

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

SINTESI E CARATTERIZZAZIONE DI NUOVI CHELANTI AZAMACROCICLICI RIGIDIFICATI UTILIZZABILI IN TERAPIA RADIOFARMACEUTICA

RELATORE: PROFESSOR VALERIO DI MARCO **CORRELATRICE**: DOTT. SSA MARIANNA TOSATO **CONTRORELATORE**: PROFESSOR MATTIA STURLESE

LAUREANDA: GIADA COLOMBARA

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

"A result is always a result either it's good or bad. Without trying and failing there is not success." Fazel A. Monikh

RIASSUNTO

Il presente progetto di tesi aveva lo scopo di sintetizzare due nuove molecole, il 4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazabiciclo[5.5.2]tetradecano (CB-DO2S) e 4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11-tetraazabiciclo[6.6.2]esadecano (CB-TE2S), e di studiarne alcune caratteristiche chimico-fisiche. CB-DO2S e CB-TE2S sono chelanti potenzialmente candidabili per complessare radionuclidi, e sono di interesse in diagnostica e terapia radiofarmaceutica.

Queste molecole derivano da due strutture base molto promettenti e già studiate, rispettivamente il *cyclen* e il *cyclam* sostituiti con derivati solforati. In questo lavoro si è considerata l'introduzione innovativa del *cross-bridge*. Tale modifica aveva l'obiettivo di rigidificare la struttura dell'anello, per stabilizzare il complesso metallo-legante sia termodinamicamente che cineticamente.

Per quanto riguarda la sintesi di CB-DO2S, sono state provate diverse vie, nessuna delle quali ha tuttavia permesso di ottenere il prodotto desiderato.

Il composto CB-TE2S, sintetizzato nell'ambito di un precedente lavoro di tesi, è stato quindi indagato per la determinazione delle costanti di dissociazione acida, e della stabilità termodinamica e cinetica di complessi metallo-legante che si formano in ambiente acquoso. In particolare, è stato approfondito il comportamento della molecola nei confronti del rame(II), dell'argento(I) e del mercurio(II) (a tale scopo sono stati utilizzati i nuclei naturali, cioè non radioattivi) usando metodiche potenziometriche, di spettroscopia UV-Vis, NMR e di ESI-MS. Le varie misurazioni hanno consentito di verificare che CB-TE2S non è stabile in soluzioni acquose acide, degradando parzialmente secondo un meccanismo non ancora chiarito. I dati termodinamici ottenuti sono quindi da considerarsi orientativi, e in ogni caso tale instabilità impedisce che il composto in esame possa essere proposto come chelante per preparazioni radiofarmaceutiche.

ABSTRACT

The aim of this thesis project was the synthesis of two new molecules, 4,10-bis[2-(methylsulfanyl)ethyl]-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecane (CB-DO2S) and 4,11-bis[2-(methylsulfanyl)ethyl]-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2] hexadecane (CB-TE2S) and the investigation of some of their chemical-physical properties.

CB-DO2S and CB-TE2S are potentially candidate chelators employable to bind radionuclides, and they are interesting both in diagnostic and radiopharmaceutical therapy.

These molecules derive from two very promising and already studied basic structures, respectively *cyclen* and *cyclam*, substituted with sulfur derivatives. In this project the innovative introduction of cross-bridge was considered.

This change was made in order to rigidify the ring structure, and to thermodynamically and kinetically stabilize the metal-ligand complex.

Regarding CB-DO2S, many synthetic routes were tried, none of which led to the desired product.

CB-TE2S was synthesized in a previous thesis project, it was here investigated in order to obtain its acid dissociation constants, and thermodynamic and kinetic stability of the metal-ligand complexes that form in aqueous solution.

In particular, the molecule's interaction with copper (II), silver (I), and mercury (II) were studied (using the natural nucleus, not the radioactive ones), employing potentiometric techniques, UV-Vis, NMR and ESI-MS.

The measurements demonstrated that CB-TE2S isn't stable in acid aqueous solutions. In these media, the partial degradation of the molecule occurred, with a mechanism that up to now has been not yet understood. Therefore, thermodynamic data collected are considered indicative, and the instability at acid conditions will preclude further studies on this molecule.

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
1.1 Radiofarmaci	1
1.1.1 Agente direzionante	2
1.1.2 Linker	3
1.1.3 Chelante bifunzionale	3
1.1.4 Radiometallo Decadimento α Decadimento β Decadimento γ e conversione interna	6 7 7 8
1.2 Rame-64 e rame-67	11
1.3 Argento-111	15
1.4 Mercurio-197 e mercurio-197m	18
2 SCOPO DELLA TESI	21
3 PRINCIPI TEORICI	23
3.1 Studio degli equilibri di complessamento	23
3.2 Potenziometria	23
3.2.1 Elettrodo di vetro	24
3.2.2 Controllo della forza ionica	25
3.2.3 Elaborazione dei dati potenziometrici	26
3.2.4 Limitazioni della potenziometria	27
3.3 Spettroscopia NMR	28

3.3.1 Interferenza del protone dell'acqua3.3.2 Spettri mono-e bidimensionali	29 30
3.3.3 Determinazione delle costanti di equilibrio	31
3.3.4 Acquisizione a diverse temperature	32
3.4 Spettrofotometria UV-Vis 3.4.1 Determinazione delle costanti di equilibrio	33 35
3.4.2 Studio di cinetiche di reazione	38
3.4.3 Vantaggi e limiti della spettrofotometria UV-Vis	39
4 PARTE SPERIMENTALE	41
4.1 Sintesi di CB-DO2S	41
4.1.1 Materiali	41
4.1.2 Strumentazione	41
4.2 Procedure sintetiche	43
4.2.1 Sintesi di decaidro-2a,4a,6a,8a- tetraazaciclopenta[fg]acenaftilene (GC01)	43
4.2.2 Sintesi del benzil ioduro (GC02)	45
4.2.3 Sintesi di 2a,6a-dibenzildodecaidro-2a,4a,6a,8a- tetraazaciclopenta [fg]acenaftilen-2a,6a-diio (GC03)	46
4.2.4 Sintesi di 4,10-dibenzil-1,4,7,10-tetraazabiciclo [5.5.2] tetradecano (GC04)	47
4.2.5 Tentativi di sintesi di 1,4,7,10-tetraazabiciclo[5.5.2] tetradecano (GC05)	49
4.3 Studio degli equilibri in soluzione	51
4.3.1 Materiali	51
4.3.2 Strumentazione	51
4.4 Preparazione delle soluzioni	52
4.4.1 Soluzioni per le misure potenziometriche	52

4.4.2 Preparazione della soluzione di HNO ₃ 0.1 M	52					
4.4.3 Preparazione della soluzione di NaOH 0.1 M	52					
4.4.4 Preparazione delle soluzioni degli ioni metallici	53					
4.4.5 Soluzioni dei leganti	54					
4.4.6 Preparazione dei campioni per l'analisi all'NMR	54					
4.4.7 Preparazione dei campioni per le misure spettrofotometriche	54					
4.4.8 Preparazione dei campioni per la determinazione indiretta della costante di complessamento Cu ²⁺ /CB-TE2S	54					
4.5 Procedure sperimentali	55					
4.5.1 Titolazioni potenziometriche	55					
4.5.2 Standardizzazione della soluzione di HNO ₃	57					
4.5.3 Calibrazione dell'elettrodo di vetro	58					
4.5.4 Standardizzazione della soluzione di NaOH	58					
4.5.5 Titolazione della soluzione di legante	58					
4.5.6 Conservazione dell'elettrodo di vetro	59					
4.6 Spettroscopia NMR	59					
4.6.1 Strumentazione	59					
4.6.2 Acquisizione di spettri ¹ H-NMR a temperature variabili	59					
4.7 Misurazioni spettrofotometriche UV-Vis						
4.7.1 Studio della cinetica di complessamento	60					
4.7.2 Determinazione delle costanti di stabilità	61					
4.7.3 Determinazione indiretta della costante di complessamento	61					

5 RISULTATI E DISCUSSIONE

63 63

5.1 Sintesi di CB-DO2S

5.1.1 Sintesi dalla letteratura e sintesi attuata	63					
5.2 Caratterizzazione di CB-TE2S	65					
5.3 Titolazioni potenziometriche						
5.3.1 Standardizzazione di HNO₃ e di NaOH, e calibrazione dell'elettrodo	65					
5.3.2 Titolazione di CB-TE2S	67					
5.4 NMR	68					
5.4.1 CB-TE2S	68					
5.4.2 Spettri ¹ H-NMR di soluzioni contenenti CB-TE2S e Ag ⁺	78					
5.4.3 Spettri NMR di soluzioni contenenti CB-TE2S e Hg ²⁺	85					
5.5 Spettrofotometria UV-Vis	87					
5.5.1 Cinetiche di formazione dei complessi tra Cu ²⁺ e CB-TE2S	87					
5.5.2 Instabilità di CB-TE2S	91					
5.5.3 Determinazione delle costanti di complessamento di Cu ²⁺ con CB-TE2S	93					

LUSIONI E PROSPETTIVE 95
LUSIONI E PROSPETTIVE 9

7 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI E SITOGRAFICI 9

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Radiofarmaci

I radiofarmaci sono preparazioni farmaceutiche, impiegate in medicina nucleare, che contengono uno o più radionuclidi. In questa tipologia di farmaci l'attività farmacologica è data dal decadimento radioattivo del radionuclide [1].

I radiofarmaci si dividono in due classi: quelli di derivazione organica e quelli contenenti un metallo (o *metal-based*).

Gli appartenenti alla prima categoria incorporano il radionuclide, sostituendolo a un atomo di idrogeno, e formando un legame covalente, come si vede nel caso del ¹⁸F nel fluorodesossiglucosio (C₆H₁₁¹⁸FO₅, Figura 1) [2].



Figura 1 Struttura chimica del Fluorodesossiglucosio [3].

Questa classe di composti ha però diversi svantaggi, che includono un'emivita molto breve, limitate caratteristiche di decadimento, e una sintesi del radiofarmaco finale piuttosto complessa. Per questi motivi hanno delle applicazioni più limitate, e sono esclusi dall'indagine di processi biologici che avvengono in ore o giorni [2] [4].

Per quanto riguarda i radiofarmaci *metal-based*, questa categoria è ulteriormente suddivisa, in base al ruolo del radiometallo, in *metal-essential* e *metal-nonessential*. Nei farmaci *metal-essential* il radiometallo è fondamentale per il *targeting* biologico, e influenza direttamente la biodistribuzione del farmaco. Tali composti sono di semplice sintesi, ma di utilizzo limitato in quanto i *target* specifici sono pochi (essenzialmente l'apparato scheletrico per i metalli alcalino-terrosi). Al contrario, i farmaci *metal-nonessential* hanno un *design*

modulare e il loro comportamento *in vivo* è teoricamente indipendente dal metallo.

La struttura del farmaco *metal-nonessential* tipico si compone di quattro elementi fondamentali (Figura 2): l'agente direzionante (o di *targeting*), lo spaziatore (o *linker*), il chelante bifunzionale e il radiometallo.



Figura 2 struttura di un radiofarmaco metal-nonessential.

Questo tipo di *drug design* permette di modificare i singoli componenti per modulare la funzionalità del farmaco, e ha un enorme potenziale per lo sviluppo farmaceutico. [2]

1.1.1 Agente direzionante

Questo componente permette il direzionamento sito-specifico del radiofarmaco, tramite *targeting* attivo, e il suo accumulo selettivo [5] [6].

Tra i diversi agenti direzionanti si hanno biomolecole (come peptidi, proteine, anticorpi), composti di origine naturale modificati (come zuccheri, nucleosidi o nucleotidi), e altri costrutti sintetici (piccole molecole, nanoparticelle o liposomi) capaci di interagire specificatamente con strutture (come recettori sovraespressi o antigeni) o condizioni peculiari (come l'ipossia, il pH o la temperatura diversi) presenti solo nel sito di interesse.

I vettori di *targeting* con pesi molecolari maggiori, come gli anticorpi, in genere si prestano meglio a questo approccio, perché la loro affinità e specificità è influenzata in maniera minore dall'aggiunta del complesso radiometallico.

Solitamente questo tipo di radiofarmaci sono monovalenti, hanno quindi un singolo vettore di *targeting*, che può essere legato tramite *linker* al chelante bifunzionale [5].

1.1.2 *Linker*

I *linker* sono utilizzati per mantenere a distanza opportuna il chelante bifunzionale e l'agente direzionante, in modo che il comportamento di queste molecole non venga influenzato dall'altro componente, e per modificare la farmacocinetica del prodotto finale [1] [7]. È importante che questi gruppi distanziatori siano stabili in condizioni fisiologiche (tranne nel caso in cui siano stati progettati per decomporsi in situazioni predeterminate) e non interferiscano con la specificità o l'affinità dell'agente di *targeting*.

I distanziatori più utilizzati sono quelli costituiti da catene alifatiche, da polietilenglicole (PEG) o da amminoacidi (di solito sono molto sfruttati i polimeri di acido glutammico) [5] [7].

1.1.3 Chelante bifunzionale

Il chelante bifunzionale (o BFC, dall'inglese *BiFunctional Chelator*) lega la porzione direzionante, tramite il *linker*, e coordina il metallo; questo permette di minimizzare l'interferenza del radionuclide con l'attività biologica del vettore di *targeting* [5] [8]. Il ruolo del BFC è molto importante anche perché modula la farmacocinetica della molecola finale e permette l'incorporazione del metallo in modo semplice, richiedendo una minima purificazione [9].

Esistono diversi chelanti perché specifici per ogni tipo di metallo e per i diversi stati di ossidazione; non esiste un singolo legante ideale per tutti i radiometalli [5].

È importante che il complesso metallo-chelante sia termodinamicamente stabile e cineticamente inerte per evitare reazioni di competizione (come la transchelazione e la transmetallazione) e la dissociazione del metallo [6] [10]. Per le applicazioni *in vivo*, l'inerzia cinetica dei complessi metallo-chelante può essere anche più rilevante della stabilità termodinamica [4]. Questi prerequisiti non devono però influire negativamente sulle condizioni di complessamento, che devono essere preferenzialmente rapide e ottenibili in condizioni blande [6].

I chelanti bifunzionali sono suddivisibili in due grandi classi: chelanti aciclici e chelanti macrociclici. Nel primo caso si ottengono complessi caratterizzati da una bassa stabilità cinetica in vivo ma, d'altra parte, da una rapida formazione nelle condizioni di complessamento. In Tabella 1 sono riportati alcuni esempi.



Tabella 1 Schematizzazione dei principali chelanti aciclici e loro analoghi bifunzionali (è evidenziata in blu la porzione di legame) [10].

Per quanto riguarda i chelanti macrociclici, sebbene presentino i siti di legame già disposti in modo tale da favorire la geometria e il numero di coordinazione del metallo, il complessamento avviene più lentamente che per i chelanti aciclici, ma d'altra parte la stabilità cinetica dei complessi *in vivo* risulta maggiore [4] [7]. In Tabella 2 sono riportati alcuni esempi.



Tabella 2 Schematizzazione dei principali dei chelanti macrociclici e loro analoghi bifunzionali (è evidenziata in blu la porzione di legame) [10].



1.1.4 Radiometallo

Il radiometallo è costituito da un nuclide¹ instabile, che tramite decadimento radioattivo si trasforma spontaneamente in un nuclide figlio più stabile mediante emissione di radiazioni elettromagnetiche e/o particelle energetiche. Se il nuclide figlio così generato risulta a sua volta instabile, esso decade ulteriormente, dando quindi luogo ad una serie di decadimenti fino al raggiungimento di una configurazione nucleare stabile.

¹ Con il termine nuclide ci si riferisce a una singola specie nucleare, caratterizzata dal numero atomico Z (numero di protoni contenuti nel nucleo considerato), da un numero di massa A (dato dalla somma di protoni e neutroni della specie considerata) e da uno stato energetico.

Due nuclidi che differiscono nel numero di massa, ma non in quello atomico, sono detti isotopi.

I processi di decadimento radioattivo sono divisibili in sei categorie, di cui tre sono le più importanti dal punto di vista medico (decadimento α , $\beta \in \gamma$), mentre le altre tre sono di minor importanza (fissione spontanea, decadimento per emissione di protoni e decadimento per emissione di neutroni); queste ultime, quindi, non verranno approfondite [11]. L'effetto biologico della radiazione sulle cellule dipende dal tipo di radiazione e dalle sue caratteristiche [12].

Decadimento α . Il decadimento α è un tipo di decadimento radioattivo tipico dei nuclei *proton rich* di elementi pesanti (numero atomico, $Z \ge 84$) [7]. Durante questo processo, il nucleo genitore (P) radioattivo decade a nucleo figlio (D) emettendo una particella α , che corrisponde a un nucleo di elio ⁴He²⁺. Il nucleo figlio presenta quindi il numero atomico (Z) e il numero di massa (A) diminuiti rispettivamente di due e di quattro unità rispetto al nucleo genitore (**Errore.** L'origine riferimento non è stata trovata.) [11].

$${}^{A}_{Z}P \rightarrow {}^{A-4}_{Z-2}D + {}^{4}_{2}He^{2+} = {}^{A-4}_{Z-2}D + \alpha$$
 (1)

Le particelle α depositano la loro energia (4-8 MeV) in un intervallo di distanze relativamente brevi dal sito di emissione (50-100 μ m, corrispondente a pochi diametri cellulari) [12].

Decadimento β . Il decadimento β si ha in nuclei con un lieve squilibrio tra il numero di neutroni e di protoni, e comprende a sua volta tre sottocategorie di decadimento: β^- , β^+ e cattura elettronica.

Nel decadimento β^- , nel nucleo genitore *neutron-rich* P si ha la trasformazione di un neutrone in un protone con emissione di un elettrone (e⁻) e di un antineutrino² ($\bar{\nu}_e$). Di conseguenza, il numero atomico del nucleo figlio D aumenta di una unità, mentre il numero di massa resta costante (equazione 2) [11].

² I neutrini (ν_e) sono particelle subatomiche elementari, prive di carica, con una massa considerata nulla e spin pari a 1/2. L' antineutrino ($\bar{\nu}_e$) è l'antiparticella del neutrino, per cui le due particelle presentano la stessa massa, la stessa carica (neutra), e spin uguali ma di segno opposto.

$${}^{A}_{Z} P \rightarrow {}^{A}_{Z+1} D + e^{-} + \overline{\nu}_{e}$$
⁽²⁾

Le particelle β^- percorrono distanze di circa 0.3-12 mm, corrispondenti a diverse centinaia di nuclei cellulari [12].

Il decadimento β^+ si verifica quando un protone dell'atomo genitore *proton-rich* P si trasforma in un neutrone, con emissione di un positrone³ (e⁺) e un neutrino (ν_e). Quindi, in questo caso il numero atomico del nucleo figlio diminuisce di una unità, mentre il numero di massa resta costante (equazione 3).

$${}^{A}_{Z} P \rightarrow {}^{A}_{Z-1} D + e^{+} + \nu_{e}$$
⁽³⁾

I radionuclidi che decadono tramite il decadimento β^+ sono chiamati emettitori di positroni, e sono utilizzati in medicina nell'ambito del PET *imaging*.

Il decadimento tramite cattura elettronica (*electron capture*, EC) si verifica quando un elettrone entra nel volume nucleare, viene catturato da un protone, e ne innesca la trasformazione a neutrone; contestualmente si ha l'espulsione di un neutrino. Il numero atomico del nucleo figlio D risultante è quindi inferiore di una unità rispetto al nucleo genitore, mentre rimane costante il numero di massa (equazione 4) [11].

$${}^{A}_{Z}P + e^{-} \rightarrow {}^{A}_{Z-1}D + \nu_{e}$$
(4)

Decadimento y e conversione interna

Sia in seguito al decadimento α , sia in seguito a uno dei tre possibili decadimenti β , si può avere la produzione di un nucleo figlio in uno stato eccitato, che per raggiungere lo stato fondamentale decade a sua volta mediante decadimento γ o mediante conversione interna. Questo processo di raggiungimento dello stato fondamentale può avvenire immediatamente (entro 10^{-12} secondi) o in maniera ritardata; in questo secondo caso si ha la formazione di un isotopo metastabile.

³ Il positrone (e⁺) è l'antiparticella dell'elettrone; le due particelle presentano quindi la stessa massa, lo stesso spin e la stessa carica, ma quest'ultima è di segno opposto [9].

Il **decadimento** γ (equazione 5) si verifica quando l'energia di eccitazione viene emessa sottoforma di uno o più fotoni γ .

$${}^{A}_{Z}X^{*} \to {}^{A}_{Z}X + \gamma$$
⁽⁵⁾

Invece, nella **conversione interna** (*Internal Conversion*, IC, equazione 6) il trasferimento di tale energia avviene a carico di uno dei suoi elettroni dei gusci atomici, con successiva emissione dello stesso.

Successivamente, il posto vacante lasciato dall'elettrone è colmato tramite una cascata di transizioni che spostano la vacanza verso gusci più esterni; questo processo produce raggi X e/o elettroni Auger [11] [13] [14].

$${}^{A}_{Z}X^{*} \rightarrow {}^{A}_{Z}X^{+} + e^{-} \rightarrow {}^{A}_{Z}X$$
⁽⁶⁾

Dalle proprietà di decadimento e dall'emivita⁴ del radiometallo dipende l'attività farmacologica della formulazione, che si può distinguere in attività diagnostica, terapeutica o teranostica [1] [8] (Figura 3).

⁴ L'emivita, o tempo di dimezzamento, è il tempo necessario perché la metà degli atomi di un campione radioattivo puro decadano.

H H H H H H H H H H H H H H H H H H H	Be Besture Mg		 PET Beta Therapy SPECT Alpha Therapy Auger e⁻ Therapy Ai Si P S Cl 														
K	Ca	Sc	Ti	Variation	Cr	Mn	Fe	Core	Ni	QU	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	K
Rb	Sr	X	Zr	Nb	Mo	Тс	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	X	Xe
Cs Csecuri	Ba	57-71	Hf	Та	W Turgatan Talaa	Re	Os	Ir 10222	Pt	Au	Hg	TI	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	89-103	Rf Ratietodum	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	Ds	Rg	Committee	Nh	FI	Мс	Lv	TS Temestre	Og Ogenessor
				58	-	80	-11		45	10		N	N				
	"Lanthanoids		La	Ce	Rr	Nd Nectorium	Pm	Sm	Eu Buroparri 151.06	Gd Custolitum 187,25(2)	X	Dy	Ale	Er	Tm	Yb	Lu
**Actinoids		Ac	Th	Pa	U U (transum 238.00	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lines	

Figura 3 Tavola periodica degli elementi, con evidenziati i radionuclidi di corrente o potenziale applicazione in medicina nucleare [2].

L'attività diagnostica consiste nella visualizzazione, nella caratterizzazione e nella misurazione di processi biologici a livello molecolare e cellulare, negli esseri umani e in altri sistemi viventi. Queste informazioni sono molto rilevanti poiché permettono di diagnosticare una malattia, prescrivere un trattamento e monitorarne il decorso in modo non invasivo [4]. I radiofarmaci utilizzati in diagnostica contengono radionuclidi che emettono raggi γ , sfruttati nella tomografia computerizzata a emissione di fotone singolo (SPECT, Figura 4), oppure emettono positroni (e⁺), che poi annichilendosi con gli elettroni producono dei raggi γ impiegati nella tomografia a emissione di positroni (PET, Figura 4) [5]. Sia nella SPECT, sia nella PET, dopo un tempo di acquisizione sufficientemente lungo, i dati raccolti sono analizzati con algoritmi matematici per ricostruire un'immagine tridimensionale della distribuzione del radionuclide [5] [4].

Per quanto riguarda le applicazioni terapeutiche, sono richiesti radionuclidi che decadano tramite decadimento α , β^- , o producendo elettroni Auger (Figura 4). Queste particelle vengono localizzate nel tessuto malato grazie all'agente di *targeting*, e tramite l'energia rilasciata dal loro decadimento inducono un danno irreversibile nel DNA, che porta la cellula all'apoptosi [7]. Nei casi in cui la terapia sia condotta da un radiofarmaco che raggiunge il sito di interesse grazie ad un agente di *targeting* si parla di *Targeted Radionuclide Therapy* (TRT). È importante ricordare che le radiazioni in gioco nella terapia risultano essere meno penetranti

rispetto ai raggi γ e depositano la loro energia a breve distanza (questo è vero soprattutto per gli elettroni Auger e le particelle α), per cui tendono a danneggiare le cellule in prossimità risparmiando il tessuto sano circostante [8].



Figura 4 Schematizzazione delle tipologie di decadimento nucleare e delle rispettive modalità di interazione con il sistema biologico [2].

Per la maggior parte delle applicazioni in medicina nucleare, è preferito che il radiofarmaco diagnostico sia accoppiato con il radiofarmaco terapeutico, creando una coppia teranostica. In tal caso è molto importante che il comportamento chimico e farmacocinetico di entrambi i radionuclidi sia simile [5]. A tal scopo, i radionuclidi diagnostici e terapeutici dovrebbero essere idealmente una coppia di radioisotopi chimicamente identica, perché l'utilizzo di un solo ione metallico rende più affidabile la valutazione della dose assorbita, e permette una migliore indicazione dell'attività terapeutica necessaria per il trattamento. È infatti vero che piccole variazioni nella composizione chimica dei radiotraccianti possono causare grandi variazioni nella biodistribuzione; quindi, l'associazione di due radionuclidi di diversi elementi può portare a risultati non corretti [5] [6] [15].

1.2 Rame-64 e rame-67

Il rame (Cu) è un metallo di transizione appartenente all'undicesimo gruppo della tavola periodica, con numero atomico pari a 29. Esistono diversi isotopi

radioattivi per questo elemento (⁶⁰Cu, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu e ⁶⁷Cu), di cui la maggior parte ha breve emivita; i più promettenti in ambito medico sono ⁶⁴Cu e ⁶⁷Cu [16].

Le caratteristiche di decadimento di ⁶⁴Cu (t_{1/2} 12.70 ore, β^- 40%, β^+ 19%, EC 41%) ne permetterebbero l'impiego sia in diagnostica (PET *imaging*), sia in terapia. Inoltre, l'emivita relativamente lunga ne permetterebbe una distribuzione più ampia e la coniugazione ad agenti di *targeting* capaci di circolare per un tempo più lungo [9] [16] [17]. Le caratteristiche di emissione di ⁶⁷Cu (t_{1/2} 62.01 ore, β^- 100%) risulterebbero interessanti per applicazioni terapeutiche. Inoltre, la coppia ⁶⁴Cu/⁶⁷Cu potrebbe formare una coppia teranostica promettente [18] [16].

I due stati di ossidazione più comuni del rame sono +1 (ione rameoso, Cu⁺) e +2 (ione rameico, Cu²⁺); quest'ultimo rappresenta lo stato di ossidazione più stabile in ambiente acquoso, ed è quello considerato nello sviluppo di radiofarmaci basati su ⁶⁴Cu e/o ⁶⁷Cu. Tuttavia, secondo la teoria HSAB (*Hard Soft Acids and Bases*), il rame(II) è classificato come un acido *borderline-hard*, e perciò ha una predilezione per leganti che sono a loro volta di tipo *borderline-hard*, come le ammine, le immine e i carbossilati. Il rame(II) forma complessi con un numero di coordinazione pari a 4, 5 e 6, con una geometria planare quadrata, bipiramidale trigonale, piramidale a base quadrata e ottaedrica distorta. Alla luce di questo, i chelanti utilizzabili per complessare il rame(II) devono essere almeno esadentati, in modo tale da saturare la sfera di coordinazione dello ione metallico e quindi minimizzare le interazioni con leganti esogeni e chelanti biologici, cioè massimizzare la stabilità e l'inerzia cinetica. Quest'ultimo aspetto è di particolare interesse, dato che il rame(II) è piuttosto labile [17].

Tra i leganti studiati per formare complessi con il rame(II), i chelanti azamacrociclici derivati del *cyclen* (1,4,7,10-tetraazaciclododecano, Figura 5.a) e del *cyclam* (1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano, Figura 5.b) sono quelli di riferimento; da questi sono stati prodotti e testati un'ampia serie di derivati ottenuti generalmente mediante derivatizzazione degli atomi di azoto.



Figura 5 Struttura del cyclen (a.) e del cyclam (b.) [16].

Tra i derivati considerati, sono presenti il DOTA (acido 1,4,7,10tetrazaciclododecano-1,4,7,10-tetracetico, Figura 6.a) e il TETA (acido 1,4,8,11tetrazaciclodotetradecano-1,4,8,11-tetracetico, Figura 6.b), che presentano gruppi carbossilici come sostituenti.

I complessi rameici ottenuti con tali composti hanno un'elevata stabilità termodinamica, ma una bassa inerzia cinetica, per cui *in vivo* tendono ad andare incontro a demetallazione.



Figura 6 Struttura del DOTA (a.) e del TETA (b.) [16].

Per carcare di risolvere questo problema sono stati sintetizzati dei derivati strutturalmente più rigidi; la rigidificazione è stata ottenuta in varie maniere, una delle quali è costituita dall'inserimento di un ponte etilenico, che ha portato all'ottenimento di CB-DO2A (*cross bridge* 4,10-bis (carbossimetil)-1,4,7,10-tetraazabiciclo [5.5.2] tetradecano, Figura 7.a) e CB-TE2A (4,11-bis (carbossimetil) -1,4,8,11-tetrazabiciclo [6.6.2] esadecano, Figura 7.b).



Figura 7 Struttura di CB-DO2A (a.) e CB-TE2A (b.) [16].

Questi derivati hanno ottenuto migliori risultati in quanto a stabilità cinetica e termodinamica del complesso, ma necessitano di condizioni di complessamento più estreme (maggiori temperature e tempi di reazione) [16].

Un aspetto problematico relativo al rame, che è considerato responsabile almeno in parte dei processi di demetallazione, è che il rame(II) è potenzialmente riducibile *in vivo*, passando quindi a uno stato di ossidazione +1. Il rame(I), secondo la teoria HSAB, è uno ione metallico con caratteristiche *soft*, e come tale i suoi complessi non sono stabilizzati dagli ossigeni carichi presenti nei chelanti finora considerati. Pertanto, una volta che il rame viene ridotto *in vivo*, in linea di principio può decomplessare [16].

Per risolvere questo problema, sono stati studiati dei chelanti derivati del *cyclen* con braccia tioeteree come sostituenti come il DO4S (1,4,7,10-tetrakis[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano, Figura 8.a) e il DO3S (1,4,7-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano, Figura 8.b). Sono stati anche considerati composti "misti", ottenendo il DO3SAm (1,4,7-tris[2-(metilsulfanil)etil]-10-acetamido-1,4,7,10-tetraazaciclododecano, Figura 8.c) e DO2A2S (acido 1,7-bis[2-(metilsulfanil)etil]-4,10-diacetico -1,4,7,10-tetraazaciclododecano, Figura 8.d).



Figura 8 Struttura di DO4S (a.), DO3S (b.), DO3SAm (c.) e DO2A2S (d.) [18].

I dati termodinamici di questi quattro composti hanno evidenziato un'alta affinità nei confronti di Cu²⁺, dovuta principalmente agli atomi di azoto, e ai carbossilati nel caso del DO2A2S. Inoltre, le braccia laterali contenenti zolfo sono in grado di coordinare anche Cu⁺, nel caso questo si formi *in vivo* dalla riduzione di Cu²⁺. I dati termodinamici suggeriscono quindi che anche in caso di bioriduzione si dovrebbe evitare la demetallazione e la perdita del radiometallo dal radiofarmaco [18].

1.3 Argento-111

L'argento (Ag) è un metallo di transizione appartenente all'undicesimo gruppo, con un numero atomico pari a 47. Sono noti 28 isotopi radioattivi per tale elemento; quelli più interessanti dal punto di vista dell'applicazione medica sono: ¹⁰³Ag, ¹⁰⁴Ag e ¹¹¹Ag.

¹⁰³Ag ($t_{1/2}$ 65.7 minuti, β^+ 27%, 73% EC) e ¹⁰⁴Ag ($t_{1/2}$ 69.2 minuti, β^+ 15%, 85% EC) sono emettitori di positroni e possono perciò essere utilizzati nell'*imaging* PET. ¹¹¹Ag ($t_{1/2}$ 7.45 giorni, β^- 100%) è molto promettente per applicazioni sia in ambito terapeutico, dato che si tratta di un β^- emettitore di media energia, sia in diagnostica, dato che durante il suo decadimento si ha anche emissione di due tipi di raggi γ a bassa energia adatti all'*imaging* SPECT; l'¹¹¹Ag potrebbe quindi essere utilizzato come agente teranostico.

Il numero di ossidazione dell'argento è +1, è in grado di formare complessi con numero di coordinazione pari a 2, 3, 4 e 6, generando rispettivamente complessi con geometria lineare, trigonale planare, tetraedrica e ottaedrica.

A differenza del rame, i radioisotopi dell'argento non sono stati finora considerati in radiofarmacia, principalmente a causa delle difficoltà legate alla loro produzione e purificazione. Tuttavia, i Laboratori Nazionali di Legnaro (LNL) dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN) hanno recentemente brevettato un nuovo metodo per la produzione di radioisotopi, tra cui ¹¹¹Ag, che quindi rendono tale radiometallo potenzialmente utile. [19]

L'argento, essendo catalogato come acido *soft* dalla teoria HSAB, forma complessi stabili con leganti che a loro volta sono *soft*; sono perciò esclusi leganti con gruppi donatori *hard*, come tutti quelli contenenti gruppi carbossilato, comunemente usati per altri radiometalli, ad esempio il DOTA (Figura 6.a**Errore.** L'origine riferimento non è stata trovata.), il DO2A (acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,7-diacetico Figura 9.a), CB-DO2A (Figura 7.a) e il NOTA (acido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacetico Figura 9.b) [6].





Figura 9 Struttura di DO2A (a.) [20] e NOTA (b.) [21].

Perciò, il nostro gruppo di ricerca ha preso in considerazione dei derivati del *cyclen* sostituiti con catene tioeteree come il DO4S (Figura 8.a), il DO3S (Figura 8.b), il DO2A2S (Figura 8.d), il DO3SAm (Figura 8.c) e anche il DO4S4Me, (2S,5S,8S,11S)-2,5,8,11-tetrametil-1,4,7,10-tetrakis(2-(metilsulfanil)etil)-

1,4,7,10-tetraazaciclododecano (Figura 10), che presenta quattro gruppi metilici chirali che preorganizzano la molecola e la rendono più rigida rispetto agli analoghi non metilati.



Figura 10 Struttura di DO4S4Me [6].

I risultati ottenuti evidenziano che questi derivati sono tutti molto promettenti, perché grazie alla presenza di almeno due catene tioeteree in posizione *trans* sono in grado di formare complessi molto stabili con l'argento. In particolare, è risultato che la stabilità è positivamente correlata col numero di atomi di zolfo, per cui DO4S e DO4S4Me sono state le molecole in grado di dare i complessi più stabili [1] [6], anche se un recente studio *in vitro* condotto in plasma umano ha mostrato che il complesso tra Ag⁺ e DO4S non è stabile se non per tempi dell'ordine di poche ore (dato ancora non pubblicato).

Si può segnalare che lo sviluppo di nuovi chelanti capaci di legare l'argento e il rame può risultare di estremo interesse anche in un campo molto diverso dalla medicina nucleare, e cioè per il loro riciclaggio [22]. Infatti, questi due metalli appartengono (come molti altri) al gruppo dei cosiddetti elementi *"bottleneck,"* ovvero elementi molto richiesti dai prodotti tecnologici di uso quotidiano (PC, *smartphones*, ecc.), ma che presentano una sempre più limitata disponibilità in natura; questa consapevolezza spinge alla ricerca di nuovi metodi, come l'utilizzo di chelanti, che ne permettano il recupero in modo più soddisfacente rispetto ai metodi attualmente impiegati conosciuti [23].

1.4 Mercurio-197 e mercurio-197m

Il mercurio (Hg) è un metallo di transizione appartenente al dodicesimo gruppo, con numero atomico 80. Diversi sono i radioisotopi noti del mercurio, ma quelli utilizzabili in ambito terapeutico sono solo ¹⁹⁷Hg e ^{197m}Hg.

¹⁹⁷Hg ($t_{1/2}$ 64.14 ore, EC 100%) decade interamente mediante cattura elettronica ad ¹⁹⁷Au*, che a sua volta decade a ¹⁹⁷Au emettendo elettroni di conversione, raggi γ a bassa energia, elettroni Auger e raggi X.

^{197m}Hg (t_{1/2} 23.8h, IT 94.68%, EC 5.32%) decade prevalentemente mediante transizione isomerica allo stato fondamentale ¹⁹⁷Hg emettendo elettroni monoenergetici di conversione, raggi γ ad alta energia, elettroni Auger a bassa energia e raggi X. Per una piccola percentuale (pari al 5.32%), il radioisotopo decade tramite cattura elettronica allo stato eccitato ¹⁹⁷Au*, che a sua volta va incontro a transizione isomerica emettendo raggi γ ad alta energia, elettroni di conversione, elettroni Auger e raggi X per raggiungere lo stato stabile di ¹⁹⁷Au.

Quindi entrambi i radioisotopi, producendo elettroni Auger a bassa energia (1-10 keV), possono essere sfruttati nella terapia, e inoltre sono utilizzabili in diagnostica nell'*imaging* SPECT grazie alla loro emissione di raggi γ. Se sono usati assieme, i due isotopi possono essere sfruttati come coppia teranostica [15] [24].

Secondo la teoria HSAB, il mercurio è definito un acido *soft*, il suo numero di ossidazione tipico e più stabile è +2, ha una configurazione elettronica d¹⁰ e può assumere diversi numeri di coordinazione, da 4 a 8, assumendo diverse geometrie.

Anche per il mercurio, come per l'argento, non è finora stato proposto alcun radiofarmaco, ma lo sviluppo di nuovi metodi di produzione dei due isotopi rende oggigiorno molto interessante tale metallo. Come per l'argento, anche per il mercurio non sono proponibili i chelanti hard-borderline visti per il rame, e si è quindi pensato che i medesimi chelanti efficaci per l'argento possano essere impiegati anche per il mercurio (Figura 8). Nel caso del mercurio sono stati anche considerati derivati poliazamacrociclici con dimensioni dell'anello differente, come TACD3S (1,5,9-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,5,9-triazaciclododecano, Figura 11.a), TRI4S (1,4,7,10-tetrakis[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7,10 tetrazaciclotridecano, Figura 11.b), TE4S (1,4,8,11-tetrakis[2 (methilsulfanil) etil] -1,4,8,11-tetrazaciclotetradecano, Figura 11.c); tuttavia, i dati recentemente ottenuti (da pubblicare) hanno evidenziato che un anello più grande o un minor decrementano numero di azoti donatori drasticamente la stabilità termodinamica e l'efficienza della marcatura; la minore efficacia dei derivati di cui alla Figura 11 è stata recentemente evidenziata anche con argento e rame. [24]





Figura 11 Strutture di TACD3S (a.), TRI4S (b.) e TE4S (c.) [24].

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI

Come descritto precedentemente, i derivati del *cyclen* e del *cyclam* risultano promettenti nello studio di nuovi chelanti da utilizzare nella *Targeted Radionuclide Therapy* (TRT). L'interesse del nostro gruppo di ricerca è rivolto soprattutto alla TRT basata su radionuclidi esotici, come ¹¹¹Ag, ¹⁹⁷Hg, e ^{197m}Hg, per i quali non esistono oggigiorno dei chelanti adatti. Sono stati quindi sintetizzati dei derivati solforati del *cyclen* e di altri anelli, come il *cyclam*, e sono state studiate le interazioni con Ag⁺ e Hg²⁺, evidenziando la formazione di complessi molto stabili. Questi chelanti sono stati anche considerati per il rame: sebbene infatti vi siano in letteratura molti chelanti utilizzabili per Cu²⁺, i chelanti solforati sembrano essere in grado di impedire la demetallazione del rame una volta che questo, *in vivo*, viene ridotto a Cu⁺.

Nel caso dell'argento si è tuttavia evidenziato come il complesso con DO4S sia stabile in plasma umano solo per un tempo breve (poche ore), e poi decomplessa. Sebbene non sia nota la ragione di tale decomplessamento, si ritiene che un aumento dell'inerzia cinetica del complesso dovrebbe essere benefico e rendere maggiormente stabile il complesso nel plasma.

Considerando che nel caso di ^{64/67}Cu tale effetto è stato positivamente ottenuto utilizzando CB-DO2A e CB-TE2A (Figura 7), si è quindi ritenuto di seguire la medesima strategia. Da qui nasce l'idea di indagare due nuove molecole: CB-DO2S (4,10-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,7,10-tetraazabiciclo[5.5.2]tetradecano, Figura 12.a) e CB-TE2S (4,11-bis(2-(metiltio)etil)-1,4,8,11tetraazabiciclo[6.6.2]esadecano, Figura 12.b).



Figura 12 Struttura del CB-DO2S e CB-TE2S.

Queste due molecole presentano come sostituenti due braccia tioeteree, che permettono di coordinare metalli *soft* quali sono quelli indagati, e inoltre presentano un ponte etilenico che rigidifica la struttura finale, e che dovrebbe limitare la demetallazione *in vivo* del metallo coordinato.

Scopo di questo progetto di tesi è la sintesi di CB-DO2S, molecola non disponibile, e per la quale diversi tentativi di sintesi non andati a buon fine sono già stati descritti in un precedente lavoro di tesi [1]. In questo lavoro si è cercato di implementare le sintesi descritte nella tesi precedente mediante l'uso di un reattore che permettesse di raggiungere temperature e pressioni più elevate, per cercare di favorire la reazione di rimozione dei benzili impiegati come gruppi protettori.

Per quanto riguarda CB-TE2S, la sua sintesi è stata condotta nel lavoro di tesi precedente [1], e in questa sede si è avviata la valutazione delle sue proprietà acido-base e di complessamento con i metalli considerati (Cu²⁺, Ag⁺ e Hg²⁺). A tale scopo sono state utilizzate tecniche potenziometriche e le spettroscopie UV-Vis e di risonanza magnetica nucleare (NMR).

CAPITOLO 3

PRINCIPI TEORICI

3.1 Studio degli equilibri di complessamento

Lo scopo dello studio degli equilibri di complessamento di un sistema metallolegante è quello di determinarne la speciazione, cioè le costanti di formazione, il numero e la stechiometria dei complessi presenti; per fare questo ci si avvale di tecniche che sono sensibili a una delle proprietà della soluzione che vengono modificate dal complessamento, ma tali misurazioni non devono perturbare il sistema; in questo lavoro di tesi sono state considerate tecniche potenziometriche, di spettroscopia NMR e di spettrofotometria UV-Vis [25].

3.2 Potenziometria

La potenziometria è una tecnica molto utilizzata nello studio di equilibri di complessamento perché è molto accurata, di semplice utilizzo ed economica.

Questa tecnica si basa sulla misurazione della forza elettromotrice (*E*) in condizioni di equilibrio di una cella galvanica costituita da un elettrodo di riferimento e da un elettrodo sensibile a una delle specie coinvolte negli equilibri di complessamento.

La formazione del complesso viene rivelata in maniera indiretta tramite la misurazione della variazione del pH; infatti, quando si ha una reazione di complessamento si ha spesso la liberazione o il consumo di protoni, come ad esempio si vede nell'equazione 7:

$$\mathsf{M}^{\mathsf{n}+} + \mathsf{H}_{\mathsf{m}}\mathsf{L} \rightleftharpoons [\mathsf{M}\mathsf{L}]^{(\mathsf{n}-\mathsf{m})+} + \mathsf{m}\mathsf{H}^{+}$$
(7)

Le misurazioni sono effettuate tramite l'elettrodo di vetro sensibile agli ioni idronio (H_3O^+), che è uno strumento accurato e di semplice utilizzo e manutenzione.

Il coinvolgimento di elettrodi sensibili a ioni metallici o al legante di interesse può essere considerato solo in casi particolari.
3.2.1 Elettrodo di vetro

L'elettrodo di vetro misura la forza elettromotrice E che è funzione dell'attività degli ioni idronio H₃O⁺; la relazione è espressa dall'equazione di Nernst estesa (equazione 8):

$$E = E^{0} + \frac{RT}{nF} \ln(a_{H} + \sum k_{M}a_{M}) - E_{j}$$
(8)

In cui:

- E^o è il potenziale standard dell'elettrodo; questa grandezza racchiude vari termini, tra cui il potenziale standard del riferimento esterno e il potenziale standard del riferimento interno dell'elettrodo di vetro (elettrodo ad Ag/AgCl/Cl⁻)
- R è la costante universale dei gas, che vale 8.31447 J/(K mol);
- *T* è la temperatura espressa in Kelvin;
- *n* è il numero di elettroni scambiati, pari a 1 per l'elettrodo di vetro;
- F è la costante di Faraday, corrispondente alla carica di una mole di elettroni, ed ha un valore di 96485.3 C/mol;
- $\frac{RT}{nF}$ corrisponde alla pendenza di Nernst, inidicata con la lettera *S*;
- a_H è l'attività dello ione idronio;
- a_M è l'attività di un generico catione interferente M⁺;
- k_M è il coefficiente di selettività dell'elettrodo rispetto a M⁺;
- *E_j* è il potenziale di giunto liquido.

La sommatoria è estesa ai vari cationi interferenti, ed in particolare a quelli alcalini come Na⁺ e K⁺. Nei campioni considerati per analisi potenziometriche, spettroscopiche e spettrofotometriche lo ione Na⁺ è introdotto, sotto forma di NaNO₃ o NaCl, come elettrolita di supporto e sotto forma di NaOH durante le titolazioni o la preparazione dei campioni.

L'elettrodo di vetro può andare incontro a errore alcalino e errore acido. Il primo caso si verifica a pH basico, dove la concentrazione di M⁺ diventa molto maggiore rispetto a quella di H₃O⁺ e quindi il prodotto $k_M a_M$ non è più trascurabile rispetto a a_H . Il potenziale misurato risulta maggiore di quello reale, per cui il pH misurato è minore del suo valore reale. Gli elettrodi attualmente disponibili in commercio sono costituiti da vetri particolari per limitare questo effetto, che diventa significativo solo a pH maggiori di circa 12. L'errore acido si verifica in ambienti molto acidi, ed è dovuto alla sovrassaturazione dei siti superficiali dell'elettrodo di vetro, che quindi non risponde correttamente alle variazioni di attività di H₃O⁺.

Un'altra fonte di errore può derivare dal potenziale di giunto liquido E_j . Questo parametro si origina dalla diversa migrazione degli ioni all'interfaccia tra la soluzione contenuta nell'elettrodo di riferimento e quella del campione considerato, che genera uno squilibrio di carica e quindi un potenziale elettrico. E_j può variare a seconda della temperatura, della geometria dell'interfaccia e della composizione delle soluzioni interna ed esterna. Grazie all'ottimizzazione degli elettrodi di riferimento presenti in commercio, questo effetto è sostanzialmente trascurabile se il pH della soluzione è compreso tra circa 2 e 12.5.

3.2.2 Controllo della forza ionica

L'equazione di Nernst è scritta in funzione delle attività degli ioni (a_H e a_M), le quali dipendono dalle concentrazioni secondo equazioni come la 9:

$$a_M = \gamma [\mathsf{M}] \tag{9}$$

(l'equazione 9 è stata scritta per M), dove γ rappresenta il coefficiente di attività. Quest'ultimo dipende dalla forza ionica della soluzione; per soluzioni molto diluite ($\leq 10^{-3}$ M) vale l'equazione di Debye-Hückel (equazione 10):

$$\log \gamma = -0.509 |z_+ z_-| I^{1/2}$$
(10)

in cui z_+ e z_- rappresentano le cariche degli ioni e I è la forza ionica, descritta dall'equazione 11:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2 \tag{11}$$

in cui z_i è la carica dello ione i-esimo e C_i è la sua concentrazione molare o molale.

In soluzioni più concentrate di circa 10^{-3} M l'equazione 9 non è più valida, ma resta comunque valida la dipendenza dei coefficienti di attività dalla forza ionica. Quindi, mantenendo la forza ionica costante, anche i coefficienti di attività restano costanti, per cui le attività possono essere sostituite dalle concentrazioni e i coefficienti di attività possono essere inglobati nelle costanti. Queste sono definite "costanti stechiometriche" perché sono influenzate dal mezzo in cui sono condotte le analisi [16]. Per mantenere la forza ionica costante si utilizza un elettrolita inerte di supporto ad alta concentrazione. In questo lavoro di tesi si sono utilizzati NaNO₃ 0.15 M o NaCl 0.15 M; i cationi e gli anioni non interagiscono significativamente con le specie da analizzare, e la concentrazione è tale da simulare l'isosmoticità e l'isotonia delle soluzioni fisiologiche. NaCl è stato utilizzato per i campioni preparati per l'analisi spettrofotometrica UV-Vis perché, al contrario di NO³⁻, Cl⁻ presenta assorbimenti più contenuti nell'intervallo di lunghezze d'onda considerate e perciò non interferisce con le misurazioni; per quanto riguarda invece i campioni contenenti argento, la forza ionica è stata data da NaNO₃ perché l'utilizzo di NaCl avrebbe causato la precipitazione di AgCl, che è un sale poco solubile.

3.2.3 Elaborazione dei dati potenziometrici

Per elaborare i dati potenziometrici e ricavare le informazioni volute si utilizzano dei programmi adatti allo scopo. In questo lavoro di tesi è stato utilizzato PITMAP [25]. I dati di *input* sono i valori di potenziale misurati dall'elettrodo di vetro in funzione del volume di titolante, ed inoltre è necessario conoscere il volume del titolando e le concentrazioni delle varie specie.

Il *software* calcola quindi la curva di titolazione teorica risolvendo il sistema di equazioni (equazioni 12, 13, 14) per le specie presenti in soluzione (di cui sono omesse le cariche per semplicità):

$$C_{\rm M} = [{\rm M}] + \sum_{i}^{n} m \ \beta_{m,h,l} \, [{\rm M}]^{\rm m} \, [{\rm H}]^{\rm h} \, [{\rm L}]^{\rm l}$$
(12)

$$C_{\rm L} = [{\rm L}] + \sum_{i}^{n} l \ \beta_{m,h,l} \ [{\rm M}]^{\rm m} \ [{\rm H}]^{\rm h} \ [{\rm L}]^{\rm l}$$
(14)

In cui:

- C_M, C_H e C_L sono le concentrazioni stechiometriche di metallo, protone e legante. Si conoscono per ogni punto sperimentale dato che sono note le quantità degli analiti introdotte in soluzione;
- n corrisponde al numero di specie presenti all'equilibrio, in aggiunta a M, H e L;
- [M], [H] e [L] sono le concentrazioni all'equilibrio di metallo, protone e legante liberi;
- *m*, *h* e *l* rappresentano i coefficienti stechiometrici di M, H e L nei complessi presenti.

m e l possono avere un valore positivo o pari a zero, mentre h può assumere anche valori negativi, il che indica la perdita di protoni, come quando si ha la formazione di idrossocomplessi del tipo [ML(OH)];

 β_{m,h,l} sono le costanti di formazione globale (o costanti di equilibrio) delle varie specie esprimibili dall'equazione 15:

$$\beta_{m,h,l} = \frac{[M_m H_h L_l]}{[M]^m [H]^h [L]^l}$$
(15)

Risolvendo il sistema di equazioni è possibile ricavare la concentrazione teorica del metallo [M], del legante [L] e dello ione idronio [H], e sostituendo quest'ultima concentrazione nell'equazione di Nernst è possibile calcolare il valore teorico del potenziale per ogni punto sperimentale.

Successivamente, i valori di $\beta_{m,h,l}$ sono ottimizzati tramite una procedura iterativa, che attribuisce loro i valori che minimizzino le differenze tra i potenziali misurati e quelli calcolati.

3.2.4 Limitazioni della potenziometria

Come già descritto nel **Paragrafo 3.2.1**, le misurazioni di pH estremi, quindi troppo acidi (pH< 2) o troppo basici (pH> 12.5), sono affette da errore per la presenza di errori acidi, errori alcalini e potenziale di giunto liquidi. Inoltre, a pH troppo bassi le variazioni nelle concentrazioni degli ioni idronio successive agli equilibri di complessamento risultano essere trascurabili rispetto alla concentrazione totale e perciò non rivelabili.

La variazione della forza elettromotrice del sistema è determinata indirettamente dagli equilibri di complessamento, ma anche dal comportamento acido-base di impurezze che possono essere presenti in soluzione; questo rende la potenziometria una tecnica poco robusta. Per questo motivo i risultati del *fitting* devono essere valutati in modo critico, soprattutto se riferiti a modelli di speciazione piuttosto complicati, in cui sono presenti più specie in soluzione.

Un'ulteriore limitazione è la necessità di raggiungere l'equilibrio in modo rapido da parte del sistema preso in esame, perché solo una volta raggiunto l'equilibrio si può misurare il potenziale; se le cinetiche coinvolte implicano tempi di attesa superiori alle ore, i parametri dell'equazione di Nernst possono subire delle lievi modifiche e dare origine a errori.

3.3 Spettroscopia NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare è una tecnica che permette di determinare la struttura molecolare di una sostanza. Si basa sull'interazione del campo magnetico oscillante di una radiazione elettromagnetica della regione delle onde radio con i momenti magnetici dei nuclei, in presenza di un campo magnetico statico [26].

L'implementazione di questa tecnica nello studio di equilibri acido-base e di complessamento consiste nel valutare come varia lo spettro dei campioni a seconda del pH, tenendo conto della stechiometria e del numero delle specie presenti. Infatti, grazie al legame con il nucleo metallico, i segnali del legante subiscono una variazione del *chemical shift*, tale da risultare separati dai segnali del complesso. Questi segnali possono risultare ben distinti o mediati, a seconda delle proprietà cinetiche e termodinamiche del complesso.

La spettroscopia NMR è utilizzata in questo progetto di tesi per indagare il comportamento acido-base del legante e le proprietà termodinamiche dei complessi di CB-TE2S con i nuclei diamagnetici⁵ Ag⁺ e Hg²⁺. Per quanto riguarda invece lo studio del complessamento del Cu²⁺ questa strada non è percorribile, perché si tratta di un nucleo paramagnetico⁶ che presenta tempi di rilassamento

 ⁵ Una sostanza diamagnetica, se soggetta a un campo magnetico, acquisisce una magnetizzazione indotta opposta e solitamente di bassa intensità. Questa condizione si verifica per atomi che hanno tutti i doppietti accoppiati, come Ag⁺ che ha configurazione elettronica [Kr]4d¹⁰, e Hg²⁺ che ha configurazione [Xe]4f¹⁴5d¹⁰.
 ⁶ Una sostanza paramagnetica, se soggetta a un campo magnetico, acquisisce una magnetizzazione indotta nello stesso senso e di intensità proporzionale. Questa condizione si verifica per atomi che hanno un elettrone spaiato, come nel caso di Cu²⁺ che presenta configurazione [Ar]3d⁹.

molto più brevi e picchi più allargati (la sua indagine è quindi avvenuta mediante spettrofotometria UV-Vis).

3.3.1 Interferenza del protone dell'acqua

I campioni utilizzati sono stati preparati usando come solvente H₂O e D₂O in rapporto 90:10 (D₂O è necessario per calibrare lo strumento). L'acquisizione di spettri che contengono al loro interno acqua non deuterata è possibile grazie a una tecnica chiamata *excitation sculpting* che minimizza l'interferenza dei suoi protoni, sopprimendone il segnale e migliorando quindi in maniera evidente la qualità dello spettro (Figura 13) [27].



Figura 13 Esempio di soppressione dell'acqua; entrambi gli spettri del protone sono stati acquisiti tramite NMR 400MHz e rappresentano la stessa soluzione 2 mM di saccarosio in H_2O al 90% e D2O al 10%. Nel primo spettro l'acquisizione è avvenuta direttamente, senza applicare l'excitation sculpting, al contrario del secondo [27].

È anche possibile ottenere spettri usando acqua pesante pura come solvente, quindi senza la necessità di sopprimere il segnale di H₂O. In tale caso, tuttavia, gli eventuali dati di equilibrio sarebbero affetti da errore per il verificarsi di un effetto isotopico primario dato dagli equilibri di scambio protonico tra il solvente e le specie presenti in soluzione, o per un effetto solvente (o effetto isotopico secondario) dato da tutti gli equilibri presenti in soluzione, anche quelli che non coinvolgono il solvente.

3.3.2 Spettri mono- e bidimensionali

Tramite sequenze predeterminate degli impulsi di radiofrequenza si possono ottenere spettri monodimensionali e bidimensionali (COSY, TOCSY, HSQC e HMBC) che forniscono informazioni diverse, come l'intorno chimico, l'abbondanza, la connettività attraverso i legami, e la prossimità nello spazio.

Parlando di spettri monodimensionali, quelli del protone ¹H sono i più semplici da ottenere e i più frequentemente utilizzati data l'elevata sensibilità del nucleo ¹H; spesso sono anche acquisiti gli spettri del ¹³C per identificare i diversi tipi di carboni che sono presenti nella molecola in esame.

Per quanto riguardano gli spettri bidimensionali, sono distinte cinque tecniche in base al tipo di correlazione che permettono di indagare. Si riconoscono le tecniche che permettono di rivelare la connettività omonucleare⁷ (COSY e TOCSY), eteronucleare⁸ (HSQC e HMBC) o la vicinanza spaziale (NOESY).

Il COSY (*COrrelation SpectroscopY*) è una tecnica che mette in relazione gli idrogeni che si trovano su due carboni adiacenti, mentre il TOCSY (*Total Correlation SpectroscopY*) identifica gli idrogeni che accoppiano tra loro. L'HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) consente di capire quali protoni sono legati a ciascun carbonio, mentre l'HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) indica quali protoni sono legati al carbonio adiacente. Infine, grazie al NOESY (*Nuclear Overhouser Effect SpectroscopY*) è possibile determinare quali porzioni della molecola sono adiacenti (Figura 14).



Figura 14 Rappresentazione schematica del tipo di relazioni ricavabili dai diversi tipi di spettri NMR bidimensionali; in rosso quelle ottenibili dal COSY, in viola quelle del TOCSY, in azzurro quelle dell'HSQC, in verde quelle dell'HMBC e in nero quelle del NOESY [28].

⁷ La connettività omonucleare è definita dalle relazioni tra atomi di idrogeno.

⁸ La connettività eteronucleare è definita tra il protone e un eteroatomo, come il carbonio, l'azoto, ecc.

3.3.3 Determinazione delle costanti di equilibrio

In presenza di reazioni all'equilibrio in soluzione acquosa, come ad esempio reazioni acido-base o di complessamento, la valutazione delle variazioni del *chemical shift* ai diversi pH, o dell'intensità dei segnali relativi alle diverse specie in equilibrio, permette di ricavare i valori delle costanti di equilibrio corrispondenti. Questa analisi è possibile perché, come conseguenza della reazione, si ottiene una deschermatura o una schermatura dei nuclei considerati. Ad esempio, se L è un acido, l'addizione di protoni comporta una deschermatura dei segnali di L, in particolare per gli atomi direttamente coinvolti nella formazione del legame col protone. Se L è un legante, la formazione del complesso con M (carico positivamente) comporta anche in questo caso solitamente una deschermatura. Un ulteriore contributo al *chemical shift* può venire dai cambi di conformazione che possono verificarsi a seguito della reazione

A seconda delle proprietà cinetiche e termodinamiche della reazione in esame, si possono avere segnali distinti per reagenti e prodotti, oppure solo dei segnali mediati tra essi.

A titolo di esempio sono qui considerati i passaggi matematici che portano all'ottenimento della p K_a di un acido HL a partire dalla variazione del *chemical shift* (δ), nei casi (molto frequenti per reazioni acido-base) in cui le specie variamente protonate non sono distinguibili all'NMR ma danno dei segnali mediati.

Per la reazione:

la costante di equilibrio è espressa da:

$$K_a = \frac{[\mathrm{L}][\mathrm{H}]}{[\mathrm{HL}]} \tag{16}$$

 δ è una grandezza additiva, data dalla somma dei singoli contributi delle diverse specie in soluzione, ciascuna pesata per la propria frazione molare.

Le frazioni molari di ciascuna specie sono:

$$\chi_{\rm HL} = \frac{[\rm HL]}{[\rm HL] + [L]} = \frac{\frac{[\rm H]}{K_a}}{\left(\frac{[\rm H]}{K_a}\right) + 1} = \frac{10^{\rm pK_a - \rm pH}}{10^{\rm pK_a - \rm pH} + 1}$$
(17)

$$\chi_{\rm L}=1-\chi_{\rm HL} \tag{18}$$

Si può quindi ricavare l'equazione 19:

$$\delta_{oss} = \chi_{\rm HL} \delta_{\rm HL} + \chi_{\rm L} \delta_{\rm L} = \delta_{\rm HL} \, \frac{10^{\rm pKa-pH}}{(10^{\rm pKa-pH})+1} + \delta_{\rm L} \left(1 - \frac{10^{\rm pKa-pH}}{(10^{\rm pKa-pH})+1} \right) =$$

$$=\frac{\delta_{\rm HL}\,(10^{\rm pK}a^{\rm -pH})+\delta_{\rm L}}{(10^{\rm pK}a^{\rm -pH})+1}\tag{19}$$

in cui δ_{oss} è il *chemical shift* sperimentalmente osservato. Eseguendo il *fitting* di questa funzione si possono ricavare la p K_a e i valori teorici di *chemical shift* di L e di HL.

3.3.4 Acquisizione a diverse temperature

L'acquisizione degli spettri NMR a diversa temperatura è utile per studiare la cinetica delle reazioni, ed eventualmente anche quella dei moti intramolecolari come la rotazione e il *flip* di anello; ad esempio, in questa maniera si possono evidenziare i conformeri di un complesso metallo-legante che a temperatura ambiente scambiano troppo lentamente o troppo velocemente.

La scala temporale del processo dinamico può essere aumentata o diminuita variando la temperatura, infatti, se l'intervallo delle temperature corrisponde alle esigenze della dinamica di processo, aumentando la temperatura si aumenta la velocità di scambio, mentre abbassando la temperatura, la velocità di scambio diminuisce e si possono osservare i segnali separati (Figura 15).

Passando da una condizione all'altra si può determinare la temperatura di coalescenza.



Figura 15 Schema esemplificativo di NMR dinamico [21].

3.4 Spettrofotometria UV-Visibile

La spettrofotometria UV-Vis è una tecnica che si bassa sull'interazione tra materia e radiazione elettromagnetica⁹ della regione dell'UV-Visibile, quindi operando a lunghezze d'onda¹⁰ comprese tra i 200 nm e gli 800 nm (l'intervallo tra 200 nm e circa 400 nm corrisponde a quello del vicino UV, mentre l'intervallo tra circa 400 nm e 800 nm è quello corrispondente alla luce visibile).

La quantità di radiazione assorbita dal campione è misurata dalla trasmittanza (T), ovvero dal rapporto tra l'intensità della luce trasmessa attraverso il campione (I) e quella incidente (I_0 , equazione 20, Figura 16):

$$T = \frac{I}{I_0} \tag{20}$$

⁹ La radiazione elettromagnetica è una forma di energia che si propaga nello spazio; è data dalla combinazione di un campo elettrico e un campo magnetico oscillanti perpendicolari tra loro e alla direzione di propagazione. ¹⁰ La lunghezza d'onda (λ) è la distanza che separa due massimi o due minimi adiacenti in un'onda.



Figura 16 Rappresentazione schematica dell'interazione della radiazione elettromagnetica con il campione [29].

In alternativa alla trasmittanza si può misurare l'assorbanza (A), che corrisponde a (equazione 21):

$$A = -\log T \tag{21}$$

L'assorbanza è legata alla concentrazione della specie assorbente grazie all'equazione 22, che rappresenta la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \ b \ C \tag{22}$$

In cui:

- ε è l'assorbività, ovvero l'assorbanza di una soluzione 1 M di un determinato composto, in una cella con cammino ottico pari a 1 cm;
- b è il cammino ottico, espresso in centimetri. Rappresenta la distanza percorsa dal raggio nel campione; di solito è pari a 1 cm;
- C è la concentrazione (solitamente molare, mol/L) dell'analita contenuto nella soluzione considerata.

La spettrofotometria UV-Vis può essere sfruttata per studiare le proprietà dei complessi del rame, in quanto nel suo stato di ione divalente (Cu²⁺) ha configurazione $[Ar]3d^9$ e presenta gli orbitali *d* parzialmente occupati. Si può quindi osservare una transizione energetica data dall'assorbimento di energia da parte del campione, causata dal trasferimento di un elettrone da un orbitale *d* a un altro orbitale *d* che si trova a un'energia superiore (la formazione del complesso fa perdere la degenerazione tra gli orbitali *d*), oppure (o anche) dal trasferimento di un elettrone da un odel legante o viceversa (transizione di carica). Le transizioni *d*-*d* si osservano di solito a

lunghezze d'onda maggiori di quelle di carica, in quanto le prime sono meno energetiche.

Al pari dell'NMR, inoltre, la spettrofotometria UV-Visibile può essere utilizzata anche per studiare reazioni acido-base, nel caso la protonazione o deprotonazione abbia luogo su un sito che influenza le proprietà cromofore della molecola stessa.

3.4.1 Determinazione delle costanti di equilibrio

La tecnica spettrofotometrica permette di determinare le costanti di equilibrio in una reazione. A tale scopo, si opera in maniera del tutto similare a quanto visto per la spettroscopia NMR, solo che l'osservabile non è più il *chemical shift*, bensì l'assorbanza ad una determinata lunghezza d'onda. Anche l'assorbanza, infatti, è una proprietà che dipende dalle assorbanze dei singoli componenti; a differenza del *chemical shift*, che è una media pesata sulle frazioni molari, l'assorbanza è una grandezza additiva, in quanto lo spettro misurato è dato dalla somma dei contributi di ciascuna specie assorbente in soluzione.

Si consideri ad esempio il caso in cui il legante L può protonarsi formando HL e può legarsi ad M attraverso la reazione di complessamento:

dove L' rappresenta il legante nelle diverse specie protonate, e ML il complesso metallo-legante che si viene a formare. La costante di complessamento condizionale (β') è data da:

$$\beta' = \frac{[ML]}{[M] [L']}$$
(23)

L'assorbanza della soluzione è:

$$A = A_{\rm M} + A_{\rm L} + A_{\rm ML} + A_{\rm HL}$$
(24)

In cui i vari termini di assorbanza sono rispettivamente quelli del metallo, del legante, del complesso metallo-legante e della forma protonata del legante. L'equazione (27) diviene:

$$A = \varepsilon_{\rm M} b[{\rm M}] + \varepsilon_{\rm L} b[{\rm L}] + \varepsilon_{\rm ML} b[{\rm ML}] + \varepsilon_{\rm HL} b[{\rm HL}]$$
(25)

Le incognite di questa equazione, [M], [L], [ML] e [HL], possono essere ricavate impostando un sistema di equazioni che comprendano i bilanci di massa, le concentrazioni note iniziali di metallo e di legante, e le costanti di equilibrio. Risolvendo il sistema si ottiene [16] [21]:

$$A = \varepsilon \frac{\alpha \beta C^2}{1 + \alpha \beta C}$$
(26)

dove:

- ε è l'assorbività del complesso metallo legante;
- $\beta = \frac{\beta'}{\alpha}$ è la costante di complessamento;
- α è la frazione di dissociazione del legante, che è esprimibile in funzione della K_a e di [H⁺], quest'ultimo ricavabile dal pH;
- C è la concentrazione iniziale di metallo, che è uguale a quella iniziale del legante, ed è nota.

Tramite il *fitting* di questa funzione è possibile ottimizzare i valori di $\varepsilon e \beta e$ quindi ricavare il valore della costante di complessamento.

In questo lavoro di tesi, per motivi che saranno chiariti in seguito, non è stato possibile determinare costanti di complessamento attraverso un metodo "diretto" come quello che porta all'equazione (26). Si è invece dovuto utilizzare un metodo "indiretto", cioè sfruttando la competizione con un altro legante di cui sono già note le proprietà complessanti con lo ione metallico di interesse. In particolare, per determinare la costante di complessamento tra Cu²⁺ e CB-TE2S (L) si è sfruttata la competizione col DOTA (D) secondo la reazione di scambio:

$$CuD + L \rightleftharpoons CuL + D \tag{27}$$

Le singole reazioni di complessamento e le rispettive costanti di formazione sono:

$$Cu^{2+} + D \rightleftharpoons CuD \qquad \qquad \beta_D = \frac{[CuD]}{[Cu][D]} = 10^{22.30} \qquad (28)$$

$$Cu^{2+} + L \rightleftharpoons CuL$$
 $\beta_L = \frac{[CuL]}{[Cu][L]}$ (29)

(le cariche di leganti e complessi sono omesse per semplicità. La costante tra Cu²⁺ e DOTA è data nel riferimento [30]).

Da queste relazioni si può ricavare la costante di scambio:

$$\beta_{\text{scambio}} = \frac{\beta_{\text{L}}}{\beta_{\text{D}}} = \frac{[\text{CuL}][\text{D}]}{[\text{L}][\text{CuD}]}$$
(30)

Ricordando che l'assorbanza è una grandezza additiva, nel caso in esame essa è data da:

$$A = b \left(\varepsilon_{MD}[MD] + \varepsilon_{L}[L] + \varepsilon_{M}[M] + \varepsilon_{D}[D] + \varepsilon_{ML}[ML] \right)$$
(31)

In cui i vari ε sono riferiti ad una lunghezza d'onda prescelta. In particolare, nel caso in esame si può operare in maniera tale che le assorbanze del legante, del DOTA e del metallo siano trascurabili. Considerando anche che b = 1 cm, si ottiene:

$$A = \varepsilon_{\rm MD}[\rm MD] + \varepsilon_{\rm ML}[\rm ML]$$
(32)

A partire dal sistema di equazioni dei vari bilanci di massa:

$$(C_{D \text{ tot}} = [D] + [MD]$$
(33)

$$\begin{cases} C_{M \text{ tot}} = [M] + [MD] + [ML] & (34) \\ C_{L \text{ tot}} = [L] + [ML] & (35) \end{cases}$$

(35)

si ottiene:

$$[L] = C_L - [ML] \tag{36}$$

$$[MD] = C_M - [ML] \tag{37}$$

Nell'ipotesi in cui $C_M = C_D$, si ricava:

$$\beta_{\text{scambio}} = \frac{[\text{ML}]^2}{(C_{\text{L}} - [\text{ML}])(C_{\text{D}} - [\text{ML}])}$$
(38)

Svolgendo questa equazione in funzione di [ML] e dividendo per C_{M} si ottiene:

$$[ML] = \frac{\beta \left(1 + \frac{c_L}{c_M}\right) \pm \sqrt{\left(\beta + \beta \frac{c_L}{c_M}\right)^2 - 4 \frac{c_L}{c_M} \beta (\beta - 1)}}{2 \left(\frac{\beta - 1}{c_M}\right)}$$
(39)

Infine, sostituendo questa relazione nell'equazione 32 si ha:

$$A = \varepsilon_{\rm MD} \ C_{\rm M} + \frac{\beta \left(1 + \frac{C_L}{c_{\rm M}}\right) \pm \sqrt{\left(\beta + \beta \frac{C_{\rm L}}{c_{\rm M}}\right)^2 - 4 \frac{C_{\rm L}}{C_{\rm M}} \beta (\beta - 1)}}{2 \left(\frac{\beta - 1}{c_{\rm M}}\right)} \ (\varepsilon_{\rm ML} - \varepsilon_{\rm MD}) \tag{40}$$

3.4.2 Studio di cinetiche di reazione

Come visto, la concentrazione di una specie in soluzione è direttamente proporzionale all'assorbanza, secondo la legge di Lambert-Beer. Pertanto, la cinetica di una reazione può essere monitorata misurando la variazione dell'assorbanza di uno dei reagenti o dei prodotti in funzione del tempo.

Un caso comune di applicazione della spettrofotometria alle misure cinetiche riguarda la formazione di un complesso, oppure la sua decomposizione. In questi casi si deve fissare il valore di pH, dato che le proprietà cinetiche dipendono da questo. A tale scopo si utilizza un tampone che non interferisca con gli equilibri in soluzione e che esplichi il suo massimo potere tamponante a un pH prossimo a quello prescelto (quindi la pK_a del tampone deve essere vicina al pH di lavoro).

Le misure possono essere condotte in *batch*, cioè disponendo i reagenti in contenitori opportuni e misurandone l'assorbanza a tempi prestabiliti, oppure operando direttamente in cuvetta. Il primo metodo è adottato quando le cinetiche sono molto lente.

3.4.3 Vantaggi e limiti della spettrofotometria UV-Vis

La spettrofotometria UV-Vis presenta alcuni vantaggi rispetto alla potenziometria. Innanzitutto, non essendo una misura elettrodica, permette di indagare il comportamento dei sistemi acquosi anche a pH molto acidi (pH <<2) o molto basici (pH >> 12), e di lavorare con concentrazioni di analiti più bassi (fino a circa uno o due ordini di grandezza inferiori).

D'altro canto, questa tecnica è meno accurata della potenziometria, per cui non è in grado di fornire dati affidabili se nella soluzione è presente un elevato numero di specie. Inoltre, non è utilizzabile se lo spettro dei reagenti è uguale a quello dei prodotti, cioè se la reazione non interferisce coi cromofori dei reagenti.

CAPITOLO 4

PARTE SPERIMENTALE

4.1 Sintesi di CB-DO2S

4.1.1 Materiali

Tutti i solventi (*Sigma-Aldrich* e *Carlo Erba*) e i reagenti di partenza (*Sigma-Aldrich, Chematech* e *Fluka*) sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. I solventi deuterati utilizzati per la preparazione dei campioni per l'NMR (*Sigma-Aldrich*) presentano una purezza isotopica minima del 99.8%.

Il metanolo utilizzato per le analisi di massa è del tipo *Plus Gradient* HPLC use. La cromatografia su strato sottile è stata effettuata su fogli di alluminio a gel di silice 60 F254 (della *Merck*) e in casi più limitati su fogli di plastica ricoperti da ossido di alluminio 60 F254 (*Merck*), mentre la fase stazionaria per la cromatografia *flash* su colonna è stata preparata da gel di silice *Kiesiegel* 60M, 0.4 – 0.063 mm o con allumina basica 90 della *Merck*, 0.063-0.200 mm.

Le rese ottenute sono in accordo con quanto riportato nel precedente lavoro di tesi [1].

4.1.2 Strumentazione

Gli spettri NMR sono stati acquisiti utilizzando i seguenti spettrometri: *Bruker* AV III 500 a 500 MHz per ¹H e 125.8 MHz per ¹³C e *Bruker* Avance DPX 300 a 300 MHz per ¹H e 75 MHz per ¹³C.

La molteplicità è riportata come s = singoletto, d = doppietto, t = tripletto, m = multipletto. Gli spostamenti chimici (δ) sono espressi in parti per milione (ppm). Per l'analisi di massa, i campioni sono stati sciolti in una miscela di MeOH/H⁺ o ACN/H⁺ e lo strumento usato per registrare gli spettri è l'*Agilent Technologies* LC/MSD Trap SL.

È inoltre stato utilizzato per la reazione di idrogenazione un reattore assemblato mostrato in Figura 17.



Figura 17 Reattore assemblato costituito da raccordi e valvole Swagelock, barometro Ashcroft.

4.2 Procedure sintetiche

4.2.1 Sintesi di decaidro-2a,4a,6a,8a-tetraazaciclopenta[fg] acenaftilene (GC01).



	massa o volume	MW (g/mol)	mmoli	equivalenti	densità (g/mL)
Cyclen	1.50 g	172.27	8.70	1	
Gliossale 40%	1.49 mL	58.04	13.05	1.5	1.265
ACN	90 mL				

In un pallone da 250 mL si trasferisce la massa di *cyclen* pesata e 90 mL di acetonitrile. Successivamente, si aggiunge il volume di gliossale prelevato con una siringa.

La reazione è stata scaldata a 60°C ed è stata lasciata a riflusso per due ore sotto agitazione magnetica. Il suo avanzamento è stato monitorato tramite TLC usando come eluente diclorometano (DCM) e metanolo (MeOH) in rapporto 9:1, con l'aggiunta di 0.5% di NH₃, per prevenire la protonazione delle ammine del macrociclo ad opera della silice acida della lastrina.

È stato evaporato il solvente di reazione tramite *rotavapor* ed è stato purificato il prodotto tramite cromatografia su colonna di gel di silice (l'eluizione è avvenuta a gradiente utilizzato inizialmente una miscela DCM e MeOH 8:2 + 0.5% di NH₃, successivamente si è passati a una percentuale di DCM: MeOH pari a 7:3 e infine 5:5).

Infine, la caratterizzazione è avvenuta mediante NMR e spettrometro di massa (Figura 18 e Figura 19).

¹H-NMR (CDCl₃)



Figura 18 Spettro ¹H di GC01 in CDCl₃ acquisito tramite NMR 300 MHz

¹**H-NMR** (CDCl₃, 300 MHz): δ 2.32-2.45 (m, 4H, NCH₂CH₂N), 2.45-2.60 (m, 4H, NCH₂CH₂N), 2.71-2.81 (m, 4H, NCH₂CH₂N), 2.81-2.93 (m, 4H, NCH₂CH₂N), 2.96 (s, 2H, NN'CHCHNN').

¹³C-NMR (CDCl₃)



79 78 77 76 75 74 73 72 71 70 69 68 67 66 65 64 63 62 61 60 59 58 57 56 55 54 53 52 51 50 ppm Figura 19 Spettro ¹³C di GC01 in CDCl₃ acquisito tramite NMR 75 MHz

¹³**C-NMR** (CDCl₃, 75 MHz): δ 50.242 (4C, NCH₂CH₂N), 51.02 (4C, NCH₂CH₂N), 77.387 (2C, NN'CHCHNN')

ESI (+) MS m/z: 195.1

4.2.2 Sintesi del benzil ioduro (GC02)



	massa o vol	MW(g/mol)	mmol	eq	densità (g/mL)
Benzil bromuro	1.50 g	171.03	12.6	1	1.438
loduro di sodio	3.78 g	149.89	25.2	2	
Acetone	15 mL				

La massa di ioduro di sodio è stata pesata e trasferita nel pallone di reazione da 50 mL, poi è stato aggiunto il volume di acetone ed è stato disciolto completamente il sale. Successivamente è stato coperto il pallone di reazione per evitare che si formi l₂ tramite reazione radicalica, ed è stato unito il volume di benzil bromuro.

La reazione è stata lasciata andare per tutta la notte a 25 °C sotto agitazione magnetica, in atmosfera inerte per N₂. Il giorno seguente, il solvente è stato evaporato al *rotavapor* e si sono eseguite tre estrazioni con cloroformio e acqua.

La fase organica è stata recuperata ed anidrificata con sodio solfato, infine la soluzione è stata filtrata su imbuto con cotone ed è stato evaporato il solvente all'evaporatore rotante.

In questo caso la caratterizzazione non è avvenuta perché è una reazione quantitativa e nota.

4.2.3 Sintesi di 2a,6a-dibenzildodecaidro-2a,4a,6a,8atetraazaciclopenta [fg]acenaftilen-2a,6a-diio (GC03)



	massa o vol	MW (g/mol)	mmol	eq
GC01	700 mg	194.28	3.6	1
GC02	2.75 g	218.03	12.6	3.5
ACN	8 mL			

Nel pallone di reazione sono stati trasferiti 700 mg di GC01. Il benzil ioduro (GC02) è stato aggiunto al pallone di reazione tramite tre volumi di acetonitrile anidro; dopo ciascuna aggiunta è stata notata la formazione di un precipitato giallo. La reazione è lasciata andare *overnight* sotto agitazione magnetica a una temperatura di 50 °C.

Il giorno seguente, per controllare che la reazione fosse avvenuta, è stata eseguita una TLC con DCM e MeOH in proporzione 9:1 + 0.5% NH₃.

Il composto di interesse è stato purificato tramite tre lavaggi con acetonitrile, utilizzando la centrifuga.

Si recupera con dietiletere e metanolo il precipitato e lo si trasferisce in un pallone, da cui viene allontanato il solvente tramite evaporatore rotante; infine, si esegue la caratterizzazione tramite NMR (Figura 20).





Figura 20 Spettro 1 H di GC03 in D₂O acquisito tramite NMR 300 MHz

¹**H-NMR** (D₂O, 300): δ 2.98-3.17 (m, 2H, NCH₂CH₂N), 3.28-3.44 (m, 4H, NCH₂CH₂N), 3.46-3.70 (m, 6H, NCH₂CH₂N), 3.74-3.92 (m, 2H, NCH₂CH₂N), 4.14-4.32 (m, 2H, NCH₂CH₂N), 4.69-4,80 (s, 2H, CH₂Ph), 4.89 (d, 2H, NN'CHCHNN'), 7.47-7.61 (m, 10H, *H* Ph)

4.2.4 Sintesi di 4,10-dibenzil-1,4,7,10-tetraazabiciclo [5.5.2] tetradecano (GC04)



	massa o vol	MW(g/mol)	mmol	eq
GC03	1 g	630.33	1.59	1
LiAlH ₄ 1M	4.76 mL	37.95	4.76	3
THF	12 mL			

La massa del composto GC03 viene pesata e trasferita in un pallone da 50 mL, successivamente si collega il pallone alla linea del vuoto per eliminare qualsiasi residuo d'acqua contenuto nel campione che potrebbe compromettere l'esito della reazione. Successivamente, si chiude il pallone con un tappo perforabile, ed è fatto flussare azoto.

Si aggiunge infine il tetraidrofurano (THF) anidro e il litio alluminio idruro (LiAlH₄, come soluzione 1 M in THF); la reazione è lasciata andare tutta la notte a temperatura di 25 °C.

Il giorno seguente, è stata eseguita una TLC 8:2 DCM: MeOH che ha evidenziato la presenza del precursore, perciò la temperatura della reazione è stata alzata a 70 °C, ed è stata messa a riflusso per un'ora.

Successivamente per eliminare il LiAlH₄ non reagito, è stato aggiunto metanolo (MeOH), ed è stata ripetuta la TLC.

Quindi, è stato allontanato il solvente con il *rotavapor*; il solido così ottenuto è stato lavato tre volte con acetonitrile, recuperando il surnatante in un pallone da 250 mL.

È stata eseguita una prima caratterizzazione tramite spettroscopia NMR, che ha evidenziato diverse impurezze; perciò, è stata eseguita una purificazione su colonna cromatografica utilizzando allumina e una miscela 95:5 di DCM : MeOH e 0.5% NH₃. Il composto è tuttavia eluito subito dalla colonna, perciò è stata tentata una ulteriore purificazione tramite cromatografia su colonna, utilizzando la silice. In questo caso la polarità dell'eluente è stata modificata durante la corsa cromatografica: si è partiti con 98:2 di DCM : MeOH + 0.5% NH₃, per poi passare a 96:4 e infine a 95:5.

La caratterizzazione è avvenuta grazie agli spettri NMR del protone e del ¹³C, e allo spettro di massa; gli spettri non sono riportati perché, malgrado i due tentativi di purificazione, i risultati spettroscopici non sono risultati accettabili; si è comunque ritenuto possibile continuare con il successivo step sintetico.

ESI (+) MS m/z: 379.0

4.2.5 Tentativi di sintesi di tetradecano (GC05)

1,4,7,10-tetraazabiciclo[5.5.2]



	massa o vol	MW(g/mol)	mmol
GC04	119 mg	378.55	0.314
Pd/C	20 mg		
MeOH	6 mL		

In un reattore in acciaio, assemblato per uso interno, viene trasferito GC04, il palladio su carbone e il metanolo.

L'idrogeno necessario per far avvenire la reazione è stato prodotto a partire da fogli di alluminio fatti reagire con idrossido di sodio (NaOH) e convogliato nel reattore (**Capitolo 5**). La reazione è stata mantenuta a 50 °C per tre giorni.

Successivamente è stato prelevato e filtrato su cotone il contenuto del reattore e analizzato tramite TLC 95:5 DCM : MeOH + 0.5 % NH₃, ma non è stata rilevata la formazione del prodotto.

La reazione è stata ripetuta nelle stesse condizioni (20 mg Pd/C in 6 mL di MeOH, 3.8 atm di H₂), ed è lasciata andare per una notte a 30 °C.

Il giorno successivo, dopo aver constatato che anche in questo caso la reazione non era avvenuta, è stata caricata la piccola autoclave con GC04, 6 mL di MeOH anidro, 0.5 mL di acido acetico glaciale (AcOH), 20 mg di Pd/C, 5 mg di ossido di platino per catalizzare l'idrogenazione, e idrogeno a una pressione di 3 atmosfere; la reazione è stata scaldata a 100 °C per una notte. Ne è stato monitorato l'andamento per due giorni; la reazione è stata ripetuta in condizioni analoghe (si è provato a raggiungere temperature più alte, fino a 160 °C, ad usare più catalizzatore e acido acetico, raggiungendo anche valori di pressione di 8 atmosfere) altre due volte, senza ottenere i risultati sperati. Un ultimo tentativo è stato fatto sfruttando il *transfer* di idrogeno, usando il formiato per generare *in situ* l'idrogeno necessario per la deprotezione, secondo la seguente reazione:

N N $+ 2$ 0^{-1}	NH4 ⁺	Pd/C MeOH 160° overnight	N HN NH N	+ 2CO ₂
------------------------	------------------	-----------------------------------	--------------	--------------------

	massa o vol	MW(g/mol)	mmol
Formiato d'ammonio	67 mg	63.06	1.06
GC04	40 mg	378.55	0.106
Pd/C	20 mg		
MeOH	8 mL		

La reazione è sempre stata condotta utilizzando il reattore, in cui sono stati aggiunti il solvente (MeOH), il precursore (GC04), il formiato d'ammonio e il catalizzatore (Pd/C). La reazione è avvenuta a 160 °C per tutta la notte.

Il giorno seguente è stato raffreddato il reattore, il contenuto è stato filtrato su celite e raccolto in un pallone di volume adeguato; il solvente è stato allontanato per evaporazione tramite evaporatore rotante, e infine sono state operate tre estrazioni con diclorometano della miscela di reazione basificata e successivamente altre tre con etile acetato, sempre con lo scopo di rimuovere il formiato dalla miscela di reazione.

Dalla caratterizzazione tramite spettroscopia NMR però è comunque risultato che il composto di interesse non è stato ottenuto.

4.3 Studio degli equilibri in soluzione

4.3.1 Materiali

- Acqua ultrapura;
- Nitrato di sodio, NaNO₃, *Sigma-Aldrich*, ≥ 99.0%;
- Acido nitrico, HNO₃, *Aristar VWR Chemicals*, 69% per analisi in tracce;
- Idrossido di sodio, NaOH, EMSURE, titolo 99-100 %;
- Nitrato di argento, AgNO₃, Aldrich, 99.8%;
- Acqua deuterata, D₂O, *Aldrich*, 99.9% D;
- Acido nitrico deuterato, DNO₃, *Aldrich*, 65% in D₂O, 99% D;
- Idrossido di sodio deuterato, NaOD, Aldrich, 99.9% D;
- Acido 3-(trimetilsilil)propionico, sale di sodio, TSP, Sigma-Aldrich, > 99%;
- DOTA, C₁₆H₂₈N₄O₈ ·6H₂O, *Chematech*;
- CB-TE2S, C₁₈H₃₈N₄S₂ (derivato di sintesi);
- Cloruro di sodio, NaCl, *Sigma-Aldrich*;
- Carbonato di sodio anidro, Na₂CO₃, *Carlo Erba*, titolo minimo 99.5%;
- Ftalato acido di potassio, KHC₈H₄O₄, Aldrich, 99.95%;
- Acido cloridrico, HCl, *Sigma Aldrich*, 37%;
- Cloruro di rame, CuCl₂, Aldrich, ≥ 99.99%;
- Soluzione di nitrato di mercurio, HgNO₃, *Meck*, 0.05 M;
- Soluzione di HEPES, preparata dal solido, *Sigma-Aldrich*;
- Soluzione di Acido acetico, CH₃COOH, preparata per diluizione, Carlo Erba.

4.3.2 Strumentazione

- Sistema Purelab Chorus, *Veolia* (per la produzione di acqua ultrapura);
- Titolatore automatico Metrohm 765 Dosimat, dotato di burette da 1, 5 e 20 mL;
- Cella di misura di capacità pari a circa 10 mL, con mantello termostatato a doppia parete;
- Termostato ad acqua Falc SB 5, con controllo di temperatura *FA 90*;
- Sistema di erogazione e pre-saturazione dell'azoto costituito da due gorgogliatori in serie, contenenti nell'ordine NaOH 0.05 M e H₂O;
- Elettrodo di vetro combinato Hamilton pH 0-14;
- Elettrodo di riferimento ad Ag/AgCl/KCl *Crison* con doppio giunto;
- pH-metro *Metrohm 713*;
- Sonda termometrica *Metrohm 6.1110.100*, Pt 1000/B/2;
- Bilancia tecnica *Gibertini* TM 560-2R;
- Bilancia analitica *Gibertini* CA 312;
- Spettrometro NMR 400 MHz Bruker AMX 400;

 Spettrofotometro UV-vis Cary 60 (*Agilent*), equipaggiato con cuvette di quarzo di aventi cammino ottico 1 cm.

4.4 Preparazione delle soluzioni

4.4.1 Soluzioni per le misure potenziometriche

Tutte le soluzioni sono state preparate pesando direttamente gli analiti e il solvente o portando a volume in matracci tarati.

In tutti i campioni è stata introdotta una quantità di (Na)NO₃ o (Na)Cl che permettesse di ottenere una forza ionica di 0.15 M. Le parentesi in (Na)NO₃ o (Na)Cl specificano che NO₃⁻ o Cl⁻ sono alla concentrazione di 0.15 M, mentre il sodio può essere presente in quantità minori (come nelle soluzioni di HNO₃ o HCl) o maggiori (come nelle soluzioni di NaOH).

4.4.2 Preparazione della soluzione di HNO₃ 0.1 M

La soluzione di acido nitrico 0.1 M è stata ottenuta diluendo l'acido concentrato.

La standardizzazione è avvenuta titolando soluzioni a concentrazione nota di Na₂CO₃ anidro, che è uno standard primario; queste sono state preparate direttamente nella cella di misura. La soluzione di acido a titolo noto è stata conservata in una bottiglia di vetro.

4.4.3 Preparazione della soluzione di NaOH 0.1 M

Le soluzioni alcaline come quelle di NaOH, in presenza di anidride carbonica atmosferica (CO₂), subiscono il fenomeno della carbonatazione:

$$NaOH + CO_2 \rightarrow Na_2CO_3 + H_2O$$

Questa reazione determina *in primis* un problema per quanto riguarda il titolo della base, che viene diminuito progressivamente e irreversibilmente man mano che la reazione ha luogo. Inoltre, la formazione del prodotto di reazione (Na₂CO₃) fa sì che si abbia una miscela di una base debole diprotica con una base forte,

con conseguenti difficoltà nella trattazione teorica delle titolazioni potenziometriche.

Sono quindi state adottate delle accortezze che permettessero la produzione e la conservazione della base, limitando al minimo questo fenomeno. In particolare, l'acqua ultrapura utilizzata per preparare la soluzione è stata bollita per allontanare la CO₂ contenuta, e il pellet di NaOH utilizzato è stato sciacquato con quest'acqua prima di essere introdotto nella soluzione, per allontanare il carbonato presente sulla sua superficie.

La soluzione di NaOH è stata conservata in una bottiglia di polietilene rivestita con fogli di alluminio fissati con nastro isolante, per impedire l'ingresso della CO₂ per diffusione attraverso la plastica. L'NaOH non può essere conservato nel vetro, altrimenti la base reagirebbe con i silanoli del recipiente, e anche in questo caso il titolo della base cambierebbe nel tempo:

$$-SiOH_{(s)} + NaOH \rightarrow -SiONa_{(s)} + H_2O$$

Inoltre, l'imboccatura della bottiglia è stata protetta con una siringa che contiene calce sodata, costituita al 75% circa da Ca(OH)₂, al 20% circa da H₂O, al 3% circa da NaOH e al 2% circa da KOH.

La concentrazione nominale della soluzione ottenuta è 0.1 M; il titolo esatto è stato determinato tramite titolazioni effettuate con la soluzione di HNO₃ standardizzata in precedenza.

4.4.4 Preparazione delle soluzioni degli ioni metallici

Le soluzioni dei tre ioni metallici considerati sono state ottenute rispettivamente per dissoluzione di AgNO₃, di CuCl₂ e di HgNO₃ in acqua ultrapura contenente (Na)NO₃ o (Na)Cl 0.15 M, a seconda dell'anione che sarà presente in soluzione, dopo aver pesato la loro massa tramite bilancia analitica.

Le soluzioni sono poi state conservate in matracci di vetro. Le concentrazioni ottenute sono state di 20.3214 mM di CuCl₂, di 9.7274 mM di AgNO₃ e di 50.0000 mM di HgNO₃.

4.4.5 Soluzioni dei leganti

Le soluzioni di legante sono state preparate dissolvendo le quantità pesate con la bilancia analitica in acqua ultrapura, in presenza di (Na)NO₃ o (Na)Cl 0.15 M, queste soluzioni sono poi state conservate in *vial* di vetro sigillate.

4.4.6 Preparazione dei campioni per l'analisi all'NMR

Le soluzioni sono state preparate usando una miscela di acqua ultrapura : acqua deuterata 90:10; è inoltre stata introdotta una piccola quantità di TSP (acido tetrametilsililpropionico) come riferimento interno.

Per ottenere il pH desiderato, sono state fatte delle aggiunte di piccole aliquote di DNO₃ o NaOD diluiti in D₂O.

4.4.7 Preparazione dei campioni per le misure spettrofotometriche

Le soluzioni utilizzate per queste misurazioni sono state preparate analogamente a quanto descritto precedentemente per le misure potenziometriche; la forza ionica è assente nei campioni preparati per le cinetiche, mentre è presente sotto forma di NaCl 0.15 M negli altri campioni. Non è stato utilizzato NaNO₃ perché avrebbe interferito con l'acquisizione dello spettro del campione, in quanto il nitrato ha una banda di assorbimento attorno a $\lambda \approx 300$ nm.

4.4.8 Preparazione dei campioni per la determinazione indiretta della costante di complessamento Cu²⁺/CB-TE2S

È stata preparata la soluzione madre di DOTA 3 mM sciogliendo una massa della sostanza misurata alla bilancia analitica in acqua ultrapura contenente (Na)Cl 0.15 M; il pH è stato regolato aggiungendo piccoli volumi di NaOH per arrivare a un pH di circa 11. Si prepara anche una soluzione madre di CB-TE2S 2.82 mM, sciogliendo la massa del legante e di NaCl in acqua ultrapura; anche in questo caso si regola il pH con NaOH, fino ad arrivare a circa 11. Si prepara anche una soluzione di acqua ultrapura e NaCl 0.15 M a pH 11 da usare come bianco, prima di tutte le misure relative a questo esperimento.

I campioni sono stati preparati a pH basico in modo tale da non avere problemi di instabilità di CB-TE2S e da favorire la rapida formazione del complesso. Successivamente, si preparano diverse soluzioni contenenti diverse proporzioni di CB-TE2S : DOTA a concentrazione costante di Cu²⁺, aggiungendo prima DOTA e Cu²⁺, e infine CB-TE2S (Tabella 4). Ciascun campione ha un volume finale di 2 mL, la concentrazione di DOTA e CuCl₂ è 1 mM, è presente (Na)Cl 0.15 M e il pH è circa 11.

	CB-TF2S (uL)		CuCl ₂ (uL)	H₂O e NaCl
		υσιν (με)		0.15 M (μL)
0	0	666.7	98.42	1234.88
0.25	177.3	666.7	98.42	1057.3
0.5	354.7	666.7	98.42	880.28
0.75	531.9	666.7	98.42	702.7
1	709.2	666.7	98.42	525.68
1.25	886.5	666.7	98.42	347.6
1.54	1092	666.7	98.42	142.88

Tabella 3 Volumi prelevati dalle soluzioni madre di CB-TE2S (concentrazione iniziale = 2.82 mM), DOTA (concentrazione iniziale = 3.00 mM) e CuCl₂ (concentrazione iniziale = 20.32 mM) per ottenere i diversi campioni.

Durante la preparazione dei campioni si è evitato di porre CB-TE2S in ambiente acido o CuCl₂ in ambiente basico; in quest'ultimo caso il problema poteva essere rappresentato dalla sua precipitazione sotto forma di Cu(OH)₂.

4.5 Procedure sperimentali

4.5.1 Titolazioni potenziometriche

L'apparato strumentale utilizzato per eseguire le titolazioni potenziometriche è il titolatore automatico Metrohm 765 *Dosimat* (Figura 21), costituito da una buretta intercambiabile, un potenziometro e un sensore di temperatura; questo strumento è collegato a un computer che ne permette l'interfaccia con l'utente e la gestione dei *file* salvati tramite il programma *Automat1* [25].



Figura 21 Rappresentazione schematica di un titolatore automatico [7].

Durante le titolazioni la temperatura è sempre stata termostatata a 25.5 ± 0.2 °C, grazie a un termostato ad acqua, la soluzione è sempre stata in agitazione, grazie all'ancoretta magnetica, e il potenziale è stato monitorato tramite l'elettrodo di vetro combinato. L'ambiente di reazione è stato mantenuto inerte grazie al flusso di azoto purificato e presaturato; in tale maniera si evita che l'anidride carbonica si disciolga nella soluzione acquosa e ne modifichi il pH, acidificandolo secondo quanto descritto dai seguenti equilibri:

 $CO_{2(g)} \rightleftharpoons CO_{2(aq)}$ $CO_{2(aq)} + 2H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H_3O^+$ $HCO_3^- + 2H_2O \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H_3O^+$

Inoltre, per evitare interferenze elettromagnetiche dall'ambiente esterno, il titolatore automatico è riposto in una gabbia di Faraday¹¹, ed è tenuto al riparo dalla luce solare diretta per prevenire la deriva dell'elettrodo di vetro e di riferimento.

¹¹ La gabbia di Faraday è un contenitore costituito da un materiale conduttore di elettricità; ha la proprietà di isolare elettricamente il suo contenuto.

Essendo uno strumento che lavora in automatico, questo provvede sia alle aggiunte di titolante sia alla misura del potenziale, minimizzando i possibili errori casuali e velocizzando le tempistiche.

L'operatore ha il compito di impostare i seguenti parametri prima di avviare la titolazione:

- *V*_{min} (mL): volume minimo di titolante per ogni aggiunta;
- V_{max} (mL): volume massimo di titolante per ogni aggiunta;
- V_{fin} (mL): volume massimo di titolante aggiunto, oltre il quale la titolazione viene arrestata;
- *t*_{min} (sec): tempo minimo di attesa tra due aggiunte consecutive;
- *t*_{max} (sec): tempo massimo di attesa tra due aggiunte consecutive;
- *E*_{fin} (mV): valore finale del potenziale, oltre al quale la titolazione si arresta;
- *E*_{att} (mV): variazione di potenziale attesa dopo un'aggiunta di titolante; questo valore è sempre stato impostato a 5 mV. Il programma calcola il volume da aggiungere di volta in volta, in base al potenziale misurato dopo l'aggiunta precedente, scegliendo un volume compreso tra *V*_{min} e *V*_{max}, in modo tale da raggiungere questo valore di potenziale;
- d (mV/min): valore massimo di deriva del potenziale accettata affinché possa avvenire l'aggiunta successiva, che viene comunque effettuata se t_{max} viene superato. In quest'ultimo caso il programma indica il valore precedente come punto di non equilibrio; durante le misurazioni questo valore è sempre stato pari a 0.1 mV/min.

L'*output* della titolazione automatica è un *file* contenente il potenziale misurato ad ogni aggiunta di titolante in funzione del suo volume, e viene inoltre indicato se è stato raggiunto l'equilibrio prima di tale misura.

Le titolazioni sono state condotte in una cella di volume pari a 10 mL; il volume di soluzione iniziale è sempre stato pari ad almeno 3 mL per garantire l'immersione completa del bulbo dell'elettrodo di vetro.

4.5.2 Standardizzazione della soluzione di HNO₃

La soluzione di HNO₃ è stata standardizzata nell'ambito di un precedente lavoro di tesi [31]. In breve, il procedimento prevede di essiccare il carbonato di sodio in muffola per circa 2 ore a 260 °C, pesarlo con bilancia analitica, e discioglierlo nella cella di misurazione, aggiungendo acqua ultrapura contenente NaNO₃ 0.15 M. Si aggiunge poi un volume opportuno di HNO₃ tale per cui si ottenga una concentrazione molare di poco inferiore al doppio di quella del carbonato. La titolazione del carbonato in eccesso viene condotta con HNO₃ impostando i parametri riportati in Tabella 4.

Una volta terminata la titolazione è stata misurata la temperatura, e il titolo esatto dell'acido nitrico è stato determinato mediante metodo di Gran.

4.5.3 Calibrazione dell'elettrodo di vetro

L'elettrodo di vetro si calibra attraverso aggiunte di sei volumi noti e costanti di HNO₃ a 3 mL di una soluzione contenente acqua ultrapura e (Na)NO₃ 0.15 M. I parametri utilizzati per la calibrazione sono stati riportati in Tabella 4.

Daramatra		Valore impostato				
Parametro	HNO₃	Calibrazione	NaOH	CB-TE2S		
V _{min} (mL)	0.05	0.01–0.05	0.02	0.01		
V _{max} (mL)	0.20	0.10	0.08-0.1	0.10		
V _{fin} (mL)	v.a.e.	0.60	v.a.e.	v.a.e.		
t _{min} (sec)	40.0	40.0	40.0	40.0		
t _{max} (sec)	60.0	80.0	80.0	80.0		
E _{fin} (mV)	240.0	v.a.e.	-340.0	-340		

Tabella 4 Parametri impostati per la standardizzazione di HNO₃, la calibrazione dell'elettrodo, la titolazione di NaOH e la titolazione di CB-TE2S. v.a.e. = valore arbitrario elevato.

4.5.4 Standardizzazione della soluzione di NaOH

La soluzione di NaOH è stata titolata con HNO₃ standardizzato in precedenza (i parametri della titolazione sono riportati in Tabella 4). La concentrazione di NaOH è stata determinata inizialmente utilizzando il metodo di Gran, e successivamente con PITMAP.

4.5.5 Titolazione della soluzione di legante

La soluzione di legante da titolare è stata ottenuta aggiungendo nella cella di misurazione volumi opportuni di acqua ultrapura contenente (Na)NO₃ 0.15 M, di HNO₃ in modo da ottenere un pH iniziale di 2, e di legante per una concentrazione iniziale di 1 mM.

La titolazione avviene per aggiunte successive di NaOH, fino al raggiungimento del potenziale finale impostato (Tabella 4).

4.5.6 Conservazione dell'elettrodo di vetro

L'elettrodo di vetro, quando non utilizzato, è stato conservato in una soluzione di ftalato acido di potassio 0.15 M, mentre sia prima che dopo ogni utilizzo è stato lavato con acqua ultrapura e asciugato usando carta da laboratorio.

4.6 Spettroscopia NMR

4.6.1 Strumentazione

I campioni sono stati preparati per diluizione delle soluzioni madre del legante e del metallo, in modo tale da ottenere in entrambi i casi una soluzione finale di concentrazione 1 mM; il volume finale dei campioni è di 600 μL.

Tutti gli spettri sono stati acquisiti utilizzando il *software Topspin 3.5*, e sono stati processati con il *software Topspin 4.1.4*; tutte le misurazioni sono state condotte a 25 °C, se non diversamente indicato.

I *chemical shift* sono espressi in parte per milione (ppm) e riferiti al TSP, lo standard interno; è stato soppresso il segnale dell'acqua tramite *excitation sculpting*.

Per preparare i campioni a diverso pH sono stati aggiunti piccoli volumi di DNO₃ e NaOD alle soluzioni, e il pH è stato misurato mediante elettrodo di vetro precedentemente calibrato.

4.6.2 Acquisizione di spettri ¹H-NMR a temperature variabili

Gli spettri del complesso tra ione metallico e CB-TE2S sono stati acquisiti anche alle temperature di 45 °C e 65 °C, oltre che alla temperatura ambiente.

È possibile impostare il cambio di temperatura tramite l'apposito menù disponibile su *TopSpin*. Il cambiamento avviene rapidamente, ma in media si aspettano 15 minuti per assicurarsi che tutto il campione sia stato omogeneamente scaldato; in caso contrario si avrebbe la formazione di gradienti di temperatura che pregiudicherebbero una misurazione accurata.
4.7 Misurazioni spettrofotometriche UV-Vis

Tutte le misurazioni spettrofotometriche UV-Vis sono state effettuate usando radiazioni elettromagnetiche con λ compresa tra i 200 e gli 800 nm. Lo schema strumentale è riportato in Figura 22.

Prima di ciascuna misurazione è stato acquisito lo spettro del "bianco," per eliminare possibili interferenze date dal solvente o da specie disciolte in esso; nel caso delle cinetiche il bianco è stato preparato utilizzando i tamponi corrispondenti ai diversi pH indagati, mentre negli altri esperimenti è stata utilizzata acqua ultrapura contenente NaCl 0.15 M.



Figura 22 Struttura schematica dello spettrofotometro utilizzato nel corso del lavoro di tesi [32]

Dopo ogni acquisizione la cuvetta è stata sciacquata con acqua ultrapura e asciugata con un flusso di azoto.

4.7.1 Studio della cinetica di complessamento

Le reazioni di complessamento tra Cu²⁺ e CB-TE2S sono state valutate a vari pH per determinare il tempo richiesto al raggiungimento dell'equilibrio. I pH indagati sono stati pH = 2 (tamponato con HCl), pH = 4.5 (tamponato con Acido Acetico/Acetato), e pH = 7 (tamponato con HEPES).

Le misurazioni sono avvenute a temperatura ambiente e i campioni sono stati preparati aggiungendo nella cuvetta di misurazione il tampone, la soluzione del legante e infine quella di CuCl₂. I volumi di queste due soluzioni sono stati calcolati in modo tale da avere una concentrazione finale di 0.1 mM sia per il legante che per Cu²⁺.

L'acquisizione degli spettri è avvenuta immediatamente subito dopo l'aggiunta del metallo, e ai successivi intervalli di tempo preimpostati, a seconda del pH, in base alla velocità attesa.

Per monitorare il complessamento è stato valutato l'incremento della banda di assorbimento del complesso alla λ di 345-350 nm.

4.7.2 Determinazione delle costanti di stabilità

È stata preparata una soluzione madre contenente CB-TE2S e Cu²⁺ entrambi a concentrazione 0.1 mM, ne è stato modificato il pH aggiungendo piccole aliquote, dell'ordine dei μ L, di NaOH o HCl alle concentrazioni di 0.1 M, 0.01 M o 0.001 M, in modo da regolare il pH senza determinarne una diluizione, e successivamente sono stati preparati due campioni per ogni valore di pH desiderato (è stato considerato l'intervallo tra pH 2 e 10). Uno dei campioni è stato mantenuto a temperatura ambiente, mentre l'altro è stato mantenuto a temperatura ambiente, mentre l'altro è stato riscaldato a 60 °C su piastra riscaldante per venti giorni.

Gli spettri sono stati acquisiti fino al raggiungimento dell'equilibrio, che si ottiene quando non ci sono più variazioni di assorbanza nel tempo.

4.7.3 Determinazione indiretta della costante di complessamento

Per i campioni di cui alla Tabella 3 è stato dapprima controllato il pH, per verificare che esso fosse tra circa 10 e 11; successivamente è stata misurata l'assorbanza dei vari campioni, che poi sono stati messi a scaldare in *vial* di vetro sigillate a 80 °C; le misure sono avvenute immediatamente dopo la loro preparazione e sono state ripetute ogni 30 min fino al raggiungimento dell'equilibrio. L'equilibrio è stato raggiunto sempre entro un'ora dopo la preparazione delle soluzioni.

CAPITOLO 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Sintesi di CB-DO2S

5.1.1 Sintesi dalla letteratura e sintesi attuata

La via sintetica che si è scelto di seguire per ottenere CB-DO2S richiede innanzitutto di disporre del CB-cyclen. La sintesi di quest'ultimo composto è riportata in letteratura ed è schematizzata in Figura 23. Successivamente, il CB-cyclen può essere alchilato sulle due ammine secondarie tramite 2-clorometietilsolfuro [1] per produrre CB-DO2S. La via sintetica proposta per questo è mostrata in Figura 24.



Figura 23 Sintesi del CB-cyclen proposta in letteratura [33].



Figura 24 Via sintetica proposta per CB-DO2S (GC06); in rosso sono riportate le reazioni tentate ma non riuscite.

Nel primo passaggio si ha la condensazione del gliossale al *cyclen* disponibile commercialmente; la reazione avviene in acetonitrile a riflusso per due ore.

Nel secondo passaggio, condotto in parallelo, si è operata una sostituzione bromo/iodio per rendere più reattivo il benzile e ridurre i tempi di reazione; è stato così ottenuto un derivato circa tre volte più reattivo del benzil bromuro. Infatti, lo ioduro rappresenta un miglior gruppo uscente per la sostituzione nucleofila ($S_N 2$), e questo ha permesso di ottenere il prodotto del terzo passaggio in una sola notte, anziché in tempi (secondo la letteratura [33]) compresi tra i tre e i ventuno giorni.

Nel quarto passaggio si ha la riduzione dei doppi legami del ponte centrale utilizzando litio alluminio idruro (LiAlH₄). Anche in questo caso si è operata una distinzione rispetto alla procedura riportata in letteratura, dove come riducente si utilizzava sodio boroidruro (NaBH₄): in questo modo si è riusciti a ridurre

sensibilmente la tempistica della reazione, che è stata di un giorno anziché di quattro - sedici giorni [33].

Per il quinto passaggio era prevista una riduzione con idrogeno palladio su carbone ($H_2 Pd/C$), che però non è mai avvenuta, malgrado i diversi tentativi e le diverse condizioni utilizzate (descritte nel **Capitolo 4**).

Inizialmente, l'idrogeno necessario per la reazione di deprotezione, in presenza del catalizzatore Pd/C, è stato prodotto secondo la seguente reazione di ossidoriduzione:

$$2AI^{0} + 6H_{2}O + 2OH^{-} \rightleftharpoons 2AI(OH)_{4}^{-} + 3H_{2}^{\uparrow}$$

L'idrogeno è stato convogliato nel reattore dove si è cercato di ottenere GC05.

In un secondo tentativo, H_2 è stato ottenuto da bombole che permettessero di raggiungere pressioni più elevate. Si sono utilizzate miscele di MeOH e AcOH come solvente, per cercare di stabilizzare il prodotto di reazione, e utilizzando come catalizzatore oltre al Pd/C anche l'ossido di platino (PtO₂), ma in nessun caso la reazione ha avuto l'esito sperato.

5.2 Caratterizzazione di CB-TE2S

La caratterizzazione di CB-TE2S ha come obiettivo iniziale la determinazione delle sue costanti di dissociazione acida. Infatti, quando si studiano molecole chelanti, la loro diversa protonazione influenza la formazione dei complessi metallo-legante, e la determinazione delle costanti di complessamento richiede la conoscenza delle proprietà acido-base del legante (e del metallo).

5.3 Titolazioni potenziometriche

5.3.1 Standardizzazione di HNO₃ e di NaOH, e calibrazione dell'elettrodo

Prima di poter caratterizzare il legante in sé è stata effettuata la standardizzazione di HNO₃ [31], la calibrazione dell'elettrodo e la standardizzazione di NaOH.

Dall'elaborazione, tramite metodo di Gran, dei dati raccolti dalla titolazione di Na_2CO_3 con HNO_3 è risultato che la concentrazione esatta dell'acido è pari a 0.1016 ± 0.0049 M [31].

Per quanto riguarda la calibrazione dell'elettrodo, il potenziale è influenzato dalla pendenza di Nernst (*S*), dal potenziale di giunto liquido (*E*_j), dal potenziale standard (*E*⁰) e dalle impurezze (*imp*). Le prime due grandezze sono considerate costanti nelle condizioni in cui sono state effettuate le misure; infatti, $S = \frac{RT}{nF} \ln 10$ ha un valore costante perché le misurazioni avvengono in un sistema termostatato, mentre *E*_j è considerato trascurabile quando i valori di pH non sono minori di circa 2 o maggiori di circa 12.5. Le rimanenti incognite sono ottimizzate mediante PITMAP.

La calibrazione dell'elettrodo tal quale è stata condotta solo saltuariamente. Di fatto, si è preferito saltare questo passaggio, ed ottimizzare i valori di E^0 e di *imp* dalle titolazioni acido.

La concentrazione della soluzione di NaOH è stata determinata tramite titolazione di quantità note di HNO₃ precedentemente standardizzato. Un esempio di curva ottenuta è riportata in Figura 25. I dati sono stati inizialmente elaborati con il metodo di Gran (Figura 26), grazie al quale è stata ottenuta una concentrazione media di NaOH pari a 0.1062 ± 0.0018 M; successivamente gli stessi dati sono stati rielaborati con PITMAP, che ha comunque confermato il valore ricavato col metodo di Gran.



Figura 25 Titolazione con NaOH di una soluzione contenente 3.00 mL di H_2O , NaNO₃ 0.15 M e 0.6 mL di HNO_3 0.1016 M.



Figura 26 Linearizzazione di Gran applicata ai punti sperimentali della curva di titolazione di Figura 25 (valori prima del punto di equivalenza).

5.3.2 Titolazione di CB-TE2S

Sono state effettuate diverse titolazioni potenziometriche del legante, con l'obiettivo di determinare le costanti di dissociazione acida e la concentrazione del legante.

I risultati dei *fitting* non sono però stati accettabili, in quanto le costanti e le concentrazioni determinate differivano da titolazione a titolazione, e i fitting erano sempre di qualità scadente. Di solito questo tipo di comportamento si verifica quando l'analita contiene delle specie capaci di interferire con la titolazione perché aventi un comportamento acido-base. L'ipotesi iniziale che è stata fatta per spiegare i mancati risultati è che il CB-TE2S, nominalmente neutro, possa contenere specie variamente protonate e un controione negativo: in questa situazione il peso molecolare del composto è indefinito e non permette di procedere ad un'elaborazione accettabile. Questo tipo di impurezze non è così impattante per misure spettroscopiche, e quindi si è abbandonata la potenziometria passando alla spettroscopia NMR e alla spettrofotometria UV-Vis.

5.4 NMR

5.4.1 CB-TE2S

Sono stati acquisiti una serie di spettri ¹H-NMR a vari pH di soluzioni contenenti CB-TE2S. La Figura 27 riporta le assegnazioni dei segnali, effettuate anche grazie all'ausilio di spettri bidimensionali TOCSY ¹H-¹H, a due differenti pH, nei quali, come si vedrà meglio tra breve, sono presenti due forme diversamente protonate. Le assegnazioni sono riassunte in Tabella 6.

Nello spettro monodimensionale si osservano un singoletto allargato, che si sdoppia a pH più acidi in due singoletti allargati, verosimilmente corrispondenti a un doppietto di tripletti di tripletti, relativo ai metileni dell'anello (NCH₂CH₂CH₂N), e un singoletto corrispondente ai gruppi metilici legati allo zolfo delle catene tioeteree (SCH₃). Non è stato possibile assegnare i segnali relativi ai protoni NN'CHCHNN' e NCH₂CH₂N del ponte e dell'anello.

La Figura 28 riporta una selezione di spettri ottenuti a vari pH. Se si osserva l'andamento del metile della catena tioeterea, si nota che il suo *chemical shift* varia in maniera sistematica col pH (Figura 29); questa porzione della molecola, sebbene non direttamente legata ai siti protonabili, risente quindi del diverso stato di protonazione del legante. Anche gli altri segnali si spostano col pH, ma risuonando assieme risulta più difficoltoso cogliere l'andamento esatto.

Tramite la valutazione della variazione del *chemical shift* si è potuto ricavare, dopo il *fitting* della funzione corrispondente, il valore della costante di dissociazione acida, pari a 6.65 ± 0.12 (Figura 30); grazie a tale valore è stato possibile tracciare il diagramma di distribuzione di CB-TE2S (Figura 31).



a.



b.



c.

Figura 27. a) Assegnazione dei picchi di CB-TE2S; (b) spettri TOCSY ¹H-¹H di CB-TE2S a pH 3.53 (a tale pH predomina la forma H_2L^{2+}); (c) spettri a pH 10 (a tale pH predomina la forma HL^+).

Tabella 5 Attribuzione dei segnali di CB-TE2S a pH 10 (forma HL^+) e a pH 3.53 (forma H_2L^{2+}).

Specie	Assegnazione
HL⁺	1.72 (s allargato, 4, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ N);
	2.15 (s, 6, SCH₃);
	2.73 (m, 4, NCH ₂ CH ₂ S);
	2.84 (m, 4, NC <i>H</i> ₂ CH ₂ S).
H ₂ L ²⁺	1.83 (s allargato, 2, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ N);
	1.88 (s allargato, 2, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ N);
	2.17 (s, 3, SCH₃);
	2.23 (s, 3, SCH ₃);
	2.75 (m, 4, NCH ₂ CH ₂ S);
	3.06 (m, 4, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ N)
	3.53 (m, 4, NCH ₂ CH ₂ CH ₂ N)
	3.60 (m, 4, NCH ₂ CH ₂ S)



Figura 28 Andamento in funzione del pH degli spettri di soluzioni contenenti CB-TE2S 1 mM e NaNO₃ 0.15 M; spettri ¹H-NMR 400 MHz, acquisiti alla temperatura di 298 K, in solvente 90% H₂O e 10% D₂O.



Figura 29 Variazione del chemical shift del segnale corrispondente al metile legato allo zolfo della catena laterale in funzione del pH (cfr. spettri di Figura 25).



Figura 30 Fitting della variazione del chemical shift in funzione del pH della porzione -SCH₃ (è mostrata la porzione tra pH 4 e 8).

Si noti che le costanti di deprotonazione di CB-TE2S potrebbero essere fino a quattro¹², dato che la molecola è una base tetraprotica, ma dall'analisi ne è stata determinata solo una. I debolissimi spostamenti osservati nell'intorno di pH 3 e di pH 10 (Figura 29) sono appena percettibili, e soprattutto sono poco estesi sull'asse del pH, per cui non sono stati considerati essere legati a reazioni di protonazione o deprotonazione.

Per determinare quale pK_a , tra le quattro possibili, è quella determinata, si possono fare alcune considerazioni. Innanzitutto, per molecole simili (*cyclam* e derivati) le prime due pK_a sono sempre molto basse, tendenzialmente minori di 2, poiché gli azoti protonati sono carichi, e le cariche vicinali sull'anello sono fortemente destabilizzate. Pertanto, la pK_a determinata può essere ragionevolmente la terza oppure la quarta. In secondo luogo, per molecole simili la specie completamente deprotonata ha una scarsa solubilità in acqua, appunto perché non presenta carica [31]. Nel nostro caso non si sono verificati problemi di solubilità ad alcun pH. Infine, sempre per molecole simili (leganti con braccia solforate) si sono trovati valori di pK_{a3} e di pK_{a4} prossimi rispettivamente a 7 e a 11. Queste ultime due considerazioni fanno ritenere che il valore da noi trovato sia da assegnare alla pK_{a3} .

¹² Le quattro pK_a di CB-TE2S sono corrispondenti ai seguenti equilibri:

$H_4L^{4+} \rightleftharpoons H_3L^{3+} + H^+$	$pK_{a1} = \frac{[H_3L^{3+}][H^+]}{[H_4L^{4+}]}$
$H_3L^{3*} \rightleftharpoons H_2L^{2*} + H^*$	$pK_{a2} = \frac{[H_2L^{2+}][H^+]}{[H_3L^{3+}]}$
$H_2L^{2+} \rightleftharpoons HL^+ + H^+$	$pK_{a3} = \frac{[HL^+][H^+]}{[H_2L^{2+}]}$
$HL^+ \rightleftharpoons L + H^+$	$pK_{a4} = \frac{[L][H^+]}{[HL^+]}$



Figura 31 Diagramma di distribuzione di CB-TE2S α è la frazione di dissociazione, data da [concentrazione all'equilibrio della specie considerata] C_{totale} .

Per la molecola non sostituita, *CB-cyclam*¹³, la letteratura riporta le seguenti costanti di dissociazione: $pK_{a1} << 2$, $pK_{a2} = 1.39$, $pK_{a3} = 10.20$ e $pK_{a4} = 12.42$ [34] [35]; confrontando questi dati con quelli da noi ottenuti, si osserva che per CB-TE2S la seconda pK_a potrebbe essere di poco minore e l'ultima pK_a potrebbe essere di poco maggiore; invece, la pK_{a3} passa da 10.20 a 6.65. La ragione di questo fenomeno non è chiara ed è presumibilmente da attribuirsi a modifiche conformazionali indotte delle braccia solforate. Peraltro, una analoga e significativa riduzione della pK_{a3} , passando da un anello non sostituito ad un anello sostituito, è già stato osservato per altri chelanti sostituiti da braccia solforate [36]. La Figura 32 mostra tale effetto nel caso di alcuni derivati del *cyclen*.

¹³ Struttura del CB-cyclam [38]



Figura 32 Valori di pK_{a3} in NaNO₃ 0.15 M a 25 °C per il cyclen e per i suoi alchil, ammido e sulfanil derivati¹⁴ [37] [30].

Gli spettri di CB-TE2S sono stati acquisiti anche a temperature elevate ($T_1 = 318$ K e $T_2 = 338$ K, Figura 33, Figura 34, Figura 35, Figura 36) per valutare la natura del picco adiacente a quello del metile della catena tioeterea. Si è sospettato, infatti, che tale picco potesse essere attribuibile ad un conformero, la cui esistenza in soluzione è giustificabile dalla rigidità della molecola. Gli spettri ai vari pH mostrano tuttavia che il picco resta invariato in quanto non subisce nessun allargamento. Ciò naturalmente potrebbe semplicemente significare che, se ci sono due conformeri, il loro scambio rimanga molto lento anche a 318 K e a 338 K; in alternativa, il picco aggiuntivo dovrebbe essere attribuibile ad un'impurezza.

¹⁴ Struttura del tetrametil cyclen [37] e di DOT-n-Bu





Figura 33 Spettri di CB-TE2S *a* pH=3.53 *a temperatura ambiente (c.), a* 318 K (45 °C, *b.) e a* 338 K (65 °C, *a.), acquisiti tramite* NMR 400 MHz, *solvente* 90% H₂O *e* 10% D₂O.



Figura 34 Spettri di CB-TE2S *a* pH=5.81 *a temperatura ambiente (b.) e a* 318 K (*a.), acquisiti tramite* NMR 400 MHz, *solvente* 90% H₂O *e* 10% D₂O.



Figura 35 Spettri di CB-TE2S a pH=6.77 a temperatura ambiente (c.), a 318 K (b.) e a 338 K (c.), acquisiti tramite NMR 400 MHz, solvente 90% H_2O e 10% D_2O .



Figura 36 Spettri di CB-TE2S a pH=10.50 a temperatura ambiente (b.) e a 338 K (a.), acquisiti tramite NMR 400 MHz, solvente 90% H₂O e 10% D₂O.

5.4.2 Spettri ¹H-NMR di soluzioni contenenti CB-TE2S e Ag⁺

Sono stati raccolti diversi spettri di soluzioni CB-TE2S e Ag⁺, entrambi a concentrazione 1 mM, lavorando a diversi pH ed in presenza di NaNO₃ 0.15 M, per valutare la variazione del *chemical shift* in funzione del pH. Gli spettri ottenuti sono mostrati in Figura 37.



Figura 37 Spettri ¹H-NMR 400 MHz di soluzioni contenenti CB-TE2S e AgNO₃ 1 mM, e NaNO₃ 0.15 M in H₂O 90% e D₂O 10% misurati a 298 K e a diversi valori di pH.

Gli spettri non permettono di identificare un andamento sistematico che sia dipendente dal pH. Gli spettri in presenza di Ag⁺ possono essere utilmente confrontati con quelli in sua assenza. A pH = 2 (Figura 38) i due spettri appaiono praticamente identici. Pertanto, il complesso tra Ag⁺ e CB-TE2S non si forma a tali pH, o perché termodinamicamente instabile, oppure perché la cinetica di formazione è molto lenta e il tempo trascorso prima di ottenere lo spettro (poche ore) è stato insufficiente. Quest'ultima possibilità non è escludibile a priori, perché non sono state fatte ulteriori misurazioni a tempi diversi; in effetti, sebbene il CB-TE2S possa di per sé dare complessi inerti, lo ione Ag⁺ è noto per essere uno ione metallico che reagisce rapidamente con leganti per dare complessi.

Si deve anche segnalare che, dopo la preparazione della miscela Ag⁺/CB-TE2S, è stata osservata nel tubo NMR la precipitazione di un sale poco solubile, probabilmente da attribuirsi ad impurezze derivanti dalla sintesi o dal solvente. Questo sale potrebbe essere ad esempio un alogenuro di argento (AgCl o AgI), e la sua formazione confermerebbe il mancato complessamento dello ione metallico.



Figura 38 Spettri ¹H-NMR 400 MHz di CB-TE2S 1mM in presenza di NaNO₃ 0.15 M a pH=2.02 (b.) e CB-TE2S e AgNO₃ a pH=2.06 in presenza di NaNO₃ 0.15 M; il solvente è H₂O 90% e D₂O 10%, l'acquisizione è avvenuta a 298K.

La Figura 39 pone a confronto gli spettri di solo CB-TE2S e della miscela con Ag⁺ a pH leggermente inferiori a 7. Gli spettri sono diversi e indicano la formazione di uno (o più) complessi. Il riscaldamento delle soluzioni metallo+legante ha in questo caso un effetto piuttosto marcato, come si osserva confrontando le Figura 39 (a, b e c). Per spiegare l'effetto del riscaldamento si possono avanzare due ipotesi: una prevede una lenta cinetica di formazione, e l'altra la presenza di due complessi in equilibrio tra loro, considerando che la costante di tale equilibrio dipende dalla temperatura. Per motivi che saranno chiariti in seguito, non si è ulteriormente indagato il sistema.



Figura 39 Spettri 1H-NMR 400 MHz di soluzioni di CB-TE2S (d.) a pH=6.77 e CB-TE2S e AgNO₃ entrambi a concentrazione 1 mM e NaNO₃ 0.15 M a pH=6.80, spettri acquisiti dopo diverse condizioni di riscaldamento (a., b., c.); solvente H₂O 90% e D₂O 10%, spettri acquisiti a 298 K. Il trattamento del campione prima della misurazione è riportato in Tabella 6.

Tabella 6 Descrizione, per ciascuno spettro acquisito, del pH e del trattamento dei campioni prima dell'acquisizione degli spettri (cfr. Figura 39).

Numero spettro	рН	composizione	Trattamento prima dell'acquisizione
36.a	6.80	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	Come il campione 50.b e riscaldamento per altre 72 h
36.b	6.80	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	Campione acquisito dopo aver lasciato il campione a temperatura ambiente per 72 h
36.c	6.80	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	_
36.d	6.77	CB-TE2S 1 mM NaNO₃ 0.15 M	_

La Figura 40 pone invece a confronto gli spettri di solo CB-TE2S e della miscela con Ag⁺ a pH prossimi a 8. In questi casi il segnale a δ =2.15 relativo al metile del legante libero viene osservato anche nel complesso, mentre in prossimità appaiono nuovi segnali più deboli, attribuibili ad uno o più complessi in soluzione. Gli spettri non cambiano in seguito a riscaldamento.



Figura 40 Spettri ¹H-NMR 400 MHz *di soluzioni di* CB-TE2S (*e.*) *a* pH=7.92 *e* CB-TE2S *e* AgNO₃ *entrambi a concentrazione* 1 mM *e* NaNO₃ 0.15 M *a* pH=8.03; *spettri acquisiti dopo diverse condizioni di riscaldamento (a., b., c., d.); solvente* H₂O 90% *e* D₂O 10%, *spettri acquisiti a* 298 K, *per il trattamento del campione prima della misurazione vedere Tabella 7.*

Numero spettro	рН	composizione	Trattamento prima dell'acquisizione
37.a	8.03	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	Come il campione 51.c e scaldato per altre 120 h
37.b	8.03	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	Come il campione 51.c e ulteriormente scaldato per altre 48 h
37.c	8.03	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	Campione scaldato per 24 h, dopo un'attesa di 24 h a <i>T</i> ambiente
37.d	8.03	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	_
37.e	7.92	CB-TE2S 1 mM NaNO₃ 0.15 M	_

Tabella 7 Descrizione, per ciascuno spettro acquisito di cui alla Figura 40, del pH e del trattamento dei campioni prima dell'acquisizione degli spettri.

La Figura 41 e la Figura 42 si riferiscono invece a pH compresi tra 9 e 10. Il comportamento a tali pH è del tutto analogo a quello descritto per pH prossimi a 8, con la differenza che i nuovi segnali che appaiono previa aggiunta di Ag⁺ sono più intensi che non a pH 8, indicando presumibilmente una formazione più accentuata dei complessi rispetto al legante libero. L'aumento della temperatura comporta però una diminuzione del segnale dei complessi. Ciò suggerisce che i complessi siano meno stabili a temperature più alte.



Figura 41 Spettri ¹H-NMR 400 MHz di soluzioni di CB-TE2S (g.) a pH=9.06, CB-TE2S e AgNO₃ entrambi a concentrazione 1 mM e NaNO₃ 0.15 M a pH=9.41-9.91 (c., d., e., f.), CB-TE2S 1 mM e AgNO₃ 2mM NaNO₃ 0.15 M (a., b.), spettri acquisiti dopo diverse condizioni di riscaldamento; solvente H₂O 90% e D₂O 10%, spettri acquisiti a 298 K, per il trattamento del campione prima della misurazione vedere Tabella 8.

Tabella 8 Descrizione, per ciascuno spettro acquisito (cfr. Figura 41), del pH e del trattamento dei campioni prima dell'acquisizione degli spettri.

Numero spettro	рН	composizione	Trattamento prima dell'acquisizione
38.a	9.41	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 2 mM NaNO₃ 0.15 M	Come il campione 50.b e scaldato per altre 24 h
38.b	9.41	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 2 mM NaNO₃ 0.15 M	Aggiunto un ulteriore volume di AgNO₃ al campione 50.c e scaldato per altre 96 h e 24 h a temperatura ambiente
38.c	9.41	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	Come il campione 50.d e scaldato per altre 25 h
38.d	9.41	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	Campione scaldato per 72 h, successivamente mantenuto a temperatura ambiente per 24 h, infine scaldato per altre 2 h
38.e	9.41	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	Campione scaldato per 72 h
38.f	9.91	CB-TE2S 1 mM AgNO₃ 1 mM NaNO₃ 0.15 M	_
38.g	9.06	CB-TE2S 1 mM NaNO₃ 0.15 M	_



Figura 42 Spettri ¹H-NMR 400 MHz di soluzioni di CB-TE2S (c.) a pH=10 e CB-TE2S e AgNO₃ entrambi a concentrazione 1 mM e NaNO₃ 0.15 M a pH=10, spettri acquisiti dopo diverse condizioni (a., b.); solvente H₂O 90% e D₂O 10%, spettri acquisiti a 298 K, per il trattamento del campione prima della misurazione vedere Tabella 9.

Numero spettro	рН	composizione	Trattamento prima dell'acquisizione
		CB-TE2S 1 mM	Campione tenuto per 72 h a
39.a	10.22	AgNO₃ 1 mM	temperatura ambiente,
		NaNO₃ 0.15 M	successivamente scaldato per 72 h
		CB-TE2S 1 mM	
39.b	10.22	AgNO₃ 1 mM	_
		NaNO₃ 0.15 M	
20 -	10	CB-TE2S 1 mM	
39.0	10	NaNO₃ 0.15 M	—

Tabella 9 Descrizione, per ciascuno spettro acquisito (cfr. Figura 42), del pH e del trattamento dei campioni prima dell'acquisizione degli spettri.

5.4.3 Spettri NMR di soluzioni contenenti CB-TE2S e Hg²⁺

Sono stati raccolti diversi spettri di soluzioni di CB-TE2S e Hg²⁺ entrambi alla concentrazione 1 mM e a diversi pH. Una selezione di questi spettri è mostrata in Figura 43. Gli spettri a pH inferiori di 2 sono risultati uguali tra loro, e diversi

da quelli del legante libero, indicando la formazione quantitativa di un complesso. Tra pH 2 e 3 i segnali si spostano, e appare un nuovo segnale che è al *chemical shift* del legante libero. Da pH = 3 in su il nuovo segnale sparisce, e restano solo i segnali del complesso.



Figura 43 Spettri ¹H-NMR 400 MHz di campioni contenenti CB-TE2S e HgNO₃ entrambi a concentrazione 1 mM a diversi pH in presenza di NaNO₃ 0.15 M; il solvente è H₂O 90% e D₂O 10%, gli spettri sono stati acquisiti a 298 K.

Si può ipotizzare che Hg²⁺ e CB-TE2S formino un complesso protonato a pH molto acidi (inferiori a 2), e poi che tale complesso deprotoni per dare una specie deprotonata a pH maggiori di circa 3. Non è invece chiaro cosa accade tra pH 2 e 3. Per approfondire la questione, sono stati acquisiti degli spettri dopo aver scaldato i campioni da uno a quattordici giorni, per verificare se vi fossero effetti dovuti a cinetiche lente, e sono stati preparati nuovi campioni con un rapporto legante : metallo diverso da uno, per verificare se i complessi che si formano hanno questa stechiometria. Tuttavia, i dati ottenuti non mostrano né particolari effetti cinetici, né stechiometrie metallo:legante diverse da 1:1 (dati non mostrati).

5.5 Spettrofotometria UV-Vis

5.5.1 Cinetiche di formazione dei complessi tra Cu²⁺e CB-TE2S

L'obiettivo dello studio cinetico da noi condotto non è quello di determinare costanti cinetiche, bensì di valutare il tempo richiesto dal sistema per raggiungere l'equilibrio. Ciò è necessario perché le misure delle costanti di equilibrio devono essere condotte quando il sistema è all'equilibrio.

La Figura 44 riporta gli spettri in funzione del tempo (72 h a temperatura ambiente) di una miscela tra Cu^{2+} e CB-TE2S. Si può notare come gli spettri siano identici tra loro e, sulla base di misurazioni effettuate successivamente, siano identici allo spettro del legante libero. In altre parole, a pH = 2 la reazione di complessamento raggiunge l'equilibrio in tempi molto più lunghi di 72 h.



Figura 44 Spettri di assorbimento di una soluzione contenente CB-TE2S e CuCl₂ alle concentrazioni di 1 mM e a pH = 2; acquisizioni avvenute ogni 30 min per 72 h.

Scaldando le soluzioni a 80 °C, invece (Figura 45), si è osservata l'apparizione di una nuova banda attorno a 350 nm, attribuibile al complesso rameico. La Figura 46 evidenzia l'andamento temporale misurato per λ =345.99 nm. La Figura 47 dimostra che a pH = 2 si ha un certo grado di complessamento anche a temperatura ambiente, ma solo dopo molti giorni.



Figura 45 Spettri di assorbimento delle soluzioni di cui alla Figura 44, ma poste a scaldare a 80 °C per il numero di ore indicato in Figura.



Figura 46 Cinetica di formazione del complesso metallo-legante a pH=2 *dopo riscaldamento.*



Figura 47 Misurazione dell'assorbanza a 350 nm di miscele contenenti Cu²⁺ e CB-TE2S a distanza di 23 giorni a temperatura ambiente dopo la preparazione della soluzione.

La Figura 49 mostra che la cinetica della reazione di complessamento è decisamente più rapida a pH = 4.5 (Figura 48), in quanto a temperatura ambiente essa va a completezza in circa 500 min (Figura 49). A pH = 7 (Figura 50) la reazione è ancora più rapida, e l'equilibrio viene raggiunto dopo circa dieci minuti (Figura 51).



Figura 48 Spettri di assorbimento di una soluzione contenente CB-TE2S e CuCl₂ alle concentrazioni di 1 mM e a pH = 4.5; acquisizioni avvenute ogni 15 min per 17 h.



Figura 49 Andamento dell'Assorbanza a 345 nm in funzione del tempo a pH=4.5 (cfr. Figura 48).



Figura 50 Spettri di assorbimento di una soluzione contenente CB-TE2S e CuCl₂ alle concentrazioni di 1 mM e a pH = 7; acquisizioni avvenute ogni 30 sec per 45 min.



Figura 51 Andamento dell'Assorbanza a 350 nm in funzione del tempo a pH=7 (cfr. Figura 50).

Se si confrontano le assorbanze ai vari pH, si deduce che a pH 4.5 e a pH 7 si forma il medesimo complesso. Se a pH = 2 il complesso è lo stesso, i valori di assorbanza ottenuti indicano che a questo pH la formazione del complesso ha luogo per circa il 60 %.

In tutti gli spettri compare una banda a λ =345-350 nm data dal trasferimento di carica metallo-legante. Inoltre, negli spettri acquisiti a pH=7 è osservabile un punto isosbestico¹⁵ a λ =270 nm, dato dalla presenza del legante libero e del legante legato in equilibrio tra loro. Questa peculiarità non è presente agli altri pH perché in questo caso il legante presenta un diverso stato di protonazione; infatti, si è a un pH maggiore della pK_a di 6.65, e quindi il legante è in forma prevalente HL invece che H₂L.

5.5.2 Instabilità di CB-TE2S

Durante le misure sperimentali, in particolare quelle potenziometriche ed NMR, si è evidenziata la presenza di impurezze nel prodotto sintetizzato CB-TE2S. Tali impurezze erano inattese, in quanto il prodotto aveva mostrato di essere puro

¹⁵ Un punto isosbestico è definito come un punto generato da due specie in equilibrio tra loro, in cui, per esempio in uno spettro UV-Vis, l'assorbanza misurata a una determinata λ è indipendente dal loro rapporto molare.

durante la fase di caratterizzazione condotta mediante NMR e massa al termine della sintesi [1].

È stato quindi deciso di eseguire ulteriori spettri di massa del prodotto. Uno di questi è mostrato in Figura 52. Si osserva la presenza di due segnali principali: quello a $\frac{m}{z} = 375.4$ è attribuibile a CB-TE2S, mentre quelloa $\frac{m}{z} = 435.3$ è invece un'impurezza che contiene gli stessi atomi di CB-TE2S con in aggiunta un atomo di zolfo, due di carbonio e quattro di idrogeno (presumibilmente la catena SCH₂CH₂).

Sono stati quindi ripresi i dati del lavoro di tesi precedente [1]. In quel caso gli spettri di caratterizzazione sono stati ottenuti a pH neutro e/o basico, mentre nel nostro caso (come per lo spettro di Figura 52 e per altri spettri analoghi) si è lavorato a pH acido. Sulla base di ciò, si è ipotizzato che CB-TE2S sia instabile a pH acido, e si trasformi parzialmente in un altro composto che tuttavia non è stato possibile identificare.

La presenza di questa impurezza a pH acido può spiegare i risultati ottenuti con potenziometria e con spettroscopia NMR. In tutti i casi, infatti, le soluzioni sono state inizialmente portate a pH acido, dove l'impurezza potrebbe formarsi. Tale impurezza potrebbe quindi essere responsabile della mancata convergenza dei fitting dei dati potenziometrici, e degli strani segnali osservati negli spettri NMR.

Inoltre, se è vero che l'impurezza si forma a pH acidi, allora anche le misure spettrofotometriche vengono invalidate, perlomeno per quanto riguarda la determinazione della costante di equilibrio. Infatti, la determinazione delle costanti di equilibrio di un complesso metallo-legante richiede di ottenere dati anche a pH acidi, cioè dove il complesso non si forma in maniera quantitativa, ma in queste condizioni è presente anche l'impurezza. Pertanto, si è deciso di determinare le costanti di stabilità del complesso tra Cu²⁺ e CB-TE4S utilizzando un metodo indiretto per evitare di dover lavorare a pH acidi.



Figura 52 Spettro di massa di CB-TE2S pH=1.6, l'eluente usato è stato MeOH/H⁺; il picco con $\frac{m}{z}$ =375.4 è attribuito a CB-TE2S, mentre quello a $\frac{m}{z}$ =435.3 è relativo all'impurezza.

5.5.3 Determinazione delle costanti di complessamento di Cu²⁺ con CB-TE2S

Per determinare le costanti di complessamento di Cu²⁺ con CB-TE2S si è proceduto tramite misure di competizione col DOTA, cioè valutando la costante della reazione di scambio tra CB-TE2S e il complesso CuDOTA a pH basici (maggiori di 10).

Gli spettri dei campioni sono stati misurati subito dopo la loro preparazione, dopo 30 minuti di riscaldamento e dopo 1 ora totale di riscaldamento, per evidenziare la presenza di eventuali cinetiche per la reazione di scambio. I risultati ottenuti (assorbanza in funzione del rapporto tra le moli di CB-TE2S e DOTA dopo un'ora di riscaldamento) sono riportati in Figura 53.

Dall'ottimizzazione dell'equazione di *fitting* si è ricavata la costante di complessamento condizionale, pari a $\log \beta'_{CB-TE2S} = 23.7 \pm 1.0$.

Si può notare che l'errore è piuttosto alto, e ciò è da attribuirsi al fatto che le misure indirette presentano incertezze maggiori rispetto alle misure dirette. Il dato più significativo è comunque rappresentato dal valore di per sé, che è molto elevato, e decisamente più elevato (circa due ordini di grandezza) rispetto alla costante del complesso CuDOTA.



Figura 53 Rappresentazione dei dati di assorbanza raccolti dopo un'ora di riscaldamento in funzione del rapporto tra le moli di CB-TE2S e DOTA.

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Questo progetto di tesi si poneva l'obiettivo di sintetizzare e caratterizzare due nuovi chelanti azamacrocicilici rigidificati utilizzabili in terapia radiofarmaceutica.

Le molecole considerate, CB-DO2S e CB-TE2S, si basano su strutture di leganti già studiati e noti dalla letteratura, il *cyclen* e il *cyclam*, ma in questo caso si ha l'introduzione di un ponte etilenico che rigidifica lo *scaffold* e favorisce la formazione di complessi più stabili e inerti rispetto a quelli ottenuti con i derivati senza *cross-bridge*.

La sintesi di CB-DO2S era stata tentata senza successo in un lavoro di tesi precedente a questo. Il passaggio sintetico critico era rappresentato da una riduzione con idrogeno. Qui, pertanto, si è previsto di intervenire su questo passaggio, mediante l'implementazione di un reattore che permettesse di raggiungere pressioni di idrogeno e temperature più elevate, rispetto a quelle utilizzate in precedenza. Tuttavia, malgrado tutti i tentativi attuati, la molecola non è stata ottenuta.

Lo studio di CB-TE2S è avvenuto tramite tecniche potenziometriche, di spettroscopia NMR e di spettrofotometria UV-Vis, e prevedeva di determinare le costanti di acidità del legante e quelle di complessamento metallo-legante con Ag⁺, Hg²⁺ e Cu²⁺. Durante il lavoro di tesi, si è gradualmente notata la presenza di un'importante impurezza, certificata da una serie di spettri di massa ottenuti a vari pH. Tale impurezza, non presente né negli spettri ottenuti in fase di caratterizzazione (lavoro di tesi precedente [1]), né in quelli ottenuti durante questo lavoro a pH basico, si forma presumibilmente a pH acido. Ciò rende più incerti, o non determinabili, i dati quantitativi di soluzioni a pH acidi, come quelle analizzate nelle fasi iniziali e centrali di questo lavoro.

Sono state innanzitutto ottenute le caratteristiche acido-base del legante, e in particolare è stato determinato il valore di una p K_a , probabilmente della p K_{a3} . Tali risultati sono stati ottenuti mediante NMR, in quanto le titolazioni potenziometriche hanno risentito della presenza dell'impurezza e i loro dati non sono stati elaborabili.
Successivamente sono stati ottenuti spettri NMR dei complessi con Ag⁺ e Hg²⁺. Nel primo caso, i segnali dei complessi sono stati accompagnati da altri segnali attribuibili all'impurezza, e non è stato possibile ottenere nessun dato utile. Nel secondo caso, presumibilmente l'impurezza non ha interferito, tranne probabilmente a pH compresi tra 2 e 3 dove il comportamento osservato da parte della miscela è stato anomalo. In generale, mentre Ag⁺ sembra formare complessi deboli con CB-TE2S, i complessi formati con Hg²⁺ appaiono estremamente stabili.

Successivamente è stato avviato lo studio dei complessi tra CB-TE2S e Cu²⁺, iniziando con la valutazione della cinetica di formazione. La velocità della reazione dipende fortemente dal pH, risultando estremamente lenta a pH = 2, e accelerando vistosamente al crescere della basicità.

Infine, per evitare di dover lavorare a pH acidi, la costante della reazione di complessamento tra Cu²⁺ e CB-TE2S è stata ottenuta per via indiretta, mediante competizione col DOTA a pH basico. Il valore ottenuto è incerto, ma indica la grande stabilità del complesso rameico.

Le prospettive future comprendono la messa appunto di una via sintetica meno costosa e più quantitativa per ottenere CB-TE2S, e lo studio della sua stabilità, con particolare riferimento all'intervallo di pH in cui il composto è stabile. Se, infatti, il composto fosse instabile solo a pH molto acidi (nei dintorni di 2, o minori), CB-TE2S potrebbe essere utilizzabile a scopo radiofarmaceutico, anche in considerazione dei promettenti dati finora ottenuti che suggeriscono una elevatissima stabilità sia dei complessi con Hg²⁺ che di quelli con Cu²⁺.

CAPITOLO 7

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI E SITOGRAFICI

- [1] S. Pozzo, Sintesi di nuovi chelanti azamacrociclici rigidificati impiegabili nella terapia mirata con Argento-111, Padova: tesi di laurea, 2022.
- [2] T. I. Kostelnik e C. Orvig, «Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy,» *Chemical Reviews*, vol. 119, pp. 902-956, 2019.
- [3] M. University, «McMaster University Cyclotron Facility,» [Online]. Available: https://nuclear.mcmaster.ca/facilities-equipment/facilitylist/mcmaster-university-cyclotron-facility/.
- [4] T. J. Wadas, E. H. Wong, G. R. Weisman e C. J. Anderson, «Coordinating Radiometals of Copper, Gallium, Indium, Yttrium, and Zirconium for PET and SPECT Imaging of Disease,» *Chemical Reviews*, vol. 110, pp. 2858-2902, 2010.
- [5] N. C. Okoye, J. E. Baumeister, F. N. Khosroshahi, H. M. Hennkens e S. S. Jurisson, «Chelators and metal complex stability for radiopharmaceutical application,» *Radiochim. Acta*, pp. 1-34, 2019.
- [6] M. Tosato, M. Asti, M. Dalla Tiezza, L. Orian, D. Häussinger, R. Vogel, U. Köster, A. A. Jensen, P. Pastore e V. Di Marco, «Highly stable Silver(I) Complexes with Cyclen-Based Ligands Bearing Sulfide Arms: A step TOward Silver-111 Labeled Radiopharmaceuticals,» *Inorganic Chemistry*, vol. 59, pp. 10907-10919, 2020.
- [7] S. Franchi, Studio della formazione di complessi di Ag(I) e Cd(II) con derivati solforati di poliazacicloalcani (Progetto ISOLPHARM), Padova: tesi di laurea, 2021.
- [8] E. Boros, B. V. Marquez, O. F. Ikotun, S. E. Lapi e C. L. Ferreira, «Coordination Chemistry and Ligand Design in the Development of Metal Based Radiopharmaceuticals,» in *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*, Tim Storr, 2014, pp. 47-79.

- [9] J. R. Nedrow e C. J. Anderson, «Emerging Radiometals for PET imaging,» Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry, pp. 1-11, 2016.
- [1 C. F. Ramogida e C. Orvig, «Tumor targeting with radiometals for diagnosis
- 0] and therapy,» *ChemComm*, vol. 49, pp. 4720-4739, 2013.
- [1 D. L. Bailey, J. L. Humm, A. Todd-Pokropek e A. Van Aswegen, Nuclear
- 1] Medicine Physics. A Handbook for teachers and students., Austria: IAEA, 2014.
- [1 M. G. Ferrier, V. Radchenko e S. Wilbur, «Radiochemical aspects of alpha
- 2] emitting radionuclides for medical application,» *Radiochim. Acta*, vol. 107, pp. 1065-1085, 2019.
- [1 D. Matsakis, A. Coster, B. Laster e R. Sime, «A renaming proposal: "The
- 3] Auger-Meitner effect",» *Physics today*, vol. 72, pp. 10-11, 2019.
- [1 H. Mahnke, «Lise Meitner, β -decay and non-radiative electromagnetic
- 4] transitions,» *Notes Rec.*, pp. 1-9, 2020.
- [1 R. Freudenberg, R. Apolle, M. Walther, H. Hartmann e J. Kotzerke,
- 5] «Molecular imaging using the theranostic agent Hg-197(m): phantom measurements and Monte Carlo simulation,» *EJNMMI Physics*, pp. 1-14, 2018.
- [1 M. Pelosato, Complessi di Cu(II) e Cu(I) con Derivati Solforati di
- 6] Poliazamacrocicli Aventi Interesse Radiofarmaceutico (Progetto ISOLPHARM), Padova: tesi di laurea, 2021.
- [1 E. W. Price e C. Orvig, «The chemistry of inorganic nuclides (Y-86, Ga-68,
- 7] Cu-64, Zr-89, I-124),» in *The Chemistry of Molecular Imaging*, Jhon Wiley & Sons, Inc., 2015, pp. 105-135.
- [1 M. Tosato, M. Dalla Tiezza, N. V. May, A. A. Isse, S. Nardella, L. Orian, M.
- 8] Verona, C. Vaccarin, A. Alker, H. Mäcke, P. Pastore e V. Di Marco, «Copper Coordination Chemistry of Sulfur Pendant Cyclen Derivatives: An Attempt to Hinder the Reductive-Induced Demetalation in Cu-64/67 Radiopharmaceuticals,» *Inorganic Chemistry*, vol. 60, pp. 11530-11547, 2021.

- [1 A. Andrighetto, M. Tosato, M. Ballan, S. Corradetti, F. Borgna, V. Di Marco,
- 9] G. Marzaro e N. Realdon, «The ISOLPHARM project: ISOL-based production of radionuclides for medical applications,» *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, vol. 322, pp. 73-77, 2019.
- [2 «Macrocyclics,» [Online]. Available: https://www.macrocyclics.com/online-
- 0] catalog/macrocyclic-ligands/do2a/.
- [2 L. Lazzari, Coordinazione tra piombo(II) e poliazamacrocicli solforati:
- 1] complessi per potenziali radiofarmaci a base di Pb-203/212, Padova: tesi di laurea, 2021.
- [2 A. Valero, A. Valero, G. Calvo e A. Ortego, «Material bottlenecks in the
- 2] future development of green technologies,» *Renewable and Sustainable Energy Reviews,* vol. 93, pp. 178-200, 2018.
- [2 F. Gu, P. A. Summers e P. Hall, «Recovering materials from waste mobile
- 3] phones: Recent technological developments,» *Journal of Cleaner Production,* vol. 117657, 2019.
- [2 M. Tosato, Macrocyclic Ligands for the Chelation of Theranostic
- 4] Radiometals, Padova: tesi di dottorato, 2022.
- [2 V. Di Marco, Studio della formazione di complessi tra Alluminio e molecole
- 5] di interesse ambientale, biologico e farmaceutico, Padova: tesi di dottorato, 1997.
- [2 «Risonanza Magnetica Nucleare (NMR),» [Online]. Available:
- 6] https://dscf.units.it/it/servizi-strumenti/strumenti/Risonanza-Magnetica-Nucleare-%28NMR%29.
- [2 «Water suppression,» [Online]. Available:
- 7] https://nmr.chem.columbia.edu/content/water-suppression.
- [2 G. Marzaro, Laboratorio di preparazione estrattiva e sintesi dei farmaci,
- 8] Padova: Dispense di lezione, 2020.
- [2 I. Fontana, «DIFFERBETWEEN,» [Online]. Available:
- 9] https://it.differbetween.com/article/difference_between_absorptivity_an d_molar_absorptivity.

- [3 G. Anderegg, F. Arnaud, R. Delgado, K. Popov e e. al., «Critical evaluation of
- 0] stability constants of metal complexes of complexones for biomedical and enviromental applications,» *Pure and Applied Chemistry,* vol. 77, n. 8, p. 1445–1495, 2005.
- [3 A. Del Vecchio, Studio della formazione di complessi di 1,4,7-tris[2-
- 1] (metilsulfanil)etil]-1,4,7-triazaciclononano con Ag (I), Cu(II) e Cu (I), Padova: tesi di laurea, 2021.
- [3 «Spettroscopia UV-Visibile,» [Online]. Available: https://didattica-
- 2] 2000.archived.uniroma2.it/MA2/deposito/spettroscopia_UV.pdf.
- [3 N. Weijun, E. H. Wong, G. R. Weisman, D. C. Hill, D. J. Tranchemontagne, K.
- 3] Lam, R. D. Sommer, L. N. Zakharov e A. L. Rheingold, «Inside or outside a ligand cleft? Synthetic, structural, and kinetic inertness studies of zinc, cadmium, and mercury complexes of cross-bridged cyclam and cyclen,» *Dalton Trans.*, vol. 10.1039, pp. 3536-3547, 2004.
- [3 A. Rodríguez-Rodríguez, M. Regueiro-Figueroa, D. Esteban-Gómez, R.
- 4] Tripier, G. Tircsó, F. Krisztián Kálmán, A. Csaba Bényei, I. Tóth, A. de Blas, T. Rodríguez-Blas e C. Platas-Iglesias, «Complexation of Ln3+ Ions with Cyclam Dipicolinates: A Small Bridge that Makes Huge Differences in Structure, Equilibrium, and Kinetic Properties,» *Inorg. Chem.*, vol. 55, pp. 2227-2239, 2016.
- [3 R. C. Knighton, L. K. Soro, T. Troadec, V. Mazan, A. M. Nonat, M. Elhabiri, N.
- 5] Saffon-Merceron, S. Djenad, R. Tripier e L. J. Charbonnière, «Formation of Heteropolynuclear Lanthanide Complexes Using Macrocyclic Phosphonated Cyclam-Based Ligands,» *Inorg. Chem,* vol. 59, pp. 10311-10327, 2020.
- [3 M. Tosato, M. Verona, M. Doro, M. Dalla Tiezza, L. Orian, A. Andrighetto, P.
- 6] Pastore, G. Marzaro e V. Di Marco, «Toward novel sulphur-containing derivatives of tetraazacyclododecane: synthesis, acid–base properties, spectroscopic characterization, DFT calculations, and cadmium(II) complex formation in aqueous solution,» *New J. Chem.*, vol. 44, pp. 8337-8350, 2020.
- [3 R. D. Hancock, P. W. Wade, M. P. Ngwenya, A. S. de Sousa e K. V. Damu,
- 7] «Ligand Design for Complexation in Aqueous Solution. 2. Chelate Ring Size

as a Basis for Control of Size-Based Selectivity for Metal Ions,» *Inorg. Chem.,* vol. 29, n. 10, pp. 1968-1974, 1990.

- [3 «Macrocyclics,» [Online]. Available: https://www.macrocyclics.com/online-
- 8] catalog/macrocyclic-ligands/cb-cyclam/.

Ringraziamenti

Ringrazio per il raggiungimento di questo traguardo la mia famiglia, il mio fidanzato e i miei amici per i supporto, il professor Di Marco, la dottoressa Marianna Tosato e il dottor Giordano Zanoni per la preziosa guida, e le dottoresse Silvia Pozzo, Sara Franchi e Malwina Gabryel-Skrodzka per le conoscenze che mi hanno saputo trasmettere.

Importante è stato anche il supporto da parte dei colleghi della farmacia Bressan, della dottoressa Lidia Soldà e dei ragazzi del laboratorio di organica del professor Mancin.