89 (m, 4 H, $SC\mathit{H}_2CH_2N$), 3.06 (s, 18 H, $NC\mathit{H}_3$), 3.46 (m, 4 H, $SCH_2C\mathit{H}_2N$); **$^{13}C\{^1H\}$**: δ -5.7 ($Si\mathit{C}H_3$), 12.4 ($SCH_2CH_2CH_2\mathit{C}H_2Si$), 14.0 ($Si\mathit{C}H_2CH_2S$), 21.9 ($SCH_2CH_2\mathit{C}H_2CH_2Si$), 23.5 ($S\mathit{C}H_2CH_2CH_2CH_2Si$), 23.8 ($S\mathit{C}H_2CH_2N$), 27.4 ($SiCH_2\mathit{C}H_2S$), 38.0 ($SCH_2\mathit{C}H_2CH_2CH_2Si$), 53.0 ($N\mathit{C}H_3$), 65.6 ($SCH_2\mathit{C}H_2N$); **{$^1H$-$^{29}Si$}**: δ 2.86 ($\mathit{Si}CH_3$); **{$^1H$-$^{15}N$}**: δ 48.2. **MS:** $[M - I^-]^+$: 553.16, $[M - 2\ I^-]^{2+}$: 213.13. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 33.53; H, 6.81; N, 4.12; S, 14.13; Obt.: C, 33.46; H, 7.80; N, 4.11; S, 13.96**.**

$HSG_2(S\text{-}NMe_3I)_4$ (**24I**)

Reagents: Compound **14I** (0.70 g, 0.05 mmol) and HCl (0.5 mL, 1.0 mmol). After compound **24I** was obtained as orange solid (0.61 g, 90 %).

$C_{41}H_{98}I_4N_4OS_5Si_3$ (1399.44 $g.mol^{-1}$). **NMR (D_2O): ^1H**: δ - 0.06 (s, 3 H, $SiC\mathit{H}_3$) 0.16 (s, 6 H, $SiC\mathit{H}_3$), 0.47 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2C\mathit{H}_2Si$), 0.62 (m, 8 H, $SiC\mathit{H}_2CH_2C\mathit{H}_2Si$) 0.98 (m, 8 H, $SiC\mathit{H}_2CH_2S$), 1.36 (m, 6 H, $SCH_2CH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$, $SiCH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$), 1.58 (m, 2 H, $SCH_2C\mathit{H}_2CH_2CH_2Si$), 2.49 (m, 2 H, $SC\mathit{H}_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.80 (m, 8 H, $SiCH_2C\mathit{H}_2S$), 3.05 (m, 8 H, $SC\mathit{H}_2CH_2N$), 3.23 (s, 36 H, $NC\mathit{H}_3$), 3.71 (m, 8 H, $SCH_2C\mathit{H}_2N$); **$^{13}C\{^1H\}$**: δ -4.4 (1 $Si\mathit{C}H_3$), -4.1 (2 $Si\mathit{C}H_3$), 13.6 ($SCH_2CH_2CH_2\mathit{C}H_2Si$), 14.8 ($Si\mathit{C}H_2CH_2S$), 18.5, 18.6 ($Si\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2Si$), 22.7 ($SCH_2CH_2\mathit{C}H_2CH_2Si$), 24.2 ($S\mathit{C}H_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.4 ($S\mathit{C}H_2CH_2N$), 27.9 ($SiCH_2\mathit{C}H_2S$), 37.7 ($SCH_2\mathit{C}H_2CH_2CH_2Si$), 53.4 ($N\mathit{C}H_3$), 65.6 ($SCH_2\mathit{C}H_2N$); **{$^1H$-$^{29}Si$}**: δ 1.79 (1 $\mathit{Si}CH_3$), 2.60 (2 $\mathit{Si}CH_3$); **{^1H-^{15}N}**: δ 50.2. **MS:** $[M - 2\ I^-]^{2+}$: 572.20. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 35.19; H, 7.06; N, 4.00; S, 11.46; Obt.: C, 35.96; H, 7.50; N, 4.08; S, 11.60**.**

$HSG_3(S\text{-}NMe_3I)_8$ (**25I**)

Reagents: **15I** (23 g, 0.74 mmol) with HCl in ether (1.1 mL, 4.43 mmol). Compound **25I** was obtained as orange solid (1.80 g, 86 %).

$C_{85}H_{202}I_8N_8OS_9Si_7$ (2836.99 $g.mol^{-1}$). **NMR (D_2O): ^1H**: δ - 0.04 (s, 9 H, $SiC\mathit{H}_3$) 0.18 (s, 12 H, $SiC\mathit{H}_3$), 0.64 (m, 26 H, $SCH_2CH_2CH_2C\mathit{H}_2Si$, $SiC\mathit{H}_2CH_2C\mathit{H}_2Si$) 1.01 (m, 16 H, $SiC\mathit{H}_2CH_2S$), 1.37 (m, 14 H, $SCH_2CH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$, $SiCH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$), 1.59 (m, 2 H, $SCH_2C\mathit{H}_2CH_2CH_2Si$), 2.46 (m, 2 H, $SC\mathit{H}_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.82 (m, 16 H, $SiCH_2C\mathit{H}_2S$), 3.07 (m, 16 H, $SC\mathit{H}_2CH_2N$), 3.26 (s, 72 H, $NC\mathit{H}_3$), 3.75 (m, 16 H, $SCH_2C\mathit{H}_2N$); **$^{13}C\{^1H\}$**: δ -4.2

(1 Si*C*H_3), -3.97 (2 Si*C*H_3), 13.4 (SCH_2CH_2CH_2*C*H_2Si), 15.1 (Si*C*H_2CH_2S), 18.6, 18.7 (Si*C*H_2*C*H_2*C*H_2Si), 22.8 (SCH_2CH_2*C*H_2CH_2Si), 24.4 (S*C*H_2CH_2CH_2CH_2Si), 24.8 (S*C*H_2CH_2N), 28.1 (SiCH_2*C*H_2S), 37.9 (SCH_2*C*H_2CH_2CH_2Si), 53.8 (N*C*H_3), 65.8 (SCH_2*C*H_2N); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.21, 2.68 (*Si*CH_3); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 51.2. **MS:** [M - 5 I^-]$^{5+}$: 440.21. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 35.99; H, 7.18; N, 3.95; S, 6.93; Obt.: C, 35.86; H, 7.91; N, 4.13; S, 7.03**.**

HSG_4(S-$NMe_3I)_{16}$ (**26I**)

Reagents: Compound **16I** (2.12 g, 0.37 mmol) and HCl (1.1 mL, 2.21 mmol). Compound **26I** was obtained as orange solid (1.86 g, 88 %).

$C_{173}H_{410}I_{16}N_{16}S_{17}Si_{15}$ (5712.06 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.07 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), 0.04 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.52 (m, 22 H, SCH_2CH_2CH_2C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH_2C*H*$_2$Si) 0.88 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH_2S), 1.30 (m, 16 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$CH_2Si, SiCH_2C*H*$_2$CH_2Si), 1.56 (m, 2 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2CH_2Si), 2.66, (m, 16 H, SiCH_2C*H*$_2$S), 2.93 (m, 18 H, SC*H*$_2$CH_2CH_2CH_2Si, SC*H*$_2$CH_2N), 3.09 (s, 72 H, NC*H*$_3$), 3.51 (m, 16 H, SCH_2C*H*$_2$N); **^{13}C{^{1}H}**: -5.3 (3 Si*C*H_3), -4.7 (4 Si*C*H_3), not observed (SCH_2CH_2CH_2*C*H_2Si), 14.4 (Si*C*H_2CH_2S), 18.4, 18.6, 18.8, 18.9 (Si*C*H_2*C*H_2*C*H_2Si), not observed (SCH_2CH_2*C*H_2CH_2Si), 27.3 (SiCH_2*C*H_2S), not observed (S*C*H_2CH_2CH_2CH_2Si), 27.6 (S*C*H_2CH_2N), not observed (SCH_2*C*H_2CH_2CH_2Si), 53.4 (N*C*H_3), 65.6 (SCH_2*C*H_2N). **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.21, 2.65 (*Si*CH_3); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 51.0. **MS:** [M - 5 I^-]$^{5+}$: 440.21. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 36.38; H, 7.24; N, 3.92; S, 9.54; Obt.: C, 35.86; H, 7.91; N, 4.13; S, 8.03

HSG_1(S-$NMe_3Cl)_2$ (**23Cl**)

Reagents: Compound **13Cl** (0.10 g, 0.18 mmol) and HCl (0.5 mL, 1.06 mmol). After purification compound **23Cl** was obtained as yellow solid (0.09 g, 100 %).

$C_{21}H_{48}Cl_2N_2OS_3Si$ (497.77 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H:** δ - 0.05 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.51 (m, 2 H, SCH_2CH_2CH_2C*H*$_2$Si), 0.84 (m, 4 H, SiC*H*$_2$CH_2S), 1.32 (m, 2 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$CH_2Si), 1.52 (m, 2 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2CH_2Si), 2.45 (m, 2 H, SC*H*$_2$CH_2CH_2CH_2Si), 2.60 (m, 4 H, SiCH_2C*H*$_2$S), 2.87 (m, 4 H, SC*H*$_2$CH_2N), 3.04 (s, 18 H, NC*H*$_3$), 3.43 (m, 4 H, SCH_2C*H*$_2$N). **^{13}C{^{1}H}**: δ -6.4 (Si*C*H_3), 11.7 (SCH_2CH_2CH_2*C*H_2Si), 13.6 (Si*C*H_2CH_2S), 21.5

($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 23.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 23.5 (SCH_2CH_2N), 27.1 ($SiCH_2CH_2S$), 36.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 52.9 (NCH_3), 65.5 (SCH_2CH_2N); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.86 ($SiCH_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 48.2. **MS:** $[M - 8\ Cl^-]^{8+}$: 227.15, $[M - 7Cl^-]^{7+}$: 265.17, $[M - 6Cl^-]^{6+}$: 315.20, $[M - 5Cl^-]^{5+}$: 385.23, $[M - 4Cl^-]^{4+}$: 491.28, $[M - 3Cl^-]^{3+}$: 666.02. **Elemental Analysis:** Calcd.: 45.85; H, 9.31; Cl, 14.24; N, 5.63; S, 19.33; Obt.: C, 43.74; H, 8.89; N, 5.59; S, 17.70**.**

$HSG_2(S\text{-}NMe_3Cl)_4$ (**24Cl**)

Reagents: Compound **14Cl** (0.31 g, 0.29 mmol) and HCl (0.9 mL, 1.71 mmol). Compound **24Cl** was obtained as yellow solid (0.28 g, 93 %)

$C_{41}H_{98}Cl_4N_4OS_5Si_3$ (1033.64 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H:** δ - 0.11 (s, 3 H, $SiCH_3$) 0.01 (s, 6 H, $SiCH_3$), 0.45 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.58 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.87 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.32 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.55 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.48 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.65 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.92 (m, 8 H, SCH_2CH_2N), 3.08 (s, 36 H, NCH_3), 3.49 (m, 8 H, SCH_2CH_2N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.6 (1 $SiCH_3$), -4.3 (2 $SiCH_3$), 13.7 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.9 ($SiCH_2CH_2S$), 18.6, 18.8 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 22.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.6 (SCH_2CH_2N), 27.8 ($SiCH_2CH_2S$), 37.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 53.5 (NCH_3), 65.7 (SCH_2CH_2N); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.79 (1 $SiCH_3$), 2.61 (2 $SiCH_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 50.0. **MS:** $[M - 4\ Cl^-]^{4+}$: 222.65, $[M - 3\ Cl^-]^{3+}$: 308.52, $[M - 2\ Cl^-]^{2+}$: 480.76. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 47.64; H, 9.56; N, 5.42; S, 15.51; Obt.: C, 47.40; H, 9.28; N, 5.54; S, 13.58**.**

$HSG_3(S\text{-}NMe_3Cl)_8$ (**25Cl**)

Reagents: Compound **15Cl** (0.22 g, 0.10 mmol) and HCl (0.3 mL, 0.62 mmol). After purification compound **25Cl** was obtained as yellow solid (0.20 g, 90 %).

$C_{85}H_{202}Cl_8N_8OS_9Si_7$ (2105.34 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H:** δ - 0.08 (s, 9 H, $SiCH_3$) 0.05 (s, 12 H, $SiCH_3$), 0.58 (m, 26 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.90 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.32 (m, 14 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.57 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.50 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.67 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 2.95 (m, 16 H, SCH_2CH_2N), 3.11 (s, 72 H, NCH_3), 3.52 (m, 16 H, SCH_2CH_2N). **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.0 (1 $SiCH_3$), -3.8 (2 $SiCH_3$), 13.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 15.2 ($SiCH_2CH_2S$), 18.4, 18.8

(Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 22.6 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 24.2 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 24.6 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 28.2 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 37.7 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 53.6 (N*C*H$_3$), 65.7 (SCH$_2$*C*H$_2$N); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.22, 2.66 (*Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 51.1. **MS:** [M - 8 Cl$^-$]$^{8+}$: 227.15, [M - 7Cl$^-$]$^{7+}$: 265.17, [M - 6Cl$^-$]$^{6+}$: 315.20, [M - 5Cl$^-$]$^{5+}$: 385.23, [M - 4Cl$^-$]$^{4+}$: 491.28, [M - 3Cl$^-$]$^{3+}$: 666.02. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 48.49; H, 9.67; N, 5.32; S, 13.71; Obt.: C, 48.52; H, 9.46; N, 5.43; S, 12.29**.**

HSG$_4$(S-NMe$_3$Cl)$_{16}$ (**26Cl**)

Reagents: Compound **16Cl** (0.08 g, 0.02 mmol) and HCl (0.1 mL, 0.11 mmol). Compound **26Cl** was obtained as yellow solid (0.07 g, 90 %).

C$_{175}$H$_{412}$Cl$_{16}$N$_{16}$OS$_{17}$Si$_{15}$ (4290.83 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H:** δ -0.08 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), 0.05 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.55 (m, 22 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si) 0.89 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.31 (m, 16 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.57 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.68, (m, 16 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 2.95 (m, 18 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SC*H*$_2$CH$_2$N), 3.11 (s, 72 H, NC*H*$_3$), 3.53 (m, 16 H, SCH$_2$C*H*$_2$N). **^{13}C{^{1}H}**: -5.1 (3 Si*C*H$_3$), -4.6 (4 Si*C*H$_3$), not observed (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.6 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.2, 18.4, 18.7, 18.9 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), not observed (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 27.2 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), not observed (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 27.7 (S*C*H$_2$CH$_2$N), not observed (*C*H$_3$COS), not observed (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 53.5 (N*C*H$_3$), 65.7 (SCH$_2$*C*H$_2$N). **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.23, 2.66 (*Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 51.2. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 48.99; H, 9.68; N, 5.22; S, 12.70; Obt.: C, 48.61; H, 9.69; N, 5.28; S, 11.71**.**

4.2.2f. General protocol for HSG$_n$(S-NMe$_2$)$_m$

To a THF solution (ca. 5 mL) of compounds **17-19** was added NaHCO$_3$ and reaction mixtures were stirred at 25ºC during 12 hours. Afterwards, volatiles were removed under vacuum and the residue was dissolved in Et$_2$O. Subsequently brine was added, the organic phase was separate and the aqueous phase was extracted twice with Et$_2$O. The organic phase was washed with brine and dried over MgSO$_4$. The solution was filtered through celite and the volatiles were removed under vacuum.

$HSG_1(S\text{-}NMe_2)_2$ (**20**)

Reagents: Compound **17** (0.51 g, 1.24 mmol and $NaHCO_3$ (0.92 g, 4.98 mmol). Compound **20** was obtained as orange oil (0.47 g, 95 %).

$C_{17}H_{40}N_2S_3Si$ (396.79 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ 0.01 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.54 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.89 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.29 (m, 1 H, *H*S), 1.37 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.61 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.24 (s, 12 H, NC*H*$_3$), 2.59 (m, 14 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2S$, SCH_2CH_2N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.2 ($SiCH_3$), 13.0 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.4 ($SiCH_2CH_2S$), 22.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.1 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.6 ($SiCH_2CH_2S$), 29.7 (SCH_2CH_2N), 37.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 42.9 (NCH_3), 57.3 (SCH_2CH_2N); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.25 (*Si*CH_3); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 27.8. **MS:** $[M + H]^+$: 326.22. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 51.46; H, 10.16; N, 7.06; S, 24.24; Obt.: C, 51.09; H, 9.88; N, 7.09; S, 23.18.

$HSG_2(S\text{-}NMe_2)_4$ (**21**)

Reagents: Compound **18** (0.57 g, 0.55 mmol) and $NaHCO_3$ (0.39 g, 4.67 mmol). After purification compound **21** was obtained as orange oil (0.34 g, 70 %).

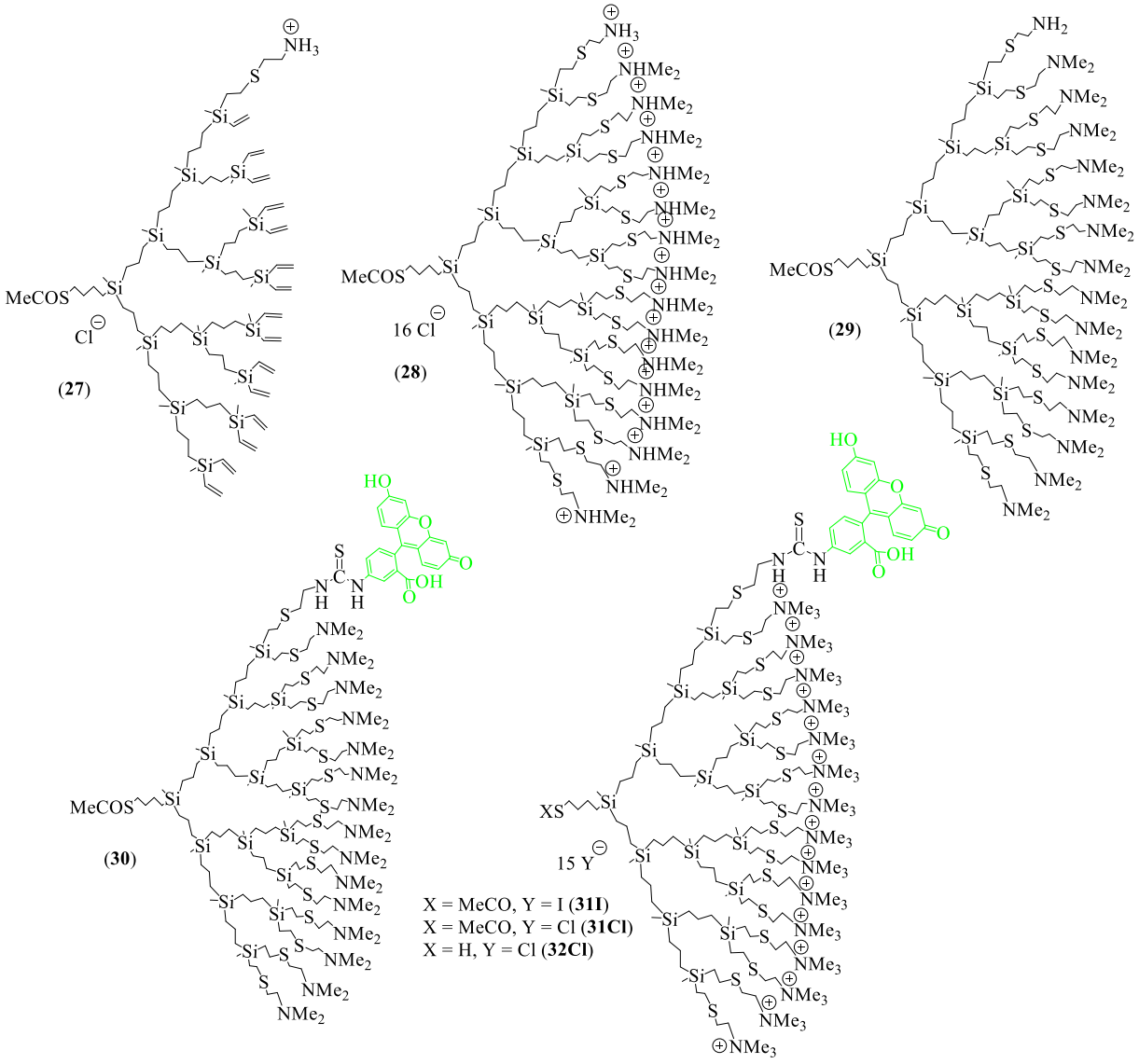
$C_{37}H_{86}N_4S_5Si_3$ (831.69 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.01 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.03 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.52 (m, 10 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.87 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.18 (m, 1 H, *H*S), 1.29 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.60 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.23 (s, 24 H, NC*H*$_3$), 2.53 (m, 26 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2S$, SCH_2CH_2N), **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.1 (1 $SiCH_3$), -5.1 (2 $SiCH_3$), 13.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.7 ($SiCH_2CH_2S$), 18.3, 18.5, 18.7 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 22.7 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.7 ($SiCH_2CH_2S$), 29.8 (SCH_2CH_2N), 37.7 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 42.4 (NCH_3), 59.3 (SCH_2CH_2N)M; **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (1 *Si*CH_3), 2.0 (2 *Si*CH_3); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 27.4. **MS:** $[M + H]^+$: 831.5. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 53.43; H, 10.42; N, 6.74; S, 19.28; Obt.: C, 51.69; H, 9.93; N, 6.59; S, 18.20.

$HSG_3(S\text{-}NMe_2)_8$ (**22**)

Reagents: Compound **19** (0.53 g, 0.26 mmol) and $NaHCO_3$ (0.35 g, 4.22 mmol). Compound **22** was obtained as orange oil (0.32 g, 71 %).

$C_{77}H_{178}N_8S_9Si_7$ (1699.00 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.07(s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.03 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.55 (m, 26 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.90 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.21 (m, 1 H, *H*S), 1.27 (m, 14 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.64 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.27 (s, 48 H, NC*H*$_3$), 2.58 (m, 50 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2S$, SCH_2CH_2N), **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.3 (3 Si*C*H$_3$), -5.0 (4 Si*C*H$_3$), 13.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.6 ($SiCH_2CH_2S$), 18.3, 18.4, 18.8 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 22.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.6 ($SiCH_2CH_2S$), 29.8 (SCH_2CH_2N), 39.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 45.3 (NCH_3), 59.2 (SCH_2CH_2N)M; **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 0.91, 1.62 (3 *Si*CH$_3$), 1.99 (4 *Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 28.4. **MS:** $[M + H]^+$: 1701.9, $[M + Na]^+$: 1723.9. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 54.35; H, 10.54; N, 6.59; S, 16.96; Obt.: C, 53.25; H, 10.26; N, 6.19; S, 17.20.

4.2.2g. Fluorescein labelled dendrons



(MeCOS)G_4V_{15}(S-NH_3Cl) (**27**)

A MeOH solution (ca. 8 mL) of $HS(CH_2)_2NH_2 \cdot HCl$ (0.11 g, 0.06 mmol) was added to a THF solution of compound **4** (0.11 g, 0.06 mmol) in the presence of DMPA (10% per thiol). The reaction mixture was deoxygenated and stirred under ultraviolet light for 1 h. This compound was used for next reaction without isolation.

$C_{97}H_{196}ClNOSSi_{15}$ (1913.49 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.11 (s, 21 H, SiC*H*$_3$), 0.11 (s, 24 H, SiC*H*$_3$), 0.50 (m, 58 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.68 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.92 (m, 2 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.30 (m, 32 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.53 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.29 (s, 3 H,

C*H*$_3$COS), 2.54 (m, 2 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 2.84 (t, , 4 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SC*H*$_2$CH$_2$N) 3.17 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$N), 5.68 (m, 15 H, SiC*H*C*H*$_2$), 6.06 (m, 30 H, SiC*H*C*H*$_2$) 8.46 (br s, N*H*$_3$).

(MeCOS)G$_4$(S-NH$_3$Cl)(S-NMe$_2$·HCl)$_{15}$ (**28**)

Reagents: Compound **27** (0.12 g, 0.06 mmol) and HS(CH$_2$)$_2$NMe$_2$·HCl (0.14 g, 0.95 mmol) (protocol 4.2.2a). Compound **28** was obtained as yellow solid (0.23 g, 89 %).

C$_{157}$H$_{376}$Cl$_{16}$N$_{16}$OS$_{17}$Si$_{15}$ (4038.34 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H**: δ -0.11(s, 21 H, SiC*H*$_3$), 0.01 (s, 24 H, SiC*H*$_3$), 0.51 (m, 58 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.87 (m, 32 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.29 (m, 34 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.49 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.28 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.60 (m, 32 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 2.73 (m, 92 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, NC*H*$_3$), 2.81 (m, 32 H, SC*H*$_2$CH$_2$N) 3.16 (m, 32 H, SCH$_2$C*H*$_2$N); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.2 (7 Si*C*H$_3$), -4.3 (8 Si*C*H$_3$), not observed (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.3 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.5, 18.6 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 25.9 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 27.1 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), not observed (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), not observed (*C*H$_3$COS), 43.0 (N*C*H$_3$), 56.8 (SCH$_2$*C*H$_2$N), not observed (CH$_3$*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.05 (7 *Si*CH$_3$), 2.4 (8 *Si*CH$_3$); **{^{1}H-^{15}N}**: δ 41.2 (*N*Me$_2$·HCl). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 46.70; H, 9.39; N, 5.55; S, 13.50; Obt.: C, 47.64; H, 8.85; N, 5.17; S, 12.24.

(MeCOS)G$_4$(S-NH$_2$)(S-NMe$_2$)$_{15}$ (**29**)

Reagents: **28** (0.169 g, 0.042 mmol) and NaHCO$_3$ (0.11 g, 1.34 mmol) (protocol 4.2.2b). After purification compound **29** was obtained as yellow solid (0.12 g, 85 %).

C$_{157}$H$_{360}$N$_{16}$OS$_{17}$Si$_{15}$ (3455.03 g.mol^{-1}). **NMR (CDCl$_3$): ^{1}H**: δ - 0.10 (s, 21 H, SiC*H*$_3$), -0.04 (s, 24 H, SiC*H*$_3$), 0.52 (m, 56 H, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.60 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.88 (m, 32 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.25 (m, 30 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.41(s, 2H, N*H*$_2$) 1.56 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.25 (s, 96 H, NC*H*$_3$), 2.29 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.57 (m, 96 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S, SC*H*$_2$C*H*$_2$N), 2.84 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 3.44 (m, 2H, SCH$_2$C*H*$_2$NH$_2$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.9 (7 Si*C*H$_3$), -4.4 (8 Si*C*H$_3$), 13.9 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.6 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.4, 18.5 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 23.3 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 27.7 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 29.7 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$*C*H$_2$S, S*C*H$_2$CH$_2$NH$_2$), 30.8 (*C*H$_3$COS), 32.7 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 36.5 (SCH$_2$*C*H$_2$NH$_2$), 45.3

(N*C*H_3), 59.2 (SCH_2*C*H_2N), 198.0 (CH_3*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (7 *Si*CH_3), 2.9 (8 *Si*CH_3). **{^{1}H-^{15}N}**: δ 27.4 (*N*Me_2), not observed (*N*H). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 54.58; H, 10.50; N, 6.49; S, 15.78; Obt.: C, 55.47; H, 10.69; N, 6.41; S, 15.87.

(MeCOS)G_4(S-NHFITC)(S-NMe_2)$_{15}$ (**30**)

To a THF solution (ca. 4 mL) of **29** (0.09 g, 0.03 mmol) was added an ethanol solution of fluorescein isothiocyanate (FITC, 0.01 g, 0.03 mmol) and the mixture was stirred protected from light at 25ºC for 12 hours. Volatiles were removed under vacuum yielding compound **30** as orange oil.

$C_{178}H_{371}N_{17}O_6S_{18}Si_{15}$ (3844.39 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ - 0.10 (s, 21 H, SiC*H*$_3$), 0.05 (s, 24 H, SiC*H*$_3$), 0.51 (m, 56 H, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.60 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.88 (m, 32 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.25 (m, 30 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.56 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.26 (s, 99 H, NC*H*$_3$, C*H*$_3$COS), 2.57 (m, 96 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S, SC*H*$_2$C*H*$_2$N), 2.84 (m, 2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 3.44 (m, 2H, SCH$_2$C*H*$_2$NH$_2$), 6.56, 6.89, 7.60 (9H, m, FITC); **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.9 (7 Si*C*H$_3$), -4.4 (8 Si*C*H$_3$), 13.9 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.6 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.4, 18.5 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 23.3 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 27.7 (S*C*H$_2$CH$_2$N), 29.7 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$*C*H$_2$S, S*C*H$_2$CH$_2$NH$_2$), 30.8 (*C*H$_3$COS), 32.7 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 36.5 (SCH$_2$*C*H$_2$NH$_2$), 45.3 (N*C*H$_3$), 59.2 (SCH$_2$*C*H$_2$N), 115.9, 138.2 (*C*ar-FTIC), 171.0 (*C*O-FTIC), 199.4 (CH$_3$*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.8 (7 *Si*CH_3), 2.7 (8 *Si*CH_3). **{^{1}H-^{15}N}**: δ 27.2 (*N*Me_2), not observed (*N*H).

(MeCOS)G_4(NHFITC)(S-NMe_3I)$_{15}$ (**31I**)

Reagents: Compound **30** (0.11 g, 0.03 mmol) and CH_3I (0.07 g, 0.49 mmol) (protocol 4.2.2c). Compound **31I** was obtained as orange solid (0.12 g, 71 %).

$C_{193}H_{416}I_{15}N_{17}O_6S_{18}Si_{15}$ (5973.49 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ - 0.05 (s, 21 H, SiC*H*$_3$) 0.05 (s, 24 H, SiC*H*$_3$), 0.48 (m, 58 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si) 0.86 (m, 32 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.25 (m, 28 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.51 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.20 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.69 (m, 34 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 2.95 (m, 32 H, SC*H*$_2$CH$_2$N), 3.16 (s, 144 H, NC*H*$_3$), 3.60 (m, 32 H, SCH$_2$C*H*$_2$N), 6.67, 7.08, 7.81 (9H, m, FITC); **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.8 (3 Si*C*H$_3$), -4.1 (4 Si*C*H$_3$), not

observed ($SCH_2CH_2CH_2\mathit{C}H_2Si$), 14.8 ($Si\mathit{C}H_2CH_2S$), 18.6, 18.8, 18.9, ($Si\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2Si$), not observed ($SCH_2CH_2\mathit{C}H_2CH_2Si$), 27.2 ($SiCH_2\mathit{C}H_2S$), not observed ($S\mathit{C}H_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.6 ($S\mathit{C}H_2CH_2N$), not observed ($\mathit{C}H_3COS$), not observed ($SCH_2\mathit{C}H_2CH_2CH_2Si$), 53.0 ($NCH_3$), 65.2 ($SCH_2\mathit{C}H_2N$), not observed ($CH_3\mathit{C}OS$). **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (7 $Si\mathit{C}H_3$), 2.9 (8 $Si\mathit{C}H_3$). **{^{1}H-^{15}N}**: δ 51.3 ($\mathit{N}Me_3$), not observed ($\mathit{N}H$). **UV-Vis (H_2O):** 500.80 nm. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 38.81; H, 7.02; N, 3.99; S, 9.66; Obt.: C, 38.64; H, 6.88; N, 3.66; S, 9.90**.**

$(MeCOS)G_4(S\text{-}NHFITC)(S\text{-}NMe_3Cl)_{15}$ (**31Cl**)

Reagents: Compound **31I** (0.12 g, 0.02 mmol) Amberlite IRA-402 Cl-form ion-exchange resin (8.80 g) (protocol 4.2.2d). Compound **31Cl** was obtained as yellow solid (0.01 g, 98 %).

$C_{193}H_{416}Cl_{15}N_{17}O_6S_{18}Si_{15}$ (4601.67 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.08 (s, 21 H, $SiC\mathit{H}_3$), 0.05 (s, 24 H, $SiC\mathit{H}_3$), 0.55 (m, 58 H, $SCH_2CH_2CH_2C\mathit{H}_2Si$, $SiC\mathit{H}_2CH_2C\mathit{H}_2Si$) 0.89 (m, 32 H, $SiC\mathit{H}_2CH_2S$), 1.31 (m, 28 H, $SCH_2CH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$, $SiCH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$), 2.68 (m, 32 H, $SiCH_2C\mathit{H}_2S$), 2.95 (m, 34 H, $SC\mathit{H}_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SC\mathit{H}_2CH_2N$), 3.11 (s, 144 H, $NC\mathit{H}_3$), 3.53 (m, 32 H, $SCH_2C\mathit{H}_2N$), 6.67, 7.08, 7.81 (9H, m, FITC). **UV-Vis (H_2O):** 500.88 nm. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 50.38; H, 9.11; N, 5.17; S, 12.54; Obt.: C, 50.33; H, 9.09; N, 5.09; S, 12.13**.**

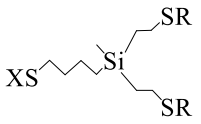
$HSG_4(S\text{-}NHFITC)(S\text{-}NMe_3Cl)_{15}$ (**32Cl**)

Reagents: Compound **31Cl** (0.06 g, 0.01 mmol) and HCl (0.04 mL, 0.08 mmol) (protocol 4.2.2e) (protocol 4.2.2d). Compound **32Cl** was obtained as yellow solid (0.04 g, 84%).

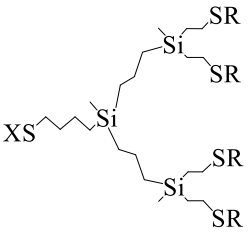
$C_{191}H_{414}Cl_{15}N_{17}O_5S_{18}Si_{15}$ (4559.63 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.09 (s, 21 H, $SiC\mathit{H}_3$), 0.06 (s, 24 H, $SiC\mathit{H}_3$), 0.57 (m, 58 H, $SCH_2CH_2CH_2C\mathit{H}_2Si$, $SiC\mathit{H}_2CH_2C\mathit{H}_2Si$) 0.86 (m, 32 H, $SiC\mathit{H}_2CH_2S$), 1.30 (m, 28 H, $SCH_2CH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$, $SiCH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$), 2.66 (m, 32 H, $SiCH_2C\mathit{H}_2S$), 2.93 (m, 34 H, $SC\mathit{H}_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SC\mathit{H}_2CH_2N$), 3.10 (s, 144 H, $NC\mathit{H}_3$), 3.51 (m, 32 H, $SCH_2C\mathit{H}_2N$), 6.66, 7.06, 7.79 (9H, m, FITC); **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.6 (3 $Si\mathit{C}H_3$), -4.3 (4 $Si\mathit{C}H_3$), not observed ($SCH_2CH_2CH_2\mathit{C}H_2Si$), 14.9 ($Si\mathit{C}H_2CH_2S$), 18.3, 18.5, 18.7, ($Si\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2Si$), not observed ($SCH_2CH_2\mathit{C}H_2CH_2Si$), 27.0 ($SiCH_2\mathit{C}H_2S$), not observed

(S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 27.4 (S*C*H$_2$CH$_2$N), not observed (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 53.2 (N*C*H$_3$), 65.4 (SCH$_2$*C*H$_2$N),. **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.6 (7 *Si*CH$_3$), 2.7 (8 *Si*CH$_3$). **{^{1}H-^{15}N}**: δ 51.4 (*N*Me$_3$), not observed (*N*H). **UV-Vis (H$_2$O):** 500.23 nm. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 50.31; H, 9.15; N, 5.22; S, 12.66; Obt.: C, 50.00; H, 9.09; N, 4.99; S, 12.13**.**

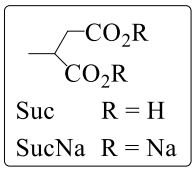
4.2.3. Anionic carbosilane dendrons

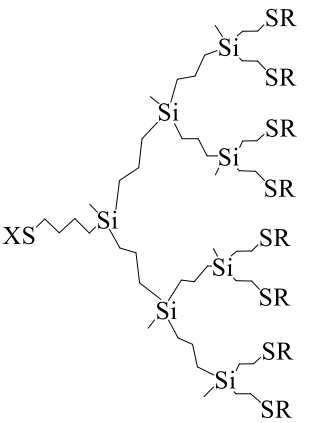


X = MeCO-, R = -(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na (**33**)
X = MeCO-, R = -CH$_2$CO$_2$Me (**36**)
X = MeCO-, R = -Suc (**39**)
X = H-, R = -(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na (**42**)
X = H-, R = -CH$_2$CO$_2$Me (**45**)
X = H-, R = -CH$_2$CO$_2$H (**48**)
X = H-, R = -Suc (**51**)
X = H-, R = -CH$_2$CO$_2$Na (**54**)
X = H-, R = -SucNa (**57**)



X = MeCO-, R = -(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na (**34**)
X = MeCO-, R = -CH$_2$CO$_2$Me (**37**)
X = MeCO-, R = -Suc (**40**)
X = H-, R = -(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na (**43**)
X = H-, R = -CH$_2$CO$_2$Me (**46**)
X = H-, R = -CH$_2$CO$_2$H (**49**)
X = H-, R = -Suc (**52**)
X = H-, R = -CH$_2$CO$_2$Na (**55**)
X = H-, R = -SucNa (**58**)





X = MeCO-, R = -(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na (**35**)
X = MeCO-, R = -CH$_2$CO$_2$Me (**38**)
X = MeCO-, R = -Suc (**41**)
X = H-, R = -(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na (**44**)
X = H-, R = -CH$_2$CO$_2$Me (**47**)
X = H-, R = -CH$_2$CO$_2$H (**50**)
X = H-, R = -Suc (**53**)
X = H-, R = -CH$_2$CO$_2$Na (**56**)
X = H-, R = -SucNa (**59**)

4.2.3a. General protocol for (MeCOS)G$_n$(S-SO$_3$Na)$_m$

An aqueous solution (ca. 8 mL) of HS(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na was added to a THF (ca. 4 mL) solution of compounds **1-3** in the presence of DMPA (10% per thiol). Thiol and DMPA were added in four times (25% at the beginning and 25% after each hour). The reaction mixtures were deoxygenated and stirred under ultraviolet light for 4 h. Volatiles were removed under vacuum and compounds were purified.

(MeCOS)G$_1$(S-SO$_3$Na)$_2$ (**33**)

Reagents: Compound **1** (5.94 g, 2.91 mmol) and HS(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na (1.06 g, 5.94 mmol). Volatiles were removed under vacuum, the residue was dissolved in H$_2$O and excess of Et$_2$O was added, the precipitate was washed with Et$_2$O, yielding **33** as yellow solid (1.19 g, 70 %).

C$_{17}$H$_{34}$Na$_2$O$_7$S$_5$Si (584.84 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H**: δ -0.05 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.53 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.84 (m, 4 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.31 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.52 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 1.92 (m, 4 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$S), 2.27 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.58 (m, 8 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$S), 2.82 (t, J = 7 Hz, 2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.93 (m, 4 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$S); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.6 (Si*C*H$_3$), 12.7 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 14.1 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 22.6 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 24.1 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$S), 26.8 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 28.7 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 29.9 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$S), 30.4 (*C*H$_3$COS), 32.6 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 50.1 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$S), 199.0 (CH$_3$*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.8 (*Si*CH$_3$). **MS:** [M - 2 Na]$^-$: 539.08, [M - 2 Na]$^{2-}$: 539.08. Adequate analytical data could not be obtained for this compound because the final product could not be separated from the starting HS(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na and NaO$_3$S(CH$_2$)$_3$S-S(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na formed in the reaction (the concentration for both impurities were below 5% by NMR spectroscopy).

(MeCOS)G$_2$(S-SO$_3$Na)$_4$ (**34**)

Reagents: Compound **2** (0.52 g, 1.15 mmol) and HS(CH$_2$)$_3$SO$_3$Na (0.85 g, 4.75 mmol). After purification by nanofiltration with cellulose membrane (MWCO = 500 Da) compound **34** was obtained as yellow solid (0.93 g, 69 %).

$C_{35}H_{72}Na_4O_{13}S_9Si_3$ (1165.74 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.12 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), -0.02 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.54 (m, 10 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.84 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.29 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.51 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1,91 (m, 4 H, $SCH_2CH_2CH_2S$), 2.28 (s, 3 H, CH_3COS), 2.56 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2S$), 2.84 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.88 (M, 8 H, $SCH_2CH_2CH_2S$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.3 (1 Si*C*H$_3$), -4.4 (2 Si*C*H$_3$), 13.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.3 ($SiCH_2CH_2S$), 18.4 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 23.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.3 ($SCH_2CH_2CH_2S$) 26.9 ($SiCH_2CH_2S$) 28.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 30.1 ($SCH_2CH_2CH_2S$), 30.5 (CH_3COS), 32.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 50.1 ($SCH_2CH_2CH_2S$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.8, 2.2 (*Si*CH$_3$). **MS:** [M - 4 Na]$^-$: 1075.20. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 36.06; H, 6.23; S, 24.76; Obt.: C, 36.26; H, 6.28; S, 25.02.

$(MeCOS)G_3(S\text{-}SO_3Na)_8$ (**35**)

Reagents: Compound **3** (0.47 g, 0.53 mmol) and $HS(CH_2)_3SO_3Na$ (0.79 g, 4.41 mmol). Purification by nanofiltration with cellulose membrane (MWCO = 1000 Da) allowed to obtain compound **35** as yellow solid (1.01 g, 82 %).

$C_{71}H_{148}Na_8O_{25}S_{17}Si_7$ (2327.47 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.12, (s, 9 H, SiC*H*$_3$), -0.03 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.52 (m, 26 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.83 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.28 (m, 14 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.49 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.89 (m, 16 H, $SCH_2CH_2CH_2S$), 2.26 (s, 3 H, CH_3COS), 2.54 (m, 32 H, $SiCH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2S$), 2.73 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.87 (m, 16 H, $SCH_2CH_2CH_2S$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.2 (3 Si*C*H$_3$), -4.4 (4 Si*C*H$_3$), 13.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.3 ($SiCH_2CH_2S$), 18.5, 18.7 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 23.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.3 ($SCH_2CH_2CH_2S$), 26.9 ($SiCH_2CH_2S$), 28.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 30.2 ($SCH_2CH_2CH_2S$), 30.6 (CH_3COS), 32.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 50.1 ($SCH_2CH_2CH_2S$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.6, 2.4 (*Si*CH$_3$). **MS:** [M + 2 Na]$^{2+}$: 1186.00. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 36.64; H, 6.41; S, 23.42; Obt.: C, 36.66; H, 6.38; S, 24.02.

4.2.4b. General protocol for (MeCOS)G_n(S-CO_2Me)$_m$

A THF solution (ca. 4 mL) of HS(CH_2)CO_2Me was added to a THF solution of compounds **1**-**3** in the presence of DMPA (10% per thiol). The reaction mixtures were deoxygenated and stirred under ultraviolet light for 4 h. Volatiles were removed under vacuum and residues were purified by size-exclusion chromatography using THF as eluent.

(MeCOS)G_1(S-CO_2Me)$_2$ (**36**)

Reagents: Compound **1** (1.94 g, 8.51 mmol) and HS(CH_2)CO_2Me (6.58 g, 17.44 mmol). After purification compound **36** was obtained as orange oil (1.19 g, 70 %).

$C_{17}H_{32}O_5S_3Si$ (440.70 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ 0.01 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.55 (m, 2 H, SCH_2CH_2CH_2C*H*$_2$Si), 0.88 (m, 4 H, SiC*H*$_2$CH_2S), 1.32 (m, 2 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$CH_2Si), 1.56 (m, 2 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2CH_2Si), 2.30 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.63 (m, 4 H, SiCH_2C*H*$_2$S), 2.84 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, SC*H*$_2$CH_2CH_2CH_2Si), 3.22 (m, 4 H, SC*H*$_2$$CO_2$), 3.71 (m, 6 H, CO_2C*H*$_3$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.4 (Si*C*H$_3$), 13.0 (SCH_2CH_2CH_2*C*H$_2$Si), 13.8 (Si*C*H$_2$CH_2S), 22.8 (SCH_2CH_2*C*H$_2$CH_2Si), 28.1 (SiCH_2*C*H$_2$S), 28.6 (S*C*H$_2$CH_2CH_2CH_2Si), 30.7 (*C*H$_3$COS), 33.1 (SCH_2*C*H$_2$CH_2CH_2Si), 33.3 (S*C*H$_2$$CO_2$), 52.4 ($CO_2$*C*H$_3$), 171.0 (*C*$O_2CH_3$) 196.0 (CH$_3$*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.4 (*Si*CH$_3$). **MS:** [M + H]$^+$: 441.12, [M + NH_4]$^+$: 458.15, [M + Na]$^+$: 463.11. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 46.33; H, 7.32; S, 21.82; Obt.: C, 47.57; H, 7.51; S, 21.65.

(MeCOS)G_2(S-CO_2Me)$_4$ (**37**)

Reagents: Compound **2** (1.69 g, 3.72 mmol) and HS$CH_2$$CO_2$Me (5.69 g, 15.08 mmol). Compound **37** was obtained as orange oil (1.82 g, 56 %).

$C_{35}H_{68}O_9S_5Si_3$ (876.28 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.13 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), -0.03 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.48 (m, 10 H, SCH_2CH_2CH_2C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH_2C*H*$_2$Si), 0.84 (m, 8 H, SiC*H*$_2$CH_2S), 1.25 (m, 6 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$CH_2Si, SiCH_2C*H*$_2$CH_2Si), 1.52 (m, 2 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2CH_2Si), 2.26 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.60 (m, 8 H, SiCH_2C*H*$_2$S), 2.80 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, SC*H*$_2$CH_2CH_2CH_2Si), 3.18 (m, 8 H, SC*H*$_2$$CO_2$), 3.67 (m, 12 H, CO_2C*H*$_3$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.5 (1 Si*C*H$_3$), -5.3 (2 Si*C*H$_3$), 13.2 (SCH_2CH_2CH_2*C*H$_2$Si), 13.9 (Si*C*H$_2$CH_2S), 18.1, 18.2,

18.5 (Si*C*H_2*C*H_2*C*H_2Si), 23.1 (SCH_2CH_2*C*H_2CH_2Si), 28.1 (SiCH_2*C*H_2S), 28.6 (S*C*H_2CH_2CH_2CH_2Si), 30.5 (*C*H_3COS), 33.1 (SCH_2*C*H_2CH_2CH_2Si, S*C*H_2CO_2), 52.2 (CO_2*C*H_3), 170.8 (*C*O_2CH_3) 195.8 (CH_3*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (1 *Si*CH_3), 2.4 (2 *Si*CH_3). **MS:** [M + NH_4]$^+$: 894.31. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 47.91; H, 7.81; S, 18.27; Obt.: C, 47.93; H, 7.66; S, 18.19.

(MeCOS)G_3(S-CO_2Me)$_8$ (**38**)

Reagents: Compound **3** (1.52 g, 1.69 mmol) and HSCH_2CO_2Me (5.38 g, 14.25 mmol). Compound **38** was obtained as orange oil (1.65 g, 56 %).

$C_{71}H_{140}O_{17}S_9Si_7$ (1751.02 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.11 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), -0.001 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.51 (m, 26 H, SCH_2CH_2CH_2C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH_2C*H*$_2$Si), 0.87 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH_2S), 1.28 (m, 14 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$CH_2Si, SiCH_2C*H*$_2$CH_2Si), 1.55 (m, 2 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2CH_2Si), 2.28 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.63 (m, 16 H, SiCH_2C*H*$_2$S), 2.83 (M, 2 H, SC*H*$_2$CH_2CH_2CH_2Si), 3.21 (m, 16 H, SC*H*$_2$CO_2), 3.70 (m, 24 H, CO_2C*H*$_3$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.3 (3 Si*C*H_3), -5.0 (4 Si*C*H_3), 13.4 (SCH_2CH_2CH_2*C*H_2Si), 14.0 (Si*C*H_2CH_2S), 18.3, 18.4, 18.9 (Si*C*H_2*C*H_2*C*H_2Si), 23.4 (SCH_2CH_2*C*H_2CH_2Si), 28.2 (SiCH_2*C*H_2S), 28.8 (S*C*H_2CH_2CH_2CH_2Si), 30.7 (*C*H_3COS), 33.2 (SCH_2*C*H_2CH_2CH_2Si, S*C*H_2CO_2), 52.4 (CO_2*C*H_3), 171.0 (*C*O_2CH_3) 196.0 (CH_3*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 0.8 (3 *Si*CH_3), 2.4 (4 *Si*CH_3). **MS:** [M + 2H]$^{2+}$: 876.30, [M + 2 H_2O]$^{2+}$: 893.31, [M + H_2O]$^+$: 1768.62. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 48.70; H, 8.06; S, 16.48; Obt.: C, 47.90; H, 7.09; S, 16.06.

4.2.3c. General protocol for (MeCOS)G_n(S-Suc)$_m$

A THF solution (ca. 10 mL) of compounds **1**-**3** was added HCO_2CH(SH)CH_2CO_2H in the presence of DMPA (10% per thiol). Thiol and DMPA were added in two times (50%at the beginning and 50% after 2 hours). The reaction mixtures were deoxygenated and stirred under ultraviolet light for 4 h. Volatiles were removed under vacuum and residues were purified by size-exclusion chromatography using THF as eluent.

(MeCOS)G_1(S-Suc)$_2$ (**39**)

Reagents: Compound **1** (0.56 g, 2.44 mmol) and HOOCCH(SH)CH_2COOH (0.75 g, 4.97 mmol). After purification compound **39** was obtained as yellow oil (1.20 g, 93 %).

$C_{19}H_{32}O_9S_3Si$ (528.73 g.mol^{-1}). **NMR (CD_3OD): ^{1}H**: δ 0.06 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.63 (m, 2 H, SCH_2CH_2CH_2C*H*$_2$Si), 0.94 (m, 4 H, SiC*H*$_2$CH_2S), 1.41 (m, 2 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$CH_2Si), 1.61 (m, 2 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2CH_2Si), 2.31 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.60, 2.66, 2.89 (m, 6 H, SC*H*$_2$CH_2CH_2CH_2Si, SCHC*H*$_2$CO), 2.76 (m, 4 H, SiCH_2C*H*$_2$S), 3.64 (m, 2 H, SC*H*CH_2CO); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.3 (Si*C*H$_3$), 13.9 (SCH_2CH_2CH_2*C*H$_2$Si), 14.9 (Si*C*H$_2$CH_2S), 23.8 (SCH_2CH_2*C*H$_2$CH_2Si), 28.0 (SiCH_2*C*H$_2$S), 29.4 (S*C*H$_2$CH_2CH_2CH_2Si), 30.6 (*C*H$_3$COS), 34.3 (SCH_2*C*H$_2$CH_2CH_2Si), 37.3 (SCH*C*H$_2$COOH), 42.7 (S*C*HCH_2COOH), 174.3 (SCH*C*OOH), 175.4 (SCHCH_2*C*OOH), 197.8 (CH_3*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 3.1 (*Si*CH$_3$). **MS:** [M + H]$^+$: 529.10, [M + NH_4]$^+$: 546.13, [M + Na]$^+$: 551.09. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 43.16; H, 6.10; S, 18.19; Obt.: C, 44.54; H, 6.96; S, 19.04.

(MeCOS)G_2(S-Suc)$_4$ (**40**)

Reagents: Compound **2** (0.49 g, 1.08 mmol) and HOOCCH(SH)CH_2COOH (0.68 g, 4.53 mmol). Compound **40** was obtained as yellow oil (0.88 g, 77 %).

$C_{39}H_{68}O_{17}S_5Si_3$ (1053.53 g.mol^{-1}): **NMR (CD_3OD): ^{1}H**: δ -0.03 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.07 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.64 (m, 10 H, SCH_2CH_2CH_2C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH_2C*H*$_2$Si), 0.95 (m, 8 H, SiC*H*$_2$CH_2S), 1.41 (m, 6 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$CH_2Si, SiCH_2C*H*$_2$CH_2Si), 1.60 (m, 2 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2CH_2Si), 2.31 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.60, 2.67, 2.89 (m, 18 H, SC*H*$_2$CH_2CH_2CH_2Si, SCHC*H*$_2$CO), 2.77 (m, 8 H, SiCH_2C*H*$_2$S), 3.64 (m, 4 H, SC*H*CH_2CO); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.0 (1 Si*C*H$_3$), -4.7 (2 Si*C*H$_3$), 14.3 (SCH_2CH_2CH_2*C*H$_2$Si), 15.1 (Si*C*H$_2$CH_2S), 19.2, 19.6 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 24.2 (SCH_2CH_2*C*H$_2$CH_2Si), 28.1 (SiCH_2*C*H$_2$S), 29.5 (S*C*H$_2$CH_2CH_2CH_2Si), 30.7 (*C*H$_3$COS), 34.4 (SCH_2*C*H$_2$CH_2CH_2Si), 37.3 (SCH*C*H$_2$COOH), 42.7 (S*C*HCH_2COOH), 174.3 (SCH*C*OOH), 175.4 (SCHCH_2*C*OOH), 197.8 (CH_3*C*OS); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (1 *Si*CH$_3$), 2.4 (2 *Si*CH$_3$). **MS:** [M - 2 H]$^-$: 525.11, [M - H]$^-$: 1051.23. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 45.77; H, 6.90; S, 13.92; Obt.: C, 44.47; H, 7.13; S, 14.11.

(MeCOS)G_3(S-Suc)$_8$ (**41**)

Reagents: Compound **3** (0.98 g, 1.09 mmol) and HOOCCH(SH)CH_2COOH (1.37 g, 9.12 mmol). After purification compound **41** was obtained as yellow oil (1.24 g, 55 %).

$C_{79}H_{140}O_{33}S_9Si_7$ (2103.09 g.mol^{-1}). **NMR (CD_3OD): ^{1}H**: δ -0.02 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), 0.07 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.64 (m, 26 H, SCH_2CH_2CH_2C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH_2C*H*$_2$Si), 0.95 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH_2S), 1.41 (m, 14 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$CH_2Si, SiCH_2C*H*$_2$CH_2Si), 1.60 (m, 2 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2CH_2Si), 2.32 (s, 3 H, C*H*$_3$COS), 2.62, 2.68, 2.90 (m, 34 H, SC*H*$_2$CH_2CH_2CH_2Si, SCHC*H*$_2$CO), 2.77 (m, 16 H, SiCH_2C*H*$_2$S), 3.64 (m, 4 H, SC*H*CH_2CO); **^{3}C{^{1}H}**: δ -5.0 (3 Si*C*H$_3$), -4.5 (4 Si*C*H$_3$), 14.6 (SCH_2CH_2CH_2*C*H_2Si), 15.1 (Si*C*H_2CH_2S), 19.3, 19.7, 19.8 (Si*C*H_2*C*H_2*C*H_2Si), 24.3 (SCH_2CH_2*C*H_2CH_2Si), 28.1 (SiCH_2*C*H_2S), 29.6 (S*C*H_2CH_2CH_2CH_2Si), 30.7 (*C*H$_3$COS), 34.5 (SCH_2*C*H_2CH_2CH_2Si), 37.3 (SCH*C*H_2COOH), 42.7 (S*C*HCH_2COOH), 174.3 (SCH*C*OOH), 175.4 (SCHCH_2*C*OOH); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.4 (3 *Si*CH$_3$), 2.6 (4 *Si*CH$_3$). **MS:** [M + Na]$^+$: 2125.50, [M + K]$^+$: 2141.50. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 45.12; H, 6.71; S, 13.72; Obt.: C, 46.81; H, 7.01; S, 14.01.

4.2.3d. General protocol for focal point deprotection

Deprotection of compounds **42**-**44** was carried out using the same protocol than for cationic dendrons (**17**-**19** y **23**-**26**) (see section 4.2.2e).

HSG_1(S-SO_3Na)$_2$ (**42**)

Reagents: Compound **33** (1.00 g, 1.38 mmol) and HCl (5.1 mL, 10.20 mmol). Compound **42** was obtained as yellow solid (0.88 g, 95 %).

$C_{15}H_{32}Na_2O_6S_5Si$ (542.80 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.07 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.53 (m, 2 H, SCH_2CH_2CH_2C*H*$_2$Si), 0.83 (m, 4 H, SiC*H*$_2$CH_2S), 1.32 (m, 2 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$CH_2Si), 1.52 (m, 2 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2CH_2Si), 1,90 (m, 4 H, SCH_2C*H*$_2$CH_2S), 2.45 (m, 2 H, SiCH_2C*H*$_2$S, SC*H*$_2$CH_2CH_2S, SC*H*$_2$CH_2CH_2CH_2Si), 2.57 (m, 8 H, SiCH_2C*H*$_2$S, SC*H*$_2$CH_2CH_2S), 2.89 (M, 4 H, SCH_2CH_2C*H*$_2$S); **^{13}C{^{1}H}**: δ -6.3 (Si*C*H$_3$), 11.9 (SCH_2CH_2CH_2*C*H_2Si), 13.6 (Si*C*H_2CH_2S), 22.4 (SCH_2CH_2*C*H_2CH_2Si), 24.0

($SCH_2CH_2CH_2S$), 24.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 26.8 ($SiCH_2CH_2S$), 29.3 ($SCH_2CH_2CH_2S$), 36.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 49.8 ($SCH_2CH_2CH_2S$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.7 ($SiCH_3$). **MS:** [M - 2 Na^+]$^-$: 496.5.

$HSG_2(S\text{-}SO_3Na)_4$ (**43**)

Reagents: Compound **34** (0.64 g, 0.55 mmol) and HCl (1.6 mL, 3.27 mmol). Compound **43** was obtained as yellow solid (0.61 g, 98 %).

$C_{33}H_{70}Na_4O_{12}S_9Si_3$ (1123.7 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.10 (s, 3 H, $SiCH_3$), -0.01(s, 6 H, $SiCH_3$) 0.56 (m, 10 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.85 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.32 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.54 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1,92 (m, 8 H, $SCH_2CH_2CH_2S$), 2.57 (m, 18 H, $SiCH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.89 (M, 8 H, $SCH_2CH_2CH_2S$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.4 (1 $SiCH_3$), -4.4 (2 $SiCH_3$), 13.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.5 ($SiCH_2CH_2S$), 18.6, ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 21.0 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 23.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.5 ($SCH_2CH_2CH_2S$), 27.2 ($SiCH_2CH_2S$), 30.3 ($SCH_2CH_2CH_2S$), 36.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 50.2 ($SCH_2CH_2CH_2S$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.8 (1 $SiCH_3$), 2.1 (2 $SiCH_3$). **MS:** [M - 4 Na^+]$^{4-}$: 257.5; [M - 3Na^+]$^{3-}$: 351.06; [M - 2 Na^+]$^{2-}$: 831.51. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 35.27; H, 6.28; S, 25.68; Obt.: C, 35.97; H, 6.47; S, 26.02.

$HSG_3(S\text{-}SO_3Na)_8$ (**44**)

Reagents: Compound **35** (0.81 g, 0.35 mmol) and HCl (1.0 mL, 2.09 mmol). Compound **44** was obtained as yellow solid (0.84 g, 97 %).

$C_{69}H_{146}Na_8O_{24}S_{17}Si_7$ (2285.5 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.11 (s, 9 H, $SiCH_3$), -0.01(s, 12 H, $SiCH_3$) 0.54 (m, 26 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.85 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.30 (m, 16 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.91 (m, 16 H, $SCH_2CH_2CH_2S$), 2.56 (m, 34 H, $SiCH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.88 (M, 16 H, $SCH_2CH_2CH_2S$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.1 (3 $SiCH_3$), -4.3 (4 $SiCH_3$), 13.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.4 ($SiCH_2CH_2S$), 18.6, 19.6 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 21.0 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.4 ($SCH_2CH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.0 ($SiCH_2CH_2S$), 30.2 ($SCH_2CH_2CH_2S$), 39.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 50.1 ($SCH_2CH_2CH_2S$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.1

(3 *Si*CH_3), 2.1 (4 *Si*CH_3). **MS:** $[M - 8\ Na^+]^{8-}$: 262.6; $[M - 7\ Na^+]^{7-}$ 303.4; $[M - 6\ Na^+]^{6-}$: 357.7. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 36.26; H, 6.44; S, 23.85; Obt.: C, 37.01; H, 6.54; S, 24.02.

$HSG_1(S\text{-}CO_2Me)_2$ (**45**)

Reagents: Compound **36** (0.06 g, 0.14 mmol) and HCl (0.2 mL, 0.86 mmol). Compound **45** was obtained as orange oil (0.54 g, 95 %).

$C_{15}H_{30}O_4S_3Si$ (398.67 $g.mol^{-1}$). **NMR ($CDCl_3$): ^1H**: δ 0.02 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.55 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.90 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.30 (m, 1 H, S*H*), 1.37 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.62 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.50 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.65 ($SiCH_2CH_2S$), 3.22 (s, 4 H, SCH_2CO_2), 3.72 (s, 6 H, CO_2CH_3); **$^{13}C\{^1H\}$**: δ -5.5 ($SiCH_3$), 12.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 13.7 ($SiCH_2CH_2S$), 22.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.0 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$) 28.1 ($SiCH_2CH_2S$), 33.2 (SCH_2CO_2), 37.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 52.3 (CO_2CH_3), 170.9 (CO_2CH_3); **{^1H-^{29}Si}**: δ 2.5 (*Si*CH_3). **MS:** $[M]^+$: 399.11. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 45.19; H, 7.59; S, 24.13; Obt.: C, 46.04; H, 7.55; S, 23.94.

$HSG_2(S\text{-}CO_2Me)_4$ (**46**)

Reagents: Compound **37** (0.13 g, 0.143 mmol) and HCl (0.2 mL, 0.86 mmol). Compound **46** was obtained as orange oil (0.11 g, 90 %).

$C_{33}H_{66}O_8S_5Si_3$ (835.44 $g.mol^{-1}$). **NMR ($CDCl_3$): ^1H**: δ -0.12 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), -0.03 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.41 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.52 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.85 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.26 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.56 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.46 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.60 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 3.18 (s, 8 H, SCH_2CO_2), 3.67 (s, 12 H, CO_2CH_3); **$^{13}C\{^1H\}$**: δ -5.0 (1 $SiCH_3$), -4.8 (2 $SiCH_3$), 13.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.2 ($SiCH_2CH_2S$), 18.6, 19.0, ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 22.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 28.5 ($SiCH_2CH_2S$), 33.6 (SCH_2CO_2), 38.0 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 52.6 (CO_2CH_3), 171.1 (CO_2CH_3); **{^1H-^{29}Si}**: δ 1.6 (1 *Si*CH_3), 2.3 (2 *Si*CH_3). **MS:** $[M + NH_4]^+$: 852.30. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 47.44; H, 7.96; S, 19.19; Obt.: C, 48.13; H, 7.80; S, 17.80.

$HSG_3(S\text{-}CO_2Me)_8$ (**47**)

Reagents: Compound **38** (0.25 g, 0.14 mmol) and HCl (0.2 mL, 0.86 mmol). Compound **47** was obtained as orange oil (0.22 g, 92 %).

$C_{69}H_{138}O_{16}S_9Si_7$ (1708.98 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.09 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.01 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.52 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.61 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si),0.89 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.27 (m, 14 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.61 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.52 (m, 2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.63 (m, 16 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 3.22 (s, 16 H, SC*H*$_2$CO$_2$), 3.71 (s, 24 H, CO$_2$C*H*$_3$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.5 (3 Si*C*H$_3$), -5.2 (4 Si*C*H$_3$), 13.8 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 16.1 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 18.2, 18.3, 18.7, (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 22.5 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 24.1 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 28.1 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 33.1 (S*C*H$_2$CO$_2$), 37.6 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 52.2 (CO$_2$*C*H$_3$), 170.8 (*C*O$_2$CH$_3$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.8 (3 *Si*CH$_3$), 2.4 (4 *Si*CH$_3$). **MS:** [M + Na$^+$]$^+$: 1731.5. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 48.49; H, 8.14; S, 16.88; Obt.: C, 49.48; H, 8.62; S, 15.79.

4.2.3e. General protocol for deprotection of focal point and peripheral groups

Compounds **36-41** were suspended in a mixture of NaOH (aqueous solution, 60 eq. per group to deprotect) and THF (v/v = 1:2). The suspension was stirred at 45 ºC for 24 hours. Afterwards, THF was evaporated and the residue was washed with CH_2Cl_2 (5 mL x 3 times). The residue was dissolved in water and hydrochloric acid (4 M) was added until a viscous precipitate was formed. The water was decanted and the viscous precipitate was washed with water (5 mL x 3 times).

$HSG_1(S\text{-}CO_2H)_2$ (**48**)

Reagents: Compound **36** (1.86 g, 4.23 mmol) and NaOH (761.4 mmol). After purification compound **48** was obtained as orange oil (1.44 g, 93 %).

$C_{13}H_{26}O_4S_3Si$ (370.61 g.mol^{-1}). **NMR (CD_3OD): ^{1}H**: δ 0.07 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.62 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.96 (m, 4 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.38 (m, 1 H, S*H*), 1.48 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.65 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.53 (m, 2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.73 (SiCH$_2$C*H*$_2$S), 3.25 (s, 4 H, SC*H*$_2$COOH), not observed (s, 2 H,

COO*H*);**^{13}C{^{1}H}**: δ -5.2 (Si*C*H_3), 13.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 14.8 (Si*C*H_2CH_2S), 23.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$) 28.8 ($SiCH_2CH_2S$), 34.0 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 38.8 (*C*H_2COOH), 174.4 (*C*OOH); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.5 (*Si*CH_3). **MS:** $[M + Na]^+$: 393, $[M - H + Na + NH_4]^+$: 410, $[M - 2 H + Na + 2 NH_4]^+$: 427. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 42.13; H, 7.07; S, 25.95; Obt.: C, 43.26; H, 8.62; S, 27.59.

$HSG_2(S\text{-}CO_2H)_4$ (**49**)

Reagents: Compound **37** (0.65 g, 0.74 mmol) and NaOH (222 mmol). Compound **49** was obtained as orange oil (0.52 g, 90 %).

$C_{29}H_{58}O_8S_5Si_3$ (779.35 g.mol^{-1}). **NMR (CD_3OD): ^{1}H**: δ -0.02 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.07 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.68 (m, 10 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.97 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.45 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.64 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.53 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.73 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 3.26 (s, 8 H, SC*H*$_2$COOH), not observed (s, 2 H, COO*H*);**^{13}C{^{1}H}**: δ -4.9 (1 Si*C*H_3), -4.6 (2 Si*C*H_3), 14.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 15.1 (Si*C*H_2CH_2S), 19.3, 19.6 (Si*C*$H_2CH_2CH_2Si$), 23.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$) 28.9 ($SiCH_2CH_2S$), 34.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 39.5 (*C*H_2COOH), 174.5 (*C*OOH); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.6 (1 *Si*CH_3), 2.5 (2 *Si*CH_3). **MS:** $[M + Na]^+$: 801.00, $[M - H + 2 Na]^+$: 823.00. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 44.69; H, 7.50; S, 20.57; Obt.: C, 44.14; H, 7.90; S, 21.18.

$HSG_3(S\text{-}CO_2H)_8$ (**50**)

Reagents: Compound **38** (0.86 g, 0.49 mmol) and NaOH (264.6 mmol). Compound **50** was obtained as orange oil (0.69 g, 88 %).

$C_{261}H_{122}O_{16}S_9Si_7$ (1594.46 g.mol^{-1}). **NMR (CD_3OD): ^{1}H**: δ -0.01 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), 0.07 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.64 (m, 26 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.96 (m, 16 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.41 (m, 14 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.65 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.72 (m, 10 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2S$), 3.25 (s, 16 H, SC*H*$_2$COOH), not observed (s, 2 H, COO*H*);**^{13}C{^{1}H}**: δ -4.7 (3 Si*C*H_3), -4.5 (4 Si*C*H_3), 14.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 15.1 (Si*C*H_2CH_2S), 19.5, 19.7, 19.9 (Si*C*$H_2CH_2CH_2Si$), 23.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.2 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$) 29.0 ($SiCH_2CH_2S$), 34.2

($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 38.4 (CH_2COOH), 174.3 ($COOH$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.8 (3 $SiCH_3$), 2.7 (4 $SiCH_3$). **MS:** $[M + Na]^+$: 1619.0, $[M - H + Na + NH_4]^+$: 1636.00, $[M - 2 H + Na + 2 NH_4]^+$: 1653.00, $[M - 3 H + Na + 3 NH_4]^+$: 1670.00, $[M - 4 H + Na + 4 NH_4]^+$: 1687.00. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 45.88; H, 7.70; S, 18.07; Obt.: C, 44.96; H, 7.67; S, 18.01.

$HSG_1(S\text{-}Suc)_2$ (**51**)

Reagents: Compound **39** (0.99 g, 1.87 mmol) and NaOH (561 mmol). Compound **51** was obtained as yellow oil (0.83 g, 91 %).

$C_{17}H_{30}O_8S_3Si$ (486.68). **NMR (CD_3OD): ^{1}H**: δ 0.07 (s, 3 H, $SiCH_3$), 0.62 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.95 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.45 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.64 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.52 (t, J = 6.8 Hz, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.62, 2.89 (m, 4 H, $SCHCH_2CO$), 2.77 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 3.62 (m, 2 H, $SCHCH_2CO$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.2 ($SiCH_3$), 13.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 15.0 ($SiCH_2CH_2S$), 23.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 28.0 ($SiCH_2CH_2S$), 37.4 ($SCHCH_2COOH$), 38.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 42.8 ($SCHCH_2COOH$), 174.4 ($SCHCH_2COOH$), 175.5 ($SCHCOOH$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 3.0 ($SiCH_3$). **MS:** $[M - H]^-$: 485.00. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 41.95; H, 6.21; S, 19.76; Obt.: C, 40.26; H, 6.59; S, 19.04.

$HSG_2(S\text{-}Suc)_4$ (**52**)

Reagents: Compound **40** (2.43 g, 2.31 mmol) and NaOH (1247.4 mmol). Compound **52** was obtained as yellow oil (2.10 g, 90 %).

$C_{37}H_{66}O_{16}S_5Si_3$ (1011.49 $g.mol^{-1}$). **NMR (CD_3OD): ^{1}H**: δ -0.02 (s, 3 H, $SiCH_3$), 0.06 (s, 6 H, $SiCH_3$), 0.62 (m, 10 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.94 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.40 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.59 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.51 (2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.66, 2.88 (m, 8 H, $SCHCH_2CO$), 2.75 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 3.62 (m, 4 H, $SCHCH_2CO$), ; **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.4 (1 $SiCH_3$), 5.0 (3 $SiCH_3$), 14.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 15.2 ($SiCH_2CH_2S$), 19.3, 19.7, 19.9 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 23.3 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 24.5 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 28.2 ($SiCH_2CH_2S$), 37.4 ($SCHCH_2COOH$), 38.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 42.7 ($SCHCH_2COOH$), 174.3 ($SCHCOOH$),

175.4 (SCHCH$_2$*C*OOH); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.6 (1 *Si*CH$_3$), 2.8 (2 *Si*CH$_3$). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 43.93; H, 6.58; S, 15.85; Obt.: C, 44.00; H, 6.63; S, 15.91.

HSG$_3$(S-Suc)$_8$ (**53**)

Reagents: Compound **41** (1.21 g, 0.58 mmol) and NaOH (591.6 mmol). Compound **53** was obtained as yellow oil (1.03 g, 86 %).

$C_{77}H_{138}O_{32}S_9Si_7$ (2061.08 g.mol^{-1}). **NMR (CD$_3$OD): ^{1}H**: δ -0.03 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), 0.06 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.65 (m, 26 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.96 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.42 (m, 14 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.61 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.51 (2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.68, 2.90 (m, 32 H, SCHC*H*$_2$CO), 2.75 (m, 16 H, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 3.64 (m, 4 H, SC*H*CH$_2$CO); **^{13}C{^{1}H}**: δ -4.5 (3 Si*C*H$_3$), -5.1 (4 Si*C*H$_3$), 14.6 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$*C*H$_2$Si), 15.1 (Si*C*H$_2$CH$_2$S), 19.3, 19.7, 19.8 (Si*C*H$_2$*C*H$_2$*C*H$_2$Si), 24.3 (SCH$_2$CH$_2$*C*H$_2$CH$_2$Si), 28.1 (SiCH$_2$*C*H$_2$S), 29.6 (S*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 34.5 (SCH$_2$*C*H$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 37.3 (SCH*C*H$_2$COOH), 42.7 (S*C*HCH$_2$COOH), 174.3 (SCH*C*OOH), 175.4 (SCHCH$_2$*C*OOH); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.5 (3 *Si*CH$_3$), 2.9 (4 *Si*CH$_3$). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 44.87; H, 6.75; S, 14.00; Obt.: C, 44.02; H, 7.01; S, 14.01.

4.2.3d. General protocol for HSG$_n$(S-CO$_2$Na)$_m$ and HSG$_n$(S-SucNa)$_m$

To a THF/H$_2$O solution (ca. 10 mL) of compound **48**-**53** NaHCO$_3$ was added and the mixture was stirred at 25ºC during 12 hours. Afterwards, volatiles were removed under vacuum and the residue was dissolved in water and purified by nanofiltration.

HSG$_1$(S-CO$_2$Na)$_2$ (**54**)

Reagents: Compound **48** (1.45 g, 3.90 mmol) and NaHCO$_3$ (0.69 g, 8.19 mmol). After purification by nanofiltration (MWCO = 100-500 Da) compound **54** was obtained as yellow solid (1.29 g, 80 %).

$C_{13}H_{24}Na_2O_4S_3Si$ (414.59 g.mol^{-1}). **NMR (D$_2$O): ^{1}H**: δ 0.00 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.54 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.86 (m, 4 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.35 (m, 1 H, S*H*), 1.37 (m, 2 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.66 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.57 (m, 2 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.65 (SiCH$_2$C*H*$_2$S), 3.17 (s, 4 H, SC*H*$_2$CO$_2$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.4 (Si*C*H$_3$),

13.1 ($SCH_2CH_2CH_2\mathit{C}H_2Si$), 13.9 ($Si\mathit{C}H_2CH_2S$), 22.6 ($SCH_2CH_2\mathit{C}H_2CH_2Si$), 24.0 ($S\mathit{C}H_2CH_2CH_2CH_2Si$) 27.8 ($SiCH_2\mathit{C}H_2S$), 36.9 ($S\mathit{C}H_2CO_2$), 38.5 ($SCH_2\mathit{C}H_2CH_2CH_2Si$), 178.0 ($\mathit{C}O_2Na$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.8 ($\mathit{Si}CH_3$). **MS:** [M+ Na^+ + H^+]$^+$: 415.0; [MNa_2 + Na^+]$^+$: 437.0. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 37.66; H, 5.83; S, 23.20; Obt.: C, 38.01; H, 5.90; S, 23.50.

$HSG_2(S\text{-}CO_2Na)_4$ (**55**)

Reagents: Compound **49** (0.56 g, 0.71 mmol) and $NaHCO_3$ (0.36 g, 4.28 mmol). Compound **55** was obtained as yellow solid (0.47 g, 76 %).

$C_{29}H_{54}Na_4O_8S_5Si_3$ (867.27 g.mol^{-1}). **NMR ($CDCl_3$): ^{1}H**: δ -0.08 (s, 3 H, $SiC\mathit{H}_3$), -0.02 (s, 6 H, $SiC\mathit{H}_3$), 0.48 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2C\mathit{H}_2Si$), 0.57 (m, 8 H, $SiC\mathit{H}_2CH_2C\mathit{H}_2Si$), 0.86 (m, 8 H, $SiC\mathit{H}_2CH_2S$), 1.33 (m, 6 H, $SCH_2CH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$, $SiCH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$), 1.65 (m, 2 H, $SCH_2C\mathit{H}_2CH_2CH_2Si$), 2.54 (m, 10 H, $SC\mathit{H}_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2C\mathit{H}_2S$), 3.13 (s, 8 H, $SC\mathit{H}_2CO_2$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.5 (1 $SiCH_3$), -4.8 (2 $SiCH_3$), 13.6 ($SCH_2CH_2CH_2\mathit{C}H_2Si$), 13.9 ($Si\mathit{C}H_2CH_2S$), 18.2, 18.4, ($Si\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2Si$), 22.7 ($SCH_2CH_2\mathit{C}H_2CH_2Si$), 24.1 ($S\mathit{C}H_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.8 ($SiCH_2\mathit{C}H_2S$), 36.9 ($S\mathit{C}H_2CO_2$), 38.8 ($SCH_2\mathit{C}H_2CH_2CH_2Si$), 178.0 ($\mathit{C}O_2Na$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.8 (1 $\mathit{Si}CH_3$), 2.2 (2 $\mathit{Si}CH_3$). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 40.16; H, 6.28; S, 18.49; Obt.: C, 44.14; H, 7.50; S, 17.80.

$HSG_3(S\text{-}CO_2Na)_8$ (**56**)

Reagents: Compound **50** (0.69 g, 0.43 mmol) and $NaHCO_3$ (0.36 g, 4.31 mmol). Compound **56** was obtained as yellow solid (0.68 g, 78 %).

$C_{61}H_{114}Na_8O_{16}S_9Si_7$ (1772.65 g.mol^{-1}). **NMR (CD_3OD): ^{1}H**: δ -0.07 (s, 6 H, $SiC\mathit{H}_3$), 0.00 (s, 12 H, $SiC\mathit{H}_3$), 0.57 (m, 18 H, $SiC\mathit{H}_2CH_2C\mathit{H}_2Si$, $SCH_2CH_2CH_2C\mathit{H}_2Si$), 0.87 (m, 16 H, $SiC\mathit{H}_2CH_2S$), 1.32 (m, 14 H, $SCH_2CH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$, $SiCH_2C\mathit{H}_2CH_2Si$), 1.61 (m, 2 H, $SCH_2C\mathit{H}_2CH_2CH_2Si$), 2.56 (m, 18 H, $SC\mathit{H}_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2C\mathit{H}_2S$), 3.16 (s, 16 H, $SC\mathit{H}_2CO_2$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.2 (3 $SiCH_3$), -4.4 (4 $SiCH_3$), 13.6 ($SCH_2CH_2CH_2\mathit{C}H_2Si$), 13.8 ($Si\mathit{C}H_2CH_2S$), 18.4, 18.6 ($Si\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2\mathit{C}H_2Si$), 22.5 ($SCH_2CH_2\mathit{C}H_2CH_2Si$), 24.0 ($S\mathit{C}H_2CH_2CH_2CH_2Si$), 27.8 ($SiCH_2\mathit{C}H_2S$), 36.9 ($S\mathit{C}H_2CO_2$), 38.6 ($SCH_2\mathit{C}H_2CH_2CH_2Si$),

178.0 (*C*O_2Na); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.1 (3 *Si*CH_3), 2.1 (4 *Si*CH_3). **MS:** $[M + Na]^+$: 1619.41. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 41.33; H, 6.48; S, 16.28; Obt.: C, 41.81; H, 6.78; S, 16.49.

$HSG_1(S\text{-}SucNa)_2$ (**57**)

Reagents: Compound **51** (1.07 g, 1.87 mmol) and $NaHCO_3$ (0.63 g, 8.47 mmol). Compound **57** was obtained as yellow solid (0.98 g, 91 %).

$C_{17}H_{26}Na_4O_8S_3Si$ (574.62 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O)**: **^{1}H** δ -0.05 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.51 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.83 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.33 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.53 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.45 (t, J = 7.1 Hz, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.33, 2.89 (m, 4 H, $SCHCH_2CO$), 2.58 (m, 4 H, $SiCH_2CH_2S$), 3.47 (m, 2 H, $SCHCH_2CO$); **^{13}C{^{1}H}**: δ -6.3 ($SiCH_3$), 11.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 13.5 ($SiCH_2CH_2S$), 21.8 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 23.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 26.7 ($SiCH_2CH_2S$), 36.9 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 40.8 ($SCHCH_2COONa$), 47.4 ($SCHCH_2COONa$), 179.6 ($SCHCH_2COONa$), 179.8 ($SCHCOONa$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 2.8 (*Si*CH_3). **MS:** $[M + Na^+]^+$: 507.06. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 35.53; H, 4.56; S, 16.74; Obt.: C, 35.32; H, 4.43; S, 16.22.

$HSG_2(S\text{-}SucNa)_4$ (**58**)

Reagents: Compound **52** (2.33 g, 2.31 mmol) and $NaHCO_3$ (3.10 g, 36.93 mmol). Compound **58** was obtained as yellow solid (1.91 g, 70 %).

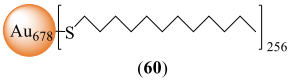
$C_{37}H_{58}Na_8O_{16}S_5Si_3$ (1187.35 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.01 (s, 3 H, SiC*H*$_3$), 0.03 (s, 6 H, SiC*H*$_3$), 0.56 (m, 10 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.82 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.31 (m, 6 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.33 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.35, 2.58, 2.71 (18 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SCHCH_2CO$, $SiCH_2CH_2S$), 3.47 (m, 4 H, $SCHCH_2CO$), ; **^{13}C{^{1}H}**: δ, -4.2 (1 $SiCH_3$), -5.7 (3 $SiCH_3$), 11.4 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 13.9 ($SiCH_2CH_2S$), 18.2, 18.4 ($SiCH_2CH_2CH_2Si$), 21.6 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 23.0 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 26.9 ($SiCH_2CH_2S$), 36.7 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 40.8 ($SCHCH_2COONa$), 47.1 ($SCHCH_2COONa$), 179.5 ($SCHCOONa$), 179.7 ($SCHCH_2COONa$); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 1.7 (1 *Si*CH_3), 2.4 (2 *Si*CH_3). **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 37.43; H, 4.92; S, 13.50; Obt.: C, 38.01; H, 4.96; S, 13.48.

$HSG_3(S\text{-}SucNa)_8$ (**59**)

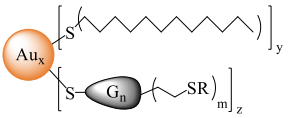
Reagents: Compound **53** (1.41 g, 0.58 mmol) and $NaHCO_3$ (0.98 g, 11.68 mmol). Compound **59** was obtained as yellow solid (0.91 g, 64 %).

$C_{77}H_{122}Na_{16}O_{32}S_9Si_7$ (2412.79 g.mol^{-1}). **NMR (D_2O): ^{1}H**: δ -0.16 (s, 9 H, SiC*H*$_3$), 0.06 (s, 12 H, SiC*H*$_3$), 0.52 (m, 26 H, SCH$_2$CH$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si, SiC*H*$_2$CH$_2$C*H*$_2$Si), 0.81 (m, 16 H, SiC*H*$_2$CH$_2$S), 1.27 (m, 14 H, SCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si, SiCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$Si), 1.52 (m, 2 H, SCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 2.33, 2.57 (50 H, SC*H*$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si, SCHC*H*$_2$CO, SiCH$_2$C*H*$_2$S), 3.45 (m, 4 H, SC*H*CH$_2$CO); **^{13}C{^{1}H}**: δ -5.3 (4 SiCH$_3$), -6.0, 12.7 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 13.7 (SiCH$_2$CH$_2$S), 17.5, 18.1, 18.28 (SiCH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 21.6 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 22.6 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 26.8 (SiCH$_2$CH$_2$S), 36.8 (SCH$_2$CH$_2$CH$_2$CH$_2$Si), 40.8 (SCHCH$_2$COONa), 47.3 (SCHCH$_2$COONa), 179.5 (SCHCOONa), 179.7 (SCHCH$_2$COONa); **{^{1}H-^{29}Si}**: δ 0.9 (3 *Si*CH$_3$), 2.3 (4 *Si*CH$_3$). **MS:** $[M + 6Na^+]^{6+}$: 375.08, $[M + 5Na^+]^{5+}$: 459.08, $[M + 4Na^+]^{4+}$: 563.10, $[M + 3Na^+]^{3+}$: 751.14, $[M + 2Na^+]^{2+}$: 1160.17. **Elemental Analysis:** Calcd.: C, 38.33; H, 5.10; S, 11.96; Obt.: C, 38.56; H, 5.18; S, 12.02.

4.2.4. Metal Nanoparticles

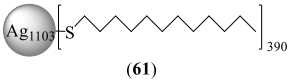


(**60**)

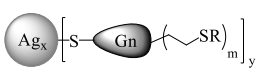


n = 2, m = 4, R = -$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (**62**)
n = 2, m = 4, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**67**)
n = 1, m = 2, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**74**)
n = 2, m = 4, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**75**)
n = 3, m = 8, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**76**)
n = 2, m = 4, R = -CH_2CO_2Me (**80**)

n = 1, m = 2, R = -$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (**63**)
n = 2, m = 4, R = -$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (**64**)
n = 3, m = 8, R = -$(CH_2)_2NMe_2$·HCl (**65**)
n = 1, m = 2, R = -$(CH_2)_2NMe_2$ (**66**)
n = 1, m = 2, x = 338, y = 94, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**68I**)
n = 2, m = 4, x = 4599, y = 2335, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**69I**)
n = 3, m = 8, x = 3416, y = 1952, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**70I**)
n = 1, m = 2, x = 180, y = 59, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**68Cl**)
n = 2, m = 4, x = 329, y = 132, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**69Cl**)
n = 3, m = 8, x = 247, y = 123, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**70Cl**)
n = 1, m = 2, x = 427, y = 140, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**77a**)
n = 1, m = 2, x = 1441, y = 255, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**77b**)
n = 2, m = 4, x = 1214, y = 121, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**78**)
n = 3, m = 8, x = 834, y = 41, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**79**)
n = 2, m = 4, R = -CH_2CO_2Me (**81**)
n = 1, m = 2, x = 1090, y = 206, R = -CH_2CO_2Na (**82**)
n = 2, m = 4, x = 3416, y = 648, R = -CH_2CO_2Na (**83**)
n = 3, m = 8, x = 3702, y = 356, R = -CH_2CO_2Na (**84**)



(**61**)



n = 1, m = 2, x = 143, y = 36, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**71Cl**)
n = 2, m = 4, x = 788, y = 165, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**72Cl**)
n = 3, m = 8, x = 1792, y = 557, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**73Cl**)

For MNPs synthesis three different approaches were used depending on the desired systems (see *Chapter II* section 2.3.1).

4.2.4a. Direct biphasic method

To an aqueous solution of salts containing the metallic ions ($HAuCl_4$ or $AgNO_3$) was added a toluene solution of tetraoctylammonium bromide (TOABr) and the solution was stirred during one hour to transfer the metallic ions to the organic layer. Afterwards, thiol was added to the mixture, followed by the dropwise addition of a freshly water solution of $NaBH_4$ under vigorous stirring, the mixture was stirred for a further 4 hours. The volatiles were removed under vacuum until 5 mL and nanoparticles were precipitated with ethanol (dodecanethiolated nanoparticles) or hexane (protected with dendrons). Compounds were stored in organic solution at 4 ºC (toluene (dodecanethiolated nanoparticles) or hexane (nanoparticles protected with dendrons)).

4.2.4b. One-pot direct method

To a $HAuCl_4$ deoxygenated water solution was added dropwise a deionized aqueous solution of carbosilane dendrons with thiol at the focal point. Afterward, $NaBH_4$ aqueous solution was added dropwise, and the mixture was stirred another 4 h. Nanoparticles were purified by dialysis (MWCO 10 kDa) and MNPs were stored in deionized water at 4 ºC.

4.2.4c. Ligand exchange method

To a solution of AuNPs **60** (see below) covered with dodecanethiolated ligands was added a deionized aqueous solution of carbosilane dendrons with thiol at the focal point under argon. The mixture was stirred at room temperature until the exchange of ligands was complete (the exchange of ligands can be easily observed by the transferred of dark colour from the organic phase to the aqueous phase). Upon complexion of exchange reaction, the layers were separated, and the aqueous layer was washed with dichloromethane (2 x 5 mL). Afterwards, the aqueous phase was evaporated and the residue obtained was purified by dialysis (MWCO 10 kDa). Compounds were stored in deionized water at 4 ºC).

$Au_{678}(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_{256}$ (**60**)

Protocol: 4.2.4a. Reagents: $HAuCl_4$ (30 mL, 0.90 mmol, 30 mM), TOABr (80 mL, 4.00 mmol, 50 mM), dodecanethiol (0.20 g, 1.00 mmol) and $NaBH_4$ (25 mL, 5.00 mmol, 200 mM). Compound **60** was obtained as a black powder (0.22 g).

$Au_{678}(C_{12}H_{25}S)_{256}$ (Av.Mw.185097 g.mol^{-1}). **^{1}H NMR ($CDCl_3$):** δ 0.86 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH_3$), 1.24 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH3$). **Au/L reactant molar ratio** = 1:1. **Elemental analysis Obt.:** C, 17.44; H, 3.38; S, 2.78. **TGA (%):** Au, 72.17; (L), 27.83. **Calc. molar ratio Au/L** = 2.65:1 in the nanoparticles (see Chapter II, section 2.3.2a). **UV-Vis (SPR):** 515.45 nm. **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 2.8 nm. Calculation of the number of gold atoms: $\boldsymbol{N_{Au}}$ = (59 atoms/nm^3)(4/3π)(D/2)^3 = 678. Calculation of thiolate ligands $\boldsymbol{N_L}$ = N_{Au}/(Au/L) = 678/2.65 = 256.

$Ag_{1103}(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_{390}$ (**61**)

Protocol: 4.2.4a. Reagents: $AgNO_3$ (30 mL, 0.90 mmol, 30 mM), dodecanethiol (0.20 g, 1.00 mmol) and $NaBH_4$ (25 mL, 5.00 mmol, 200 mM). Compound **61** was obtained as a black powder (0.23 g).

$Ag_{1103}(C_{12}H_{25}S)_{390}$ (Av.Mw.197855.52 g.mol^{-1}). **^{1}H NMR ($CDCl_3$):** δ 0.86 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH_3$), 1.24 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH3$). **Ag/L reactant molar ratio** = 1:1. **Elemental analysis Obt.:** C, 37.29; H, 6.62; S, 8.05. **TGA (%):** Ag, 60.11; (L), 39.89. **Calc. molar ratio Au/L** = 1.87:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 445.6 nm. **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 3.3 nm. Calculation of the number of gold atoms: $\boldsymbol{N_{Ag}}$ = (58.6 atoms/nm^3)(4/3 π)(D/2)^3 = 1103. Calculation of thiolate ligands $\boldsymbol{N_L}$ = N_{Ag}/(Au/L) = 1103/2.83 = 390.

$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_2(NMe_2{\cdot}HCl)_4)_z)$ (**62**)

Protocol: 4.2.4c. Reagents: Compound **60** (0.05 g, 10 mL in CH_2Cl_2 and compound **17** (0.14 g, 0.14 mmol, 10 mL). Compound **62** was obtained as a black powder.

^{1}H NMR (D_2O): δ -0.09 (s, 3 H, $SiCH_3$), 0.04 (s, 6 H, $SiCH_3$), 0.458 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.88 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.30 (m,

$SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.18, 2.57 (m, $SiCH_2CH_2S$, SCH_2CH_2N, NCH_3, SCH_2CH_2N). **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 2.4 nm.

$Au_x(S\text{-}G_1(S\text{-}NMe_2{\cdot}HCl)_2)_y$ (**63**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (15 mL, 0.45 mmol, 30 mM), compound **17** (40 mL, 0.50 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (12.5 mL, 2.50 mmol, 200 mM). After purification compound **63** was obtained (0.17 g).

^{1}H NMR (D_2O): δ 0.09 (s, $SiCH_3$), 0.61 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.92 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.50 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.79 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.66 (m, $SiCH_2CH_2S$), 2.87 (m, NCH_3, SCH_2CH_2N), 3.33 (4 H, SCH_2CH_2N. **Au/L reactant molar ratio** = 1:1. **UV-Vis (SPR):** 525.9 nm. **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 2.9 nm.

$Au_x(S\text{-}G_2(S\text{-}NMe_2{\cdot}HCl)_4)_y$ (**64**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (15 mL, 0.45 mmol, 30 mM), compound **18** (40 mL, 0.50 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (12.5 mL, 2.50 mmol, 200 mM). After purification compound **64** was obtained (0.26 g).

^{1}H NMR (D_2O): δ -0.05 (s, 1 $SiCH_3$), 0.05 (s, 3 $SiCH_3$), 0.59 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.90 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 1.34 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.71 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2S$), 2.82 (m, SCH_2CH_2N, NCH_3), 3.12 (m, 4 H, SCH_2CH_2N). **Au/L reactant molar ratio** = 1:1. **UV-Vis (SPR):** 532.8 nm. **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 6.7 nm.

$Au_x(S\text{-}G_3(S\text{-}NMe_2{\cdot}HCl)_8)_y$ (**65**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (15 mL, 0.45 mmol, 30 mM), compound **19** (40 mL, 0.50 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (12.5 mL, 2.50 mmol, 200 mM). After purification compound **65** was obtained (0.45 g).

^{1}H NMR (D_2O): δ -0.09 (s, 3 $SiCH_3$), 0.05 (s, 4 $SiCH_3$), 0.55 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.89 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.30 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2S$), 2.64 (m, $SiCH_2CH_2S$), 2,78, 2.86 (m, $SiCH_2CH_2N$, NCH_3), 3.21 (m, SCH_2CH_2N. **Au/L**

reactant molar ratio = 1:1. **SPR (Uv-visible):** 548.8 nm. **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 2.3 nm.

$Au_x(S\text{-}G_2(S\text{-}NMe_2)_4)_y$ (**66**)

Protocol: 4.2.4a. Reagents: $HAuCl_4$ (8.8 mL, 0.26 mmol, 29.5 mM), TOABr (21.2 mL, 1.06 mmol, 50 mM), compound **66** (0.26 mmol in a minimal quantity of toluene) and $NaBH_4$ (6.3 mL, 1.30 mmol, 208 mM). Nanoparticles were precipitated from the solution with hexane and were just partially soluble in DMSO but not soluble in THF, ether or CH_2Cl_2.

Mean diameter of gold core (TEM): D = 1.88 nm. **SPR** (Uv-visible): 538.1 nm.

$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_2(NMe_3^+)_4)_z)$ (**67**)

Protocol: 4.2.4c. Reagents: compound **60** (0.005 g, 10mL in CH_2Cl_2) and compound **24I** (0.19 g, 0.14 mmol). After purification compound **67** was obtained (0.12 g).

NMR (DMSO-d_6): ^{1}H: δ - 0.07 (s, 1 SiCH_3) 0.05 (s, 2 SiCH_3), 0.54 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.64 (m, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.86 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.30 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.58 (m, 2 H, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.65 (m, $SiCH_2CH_2S$), 2.91 (m, SCH_2CH_2N), 3.14 (s, NCH_3), 3.59 (m, SCH_2CH_2N.

$Au_{1338}(SG_1(S\text{-}NMe_3I)_2)_{94}$ (**68I**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (13.1 mL, 0.39 mmol, 30 mM), compound **23I** (34.8 mL, 0.44 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (10.9 mL, 2.17 mmol, 200 mM). After purification compound **68I** (0.11 g).

$Au_{1338}(C_{19}H_{45}I_2N_2S_3Si)_{94}$ (Av.Mw.130461.46 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ 0.07 (s, 1 SiCH_3) 0.58 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.90 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.37 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.70 (m, $SiCH_2CH_2S$), 2.95 (m, SCH_2CH_2N), 3.12 (s, NCH_3), 3.53 (m, SCH_2CH_2N). **Au/L reactant molar ratio** = 1:1. **Elemental analysis. Obt.:** C, 23.34; H, 4.74; N, 2.72; S, 8.01. **TGA (%):** Au, 51.30; (L), 48.70. **Calc. molar ratio Au/L** = 3.63:1 in nanoparticle. **UV-Vis (SPR):** 536.2 nm. **Zeta Potential (mV):** +43.8. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 5.3 nm. N_{Au} = 1338; N_L = 94.

$Au_{4599}(SG_2(S\text{-}NMe_3I)_4)_{2335}$ (**69I**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (5.4 mL, 0.16 mmol, 30 mM), compound **24I** (14.4 mL, 0.18 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (4.5 mL, 0.90 mmol, 200 mM). After purification compound **69I** was obtained (0.28 g).

$Au_{4599}(C_{41}H_{97}I_4N_4S_5Si_3)_{2335}$ (Av.Mw.4171176.44 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ - 0.03 (s, 1 $SiCH_3$) 0.13 (s, 2 $SiCH_3$), 0.49 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.62 (m, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.95 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.36 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.77 (m, $SiCH_2CH_2S$), 3.02 (m, SCH_2CH_2N), 3.19 (s, NCH_3), 3.64 (m, SCH_2CH_2N). **Au/L reactant molar ratio** = 1:1. **Elemental Analysis Obt.:** C, 32.05; H, 6.74; N, 3.48; S, 10.49. **TGA (%):** Au, 21.7; (L), 78.3. **Calc. molar ratio Au/L** = 8.73:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 541.9 nm. **Zeta potential (mV):** +46.1. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 5.3 nm. N_{Au} = 180; N_L = 376.

$Au_{3416}(SG_3(S\text{-}NMe_3I)_8)_{1952}$ (**70I**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (2.0 mL, 0.06 mmol, 30 mM), compound **25I** (5.3 mL, 0.07 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (1.7 mL, 0.66 mmol, 200 mM). After purification compound **70I** was obtained (0.20 g).

$Au_{3416}(C_{41}H_{97}I_4N_4S_5Si_3)_{1952}$ (Av.Mw.6208667.84 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ - 0.04, 0.14 ($SiCH_3$), 0.62 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.94 ($SiCH_2CH_2S$), 1.37 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.66 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.76 ($SiCH_2CH_2S$), 3.02 (SCH_2CH_2N), 3.19 (NCH_3), 3.65 (SCH_2CH_2N). **Au/L reactant molar ratio** = 1:1. **Elemental analysis Obt.:** C, 21.16; H, 4.82; N, 3.98; S, 18.45. **TGA (%):** Au, 21.7; (L), 78.3. **Calc. molar ratio Au/L** = 8.73:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 541.9 nm. **Zeta potential (mV):** +46.1. **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 1.8 nm. N_{Au} = 180; N_L = 376.

$Au_{180}(SG_1(S\text{-}NMe_3Cl)_2)_{59}$ (**68Cl**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (30 mL, 0.90 mmol, 30 mM), compound **23Cl** (80 mL, 1.00 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (25 mL, 5.00 mmol, 200 mM). Compound **68Cl** was obtained as a black powder (0.27 g).

$Au_{180}(C_{19}H_{45}Cl_2N_2S_3Si)_{59}$ (Av.Mw.64761.64 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ - 0.07 ($SiCH_3$), 0.60 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.91 ($SiCH_2CH_2S$), 1.41 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.70 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.70 ($SiCH_2CH_2S$), 2.97 (SCH_2CH_2N), 3.10 (NCH_3), 3.51 (SCH_2CH_2N). **Au/L reactant molar ratio** = 1:1. **TGA (%):** Au, 54.79; (L), 45.21. **Calc. molar ratio Au/L** = 3.05:1 in nanoparticle. **UV-Vis (SPR):** 528.1 nm. **Zeta Potential:** +50.0. **DLS (Z-average d.nm)** = 4.85 nm. **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 1.80 nm. $\boldsymbol{N_{Au}}$ = 180; $\boldsymbol{N_L}$ = 59.

$Au_{329}(SG_2(S\text{-}NMe_3Cl)_4)_{132}$ (**69Cl**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (5.3 mL, 0.16 mmol, 30 mM), compound **24Cl** (13.6 mL, 0.17 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (4.5 mL, 0.90 mmol, 200 mM). After purification compound **69Cl** was obtained as a black powder (0.11 g).

$Au_{329}(C_{41}H_{97}Cl_4N_4S_5Si_3)_{132}$ (Av.Mw.201105.68 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ - 0.01, 0.12 ($SiCH_3$), 0.64 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.92 ($SiCH_2CH_2S$), 1.38 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.72 ($SiCH_2CH_2S$), 2.98 (SCH_2CH_2N), 3.15 (NCH_3), 3.57 (SCH_2CH_2N). **Au/L reactant molar ratio** = 1:1. **TGA (%):** Au, 32.27; (L), 67.73. **Calc. molar ratio Au/L** = 2.50:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 533.7 nm. **Zeta potential (mV):** +63.7. **DLS (Z-average d.nm)** = 15.69 nm. **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 2.2 nm. $\boldsymbol{N_{Au}}$ = 329; $\boldsymbol{N_L}$ = 132.

$Au_{247}(SG_3(S\text{-}NMe_3Cl)_8)_{123}$ (**70Cl**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (5.0 mL, 0.15 mmol, 30 mM), compound **25Cl** (13.6 mL, 0.17 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (4.2 mL, 0.83 mmol, 200 mM). Compound **70Cl** was obtained as a black powder (0.22 g).

$Au_{247}(C_{85}H_{201}Cl_8N_8S_9Si_7)_{123}$ (Av.Mw.307482.94 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ -0.08, 0.05 ($SiCH_3$), 0.55 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.90 ($SiCH_2CH_2S$), 1.35 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.68 ($SiCH_2CH_2S$), 2.95 (SCH_2CH_2N), 3.11 (NCH_3), 3.54 (SCH_2CH_2N). **TGA (%):** Au, 15.83; (L), 84.17. **Calc. molar ratio Au/L** = 2.01:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 543.1 nm. **Zeta potential (mV):** +59.6. **DLS (Z-average d.nm)** = 21.04 nm. **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 2.0 nm. $\boldsymbol{N_{Au}}$ = 247; $\boldsymbol{N_L}$ = 123.

$Ag_{143}(SG_1(S\text{-}NMe_3Cl)_2)_{36}$ (**71Cl**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $AgNO_3$ (16.4 mL, 0.50 mmol, 30 mM), compound **23Cl** (40 mL, 0.50 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (13.5 mL, 2.70 mmol, 200 mM). Compound **71Cl** was obtained (0.11 g).

$Ag_{143}(C_{19}H_{45}Cl_2N_2S_3Si)_{36}$ (Av.Mw.64733309.85 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ 0.06 ($SiCH_3$), 0.60 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.90 ($SiCH_2CH_2S$), 1.40 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.78 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.74 ($SiCH_2CH_2S$), 2.97 (SCH_2CH_2N), 3.10 (NCH_3), 3.50 (SCH_2CH_2N). **Ag/L reactant molar ratio** = 1:1. **TGA (%):** Ag, 46.40; (L), 53.60. **Calc. molar ratio Ag/L** = 3.99:1 in nanoparticle. **UV-Vis (SPR):** 447.8 nm. **Zeta Potential:** +53.4. **DLS (Z-average d.nm)** = 11.70 nm. **Mean diameter of silver core (TEM):** D = 1.7 nm. $\boldsymbol{N_{Ag}}$ = 143; $\boldsymbol{N_L}$ = 36.

$Ag_{788}(SG_2(S\text{-}NMe_3Cl)_4)_{165}$ (**72Cl**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $AgNO_3$ (2.5 mL, 0.08 mmol, 30 mM), compound **24Cl** (5.4 mL, 0.07 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (1.85 mL, 0.37 mmol, 200 mM). Compound **72Cl** was obtained (0.08 g).

$Ag_{788}(C_{41}H_{97}Cl_4N_4S_5Si_3)_{165}$. (Av.Mw.255383.86 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ 0.05, 0.04 ($SiCH_3$), 0.57 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.87 ($SiCH_2CH_2S$), 1.33 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.66 ($SiCH_2CH_2S$), 2.91 (SCH_2CH_2N), 3.08 (NCH_3), 3.47 (SCH_2CH_2N). **Ag/L reactant molar ratio** = 1:1. **TGA (%):** Ag, 33.3; (L), 66.7. **Calc. molar ratio Ag/L** = 4.78:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 415.8 nm. **Zeta**

potential (mV): +41.0. **DLS (Z-average d.nm)** = 18.17 nm. **Mean diameter of silver core (TEM):** D = 3.0 nm. N_{Ag} = 788; N_L = 165.

$Ag_{1792}(SG_3(S\text{-}NMe_3Cl)_8)_{557}$ (**73Cl**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $AgNO_3$ (5.0 mL, 0.15 mmol, 30 mM), compound **25Cl** (11.2 mL, 0.14 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (3.8 mL, 0.76 mmol, 200 mM). Compound **73Cl** was obtained (0.30 g).

$Ag_{1792}(C_{85}H_{201}Cl_8N_8S_9Si_7)_{557}$ (Av.Mw.1365420.42 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ -0.08, 0.04 ($SiCH_3$), 0.55 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$) 0.85 ($SiCH_2CH_2S$), 1.32 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.66 ($SiCH_2CH_2S$), 2.93 (SCH_2CH_2N), 3.10 (NCH_3), 3.49 (SCH_2CH_2N). **Ag/L reactant molar ratio** = 1:1. **TGA (%):** Ag, 14.14; (L), 85.85. **Calc. molar ratio Ag/L** = 3.21:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 445.5 nm. **Zeta potential (mV):** +60.2. **DLS (Z-average d.nm)** = 43.82 nm. **Mean diameter of silver core (TEM)**: D = 3.9 nm. N_{Ag} = 1792; N_L = 557.

$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_1(SO_3Na)_2)_z)$ (**74**)

Protocol: 4.2.4c. Reagents: Compound **60** (0.01 g, 10 mL in CH_2Cl_2) and compound **42** (0.13 g, 0.24 mmol, 10 mL). Compound **74** was obtained as a black powder (0.13 g)

^{1}H NMR (D_2O): δ -0.01 (m, $SiCH_3$), 0.54 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.85 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH_3$, $SiCH_2CH_2S$), 1.37 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH_3$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.59 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 1.92 (m, $SCH_2CH_2CH_2S$), 2.58 (m, $SiCH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.89 (m, $SCH_2CH_2CH_2S$). **Elemental analysis Obt.:** C, 34.12; H, 6.93; S, 26.01. **TGA (%):** Au, 39.68; (L), 60.33. **Zeta potential (mV):** -57. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 1.2 nm.

$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_2(SO_3Na)_4)_z)$ (**75**)

Protocol: 4.2.4c. Reagents: Compound **60** (0.01 g, 10 mL in CH_2Cl_2 and compound **43** (0.27 g, 0.24 mmol, 10 mL). Compound **75** was obtained as a black powder (0.25 g).

^{1}H NMR (D_2O): δ -0.07, 0.01 (m, SiC*H*$_3$), 0.58 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$*H*$_2$Si, SiC*H*$_2CH_2CH_2$*H*$_2$Si), 0.87 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH_3$, SiC*H*$_2CH_2CH_2$S), 1.32 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH_3$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si, $SiCH_2CH_2CH_2$Si, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si), 1.93 (m, $SCH_2CH_2CH_2$S), 2.59 (m, $SiCH_2CH_2$S, SC*H*$_2CH_2CH_2$S, SC*H*$_2CH_2CH_2CH_2$Si), 2.89 (m, $SCH_2CH_2CH_2$S). **Elemental analysis Obt.:** C, 38.32; H, 7.51; S, 23.52. **TGA (%):** Au, 36.34; (L), 63.66. **Zeta potential (mV):** -30.1. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 1.8 nm.

$Au_x((S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y(S\text{-}G_3(SO_3Na)_8)_z)$ (**76**)

Protocol: 4.2.4c. Reagents: Compound **60** (0.01 g, 10 mL in CH_2Cl_2 and compound **44** (0.55 g, 0.24 mmol, 10 mL). Compound **76** was obtained as a black powder (0.35 g).

^{1}H NMR (D_2O): δ -0.08, 0.01 (m, SiC*H*$_3$), 0.55 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$*H*$_2$Si, SiC*H*$_2CH_2CH_2$*H*$_2$Si), 0.88 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH_3$, SiC*H*$_2CH_2CH_2$S), 1.30 (m, $SCH_2(CH_2)_9CH_3$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si, $SiCH_2CH_2CH_2$Si, $SCH_2CH_2CH_2CH_2$Si), 1.93 (m, $SCH_2CH_2CH_2$S), 2.59 (m, $SiCH_2CH_2$S, SC*H*$_2CH_2CH_2$S, SC*H*$_2CH_2CH_2CH_2$Si), 2.89 (m, $SCH_2CH_2CH_2$S). **Elemental analysis Obt.:** C, 39.13; H, 6.46; S, 20.48. **TGA (%):** Au, 41.83; (L), 58.17. **Zeta potential (mV):** -63.9. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 1.0 nm.

$Au_{427}(S\text{-}G_1(S\text{-}SO_3Na)_2)_{140}$ (**77a**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (7.5 mL, 0.22 mmol, 30 mM), compound **42** (20.0 mL, 0.25 mmol, 12.5 mM) and $NaBH_4$ (6.3 mL, 1.25 mmol, 200 mM) Compound **77a** was obtained (0.26 g).

$Au_{427}(C_{15}H_{31}Na_2O_6S_5Si)_{140}$ (Av.Mw.159953 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ 0.06 (SiC*H*$_3$), 0.61 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2$*H*$_2$Si), 0.89 (SiC*H*$_2CH_2CH_2$S), 1.93 ($SCH_2CH_2CH_2$S), 2.60 ($SiCH_2CH_2$S, SC*H*$_2CH_2CH_2$S), 2.90 ($SCH_2CH_2CH_2$S). **Au/L reactant molar ratio** = 1:1. **Elemental analysis Obt.:** C, 21.36; H, 4.12; S, 18.17. **TGA (%):** Au, 52.47; (L), 47.53. **Calc. molar ratio Au/L** = 3.04:1 in the nanoparticles. **Zeta potential (mV):** -22.8. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 2.4 nm. N_{Au} = 427; N_L = 140.

$Au_{1441}(S\text{-}G_1(S\text{-}SO_3Na)_2)_{255}$ (**77b**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (15 mL, 0.45 mmol, 30 mM), compound **42** (40 mL, 0.25 mmol, 6.25 mM) and $NaBH_4$ (12.5 mL, 2.50 mmol, 200 mM). Compound **77b** was obtained (0.26 g).

$Au_{1441}(C_{15}H_{31}Na_2O_6S_5Si)_{255}$. (Av.Mw.421978 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ 0.07 ($SiCH_3$), 0.62 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.90 ($SiCH_2CH_2S$), 1.91 ($SCH_2CH_2CH_2S$), 2.59 ($SiCH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2S$), 2.90 ($SCH_2CH_2CH_2S$). **Au/L reactant molar ratio** = 2:1. **Elemental analysis Obt.:** C, 21.79; H, 4.35; S, 18.56. **TGA (%):** Au, 67.28; (L), 32.71. **Calc. molar ratio Au/L** = 5.65:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 525.9 nm. **Zeta potential (mV):** -31.4. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 3.6 nm. N_{Au} = 1441; N_L = 255.

$Au_{1214}(SG_2(S\text{-}SO_3Na)_4)_{139}$ (**78**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (30 mL, 0.45 mmol, 30 mM), compound **43** (40 mL, 0.13 mmol, 3.25 mM) and $NaBH_4$ (12.5 mL, 2.5 mmol, 200 mM). Compound **78** was obtained (0.34 g).

$Au_{1214}(C_{33}H_{69}Na_4O_{12}S_9Si_3)_{139}$ (Av.Mw.395164.74 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ -0.12, 0.04 ($SiCH_3$), 0.62 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.89 ($SiCH_2CH_2S$), 1.32 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.08 ($SCH_2CH_2CH_2S$), 2.95 ($SiCH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2S$), 2.95 ($SCH_2CH_2CH_2S$). **Au/L reactant molar ratio** = 4:1. **Elemental analysis Obt.:** C, 21.16; H, 4.82; S, 18.45. **TGA (%):** Au, 60.49; (L), 39.51. **Calc. molar ratio Au/L** = 8.73:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 525.6 nm. **Zeta potential (mV):** -29.1. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 3.4 nm. N_{Au} = 1214; N_L = 139.

$Au_{834}(SG_3(S\text{-}SO_3Na)_8)_{47}$ (**79**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (15 mL, 0.45 mmol, 30 mM), compound **44** (40 mL, 0.06 mmol, 1.58 mM) and $NaBH_4$ (12.5 mL, 2.50 mmol, 200 mM). Compound **79** was obtained (0.25 g).

$Au_{834}(C_{69}H_{145}Na_8O_{24}S_{17}Si_7)_{47}$ (Av.Mw.271636.14 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ -0.10, 0.06 ($SiCH_3$), 0.62 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.91 ($SiCH_2CH_2S$), 1.33

($SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.11 ($SCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 2.59 ($SiCH_2CH_2CH_2S$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2S$), 2.87 ($SCH_2CH_2CH_2S$). **Au/L reactant molar ratio** = 8:1. **Elemental analysis Obt.:** C, 22.72; H, 4.69; S, 13.92. **TGA (%):** Au, 60.31; (L), 39.69. **Calc. molar ratio Au/L** = 17.62:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 523.6 nm. **Zeta potential (mV):** -40.1. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 3.0 nm. N_{Au} = 834; N_L = 47.

$Au_xG_2(S\text{-}(CO_2Me)_4)_y(S\text{-}(CH_2)_{11}CH_3)_y$ (**80**)

Protocol: 4.2.4c. Reagents: Compound **60** (0.05 g, 10 mL in CH_2Cl_2) and compound **46** (0.12 g, 0.14 mmol, 10 mL). After purification compound **80** was obtained.

^{1}H NMR ($CDCl_3$): - 0.07 (s, 1 $SiCH_3$), 0.02 (s, 2 $SiCH_3$), 0.57 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.88 (m, $SiCH_2CH_2S$, $SCH_2(CH_2)_{10}CH_3$), 1.29 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.54 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SCH_2(CH_2)_{10}CH_3$), 2.65 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 3.23 (s, SCH_2CO_2), 3.72 (s, CO_2CH_3). **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 2.2 nm.

$Au_xG_2(S\text{-}(CO_2Me)_4)_y$ (**81**)

Protocol: 4.2.4a. Reagents: $HAuCl_4$ (15.0 mL, 0.45 mmol, 30 mM), TOABr (40 mL, 2.00 mmol, 50 mM), compound **46** (0.50 mmol in a minimal quantity of toluene) and $NaBH_4$ (12.5 mL, 2.50 mmol, 200 mM). In this case nanoparticles were precipitated from the solution with hexane but **81** could not be purified (1.16 g).

^{1}H NMR ($CDCl_3$): - 0.09 (s, 1 $SiCH_3$), 0.01 (s, 2 $SiCH_3$), 0.46 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.54 (m, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.85 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.25 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 1.66 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.64 (m, 8 H, $SiCH_2CH_2S$), 3.22 (s, SCH_2CO_2), 3.71 (s, CO_2CH_3). **Mean diameter of gold core** (TEM): D = 1.4 nm. **DLS (Z-average d.nm)** = 50.8 nm. **SPR** (Uv-visible): 520.8 nm.

$Au_{1090}G_1(S\text{-}(CO_2Na)_2)_{206}$ (**82**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (30 mL, 0.90 mmol, 30 mM), compound **54** (80 mL, 0.50 mmol, 6.25 mM) and $NaBH_4$ (25 mL, 5.00 mmol, 200 mM). Compound **82** was obtained (0.17 g).

$Au_{1090}(C_{13}H_{23}Na_2O_4S_3Si)_{206}$. (Av.Mw.299885.94 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** δ 0.09 (s, $SiCH_3$), 0.52 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.81 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.17 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 2.53 ($SiCH_2CH_2S$), 3.09 (s, 4 H, SCH_2CO_2). **Au/L reactant molar ratio** = 2:1. **TGA (%):** Au, 71.57; (L), 28.43. **Calc. molar ratio Au/L** = 5.29:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 521.3 nm. **Zeta potential (mV):** -33.0. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 3.3 nm. N_{Au} = 1090; N_L = 206.

$Au_{3416}G_2(S\text{-}(CO_2Na)_4)_{648}$ (**83**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (30 mL, 0.90 mmol, 30 mM), compound **55** (80 mL, 0.25 mmol, 3.12 mM) and $NaBH_4$ (25 mL, 5.00 mmol, 200 mM). Compound **83** was obtained (0.22 g).

$Au_{3416}(C_{29}H_{53}Na_4O_8S_5Si_3)_{648}$ (Av.Mw.1234158.32 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** -0.02 (s, 1 $SiCH_3$), -0.00 (s, 2 $SiCH_3$), 0.46 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.55 (m, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 0.84 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.20 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.52 (m, $SiCH_2CH_2S$), 3.10 (s, SCH_2CO_2). **Au/L reactant molar ratio** = 4:1. **TGA (%):** Au, 54.41; (L), 4559. **Calc. molar ratio Au/L** = 5.25:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 528.3 nm. **Zeta potential (mV):** -31.0. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 4.8 nm. N_{Au} = 3416; N_L = 648.

$A_{3702}G_3(S\text{-}(CO_2Na)_8)_{356}$ (**84**)

Protocol: 4.2.4b. Reagents: $HAuCl_4$ (30 mL, 0.90 mmol, 30 mM), compound **56** (80 mL, 0.13 mmol, 1.58 mM) and $NaBH_4$ (25 mL, 5.00 mmol, 200 mM). Compound **84** was obtained (0.52 g).

$Au_{3702}(C_{61}H_{113}Na_8O_{16}S_9Si_7)_{356}$ (Av.Mw.1359853.32 $gmol^{-1}$). **^{1}H NMR (D_2O):** -0.05 (s, 3 $SiCH_3$), 0.02 (s, 4 $SiCH_3$), 0.55 (m, $SiCH_2CH_2CH_2Si$, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$), 0.85 (m, $SiCH_2CH_2S$), 1.22 (m, $SCH_2CH_2CH_2CH_2Si$, $SiCH_2CH_2CH_2Si$), 2.54 (m, $SiCH_2CH_2S$), 3.14 (s, SCH_2CO_2). **Au/L reactant molar ratio** = 8:1. **TGA (%):** Au, 53.65; (L), 46.35. **Calc. molar ratio Au/L** = 10.41:1 in the nanoparticles. **UV-Vis (SPR):** 527.9 nm. **Zeta potential (mV):** -42.0. **Mean diameter of gold core (TEM):** D = 4.9 nm. N_{Au} = 3702; N_L = 356.

Chapter V

Summary and conclusions

5.1. INTRODUCTION

Dendrimers are hyperbranched macromolecules that present many potential applications in several fields such as nanotechnology, catalysis, biomedicine, etc. Their properties can be modified by customizing and controlling dendrimers architecture and also chemical composition.[487]

In our research group, cationic and anionic carbosilane dendrimers have been synthesized and used for different biomedical applications. The applications of these compounds in biomedicine depend on the groups localized in the periphery. Thereby, carbosilane dendrimers with cationic groups have been used in gene therapy and as therapeutic agents with antibacterial activity,[112,116,119] while those with anionic groups show important activity as antiviral agents.[120,121]

On the other hand, metal nanoparticles (MNPs) stabilized with different types of ligands have been also extensively studied for their use in biomedical applications. The unique properties of these MNPs such as small size, high surface, unusual optical properties and the possibility to introduce many types of stabilizing ligands to change their composition make them useful for diagnostic and therapeutic applications.[488-491] The use of dendrons as stabilizing agents was studied previously.[34,246]

The goal of this investigation is gold and silver MNPs functionalization with carbosilane dendrons containing cationic and anionic groups at the periphery. The coating of MNPs with dendrons would avoid their aggregation and, at the same time, introduce different functional groups at the periphery that will serve for their applications in biomedicine. For this purpose, to link the surface of MNPs carbosilane dendrons with a thiol, -SH, group at the focal point and both cationic and anionic moieties at the periphery have been synthesized.

All the obtained compounds were characterized by several techniques such as NMR spectroscopy, elemental analysis, IR and mass spectrometry depending on their structure. In the case of MNPs some other techniques, such as TEM, TGA, EPR, UV-vis, and DLS have been also employed. To confirm the ionic nature of the MNPs obtained, zeta potential measurements were also carried out at room temperature.

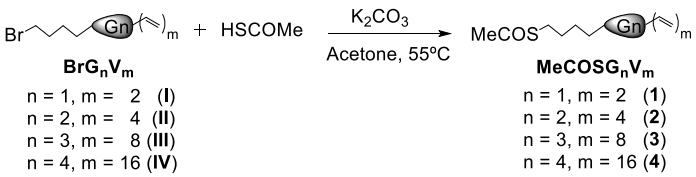
Some of these new systems obtained have been evaluated for their use as therapeutic agents (antibacterial, anticancer and antiviral against HIV), or as nucleic acids carriers for gene therapy against cancer and HIV.

5.2. RESULTS AND DISCUSSION

5.2.1. Carbosilane dendrons

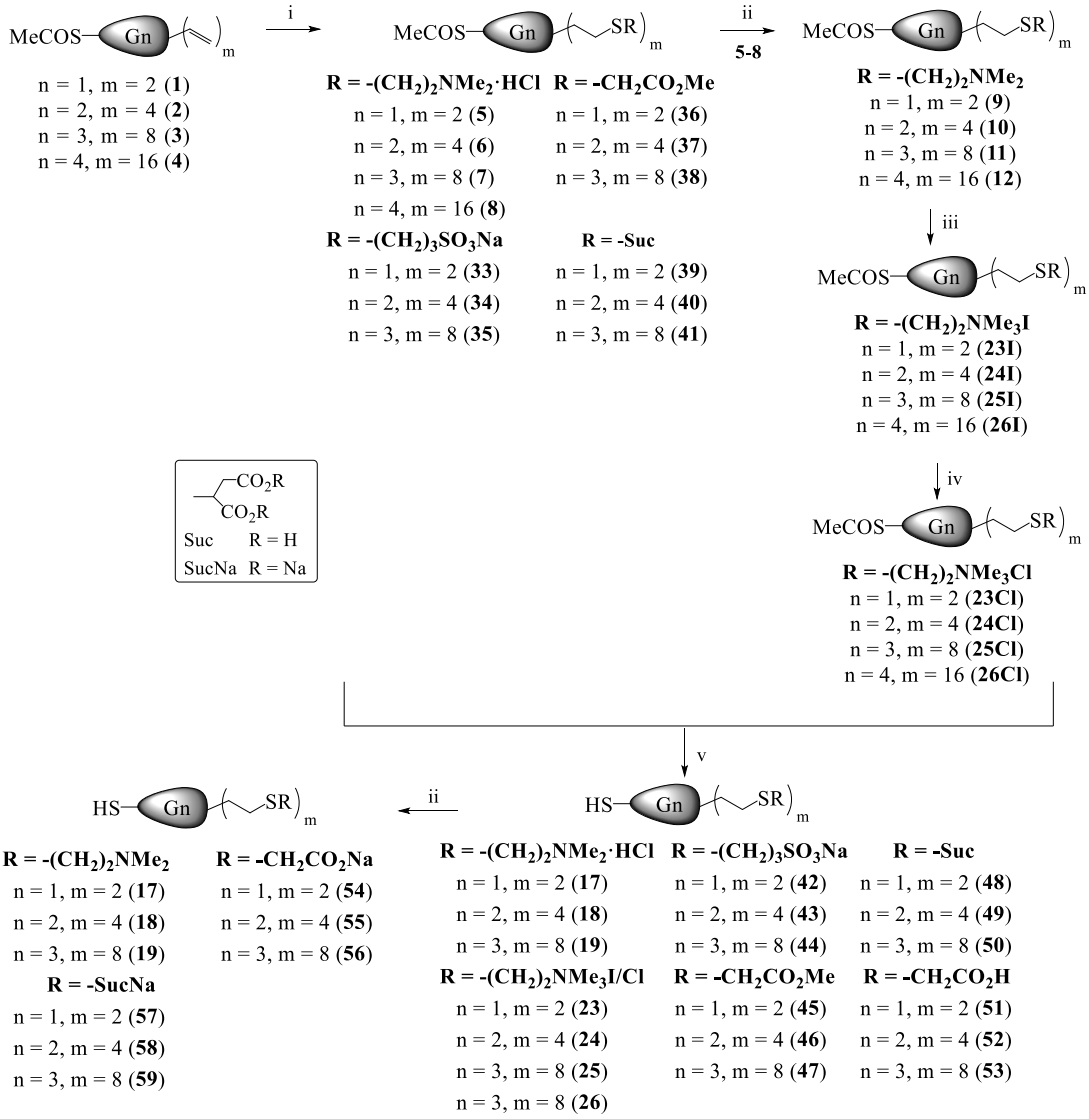
With the aim to stabilize the nanoparticles surface, carbosilane dendrons with cationic and anionic groups at the periphery and a thiol group, -SH, at the focal point have been synthetized. For this purpose, one to four generation dendrons containing Br-C bond at the focal point and vinyl groups at the periphery have been used as starting synthons.[122]

First, through nucleophilic addition reaction the bromine atom was exchange by a MeCOS- group as precursor of -SH function (Scheme 5.1). The use of this precursor group was necessary to avoid interferences of C-Br bond or thiol -SH reactions during functionalization of vinyl peripherals groups.



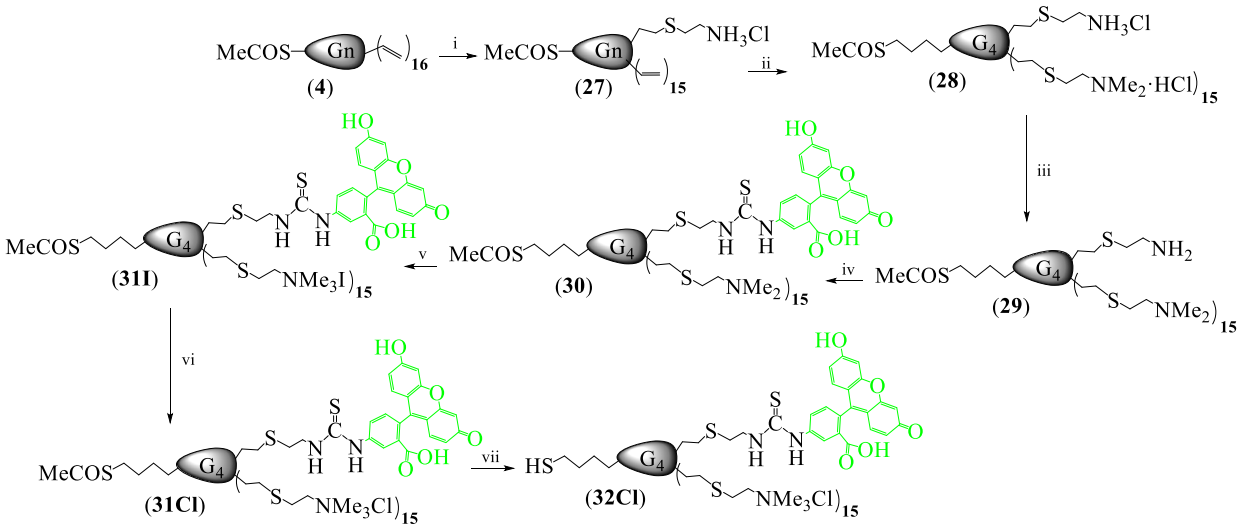
Scheme 5.1. Synthesis of carbosilane dendrons with MeCOS at the focal point

The next step towards the obtention of desired carbosilane dendrons is the introduction of peripheral function as cationic (-NMe_2H^+, -NMe_3^+) and anionic (-CO_2^-, -SO_3^-) or other precursors (-CO_2Me, -CO_2H) of these types of groups. To achieve this goal, click thiol-ene addition reactions have been used. Finally, dendrons with -SH at the focal point were obtained by deprotection of MeCOS- group (Scheme 5.2). This procedure has to be done right before the use of the thiol derivatives because they are relatively unstable and may be oxidized to the corresponding disulfides.[125]



Scheme 5.2. Synthesis of dendrons with cationic and anionic groups at the periphery and -SH at the focal point: i) Thiols, DMPA, *hv*; ii) $NaHCO_3$; iii) CH_3I; iv) Amberlite IRA-402; v) HCl/MeOH or NaOH/ hydrochloric acid

Cationic dendrons of fourth generation labelled with one fluorescein moiety at the periphery have been also synthetized. For this purpose, heterofunctionalization of the corresponding vinyl dendron, $MeCOSG_4V_{16}$, was achieved by two consecutive thiol-ene reaction, one with $HSCH_2CH_2NH_3Cl$ to introduce one single group, and the second with $HS(CH2)_2NMe_2{\cdot}HCl$ to complete the functionalization of the 15 remaining groups. The neutralization of peripherals groups allowed to obtain a dendron with $-NH_2$ group that react with isothiocyanate function present in fluorescein isothiocyanate (FITC) forming a stable thiourea bond in aqueous solutions. Finally, the corresponding cationic dendron was obtained after quaternization with CH_3I, I^- exchange with Amberlite IRA-402 Cl-form ion-exchange resin and posterior deprotection of the focal point (Scheme 5.3).



Scheme 5.3. Synthesis of cationic dendron fluorescein labelled with -SH group at the focal point: i) $HS(CH_2)_2NH_3Cl$, DMPA, *hv*; ii) $HS(CH_2)_2NMe_2{\cdot}HCl$, DMPA, *hv;* iii) $NaHCO_3$; iv) FITC; v) CH_3I; vi) Amberlite IRA-402; vii) HCl/MeOH

5.2.2. Metal nanoparticles

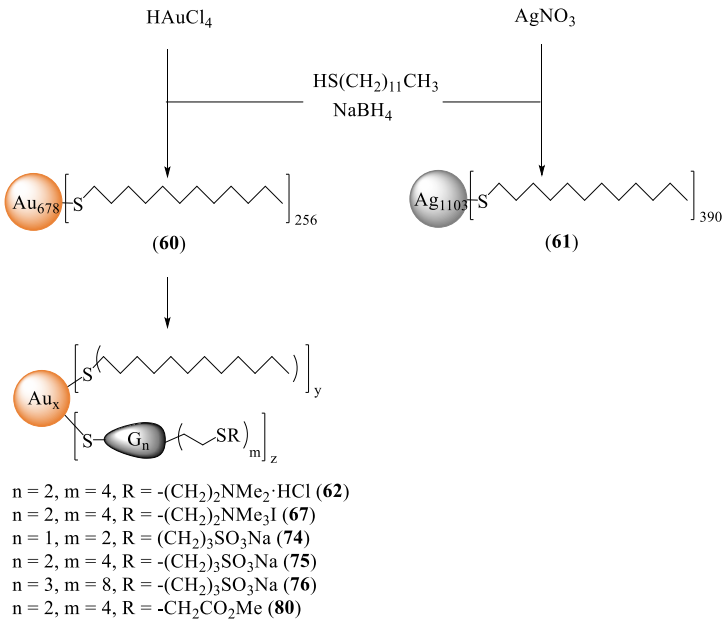
The synthesis of MNPs were carried out according three different approaches:

Direct biphasic method: in this method, the metal ions of the salts are transferred from the aqueous phase to the organic phase using a phase transfer agent. Once transferred, the metal ions are reduced in the presence of protective ligands.[181]

One-pot direct method: in this method the reduction of metal ions is carried out in aqueous phase where both salt containing metal ions and protective ligands are soluble.[188]

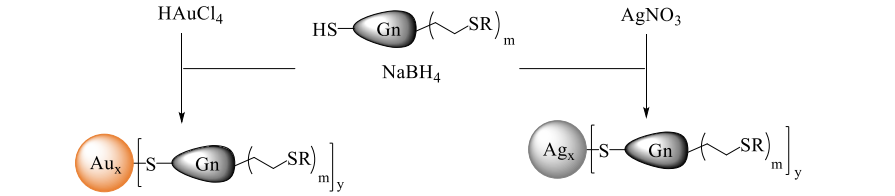
Ligand exchange reaction: in this case, the stabilizing ligands present in preformed MNPs are exchanged by other ligands of interest. [231]

Through direct biphasic method, dodecanethiolate protected MNPs based on gold or silver were obtained. Dodecanethiolate AuNPs were used to synthetized new systems by ligand exchange method. This procedure led to AuNPs with both dodecanethiolate and dendrons as protective ligands (Scheme 5.4).



Scheme 5.4. Synthesis of MNPs by direct biphasic method and obtention of new AuNPs by ligand exchange method with a mixture of dodecanethiolate and carbosilane dendrons as protective ligands

The one-pot direct method has been successfully employed to obtain cationic AuNPs and AgNPs, as well as anionic AuNPs. Precursor AuNPs with -NMe_2, CO_2Me peripherals groups were also obtained, but the treatments of these systems to afford cationic or anionic AuNPs were unsuccessful (Scheme 5.5).



n = 1, m = 2, x = 338, y = 94, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**68I**)
n = 2, m = 4, x = 4599, y = 2335, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**69I**)
n = 3, m = 8, x = 3416, y = 1952, R = -$(CH_2)_2NMe_3I$ (**70I**)
n = 1, m = 2, x = 180, y = 59, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**68Cl**)
n = 2, m = 4, x = 329, y = 132, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**69Cl**)
n = 3, m = 8, x = 247, y = 123, R = -$(CH_2)_2NMe_3Cl$ (**70Cl**)
n = 1, m = 2, x = 427, y = 140, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**77a**)
n = 1, m = 2, x = 1441, y = 255, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**77b**)
n = 2, m = 4, x = 1214, y = 121, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**78**)
n = 3, m = 8, x = 834, y = 41, R = -$(CH_2)_3SO_3Na$ (**79**)
n = 2, m = 4, R = -CH_2CO_2Me (**81**)
n = 1, m = 2, x = 1090, y = 206, R = -CH_2CO_2Na (**82**)
n = 2, m = 4, x = 3416, y = 648, R = -CH_2CO_2Na (**83**)
n = 3, m = 8, x = 3702, y = 356, R = -CH_2CO_2Na (**84**)

Scheme 5.5. Synthesis of MNPs by one-pot direct method and obtention of new AuNPs by ligand exchange method with a mixture of dodecanethiolate and carbosilane dendrons as protective ligands

5.2.3. Biomedical applications

The compounds previously obtained were tested for different biomedical applications.

5.2.3a Cationic Systems biocompatibility with blood cells

Biocompatibility of the systems with different blood cells were performed. The effects of dendronized AuNPs and their dendrons on erythrocytes, platelets and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) confirmed that the surface charges on dendrons have a significant effect on their toxicity, presenting the first generation dendron very low hemolytic values. On the other hand, for dendronized AuNPs higher values were clearly found in the case of the second generation system (**69Cl**). This fact could be related with the highest zeta potential value of **69Cl** as the extent of hemolysis depends on the surface charge.[492] However, in the presence of human serum albumin (HSA), the toxicity of all systems decrease below 10% (after 2 h of treatment). Regarding platelet aggregation, only third generation dendrons (**24Cl**) produced a significant negative effect, although after AuNPs functionalization, the three systems gave higher aggregation than thrombin. Finally, cell proliferation measurements in PBMC indicated that none of the dendrons or AuNPs stimulated lymphocyte proliferation.

The differences observed for dendrons and MNPs could be related to the size of the cells, the type of interaction with them, the system topology and its generation. On one side, platelets are significantly smaller (1-2 μm of diameter) than erythrocytes (8 μm of diameter) and lymphocytes (7-10 μm of diameter for small lymphocytes and 14-20 μm of diameter for large lymphocytes).[455] Thus, for the same concentration, the membrane of smaller cells would be covered with more dendritic systems, which in the case of platelets would affect their response in higher degree. On the other hand, hemolysis is membrane-dependent and could be produced by non-specific interaction,[456,457] while platelets aggregation is receptor-dependent and could be induced by a non-specific factor,[456,457] and lymphocyte proliferation is induced by interleukins, mitogens such as phytohemagglutinins, and by specific antigens.[458,459] Therefore, dendrons and MNPs can directly induce platelets aggregation, while for lymphocytes their interaction with cells induce a cascade of events that includes

the synthesis of antigens, their subsequent release, and receptor-mediated interaction with cells and proliferation.

Regarding topology, the flexibility of dendron framework makes their spreading over cell surfaces easier.[462] For this reason, bigger dendrons cover more cell surface, which would increase the effect on platelet receptors.[463] Dendronized AuNPs (**68Cl-70C**l) are clearly larger than free dendrons, but their gold cores have similar sizes and dendrons covering the AuNPs surface are in fixed random positions. As the number of platelet receptors is limited, these dendrons are less prone to spread over platelet membrane[464] and, therefore, the dendrons attached to AuNPs surface produces similar steric effects in the three AuNPs.[465]

5.2.3b Applications as therapeutics agents

The obtained compounds were used as therapeutic agents for some pathologies. In the case of cationic systems, they were explored as antibacterial and anticancer agents while anionic systems were studied as antiviral agents against HIV.

Antibacterial capacity

The antibacterial activity of cationic dendrons (**23Cl-25Cl**), AuNPs (**68Cl-70Cl**) and AgNPs (**71Cl-73Cl**) have been tested against both in Gram-(+) and Gram-(-) bacteria, as well as, in two strains of Gram-(+) resistant bacteria. Preliminary assays of antifungal activities in two strains of yeast were also performed (Table 5.1).

Table 5.1. List of bacteria and yeast used

	Name	Strain	Description	Abrev.
Gram-(+)	*Staphylococcus aureus S*	ATCC 6538P	Susceptible strain	S. a-S
	Staphylococcus aureus R	ZMFKSK	Multiresistant strain	S. a-R
	Staphylococcus haemolyticus R	ZMF SV212	Multiresistant strain	S. h-R
	Enterobacter fecalis	ZMF BD156	Strain isolated from clinical specimen	E. f
Gram-(-)	*Escherichia coli*	ATCC 8739	Susceptible strain	E. c-S
	Pseudomonas aeuruginosa	ATCC 27853	Susceptible strain	P. a
Yeast	*Candida albicans*	ATCC 10231	Yeast commonly used for such testing	C. a
	Candida glabrata	ZMF40	Yeast isolated from clinical specimen	C. g

The activities obtained for all systems in the different strains of bacteria and yeast are summarized in Table 5.2.

Table 5.2. MIC and MBC values of compounds in Gram-(+), Gram-(-) bacteria and yeasts

		Gram-(+)							
		S. a-S		S. a-R		S. h-R		E. f	
		mg/L							
Charges		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
2	**23Cl**	7.81	31.25	15.62	15.62	31.25	31.25	31.25	62.5
4	**24Cl**	3.9	15.62	3.9	3.9	7.81	15.62	7.81	15.62
8	**25Cl**	7.81	31.25	15.62	15.62	15.62	15.62	31.25	31.25
118	**68Cl**	53.44	106.87	53.44	53.44	26.71	53.44	427.5	427.5
528	**69Cl**	17.11	34.22	34.22	276.6	17.11	34.22	34.22	34.22
984	**70Cl**	17.85	35.83	14.28	28.56	17.85	35.83	35.83	71.4
72	**71Cl**	0.87	1.75	0.87	0.87	0.44	7	1.75	7
660	**72Cl**	26.63	26.62	13.31	106.5	13.31	13.31	26.62	26.62
4456	**73Cl**	20.19	20.19	20.19	20.19	20.19	323	20.19	20.19
	$AgNO_3$	15.65	15.52	7.81	15.62	3.9	7.81	3.9	7.81
	Streptomycin	1.95	7.81	15.62	>500	>500	>500	250	>500

	Gram-(-)			
	E. c		P. a	
	MIC	MBC	MIC	MBC
23Cl	15.62	31.25	250	500
24Cl	7.81	7.81	62.5	62.5
25Cl	31.25	31.25	62.5	62.5
68Cl	106.87	106.87	106.87	213.75
69Cl	34.22	34.22	34.22	34.22
70Cl	35.83	35.83	57.12	57.12
71Cl	0.87	7	1.75	140
72Cl	26.62	53.25	35.5	53.25
73Cl	40.38	323	40.38	161.5
$AgNO_3$	3.9	3.9	7.81	15.62
Streptomycin	15.61	15.62	7.81	7.81

	Yeast			
	C. a		C. g	
	MIC	MBC	MIC	MBC
23Cl	250	250	125	250
24Cl	31.25	250	31.25	62.5
25Cl	31.25	31.25	15.62	31.25
68Cl	1030	1030	1030	1030
69Cl	138.3	276.6	415	415
70Cl	45.57	190.4	47.57	190.4
71Cl	1.75	1.75	1.75	140
72Cl	53.25	53.25	53.25	53.25
73Cl	40.38	40.38	20.19	80.75
$AgNO_3$	3.9	7.81	-	-
Streptomycin	1.95	1.95	-	-

For dendrons, the obtained results show that the second generation system (**24Cl**) was the most effective in all cases. This behavior was observed before in our research group for similar systems and was related to an adequate hydrophobic/hydrophilic balance present in these derivatives.[468]

Regarding MNPs, they showed lower activity than free dendrons except for AgNPs **71Cl** functionalized with dendrons of first generation. These behaviors could be attributed to the presence of a metal core, which cause an increase of rigidity, decreasing the interaction of surface charges with the membrane. However, since the best results of all the systems were obtained for AgNPs (**71Cl**), this system might be releasing Ag^+ ions increasing the antibacterial activity. This behavior was not observed in AgNPs **72Cl** and **73Cl**, probably due to the surface crowding with higher generation dendrons that protect the metallic core avoiding the Ag^+ release.

Anticancer activity

The anticancer activity of dendrons (**23Cl-25Cl**), AuNPs (**68Cl-70Cl**) and AgNPs (**71Cl-73Cl**) were determined using MTT assay. The activity was performed against two types of cancer cell lines: cervical cancer (HeLa), and human colorectal adenocarcinoma (HT29).

The general behavior for all systems was a clear dependence of activity with respect to dendritic generation. IC_{50} values of analyzed compounds for HeLa and HT29 cells are listed in Table 5.3.

Table 5.3. IC_{50} (μM, with respect to dendron for MNPs) in HeLa and HT29 cell lines

		N.-NMe_3^+	**Focal point/ Core**	**IC_{50} (HeLa) μM**	**IC_{50} (HT29) μM**
G_1	**13I**	2	MeCOS-	88.30 ± 13.46	>100
	13Cl	2	MeCOS-	>100	>100
	23I	2	HS-	19.97 ± 1.68	>100
	23Cl	2	HS-	42.39 ± 7.17	>100
	68Cl	118	Au	0.99 ± 0.07	>100
	71Cl	72	Ag	4.38 ± 0.34	>100
G_2	**14I**	4	MeCOS-	4.35 ± 0.95	23.23 ± 3.40
	14Cl	4	MeCOS-	3.71 ± 1.03	17.20 ± 1.44
	24I	4	HS-	1.11 ± 0.15	19.52 ± 1.58
	24Cl	4	HS-	2.84 ± 0.49	20.43 ± 1.60
	69Cl	528	Au	0.64 ± 0.09	4.30 ± 1.60
	72Cl	660	Ag	1.71 ± 0.40	10.70 ± 2.20
G_3	**15I**	8	MeCOS-	0.62 ± 0.04	4.13 ± 0.18
	15Cl	8	MeCOS-	0.84 ± 0.08	2.77 ± 0.21
	25I	8	HS-	0.54 ± 0.08	17.17 ± 2.02
	25Cl	8	HS-	0.13 ± 0.07	15.47 ± 1.42
	70Cl	984	Au	0.44 ± 0.05	9.61 ± 2.61
	73Cl	4456	Ag	0.48 ± 0.12	13.03 ± 4.14

Most compounds exhibit good activity in HeLa, where IC_{50} values of all tested compounds (except for the first generation dendrons **13** and **23**) were below 5 μM, where the percentage of hemolysis was less than 80%. However, in the case of HT29 cells, the anticancer activity of the systems was significantly lower.

In the case of dendrons, the influence of anion (I^- or Cl^-) was not significant, observing a similar activity for both systems. However, the focal point affects the activity and those dendrons presenting a -SH group at focal point showed higher activity. The best activity of all the dendrons was observed for the third generation dendron **25Cl**.

On the other hand, the activity of MNPs depends on the cell line. In HeLa cells, AuNPs showed better activity than AgNPs, being the best activity observed for AuNPs (**70Cl**), functionalized with third generation dendrons. In the case of HT29 cells, the activity was lower than for HeLa. However, second and third generation systems showed moderated activity.

Antiviral activity

Biocompatibility and antiviral activity against HIV of anionic compounds with sulfonate group at the periphery (**42-44** y **74-79**) have been evaluated. The antiviral properties of polyanionic derivatives is related with their ability to bind cationic domains of the CD4 receptor and/or CXCR4 and CCR5 on the target cells receptors, or proteins of the virus envelope (eg. Glycoprotein gp120) preventing binding and fusion of the virus.[469]

The toxicity of the compounds was evaluated by MTT assays in TZM.bl cells, which are a model of the vaginal mucous, representing the first line of defense against HIV infection. In addition to these cells, in the case of AuNPs assays using PBMC as second barrier model were also performed.

Regarding inhibition of infection, TZM-bl and PBMC were used. Infection rates were determined using the assay based on the luminescence intensity by luciferase action. Inhibition measurements were conducted in different viral isolates: the X4 HIV-$1_{NL4.3}$ present mainly in the chronic phase of infection and R5-VIH_{NLAD8} present in the acute phase of the

infection.[470,471] The results obtained in different viral isolates allow to determine whether the inhibitory activity of the systems depends on the type of viral tropism in question.

The viability values of all the systems and their corresponding percentages of inhibition in TZM-bl cells are summarized in Table 5.4. A comparison of the results clearly shows that inhibition capacity of dendronized AuNPs (**77b-79**) was higher than free dendrons (**42-44**), being also able to inhibit both viral isolates. Thus, the process of dendronization enhances the inhibition, being necessary less amount of dendrons to produce the same percentage of inhibition.

Table 5.4. Viability and inhibition values of dendrons (**42-43**) and AuNPs (**77-79**)

42						**77b**							
µg/mL	**µM**	**Viability**		**Inhibition (R5)**	**Inhibition (X4)**	**µg/mL**	**µM**	**Cc with respect to dendron**		**Viability**		**Inhibition (R5)**	**Inhibition (X4)**
		24h	**48h**					**µg/mL**	**µM**	**24h**	**48h**		
5.4×10^{-2}	0.10	100.00	100.00	13.96	8.66	0.01	2.37×10^{-5}	3.27×10^{-3}	6.03×10^{-3}	88.03	90.83	0.00	0.00
0.5428	1.00	100.00	100.00	9.85	1.73	0.10	2.37×10^{-4}	3.27×10^{-2}	6.04×10^{-2}	82.31	88.71	49.64	26.21
2.7140	5.00	100.00	100.00	11.85	40.25	0.50	1.18×10^{-3}	0.1637	0.3026	81.62	83.64	71.48	85.24
5.4280	10.00	100.00	100.00	29.21	76.36	1.00	2.37×10^{-3}	0.3274	0.6043	87.64	83.64	78.58	93.89
10.8560	20.00	100.00	100.00	38.64	95.20	10.00	2.37×10^{-2}	3.2740	6.0428	87.14	81.25	86.75	99.66
43						**78**							
µg/mL	**µM**	**Viability**		**Inhibition (R5)**	**Inhibition (X4)**	**µg/mL**	**µM**	**Cc with respect to dendron**		**Viability**		**Inhibition (R5)**	**Inhibition (X4)**
		24h	**48h**					**µg/mL**	**µM**	**24h**	**48h**		
0.1124	0.10	93.57	93.57	8.84	12.20	0.01	2.67×10^{-5}	3.62×10^{-3}	3.22×10^{-3}	81.84	80.14	18.25	26.82
1.1237	1.00	100.00	100.00	47.67	86.91	0.10	2.67×10^{-4}	3.62×10^{-2}	3.22×10^{-2}	81.04	79.86	59.22	50.18
5.6185	5.00	97.22	97.23	76.66	100.00	0.50	1.33×10^{-3}	0.1812	0.1613	74.60	71.65	59.94	49.68
11.2370	10.00	97.08	97.08	82.67	100.00	1.00	2.67×10^{-3}	0.3623	0.3227	76.50	70.93	80.26	73.63
22.4740	20.00	90.41	90.41	91.30	100.00								
44						**79**							
µg/mL	**µM**	**Viability**		**Inhibition (R5)**	**Inhibition (X4)**	**µg/mL**	**µM**	**Cc with respect to dendron**		**Viability**		**Inhibition (R5)**	**Inhibition (X4)**
		24h	**48h**					**µg/mL**	**µM**	**24h**	**48h**		
0.2286	0.10	74.29	74.30			0.005	1.94×10^{-5}	1.82×10^{-3}	7.97×10^{-4}	81.62	68.68	45.78	37.98
2.2855	1.00	51.67	51.69			0.05	1.94×10^{-4}	1.82×10^{-2}	7.96×10^{-3}	79.82	94.45	72.38	70.54
11.4275	5.00	39.95	39.95			0.10	3.88×10^{-4}	3.63×10^{-2}	1.59×10^{-2}	76.61	90.83	77.32	98.75
22.8550	10.00	32.15	32.15			0.50	1.93×10^{-3}	0.1815	0.0794	69.67	83.74	77.02	100.00
45.7100	20.00	30.67	30.67										

5.2.3c Applications as nucleic acids carriers

Compounds with cationic groups on the periphery ($-NMe_3^+$) are potential candidates for nucleic acid delivery due to the possibility to form complexes by electrostatic interaction with phosphate moieties present in nucleic acids. Regarding this, different assays were performed to determine the efficiency of compounds to form nanoconjugates with siRNAs designed for cancer and HIV gene therapy.

Gene therapy: Cancer

The studies of nanoconjugates formation were performed with antiapoptotic siRNA Bcl-xL (40 negative charges) that specifically inhibits the expression of Bcl-xL gene. This gene prevents apoptosis of tumor cells through two different mechanisms: heterodimerization with apoptotic protein[473,474] and inhibiting its apoptotic effect and pore formation in the mitochondrial outer membrane, helping to maintain a normal state of the membrane under stress.[475] For fluorescence assays, siRNA labelled with fluorescein was used (FAM-Bcl-xL).

The nanoconjugates were formed using dendrons (**23Cl-25Cl**), AuNPs (**68Cl-70Cl**) and AgNPs (**71Cl-73Cl**). The optimal charge ratio compound/siRNA was determined by gel electrophoresis. In the case of dendrons, it was observed that the first generation system (**23Cl**) formed nanoconjugates at higher charge ratio (15:1) than dendrons of second and third generation (**24Cl** and **25Cl**) (4:1). On the other hand, for AuNPs (**69Cl-70Cl**) the same charge ratio was observed for the three systems (3:1), whereas, for AgNPs (**71Cl-73Cl**), systems functionalized with first and third generation dendrons lower charge ratios (2:1 and 3:1) where needed than those functionalized with second generation dendrons (**72Cl**) (8:1) (Fig.5.1).

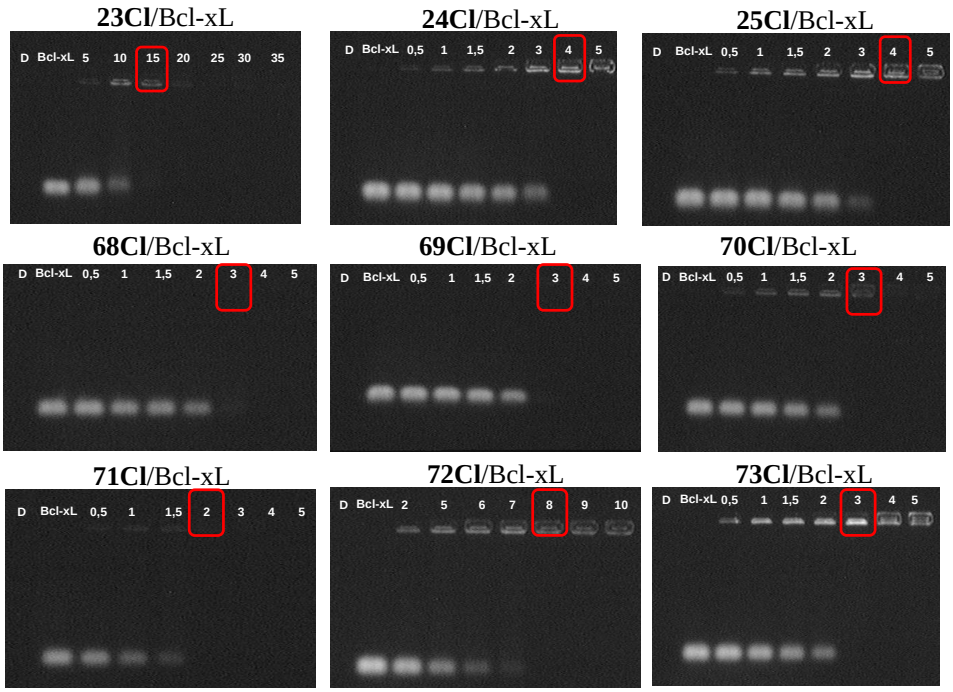


Figure 5.1. Agarose gel electrophoresis of nanoconjugates form with dendrons (**23Cl-25Cl**/Bcl-xL) AuNPs (**69Cl-70Cl**/Bcl-xL) and AgNPs (**71Cl-73Cl**/Bcl-xL) at different negative/positive charge ratio after an incubation period of 15 minutes

Fluorescence assays were also performed to confirm the charge ratios observed by gel electrophoresis. For dendrons (**23Cl-25Cl**), the results obtained for optimal charge ratios agreed with those obtained by electrophoresis on agarose gel, observing nanoconjugates formation at charge ratios of 9, 4 and 3 respectively (Fig.5.2 a).

Regarding MNPs, the quenching of fluorescence was observed, probably due to the presence of metallic cores. In this case, fluorescence polarization is not an appropriate measurement. However, fluorescence intensity spectra (500-600 nm) were performed to determine the optimal charge ratios of nanoconjugates formation through fluorescence quenching. Fluorescence intensities were normalized as F_0/F, where F is the fluorescence intensity of Bcl-xL-FAM in the presence of MNPs and F_0 is the Bcl-xL-FAM free. The optimal charge ratios for nanoconjugates formation are those in which a constant value in the extinction of the fluorescence is observed. The AuNPs (**68Cl-69Cl**) and AgNPs (**71Cl-73Cl**) show the same extinction profile with Bcl-xL siRNA-FAM. Again, the values of optimal charge ratios for the formation of the nanoconjugates agreed with those obtained by gel electrophoresis. In the case of AuNPs (**68Cl-70Cl**), they were 2.5, 3, 3.5, respectively, while for AgNPs (**71Cl-73Cl**) optimal charge ratios were 2.5, 4.5 and 3.5. (Fig.5.2 b-c).

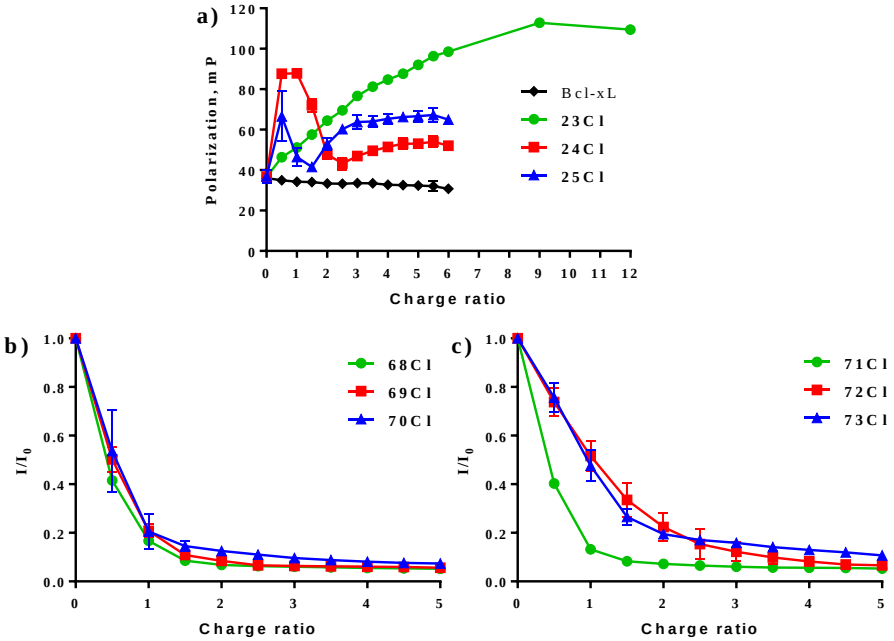


Figure 5.2. Measurements of fluorescence polarization for nanoconjugates formed with dendrons (**23Cl-25Cl**/Bcl-xL siRNA-FAM) (a) and fluorescence quenching for nanoconjugates form with AuNPs (**68Cl-70Cl**)/Bcl-xL-FAM (b) and AgNPs (**71Cl-73Cl**)/Bcl-xL-FAM (c) at different charge ratios

Circular dichroism (CD) studies were also performed to evaluate the effect of our systems in the secondary structure of Bcl-xL siRNA. For this purpose, the CD spectra were recorded on a range of 200-320 nm during the formation of nanoconjugates with dendrons (**23Cl-25Cl**/Bcl-xL) and AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL). The CD spectrum of siRNA Bcl-xL has a maximum around 260 nm.

During the formation of nanoconjugates with dendrons (**23Cl-25Cl**/Bcl-xL), CD spectra showed that the higher the dendron/siRNAs ratio, the lower the intensity of the maximum peak and also shifted to higher wavelength (Fig.5.3A). It was also noted that as dendritic generation increases, the change in the peak occurs at lower dendron/siRNA ratios (Fig.5.3B). Regarding nanoconjugates formed with AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL), the same behavior described for nanoconjugates formed with free dendrons was observed in the CD spectra. However, the difference in AuNPs/siRNA ratios by increasing the dendritic generation cause a minor effect on the peak (Fig.5.3C-D).

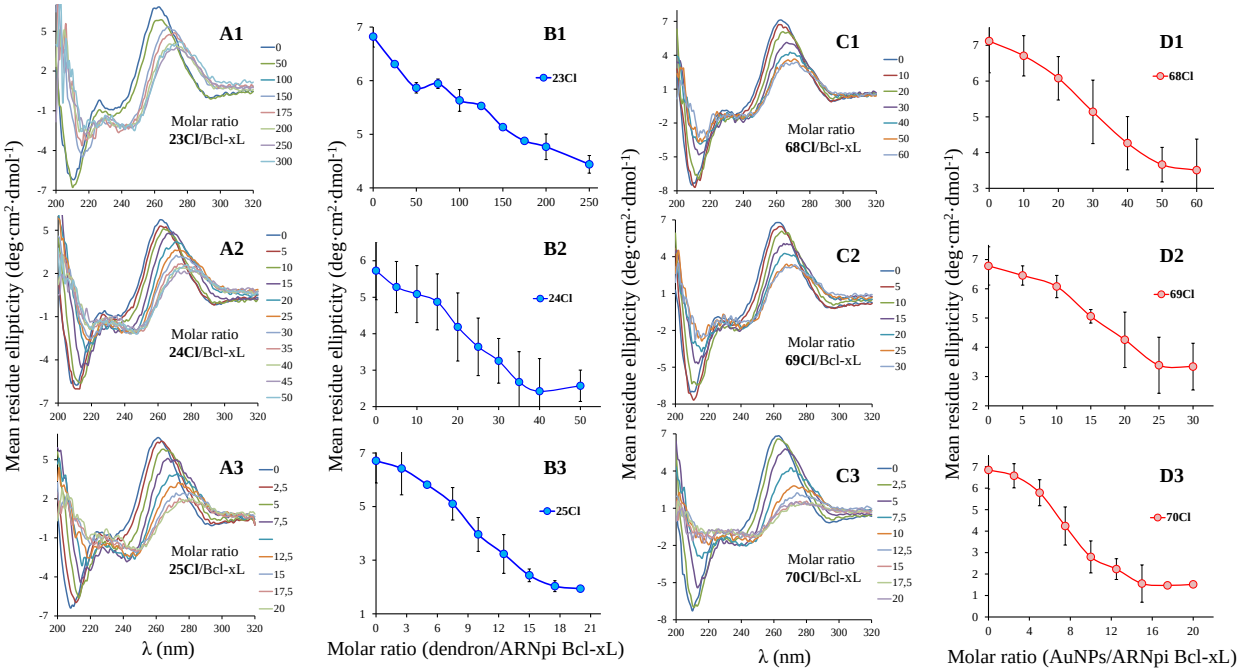


Figure 5.3. CD spectra (A y C) and changes in mean residue ellipticity (B y D) of the siBcl-xl, at $\lambda = max_{260\text{-}280\ nm}$ in the formation of nanoconjugates with dendrons: **23Cl**/ARNpi Bcl-xL (A1-B1), **24Cl**/ARNpi Bcl-xL (A2-B2) and **25Cl**/ARNpi Bcl-xL (A3-B3) and AuNPs: **68Cl**/ARNpi Bcl-xL (C1-D1), **69Cl**/ARNpi Bcl-xL (C2-D2) and **70Cl**/ARNpi Bcl-xL (C3-D3). Results represent mean ±SD. The number of scans varied between one and three for each sample of three independent experiments

Fluorescence and CD assays were also used to determine the stability of nanoconjugates against different concentrations of heparin. For dendron/siRNA nanoconjugates only those formed with second and third generation (**24Cl-25Cl**)/Bcl-xL-FAM were studied. Measurements of fluorescence polarization by adding increased amounts of heparin allow to observe the release of Bcl-xL siRNA-FAM. In this assay, both nanoconjugates (**24Cl-25Cl**)/Bcl-xL-FAM showed the same behavior, observing the release of genetic material at 20 mg/L of heparin. The maximum amount of released Bcl-xL siRNA-FAM was 80% and was reached at 40 mg/L of heparin (Fig.5.4a).

On the other hand, for nanoconjugates formed with MNPs, fluorescence quenching measurements were performed for both AuNPs (**68Cl-70cl**/Bcl-xL-FAM) and AgNPs (**71Cl-73Cl**/Bcl-xL-FAM). In both cases, a greater amount of heparin was required to displace genetic material than for free dendrons. The displacement of the genetic material of nanoconjugates formed with AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-XL-FAM) began to be observed at 40 mg/L of heparin, reaching the higher displacement at 60 mg/L of heparin (Fig.5.4b). For nanoconjugates formed with AgNPs (**71Cl-73Cl**/Bcl-XL-FAM) weaker interaction with the genetic material was observed, which began to be released at 30 mg/L of heparin with the higher released value at 50 mg/L of heparin (Fig.5.4c).

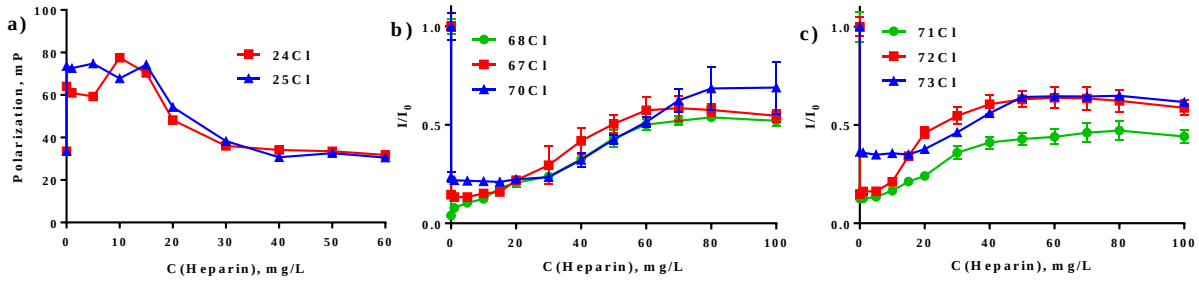


Figure 5.4. Measurements of displacement of Bcl-xL siRNA-FAM from nanoconjugates caused by heparin: fluorescence polarization in case of the dendrons (**24Cl-25Cl**/Bcl-xL siRNA-FAM) (a) and fluorescence quenching for nanoconjugates form with AuNPs (**68Cl-70Cl**)/Bcl-xL-FAM (b) and AgNPs (**71Cl-73Cl**)/Bcl-xL-FAM (c)

The release of genetic material by action of heparin was also studied by CD. For this, the CD spectra of nanoconjugates formed by dendrons (**23Cl-25Cl**/Bcl-xL-FAM) and AuNPs (**68Cl-70Cl**/Bcl-xL-FAM) after heparin addition (164 mg/L) were collected. The results showed that the CD spectra were similar to those obtained for free Bcl-xL siRNA-FAM. This behavior was considerably weaker for the nanoconjugate formed with the third generation

dendron (**25Cl**/Bcl-xL-FAM) and AuNPs functionalized with this dendron (**70Cl**/Bcl-xL-FAM) (Fig.5.5).

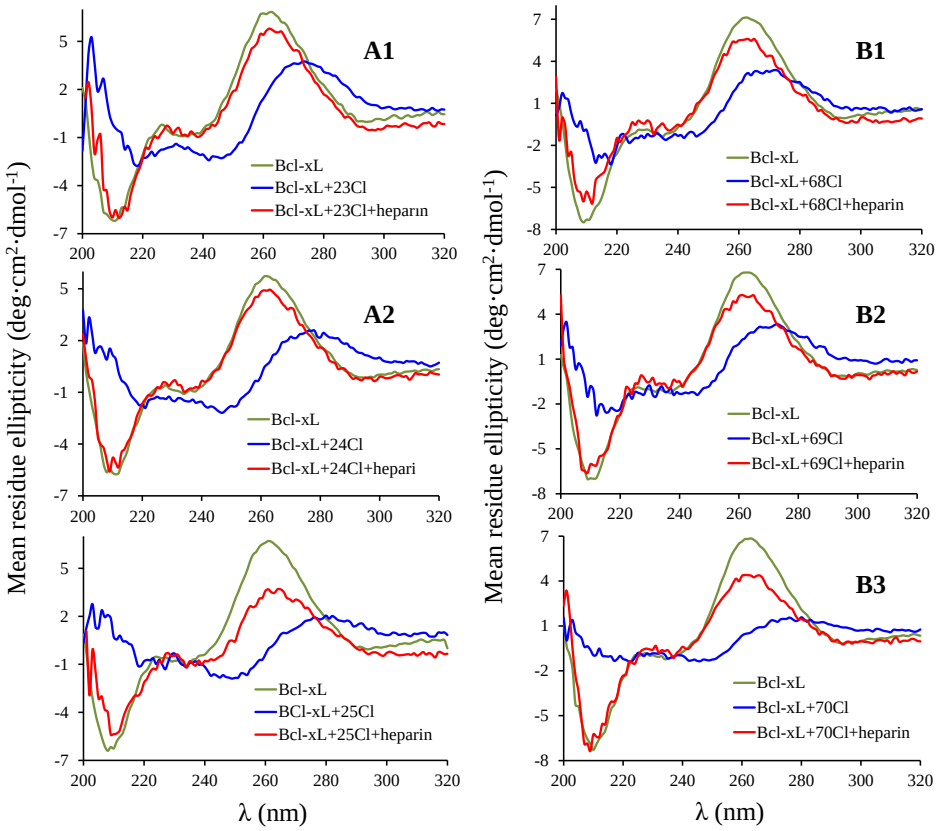


Figure 5.5. Comparison of CD spectra of siRNA free, nanoconjugates formed with dendrons: **23Cl-25Cl**/Bcl-xL siRNA (A) and nanoconjugates formed with AuNPs **68Cl-70Cl**/Bcl-xL siRNA (B) and in the presence of heparin. The results represent the mean ± SD of three independent experiments

Gene therapy: HIV

In the case of HIV, nanoconjugates formation were performed using siRNA Nef that interfere in the expression of Nef gen, an auxiliary HIV gene, which function is essential for optimal viral infectivity and pathogenicity *in vitro* and *in vivo* studies.[481] The intervention in the expression of Nef through the use of siRNAs could be a new strategy to complement the current anti-HIV therapy and to improve treatment outcomes.

To validate the functionality of compounds forming nanoconjugates with siNef and siNef random sequence (Random), third generation dendrons (**15Cl** and **25Cl**) and MNPs functionalized with first generation dendrons (**68Cl** and **71Cl**) were chosen, and gel electrophoresis assays were performed to evaluate the nanoconjugates formation. In addition,

preliminary studies in PBMC of their capacity to restrict viral replication have been performed.

Electrophoresis assays were performed using different charge ratios of compound/siNef. Retention of siNef after 2 hours of incubation was observed at 1:2 charge ratio, and an almost total retention at charge ratio of 1:4 for both, dendrons (**15Cl** and **25Cl**) and MNPs (**68Cl** and **71Cl**) (Fig.5.6a). Retention of siNef by all the tested compounds were observed after 24 and 48 hours of incubation (Fig.5.6b).

It is important to note, the excellent retention of third generation dendrons here analyzed (**15Cl** and **25Cl**), which form nanoconjugates at charge ratios of 1:4, a much lower value than other cationic carbosilane dendrons previously synthesized in our research group.[482]

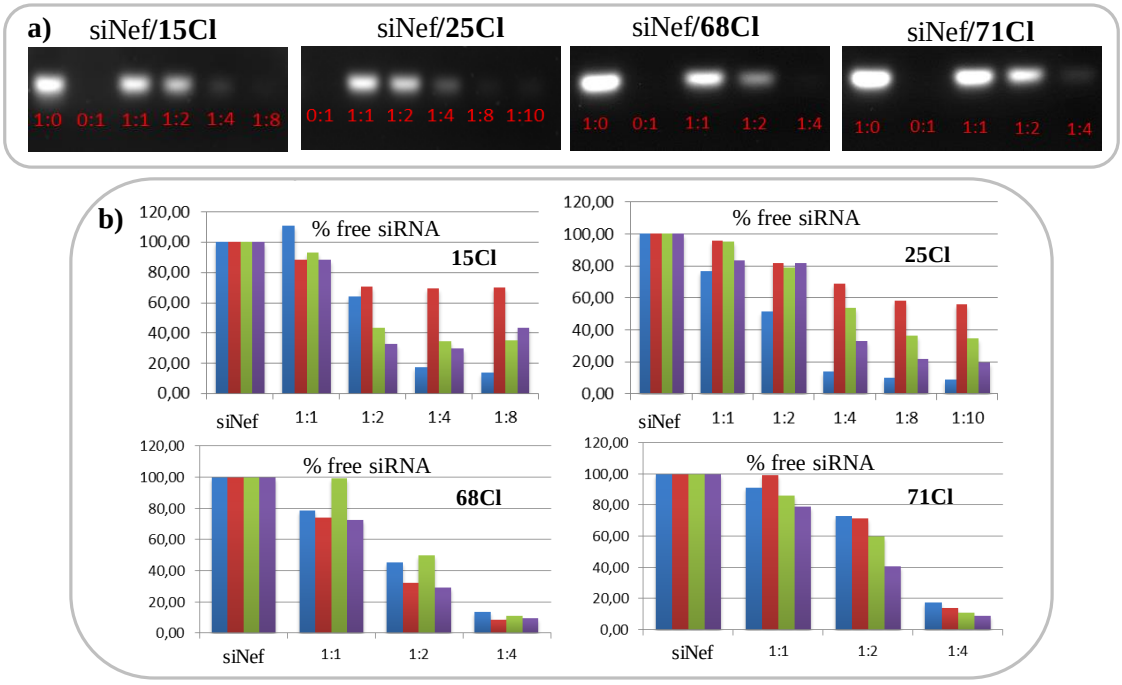


Figure 5.6. a) Agarose gel electrophoresis of nanoconjugates formed with dendrons (siNef/**15Cl** and siNef/**25Cl**) and the MNPs (siNef/**68Cl** and siNef/**71Cl**) for different negative/positive charge ratio at 48 hours of incubation, b) Percentage release of siNef at 2, 24, 48 and 120 hours

Gel electrophoresis were also performed to determine the stability of nanoconjugates against heparin. The assays showed the release of siNef by action of heparin for all the nanoconjugates after 2h of incubation (Fig.5.7).

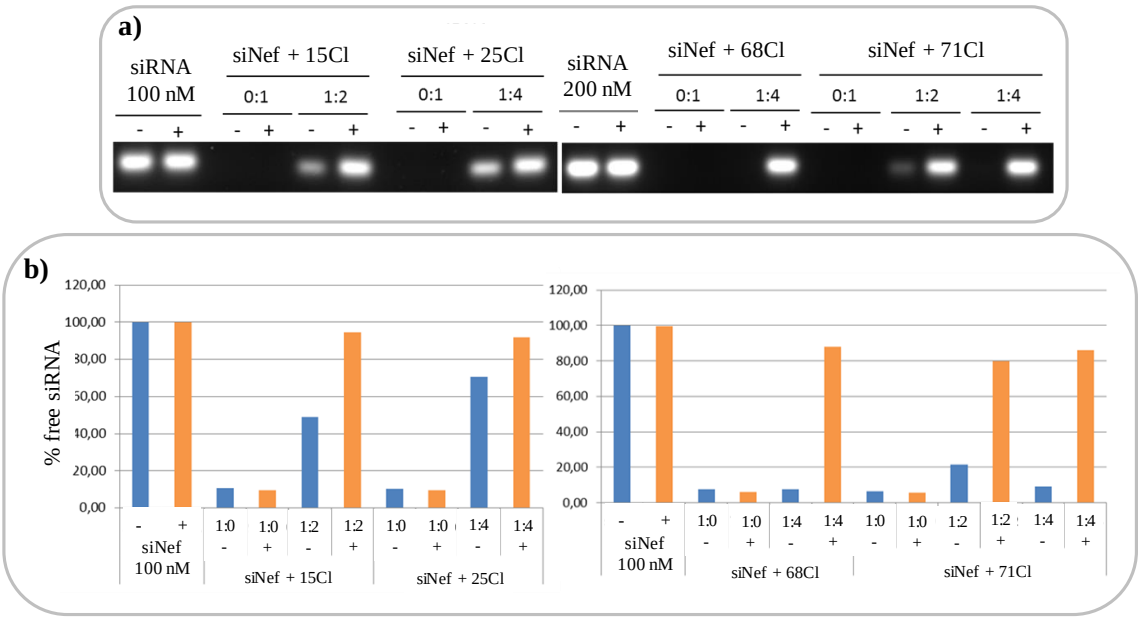


Figure 5.7. a) Agarose gel electrophoresis for nanoconjugates formed with dendrons (siNef/**15Cl** and siNef/**25Cl**) and the MNPs (siNef/**68Cl** and siNef/**71Cl**) in absence or presence of heparin, b) Percentage of free siNef in the presence (+) or absence (-) of heparin in nanoconjugates

Once proven the ability of selected compounds to form nanoconjugates with siNef, the next step was the evaluation of their toxicity. This assay was carried out on PBMC at appropriate charge ratios (1:4 for siNef/**15Cl** siNef/**25Cl** and siNef/**68Cl**, and 1:2 for siNef/**71Cl**). The results show that nanoconjugates formed with **25Cl**, **68Cl** and **71Cl** compounds were not toxic at the ratios used. However, the nanoconjugate formed with third generation dendron with MeCOS- (**15Cl**) at the focal point was toxic, being excluded in subsequent assays (Fig.5.8).

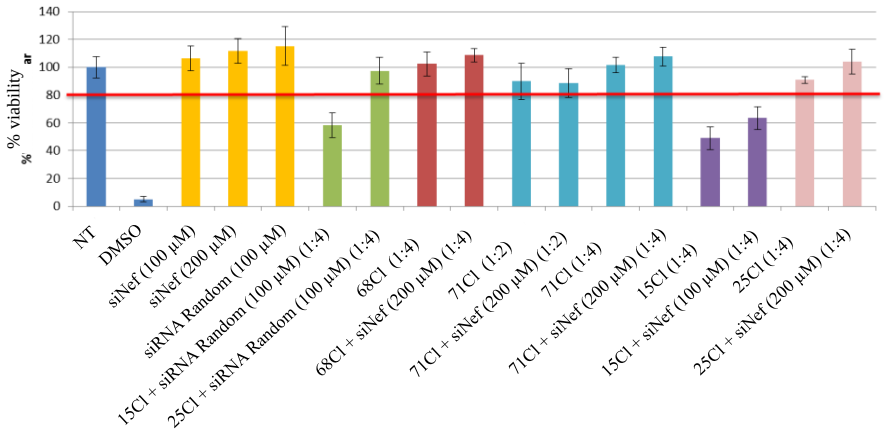


Figure 5.8. MTT assay in PBMC treated for 48 hours with nanoconjugates formed with dendrons (**15Cl** and **25Cl**) and MNPs (**68Cl** and **71Cl**). The results shown are the mean ± SD of three independent experiments

Once proven the biocompatibility of the nanoconjugates, preliminary studies were performed to determine the ability of nanoconjugates to inhibit the HIV infection. Thereby, nanoconjugates siNef/**25Cl**, siNef/**68Cl** and siNef/**71Cl** were incubated with PBMC previously activated and infected with viral X4 HIV-1NL-4.3 during 48 hours to determine their ability to inhibit the infection. The inhibition capacity was determined by performing a modified immunoassay in which a sensitized surface of antibody that specifically recognizes the protein p24 which is subsequently colorimetrically quantified. This allow to relate the inhibition percentage with the amount of p24 protein. That is, the more protein binds antibodies, the higher the degree of infection and consequently the lower the ability of nanoconjugate to inhibit the infection.

The results showed that siRNA alone could inhibit infection by 60%. Our compounds (**25C**l, **68Cl** and **71Cl**) were also able to inhibit infection more than 80% in the case of dendron (**25Cl**), 60% in the case of AuNPs (**68Cl**) and 70% in the case of AgNPs (**71Cl**). However, inhibition increased to almost 90% in the case of nanoconjugates formed with siRNA (Fig.5.9).

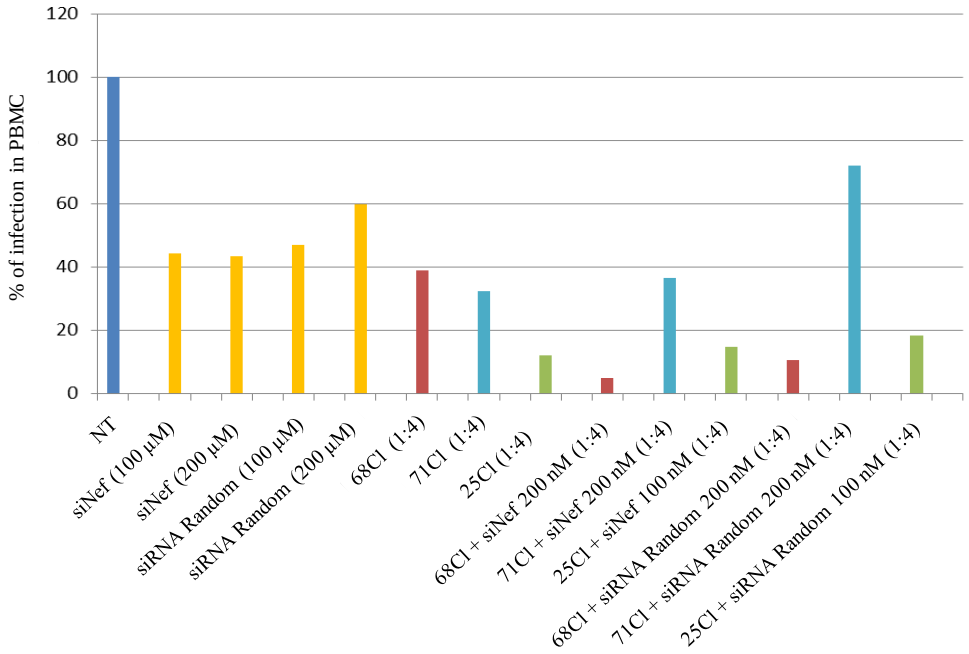


Figure 5.9. Inhibition of HIV infection using nanoconjugates formed with compounds **25Cl**, **68Cl** and **71Cl**

5.2.3d Applications in protein separation

Anionic AuNPs with peripheral sulfonate (**77b-79**) and carboxylate (**82-84**) groups were selected for interaction assays with proteins. The studies of protein-AuNPs interactions were performed by monitoring the intrinsic fluorescence signal of proteins (mainly due to the presence of tryptophan residues (Trp)) and by the separation of proteins by gel electrophoresis technique of using commercial protein mixture as standard comprising molecular weights of 15-250 kDa. First, standard proteins bovine serum albumin (BSA), myoglobin (MYO) and lysozyme (LYZ), which cover a wide range of molecular weights and isoelectric points, were used.

In the case of BSA protein, a decrease of intrinsic fluorescence intensity was observed at all pH explored when the concentration of AuNPs increases. These results indicate that conformational changes, ligand binding or even association of proteins in solution can occur.[484] The decrease of fluorescence intensity was higher at acidic and neutral pH than at basic pH, probably due to the conformational change of protein to switch from acidic to basic pH in which Trps are less accessible, and therefore the interaction with AuNPs is not as effective as at acidic pH.[485] Higher fluorescence extinction was observed for AuNPs **78** and **82**, both functionalized with second generation dendrons. However, in the case of AuNPs with carboxylate groups at periphery (**82-84**), the carboxyl groups are protonated at acidic pH and AuNPs precipitated. This behavior was most notorious in second and third generation derivatives (Fig.5.10).

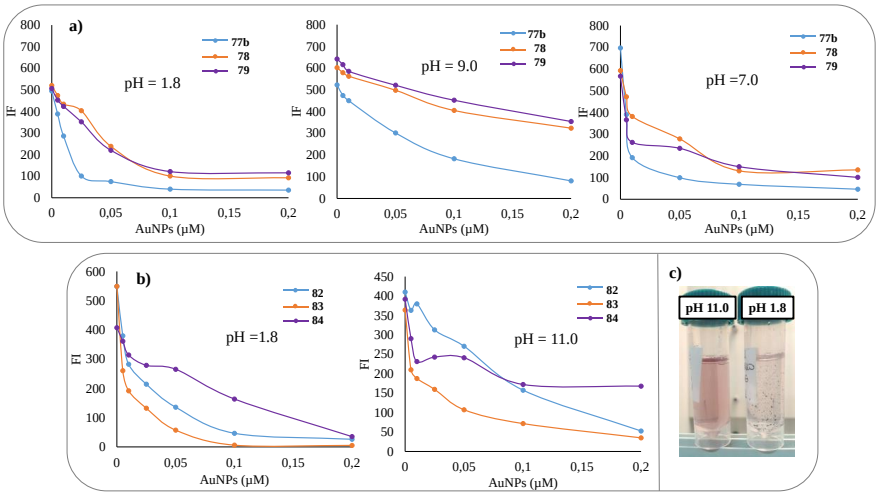


Figure 5.10. BSA Variation of fluorescence by adding increasing concentrations of AuNPs **77b-79** (a) and **82-84** (b) at different pH, and AuNPs-protein solutions at basic and acidic pH (c)

The same behaviour described for BSA was observed in the case of LYZ, observing a decrease of fluorescence intensity even at low concentration of AuNPs (Fig.5.11).

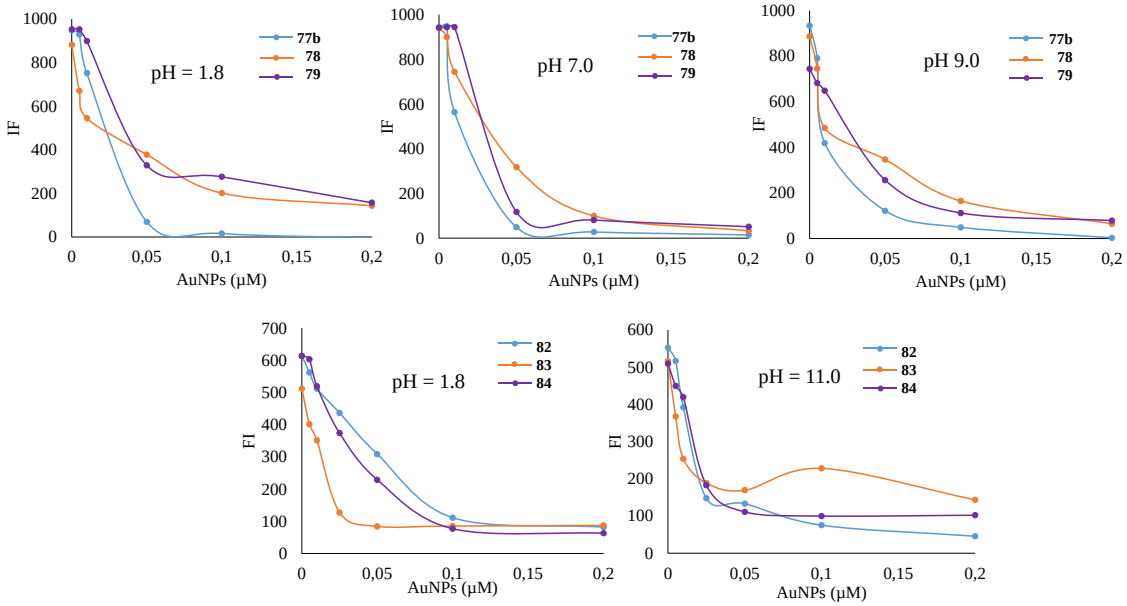


Figure 5.11. Variation of fluorescence intensity of LYZ by adding increasing concentrations of AuNPs (**77b**-**79** and **82**-**84**)

Unlike LYZ and BSA, MYO only interacts at acidic pH (Fig.5.12). This could be due to the zero net charge at neutral and basic pH of MYO, and interactions in these cases were negligible. This suggests that interaction between protein and AuNPs are specifically due to electrostatic interactions.

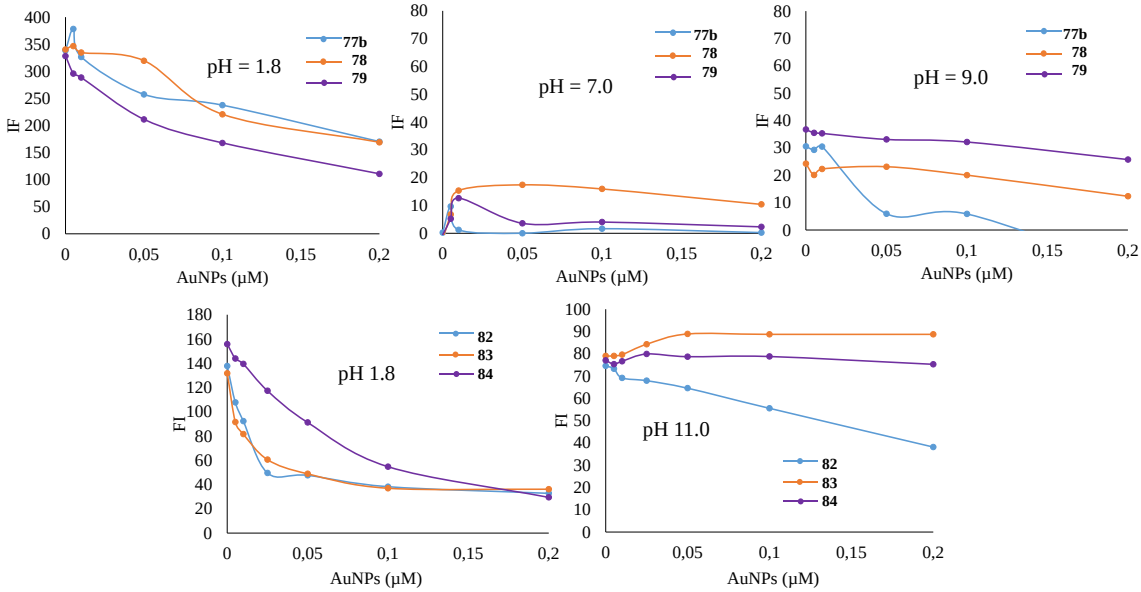


Figure 5.12. Variation of fluorescence intensity of MYO by adding increasing concentrations of AuNPs (**77b**-**79** and **82**-**84**)

The interaction of BSA with AuNPs (**77b-79**) were also determinate using gel electrophoresis. According to the results, the intensity of BSA band increases as AuNPs:protein ratio increases. This indicates the pre-concentration of the protein at higher concentration of AuNPs (Fig.5.13).

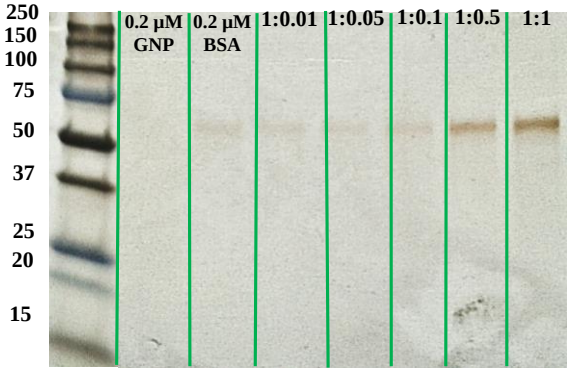


Figure 5.13. Electrophoretic profile of BSA in the presence of increasing concentrations of AuNPs with peripherals sulfonate groups (**77b-79**)

Finally, AuNPs containing peripheral sulfonate groups (**77b-79**) were used for a preliminary assay of protein separation from real sample. Thereby, extraction of proteins from peach seed has been made using acidic and neutral pH, since at these pH greater fluorescence quenching was observed in the standard proteins. The samples obtained by extraction using AuNPs (**77b-79**) were compared with those obtained by conventional extraction methods using gel electrophoresis assays.[486] The obtained results confirm the interaction between AuNPs and proteins contained in peach seeds. Therefore, these systems could be used for protein extraction as an alternative to conventional extraction methods, using much lower volume of solvents (Fig.5.14).

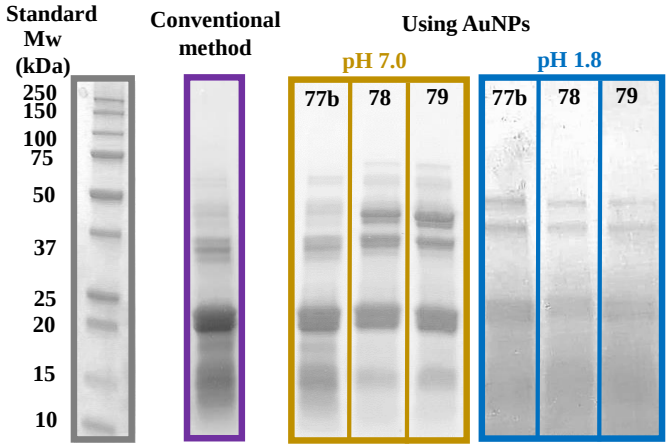


Figure 5.14. Electrophoresis of samples extracted by the conventional method and using AuNPs (**77b-79**)

5.3. CONCLUSIONS

All the scientific work performed in this thesis, has led to the following conclusions:

I. Thiol-ene addition to dendrons containing vinyl groups and protected thiol at the focal point, MeCOS- group, is an optimal procedure for the synthesis of carbosilane dendrons covered with cationic (-NMe_3^+, NMe_2H^+) or anionic (-SO_3^-, CO_2^-) functions. A further deprotection of focal point allows to transform the focal point into desired -SH group.

II. Click thiol-ene addition reaction also permits the heterofunctionalization of dendritic systems, which allows to obtain fourth generation dendrons with cationic groups and one fluorescein moiety at the periphery.

III. AuNPs with ammonium peripheral groups, (-NMe_3^+, -NMe_2H^+), were obtained through direct or ligand exchange methods using the carbosilane dendrons previously synthetized. The used Au/L ratio (1:1) leads to the production of nanoparticles with diameters of 2-5 nm. It was observed that the stability was influenced by the type of counterion, where AuNPs containing Cl^- anion had higher stability than those containing I^-. AgNPs of first, second and third generation with -NMe_3^+ peripheral groups have been also synthetized following the direct method but these systems showed lower stability than analogous AuNPs.

IV. Anionic AuNPs with sulfonate peripheral groups were obtained through direct or ligand exchange methods. The synthesis using direct method with the same Au/L ratio (1:1) yielded only AuNPs **77a** functionalized with first generation dendrons. Higher generation dendrons blocked the AuNPs growing, probably due to SO_3^--Au interaction. The use of Au/L(1/m) (m = number of sulfonate groups present in dendron) had allowed the obtention of the AuNPs functionalized with first, second and third generation dendrons **77b**-**79** with diameter of 2-4 nm. The availability of peripheral sulfonate groups for posterior interactions with other systems was confirmed by EPR, showing also that sulfonate groups of AuNPs **78** functionalized with second generation dendrons were less available than AuNPs **77** and **79** functionalized with first and third generation dendrons.

V. Anionic AuNPs with peripherals carboxylate groups were also obtained using the direct method. The solubility for the system **82** functionalized with first generation dendrons proved to be pH dependent, where the size and shape of the AuNPs was not affected by this treatment.

VI. Biocompatibility studies of systems with different blood cells were performed. In general, the dendrons have shown a clear trend of increased toxicity with increasing dendritic generation. However, this behavior is not maintained in AuNPs (**68Cl-70Cl**), probably because in these systems, besides dendritic generation, also influences the size and exposure of the metal core.

VII. The antibacterial capacity of cationic systems with $-NMe_3^+$ peripheral groups, dendrons (**23Cl-25Cl**), AuNPs (**68Cl-70Cl**) and AgNPs (**71Cl-73Cl**), depends on generation, topology and metal core. The best value was found for AgNPs functionalized with first generation dendrons (**71Cl**) that have shown an excellent antibacterial capacity, even better than the values observed for free dendrons. This is probably due to the combination of the cationic charge and the presence of a metal core, which may release Ag^+ ions, increasing the bactericidal capacity of the system. For AgNPs functionalized with second and third generation dendrons, this behaviour was not observed. Probably this is due to the larger size of the dendrons on the surface that could protect the metallic core preventing the release of Ag^+ ions.

VIII. Anti-cancer activity of cationic systems with $-NMe_3^+$ peripheral groups were performed in two different cells lines (HeLa and HT29) and a clear trend of activity with dendritic generation was shown. The best activity was observed for HeLa cell line, where the best activity was obtained for third generation dendron with -SH at the focal point (**25Cl**). However, in these assays an increase of activity was observed after functionalization, observing a significant increase in activity of AuNPs (**68Cl-69Cl**) functionalized with first and second generation dendrons in comparison with free dendrons.

IX. Biocompatibility studies of sulfonate systems showed that third generation dendron (**44**) was toxic, while the first and second generation (**42-43**) were biocompatible at any tested concentrations. Regarding AuNPs, systems functionalized by exchange method (**74-76**) exhibited higher toxicity than those obtained by direct method (**77b-**

79), probably due to the presence of dodecanethiolate ligands in the systems obtained by exchange method.

X. Antiviral capacity assays were performed observing that dendrons of second and third generation (**42**-**43**) could inhibit the viral isolate X4 HIV-$1_{NL4.3}$, while for the viral isolate R5-VIH_{NLAD8} only the third generation dendron (**43**) was active. On the other hand, the AuNPs synthesized by direct method (**77b**-**79**) had higher activity than those obtained by ligand exchange method (**74**-**76**). Moreover, these systems had higher capacity for inhibition against HIV than free dendrons (**42**-**44**), with good activity on both viral isolates. Therefore, dendronization improves systems activity.

XI. The evaluation of cationics system as potential agents in the transfection of genetic material in cancer and HIV gene therapy were studied. In the case of cancer, siRNA Bcl-xL was used. First generation dendron (**23Cl**) has shown the highest values of charge ratio on the formation of nanoconjugate. Meanwhile, second and third generation dendrons (**24Cl**-**25Cl**) form stable nanoconjugates at much lower charge ratio than those observed in similar systems previously synthesized in our research group. On the other hand, MNPs formed nanoconjugates at lower charge ratios than those observed for free dendrons. Regarding HIV, third generation dendrons (**15Cl** and **25Cl**) and MNPs functionalized with first generation dendrons (**68Cl** and **71Cl**) were used to form nanoconjugates with siRNA Nef. The formation of nanoconjugates was accomplished at similar charge ratios than those obtained in the case the Bcl-xL. The obtained nanoconjugates have shown acceptable biocompatibilities at the used concentrations. The compounds (**25Cl**, **68Cl** and **71Cl**) could inhibit HIV infection by themselves. However, the inhibition increased to nearly 90% in the case of nanoconjugates.

XII. Stability studies of nanoconjugates formed with siRNAs Bcl-xL with heparin were performed. It was observed that siRNAs Bcl-xL can be released from nanoconjugates, at higher concentrations of heparin in the case of MNPs (**68Cl**-**73Cl**) than in free dendrons (**23Cl**-**25Cl**). Another important result was the ability of our systems to protect Bcl-xL siRNAs against degradation by RNase.

XIII. Studies of proteins separation using AuNPs with sulfonate (**77b**-**79**) and carboxylate (**80**-**82**) anionic groups were performed. It was observed that these systems could interact with different proteins. AuNPs functionalized with second generation dendrons (**78** and **83**) showed the best interactions. A preliminary study of protein separation from peach seeds using AuNPs sulfonate groups (**77b**-**78**) were also performed. The interaction of the proteins contained in the seeds and AuNPs was measured by gel electrophoresis. The results have shown that these systems could be use as potential compounds for protein extraction with less quantity of solvents in comparison with conventional extraction methods, means an environmental improvement and lower cost.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhonde, R. R.; Sastry, M. *Langmuir* **2005**, *21*, 10644.

(2) Kim, S. T.; Saha, K.; Kim, C.; Rotello, V. M. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 681.

(3) Chompoosor, A.; Saha, K.; Ghosh, P. S.; Macarthy, D. J.; Miranda, O. R.; Zhu, Z. J.; Arcaro, K. F.; Rotello, V. M. *Small* **2010**, *6*, 2246.

(4) Zhu, Z.-J.; Carboni, R.; Quercio, M. J.; Yan, B.; Miranda, O. R.; Anderton, D. L.; Arcaro, K. F.; Rotello, V. M.; Vachet, R. W. *Small* **2010**, *6*, 2261.

(5) De Jong, W. H.; Hagens, W. I.; Krystek, P.; Burger, M. C.; Sips, A. J.; Geertsma, R. E. *Biomaterials* **2008**, *29*, 1912.

(6) Sonavane, G.; Tomoda, K.; Makino, K. *Colloids Surf., B* **2008**, *66*, 274.

(7) Wang, B.; He, X.; Zhang, Z.; Zhao, Y.; Feng, W. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 761.

(8) Longmire, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. *Nanomedicine* **2008**, *3*, 703.

(9) Zhu, M.; Perrett, S.; Nie, G. *Small* **2013**, *9*, 1619.

(10) Le Ouay, B.; Stellacci, F. *Nano Today* **2015**, *10*, 339.

(11) Buhleier, E.; Wehner, W.; Vögtle, F. *Synthesis-Stuttgart.* **1978**, 155.

(12) Carlmark, A.; Hawker, C.; Hult, A.; Malkoch, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 352.

(13) Paez, J. I.; Martinelli, M.; Brunetti, V.; Strumia, M. C. *Polymers* **2012**, *4*, 355.

(14) Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J.; Smith, P. *Polym. J.* **1985**, *17*, 117.

(15) Svenson, S.; Tomalia, D. A. *Adv. Drug. Deliver Rev.* **2005**, *57*, 2106.

(16) Frey, H.; Lach, C.; Lorenz, K. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 279.

(17) Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7638.

(18) de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*, 1308.

(19) Rengan, K.; Engel, R. *J. Chem. Soc. Perk. T1* **1991**, 987.

(20) Rengan, K.; Engel, R. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1990**, 1084.

(21) Ortega, P.; Bermejo, J. F.; Chonco, L.; de Jesús, E.; de la Mata, F. J.; Fernandez, G.; Flores, J. C.; Gómez, R.; Serramía, M. J.; Muñoz-Fernández, M. A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 1388.

(22) Alonso, B.; Cuadrado, I.; Moran, M.; Losada, J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2575.

(23) Frey, H.; Schlenk, C. In *Dendrimers II: Architecture, Nanostructure and Supramolecular Chemistry*; Vögtle, F., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2000**, p 69.

(24) Tomalia, D. A. *Macromol. Symp.* **1996**, *101*, 243.

(25) Hecht, S. *J. Polym. Sci. A1* **2003**, *41*, 1047.

(26) Walter, M. V.; Malkoch, M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 4593.

(27) Jansen, J. F. G. A.; de Brabander-van den Berg, E. M. M.; Meijer, E. W. *Science* **1994**, *266*, 1226.

(28) Watkins, D. M.; Sayed-Sweet, Y.; Klimash, J. W.; Turro, N. J.; Tomalia, D. A. *Langmuir* **1997**, *13*, 3136.

(29) Fischer, M.; Vögtle, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 884.

(30) Fréchet, J. M. J. *Science* **1994**, *263*, 1710.

(31) Bhyrappa, P.; Young, J. K.; Moore, J. S.; Suslick, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5708.

(32) Wu, P.; Malkoch, M.; Hunt, J. N.; Vestberg, R.; Kaltgrad, E.; Finn, M. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Hawker, C. J. *Chem. Commun.* **2005**, 5775.

(33) Chen, Y.; Xiong, X. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5049.

(34) González de Rivera, F.; Rodríguez, L.-I.; Rossell, O.; Seco, M.; Divins, N. J.; Casanova, I.; Llorca, J. *J. Organomet. Chem.* **2011**, *696*, 2287.

(35) Palacin, T.; Khanh, H. L.; Jousselme, B.; Jegou, P.; Filoramo, A.; Ehli, C.; Guldi, D. M.; Campidelli, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15394.

(36) Duanmu, C.; Saha, I.; Zheng, Y.; Goodson, B. M.; Gao, Y. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 5973.

(37) Huang, B.; Tomalia, D. A. *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 1961.

(38) Cho, T. J.; Zangmeister, R. A.; MacCuspie, R. I.; Patri, A. K.; Hackley, V. A. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 2665.

(39) Ozawa, C.; Hojo, H.; Nakahara, Y.; Katayama, H.; Nabeshima, K.; Akahane, T.; Nakahara, Y. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 9685.

(40) Romestand, B.; Rolland, J.-L.; Commeyras, A.; Coussot, G.; Desvignes, I.; Pascal, R.; Vandenabeele-Trambouze, O. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1169.

(41) Inoue, K. *Prog. Polym. Sci.* **2000**, *25*, 453.

(42) Tomalia, D. A.; Hedstrand, D. M.; Ferritto, M. S. *Macromolecules* **1991**, *24*, 1435.

(43) Gauthier, M.; Moeller, M. *Macromolecules* **1991**, *24*, 4548.

(44) Hawker, C. J.; Fréchet, J. M. J. *Polymer* **1992**, *33*, 1507.

(45) Ting, S. R. S.; Chen, G.; Stenzel, M. H. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1392.

(46) Klein Gebbink, R. J. M.; Kruithof, C. A.; van Klink, G. P. M.; Van Koten, G. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 183.

(47) Aldana, A. A.; Strumia, M. C.; Martinelli, M. *J. Biomater. Tissue Eng.* **2013**, *3*, 157.

(48) Reek, J. N. H.; Arévalo, S.; van Heerbeek, R.; Kamer, P. C. J.; van Leeuwen, P. W. N. M. In *Advances in Catalysis*; Bruce, C. G., Helmut, K., Eds.; Academic Press: **2006**; Vol. 49, p 71.

(49) Shu, L.; Schlüter, A. D.; Ecker, C.; Severin, N.; Rabe, J. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4666.

(50) Calderon, M.; Monzón, L. M. A.; Martinelli, M.; Juarez, A. V.; Strumia, M. C.; Yudi, L. M. *Langmuir* **2008**, *24*, 6343.

(51) Gössl, I.; Shu, L.; Schlüter, A. D.; Rabe, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6860.

(52) Fernández, E. J.; Monge, M. In *Modern Supramolecular Gold Chemistry. Gold-Metal Interactions and Applications*; Laguna, A., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2008**, p 131.

(53) Daou, T. J.; Pourroy, G.; Greneche, J. M.; Bertin, A.; Felder-Flesch, D.; Begin-Colin, S. *Dalton Trans.* **2009**, 4442.

(54) Wang, R.; Yang, J.; Zheng, Z.; Carducci, M. D.; Jiao, J.; Seraphin, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 549.

(55) Ratheesh Kumar, V. K.; Gopidas, K. R. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3102.

(56) Yang, P.; Zhang, W.; Du, Y.; Wang, X. *J. Mol. Catal. A-Chem.* **2006**, *260*, 4.

(57) Naka, Y.; Komori, Y.; Yoshitake, H. *Colloid Surface A* **2010**, *361*, 162.

(58) M. Eghtedari; A. V. Liopo; J. A. Copland; A. A. Oraevsky; Motamed, M. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 287.

(59) Shon, Y.-S. In *Advanced Nanomaterials*; Geckeler, K. E., Nishide, H., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2010**, p 743.

(60) Majoral, J. P.; Caminade, A. M. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 845.

(61) van der Made, A. W.; van Leeuwen, P. W. N. M.; de Wilde, J. C.; Brandes, R. A. C. *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 466.

(62) van der Made, A. W.; van Leeuwen, P. W. N. M. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, *0*, 1400.

(63) Seyferth, D.; Son, D. Y.; Rheingold, A. L.; Ostrander, R. L. *Organometallics* **1994**, *13*, 2682.

(64) Seyferth, D.; Kugita, T.; Rheingold, A. L.; Yap, G. P. A. *Organometallics* **1995**, *14*, 5362.

(65) Zhou, L. L.; Roovers, J. *Macromolecules* **1993**, *26*, 963.

(66) Tarabukina, E. B.; Shpyrkov, A. A.; Potapova, D. V.; Filippov, A. P.; Shumilkina, N. A.; Muzafarov, A. M. *Polym. Sci. Ser. A* **2006**, *48*, 974.

(67) Terunuma, D.; Kato, T.; Nishio, R.; Matsuoka, K.; Kuzuhara, H.; Aoki, Y.; Nohira, H. *Chem. Lett.* **1998**, *27*, 59.

(68) Gopidas, K. R.; Whitesell, J. K.; Fox, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6491.

(69) Love, C. S.; Chechik, V.; Smith, D. K.; Brennan, C. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 919.

(70) Love, C. S.; Ashworth, I.; Brennan, C.; Chechik, V.; Smith, D. K. *Langmuir* **2007**, *23*, 5787.

(71) Losada, J.; Cuadrado, I.; Morán, M.; Casado, C. M.; Alonso, B.; Barranco, M. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *338*, 191.

(72) García Armada, M. P.; Losada, J.; Cuadrado, I.; Alonso, B.; González, B.; Casado, C. M.; Zhang, J. *Sensor Actuator* **2004**, *101*, 143.

(73) Heerbeek, R. V.; Reek, J. N. H.; Kamer, P. C. J.; van Leeuwen, P. W. N. M. *Tertrahedron. Lett.* **1999**, *40*, 7127.

(74) Sánchez-Mendez, A.; Benito, J. M.; de Jesús, E.; de la Mata, F. J.; Flores, J. C.; Gómez, R.; Gómez-Sal, P. *Dalton Trans.* **2006**, 5379.

(75) Sánchez-Nieves, J.; Ortega, P.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 9203.

(76) Fuentes-Paniagua, E.; Hernández-Ros, J. M.; Sánchez-Milla, M.; Camero, M. A.; Maly, M.; Pérez-Serrano, J.; Copa-Patiño, J. L.; Sánchez-Nieves, J.; Soliveri, J.; Gomez, R.; de la Mata, F. J. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 1256.

(77) Galán, M.; Sánchez Rodriguez, J.; Jiménez, J. L.; Relloso, M.; Maly, M.; de la Mata, F. J.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3222.

(78) Gossage, R. A.; Muñoz-Martínez, E.; van Koten, G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2397.

(79) Gossage, R. A.; Muñoz-Martínez, E.; Frey, H.; Burgath, A.; Lutz, M.; Spek, A. L.; van Koten, G. *Chem-Eur J.* **1999**, *5*, 2191.

(80) Lach, C.; Hanselmann, R.; Frey, H.; Mülhaupt, R. *Macromol. Rapid Comm.* **1998**, *19*, 461.

(81) Lach, C.; Frey, H. *Macromolecules* **1998**, *31*, 2381.

(82) Gopidas, K. R.; Whitesell, J. K.; Fox, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14168.

(83) Rasines, B.; Hernández-Ros, J. M.; de las Cuevas, N.; Copa-Patiño, J. L.; Soliveri, J.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Dalton Trans.* **2009**, 8704.

(84) Arnáiz, E.; Doucede, L. I.; Garcia-Gallego, S.; Urbiola, K.; Gomez, R.; de Ilarduya, C. T.; de la Mata, F. J. *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 433.

(85) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.

(86) Posner, T. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 646.

(87) Kharasch, M. S.; Read, J.; Mayo, F. R. *Chem. Ind. (London)* **1938**, *57*, 752.

(88) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708.

(89) Rissing, C.; Son, D. Y. *Organometallics* **2008**, *27*, 5394.

(90) Griesbaum, K. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1970**, *9*, 273.

(91) Hoyle, C. E.; Lee, T. Y.; Roper, T. *J. Polym. Sci. A1* **2004**, *42*, 5301.

(92) Decker, C.; Nguyen Thi Viet, T.; Decker, D.; Weber-Koehl, E. *Polymer* **2001**, *42*, 5531.

(93) Allen, N. S. *J. Photoch. Photobio. A* **1996**, *100*, 101.

(94) Hoyle, C. E.; Lowe, A. B.; Bowman, C. N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1355.

(95) Kade, M. J.; Burke, D. J.; Hawker, C. J. *J. Polym. Sci A1* **2010**, *48*, 743.

(96) Chan, J. W.; Hoyle, C. E.; Lowe, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5751.

(97) Chan, J. W.; Yu, B.; Hoyle, C. E.; Lowe, A. B. *Chem. Commun.* **2008**, 4959.

(98) Kakwere, H.; Perrier, S. b. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1889.

(99) Krishnaveni, N. S.; Surendra, K.; Rao, K. R. *Chem. Commun.* **2005**, 669.

(100) Lowe, A. B. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17.

(101) Li, G.-Z.; Randev, R. K.; Soeriyadi, A. H.; Rees, G.; Boyer, C.; Tong, Z.; Davis, T. P.; Becer, C. R.; Haddleton, D. M. *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1196.

(102) Gress, A.; Völkel, A.; Schlaad, H. *Macromolecules* **2007**, *40*, 7928.

(103) Chen, G.; Amajjahe, S.; Stenzel, M. H. *Chem. Commun.* **2009**, 1198.

(104) Becer, C. R.; Babiuch, K.; Pilz, D.; Hornig, S.; Heinze, T.; Gottschaldt, M.; Schubert, U. S. *Macromolecules* **2009**, *42*, 2387.

(105) Boyer, C.; Davis, T. P. *Chem. Commun.* **2009**, 6029.

(106) David, R. L. A.; Kornfield, J. A. *Macromolecules* **2008**, *41*, 1151.

(107) Heidecke, C. D.; Lindhorst, T. K. *Chem.-Eur. J.* **2007**, *13*, 9056.

(108) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540.

(109) Parsons, A. F. *An introduction to free radical chemistry*, **2000**.

(110) Mintzer, M. A.; Grinstaff, M. W. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 173.

(111) Weijuan, J.; McLachlan, J.; Xu, J.; S., E. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2010**, *100*, 839.

(112) Bermejo, J. F.; Ortega, P.; Chonco, L.; Eritja, R.; Samaniego, R.; Müllner, M.; de Jesús, E.; de la Mata, F. J.; Flores, J. C.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, A. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 483.

(113) Pedziwiatr, E.; Chonco, L.; Shcharbin, D.; de Jesús, E.; Bermejo, J. F.; Ortega, P.; de la Mata, F. J.; Flores, J. C.; Gómez, R.; Klajnert, B.; Muñoz-Fernández, M. A.; Bryszewska, M. *Eur. J. Clin. Invest.* **2007**, *37*, 79.

(114) Gupta, U.; Agashe, H. B.; Asthana, A.; Jain, N. K. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 649.

(115) Patri, A. K.; Majoros, I. J.; Baker Jr, J. R. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 466.

(116) Weber, N.; Ortega, P.; Clemente, M. I.; Shcharbin, D.; Bryszewska, M.; de la Mata, F. J.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Control. Release* **2008**, *132*, 55.

(117) Arnáiz, E.; Vacas-Córdoba, E.; Galán, M.; Pion, M.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A.; de la Mata, F. J. *J. Polym. Sci. A1* **2014**, *52*, 1099.

(118) Lozano-Cruz, T.; Ortega, P.; Batanero, B.; Copa-Patino, J. L.; Soliveri, J.; de la Mata, F. J.; Gomez, R. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 19294.

(119) Gonzalo, T.; Clemente, M. I.; Chonco, L.; Weber, N. D.; Díaz, L.; Serramía, M. J.; Gras, R.; Ortega, P.; de la Mata, F. J.; Gomez, R.; López-Fernández, L. A.; Muñoz-Fernández, M. A.; Jiménez, J. L. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 921.

(120) de la Mata, F. J.; Gómez, R.; Muñoz, M. A.; Sánchez-Nieves, J.; Rasines, B.; Arniz, E.; Chonco, L.; Serramía, M. J.;**2010**,ES 2364264 B2

(121) de la Mata, J. F.; Gómez, R.; Sánchez-Nieves, J.; Ortega, P.; Muñoz, M. A.; Chonco, L.; Serramía, M. J.;**2010**,ES 2365685 B2

(122) Fuentes-Paniagua, E.; Peña-González, C. E.; Galán, M.; Gómez, R.; de la Mata, F. J.; Sánchez-Nieves, J. *Organometallics* **2013**, *32*, 1789.

(123) Kocienski, P. J. *Protecting groups*, **2005**.

(124) Sifferd, R. H.; du Vigneaud, V. *J. Biol. Chem.* **1935**, *108*, 753.

(125) Pryor, W. A.; Church, D. F.; Govindan, C. K.; Crank, G. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 156.

(126) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.

(127) Wellings, D. A.; Atherton, E. In *Methods in enzymology*; Academic Press: **1997**; Vol. Volume 289, p 44.

(128) Klonis, N.; Sawyer, W. *J. Fluoresc.* **1996**, *6*, 147.

(129) Zanker, V.; Peter, W. *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 572.

(130) Song, A.; Zhang, J.; Zhang, M.; Shen, T.; Tang, J. a. *Colloid Surface A* **2000**, *167*, 253.

(131) Porter, L. A.; Ji, D.; Westcott, S. L.; Graupe, M.; Czernuszewicz, R. S.; Halas, N. J.; Lee, T. R. *Langmuir* **1998**, *14*, 7378.

(132) Kuchibhatla, S. V. N. T.; Karakoti, A. S.; Bera, D.; Seal, S. *Prog. Mat. Sci.* **2007**, *52*, 699.

(133) Suryanarayana, C. *J. Org. Chem.* **2002**, *54*, 24.

(134) Rao, J. P.; Geckeler, K. E. *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 887.

(135) Darwish, A. D. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A: Inorg. Chem.* **2012**, *108*, 464.

(136) Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56.

(137) Dai, H. *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 218.

(138) Tang, F.; Li, L.; Chen, D. *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504.

(139) Bera, D.; Qian, L.; Tseng, T.-K.; Holloway, P. H. *Materials* **2010**, *3*, 2260.

(140) Fernández-García, M.; Rodriguez, J. A. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: **2011**.

(141) Rao, C. N. R.; Kulkarni, G. U.; Thomas, P. J.; Edwards, P. P. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 27.

(142) Hu, M.; Chen, J.; Li, Z.-Y.; Au, L.; Hartland, G. V.; Li, X.; Marquez, M.; Xia, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1084.

(143) Dykman, L.; Khlebtsov, N. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2256.

(144) Astruc, D. In *Nanoparticles and Catalysis*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, **2008**, p 1.

(145) Lee, K.-S.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 19220.

(146) Henglein, A. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 1861.

(147) Burda, C.; Chen, X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1025.

(148) Suryanarayana, C. *Adv. Eng. Mater.* **2005**, *7*, 983.

(149) Gleiter, H. *J. Appl. Crystallog.* **1991**, *24*, 79.

(150) Hewakuruppu, Y. L.; Dombrovsky, L. A.; Chen, C.; Timchenko, V.; Jiang, X.; Baek, S.; Taylor, R. A. *Appl. Opt.* **2013**, *52*, 6041.

(151) Guozhong, C. *Nanostructures and Nanomaterials* **2004**.

(152) Noguez, C. *J. Phys. Chem., C.* **2007**, *111*, 3806.

(153) Liz-Marzán, L. M. *Langmuir* **2006**, *22*, 32.

(154) Samanta, D.; Meiser, J. L.; Zare, R. N. *Nanoscale* **2015**, *7*, 9497.

(155) Du, J.-Z.; Du, X.-J.; Mao, C.-Q.; Wang, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17560.

(156) Kraynov, A.; Müller, T. E. In *Applications of Ionic Liquids in Science and Technology*; InTech ed.; INTECH Open Access Publisher: **2011**.

(157) Tadros, T. In *Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces*; John Wiley & Sons, Inc.: **2012**, p 153.

(158) Jiang, J.; Oberdörster, G.; Biswas, P. *J. Nanopart. Res.* **2008**, *11*, 77.

(159) Han, G.; Ghosh, P.; Rotello, V. M. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 113.

(160) Ju-Nam, Y.; Abdussalam-Mohammed, W.; Ojeda, J. J. *Faradary Discuss* **2016**.

(161) Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. *Small* **2005**, *1*, 325.

(162) Zhang, X. *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, *72*, 771.

(163) Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7238.

(164) Wei, L.; Lu, J.; Xu, H.; Patel, A.; Chen, Z.-S.; Chen, G. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 595.

(165) Jose Ruben, M.; Jose Luis, E.; Alejandra, C.; Katherine, H.; Juan, B. K.; Jose Tapia, R.; Miguel Jose, Y. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346.

(166) Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A. M. *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 580.

(167) Nair, L. S.; Laurencin, C. T. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2007**, *3*, 301.

(168) Sugimoto, T. *Fine particles: Synthesis, Characterization, and Mechanisms of growth*, **2000**.

(169) Lea, M. C. *Am. J. Sci.* **1889**, *Series 3 Vol. 37*, 476.

(170) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55.

(171) Frends, G. *Nature-Phys. Sci.* **1973**, *241*, 20.

(172) Link, S.; Wang, Z. L.; El-Sayed, M. A. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3529.

(173) Leng, W.; Pati, P.; Vikesland, P. J. *Environ. Sci. Nano* **2015**, *2*, 440.

(174) M. A., H. *Colloidal gold : Principles, Methods, and Applications*, **1989**.

(175) Liz-Marzán, L. M. *Mater. Today* **2004**, *7*, 26.

(176) Patungwasa, W.; Hodak, J. H. *Mater. Chem. Phys.* **2008**, *108*, 45.

(177) Bastús, N. G.; Merkoçi, F.; Piella, J.; Puntes, V. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 2836.

(178) Cheng, Y.; Wang, F.; Fang, C.; Su, J.; Yang, L. *J. Alloys Compd.* **2016**, *658*, 684.

(179) Dong, X.; Ji, X.; Wu, H.; Zhao, L.; Li, J.; Yang, W. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 6573.

(180) Lee, P. C.; Meisel, D. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 3391.

(181) Brust, M.; Walker, M.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Whyman, R. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 801.

(182) Faraday, M. *Philos. T R Soc. Lond.* **1857**, *147*, 145.

(183) Giersig, M.; Mulvaney, P. *Langmuir* **1993**, *9*, 3408.

(184) Goulet, P. J. G.; Lennox, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9582.

(185) Perala, S. R. K.; Kumar, S. *Langmuir* **2013**, *29*, 9863.

(186) Templeton, A. C.; Wuelfing, W. P.; Murray, R. W. *Accounts Chem. Res.* **2000**, *33*, 27.

(187) Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 3974.

(188) Brust, M.; Fink, J.; Bethell, D.; Schiffrin, D. J.; Kiely, C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1655.

(189) Frenkel, A. I.; Nemzer, S.; Pister, I.; Soussan, L.; Harris, T.; Sun, Y.; Rafailovich, M. H. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 184701.

(190) Aslam, M.; Fu, L.; Su, M.; Vijayamohanan, K.; Dravid, V. P. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1795.

(191) Buining, P. A.; Humbel, B. M.; Philipse, A. P.; Verkleij, A. J. *Langmuir* **1997**, *13*, 3921.

(192) Shem, P. M.; Sardar, R.; Shumaker-Parry, J. S. *Langmuir* **2009**, *25*, 13279.

(193) Yonezawa, T.; Yasui, K.; Kimizuka, N. *Langmuir* **2001**, *17*, 271.

(194) Hostetler, M. J.; Templeton, A. C.; Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 3782.

(195) Lin, S.-Y.; Tsai, Y.-T.; Chen, C.-C.; Lin, C.-M.; Chen, C.-h. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2134.

(196) Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2003**, *104*, 293.

(197) Ravindran, A.; Chandran, P.; Khan, S. S. *Colloid Surf. B* **2013**, *105*, 342.

(198) Crooks, R. M.; Zhao, M.; Sun, L.; Chechik, V.; Yeung, L. K. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 181.

(199) Scott, R. W. J.; Wilson, O. M.; Crooks, R. M. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 692.

(200) Niu, Y.; Crooks, R. M. *CR Chim.* **2003**, *6*, 1049.

(201) Kim, Y.-G.; Oh, S.-K.; Crooks, R. M. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 167.

(202) Rahman, K. M. A.; Durning, C. J.; Turro, N. J.; Tomalia, D. A. *Langmuir* **2000**, *16*, 10154.

(203) Ye, H.; Scott, R. W. J.; Crooks, R. M. *Langmuir* **2004**, *20*, 2915.

(204) Zhang, Y.; Peng, H.; Huang, W.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Yan, D. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 2330.

(205) Haba, Y.; Kojima, C.; Harada, A.; Ura, T.; Horinaka, H.; Kono, K. *Langmuir* **2007**, *23*, 5243.

(206) Hedden, R. C.; Bauer, B. J.; Paul Smith, A.; Gröhn, F.; Amis, E. *Polymer* **2002**, *43*, 5473.

(207) Nemanashi, M.; Meijboom, R. *J. Colloid Interf. Sci.* **2013**, *389*, 260.

(208) Sun, X.; Jiang, X.; Dong, S.; Wang, E. *Macromol. Rapid Commun.* **2003**, *24*, 1024.

(209) Krasteva, N.; Guse, B.; Besnard, I.; Yasuda, A.; Vossmeyer, T. *Sensor Actuat. B-Chem.* **2003**, *92*, 137.

(210) Yeung, L. K.; Crooks, R. M. *Nano Lett.* **2001**, *1*, 14.

(211) Ornelas, C.; Ruiz, J.; Salmon, L.; Astruc, D. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 837.

(212) Esumi, K.; Suzuki, A.; Aihara, N.; Usui, K.; Torigoe, K. *Langmuir* **1998**, *14*, 3157.

(213) Xiangyang, S.; Ganser, T. R.; Kai, S.; Lajos, P. B.; James, R. B., Jr. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 1072.

(214) Liu, J. a.; Li, H.; Wang, W.; Xu, H.; Yang, X.; Liang, J.; He, Z. *Small* **2006**, *2*, 999.

(215) Kumar, V. K. R.; Gopidas, K. R. *Chem. Asian J.* **2010**, *5*, 887.

(216) Daniel, M.-C.; Ruiz, J.; Nlate, S.; Blais, J.-C.; Astruc, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2617.

(217) Cutler, E. C.; Lundin, E.; Garabato, B. D.; Choi, D.; Shon, Y.-S. *Mater. Res. Bull.* **2007**, *42*, 1178.

(218) Kamata, H.; Zinchenko, A.; Murata, S. *Colloid Polym Sci* **2011**, *289*, 1329.

(219) Abu-Reziq, R.; Alper, H.; Wang, D.; Post, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5279.

(220) Srisombat, L.-o.; Park, J.-S.; Zhang, S.; Lee, T. R. *Langmuir* **2008**, *24*, 7750.

(221) Warner, M. G.; Reed, S. M.; Hutchison, J. E. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 3316.

(222) She, W.; Li, N.; Luo, K.; Guo, C.; Wang, G.; Geng, Y.; Gu, Z. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2252.

(223) Kono, K.; Liu, M.; Fréchet, J. M. J. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 1115.

(224) Quintana, A.; Raczka, E.; Piehler, L.; Lee, I.; Myc, A.; Majoros, I.; Patri, A.; Thomas, T.; Mulé, J.; Baker, J., Jr. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1310.

(225) Dantlgraber, G.; Baumeister, U.; Diele, S.; Kresse, H.; Lühmann, B.; Lang, H.; Tschierske, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14852.

(226) Slagt, Martijn Q.; Jastrzebski, Johann T. B. H.; Gebbink, Robertus J. M. K.; Ramesdonk, Hendrik J. v.; Verhoeven, Jan W.; Ellis, Dianne D.; Spek, Anthony L.; Koten, Gerard v. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 1692.

(227) Lebedev, B. V.; Kulagina, T. G.; Ryabkov, M. V.; Ponomarenko, S. A.; Makeev, E. A.; Boikov, N. I.; Shibaev, V. P.; Rebrov, E. A.; Muzafarov, A. M. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2003**, *71*, 481.

(228) Wong, Y.; Cooper, H. M.; Zhang, K.; Chen, M.; Bartlett, P.; Xu, Z. P. *J. Colloid Interf. Sci.* **2012**, *369*, 453.

(229) Chen, M.; Cooper, H. M.; Zhou, J. Z.; Bartlett, P. F.; Xu, Z. P. *J. Colloid Interf. Sci.* **2013**, *390*, 275.

(230) Kim, M.-K.; Jeon, Y.-M.; Jeon, W. S.; Kim, H.-J.; Hong, S. G.; Park, C. G.; Kim, K. *Chem. Commun.* **2001**, 667.

(231) Woehrle, G. H.; Brown, L. O.; Hutchison, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2172.

(232) Kassam, A.; Bremner, G.; Clark, B.; Ulibarri, G.; Lennox, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3476.

(233) Warner, M. G.; Hutchison, J. E. In *Functionalization and Surface Treatment of Nanoparticles*; Baraton, M.-I., Ed.; American Scientific Publishers: San Francisco, **2003**, p 67.

(234) Hostetler, M. J.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4212.

(235) Templeton, A. C.; Chen, S.; Gross, S. M.; Murray, R. W. *Langmuir* **1999**, *15*, 66.

(236) Ionita, P.; Caragheorgheopol, A.; Gilbert, B. C.; Chechik, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9048.

(237) Montalti, M.; Prodi, L.; Zaccheroni, N.; Baxter, R.; Teobaldi, G.; Zerbetto, F. *Langmuir* **2003**, *19*, 5172.

(238) Si, S.; Gautier, C.; Boudon, J.; Taras, R.; Gladiali, S.; Bürgi, T. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 12966.

(239) Shichibu, Y.; Negishi, Y.; Tsukuda, T.; Teranishi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13464.

(240) Rucareanu, S.; Gandubert, V. J.; Lennox, R. B. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4674.

(241) Choi, D.; Chinn, L.; Shon, Y.-S. *Polym. Mater. Sci. Eng.* **2005**, *93*, 739.

(242) Shon, Y.-S.; Choi, D. *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 644.

(243) Shon, Y.-S.; Choi, D.; Dare, J.; Dinh, T. *Langmuir* **2008**, *24*, 6924.

(244) Paez, J. I.; Cappelletti, A. L.; Baruzzi, A. M.; Brunetti, V.; Strumia, M. C. *Macromol. Symp.* **2010**, *290*, 37.

(245) Pan, B.-F.; Gao, F.; Gu, H.-C. *J. Colloid Interf. Sci.* **2005**, *284*, 1.

(246) Shon, Y.-S.; Choi, D.; Dare, J.; Dinh, T. *Langmuir* **2008**, *24*, 8.

(247) Tang, S.; Hewlett, I. *J. Infect. Dis.* **2010**, *201 Suppl 1*, S59.

(248) Brus, L. *Appl. Phys. A-Mater.* **1991**, *53*, 465.

(249) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215.

(250) Amendola, V.; Meneghetti, M. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 4277.

(251) Martínez-Castañón, G. A.; Niño-Martínez, N.; Martínez-Gutierrez, F.; Martínez-Mendoza, J. R.; Ruiz, F. *J. Nanopart. Res.* **2008**, *10*, 1343.

(252) Jin, R.; Charles Cao, Y.; Hao, E.; Metraux, G. S.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. *Nature* **2003**, *425*, 487.

(253) Mishchenko, M. I.; Travis, L. D.; Lacis, A. A. *Scattering, Absorption, and Emission of Light by Small Particles*, **2002**.

(254) Gaikwad, A. V.; Verschuren, P.; Eiser, E.; Rothenberg, G. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 17437.

(255) Burda, C.; Green, T.; Landes, C.; Link, S.; Little, R.; Petroski, J.; El-Sayed, M. A. In *Characterization of Nanophase Materials*; Wiley-VCH Verlag GmbH: **2001**, p 197.

(256) Mulvaney, P. *Langmuir* **1996**, *12*, 788.

(257) Hostetler, M. J.; Wingate, J. E.; Zhong, C.-J.; Harris, J. E.; Vachet, R. W.; Clark, M. R.; Londono, J. D.; Green, S. J.; Stokes, J. J.; Wignall, G. D.; Glish, G. L.; Porter, M. D.; Evans, N. D.; Murray, R. W. *Langmuir* **1998**, *14*, 17.

(258) Singh, S. C.; Zeng, H. B.; Guo, C.; Cai, W. *Nanomaterials: Processing and Characterization with Lasers*, **2012**.

(259) Mahmudin, L.; Suharyadi, E.; Utomo, A.; Abraha, K. *Int. J. Mod. Phys. A* **2015**, *6*, 1071.

(260) Kaushik, V.; Lahiri, T.; Singha, S.; Dasgupta, A. K.; Mishra, H.; Kumar, U.; Kumar, R. *Bioinformation* **2011**, *7*, 320.

(261) Liu, X.; Atwater, M.; Wang, J.; Huo, Q. *Colloids Surf., B.* **2007**, *58*, 3.

(262) Anil Kumar, S.; Abyaneh, M. K.; Gosavi, S. W.; Kulkarni, S. K.; Pasricha, R.; Ahmad, A.; Khan, M. I. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 439.

(263) Oh, S.-K.; Kim, Y.-G.; Ye, H.; Crooks, R. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 10420.

(264) Umeda, Y.; Kojima, C.; Harada, A.; Horinaka, H.; Kono, K. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1559.

(265) Domingos, R. F.; Baalousha, M. A.; Ju-Nam, Y.; Reid, M. M.; Tufenkji, N.; Lead, J. R.; Leppard, G. G.; Wilkinson, K. J. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 7277.

(266) Tang, Q.; Cheng, F.; Lou, X.-L.; Liu, H.-J.; Chen, Y. *J. Colloid Interf. Sci.* **2009**, *337*, 485.

(267) Woehrle, G. H.; Hutchison, J. E.; ÖZkar, S.; Finke, R. G. *Turk. J. Chem.* **2006**, *30*, 1.

(268) Zheng, N.; Fan, J.; Stucky, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6550.

(269) Terrill, R. H.; Postlethwaite, T. A.; Chen, C.-h.; Poon, C.-D.; Terzis, A.; Chen, A.; Hutchison, J. E.; Clark, M. R.; Wignall, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12537.

(270) Labande, A.; Ruiz, J.; Astruc, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1782.

(271) Tomaszewska, E.; Soliwoda, K.; Kadziola, K.; Tkacz-Szczesna, B.; Celichowski, G.; Cichomski, M.; Szmaja, W.; Grobelny, J. *J. Nanomater.* **2013**, *2013*, 60.

(272) Cho, T. J.; Hackley, V. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 2003.

(273) Bolea, E.; Jiménez-Lamana, J.; Laborda, F.; Castillo, J. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 2723.

(274) Baer, D. R.; Gaspar, D. J.; Nachimuthu, P.; Techane, S. D.; Castner, D. G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 983.

(275) Clogston, J. D.; Patri, A. K. In *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*; McNeil, E. S., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **2011**, p 63.

(276) Goldberg, M.; Langer, R.; Jia, X. *J. Biomat. Sci-Polym. E.* **2007**, *18*, 241.

(277) Zaupa, G.; Mora, C.; Bonomi, R.; Prins, L. J.; Scrimin, P. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 4879.

(278) Gentilini, C.; Franchi, P.; Mileo, E.; Polizzi, S.; Lucarini, M.; Pasquato, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3060.

(279) Cure, J.; Coppel, Y.; Dammak, T.; Fazzini, P. F.; Mlayah, A.; Chaudret, B.; Fau, P. *Langmuir* **2015**, *31*, 1362.

(280) Liu, X.; Yu, M.; Kim, H.; Mameli, M.; Stellacci, F. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1182.

(281) Mott, D. M.; Chemistry, S. U. o. N. Y. a. B. *Synthesis, Characterization, and Catalysis of Metal Nanoparticles*, **2008**.

(282) Stuart, D. A.; Haes, A. J.; Yonzon, C. R.; Hicks, E. M.; Van Duyne, R. P. *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **2005**, *152*, 13.

(283) Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. *Science* **1997**, *277*, 1078.

(284) Kahn, N.; Lavie, O.; Paz, M.; Segev, Y.; Haick, H. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 7023.

(285) Hirsch, L. R.; Stafford, R. J.; Bankson, J. A.; Sershen, S. R.; Rivera, B.; Price, R. E.; Hazle, J. D.; Halas, N. J.; West, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 13549.

(286) Mieszawska, A. J.; Mulder, W. J. M.; Fayad, Z. A.; Cormode, D. P. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 831.

(287) Hernández-Pedro, N. Y.; Rangel-López, E.; Magaña-Maldonado, R.; de la Cruz, V. P.; Santamaría del Angel, A.; Pineda, B.; Sotelo, J. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 20.

(288) Suda, Y.; Baba, M.; Okamoto, M.;**2015**,US20150218661 A1

(289) Akhtar, M. J.; Alhadlaq, H. A.; Kumar, S.; Alrokayan, S. A.; Ahamed, M. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 1895.

(290) Colombeau, L.; Acherar, S.; Baros, F.; Arnoux, P.; Gazzali, A. M.; Zaghdoudi, K.; Toussaint, M.; Vanderesse, R.; Frochot, C. In *Light-Responsive Nanostructured Systems for Applications in Nanomedicine*; Sortino, S., Ed.; Springer International Publishing: Cham, **2016**, p 113.

(291) Drescher, D.; Giesen, C.; Traub, H.; Panne, U.; Kneipp, J.; Jakubowski, N. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9684.

(292) Campelo, J. M.; Luna, D.; Luque, R.; Marinas, J. M.; Romero, A. A. *ChemSusChem* **2009**, *2*, 18.

(293) Cuenya, B. R. *Thin Solid Films* **2010**, *518*, 3127.

(294) Zhang, L.; Anderson, R. M.; Crooks, R. M.; Henkelman, G. *Surf. Sci.* **2015**, *640*, 65.

(295) James, F. H.; Daniel, N. S.; Henry, M. S. *Phys. Med. Biol.* **2004**, *49*, N309.

(296) Sang Hyun, C. *Phys. Med. Biol.* **2005**, *50*, N163.

(297) Zhang, N.; Chen, H.; Liu, A.-Y.; Shen, J.-J.; Shah, V.; Zhang, C.; Hong, J.; Ding, Y. *Biomaterials* **2016**, *74*, 280.

(298) Adijanto, J.; Naash, M. I. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *95, Part B*, 353.

(299) Narain, R. *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*, **2016**.

(300) Gopinath, P.; Sonit Kumar, G.; Arun, C.; Siddhartha Sankar, G. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 075104.

(301) Guzman, M.; Dille, J.; Godet, S. *Nanomedicine* **2012**, *8*, 37.

(302) Wang, A. Z.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. *Annu. Rev. Med.* **2012**, *63*, 185.

(303) Adeyemi, O. S.; Sulaiman, F. A. *J. Biomed. Res.* **2015**, *29*, 145.

(304) Hanson, R. N.; Amiji, M.; Weissig, V.;**2015**,US20100260676 A1

(305) Sharma, H.; Mishra, P. K.; Talegaonkar, S.; Vaidya, B. *Drug Discov. Today* **2015**, *20*, 1143.

(306) Panchangam, R.; Dutta, T. *J. Pharm. Drug. Deliv. Res.* **2015**, *1*, 2.

(307) Santos, H. A.; Bimbo, L. M.; Peltonen, L.; Hirvonen, J. In *Targeted Drug Delivery : Concepts and Design*; Devarajan, V. P., Jain, S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, **2015**, p 571.

(308) Fixler, D.; Ankri, R.;**2015**,US20150196200 A1

(309) Chinen, A. B.; Guan, C. M.; Ferrer, J. R.; Barnaby, S. N.; Merkel, T. J.; Mirkin, C. A. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10530.

(310) Abalde-Cela, S.; Carregal-Romero, S.; Coelho, J. P.; Guerrero-Martínez, A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**.

(311) Abbaszadegan, A.; Ghahramani, Y.; Gholami, A.; Hemmateenejad, B.; Dorostkar, S.; Nabavizadeh, M.; Sharghi, H. *J. Nanomaterials* **2015**, *2015*, 8.

(312) Lin, W. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 10407.

(313) Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293.

(314) DuChene, J. S.; Niu, W.; Abendroth, J. M.; Sun, Q.; Zhao, W.; Huo, F.; Wei, W. D. *Chem. Mater.* **2013**, *25*, 1392.

(315) Lohse, S. E.; Burrows, N. D.; Scarabelli, L.; Liz-Marzán, L. M.; Murphy, C. J. *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 34.

(316) Millstone, J. E.; Wei, W.; Jones, M. R.; Yoo, H.; Mirkin, C. A. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2526.

(317) Smith, D. K.; Miller, N. R.; Korgel, B. A. *Langmuir* **2009**, *25*, 9518.

(318) Ansar, S. M.; Gadogbe, M.; Siriwardana, K.; Howe, J. Y.; Dogel, S.; Hosseinkhannazer, H.; Collier, W. E.; Rodriguez, J.; Zou, S.; Zhang, D. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 24925.

(319) Templeton, A. C.; Hostetler, M. J.; Kraft, C. T.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1906.

(320) Sun, L.; Crooks, R. M.; Chechik, V. *Chem. Commun.* **2001**, 359.

(321) Garcia-Gallego, S.; Cangiotti, M.; Fiorani, L.; Fattori, A.; Munoz-Fernandez, M. a. A.; Gomez, R.; Ottaviani, M. F.; Javier de la Mata, F. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 5874.

(322) Galán, M.; Sánchez-Rodríguez, J.; Cangiotti, M.; Garcia-Gallego, S.; Jimenez, J. L.; Gomez, R.; Ottaviani, M. F.; Munoz-Fernandez, M. A.; Mata, F. J. d. l. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4984.

(323) Moulder, J. F.; Stickle, W. F.; Sobol, P. E.; Bomben, K. D. *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, **1995**.

(324) Terlingen, J. G. A.; Feijen, J.; Hoffman, A. S. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, *155*, 55.

(325) Volmer, M.; Stratmann, M.; Viefhaus, H. *Surf. Interface Anal.* **1990**, *16*, 278.

(326) Zhongyi, H.; Liping, X.; Sheng, H.; Aixi, C.; Jianwei, Q.; Xisheng, F. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62050.

(327) García-Gallego, S.; Rodríguez, J. S.; Jiménez, J. L.; Cangiotti, M.; Ottaviani, M. F.; Muñoz-Fernández, M. A.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 6488.

(328) Garcia-Gallego, S.; Serramia, M. J.; Arnaiz, E.; Diaz, L.; Munoz-Fernandez, M. A.; Gomez-Sal, P.; Ottaviani, M. F.; Gomez, R.; de la Mata, F. J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 1657.

(329) Rasines, B.; Sanchez-Nieves, J.; Maiolo, M.; Maly, M.; Chonco, L.; Jimenez, J. L.; Munoz-Fernandez, M. A.; de la Mata, F. J.; Gomez, R. *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 12733.

(330) Jackson, S. R.; Wong, A. C.; Travis, A. R.; Catrina, I. E.; Bratu, D. P.; Wright, D. W.; Jayagopal, A. In *Methods in enzymology*; Grigory, S. F., Samie, R. J., Eds.; Academic Press: **2016**; Vol. Volume 572, p 87.

(331) Park, Y. In *Biomedical Engineering: Frontier Research and Converging Technologies*; Jo, H., Jun, H.-W., Shin, J., Lee, S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, **2016**, p 3.

(332) Srikar, R.; Suresh, D.; Saranathan, S.; Zambre, A.; Kannan, R. *Langmuir* **2016**, *32*, 4877.

(333) Hughes, G. A. *Nanomedicine (NBM)* **2005**, *1*, 22.

(334) Haun, J. B.; Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S. A.; Lee, H.; Weissleder, R. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 660.

(335) Arvizo, R. R.; Saha, S.; Wang, E.; Robertson, J. D.; Bhattacharya, R.; Mukherjee, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 6700.

(336) Sun, Y.-N.; Wang, C.-D.; Zhang, X.-M.; Ren, L.; Tian, X.-H. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2011**, *11*, 1210.

(337) Goodman, C. M.; McCusker, C. D.; Yilmaz, T.; Rotello, V. M. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15*, 897.

(338) Niidome, T.; Yamagata, M.; Okamoto, Y.; Akiyama, Y.; Takahashi, H.; Kawano, T.; Katayama, Y.; Niidome, Y. *J. Control. Release* **2006**, *114*, 343.

(339) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740.

(340) Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 681.

(341) Ding, Y.; Jiang, Z.; Saha, K.; Kim, C. S.; Kim, S. T.; Landis, R. F.; Rotello, V. M. *Mol. Ther.* **2014**, *22*, 1075.

(342) MubarakAli, D.; Thajuddin, N.; Jeganathan, K.; Gunasekaran, M. *Colloid Surf., B* **2011**, *85*, 360.

(343) Peña-González, C. E.; García-Broncano, P.; Ottaviani, M. F.; Cangiotti, M.; Fattori, A.; Hierro-Oliva, M.; González-Martín, M. L.; Pérez-Serrano, J.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. Á.; Sánchez-Nieves, J.; de la Mata, F. J. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2987.

(344) Bowman, M.-C.; Ballard, T. E.; Ackerson, C. J.; Feldheim, D. L.; Margolis, D. M.; Melander, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6896.

(345) Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V. *J. Nanopart. Res.* **2010**, *12*, 1531.

(346) Galdiero, S.; Falanga, A.; Vitiello, M.; Cantisani, M.; Marra, V.; Galdiero, M. *Molecules* **2011**, *16*, 8894.

(347) Jeyaraj, M.; Sathishkumar, G.; Sivanandhan, G.; MubarakAli, D.; Rajesh, M.; Arun, R.; Kapildev, G.; Manickavasagam, M.; Thajuddin, N.; Premkumar, K.; Ganapathi, A. *Colloid Surf., B* **2013**, *106*, 86.

(348) Carlson, C.; Hussain, S. M.; Schrand, A. M.; K. Braydich-Stolle, L.; Hess, K. L.; Jones, R. L.; Schlager, J. J. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13608.

(349) AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveettil, S. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279.

(350) Svenson, S.; Tomalia, D. A. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2012**, *64, Supplement*, 102.

(351) Torchilin, V. In *Handbook of Nanobiomedical Research: Fundamentals, Applications and Recent Developments*; World Scientific Publishing Company: Northeastern University, USA, **2014**; Vol. 3, p 279.

(352) Maroto-Diaz, M.; Elie, B. T.; Gomez-Sal, P.; Perez-Serrano, J.; Gomez, R.; Contel, M.; Javier de la Mata, F. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 7049.

(353) Serramía, M. J.; Álvarez, S.; Fuentes-Paniagua, E.; Clemente, M. I.; Sánchez-Nieves, J.; Gómez, R.; de la Mata, J.; Muñoz-Fernández, M. Á. *J. Control. Release* **2015**, *200*, 60.

(354) Basly, B.; Felder-Flesch, D.; Perriat, P.; Pourroy, G.; Bégin-Colin, S. *Contrast Media Mol. Imaging* **2011**, *6*, 132.

(355) Kim, S. T.; Chompoosor, A.; Yeh, Y.-C.; Agasti, S. S.; Solfiell, D. J.; Rotello, V. M. *Small* **2012**, *8*, 3253.

(356) Naddeo, J. J.; Ratti, M.; O'Malley, S. M.; Griepenburg, J. C.; Bubb, D. M.; Klein, E. A. *Adv. Sci. Eng. Med.* **2015**, *7*, 1044.

(357) Zhou, Y.; Kong, Y.; Kundu, S.; Cirillo, J. D.; Liang, H. *J. Nanobiotechnology* **2012**, *10*, 1.

(358) Daima, H. K.; Selvakannan, P. R.; Shukla, R.; Bhargava, S. K.; Bansal, V. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79676.

(359) Rizzello, L.; Pompa, P. P. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1501.

(360) Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 1712.

(361) Silva, T.; Pokhrel, L. R.; Dubey, B.; Tolaymat, T. M.; Maier, K. J.; Liu, X. *Sci. Total Environ.* **2014**, *468–469*, 968.

(362) Ortega, P.; Copa-Patino, J. L.; Munoz-Fernandez, M. A.; Soliveri, J.; Gomez, R.; de la Mata, F. J. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3264.

(363) Majumdar, P.; Lee, E.; Gubbins, N.; Stafslien, S. J.; Daniels, J.; Thorson, C. J.; Chisholm, B. J. *Polymer* **2009**, *50*, 1124.

(364) Li, X.; Robinson, S. M.; Gupta, A.; Saha, K.; Jiang, Z.; Moyano, D. F.; Sahar, A.; Riley, M. A.; Rotello, V. M. *ACS Nano* **2014**, *8*, 10682.

(365) Hajipour, M. J.; Fromm, K. M.; Akbar Ashkarran, A.; Jimenez de Aberasturi, D.; Larramendi, I. R. d.; Rojo, T.; Serpooshan, V.; Parak, W. J.; Mahmoudi, M. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 499.

(366) Studer, A. M.; Limbach, L. K.; Van Duc, L.; Krumeich, F.; Athanassiou, E. K.; Gerber, L. C.; Moch, H.; Stark, W. J. *Toxicol. Lett.* **2010**, *197*, 169.

(367) Prabhu, S.; Poulose, E. *Int. Nano Lett.* **2012**, *2*, 32.

(368) Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. *J. Colloid Interf. Sci.* **2004**, *275*, 177.

(369) Cui, Y.; Zhao, Y.; Tian, Y.; Zhang, W.; Lü, X.; Jiang, X. *Biomaterials* **2012**, *33*, 2327.

(370) Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J.-H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C.-Y.; Kim, Y.-K.; Lee, Y.-S.; Jeong, D. H.; Cho, M.-H. *Nanomedicine (NBM)* **2007**, *3*, 95.

(371) Danilczuk, M.; Lund, A.; Sadlo, J.; Yamada, H.; Michalik, J. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2006**, *63*, 189.

(372) Feng, Q. L.; Wu, J.; Chen, G. Q.; Cui, F. Z.; Kim, T. N.; Kim, J. O. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 662.

(373) Jung, W. K.; Koo, H. C.; Kim, K. W.; Shin, S.; Kim, S. H.; Park, Y. H. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 2171.

(374) Patra, C. R.; Bhattacharya, R.; Mukhopadhyay, D.; Mukherjee, P. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2008**, *4*, 99.

(375) Jain, R. K. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **1999**, *1*, 241.

(376) Dreaden, E. C.; Austin, L. A.; Mackey, M. A.; El-Sayed, M. A. *Ther. Deliv.* **2012**, *3*, 457.

(377) Liu, X.; Chen, Y.; Li, H.; Huang, N.; Jin, Q.; Ren, K.; Ji, J. *ACS Nano* **2013**, *7*, 6244.

(378) Holback, H.; Yeo, Y. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 1819.

(379) Cherukuri, P.; Glazer, E. S.; Curley, S. A. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 339.

(380) Conde, J.; Doria, G.; Baptista, P. *J. Drug. Deliv.* **2012**, *2012*, 12.

(381) Libutti, S. K.; Paciotti, G. F.; Byrnes, A. A.; Alexander, H. R.; Gannon, W. E.; Walker, M.; Seidel, G. D.; Yuldasheva, N.; Tamarkin, L. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 6139.

(382) Park, H.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. *Biomaterials* **2014**, *35*, 3480.

(383) Mukherjee, P.; Bhattacharya, R.; Wang, P.; Wang, L.; Basu, S.; Nagy, J. A.; Atala, A.; Mukhopadhyay, D.; Soker, S. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3530.

(384) Bhattacharya, R.; Patra, C. R.; Verma, R.; Kumar, S.; Greipp, P. R.; Mukherjee, P. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 711.

(385) Mukherjee, P.; Bhattacharya, R.; Bone, N.; Lee, Y. K.; Patra, C. R.; Wang, S.; Lu, L.; Secreto, C.; Banerjee, P. C.; Yaszemski, M. J.; Kay, N. E.; Mukhopadhyay, D. *J. Nanobiotechnology* **2007**, *5*, 4.

(386) Krishnaraj, C.; Muthukumaran, P.; Ramachandran, R.; Balakumaran, M. D.; Kalaichelvan, P. T. *Biotechnol. Rep.* **2014**, *4*, 42.

(387) Sriram, M. I.; Kanth, S. B. M.; Kalishwaralal, K.; Gurunathan, S. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5*, 753.

(388) Gopinath, P.; Gogoi, S. K.; Chattopadhyay, A.; Ghosh, S. S. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 075104.

(389) Gurunathan, S.; Han, J. W.; Eppakayala, V.; Jeyaraj, M.; Kim, J.-H. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 10.

(390) ONUSIDA 2016, p http://www.unaids.org/es/resources/fact.

(391) Kesarkar, R.; Oza, G.; Pandey, S.; Dahake, R.; Mukherjee, S.; Chowdhary, A.; Sharon, M. *J. Microbiol. Biotech. Res.* **2012**, *2*, 276.

(392) Lara, H. H.; Ayala-Nuñez, N. V.; Ixtepan-Turrent, L.; Rodriguez-Padilla, C. *J. Nanobiotechnology* **2010**, *8*, 1.

(393) Muriaux, D.; Darlix, J. L. *RNA Biol.* **2010**, *7*, 744.

(394) Zhu, P.; Liu, J.; Bess, J., Jr.; Chertova, E.; Lifson, J. D.; Grise, H.; Ofek, G. A.; Taylor, K. A.; Roux, K. H. *Nature* **2006**, *441*, 847.

(395) Sierra, S.; Kupfer, B.; Kaiser, R. *J. Clin. Virol.* **2005**, *34*, 233.

(396) Turner, B. G.; Summers, M. F. *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 1.

(397) Frankel, A. D.; Young, J. A. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 1.

(398) Di Gianvincenzo, P.; Marradi, M.; Martínez-Ávila, O. M.; Bedoya, L. M.; Alcamí, J.; Penadés, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2718.

(399) Elechiguerra, J. L.; Burt, J. L.; Morones, J. R.; Camacho-Bragado, A.; Gao, X.; Lara, H. H.; Yacaman, M. J. *J. Nanobiotechnology* **2005**, *3*, 6.

(400) Resnier, P.; Montier, T.; Mathieu, V.; Benoit, J.-P.; Passirani, C. *Biomaterials* **2013**, *34*, 6429.

(401) Walther, W.; Schlag, P. M. *Curr. Opin. Oncol.* **2013**, *25*, 659.

(402) Yu, M.; Poeschla, E.; Wong-Staal, F. *Gene Ther.* **1994**, *1*, 13.

(403) Patil, S. D.; Rhodes, D. G.; Burgess, D. J. *The AAPS J.* **2005**, *7*, E61.

(404) Munyendo, W. L.; Lv, H.; Benza-Ingoula, H.; Baraza, L. D.; Zhou, J. *Biomolecules* **2012**, *2*, 187.

(405) Ryther, R. C. C.; Flynt, A. S.; Phillips, J. A.; Patton, J. G. *Gene Ther.* **2004**, *12*, 5.

(406) Medina-Kauwe, L. K.; Xie, J.; Hamm-Alvarez, S. *Gene Ther.* **2005**, *12*, 1734.

(407) Torchilin, V. P. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 343.

(408) Sokolova, V.; Epple, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 1382.

(409) Xu, Z. P.; Zeng, Q. H.; Lu, G. Q.; Yu, A. B. *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1027.

(410) Natalia, V.; Evgenya, D.; Robert, D.; Gustav, S. In *Advances and Challenges in the Delivery of Nucleic Acid Therapeutics (Volume 1)*; Future Medicine Ltd: **2015**, p 108.

(411) Seferos, D. S.; Prigodich, A. E.; Giljohann, D. A.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 308.

(412) Alhakamy, N. A.; Nigatu, A. S.; Berkland, C. J.; Ramsey, J. D. *Ther. Deliv.* **2013**, *4*, 741.

(413) Lindgren, M.; Rosenthal-Aizman, K.; Saar, K.; Eiriksdottir, E.; Jiang, Y.; Sassian, M.; Ostlund, P.; Hallbrink, M.; Langel, U. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 416.

(414) McIntosh, C. M.; Esposito, E. A.; Boal, A. K.; Simard, J. M.; Martin, C. T.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7626.

(415) Sarkar, K.; Banerjee, S. L.; Kundu, P. P.; Madras, G.; Chatterjee, K. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 5266.

(416) Bora, R. S.; Gupta, D.; Mukkur, T. K.; Saini, K. S. *Mol. Med. Rep.* **2012**, *6*, 9.

(417) Giljohann, D. A.; Seferos, D. S.; Prigodich, A. E.; Patel, P. C.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2072.

(418) Lee, J.-S.; Green, J. J.; Love, K. T.; Sunshine, J.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2402.

(419) Guo, S.; Huang, Y.; Jiang, Q.; Sun, Y.; Deng, L.; Liang, Z.; Du, Q.; Xing, J.; Zhao, Y.; Wang, P. C.; Dong, A.; Liang, X.-J. *ACS Nano* **2010**, *4*, 5505.

(420) Lee, S. H.; Bae, K. H.; Kim, S. H.; Lee, K. R.; Park, T. G. *Int. J. Pharm.* **2008**, *364*, 94.

(421) Rosi, N. L.; Giljohann, D. A.; Thaxton, C. S.; Lytton-Jean, A. K.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. *Science* **2006**, *312*, 1027.

(422) Whitehead, K. A.; Langer, R.; Anderson, D. G. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, *8*, 129.

(423) Sandhu, K. K.; McIntosh, C. M.; Simard, J. M.; Smith, S. W.; Rotello, V. M. *Bioconjug. Chem.* **2002**, *13*, 3.

(424) Han, G.; Martin, C. T.; Rotello, V. M. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 78.

(425) Chatterjee, S.; Johnson, P. R.; Wong, K. K., Jr. *Science* **1992**, *258*, 1485.

(426) Levine, B. L.; Humeau, L. M.; Boyer, J.; MacGregor, R. R.; Rebello, T.; Lu, X.; Binder, G. K.; Slepushkin, V.; Lemiale, F.; Mascola, J. R.; Bushman, F. D.; Dropulic, B.; June, C. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17372.

(427) Lu, X.; Yu, Q.; Binder, G. K.; Chen, Z.; Slepushkina, T.; Rossi, J.; Dropulic, B. *J. Virol.* **2004**, *78*, 7079.

(428) Swamy, M. N.; Wu, H.; Shankar, P. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2016**.

(429) Martinez, M. A.; Clotet, B.; Este, J. A. *Trends Immunol.* **2002**, *23*, 559.

(430) Novina, C. D.; Murray, M. F.; Dykxhoorn, D. M.; Beresford, P. J.; Riess, J.; Lee, S. K.; Collman, R. G.; Lieberman, J.; Shankar, P.; Sharp, P. A. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 681.

(431) Anderson, J.; Akkina, R. *Retrovirology* **2005**, *2*, 53.

(432) Cordelier, P.; Morse, B.; Strayer, D. S. *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 281.

(433) Ouellet, M.; Mercier, S.; Pelletier, I.; Bounou, S.; Roy, J.; Hirabayashi, J.; Sato, S.; Tremblay, M. J. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 4120.

(434) St-Pierre, C.; Ouellet, M.; Tremblay, M. J.; Sato, S. *Methods Enzymol.* **2010**, *480*, 267.

(435) Reynolds, J. L.; Law, W. C.; Mahajan, S. D.; Aalinkeel, R.; Nair, B.; Sykes, D. E.; Yong, K.-T.; Hui, R.; Prasad, P. N.; Schwartz, S. A. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2012**, *7*, 673.

(436) Tao, Y.; Ju, E.; Ren, J.; Qu, X. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 9791.

(437) Berdnikova, D. V.; Ihmels, H.; Schonherr, H.; Steuber, M.; Wesner, D. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 3766.

(438) Conde, J.; Edelman, E. R.; Artzi, N. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2015**, *81*, 169.

(439) Wadhwani, A. R.; Klein, W. L.; Lacor, P. N. *Nanoscape* **2010**, *7*, 6.

(440) Wang, H.; Chen, Y.; Li, X. Y.; Liu, Y. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 189.

(441) Ghosh, R.; Singh, L. C.; Shohet, J. M.; Gunaratne, P. H. *Biomaterials* **2013**, *34*, 807.

(442) Ahmed, H.; Ahmed, H. *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization*, **2004**.

(443) Nehete, J. Y.; Bhambar, R. S.; Narkhede, M. R.; Gawali, S. R. *Pharmacogn. Rev.* **2013**, *7*, 107.

(444) Łojewska, E.; Kowalczyk, T.; Olejniczak, S.; Sakowicz, T. *Protein Expr. Purif.* **2016**, *120*, 110.

(445) Xu, F.; Geiger, J. H.; Baker, G. L.; Bruening, M. L. *Langmuir* **2011**, *27*, 3106.

(446) Franzreb, M.; Siemann-Herzberg, M.; Hobley, T. J.; Thomas, O. R. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 505.

(447) Sykora, D.; Kasicka, V.; Miksik, I.; Rezanka, P.; Zaruba, K.; Matejka, P.; Kral, V. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 372.

(448) Liu, F.-K. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 9034.

(449) Wang, A.; Wu, C.-J.; Chen, S.-H. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1488.

(450) Nossier, A. I.; Eissa, S.; Ismail, M. F.; Hamdy, M. A.; Azzazy, H. M. E.-S. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *54*, 7.

(451) Vanderpuije, B. N. Y.; Han, G.; Rotello, V. M.; Vachet, R. W. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5491.

(452) Soh, J. H.; Gao, Z. In *Complex-Shaped Metal Nanoparticles*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **2012**, p 477.

(453) Rosarin, F. S.; Mirunalini, S. *J. Bioanal. Biomed.* **2011**, *2011*, 85.

(454) Mishra, V.; Gupta, U.; Jain, N. K. *Die Pharmazie* **2010**, *65*, 891.

(455) Rodrigues, S. F.; Granger, D. N. *Tissue barriers* **2015**, *3*, e978720.

(456) Malik, N.; Wiwattanapatapee, R.; Klopsch, R.; Lorenz, K.; Frey, H.; Weener, J. W.; Meijer, E. W.; Paulus, W.; Duncan, R. *J. Control. Release* **2000**, *65*, 133.

(457) Mecke, A.; Uppuluri, S.; Sassanella, T. M.; Lee, D. K.; Ramamoorthy, A.; Baker, J. R., Jr.; Orr, B. G.; Banaszak Holl, M. M. *Chem. Phys. Lipids* **2004**, *132*, 3.

(458) Munnix, I. C.; Cosemans, J. M.; Auger, J. M.; Heemskerk, J. W. *Thromb. Haemost.* **2009**, *102*, 1149.

(459) Gremmel, T.; Frelinger, A. L., 3rd; Michelson, A. D. *Semin. Thromb. Hemost.* **2016**, *42*, 191.

(460) Crevel, R. In *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology*; Vohr, H.-W., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2005**, p 401.

(461) Kan, A.; Hodgkin, P. D. *Syst. Synth. Biol.* **2014**, *8*, 215.

(462) Tian, W.-D.; Ma, Y.-Q. *Soft Matter* **2012**, *8*, 2627.

(463) Saboor, M.; Ayub, Q.; Ilyas, S.; Moinuddin *Pak. J. Med. Sci.* **2013**, *29*, 891.

(464) Thake, T. H. F.; Webb, J. R.; Nash, A.; Rappoport, J. Z.; Notman, R. *Soft Matter* **2013**, *9*, 10265.

(465) Licata, N. A.; Tkachenko, A. V. *Phys. Rev. Lett.* **2008**, *100*, 158102.

(466) CLSI *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard (M7A7)*; 7 ed., **2006**; Vol. 26 2.

(467) CLSI *Reference Method For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing in Yeast; Aprroved Standard (M27A3)*; 7 ed., **2008**; Vol. 28 14.

(468) Fuentes-Paniagua, E.; Sanchez-Nieves, J.; Hernandez-Ros, J. M.; Fernandez-Ezequiel, A.; Soliveri, J.; Copa-Patino, J. L.; Gomez, R.; Javier de la Mata, F. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 7022.

(469) Chonco, L.; Pion, M.; Vacas, E.; Rasines, B.; Maly, M.; Serramia, M. J.; Lopez-Fernández, L.; de la Mata, F. J.; Álvarez, S.; Gómez, R.; Muñoz-Fernández, M. A. *J. Controll. Rel.* **2012**, *161*, 949.

(470) Panos, G.; Nelson, M. *Biomarkers Med.* **2007**, *1*, 473.

(471) Clapham, P. R.; McKnight, Á. *Br. Med. Bull.* **2001**, *58*, 43.

(472) Galan, M.; Fornaguera, C.; Ortega, P.; Caldero, G.; Lorente, R.; Jimenez, J. L.; Mata, J. d. l.; Munoz-Fernandez, M. A.; Solans, C.; Gomez, R. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 73817.

(473) Adams, J. M.; Cory, S. *Science* **1998**, *281*, 1322.

(474) Minn, A. J.; Kettlun, C. S.; Liang, H.; Kelekar, A.; Vander Heiden, M. G.; Chang, B. S.; Fesik, S. W.; Fill, M.; Thompson, C. B. *Embo J.* **1999**, *18*, 632.

(475) Vander Heiden, M. G.; Li, X. X.; Gottleib, E.; Hill, R. B.; Thompson, C. B.; Colombini, M. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19414.

(476) Hammes, G. G. In *Spectroscopy for the Biological Sciences*; John Wiley & Sons, Inc.: **2005**, p 63.

(477) Bohm, G.; Muhr, R.; Jaenicke, R. *Protein engineering* **1992**, *5*, 191.

(478) Woody, R. W. In *Conformation in Biology and Drug Design*; Academic Press: **1985**; Vol. 7, p 15.

(479) Yang, J. T.; Wu, C. S.; Martinez, H. M. *Methods in enzymology* **1986**, *130*, 208.

(480) Ionov, M.; Lazniewska, J.; Dzmitruk, V.; Halets, I.; Loznikova, S.; Novopashina, D.; Apartsin, E.; Krasheninina, O.; Venyaminova, A.; Milowska, K.; Nowacka, O.; Gomez-Ramirez, R.; de la Mata, F. J.; Majoral, J. P.; Shcharbin, D.; Bryszewska, M. *Int. J. Pharm.* **2015**, *485*, 261.

(481) Pushker, R.; Jacqué, J.-M.; Shields, D. C. *J. Virol.* **2010**, *84*, 3644.

(482) Fuentes-Paniagua, E.; Serramía, M. J.; Sánchez-Nieves, J.; Álvarez, S.; Muñoz-Fernández, M. Á.; Gómez, R.; de la Mata, F. J. *Eur. Polym. J.* **2015**, *71*, 61.

(483) de Las Cuevas, N.; Garcia-Gallego, S.; Rasines, B.; de la Mata, F. J.; Guijarro, L. G.; Munoz-Fernandez, M. A.; Gomez, R. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 5052.

(484) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, **2006**.

(485) Bhattacharya, M.; Jain, N.; Bhasne, K.; Kumari, V.; Mukhopadhyay, S. *J. Fluoresc.* **2011**, *21*, 1083.

(486) Vásquez-Villanueva, R.; Marina, M. L.; García, M. C. *J. Funct. Foods* **2015**, *18, Part A*, 137.

(487) Shinde, G. V.; Bangale, G. S.; Umalkar, D. G.; Rathinaraj, B. S.; Yadav, C. S.; Yadav, P. *J. Pharm. Biomed. Sci.* **2010**, *3*, 1.

(488) Merkoci, A. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 13.

(489) Merkoci, A.; Pérez-López, B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 14.

(490) Llevot, A.; Astruc, D. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 16.

(491) Duncan, B.; Kim, C.; Rotello, V. M. *J. Control. Release* **2010**, *148*.

(492) Fröhlich, E. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 5577.

To live in this world you must be able to do three things:

1- To love what is mortal

2- To hold it againts your bones
knowing your own life depends on it

3- When the time comes ***"to let it go"***

"Blackwater woods" by Mary Oliver