

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

**FORMAZIONE DI COMPLESSI TRA BARIO (II) E CHELANTI  
MACROCICLICI DI INTERESSE RADIOFARMACEUTICO**

RELATORE: PROF. VALERIO DI MARCO

CORRELATRICE: DOTT.SSA SARA FRANCHI

LAUREANDA: FRANCESCA VOLPATO

ANNO ACCADEMICO 2023/2024



# INDICE

ABBREVIAZIONI.....	VII
RIASSUNTO.....	IX
ABSTRACT.....	XI
CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE.....	1
1.1 NOZIONI DI FISICA NUCLEARE.....	2
1.1.1 STRUTTURA NUCLEARE.....	2
1.1.2 DECADIMENTI NUCLEARI.....	3
1.1.2.1 Decadimento $\alpha$ .....	5
1.1.2.2 Decadimenti $\beta$ .....	5
1.1.2.3 Decadimento $\gamma$ e conversione interna.....	6
1.2 RADIOFARMACI.....	7
1.2.1 PROGETTAZIONE DI RADIOFARMACI.....	8
1.2.1.1 Radionuclide.....	9
1.2.1.2 Chelante bifunzionale.....	10
1.2.1.3 <i>Linker</i> .....	13
1.2.1.4 Biomolecola direzionante.....	13
1.2.2 RADIOFARMACI DIAGNOSTICI.....	15
1.2.3 RADIOFARMACI TERAPEUTICI.....	17
1.2.4 RADIOFARMACI TERANOSTICI.....	19
1.3 RADIO-223 IN MEDICINA NUCLEARE.....	20
1.3.1 $^{223}\text{Ra}$ COME EMETTITORE $\alpha$ .....	20
1.3.2 CHELANTI PER IL $^{223}\text{Ra}$ .....	23
CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI.....	29
CAPITOLO 3 – STUDIO DEGLI EQUILIBRI DI COMPLESSAMENTO.....	32
3.1 POTENZIOMETRIA.....	32
3.1.1 ELETTRODO DI VETRO.....	33
3.1.2 CONTROLLO DELLA FORZA IONICA.....	34
3.1.3 DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI DI COMPLESSAMENTO.....	35
3.1.3.1 Elaborazione dei dati potenziometrici.....	37
3.1.3.2 Valutazione della bontà del <i>fitting</i> .....	38
3.1.3.3 Il problema dei “falsi minimi”.....	39

3.1.3.4 Scelta del modello di speciazione.....	39
3.1.4 INFLUENZA DELL'AMBIENTE ESTERNO.....	40
3.1.5 LIMITI DELLA POTENZIOMETRIA.....	40
3.2 SPETTROSCOPIA NMR.....	41
3.2.1 PRINCIPI TEORICI DELLA SPETTROSCOPIA NMR.....	41
3.2.2 <sup>1</sup> H-NMR.....	43
3.2.3 TECNICHE BIDIMENSIONALI: TOCSY E HSQC.....	45
3.2.4 DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI DI COMPLESSAMENTO.....	45
3.2.4.1 Elaborazione dei dati <sup>1</sup> H-NMR tramite il <i>software Origin</i> .....	46
3.2.5 VANTAGGI E LIMITI DELLA SPETTROSCOPIA NMR.....	46
3.3 SPETTROFOTOMETRIA UV-Vis.....	47
3.3.1 PRINCIPI TEORICI DELL'ASSORBIMENTO UV-Vis.....	47
3.3.2 DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI DI COMPLESSAMENTO.....	48
3.3.3 VANTAGGI E LIMITI DELLA SPETTROFOTOMETRIA UV-Vis.....	49
CAPITOLO 4 – PARTE SPERIMENTALE.....	50
4.1 STRUMENTAZIONE.....	50
4.2 REAGENTI.....	50
4.3 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI.....	51
4.3.1 SOLUZIONI DEI LEGANTI E DI Ba <sup>2+</sup> .....	51
4.3.2 SOLUZIONI DI TITOLANTE PER LE MISURE POTENZIOMETRICHE.....	52
4.3.3 SOLUZIONI PER LE SPETTROSCOPIE NMR E UV-Vis.....	53
4.4 PROCEDURE SPERIMENTALI.....	54
4.4.1 PROCEDURE SPERIMENTALI PER LE TITOLAZIONI POTENZIOMETRICHE.....	54
4.4.1.1 Strumentazione.....	54
4.4.1.2 Standardizzazione della soluzione di HCl.....	55
4.4.1.3 Calibrazione dell'elettrodo di vetro.....	56
4.4.1.4 Standardizzazione delle soluzioni di NaOH.....	56
4.4.1.5 Titolazioni delle soluzioni di legante.....	57
4.4.1.6 Titolazioni delle miscele Ba <sup>2+</sup> -legante.....	57
4.4.1.7 Conservazione dell'elettrodo.....	58
4.4.2 PROCEDURE SPERIMENTALI PER LA SPETTROSCOPIA NMR.....	58
4.4.3 PROCEDURE SPERIMENTALI PER LA SPETTROFOTOMETRIA UV-Vis.....	59
CAPITOLO 5 – RISULTATI E DISCUSSIONE.....	60

5.1 STANDARDIZZAZIONI DEI TITOLANTI PER LA POTENZIOMETRIA.....	60
5.1.1 STANDARDIZZAZIONE DI HCl.....	60
5.1.2 CALIBRAZIONE DELL'ELETTRODO DI VETRO.....	61
5.1.3 STANDARDIZZAZIONE DI NaOH.....	62
5.2 CARATTERIZZAZIONE DEL LEGANTE MACROCAT.....	63
5.2.1 COSTANTI DI ACIDITÀ DEL MACROCAT.....	63
5.2.1.1 Potenziometria.....	64
5.2.1.2 Spettroscopia NMR.....	66
5.2.1.3 Spettrofotometria UV-Vis.....	70
5.2.1.4 Diagramma di distribuzione.....	71
5.2.2 COSTANTI DI COMPLESSAMENTO Ba <sup>2+</sup> -MACROCAT.....	71
5.2.2.1 Valutazione qualitativa della cinetica di complessamento.....	72
5.2.2.2 Potenziometria.....	72
5.2.2.3 Spettroscopia NMR.....	74
5.2.2.4 Diagramma di distribuzione e calcolo del pM.....	76
5.3 CARATTERIZZAZIONE DEL LEGANTE ODDM.....	77
5.3.1 COSTANTI DI ACIDITÀ DELL'ODDM.....	77
5.3.1.1 Potenziometria.....	78
5.3.1.2 Spettroscopia NMR.....	79
5.3.1.3 Diaframma di distribuzione.....	82
5.3.2 DECARBOSSILAZIONE DELL'ODDM.....	83
5.3.3 COSTANTI DI COMPLESSAMENTO Ba <sup>2+</sup> -ODDM.....	87
5.3.3.1 Valutazione qualitativa della cinetica di complessamento.....	87
5.3.3.2 Spettroscopia NMR.....	88
5.3.3.3 Diagramma di distribuzione e calcolo del pM.....	92
5.4 CARATTERIZZAZIONE DEL LEGANTE macroHOPO.....	93
5.4.1 COSTANTI DI ACIDITÀ DEL macroHOPO.....	94
5.4.1.1 Potenziometria.....	94
5.4.1.2 Spettroscopia NMR.....	95
5.4.1.3 Diagramma di distribuzione.....	98
5.4.2 COSTANTI DI COMPLESSAMENTO Ba <sup>2+</sup> -macroHOPO.....	98
5.4.2.1 Potenziometria.....	98
5.4.2.2 Spettroscopia NMR.....	99
5.4.2.3 Diagramma di distribuzione e calcolo del pM.....	102

CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI.....	104
BIBLIOGRAFIA.....	108

## ABBREVIAZIONI

<i>A</i>	Numero di massa
BFC	<i>Bifunctional chelator</i>
BM	<i>Targeting biomolecule</i>
DEPT-135	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DOTA	Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico
DTPA	Acido dietilentriamminopentaacetico
EC	Cattura elettronica
EDTA	Acido etilendiamminotetraacetico
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDG	2-fluorodeossiglucosio
f.e.m.	Forza elettromotrice
FID	<i>Free Induction Decay</i>
HSAB	<i>Hard and Soft Acids and Bases theory</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
LET	<i>Linear Energy Transfer</i>
mAb	Anticorpi monoclonali
<i>N</i>	Numero di neutroni
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
RPT	<i>Radiopharmaceutical Therapy</i>
RSS	<i>Residual Sum of Squares</i>
SPECT	<i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>

TAT	<i>Targeted Alpha Therapy</i>
TRT	<i>Targeted Radionuclide Therapy</i>
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TSP	Sale sodico dell'acido trimetilsilico propionico
Z	Numero atomico
1,2-HOPO	2-idrossipiridina-1-ossido
2,3-HOPO	3-idrossi-2-piridone
d	doppietto
m	multipletto
t	tripletto

## RIASSUNTO

La Radiopharmaceutical Therapy (RPT) è un approccio terapeutico emergente per il trattamento di diverse forme di cancro. Diversamente dalla più tradizionale radioterapia, la radiazione citotossica non penetra l'organismo attraverso fasci esterni, ma viene veicolata nelle cellule tumorali o nel loro microambiente mediante la somministrazione di un farmaco. Quest'ultimo permette l'accumulo di un radionuclide terapeutico nel sito tumorale attraverso meccanismi fisiologici, oppure mediante un opportuno sistema di *delivery* selettivo per il sito bersaglio.

I radionuclidi definiti emettitori  $\alpha$  possono essere sfruttati per eradicare cellule maligne, in quanto l'emissione di particelle  $\alpha$  dovuta al loro decadimento provoca la rottura di entrambi i filamenti di DNA all'interno di un raggio d'azione di alcuni diametri cellulari.

Il  $^{223}\text{Ra}$  è un emettitore  $\alpha$  impiegato da circa un decennio come cloruro di radio ( $^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ ) nella terapia palliativa di metastasi ossee sintomatiche in pazienti colpiti da tumore prostatico resistente alla castrazione. Il successo clinico di questo radiofarmaco, commercializzato con il nome Xofigo<sup>®</sup>, ha stimolato l'interesse della ricerca per l'applicazione del  $^{223}\text{Ra}$  nel trattamento di altre forme di cancro. Lo sviluppo di radiofarmaci a base di  $^{223}\text{Ra}$  per la terapia di tumori non ossei prevede l'impiego di un opportuno sistema di *drug delivery*, con il quale è possibile indirizzare il radionuclide ad esso incorporato verso uno specifico sito *target* nell'organismo ed evitarne il rilascio *in vivo*. A tale scopo, la struttura del radiofarmaco deve includere un opportuno chelante bifunzionale in grado di complessare efficacemente il  $^{223}\text{Ra}]\text{Ra}^{2+}$ , un *linker* e una molecola direzionante.

Gli studi condotti fino ad oggi sulla ricerca di potenziali chelanti per il complessamento del  $\text{Ra}^{2+}$  hanno portato solamente dei successi limitati, principalmente a causa della inadeguatezza termodinamica e/o cinetica dei chelanti attualmente conosciuti per tale ione metallico. Per ottenere dei complessi del  $\text{Ra}^{2+}$  che risultino termodinamicamente stabili e cineticamente inerti nelle condizioni di impiego del radiofarmaco sono dunque necessari ulteriori studi che, indagando le proprietà complessanti di altri agenti chelanti, permettano di individuare quello più promettente. Poiché tutti gli isotopi del  $\text{Ra}^{2+}$  sono instabili, la caratterizzazione dei complessi metallo-chelante viene inizialmente condotta utilizzando come sostituto non radioattivo il  $\text{Ba}^{2+}$ .

Nel presente lavoro di tesi sono stati studiati gli equilibri di complessamento nei confronti del  $\text{Ba}^{2+}$  di tre chelanti macrociclici, nei quali la molecola che funge da anello centrale (Kryptofix 22) è doppiamente funzionalizzata con un diverso legante bidentato. I sostituenti bidentati che caratterizzano ciascun chelante sono stati selezionati sulla base dei risultati ottenuti in un precedente lavoro di tesi, in cui è stata studiata la chimica di coordinazione del  $\text{Ba}^{2+}$  con diversi leganti, al fine

di determinare quali di questi formano le interazioni più stabili con lo ione metallico. La caratterizzazione dei complessi Ba<sup>2+</sup>-chelante è stata condotta mediante opportune analisi potenziometriche e di spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR, con l'obiettivo di determinare le costanti di formazione ( $\log\beta$ ) dei complessi. Poiché la formazione dei complessi metallo-legante è influenzata dalla competizione con gli equilibri acido-base del chelante, in una prima fase del presente lavoro sono state determinate (sempre mediante potenziometria e spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR) le costanti di dissociazione acida ( $pK_a$ ) dei tre composti in studio, con le quali è possibile determinare l'effettiva stabilità dei complessi a pH fisiologico, ossia nelle reali condizioni d'impiego del radiofarmaco. Attraverso i risultati ottenuti in questo lavoro, i tre chelanti macrociclici sono stati comparati tra loro e con altri sistemi precedentemente caratterizzati in letteratura, al fine di valutarli in base alla loro capacità di formare complessi stabili con il catione metallico.

## ABSTRACT

Radiopharmaceutical Therapy (RPT) is an emergent therapeutic approach for the treatment of different types of cancer. Unlike more traditional radiotherapy, cytotoxic radiation does not penetrate the body through external beams, but it is delivered into cancer cells or in their microenvironment by the administration of a drug. The latter allows the accumulation of a therapeutic radionuclide in the tumor site through physiological mechanisms, or by an appropriate delivery system selective for the target site.

Radionuclides defined as  $\alpha$  emitters can be exploited to eradicate malignant cells, since the emission of  $\alpha$  particles due to their decay can break both strands of DNA within a range of some cell diameters.

$^{223}\text{Ra}$  is an  $\alpha$  emitter used for about a decade as radium chloride ( $[\text{}^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ ) for the palliative therapy of symptomatic bone metastases in patients with castration-resistant prostate cancer. The clinical success of this radiopharmaceutical, branded as Xofigo<sup>®</sup>, has aroused the interest of the researchers in the application of  $^{223}\text{Ra}$  to treat other forms of cancer. The development of  $^{223}\text{Ra}$ -based radiopharmaceuticals for the treatment of non-osseous tumors involves the use of an appropriate drug delivery system, by which the incorporated radionuclide can be directed to a specific target site in the organism and prevented from being released *in vivo*. For this purpose, the structure of the radiopharmaceutical must include a suitable bifunctional chelator capable of effectively complexing  $[\text{}^{223}\text{Ra}]\text{Ra}^{2+}$ , a linker and a directional molecule.

The studies carried out to date on the research of potential chelating agents for  $\text{Ra}^{2+}$  complexation have had only limited success, mainly because the known radium chelators have shown unsatisfactory thermodynamic and/or kinetic properties. To achieve  $\text{Ra}^{2+}$  complexes that are both thermodynamically stable and kinetically inert while using radiopharmaceuticals, further studies are needed, with the aim of investigating the complexing properties of other chelating agents and identifying the most promising chelator. Since all the isotopes of  $\text{Ra}^{2+}$  are unstable, the characterization of metal-chelator complexes is initially carried out using non-radioactive substitute  $\text{Ba}^{2+}$ .

In this thesis work the complexation equilibria of  $\text{Ba}^{2+}$  with three macrocyclic chelating agents were studied. The structure of the three compounds consists of a central ring (Kryptofix 22) that is doubly functionalized with a different bidentate ligand. The bidentate substitutes characterizing each chelator were selected on the basis of the results obtained in a previous thesis work, in which the coordination chemistry of  $\text{Ba}^{2+}$  with different ligands has been examined, in order to determine which of these are able to form the most stable interactions with the metal ion.

The characterization of the  $\text{Ba}^{2+}$ -chelator complexes was carried out by appropriate potentiometric and  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy analyses in order to determine the formation constants ( $\log\beta$ ) of the complexes. Since the formation of complexes is influenced by competition with the acid-base equilibria of the chelator, in a first phase of this work the acid dissociation constants ( $\text{p}K_a$ ) of the three compounds under study were determined (again by potentiometry and  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy) in order to know the effective stability of the complexes at physiological pH, that is the real condition of use of the radiopharmaceutical. The results obtained in this work were used to compare the three macrocyclic chelators and other chelating agents previously characterized in the literature, in order to evaluate their ability to form stable complexes with the metal cation.

## CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

La medicina nucleare è una branca della medicina che si specializza nell'impiego di radiofarmaci, preparazioni medicinali contenenti uno o più elementi radioattivi detti radionuclidi. I radiofarmaci possono essere utilizzati a scopo diagnostico o terapeutico; in entrambi i casi l'attività farmacologica è legata all'emissione di radiazioni ionizzanti durante il decadimento degli elementi radioattivi presenti nella loro composizione.

L'impiego di un particolare radionuclide nella diagnosi (*imaging*) o nel trattamento di una condizione patologica è determinato dalla modalità di decadimento preferenziale di tale isotopo radioattivo. Le principali applicazioni cliniche dell'*imaging* nucleare riguardano l'individuazione di tumori e il monitoraggio della loro crescita, l'identificazione di disordini endocrini, cardiovascolari, neurologici e psichiatrici, il monitoraggio delle disfunzioni degli organi escretori e la localizzazione di danni tissutali. Per quanto riguarda la radioterapia nucleare, l'oncologia è il principale campo di impiego dei radiofarmaci. [1]

Nella radioterapia oncologica il radionuclide viene solitamente coniugato con una biomolecola, che funge da agente direzionante, in grado di legare specifici biomarcatori delle cellule tumorali con un'elevata affinità e specificità. Questo approccio, che prende il nome di *Targeted Radionuclide Therapy* (TRT), permette di accumulare il radiofarmaco nel tessuto malato, aumentando la dose di radiazione terapeutica trasferita alle cellule tumorali. La TRT offre pertanto dei significativi vantaggi rispetto ad approcci più tradizionali come la chemioterapia e la radioterapia a fasci esterni<sup>1</sup>: grazie alla somministrazione per via sistemica nell'organismo e il *delivery* specifico del radiofarmaco nel sito target, la TRT assicura una maggiore selettività d'azione, limita gli effetti collaterali legati all'irradiazione dei tessuti sani in prossimità della massa tumorale, e permette di veicolare il radionuclide anche in eventuali piccole e medie metastasi, che non potrebbero essere trattate con la radioterapia a fasci esterni. [1]

Un'area di ricerca che si è sviluppata più recentemente nella medicina nucleare è la radioteranostica, che combina l'attività terapeutica di un radionuclide con l'acquisizione di immagini diagnostiche e di monitoraggio della patologia da trattare; questo avviene mediante l'utilizzo di un radiofarmaco per l'*imaging* che rispecchi quanto più possibile la distribuzione *in vivo* del radiofarmaco terapeutico.

---

<sup>1</sup> Nella radioterapia a fasci esterni la radiazione ionizzante ad alta energia, generata da un acceleratore lineare, penetra nei tessuti e rilascia la dose prestabilita in una determinata area dove si localizza il tumore.

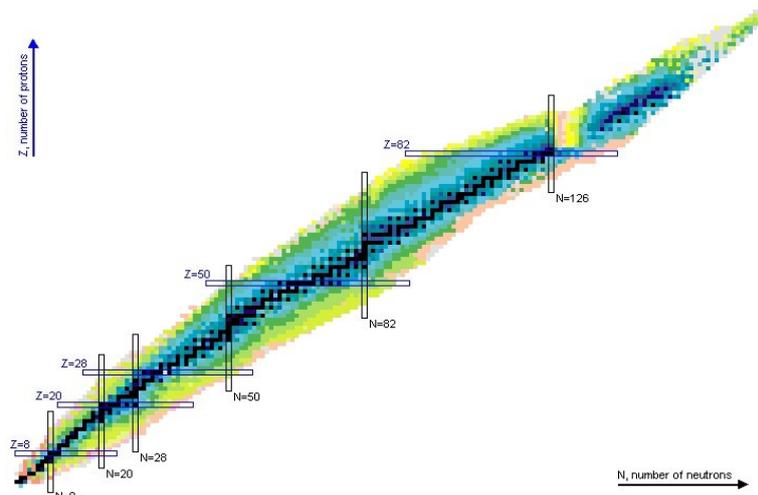
## 1.1 NOZIONI DI FISICA NUCLEARE

### 1.1.1 STRUTTURA NUCLEARE

La conoscenza delle proprietà fondamentali della struttura nucleare di un atomo permette di comprendere le possibili applicazioni della radioattività in medicina.

Un nuclide è una specie atomica caratterizzata da un numero specifico di protoni e neutroni e da un determinato stato energetico nucleare. [2] Ciascun elemento chimico è caratterizzato da un numero di protoni  $Z$ , detto numero atomico, mentre il numero di neutroni  $N$  varia in base alla specie atomica considerata. Il numero di nucleoni che costituisce un nuclide, ovvero la somma tra  $Z$  ed  $N$ , viene definito numero di massa  $A$ . Tali informazioni sulla struttura nucleare vengono inserite nella rappresentazione simbolica del nuclide  ${}^Z_A X_N$ , in cui  $X$  indica il simbolo dell'elemento chimico. Vengono definiti come isotopi specie atomiche diverse di uno stesso elemento chimico, caratterizzate quindi dallo stesso numero atomico ma da un diverso numero di neutroni. Nuclidi con diverso  $Z$  ma con uguale  $A$  vengono detti isobari; nuclidi con gli stessi numeri  $A$  e  $Z$  ma presenti in un diverso stato energetico nucleare sono invece definiti isomeri. [3]

I vari nuclidi ad oggi conosciuti sono presentati nella carta dei nuclidi (*Chart of Nuclides*, **Figura 1.1**), un grafico a due dimensioni che riporta sull'asse delle ascisse il numero di neutroni  $N$  e sull'asse delle ordinate il numero atomico  $Z$ . [3] Questo sistema di raffigurazione consente di distinguere ciascun nuclide, rappresentato mediante un riquadro colorato, sulla base della struttura nucleare che lo caratterizza. I colori dei riquadri possono essere associati a diversi valori di emivita o a diverse modalità di decadimento (queste proprietà verranno descritte nei paragrafi successivi). In radiochimica la carta dei nuclidi risulta un modello più utile rispetto alla più nota tavola periodica degli elementi, nella quale non si ha la differenziazione degli isotopi di ciascun elemento, in quanto questi possiedono lo stesso numero di protoni e il medesimo comportamento chimico; isotopi diversi, tuttavia, presentano proprietà fisiche differenti. [4]



**Figura 1.1** Carta dei nuclidi. I nuclei stabili sono indicati in nero; i nuclei instabili sono rappresentati con colori differenti sulla base della loro emivita. [5]

La stabilità dei nuclei è dovuta al bilanciamento tra le diverse interazioni che agiscono sulle particelle nucleari: la repulsione tra i protoni dovuta alla forza elettromagnetica, che agisce sulle particelle dotate di carica elettrica, e l'interazione attrattiva che si instaura tra i nucleoni dovuta alla forza nucleare forte, caratterizzata da un'intensità molto elevata entro un breve raggio d'azione ( $\sim 10^{-15}$  m). Altre interazioni di minore intensità sono la forza nucleare debole, che agisce tra le particelle elementari<sup>2</sup>, e la forza gravitazionale che, essendo di gran lunga la più debole in questo ambito, influisce in misura molto minore sulla stabilità dei nuclei rispetto alle altre forze. [3]

I nuclidi stabili si localizzano solo in una piccola zona della carta dei nuclidi chiamata valle di stabilità. I nuclei più leggeri ( $A < 40$ ) risultano stabili quando il numero di protoni risulta approssimativamente uguale al numero di neutroni ( $Z = N$ ). All'aumentare di  $Z$ , il rapporto tra  $N$  e  $Z$  nei nuclei stabili aumenta; in questo modo la maggiore repulsione dovuta all'incremento di cariche positive viene compensata con una maggiore interazione attrattiva dovuta all'aumento nel numero di neutroni. I nuclidi instabili presentano invece una combinazione di  $Z$  e  $N$  che non garantisce un corretto bilanciamento delle interazioni tra i nucleoni; essi, pertanto, subiscono dei processi di decadimento, come spiegato nei successivi paragrafi. [3], [6]

### 1.1.2 DECADIMENTI NUCLEARI

L'energia di legame nucleare globale  $E_B$  rappresenta l'energia liberata quando tutti i nucleoni che compongono il nuclide si associano a formare il nucleo. Il contributo energetico di un singolo

<sup>2</sup> L'interazione debole agisce tra quark e leptoni, tra soli leptoni oppure tra soli quark.

nucleone ( $\bar{E}_B$ ) viene calcolato dividendo l'energia di legame nucleare totale per il numero di nucleoni ( $A$ ) presenti in un dato nuclide (equazione 1.1).

$$\bar{E}_B = \frac{E_B}{A} \quad (1.1)$$

Tale parametro, che viene indicato come energia di legame nucleare media  $\bar{E}_B$ , è indicativo della stabilità di un nucleo. In natura i nuclei più stabili sono quelli per i quali  $A$  è vicino a 60 e presentano valori di  $\bar{E}_B$  maggiori di 8 MeV. [1], [3]

Il decadimento radioattivo, o decadimento nucleare, è un processo spontaneo in cui un nuclide instabile, detto genitore, si trasforma in un nuclide figlio più stabile rilasciando energia mediante l'emissione di particelle o di radiazioni elettromagnetiche. Se il nuclide figlio risulta anch'esso instabile può a sua volta decadere; il processo si ripete fino al raggiungimento di una configurazione nucleare stabile. I nuclidi instabili sono detti radioattivi o radionuclidi. [3]

Il processo di decadimento nucleare viene descritto in termini di attività del nuclide  $a(t)$ ; per una sostanza radioattiva costituita da atomi di un particolare nuclide questa grandezza rappresenta il numero di atomi  $n(t)$  che decadono nell'unità di tempo  $t$  (equazione 1.2).

$$a(t) = \frac{\partial n}{\partial t} = \lambda n(t) \quad (1.2)$$

Nel SI l'unità di misura dell'attività è il becquerel ( $1 \text{ Bq} = 1 \text{ s}^{-1}$ ).

Il parametro  $\lambda$ , espresso in  $\text{s}^{-1}$ , prende il nome di costante di decadimento radioattivo. Esso rappresenta la probabilità di un atomo che compone una sostanza radioattiva costituita da un numero di atomi  $n(t)$  di decadere nell'unità di tempo. Ciascun nuclide radioattivo è caratterizzato da uno specifico valore di  $\lambda$ .

Dall'equazione 1.2 si può ricavare la seguente legge cinetica di decadimento di primo ordine (equazione 1.3):

$$a(t) = a(0) e^{-\lambda t} \quad (1.3)$$

in cui  $a(0)$  corrisponde all'attività al tempo iniziale ( $t = 0$ ). [3]

Per descrivere le proprietà cinetiche di decadimento di un radionuclide, si utilizza generalmente un parametro detto emivita o tempo di dimezzamento ( $t_{1/2}$ ), il cui valore è correlato alla costante di decadimento secondo l'equazione 1.4:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (1.4)$$

L'emivita corrisponde al tempo necessario affinché l'attività di un radionuclide si dimezzi in seguito ai processi di decadimento radioattivo. [2] I nuclidi vengono considerati stabili quando non vanno incontro ad alcun decadimento radioattivo oppure quando l'emivita risulta superiore a  $10^9$  anni. [5]

La trasformazione dei nuclidi radioattivi in una configurazione nucleare più stabile può avvenire con differenti modalità di decadimento, che vengono descritte nei paragrafi successivi, nelle quali si ha l'emissione di energia sotto diverse forme.

#### 1.1.2.1 Decadimento $\alpha$

Il decadimento  $\alpha$  è una modalità di disintegrazione nucleare tipica di nuclidi pesanti, ossia con numero di massa elevato ( $A > 140$ ). [6] Il nuclide genitore si trasforma in un nuclide figlio più leggero emettendo una particella  $\alpha$  che, essendo costituita da due protoni e due neutroni, corrisponde ad un nucleo di elio ( ${}^2_4\text{He}^{2+}$ ). Il nuclide figlio presenta di conseguenza un valore di  $Z$  inferiore di due unità e un valore di  $A$  inferiore di quattro unità rispetto al nuclide genitore (equazione 1.5).



Le particelle  $\alpha$  generate possiedono un'energia cinetica compresa tra 4 e 9 MeV e possono coprire una distanza di 1-10 cm nell'aria, mentre all'interno dei tessuti lo spazio che possono percorrere si riduce a 10-100  $\mu\text{m}$ . [3]

#### 1.1.2.2 Decadimenti $\beta$

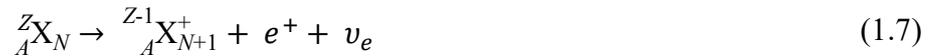
Esistono tre tipi di decadimenti  $\beta$ , che sono il  $\beta^-$ , il  $\beta^+$  e la cattura elettronica. Nel  $\beta^-$ , un neutrone di un nuclide caratterizzato da un eccesso di neutroni (*neutron rich*) viene trasformato in un protone, emettendo un elettrone ( $e^-$ ) e un antineutrino elettronico<sup>3</sup> (equazione 1.6).




---

<sup>3</sup> L'antineutrino è l'antiparticella del neutrino; queste due particelle presentano carica elettrica nulla, un identico valore di massa ma differiscono per il loro numero di spin, che risulta uguale ed opposto. Quando l'antineutrino viene prodotto da un processo di decadimento  $\beta^-$  viene detto antineutrino elettronico.

Nel  $\beta^+$ , un protone di un nuclide instabile caratterizzato da un eccesso di protoni (*proton rich*) viene trasformato in un neutrone, emettendo un positrone ( $e^+$  o  $\beta^+$ )<sup>4</sup> ed un neutrino<sup>5</sup> (equazione 1.7).



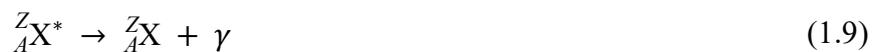
La cattura elettronica può avvenire nei nuclei *proton rich* quando un elettrone dell'atomo instabile viene catturato da un protone, il quale si trasforma in un neutrone emettendo un neutrino elettronico (equazione 1.8). [3]



### 1.1.2.3 Decadimento $\gamma$ e conversione interna

I processi di decadimento descritti nei precedenti paragrafi possono generare dei nuclidi figli in uno stato nucleare eccitato, per i quali il passaggio allo stato fondamentale può avvenire mediante il decadimento  $\gamma$  o conversione interna.

Nel decadimento  $\gamma$  si ha l'emissione di uno o più fotoni  $\gamma$ , che non produce nessuna alterazione della composizione dei nucleoni (equazione 1.9).



Lo stato energetico eccitato viene indicato nell'equazione con il simbolo \*. I raggi  $\gamma$  sono radiazioni elettromagnetiche con lunghezza d'onda  $\lambda < 10^{-11}$  m ed energia solitamente superiore a 0.1 MeV. [1]

Nella Conversione interna il nucleo eccitato trasferisce l'energia in eccesso ad un elettrone di un orbitale atomico dei gusci più interni, causandone l'emissione. Si genera così una vacanza negli orbitali atomici più interni che, attraverso transizioni elettroniche successive, si sposta ad orbitali via via più esterni. L'energia legata a queste transizioni può essere emessa dal nuclide sotto forma di raggi X, che sono caratterizzati da lunghezza d'onda  $\lambda$  compresa nell'intervallo 0.1-10 nm ed energia  $< 10$  keV.

Ogni vacanza elettronica, che si genera dopo i processi sia di cattura elettronica che di conversione interna, può anche provocare delle transizioni elettroniche senza rilascio di radiazioni elettromagnetiche (*radiation-free*), in cui si ha invece l'emissione di elettroni degli orbitali più esterni, detti elettroni Auger, ai quali viene trasferita l'energia corrispondente alla transizione elettronica. [1]

---

<sup>4</sup> Il positrone è l'antiparticella dell'elettrone;  $e^+$  presenta massa e numero di spin identici a quelli dell'elettrone, mentre la carica di queste due particelle è uguale e opposta.

<sup>5</sup> Il neutrino è una particella subatomica dotata di una massa estremamente piccola e priva di carica. Si conoscono tre tipologie (o "sapori") di neutrini: elettronico, muonico e tau; ogni tipo di neutrino è associato ad una particella leptonica (elettrone, muone o tau).

## 1.2 RADIOFARMACI

L'applicazione dei radionuclidi a scopo medico risale agli anni '20 del secolo scorso, con il primo utilizzo di un radiotracciante (successivamente identificato come  $^{214}\text{Bi}$ ) in uno studio condotto da Blumgart e Weiss per determinare la velocità del flusso ematico. [7] Negli anni successivi una serie di altri studi ha contribuito a gettare le basi delle scienze radiofarmaceutiche. Un nuclide particolarmente studiato fu  $^{131}\text{I}$ , di cui era stata evidenziata la proprietà di accumularsi selettivamente nella ghiandola tiroidea una volta somministrato nell'organismo. L'utilizzo di  $^{131}\text{I}$  per la diagnosi e il trattamento dell'ipertiroidismo e del tumore della tiroide si diffuse rapidamente dopo la Seconda Guerra Mondiale. [1], [7]

L'impiego dei radiofarmaci nella pratica clinica ha potuto diffondersi grazie allo sviluppo contemporaneo di nuovi generatori<sup>6</sup> di radionuclidi diagnostici o terapeutici caratterizzati da una breve emivita e alla comparsa, già alla fine degli anni '60, dei primi ciclotroni<sup>7</sup> all'interno delle istituzioni mediche. [6] Solo a seguito della pubblicazione del decreto legislativo 29 maggio 1991, n. 178, con recepimento della direttiva europea 89/343/CEE, le preparazioni radiofarmaceutiche, già ampiamente utilizzate a scopo diagnostico o terapeutico nei reparti di medicina nucleare, sono state incluse nell'ambito dei prodotti medicinali per uso umano. Nell'articolo 21 del decreto sono contenute le definizioni di radiofarmaco, generatore, kit<sup>8</sup> e precursore<sup>9</sup> di radionuclidi. Viene definito con il termine radiofarmaco “qualsiasi medicinale che, quando è pronto per l'uso, include uno o più radionuclidi (isotopi radioattivi) incorporati a scopo sanitario”. [8]

I radiofarmaci vengono distinti in due categorie, organici e *metal-based*, sulla base della tipologia di nuclide e della modalità con cui esso viene incorporato nella struttura del radiofarmaco. Nei derivati organici il nuclide è un elemento non metallico (come  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{123}\text{I}$ ), che viene inserito nella struttura del radiofarmaco tramite la formazione di un legame covalente. Questa prima classe di radionuclidi presenta un numero limitato di applicazioni e non è oggetto di questa tesi. I radiometalli, al contrario, risultano più versatili in quanto offrono un'ampia varietà di proprietà di decadimento.

---

<sup>6</sup> Un generatore di radionuclidi è un qualsiasi sistema che include un radionuclide genitore da cui si produce un radionuclide figlio, il quale viene in seguito rimosso per eluizione e adoperato in un radiofarmaco. [8]

<sup>7</sup> Il ciclotrone è un acceleratore circolare di particelle, spesso impiegato per produrre radionuclidi utili in medicina nucleare. All'interno di questo strumento, in condizioni di vuoto, delle particelle cariche vengono accelerate da un campo elettrico oscillante e mantenute all'interno di traiettorie circolari mediante un campo magnetico. Al termine del percorso il fascio di particelle possiede un'energia sufficiente a provocare trasformazioni nei nuclei e viene deviato verso gli atomi da colpire. [25]

<sup>8</sup> Un kit è “qualsiasi preparazione da ricostituire o ricombinare con radionuclidi nel radiofarmaco finale, di solito prima della somministrazione”. [8]

<sup>9</sup> Un precursore è “qualsiasi altro radionuclide prodotto per essere utilizzato quale tracciante di un'altra sostanza prima della somministrazione”. [8]

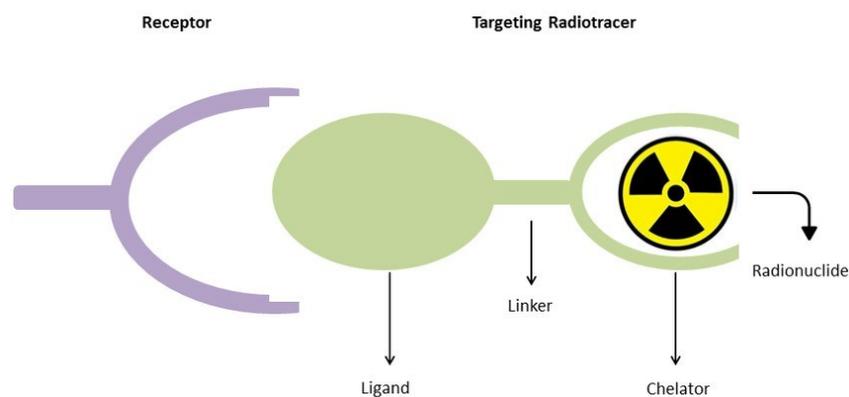
Per incorporare il nuclide nel radiofarmaco viene generalmente sfruttata la chimica di coordinazione del metallo. [9]

Nella classe dei radiofarmaci *metal-based* si possono distinguere due sottogruppi: *metal-essential* e *metal-nonessential*. Nel primo gruppo il radiometallo è responsabile dell'accumulo del radiofarmaco nel sito *target*, per cui la sua sostituzione con un altro nuclide cambia drasticamente le caratteristiche di biodistribuzione del farmaco. Nella classe *metal-nonessential* il tipo di radionuclide utilizzato non influenza il tropismo *in vivo* del radiofarmaco, se non in piccola misura. [9]

Esistono pochi esempi di radionuclidi (sia metallici che non metallici) che hanno come caratteristica intrinseca la biodistribuzione verso uno specifico *target*, e che quindi possono essere somministrati direttamente come sali o complessi metallici. Tra questi, [<sup>131</sup>I]NaI si accumula selettivamente nella tiroide e viene dunque utilizzato per la terapia dei tumori tiroidei e dell'ipertiroidismo grave; [<sup>223</sup>Ra]RaCl<sub>2</sub> (commercializzato come Xofigo®) si localizza nei cristalli di idrossiapatite, [Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH)], che compongono la matrice ossea, motivo per cui è indicato nel trattamento di metastasi ossee sintomatiche causate da tumori prostatici; anche [<sup>153</sup>Sm]Sm-lexidronam e [<sup>89</sup>Sr]SrCl<sub>2</sub> si localizzano nel tessuto osseo e sono stati approvati per la cura palliativa di metastasi osteoblastiche e scheletriche. [1], [10]

### 1.2.1 PROGETTAZIONE DI RADIOFARMACI

La strategia generalmente impiegata nella progettazione di radiofarmaci *metal-nonessential* prevede la presenza di quattro unità funzionali, che verranno descritte nei paragrafi successivi: un radiometallo, un chelante (o legante) bifunzionale, un *linker* e una biomolecola direzionante (**Figura 1.2**). Sulla base dell'applicazione del radiofarmaco (diagnosi o terapia), viene scelto un radionuclide che presenta delle caratteristiche di decadimento opportune; la biomolecola direzionante determina invece l'accumulo selettivo del radiofarmaco nello specifico sito *target* desiderato. Il chelante e il *linker* hanno la funzione di integrare in un unico composto il radionuclide e l'agente di *targeting*, senza alterare le funzionalità di questi ultimi. Un aspetto importante di questa strategia riguarda la possibilità di apportare separatamente modifiche alle singole unità funzionali, che possono poi essere combinate in una fase successiva dello sviluppo del radiofarmaco. Questo approccio rende in genere più semplice il design di nuovi radiofarmaci per diversi utilizzi. [9]



**Figura 1.2** Rappresentazione schematica di un radiofarmaco *metal-nonessential*. [11]

### 1.2.1.1 Radionuclide

La possibilità di utilizzare un particolare radionuclide a scopo terapeutico o nelle diverse tecniche di *imaging* è legata alle proprietà fisiche e di decadimento di quell'isotopo; in particolare vanno considerate la modalità di decadimento prevalente (come discusso nei **Paragrafi 1.2.2 e 1.2.3**), il trasferimento lineare di energia e l'emivita. [12]

Il trasferimento lineare di energia (*Linear energy transfer*, LET) è un parametro che indica l'energia media depositata da una radiazione ionizzante per unità di lunghezza, espressa in keV/ $\mu\text{m}$ . [1] Radiazioni con LET elevato trasferiscono un'alta quantità di energia su brevi distanze, per cui sono in grado di esercitare nei tessuti biologici un effetto citotossico localizzato; sulla base di queste proprietà esse trovano applicazione nella terapia oncologica. I radionuclidi caratterizzati da un basso valore di LET vengono invece utilizzati a scopo diagnostico, in quanto emettono delle radiazioni che hanno degli effetti citotossici minimi sui tessuti biologici e che presentano un raggio d'azione sufficientemente ampio da essere rilevate da un *detector* esterno. [9]

La scelta di un radionuclide si basa anche sulla valutazione del suo tempo di emivita. Se la velocità di decadimento del radiometallo fosse troppo elevata, potrebbe non esserci tempo sufficiente per produrre il radiofarmaco o per permetterne l'accumulo nel sito bersaglio: in tal caso la radiazione verrebbe emessa solo in siti *off-target*. [3] Allo stesso tempo, l'emivita deve essere sufficientemente breve per ottenere l'effetto farmacologico in tempi ragionevoli e massimizzare la quantità di radiazione che viene rilasciata nel periodo in cui il farmaco permane nell'organismo. Inoltre, un'emivita troppo lunga esporrebbe i pazienti (ed eventualmente anche le persone con cui essi entrano in contatto) a dosi eccessive di radiazioni per tempi troppo lunghi. [3] L'emivita del radionuclide dovrebbe essere compatibile con le caratteristiche farmacocinetiche correlate all'agente direzionante del radiofarmaco, quali la velocità di accumulo nel *target* biologico e la *clearance* dai tessuti sani. Per grandi proteine *carrier*, come gli anticorpi monoclonali, sono richiesti nuclidi con tempi di

emivita di diversi giorni per ottimizzare l'indice terapeutico<sup>10</sup>; nel caso di piccole biomolecole direzionanti, come quelle di natura peptidica, risultano invece più adatti radionuclidi con un'emivita più breve. [3]

Gli effetti dell'esposizione dei tessuti biologici alla radiazione sono strettamente legati all'energia assorbita per unità di massa, e sono oggetto delle valutazioni dosimetriche. Una grandezza introdotta allo scopo di quantificare la radiazione è la dose assorbita ( $D$ ), definita come il rapporto tra l'energia media,  $dE$ , ceduta dalle radiazioni ionizzanti alla materia in un'unità di volume e la massa della materia contenuta in tale volume ( $dm$ ) (equazione 1.10). [3]

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (1.10)$$

L'unità di misura della dose assorbita nel SI è il gray ( $Gy = 1 \text{ J/kg}$ ). [3]

Alcuni radionuclidi impiegati nella medicina nucleare sono di origine naturale, mentre altri sono ottenuti artificialmente mediante l'uso di acceleratori di particelle, oppure sono generati dal decadimento di altri radionuclidi più stabili all'interno di generatori. Ad oggi, l'ampia disponibilità di radioisotopi con differenti proprietà (emivita, modalità ed energia di decadimento) consente di scegliere in modo accurato il radionuclide più adatto per una determinata applicazione medica. [10]

#### 1.2.1.2 Chelante bifunzionale

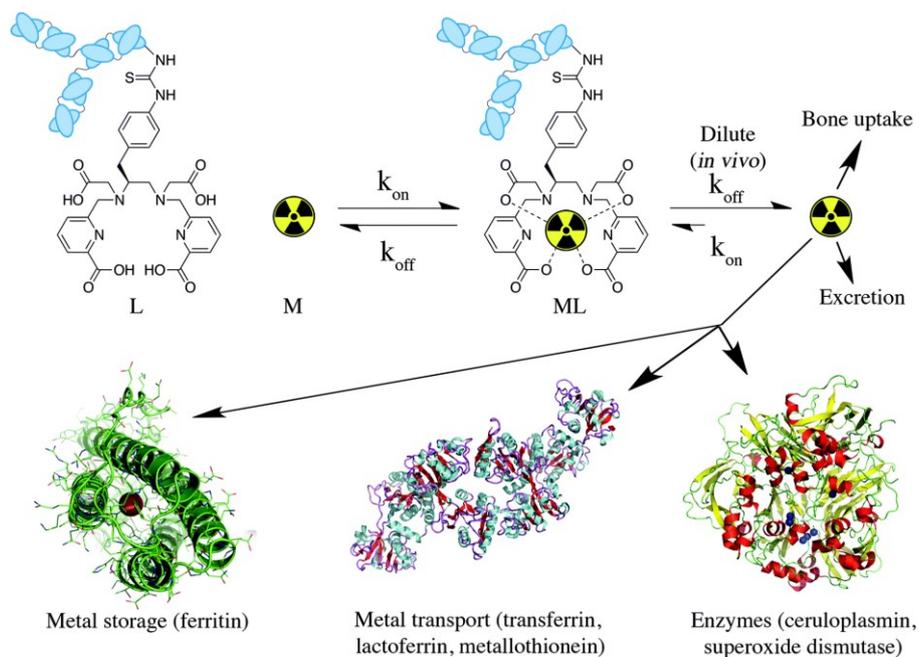
Il chelante è un componente fondamentale e critico della struttura dei radiofarmaci *metal-based*. I chelanti bifunzionali (BFC) possiedono gruppi funzionali in grado di complessare il radiometallo sfruttando la sua chimica di coordinazione e almeno un gruppo funzionale che consente di coniugare la biomolecola direzionante tramite un legame covalente. [6]

Nella scelta di un BFC, un requisito fondamentale è la capacità di formare un complesso termodinamicamente stabile e cineticamente inerte con il radiometallo in condizioni fisiologiche (si considera un intervallo di pH compreso tra 5 e 7.5), al fine di evitare il rilascio *in vivo* dell'elemento radioattivo. La presenza di radionuclide non complessato determinerebbe la distribuzione nel metallo in distretti sani dell'organismo, con possibili effetti collaterali, e il mancato direzionamento del radionuclide verso il sito *target*, sul quale si basa l'efficacia del radiofarmaco. [6] A livello biologico diversi fattori promuovono la dissociazione del complesso *in vivo* (**Figura 1.3**): la diluizione del

---

<sup>10</sup> L'indice terapeutico è un parametro utile per stimare la potenziale efficacia di un farmaco nell'impiego umano. Negli studi sull'animale, l'indice terapeutico è solitamente definito come il rapporto tra la dose tossica mediana ( $TD_{50}$ ), e la dose efficace mediana ( $ED_{50}$ ) relativa ad un particolare effetto terapeuticamente rilevante. Questi indici rappresentano, rispettivamente, la dose richiesta per produrre un particolare effetto tossico e quella necessaria a ottenere un determinato effetto terapeutico nel 50% degli animali in studio. [26]

farmaco nel circolo sanguigno, i fenomeni di transchelazione ad opera di alcune proteine ed enzimi plasmatici che fisiologicamente trasportano ioni metallici (come la transferrina, l'albumina sierica e la ceruloplasmina) e che possono sottrarre il radiometallo dal complesso con il BFC, e i processi di transmetallazione, ossia la competizione di altri ioni metallici presenti nel sangue con il radionuclide per il complessamento con il chelante. [12]



**Figura 1.3** Rappresentazione schematica della termodinamica e della cinetica di coordinazione del radiometallo e dei possibili fenomeni di dissociazione *in vivo*. [10]

Nella sintesi di un radiofarmaco la reazione di radiomarcatura (*radiolabelling*), ossia l'incorporazione del radionuclide da parte del BFC, deve presentare una resa<sup>11</sup> elevata (in genere superiore al 95%), possibilmente in tempi brevi e in condizioni blande di temperatura e pH. Il complesso formato, inoltre, non deve andare incontro ad una decomposizione radiolitica, un processo che può avvenire quando si utilizzano radionuclidi caratterizzati da un'elevata LET, come gli emettitori di particelle  $\alpha$  o  $\beta^-$  ad alta energia, in grado di provocare la rottura di legami covalenti nella struttura del radiofarmaco e quindi la dissociazione del complesso. [4]

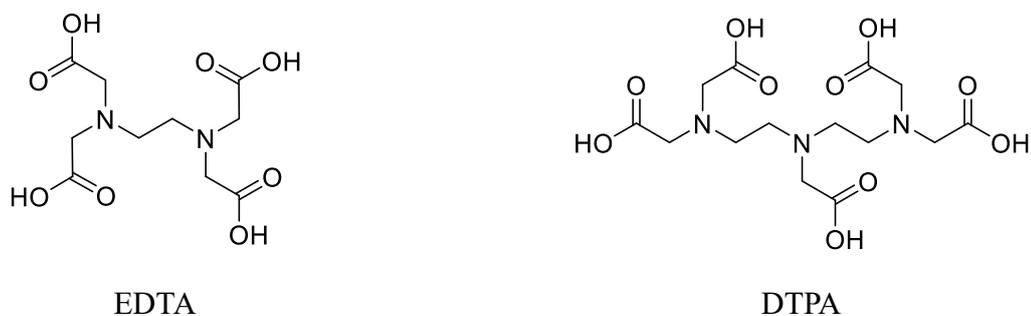
Da un punto di vista strutturale, i BFC maggiormente diffusi e utilizzati nei radiofarmaci possono essere divisi in aciclici e macrociclici.

<sup>11</sup> La resa di radiomarcatura, detta anche resa radiochimica, viene definita in termini di quantità percentuale del radiometallo di interesse che viene complessato dal chelante.

### Chelanti aciclici

I composti che rientrano in questa classe presentano una struttura lineare, non ciclizzata mediante legami covalenti. La radiomarcatura dei chelanti aciclici può avvenire in genere con una resa elevata e in tempi brevi, anche in condizioni blande di temperatura e pH. Allo stesso tempo, però, la dissociazione dei complessi *in vivo* può essere più rapida per questi composti rispetto ai chelanti macrociclici. Tale comportamento è giustificato dal fatto che la ridotta rigidità strutturale dei chelanti aciclici richiede una riorganizzazione della molecola durante la formazione del complesso, che comporta dunque un'elevata diminuzione di entropia; al contrario, la reazione di dissociazione risulta favorita dal punto di vista entropico. Per questo motivo i chelanti aciclici presentano spesso una minore stabilità termodinamica e anche (oppure) una minore inerzia cinetica rispetto a composti macrociclici. [1]

EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) e DTPA (acido dietilentriamminopentaacetico) sono alcuni esempi dei principali leganti aciclici utilizzati nella chimica radiofarmaceutica (**Figura 1.4**). Il DTPA è stato ampiamente impiegato nel *radiolabelling* di una grande varietà di radiometalli ed è presente nella struttura di tre radiofarmaci approvati dalla *Food and Drug Administration* degli Stati Uniti (FDA): Zevalin, anticorpo monoclonale coniugato con  $^{90}\text{Y}$ , Octreoscan<sup>TM</sup> e ProstaScints<sup>®</sup>, che incorporano nella loro struttura  $^{111}\text{In}$ . [12]

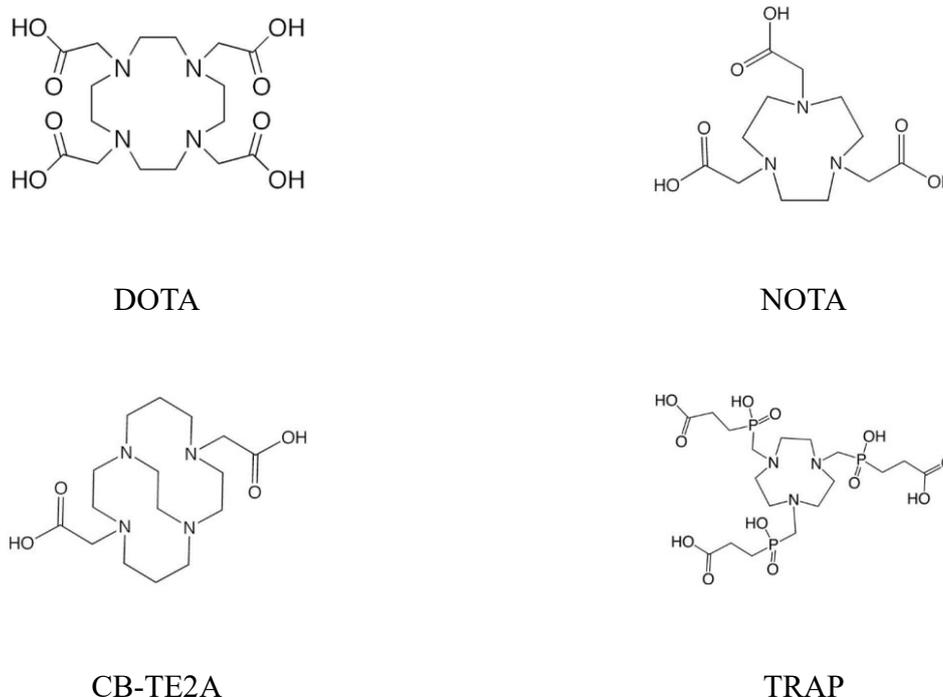


**Figura 1.4** Strutture molecolari di EDTA e DTPA.

### Chelanti macrociclici

Questa classe di leganti è stata introdotta allo scopo di ottenere dei complessi dotati di maggiore stabilità e inerzia cinetica rispetto a quelli formati dai derivati aciclici. La loro struttura rigida e preorganizzata consente in genere di ridurre i costi entropici della reazione di complessamento, aumentando la barriera energetica della reazione di dissociazione: questo si traduce spesso in un lento (o assente) rilascio dei radiometalli *in vivo*. Per contro, la cinetica di formazione dei complessi può risultare lenta, per cui il processo di radiomarcatura può richiedere temperature elevate e tempi

relativamente lunghi; questo svantaggio può rendere i chelanti macrociclici meno adatti al complessamento di radionuclidi con emivita molto breve e alla coniugazione con vettori biologici sensibili alle alte temperature, come gli anticorpi. [1], [9] Alcuni esempi di chelanti macrociclici sono riportati in **Figura 1.5**.



**Figura 1.5** Strutture di alcuni chelanti macrociclici utilizzati in medicina nucleare. [12]

#### 1.2.1.3 *Linker*

La porzione del radiofarmaco denominata *linker* connette in modo stabile il complesso metallo-chelante e la biomolecola direzionante; allo stesso tempo consente di distanziare opportunamente queste due componenti al fine di evitare possibili interferenze reciproche, che in alcuni casi possono ridurre l'affinità della molecola direzionante per il suo *target* biologico, oppure limitare la capacità del chelante di coordinare lo ione metallico. Un'altra funzione del *linker* è quella di modulare le proprietà farmacocinetiche dell'intero radiofarmaco, in quanto le caratteristiche strutturali e chimiche del *linker*, in particolare le dimensioni e l'idrofilia, influenzano i processi di distribuzione e di eliminazione *in vivo* del radiofarmaco. [9], [14]

#### 1.2.1.4 **Biomolecola direzionante**

La biomolecola direzionante (*targeting biomolecule* o *targeting vector*, BM) riveste un ruolo fondamentale nel garantire l'accumulo del radiofarmaco presso uno specifico sito d'interesse nell'organismo; ciò rende possibile l'acquisizione di informazioni precise sulla condizione di un particolare tessuto quando la BM viene coniugata ad un radionuclide diagnostico, e un'attività

citotossica selettiva sulle cellule malate nel caso di radiofarmaci terapeutici. L'efficacia del *targeting* si basa sull'affinità della BM per un particolare bersaglio molecolare, come ad esempio un recettore o un enzima sovraespresso nelle cellule tumorali ma che risulta assente o poco espresso nelle cellule sane. Altri requisiti importanti della BM sono un'elevata stabilità *in vivo* e un limitato accumulo a livello epatico e renale; inoltre, come accennato nel Paragrafo 1.2.1.1, l'emivita biologica<sup>12</sup> deve essere compatibile con la velocità di decadimento del radionuclide (emivita fisica). [9]

Esistono diverse classi di biomolecole che possono essere utilizzate come agenti direzionanti: piccole molecole (*small molecules*), peptidi, proteine (come l'albumina sierica umana), anticorpi monoclonali (mAb) o frammenti di anticorpi monoclonali. [14]

### *Small molecules*

Le piccole molecole organiche sono caratterizzate da una certa permeabilità di membrana per cui, a differenza di altri vettori direzionanti di maggiori dimensioni, sono capaci di raggiungere *target* localizzati nel citoplasma e nel nucleo cellulare. Alcune di esse vengono sfruttate per veicolare radiofarmaci nel cervello grazie alla loro permeabilità alla barriera ematoencefalica. Esiste un'ampia varietà di *small molecules* impiegate nel *design* di radiofarmaci, tra cui diversi amminoacidi, acidi grassi, nucleosidi e xenobiotici. [12]

### *Peptidi*

Molti recettori riconosciuti da peptidi risultano sovraespressi nelle cellule tumorali rispetto ai tessuti sani; essi rappresentano dunque degli ottimi *target* per la veicolazione del radiofarmaco nel tessuto malato. Da un punto di vista farmacocinetico, grazie al loro basso peso molecolare, i peptidi mostrano un veloce accumulo nel sito bersaglio e una rapida *clearance* plasmatica e dai tessuti sani; tuttavia, l'elevato accumulo a livello renale rende potenzialmente nefrotossici i radiofarmaci direzionati da peptidi, in particolare quelli utilizzati a scopo terapeutico. A seguito dell'interazione specifica con un recettore, il complesso ligando-recettore viene spesso internalizzato, per cui l'emissione di radiazione viene mantenuta a lungo all'interno della cellula tumorale. La sintesi peptidica è semplice e consente di introdurre facilmente delle modifiche alla sequenza amminoacidica rispetto ai peptidi endogeni, al fine di limitare il loro catabolismo enzimatico *in vivo*, senza alterare l'affinità con il recettore *target*. Un ulteriore vantaggio di queste molecole è in genere la tolleranza a condizioni drastiche di temperatura e pH che sono necessarie in alcune reazioni di radiomarcatura. I peptidi più comunemente utilizzati per il *targeting* di radionuclidi sono gli analoghi della somatostatina (ad esempio octreotide,

---

<sup>12</sup> L'emivita biologica di una sostanza è un parametro farmacocinetico che indica il tempo necessario per ridurre del 50% la concentrazione plasmatica della sostanza in esame; tale parametro è utilizzato per descrivere la velocità di eliminazione di un farmaco dall'organismo.

TOC, NOC e TATE), che trovano applicazione nell'*imaging* e nel trattamento dei tumori neuroendocrini. Altri esempi di bioconiugati peptidici sono il tripeptide RGD (arginina-glicina-acido aspartico) per il riconoscimento dell'integrina e i ligandi per il PSMA (*prostate-specific membrane antigen*). [9]

#### *Anticorpi monoclonali e frammenti di anticorpi*

I radiofarmaci basati sull'utilizzo di un anticorpo monoclonale come agente direzionante vengono definiti radioimmunoconiugati. Il successo della radioimmunoterapia, introdotta a partire dagli anni '70 del secolo scorso, è dovuto alla possibilità di ottenere una vasta gamma di biomolecole direzionanti caratterizzate da un'elevata affinità e specificità di legame per un determinato bersaglio molecolare. Gli anticorpi monoclonali, sulla base delle esigenze di *targeting*, vengono progettati per il riconoscimento di un particolare antigene sovraespresso nelle cellule malate nelle varie tipologie di tumori; questo permette di estendere il numero di applicazioni dei radionuclidi a specifiche condizioni tumorali caratterizzate da un particolare fenotipo delle cellule malate. A causa delle dimensioni molecolari elevate (il peso molecolare di un mAb è indicativamente attorno a 150 kDa), la permanenza nel circolo sanguigno dei radiofarmaci contenenti anticorpi monoclonali si protrae per diversi giorni o settimane. Sebbene una lunga emivita plasmatica favorisca l'accumulo di radiofarmaco nel sito *target*, il lento *uptake* nel tumore rende impossibile l'impiego di questa strategia con radionuclidi caratterizzati da una breve emivita. Un ulteriore problema riguarda la sensibilità dei mAb alle variazioni di temperatura e pH. [1], [9]

Per superare questi limiti spesso si possono utilizzare i frammenti anticorpali, molecole che conservano la stessa funzione dell'anticorpo intero ma presentano dimensioni ridotte e dunque un'emivita plasmatica più breve. Altri vantaggi dei frammenti anticorpali sono la minore sensibilità termica, che facilita la loro manipolazione, e la minore immunogenicità. [9]

Due esempi di radioimmunoconiugati approvati da FDA per il trattamento del linfoma non-Hodgkin sono [<sup>90</sup>Y]Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin<sup>®</sup>) e [<sup>131</sup>I]I-tositumomab (Bexxar, ora non più in commercio), che hanno come *target* le cellule che esprimono l'antigene CD20. [1], [3], [13]

#### **1.2.2 RADIOFARMACI DIAGNOSTICI**

Il *nuclear imaging* è un ramo della medicina nucleare che sfrutta i radiofarmaci per diagnosticare eventuali disfunzioni biochimiche nell'organismo dovute ad uno stato patologico, oppure per monitorare gli effetti di una terapia. Ad oggi è disponibile un'ampia gamma di radiofarmaci diagnostici, utilizzati in clinica o nel contesto della ricerca preclinica e clinica, che consentono di studiare particolari *target* molecolari o processi fisiologici senza perturbare l'ambiente biologico. Le

tecniche di *imaging* nucleare più largamente utilizzate sono la tomografia computerizzata a emissione di singolo fotone (*Single Photon Emission Computed Tomography*, SPECT) e la tomografia a emissione di positroni (*Positron Emission Tomography*, PET). [1], [9]

L'*imaging* nucleare si basa sulla capacità delle radiazioni emesse dai radionuclidi diagnostici di ionizzare atomi o molecole di un materiale schermante, tramite il quale possono essere rilevate e visualizzate utilizzando strumentazioni per la produzione di immagini, come le gamma camere e il tomografo PET. Le radiazioni che presentano proprietà utili per l'*imaging* sono i raggi  $\gamma$  e i raggi X: grazie all'elevato potere penetrante e al basso valore di LET, queste radiazioni riescono infatti ad attraversare i tessuti dell'organismo e a raggiungere i *detector* esterni, con minime o trascurabili interazioni con i tessuti biologici. I radiofarmaci diagnostici devono pertanto essere in grado di emettere raggi X o  $\gamma$ , che possono derivare direttamente dal decadimento del radionuclide, come avviene nella SPECT, oppure essere generati indirettamente dall'annichilazione dei positroni emessi durante il decadimento  $\beta^+$  (processo che viene sfruttato nella PET). [1]

### *Positron Emission Tomography*

I radionuclidi utilizzati nella PET decadono secondo la modalità  $\beta^+$ , cioè sono emettitori di positroni. Queste particelle sono in grado di percorrere una distanza di anche 1-2 mm all'interno dei tessuti, dopodiché danno luogo ad un processo di annichilazione: l'incontro tra un positrone e un elettrone della materia circostante provoca l'emissione di una coppia di fotoni  $\gamma$  con un'energia pari a 511 keV e versi di propagazione opposti. I raggi  $\gamma$  così generati vengono rilevati simultaneamente da appositi scanner esterni e vengono convertiti in un segnale elettrico-digitale per l'analisi computerizzata; il calcolo accurato del punto di annichilazione permette di determinare la localizzazione del radionuclide. [1], [14]

Per alcuni radionuclidi definiti emettitori di positroni "puri", come ad esempio  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{82}\text{Rb}$ , l'emissione  $\beta^+$  è la modalità principale di decadimento; altri emettitori  $\beta^+$ , detti "non puri", invece decadono principalmente attraverso altre modalità di emissione (come  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{124}\text{I}$ , e  $^{152}\text{Tb}$ ). [10]

La distanza percorsa da un positrone prima dell'annichilazione è proporzionale alla sua energia; per tale motivo, i radionuclidi più indicati per l'*imaging* sono quelli caratterizzati da radiazioni  $\beta^+$  a bassa energia, come ad esempio il  $^{18}\text{F}$ , per i quali il punto di annichilazione si trova in prossimità del radionuclide. Il [ $^{18}\text{F}$ ]FDG ([ $^{18}\text{F}$ ]-fluorodeossiglucosio) è il radiotracciante di gran lunga più utilizzato nella PET. Data la sua struttura simile al glucosio, [ $^{18}\text{F}$ ]FDG viene ampiamente internalizzato dalle cellule tumorali, caratterizzate da una sovraespressione dei trasportatori del glucosio, ma non subisce

i successivi processi metabolici della glicolisi. L'elevato accumulo di radiotracciante nelle cellule tumorali rispetto ai tessuti sani consente l'acquisizione di immagini ad elevata risoluzione in merito all'attività metabolica di un tumore. [3], [9]

### *Single Photon Emission Computed Tomography*

La SPECT si basa sulla rilevazione di singoli fotoni  $\gamma$  a bassa energia (100-250 keV) emessi da un radionuclide mediante processi di cattura elettronica o di transizione isomerica. L'*imaging* SPECT viene eseguito adoperando una gamma camera, un detector rotante che acquisisce diverse proiezioni bidimensionali da molteplici angoli; l'immagine così ottenuta restituisce una distribuzione spaziale tridimensionale del radionuclide all'interno del corpo. [9], [10]

La maggior parte delle scansioni SPECT viene eseguita utilizzando un isotopo metastabile del tecnezio,  $^{99m}\text{Tc}$  ( $t_{1/2} = 6.06$  h), di comune impiego in clinica per la valutazione di disturbi cardiovascolari, l'identificazione di forme tumorali e di patologie del sistema nervoso centrale. Altri radiometalli usati di routine nell'*imaging* SPECT sono il  $^{67}\text{Ga}$  ( $t_{1/2} = 3.26$  d) e il  $^{67}\text{Cu}$  ( $t_{1/2} = 3$  d). [9]

Rispetto alla PET, questa tecnica è caratterizzata da una minore sensibilità e risoluzione spaziale; tuttavia presenta dei costi di strumentazione più bassi, una maggiore disponibilità di radionuclidi e la possibilità di eseguire un *multi-radionuclide imaging*<sup>13</sup>. [1]

### 1.2.3 RADIOFARMACI TERAPEUTICI

L'obiettivo della *Targeted Radionuclide Therapy* (TRT) è la somministrazione al paziente di dosi terapeutiche di radiazioni ionizzanti, indirizzate mediante un sistema di *drug delivery* verso uno specifico tessuto malato, per il trattamento di una patologia oppure come cura palliativa. [10] Nella pratica clinica l'elevato effetto citotossico dei radionuclidi terapeutici viene sfruttato principalmente in ambito oncologico, al fine di eradicare le cellule tumorali minimizzando l'irradiazione delle cellule sane, per limitare il più possibile gli effetti collaterali del radiofarmaco in siti *off target*. [13]

L'azione citotossica delle radiazioni terapeutiche è dovuta principalmente a danni diretti al DNA, che comportano la rottura dei suoi filamenti e di conseguenza la morte cellulare per apoptosi. Un meccanismo secondario di morte cellulare è il danno ai mitocondri e alle membrane cellulari mediato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS), noto come catastrofe mitotica. Per ottenere un'attività terapeutica ottimale, le particelle emesse devono avere un'elevata LET e un ridotto potere penetrante,

---

<sup>13</sup> Poiché diversi radionuclidi impiegati nella SPECT emettono raggi X e raggi  $\gamma$  a energie differenti, acquisendo immagini distinte nei diversi intervalli di energia specifici per ciascun radionuclide è possibile condurre contemporaneamente l'*imaging* di più radionuclidi (e quindi di più radiofarmaci). Questa procedura non è applicabile nella PET, in cui i radionuclidi non sono distinguibili sulla base dell'energia emessa, essendo questa identica in ogni processo di annichilazione che porta all'emissione di fotoni (511 keV). [1]

al fine di depositare un'energia elevata in un raggio d'azione limitato, evitando il danneggiamento dei tessuti sani circostanti. I radionuclidi terapeutici possono essere suddivisi in tre sottogruppi in base al tipo di particelle generate durante il loro decadimento:  $\alpha$ ,  $\beta^-$  o elettroni Auger. [1]

### *Emettitori $\alpha$*

Le particelle  $\alpha$ , costituite da due protoni e due neutroni, si caratterizzano per un'elevata energia cinetica (5-8 MeV) e un'elevata LET (approssimativamente uguale a 80 keV/ $\mu\text{m}$ ), grazie alla quale sono in grado di indurre la rottura del doppio filamento di DNA con elevata frequenza; questo effetto è irreversibile e indipendente dalla dose somministrata. A causa del loro basso potere penetrante (50-100  $\mu\text{m}$ , corrispondenti al diametro di 2-10 cellule), le radiazioni  $\alpha$  rimangono quasi sempre confinate all'interno del tumore, causando solo un minimo danno alle cellule sane circostanti. Il ridotto raggio d'azione è anche il motivo per cui gli emettitori  $\alpha$  risultano più adatti ad eradicare tumori di piccolo diametro, come le piccole metastasi. [1] La TRT che si basa sull'utilizzo di  $\alpha$  emettitori prende il nome di *Targeted Alpha Therapy* (TAT), per la quale i radionuclidi più promettenti sono  $^{223}\text{Ra}$  ( $t_{1/2} = 11.4$  d),  $^{149}\text{Tb}$  ( $t_{1/2} = 4.15$  h),  $^{211}\text{At}$  ( $t_{1/2} = 7.21$  h),  $^{212}\text{Bi}$  ( $t_{1/2} = 61$  min),  $^{213}\text{Bi}$  ( $t_{1/2} = 45.6$  min) e  $^{225}\text{Ac}$  ( $t_{1/2} = 10$  d). [1], [4]

Alcuni radionuclidi, come  $^{225}\text{Ac}$  e  $^{223}\text{Ra}$ , vanno incontro ad una serie di vari decadimenti  $\alpha$  successivi, in quanto anche i nuclidi figli sono a loro volta emettitori  $\alpha$ : si produce così un incremento notevole della dose di radiazione nel sito *target*. Nonostante questi radiometalli siano molto promettenti per l'applicazione nella *Targeted Radionuclide Therapy*, occorre valutare il rischio di generare effetti tossici in tessuti sani a causa dell'energia di *recoil*<sup>14</sup> associata ai decadimenti  $\alpha$ . [1] Tale energia, essendo più di mille volte superiore rispetto all'energia dei legami chimici in una molecola, può causare la degradazione del chelante che coordina il radionuclide; di conseguenza il nuclide figlio viene rilasciato prematuramente dal radiofarmaco e segue la sua naturale biodistribuzione nell'organismo, emettendo particelle  $\alpha$  in siti *off target*. [1], [10]

### *Emettitori $\beta^-$*

Le particelle  $\beta^-$  (elettroni) presentano un'energia cinetica compresa tra 0.3 e 2.3 MeV; tale energia si distribuisce nei tessuti in un intervallo spaziale di 0.5-12 mm, che corrisponde a 10-1000 diametri cellulari. Il valore di LET ( $\sim 0.2$  keV/ $\mu\text{m}$ ) risulta quindi di gran lunga inferiore rispetto a quello delle particelle  $\alpha$ , ma sufficiente per provocare la rottura del singolo filamento di DNA e altre modifiche chimiche alla sua struttura. Questi danni possono essere riparati mediante specifici enzimi endogeni:

---

<sup>14</sup> L'effetto di *recoil* consiste nell'emissione di una particella, che ha acquisito energia cinetica per collisione con un'altra particella o in seguito all'irradiazione da parte di una radiazione elettromagnetica. [2]

per tale motivo l'effetto citotossico risulta direttamente proporzionale alla dose somministrata, ovvero alla quantità di radiazione  $\beta^-$  emessa. [10]

L'elevato potere penetrante delle particelle  $\beta^-$  consente di trattare tumori solidi eterogenei di medie dimensioni, sfruttando il cosiddetto “*crossfire effect*”: la distanza relativamente ampia coperta dalle radiazioni consente di estendere l'effetto terapeutico a ciascuna cellula della massa tumorale, incluse quelle che non esprimono il *target* molecolare a cui si lega il radiofarmaco terapeutico. I principali svantaggi sono i potenziali effetti collaterali dovuti ad un danneggiamento dei tessuti sani circostanti e la minore efficacia rispetto alle particelle  $\alpha$  nel trattamento di piccoli tumori metastatici. [10] Alcuni esempi di emettitori  $\beta^-$  utilizzati in terapia sono  $^{90}\text{Y}$  ( $t_{1/2} = 64$  h),  $^{177}\text{Lu}$  ( $t_{1/2} = 6.6$  d),  $^{131}\text{I}$  ( $t_{1/2} = 8$  d). [4]

#### *Emettitori di elettroni Auger*

Il decadimento di questi radionuclidi genera delle radiazioni caratterizzate da una bassa energia cinetica (1-10 keV), un'elevata LET (4-26 keV/mm) e da un ridotto raggio di penetrazione nei tessuti (1-20  $\mu\text{m}$ ). [9], [10] Gli emettitori di elettroni Auger presentano delle potenzialità interessanti per il trattamento di piccoli tumori, tra cui le micrometastasi costituite da singole cellule, grazie all'elevata citotossicità e al ridotto raggio d'azione, addirittura inferiore al diametro cellulare, che consente di minimizzare il *crossfire effect* su cellule sane circostanti.

Attualmente la applicazione di questi radionuclidi in terapia è limitata, a causa della necessità di veicolare il radiofarmaco nel nucleo cellulare affinché la radiazione possa raggiungere il DNA e danneggiarlo. Alcuni esempi di radionuclidi terapeutici che appartengono a questo sottogruppo sono  $^{103}\text{Pd}$  ( $t_{1/2} = 17.0$  d),  $^{77}\text{Br}$  ( $t_{1/2} = 57$  h),  $^{117\text{m}}\text{Sn}$  ( $t_{1/2} = 13.8$  d),  $^{195\text{m}}\text{Pt}$  ( $t_{1/2} = 4.0$  d),  $^{114\text{m}}\text{In}$  ( $t_{1/2} = 17.0$  d). [9]

#### **1.2.4 RADIOFARMACI TERANOSTICI**

La teranostica è una strategia emergente nella medicina nucleare, che si basa sull'utilizzo combinato di radionuclidi diagnostici e terapeutici nel trattamento di una patologia. Questo approccio prevede la somministrazione iniziale di un radiofarmaco diagnostico, allo scopo di conoscere lo stato della patologia, ma anche di acquisire informazioni sulle caratteristiche di biodistribuzione del radiofarmaco stesso. I dati raccolti dall'*imaging* consentono di determinare la dosimetria e il regime terapeutico più adatto per il paziente. Successivamente il radiofarmaco viene marcato con un radionuclide terapeutico con proprietà chimiche uguali o molto simili e somministrato per la terapia: il presupposto per il successo di questa strategia è che la biodistribuzione dei due radiofarmaci (diagnostico e terapeutico) sia quanto più simile possibile. L'agente diagnostico può inoltre essere

somministrato quando il trattamento con il radionuclide terapeutico è in corso o terminato per monitorare gli effetti della terapia. [9], [10]

Alcuni radiometalli sono intrinsecamente teranostici, ossia decadono emettendo sia radiazioni  $\gamma$  o  $\beta^+$  utili per l'*imaging* sia radiazioni terapeutiche ( $\alpha$ ,  $\beta^-$  o elettroni Auger). In altri casi si possono sfruttare due radioisotopi di uno stesso elemento chimico (ad esempio  $^{123/131}\text{I}$ ,  $^{86/90}\text{Y}$ ,  $^{161/155/149/152}\text{Tb}$ ) che presentano proprietà di decadimento complementari, per cui un radioisotopo è adatto all'*imaging* e un altro alla terapia. Questo approccio viene considerato ideale in quanto si utilizzano due radioisotopi caratterizzati da un identico comportamento chimico, in particolare nei confronti del chelante, e dalle stesse proprietà farmacocinetiche e di biodistribuzione *in vivo*. Altre coppie teranostiche sono invece costituite da un radionuclide diagnostico e uno terapeutico di elementi diversi ma che presentano proprietà chimiche simili. In quest'ultimo caso le informazioni acquisite con l'*imaging* risultano meno rappresentative della biodistribuzione della dose terapeutica; ciononostante esistono molti esempi di coppie teranostiche basate su elementi differenti che hanno riscosso successo in clinica. Ne sono esempio la coppia formata dall'agente diagnostico  $^{111}\text{In}$  e dall'emettitore  $\beta^-$   $^{90}\text{Y}$ , indicata per il trattamento del linfoma non-Hodgkin, e la coppia  $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$  per la terapia di tumori neuroendocrini e alla prostata. [9], [10]

## 1.3 RADIO-223 IN MEDICINA NUCLEARE

### 1.3.1 $^{223}\text{Ra}$ COME EMETTITORE $\alpha$

Il radio (Ra), scoperto nel 1898 da Marie Curie e dal marito Pierre Curie, è l'elemento chimico più pesante tra i metalli alcalino-terrosi. In natura si trova presente in tracce nei minerali dell'uranio ed esiste sotto forma di quattro isotopi radioattivi (**Tabella 1.3**), dei quali il  $^{226}\text{Ra}$  è il più stabile ( $t_{1/2} = 1600$  anni). [15]

**Tabella 1.3** Elenco degli isotopi naturali del radio con le rispettive emivite. [15]

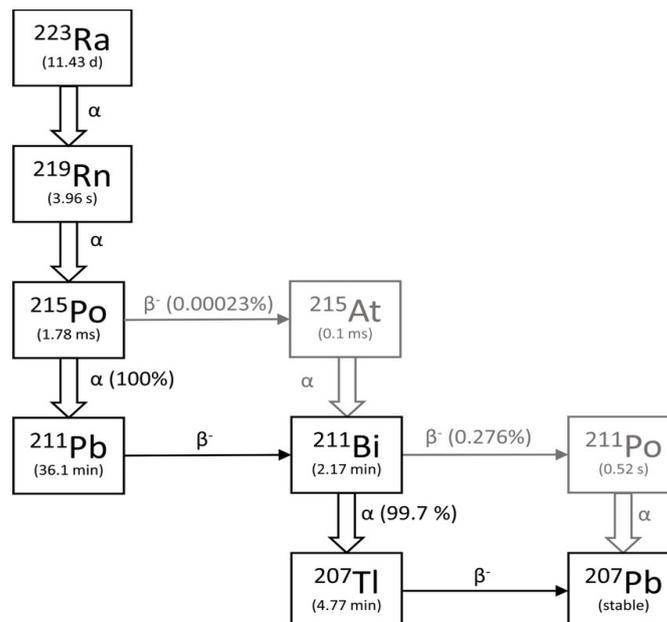
Isotopo	Emivita ( $t_{1/2}$ )
$^{228}\text{Ra}$	5.7 anni
$^{226}\text{Ra}$	1600 anni
$^{224}\text{Ra}$	3.6 giorni
$^{223}\text{Ra}$	11.4 giorni

Gli altri 29 isotopi noti del radio, che non sono generati dal decadimento di nuclidi primordiali e non si trovano in natura, sono anch'essi instabili.

I due isotopi  $^{223}\text{Ra}$  e  $^{224}\text{Ra}$  presentano un'emivita idonea per l'applicazione nella terapia nucleare. In passato  $^{224}\text{Ra}$  ( $t_{1/2} = 3.6$  d) è stato impiegato nel trattamento di dermatosi benigne, lesioni vascolari, sciatica, reumatismo articolare e anemia. È stato inoltre somministrato in forma di radio cloruro ( $[^{224}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ ) per trattare pazienti affetti da patologie ossee, in particolare la spondilite anchilosante; tuttavia in seguito a questi trattamenti si sono verificati effetti collaterali gravi, quali l'insorgenza di leucemia ed altre forme tumorali, che hanno portato all'interruzione dell'uso di  $^{224}\text{Ra}$  in clinica. Al contrario, in tempi più recenti il  $^{223}\text{Ra}$  ha riscosso un notevole successo nel trattamento palliativo di metastasi ossee, e ad oggi è oggetto di ricerca in ambito oncologico per una sua potenziale applicazione nella *Targeted Alpha Therapy* (TAT). [15]

Il radio-223 è infatti un emettitore  $\alpha$  che presenta delle proprietà ottimali dal punto di vista terapeutico. In primo luogo, l'emivita è abbastanza lunga da permettere di produrre e distribuire il radiofarmaco nelle unità ospedaliere, somministrarlo al paziente e assicurarne l'accumulo nel sito bersaglio; inoltre è sufficientemente breve da evitare l'esposizione dei pazienti alle radiazioni per periodi eccessivamente lunghi. Un ulteriore vantaggio riguarda la sua catena di decadimento (**Figura 1.6**), che genera vari radionuclidi figli instabili in grado a loro volta di emettere particelle  $\alpha$ , aumentando così la dose di radiazione associata al decadimento di un singolo nucleo. L'elevata energia globale rilasciata durante la catena di decadimenti ( $\sim 28$  MeV) rende il  $^{223}\text{Ra}$  un potente agente terapeutico, ma allo stesso tempo rende difficile la coniugazione stabile ed efficace del radionuclide con l'agente direzionante a causa dell'effetto di *recoil* (**Paragrafo 1.2.3**). La frazione di energia emessa in forma di particelle  $\alpha$  è pari al 95.3%, mentre l'energia rimanente viene emessa come particelle  $\beta^-$  (3.6%) e come radiazioni  $\gamma$  (1.1%). L'emissione  $\gamma$  può essere sfruttata per conoscere la biodistribuzione e la farmacocinetica dei radiofarmaci a base di  $^{223}\text{Ra}$  mediante l'*imaging* SPECT, anche se la qualità delle immagini risulta molto bassa. [15], [16]

Un altro aspetto che incoraggia lo sviluppo di radiofarmaci a base di  $^{223}\text{Ra}$  è la maggiore facilità di approvvigionamento del radiometallo rispetto ad altri emettitori  $\alpha$ , come attinio-225 e bismuto-213, che ad oggi vengono prodotti in quantità insufficiente a soddisfare la domanda a livello globale di radiofarmaci terapeutici. La produzione di radio-223 avviene nei generatori  $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}$  mediante il decadimento di torio-227, che viene generato a partire da attinio-227. La modalità principale di produzione di  $^{227}\text{Ac}$  prevede l'esposizione di substrati arricchiti di  $^{226}\text{Ra}$  a fasci di neutroni all'interno di reattori nucleari. [15]



**Figura 1.6** Catena di decadimento del radio-223. [17]

Tra gli emettitori  $\alpha$  indagati fino ad oggi, il radio-223 è l'unico radionuclide impiegato di routine in terapia: la sua formulazione come cloruro di radio-223,  $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ , è stata approvata dalla FDA e dall'EMA nel 2013 ed è entrata in commercio con il nome di Xofigo<sup>®</sup> per il trattamento palliativo di metastasi ossee dovute a cancro prostatico resistente alla castrazione. [15], [16]

Lo schema di dosaggio raccomandato per Xofigo<sup>®</sup> prevede sei iniezioni endovenose di una sua soluzione in tampone citrato, somministrate a distanza di quattro settimane per sei mesi, con un'attività per iniezione di 50 kBq/kg di peso corporeo. [16] Una volta somministrato nell'organismo, il catione  $[^{223}\text{Ra}]\text{Ra}^{2+}$  mostra un comportamento simile al  $\text{Ca}^{2+}$  endogeno, perciò si accumula nella matrice ossea nella struttura dell'idrossiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). In particolare,  $[^{223}\text{Ra}]\text{Ra}^{2+}$  si accumula spontaneamente nelle aree del tessuto osseo caratterizzate da un elevato *turnover*, come quelle associate a metastasi. L'elevato *linear energy transfer* delle particelle  $\alpha$  emesse dal radionuclide determina una notevole efficacia biologica, con un effetto citotossico che risulta indipendente dalla dose, dalla fase del ciclo cellulare e dalla presenza di ossigeno. [16]

La biodistribuzione di questo radiofarmaco avviene rapidamente (la quantità di  $[^{223}\text{Ra}]\text{Ra}^{2+}$  presente nel circolo ematico si riduce al 20% dopo 15 minuti e a meno dell'1% dopo 24 ore) ed è selettiva a livello del tessuto osseo, senza un significativo *uptake* da parte di organi *off target*. L'eliminazione avviene preferenzialmente per via intestinale e fecale, senza coinvolgere la via epatobiliare, mentre l'escrezione renale risulta trascurabile, motivi per cui il farmaco non mostra evidenze di epatotossicità e nefrotossicità. [18] I benefici riscontrati negli studi riguardano sia l'allungamento del tempo di

sopravvivenza dei pazienti trattati (*overall survival*) che il rallentamento dello sviluppo di segni e sintomi della malattia progressiva, come il dolore osseo. [16]

Nonostante sia trascorso un decennio dall'approvazione di Xofigo<sup>®</sup> per l'uso clinico, l'applicazione del radio-223 ad oggi rimane limitata al trattamento del tumore alla prostata metastatico resistente alla castrazione (mCRPC). Per estendere l'uso di <sup>223</sup>Ra ad un maggior numero di indicazioni terapeutiche, in particolare non riguardanti esclusivamente le ossa, occorre progettare un opportuno sistema di *drug delivery* in grado di indirizzare il nuclide verso *target* biologici specifici presenti nelle cellule malate. Una possibile strategia verso cui la ricerca si sta indirizzando per lo sviluppo di radiofarmaci a base di <sup>223</sup>Ra per il trattamento di tumori non ossei prevede la coniugazione del radiometallo ad una biomolecola direzionante mediante un opportuno BFC in grado di formare un complesso stabile, evitando il rilascio del nuclide *in vivo* e il conseguente accumulo nelle ossa, come spiegato nei paragrafi precedenti. [19]

### 1.3.2 CHELANTI PER IL <sup>223</sup>Ra

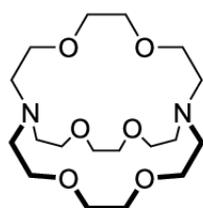
Ad oggi, nonostante il grande interesse della ricerca nei confronti del <sup>223</sup>Ra, non sono ancora stati identificati composti capaci di chelare questo radiometallo con una stabilità sufficiente *in vivo*. [19] Uno dei principali ostacoli allo sviluppo di chelanti per il complessamento del <sup>223</sup>Ra è la scarsa conoscenza della chimica di coordinazione di questo metallo. La presenza di soli isotopi instabili, che emettono radiazioni ad elevata intensità, rende difficile lo studio delle sue proprietà chimiche in soluzione acquosa. Queste informazioni, pertanto, vengono spesso stimate sfruttando l'analogia esistente tra il radio e gli altri metalli alcalino-terrosi, in particolare il bario, che presenta le dimensioni e il comportamento chimico più simili a quelli del radio. [19], [20]

In soluzione acquosa il radio si trova esclusivamente nello stato di ossidazione +2 in forma di catione idratato, analogamente al bario e agli altri elementi del gruppo II. La difficoltà riscontrata nella formazione di complessi stabili con vari chelanti è dovuta alle proprietà chimiche dell'elemento: come gli altri metalli alcalino-terrosi, le interazioni del radio con i leganti sono principalmente di natura elettrostatica, e dunque non direzionali, e risultano più deboli rispetto a quelli formati dagli altri metalli dello stesso gruppo in quanto, essendo il più grande catione bivalente, Ra<sup>2+</sup> presenta un minore rapporto carica:raggio ionico. Inoltre, gli elementi del gruppo II non mostrano una predilezione per specifiche geometrie di coordinazione. [15], [19]

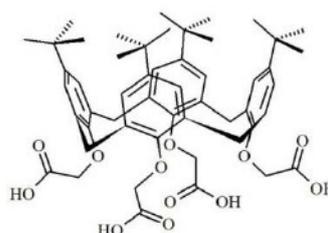
Gli studi di stabilità termodinamica di complessi del Ra<sup>2+</sup> con una serie di piccole molecole organiche acicliche, tra cui EDTA e DTPA (**Figura 1.4**), hanno evidenziato che i leganti capaci di formare complessi più stabili sono quelli dotati di una maggiore carica negativa. I risultati sono inoltre in accordo con la teoria HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases theory*), per cui i cationi dei metalli

alcalino-terrosi formano interazioni più forti con donatori “hard”, come ad esempio i gruppi carbossilici e ossidrilici. [15]

In letteratura sono presenti degli studi di estrazione competitiva in cui è stata valutata la stabilità dei complessi di  $\text{Ra}^{2+}$  con alcuni chelanti macrociclici, come DOTA (**Figura 1.5**), Kryptofix 2.2.2 e strutture supramolecolari appartenenti alla classe dei calixareni (**Figura 1.7**). [20] Nonostante la maggiore efficienza di estrazione del  $\text{Ra}^{2+}$  rispetto agli altri composti, i calixareni si sono rivelati non adatti a complessare il metallo nelle condizioni fisiologiche di utilizzo del radiofarmaco, sia a causa del fallimento riscontrato nelle prove di radiomarcatura che per la bassa stabilità cinetica dei complessi ottenuti; per queste ragioni si è scelto di abbandonare lo studio di tali composti. [20] Anche per il DOTA sono stati condotti degli esperimenti di *radiolabeling* con  $\text{Ra}^{2+}$ , da cui è risultata una bassa resa di radiomarcatura. [15], [19] I risultati ottenuti negli studi di estrazione competitiva sopra citati hanno dimostrato la capacità dei composti macrociclici di complessare il  $\text{Ra}^{2+}$  con una maggiore stabilità rispetto a chelanti aciclici come il DTPA; inoltre si è potuto osservare che il Kryptofix 2.2.2 forma complessi più stabili con il  $\text{Ra}^{2+}$  rispetto al DOTA, suggerendo che la presenza di una cavità rigida e spaziosa risulta più adatta ad ospitare un catione metallico avente un elevato raggio ionico come il radio. Nonostante gli insuccessi ottenuti negli esperimenti di radiomarcatura sopra citati, gli studi iniziali relativi al complessamento del  $\text{Ra}^{2+}$  con composti macrociclici hanno indirizzato la comunità scientifica verso la ricerca di chelanti caratterizzati da un elevato numero di atomi donatori e da una certa rigidità strutturale, allo scopo di aumentare l’affinità termodinamica con il  $\text{Ra}^{2+}$ . [19], [21]



Kryptofix 2.2.2



Calix-TA

**Figura 1.7** Strutture molecolari di due leganti macrociclici proposti in letteratura per il complessamento del  $^{223}\text{Ra}$ .

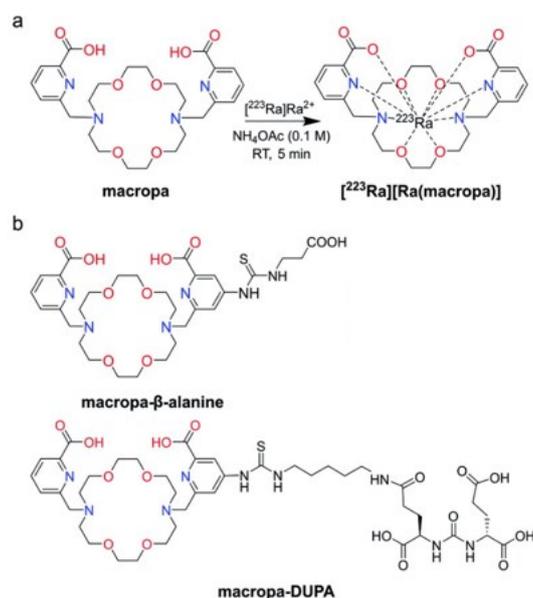
Un legante studiato più recentemente che ha fornito risultati piuttosto promettenti è il macropa (**Figura 1.8 a**), la cui struttura è composta da un anello centrale a 18 atomi, chiamato Kryptofix 22, e due residui di acido picolinico come bracci laterali. L’interesse nei confronti di questo composto macrociclico deriva dal successo che ha dimostrato come chelante per l’emettitore  $\alpha$   $^{225}\text{Ac}$  e per la coppia teranostica  $^{132/135}\text{La}$ . Come era già stato evidenziato negli studi di complessamento con i

lantanidi e l'attinio, infatti, il macropa presenta una cavità sufficientemente ampia da accomodare cationi con raggio ionico elevato. Inoltre, la sua struttura presenta dieci atomi donatori disponibili per la coordinazione dello ione metallico: due azoti e quattro ossigeni nell'anello centrale, un azoto e un ossigeno per ciascun residuo di acido picolinico. [15], [19], [20]

Gli studi iniziali di caratterizzazione del macropa sono stati condotti utilizzando il bario come surrogato del radio. Per il complesso [Ba(macropa)] è stata ottenuta una costante condizionale di complessamento ( $\log\beta'$ ) a pH 7.4 pari a 10.74, maggiore rispetto alle costanti ottenute con tutti i chelanti studiati in precedenza. La  $\log\beta'$  a pH 7.4 del complesso [Ra(macropa)] è pari a 9.28, ottenuta mediante misure di scambio cationico. [18] Le prove di radiomarcatura dimostrano che il macropa è in grado di complessare lo ione [ $^{223}\text{Ra}$ ]Ra<sup>2+</sup> con maggiore efficienza rispetto a chelanti come DOTA ed EDTA. [19] Nella successiva caratterizzazione *in vitro* il complesso è stato incubato a 37°C in siero umano per valutarne la stabilità: dopo 12 giorni (intervallo di tempo pari a circa un'emivita del radionuclide) è rimasto integro il 90% del complesso. Per studiare la stabilità *in vivo* di [ $^{223}\text{Ra}$ ][Ra(macropa)], la biodistribuzione del complesso è stata confrontata con quella della formulazione presente in clinica, [ $^{223}\text{Ra}$ ]RaCl<sub>2</sub>. I test effettuati su topi sani hanno mostrato un minore *uptake* nelle ossa, una rapida *clearance* renale e un ridotto accumulo a livello di milza e intestino rispetto a [ $^{223}\text{Ra}$ ]RaCl<sub>2</sub>; tali differenze nel profilo farmacocinetico dimostrano che il complesso macropa-radiometallo rimane stabile *in vivo* e non libera [ $^{223}\text{Ra}$ ]Ra<sup>2+</sup>. [19]

Una volta dimostrata la stabilità *in vivo* di [ $^{223}\text{Ra}$ ][Ra(macropa)], studi successivi sono stati condotti per valutare la stabilità di due forme coniugate di questo chelante. Tramite funzionalizzazione con un gruppo isotiocianato, è stato ottenuto il chelante bifunzionale macropa-NCS, da cui poi sono stati sintetizzati i coniugati macropa- $\beta$ -alanina e macropa-DUPA (**Figura 1.8 b**). Il primo coniugato è servito a valutare l'effetto della coniugazione tramite tiourea sulla stabilità del complesso con Ra<sup>2+</sup>; a tal fine sono state determinate le costanti di complessamento di [Ba(macropa- $\beta$ -alanina)] e [Ra(macropa- $\beta$ -alanina)] ed eseguite la radiomarcatura con  $^{223}\text{Ra}$ , la valutazione della stabilità *in vitro* e della biodistribuzione *in vivo* del complesso. Sebbene il coniugato mostri una stabilità *in vitro* del complesso leggermente più bassa rispetto a [ $^{223}\text{Ra}$ ][Ra(macropa)] non funzionalizzato, gli studi di biodistribuzione condotti su un campione murino hanno dimostrato che il complesso [Ra(macropa- $\beta$ -alanina)] rimane stabile *in vivo*. Nel secondo coniugato il macropa funzionalizzato con l'isotiocianato è stato legato al DUPA, una *small molecule* che funge da agente direzionante, costituita dalla sequenza glutammato-urea-glutammato e selettiva per il PSMA, un antigene di membrana delle cellule prostatiche. Nonostante la resa di radiomarcatura e la stabilità *in vitro* del complesso [ $^{223}\text{Ra}$ ][Ra(macropa-DUPA)] siano risultate identiche a quelle ottenute per [ $^{223}\text{Ra}$ ][Ra(macropa)], il coniugato ha presentato nei test *in vivo* una biodistribuzione analoga a quella di [ $^{223}\text{Ra}$ ]RaCl<sub>2</sub>, con un

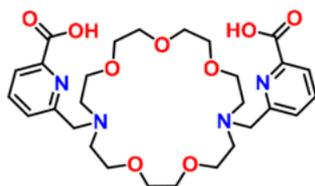
elevato accumulo di attività a livello osseo, renale e nella milza, dimostrando dunque un rilascio del radiometallo. Questi primi risultati hanno evidenziato, come ci si aspetta, che le biomolecole direzionanti introdotte nel coniugato possono influenzare drasticamente la stabilità del complesso metallo-chelante, ma costituiscono comunque un punto di partenza molto promettente per la ricerca di chelanti in grado di incorporare  $^{223}\text{Ra}$  stabilmente *in vivo*. [19]



**Figura 1.8** a) Struttura del macropa e del complesso  $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa})]$ , b) struttura dei coniugati basati sul macropa e studiati per il complessamento del radio-223. [19]

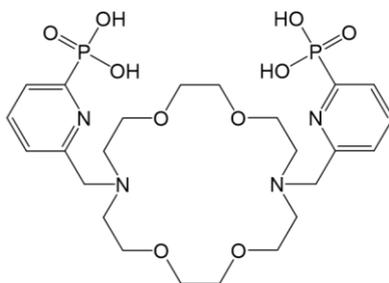
Lo studio delle costanti di complessamento del macropa sopra citato ha dimostrato che la  $\log K$  relativa al complesso  $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa})]$  è minore di più di un ordine di grandezza rispetto a quella del complesso  $[\text{Ba}(\text{macropa})]$ ; supponendo che la minore selettività del chelante per il  $\text{Ra}^{2+}$  rispetto al  $\text{Ba}^{2+}$  sia dovuta alla cavità non sufficientemente spaziosa del macrociclo, lo stesso gruppo di ricerca ha deciso di indagare le proprietà complessanti di un chelante analogo al macropa ma con un anello centrale a 21 atomi, denominato macropa-XL (**Figura 1.9**). In particolare, nello studio è stata confrontata la selettività di tale composto con quella del macropa per i diversi ioni dei metalli alcalino-terrosi: per tutti i complessi con i diversi ioni metallici la  $\log K$  risulta significativamente minore rispetto a quella dei rispettivi complessi con il macropa, da cui si può dedurre che le maggiori dimensioni dell'anello riducano la stabilità termodinamica dei complessi. Sebbene sia stata evidenziata una minore efficacia di complessamento del  $\text{Ra}^{2+}$  rispetto al macropa (la  $\log K$  è inferiore di circa 1.5 unità logaritmiche rispetto a quella del complesso  $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa})]$ ), attraverso questo studio si è potuto osservare che la diminuzione dell'affinità del macropa-XL per il  $\text{Ra}^{2+}$  rispetto al  $\text{Ba}^{2+}$  è minore di quella del macropa. Pertanto, in confronto a quest'ultimo, macropa-XL risulta relativamente più selettivo per il  $\text{Ra}^{2+}$  rispetto al  $\text{Ba}^{2+}$ , comportamento che può essere attribuito alle

maggiori dimensioni del macrociclo. Nonostante gli esperimenti di radiomarcatura del macropa-XL con  $^{223}\text{Ra}$  abbiano restituito risultati simili a quelli del macropa, i saggi di stabilità in siero hanno dimostrato che il complesso  $[\text{}^{223}\text{Ra}][\text{Ra}(\text{macropa-XL})]$  risulta instabile in condizioni fisiologiche, perciò si è deciso di interrompere gli studi su questo chelante. [22]



**Figura 1.9** Struttura del macropa-XL. [22]

Un analogo del macropa, denominato macrophospho, è stato proposto di recente in letteratura come possibile chelante per il radio. (**Figura 1.10**) La sua struttura presenta lo stesso anello centrale a 18 atomi, il Kryptofix 22, e due residui di acido piridil-2-fosfonico come bracci laterali, per cui l'unica differenza rispetto al macropa è data dalla sostituzione dei due acidi carbossilici con acidi fosfonici. La scelta di introdurre questo gruppo funzionale è legata a due motivi: gli anioni  $-\text{PO}_3^{2-}$  presenti in condizioni neutre si comportano da basi forti di Lewis nei confronti di ioni metallici come  $\text{Ra}^{2+}$  e  $\text{Ba}^{2+}$ ; inoltre l'elevata affinità del  $\text{Ra}^{2+}$  per l'idrossiapatite della matrice ossea suggerisce la formazione di interazioni stabili tra il fosfonato e questo catione metallico. [23]



**Figura 1.10** Struttura del macrophospho.

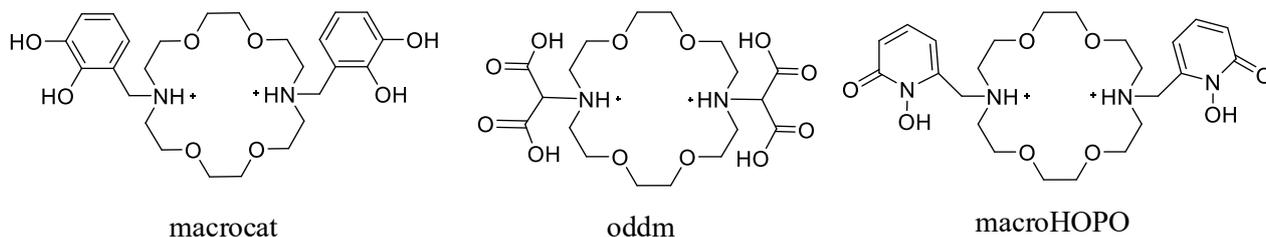
Dai dati cristallografici del complesso  $[\text{Ba}(\text{macrophospho})]$  presenti in letteratura sono stati identificati gli atomi donatori del legante impegnati nella coordinazione con il catione metallico: due azoti e quattro ossigeni dell'anello centrale e due azoti e due ossigeni dei due bracci laterali. Inoltre, la struttura mostra una cavità sufficientemente spaziosa per il posizionamento del  $\text{Ba}^{2+}$ , che consente ai dieci donatori di coordinare il metallo senza particolari tensioni conformazionali. [23] Ad oggi un unico studio presente in letteratura si è limitato alla caratterizzazione termodinamica dei complessi di  $\text{Ba}^{2+}$  con il macrophospho, per i quali sono state ottenute delle costanti di complessamento inferiori a quelle misurate con il macropa. [23]; anche alcuni dati preliminari ottenuti dal nostro gruppo di ricerca sembrano confermare i risultati ottenuti in letteratura. [24] Tuttavia, solo mediante esperimenti

di radiomarcatura con  $[^{223}\text{Ra}]\text{Ra}^{2+}$  e saggi di stabilità *in vitro* e *in vivo* sarà possibile valutare l'efficacia del macrophospho come chelante per la TAT.

## CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

Come si è visto nel capitolo 1,  $^{223}\text{Ra}$  è un radioisotopo promettente nell'ambito della *targeted alpha therapy*; è già in uso nella pratica clinica come sale  $^{223}\text{Ra}[\text{RaCl}_2]$  per il trattamento palliativo di metastasi ossee in pazienti colpiti da tumore prostatico resistente alla castrazione, ma attualmente non trova impiego in altre patologie oncologiche non ossee. Per poter estendere le indicazioni terapeutiche del  $^{223}\text{Ra}$ , occorre sviluppare nuovi radiofarmaci dotati di un opportuno sistema di *drug delivery* in grado di incorporare il radionuclide, indirizzarlo nel sito bersaglio e impedirne il rilascio *in vivo*. Un'unità strutturale fondamentale del radiofarmaco è il chelante, che deve garantire il complessamento del  $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}^{2+}]$  con elevata stabilità termodinamica ed inerzia cinetica in condizioni fisiologiche.

Nel presente lavoro di tesi sono state indagate le proprietà complessanti di tre chelanti macrociclici (**Figura 2.1**) nei confronti dello ione non radioattivo  $\text{Ba}^{2+}$ , utilizzato in sostituzione del  $\text{Ra}^{2+}$ , come studio preliminare della capacità di tali composti di formare complessi stabili con  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Ra}^{2+}$ .



**Figura 2.1** Chelanti macrociclici studiati in questo lavoro di tesi.

La struttura di questi composti riprende quella del macropa (**Paragrafo 1.3.2, Figura 1.8**), rispetto alla quale viene mantenuto lo stesso anello centrale ma cambiano i sostituenti inseriti come bracci laterali. La scelta dei gruppi chimici con cui funzionalizzare il macrociclo centrale risulta cruciale nella progettazione di chelanti opportuni per il complessamento del  $\text{Ba}^{2+}$  (e del  $\text{Ra}^{2+}$ ), in quanto gli atomi donatori che contribuiscono a completare la sfera di coordinazione modulano l'affinità delle interazioni con lo ione metallico e di conseguenza la stabilità termodinamica del complesso formato. Le molecole introdotte come bracci laterali (al posto dell'acido picolinico presente nel macropa) sono state scelte sulla base dei risultati ottenuti in un precedente lavoro di tesi [24], nel quale sono state determinate le costanti di complessamento del  $\text{Ba}^{2+}$  con una serie di chelanti bidentati: 1,2-HOPO (2-idrossipiridina-1-ossido), 2,3-HOPO (3-idrossi-2-piridone), acido malonico, catecolo e acido salicilico, oltre all'acido picolinico. A loro volta, tali molecole erano state selezionate sulla base dei

dati acquisiti da un precedente studio computazionale di *Density Functional Theory*<sup>15</sup>, nel quale erano state calcolate le energie di legame di numerosi leganti monodentati e bidentati con gli ioni Ba<sup>2+</sup> e Ra<sup>2+</sup>, allo scopo di individuare quali di questi composti risultassero più promettenti per la coordinazione del metallo. Tra i leganti bidentati sopra citati, per la sintesi del macrocat e del macroHOPO<sup>16</sup> sono stati utilizzati rispettivamente il catecolo e l'1,2-HOPO, inseriti come bracci laterali legati all'anello centrale. Questi due chelanti macrociclici sono stati oggetto di studio del presente lavoro di tesi, con l'obiettivo di determinare le rispettive costanti di dissociazione acida ( $pK_a$ ) e le costanti di formazione dei complessi ( $\log\beta$ ) con lo ione Ba<sup>2+</sup>, utilizzando tecniche potenziometriche, di spettroscopia NMR e UV-Vis.

Nel precedente lavoro di tesi [24] erano stati inoltre caratterizzati i due chelanti macrociclici macrophospho (**Figura 1.10**) e oddm (**Figura 2.1**) e i loro complessi con il Ba<sup>2+</sup>, a completamento dei dati già disponibili in letteratura per questi composti. Tuttavia, significative discrepanze rispetto alle  $pK_a$  e  $\log\beta$  riportate in letteratura erano state osservate per quanto riguarda l'oddm. In aggiunta, nella caratterizzazione dell'oddm mediante spettroscopia NMR era stata riscontrata la comparsa di un picco incognito, che aveva fatto supporre l'esistenza di un processo degradativo del legante a pH acido. È stato dunque ipotizzato che la presenza del prodotto di degradazione nella soluzione di legante fosse responsabile della non riproducibilità dei valori di  $pK_a$  e  $\log\beta$  misurati, e che tale variazione dipendesse dalle condizioni di pH acido a cui era stato sottoposto il legante durante le analisi. Una possibile reazione in grado di spiegare tale processo è la decarbossilazione dell'acido malonico presente nei bracci laterali (**Paragrafo 5.3.2**); questa reazione, secondo quanto riportato in uno studio disponibile in letteratura [32], avverrebbe tuttavia a pH inferiori rispetto alle condizioni adoperate durante le analisi ( $pH < 2$ ). In tale studio la degradazione dell'oddm non era dunque stata considerata, come anche nel precedente lavoro di tesi sopra citato, ma il disaccordo tra i risultati ottenuti e soprattutto gli inattesi spettri NMR hanno suggerito che fosse necessario approfondire la caratterizzazione dell'oddm. Pertanto, in questa tesi è stata anche ripetuta la caratterizzazione dell'oddm e dei suoi complessi con il Ba<sup>2+</sup>. Affinché i valori di  $pK_a$  e  $\log\beta$  ottenuti non venissero influenzati (per quanto possibile) dalla presenza di eventuali prodotti di degradazione, in questo lavoro di tesi la caratterizzazione dell'oddm e dei suoi complessi con il Ba<sup>2+</sup> è stata condotta adottando opportuni accorgimenti per limitare il contatto del legante con l'ambiente acido (**Paragrafo 5.3**). In aggiunta, per verificare l'ipotesi secondo cui il processo di degradazione dell'oddm sia un fenomeno

---

<sup>15</sup> Realizzato nell'ambito di una tesi di dottorato, in collaborazione con il gruppo della prof.ssa Laura Orian presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

<sup>16</sup> La sintesi dei chelanti macrociclici è stata eseguita dalla dott.ssa Sara Franchi in collaborazione con il gruppo del prof. Fabrizio Mancin presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

di decarbossilazione e abbia luogo anche alle condizioni adoperate durante le analisi e non solo a pH < 2, è stato eseguito uno studio NMR più approfondito, impiegando anche tecniche bidimensionali **(Paragrafo 5.3.2)**.

L'obiettivo finale del nostro gruppo di ricerca è quello di eseguire gli studi di radiomarcatura con il  $^{223}\text{Ra}$  dei diversi chelanti macrociclici caratterizzati in questo e nel precedente lavoro di tesi (macrophospho, oddm, macrocat e macroHOPO), per valutare se tali composti siano in grado di formare complessi più stabili con lo ione metallico rispetto al macropa, il chelante che al momento ha restituito i risultati più promettenti.

## CAPITOLO 3 – STUDIO DEGLI EQUILIBRI DI COMPLESSAMENTO

La stabilità termodinamica dei complessi del bario con i chelanti studiati in questa tesi è stata valutata mediante l'utilizzo di tre tecniche strumentali: potenziometria, spettroscopia NMR e spettrofotometria UV-Vis. Come descritto nei paragrafi successivi, opportune titolazioni di sistemi metallo-legante condotte con queste tecniche consentono di determinare le costanti di formazione dei complessi e la speciazione del sistema, ossia quale stechiometria abbiano le diverse specie presenti in soluzione in condizioni di equilibrio. Le tecniche potenziometriche e spettroscopiche (NMR e UV-Visibile) possono essere utilizzate per questi scopi in quanto risultano sensibili alla variazione di una o più grandezze alterate dalla formazione dei complessi metallo-legante; ad esempio, la potenziometria misura la variazione di concentrazione di ioni idrogeno in soluzione che si verifica se (come quasi sempre accade) il legante, lo ione metallico e/o il complesso possiedono proprietà acido-base di Brønsted. Inoltre queste tecniche sono tali per cui la misura non perturba l'equilibrio del sistema, un requisito essenziale per poter studiare reazioni all'equilibrio.

### 3.1 POTENZIOMETRIA

La tecnica sperimentale più comunemente impiegata per la determinazione delle costanti di complessamento tra metallo e legante è la potenziometria, mediante la quale viene misurata la differenza di potenziale  $E$ , detta anche forza elettromotrice (fem), tra un elettrodo di riferimento e un elettrodo di misura immerso nella soluzione da analizzare. Il potenziale all'equilibrio dell'elettrodo di misura deve dipendere dall'attività delle specie coinvolte nella formazione dei complessi. Alcuni vantaggi della potenziometria sono la possibilità di acquisire dati molto accurati e l'utilizzo di un apparato strumentale di semplice impiego e più economico rispetto ad altre tecniche.

L'elettrodo di misura più comunemente utilizzato per lo studio degli equilibri di complessamento metallo-legante è quello di vetro, con il quale è possibile determinare le variazioni di pH in una soluzione in cui si verificano reazioni di formazione e dissociazione dei complessi. La concentrazione di idrogenioni ( $\text{H}_3\text{O}^+$ , indicati per semplicità come  $\text{H}^+$ ) è infatti influenzata dall'equilibrio di complessamento secondo l'equazione 3.1.



Tale comportamento è dovuto al fatto che il legante presenta diversi atomi donatori per la coordinazione del metallo, i quali solitamente rappresentano anche dei siti acidi della molecola, per cui la formazione del legame con il metallo generalmente ne causa la deprotonazione, con una conseguente liberazione di idrogenioni in soluzione. Spesso anche lo ione metallico e il complesso

presentano proprietà acido-base di Brønsted, rendendo la reazione (3.1) ulteriormente influente sul pH della soluzione.

### 3.1.1 Elettrodo di vetro

L'elettrodo di vetro è uno strumento per le misure potenziometriche, in cui la parte sensibile alla concentrazione di ioni  $H^+$  è costituita da un bulbo di vetro contenente una soluzione tampone a pH costante. I dispositivi più comunemente impiegati sono gli elettrodi combinati, che accoppiano in un unico corpo l'elettrodo di misura, la cui membrana di vetro viene immersa nella soluzione da analizzare, e l'elettrodo di riferimento. La diversa concentrazione di idrogenioni ai due lati della membrana di vetro genera una differenza di potenziale, il cui valore dipende dall'attività degli ioni  $H^+$  nella soluzione da analizzare. Questa relazione viene descritta dalla legge di Nernst (equazione 3.2)

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln (a_H + \sum k_M a_M) - E_j \quad (3.2)$$

In cui

- $E^0$  è il potenziale standard dell'elettrodo, che raccoglie in un unico parametro diversi contributi costanti, tra cui il potenziale standard del riferimento interno all'elettrodo di vetro, il potenziale standard dell'elettrodo di riferimento e il potenziale di asimmetria della membrana<sup>17</sup>;
- $R$  è la costante universale dei gas ( $R = 8.31447 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ );
- $T$  è la temperatura espressa in Kelvin;
- $n$  rappresenta il numero di elettroni scambiati (per l'elettrodo di vetro  $n = 1$ );
- $F$  è la costante di Faraday, pari a  $96485.3 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$ , ossia la quantità di carica elettrica presente in una mole di elettroni. Il rapporto che include queste costanti,  $\frac{RT}{nF}$ , viene definito pendenza di Nernst ( $S$ ), pari a  $59.159 \text{ mV}$  alla temperatura di  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ;
- $a_H$  e  $a_M$  indicano rispettivamente le attività dello ione  $H_3O^+$  e di un generico catione interferente  $M$ ;
- $k_M$  è il coefficiente di selettività dell'elettrodo di vetro per un determinato catione interferente  $M$ . Nelle analisi potenziometriche effettuate in questo lavoro di tesi, lo ione  $Na^+$  rappresenta l'unico possibile interferente poiché è stato introdotto sia come elettrolita ( $NaCl$ ) per regolare la forza ionica delle soluzioni (**Paragrafo 3.1.2**), sia come base ( $NaOH$ ) durante le titolazioni.

---

<sup>17</sup> Il potenziale di asimmetria di membrana è una piccola differenza di potenziale che si genera a causa delle inevitabili disomogeneità nella struttura del bulbo.

Affinché l'elettrodo sia sufficientemente selettivo per gli ioni  $H^+$ , le costanti di selettività associate agli ioni interferenti devono essere basse;

- $E_j$  rappresenta il potenziale di giunzione, dovuto alla diversa mobilità degli ioni presenti nella soluzione in esame rispetto a quella in cui è immerso l'elettrodo di riferimento, tra le quali si genera quindi una separazione di carica ai due lati del setto poroso che le connette. Il contributo di  $E_j$  alla fem dell'elettrodo è in genere molto basso e costante quando si opera in un intervallo di pH tra 2 e 12.5; ciò è dovuto alla presenza di un sale molto concentrato (generalmente KCl 3M) come elettrolita per la soluzione interna all'elettrodo. A pH estremi il potenziale di giunzione aumenta a causa dell'elevata mobilità degli ioni  $H_3O^+$  e  $OH^-$ , fino a diventare non più trascurabile; poiché il suo valore è difficile da determinare, la misura di pH estremi risulta poco accurata. Il potenziale di giunzione è inoltre influenzato da diversi fattori quali la temperatura, la composizione delle due soluzioni all'interfaccia e la geometria del setto poroso.

La misurazione del pH con l'elettrodo di vetro al di fuori dell'intervallo tra 2 e 12 non si può ritenere affidabile. A valori di pH molto basici l'attività degli ioni interferenti non è trascurabile rispetto a quella degli ioni  $H^+$ , per cui nell'equazione 3.2 il prodotto  $k_M a_M$  incluso nella sommatoria diventa significativo e contribuisce ad aumentare il valore della fem insieme a  $a_H$ . In questa situazione il pH determinato sulla base del potenziale misurato dall'elettrodo risulta minore di quello effettivo: questo fenomeno è detto errore alcalino. L'errore a pH acido, invece, si verifica quando la soluzione in esame presenta un'elevata concentrazione di ioni  $H^+$ , tale da saturare i siti superficiali della membrana di vetro; per questo motivo la misurazione del potenziale con l'elettrodo di vetro a pH molto acidi presenta una deviazione rispetto all'equazione di Nernst.

### 3.1.2 CONTROLLO DELLA FORZA IONICA

Nella misurazione del potenziale di una soluzione con l'elettrodo di vetro, per ottenere dati accurati secondo l'equazione di Nernst (equazione 3.2) occorre considerare le attività delle specie presenti in soluzione, senza approssimarle alle rispettive concentrazioni.

L'attività di un generico ione M è data dal prodotto tra la sua concentrazione all'equilibrio [M] e il coefficiente di attività  $\gamma$  (equazione 3.3), un parametro con il quale vengono tenute in considerazione le deviazioni della specie considerata dal comportamento ideale.

$$a_M = \gamma [M] \quad (3.3)$$

Nelle soluzioni molto diluite (la cui concentrazione è inferiore a  $10^{-3}$  M) il valore di  $\gamma$  per uno specifico sale può essere ricavato in modo approssimativo con l'equazione di Debye-Huckel (equazione 3.4):

$$\log(\gamma) = -0.509 |z_+ z_-| I^{1/2} \quad (3.4)$$

In cui i termini  $z_+$  e  $z_-$  indicano le cariche degli ioni, mentre  $I$  rappresenta la forza ionica della soluzione. Quest'ultima viene calcolata con la seguente formula (equazione 3.5):

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2 \quad (3.5)$$

Dove  $C_i$  e  $z_i$  indicano rispettivamente la concentrazione molare o molale dello ione  $i$ -esimo e la sua carica.

In prima approssimazione, nelle soluzioni diluite i coefficienti di attività dipendono dalla forza ionica; ciò risulta utile in quanto, mantenendo  $I$  costante a livello sperimentale, anche i coefficienti di attività rimangono pressoché costanti e possono essere quindi inglobati nel parametro  $E^0$  nell'equazione di Nernst (3.2), oppure nelle costanti di equilibrio relative ad una determinata specie in soluzione. Il controllo della forza ionica risulta dunque un aspetto importante per la determinazione sperimentale delle costanti di equilibrio, in quanto permette di impiegare nei calcoli le concentrazioni anziché le attività delle specie coinvolte. Dal punto di vista pratico questa condizione viene realizzata aggiungendo alla soluzione in esame un elettrolita inerte di supporto, in concentrazione molto maggiore rispetto a quella delle altre specie presenti: in questo modo le variazioni di forza ionica causate dagli equilibri di complessamento risultano trascurabili rispetto al valore complessivo di  $I$  della soluzione. Per tutte le analisi condotte nel presente lavoro di tesi, nelle soluzioni è stata introdotta una quantità di NaCl tale per cui la concentrazione degli ioni cloruro fosse 0.15 M, rendendo la forza ionica simile a quella riscontrabile in condizioni fisiologiche.

### 3.1.3 DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI DI COMPLESSAMENTO

Ciascuna titolazione potenziometrica è stata condotta utilizzando un titolatore automatico, con il quale vengono aggiunti progressivamente piccoli volumi di titolante ad una soluzione contenente il legante ed il metallo. Lo strumento registra un valore di fem ad ogni aggiunta di titolante, restituendo una serie di punti sperimentali costituiti da coppie di valori (fem in funzione del volume di titolante). I dati ottenuti sono stati elaborati utilizzando il programma PITMAP, scritto in linguaggio Turbo Pascal e funzionante in ambiente DOS[1], per il calcolo delle costanti di equilibrio relative alle specie esistenti in soluzione. L'elaborazione si basa sul confronto tra i valori di potenziale misurati con l'elettrodo di vetro e quelli teorici, calcolati utilizzando l'equazione di Nernst (3.2). Per la

determinazione delle costanti di complessamento è necessario, in una prima fase, ipotizzare un modello di speciazione, ossia il numero e la stechiometria delle specie presenti in soluzione. Queste informazioni non sono note a priori, tuttavia la speciazione può essere scelta sulla base di dati presenti in letteratura relativi a sistemi analoghi, oppure con delle assunzioni ragionevoli basate sulle proprietà acido-base del legante e del metallo, escludendo specie non plausibili.

Successivamente, la curva di titolazione teorica viene ricavata risolvendo il sistema di equazioni relativo ai bilanci di massa e agli equilibri di formazione dei complessi, nel quale vengono incluse tutte le specie presenti nel modello di speciazione ipotizzato. Nel seguente sistema esemplificativo di equazioni le cariche sono omesse per semplicità (equazione 3.6).

$$\begin{aligned}
 C_M &= [M] + \sum_i^n m \beta_{m,l,h} [M]^m [L]^l [H]^h \\
 C_L &= [L] + \sum_i^n l \beta_{m,l,h} [M]^m [L]^l [H]^h \\
 C_H &= [H] + \sum_i^n h \beta_{m,l,h} [M]^m [L]^l [H]^h
 \end{aligned}
 \tag{3.6}$$

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

In cui:

- $C_M$ ,  $C_L$  e  $C_H$  sono rispettivamente le concentrazioni stechiometriche note di metallo, legante e protone, di cui si conosce la quantità introdotta inizialmente nella soluzione;
- $[M]$ ,  $[L]$  e  $[H]$  rappresentano le concentrazioni all'equilibrio di metallo, legante e protone liberi, che sono incognite;
- $m$ ,  $l$  e  $h$  sono i coefficienti stechiometrici di metallo, legante e protone nella specie  $i$ -esima.  $m$  ed  $l$  possono assumere solo valori positivi (o nulli), mentre  $h$  può assumere anche valori negativi per indicare la perdita di protoni; ciò equivale a dire che la specie considerata acquisisce dei gruppi ossidrilici (ad esempio, il complesso  $MLH_{-1}$  può essere analogamente indicato come  $MLOH$ );
- $n$  è il numero totale di specie presenti all'equilibrio, escluse  $M$ ,  $L$  e  $H$ ;
- $\beta_{m,l,h}$  sono le costanti di formazione globali dei complessi presenti in soluzione all'equilibrio. Dopo aver attribuito ad ogni  $\beta$  un numero iniziale arbitrario, il software PITMAP è in grado di ottimizzare tale valore attraverso la risoluzione iterativa del sistema di equazioni, in modo tale che la differenza tra i potenziali misurati sperimentalmente e quelli teorici calcolati mediante l'equazione di Nernst sia minima.

### 3.1.3.1 Elaborazione dei dati potenziometrici

L'operazione iniziale, sia nel programma PITMAP che in programmi analoghi disponibili nella letteratura specialistica, prevede la selezione delle specie che vengono ritenute presenti in soluzione (modello di speciazione); successivamente viene richiesto il caricamento del file contenente i dati potenziometrici ottenuti sperimentalmente. Il software presenta poi una serie di parametri coinvolti nei calcoli (**Tabella 3.1**), dei quali occorre fornire un valore iniziale. Alcuni di questi parametri sono noti e pertanto il loro valore viene mantenuto fisso; altri invece vengono ottimizzati in seguito dal programma.

**Tabella 3.1** Parametri impiegati dal software PITMAP nel calcolo delle costanti di equilibrio.

Parametri non termodinamici		Costanti di equilibrio
$E^0$	Potenziale standard	<u>Autoprotolisi</u> dell'acqua ( $K_w$ )
$S$	Pendenza di <u>Nernst</u>	Costanti di acidità delle specie $\text{HCO}_3^-$ e $\text{H}_2\text{CO}_3$ ( $K_a$ )
$k_{Na}$	Costante di errore alcalino	Costanti di acidità del legante ( $K_{aL}$ )
$imp$	Impurezze basiche o acide	Costanti di formazione dei complessi $[\text{M}_m\text{L}_l\text{H}_h]$ ( $\beta_{m,l,h}$ )
$\alpha$	Grado di carbonatazione della base ( <u>NaOH</u> )	
$C_b$	Titolo della base	
$C_L$	Titolo del legante	
$C_M$	Titolo del metallo	

Una volta compilati questi campi, PITMAP effettua il calcolo per la risoluzione del sistema di equazioni 3.6, ottenendo una curva di titolazione teorica in cui la concentrazione  $[\text{H}]$  calcolata (e convertita in valore di potenziale mediante l'equazione di Nernst) è tale da rendere la curva più simile possibile a quella sperimentale. Per ottenere una maggiore accuratezza dei risultati è opportuno ripetere l'ottimizzazione delle costanti di equilibrio, cambiando il valore iniziale dei parametri non noti e variando il modello di speciazione. I fattori che influenzano l'accuratezza della curva di titolazione ottimizzata sono le condizioni sperimentali, l'efficacia e la robustezza dell'algoritmo di *fitting*. Poiché la funzione da ottimizzare dipende dalla composizione della soluzione e non è lineare nei suoi parametri, anche l'algoritmo impiegato dev'essere non lineare. Quest'ultimo deve inoltre

riuscire ad ottimizzare funzioni implicite, in quanto le costanti di equilibrio ed altre variabili influenzano in modo implicito la concentrazione di protoni liberi in soluzione. [24] Il programma PITMAP utilizza il metodo del semplice e del *pit-mapping*, due algoritmi che si basano sul metodo dei minimi quadrati come tecnica di ottimizzazione.

### 3.1.3.2 Valutazione della bontà del *fitting*

Al fine di valutare la bontà del *fitting*, ovvero il grado di corrispondenza tra i punti della curva teorica e i punti sperimentali, viene considerata la seguente funzione (equazione 3.11):

$$\sigma_{\text{fit}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (E_{i,\text{calc}} - E_{i,\text{sper}})^2}{N-P}} \quad (3.7)$$

Dove:

- $N$  rappresenta il numero di punti sperimentali;
- $P$  è il numero di parametri ottimizzati;
- $E_{i,\text{calc}}$  indica il potenziale teorico del punto  $i$ -esimo calcolato mediante l'equazione di Nernst;
- $E_{i,\text{sper}}$  indica il valore sperimentale di potenziale per il punto  $i$ -esimo registrato durante la titolazione. Il numeratore all'interno della sommatoria rappresenta dunque la somma degli scarti tra i punti teorici e quelli sperimentali.

Poiché  $\sigma_{\text{fit}}$  non dipende dal numero di punti sperimentali considerati ma solo dalla loro dispersione rispetto al valore calcolato, questo parametro consente di confrontare tra loro i *fitting* derivanti da diversi esperimenti. La bontà del *fitting* di una curva teorica può anche essere valutata in termini assoluti, sulla base di un valore teorico atteso per  $\sigma_{\text{fit}}$ , che tiene conto della risoluzione strumentale. Nelle misure potenziometriche è stato utilizzato un voltmetro con una risoluzione di 0.1 mV; si può dunque considerare, per una distribuzione uniforme di ampiezza  $a = 0.1$ , una varianza ( $\sigma^2 = a/12$ ) tale per cui  $\sigma \cong 0.289 \cdot a = 0.0289$  mV. L'incertezza minima dei dati è quindi pari a circa 0.03 mV, che corrisponde al valore teorico atteso per  $\sigma_{\text{fit}}$  calcolato considerando esclusivamente l'errore strumentale. Dal punto di vista pratico è improbabile ottenere valori simili di  $\sigma_{\text{fit}}$ , in quanto nelle misure subentrano anche altre fonti di errore sperimentale; sulla base dell'esperienza pregressa, la bontà del *fitting* viene considerata adeguata quando il valore di  $\sigma_{\text{fit}}$  è minore di 0.5 mV nelle titolazioni acido-base o dei leganti, oppure inferiore a 1.0 mV nel caso di soluzioni contenenti sia il legante che il metallo. [27]

### 3.1.3.3 Il problema dei “falsi minimi”

Una possibile fonte di errore nella determinazione delle costanti di equilibrio è la convergenza dell’algoritmo di *fitting* verso un “falso minimo”, cioè un punto di minimo relativo della funzione  $\sigma_{fit}$ , che viene interpretato erroneamente dall’algoritmo come un minimo assoluto. Il numero di falsi minimi in cui l’algoritmo può incorrere è maggiore nei sistemi più complicati, i quali presentano dunque una probabilità maggiore di ottenere dei parametri ottimizzati in modo errato.

I risultati corretti del *fitting* possono essere distinti dai falsi minimi adottando alcuni accorgimenti. In primo luogo, si può ripetere l’ottimizzazione inserendo valori di partenza diversi per i parametri da determinare, dato che la convergenza verso un falso minimo deriva esclusivamente da specifiche combinazioni di valori. Inoltre, spesso può risultare utile impiegare un algoritmo di *fitting* differente. Talvolta è anche possibile confrontare i risultati ottenuti dal *fitting* con quelli eventualmente presenti in letteratura, oppure con valori ipotizzati sulla base delle condizioni sperimentali dell’analisi: deviazioni significative suggeriscono la convergenza dell’algoritmo verso un falso minimo. [27]

### 3.1.3.4 Scelta del modello di speciazione

Come spiegato in precedenza, nello studio di nuovi sistemi metallo-legante il modello di speciazione non è noto a priori, pertanto deve essere ipotizzato durante la fase iniziale dell’elaborazione. Per individuare la speciazione corretta bisogna dunque confrontare i *fitting* ottenuti per tutti i diversi modelli ipotizzati. A tal fine vengono valutati i valori di  $\sigma_{fit}$  ottenuti per i diversi modelli proposti: in linea generale la speciazione che presenta il  $\sigma_{fit}$  più basso corrisponde al modello corretto, per il quale la deviazione tra curva sperimentale e curva teorica è la minore possibile.

In alcuni casi, l’esistenza di alcune specie in soluzione proposta in un determinato modello potrebbe essere, in realtà, una modalità con cui l’algoritmo compensa piccoli errori sistematici commessi durante l’analisi per diminuire il valore di  $\sigma_{fit}$ . Vi sono alcuni esiti dei *fitting* che possono segnalare la presenza di errori di questo tipo. Ad esempio, se alcuni parametri ottimizzati assumono valori irrealistici o che differiscono molto nei vari esperimenti, è probabile che il modello presenti più specie di quelle realmente esistenti nella soluzione. In tal caso è opportuno ripetere il *fitting*, eliminando di volta in volta una specie diversa per identificare quale di queste deve essere esclusa. L’individuazione della specie corretta può essere facilitata operando gli esperimenti in condizioni differenti, ossia variando la concentrazione di metallo, di legante e il rapporto tra le due: per le specie inesistenti i valori ottimizzati delle costanti di equilibrio variano a seconda delle condizioni sperimentali, diversamente dalle costanti di formazione delle specie corrette. [27]

### 3.1.4 INFLUENZA DELL'AMBIENTE ESTERNO

Le titolazioni potenziometriche permettono di determinare la speciazione in maniera indiretta, mediante il confronto tra la curva sperimentale e quella teorica. La misura dei punti sperimentali è tuttavia influenzata da diversi fattori, tra cui la presenza di impurezze acide o basiche in soluzione, il malfunzionamento degli elettrodi o del sistema di misura e le condizioni dell'ambiente esterno al sistema (temperatura, luce ed umidità dell'aria). Queste ultime, se non vengono mantenute sotto controllo durante le analisi, possono causare errori non trascurabili nelle misurazioni. La temperatura è un fattore molto rilevante per la modifica del potenziale  $E$ , essendo una variabile dell'equazione di Nernst (equazione 3.2), dalla quale dipende anche il valore del parametro  $E^0$ . Al fine di evitare oscillazioni del potenziale (una variazione di  $1^\circ\text{C}$  modifica il potenziale registrato di circa  $1\text{ mV}$ ), la soluzione da analizzare viene posta in una cella termostata, che mantiene la temperatura costante nel corso della titolazione. Anche il volume erogato dalle burette automatiche viene influenzato dalla temperatura del laboratorio; poiché le burette non sono termostate, è necessario lavorare in condizioni controllate tra circa  $20^\circ\text{C}$  e  $30^\circ\text{C}$  affinché l'errore dovuto alla dilatazione dei volumi risulti trascurabile. Un secondo fattore che ha un'influenza rilevante sul valore di potenziale è la luce solare; dall'esperienza pregressa è noto che quest'ultima può determinare un'oscillazione del valore di  $E^0$  anche di  $2\text{ mV}$  entro lo stesso giorno, per cui l'errore che ne risulta è molto più elevato della risoluzione strumentale (pari a  $0.1\text{ mV}$ ). Infine, anche valori di umidità relativa dell'aria particolarmente bassi possono contribuire a provocare delle momentanee variazioni del potenziale misurato, dovute alla generazione di campi elettrici fluttuanti.

Al fine di minimizzare tali errori nella misura del potenziale, è necessario porre attenzione alle condizioni di preparazione e conservazione delle soluzioni; inoltre, le titolazioni potenziometriche devono essere condotte in un ambiente controllato, motivo per cui negli esperimenti viene utilizzata una cella termostata, che viene collocata all'interno di una scatola opaca circondata interamente da una rete metallica, creando in questo modo una gabbia di Faraday. [27]

### 3.1.5 LIMITI DELLA POTENZIOMETRIA

Nello studio degli equilibri in soluzione, i metodi potenziometrici presentano alcune limitazioni che possono ostacolare l'acquisizione di dati affidabili. Un primo limite riguarda la robustezza del metodo analitico, in quanto la concentrazione di ioni  $\text{H}^+$  misurata con l'elettrodo di vetro è influenzata solo in modo indiretto dagli equilibri di formazione dei complessi, e può essere condizionata dalla presenza di impurezze acide o basiche di qualsiasi natura all'interno della soluzione. In secondo luogo, nell'analisi di sistemi complicati, piccole oscillazioni del pH registrate dallo strumento possono essere interpretate dall'algoritmo come il risultato della formazione di complessi in realtà

inesistenti, portando dunque ad una valutazione errata del modello di speciazione. Poiché piccole variazioni della misura del potenziale possono determinare delle differenze significative nei risultati ottenuti, è fondamentale eseguire in modo accurato l'esperimento, limitando il più possibile l'introduzione di impurezze all'interno della soluzione e valutando con attenzione il *fitting* ottenuto. Inoltre, a differenza di altre tecniche come l'NMR, la potenziometria fornisce dei risultati esclusivamente quantitativi, per cui non si ottiene nessuna informazione qualitativa, come ad esempio la struttura delle specie esistenti. Un ulteriore limite di questa tecnica analitica è l'impossibilità di misurare con accuratezza il pH in condizioni estreme, al di fuori dell'intervallo compreso tra 2 e 12, dovuta ai fenomeni descritti in precedenza (**Paragrafo 3.1.1**).

Infine, per ottenere una correlazione tra il potenziale misurato e la composizione del sistema, quest'ultimo deve aver raggiunto l'equilibrio in ogni punto sperimentale registrato. Pertanto, il metodo potenziometrico risulta utilizzabile solo nel caso di reazioni sufficientemente veloci, che vanno a completezza in tempi massimi dell'ordine di alcuni minuti. Se il raggiungimento dell'equilibrio fosse più lento, sarebbe necessario allungare i tempi di analisi a ore o a giorni; tuttavia, in tali condizioni si verificano delle derive dei parametri relativi alla calibrazione dell'elettrodo, come  $E^0$  e la pendenza di Nernst, e di conseguenza si generano degli errori significativi nella misura del potenziale.

## 3.2 SPETTROSCOPIA NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è un'altra tecnica frequentemente impiegata nello studio degli equilibri acido-base e di complessamento metallo-legante in soluzione. Tali studi possono essere condotti mediante la registrazione di diversi spettri della stessa soluzione, che differiscono tra loro per il valore di pH o per le concentrazioni totali di metallo e legante; la valutazione dell'andamento degli spettri al variare di questi fattori permette di ottenere dei dati qualitativi, e in alcuni casi anche quantitativi, sulla formazione dei complessi in soluzione.

### 3.2.1 PRINCIPI TEORICI DELLA SPETTROSCOPIA NMR

La spettroscopia NMR è una tecnica analitica con la quale si possono ottenere informazioni dettagliate sulla struttura delle molecole. Essa si basa sull'osservazione del comportamento dei nuclei atomici di una molecola sotto l'influenza di un campo magnetico esterno; in particolare viene misurato l'assorbimento di una radiazione nello spettro delle onde radio (da 100 a 1000 MHz), che provoca transizioni di spin nucleare in particolari nuclei, come  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ . La tecnica NMR è infatti applicabile solo se le molecole in esame possiedono dei nuclei atomici caratterizzati da un numero

quantico di spin nucleare ( $I$ ) maggiore di zero, condizione che genera un momento magnetico nucleare ( $\mu$ ) non nullo.

Quando un campione viene introdotto in un campo magnetico esterno  $B_0$ , i momenti magnetici dei suoi nuclei atomici, inizialmente orientati in modo casuale nello spazio, si allineano al campo  $B_0$ . Il numero di orientazioni possibili per un nucleo, e di conseguenza anche il numero di stati energetici differenti che esso può assumere, è pari a  $2I + 1$ . Nuclei come  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  sono caratterizzati da un numero quantico di spin pari a  $1/2$ , per cui esistono due possibili stati a diversa energia. Irradiando i nuclei con un'onda elettromagnetica di energia opportuna, viene promossa la transizione dallo stato ad energia più bassa a quello con energia maggiore; le radiazioni che permettono l'eccitazione degli spin nucleari devono possedere una frequenza ( $\nu$ ) pari a quella dell'oscillazione dei momenti magnetici dei nuclei, detta frequenza di Larmor (equazione 3.8).

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (3.8)$$

Il parametro  $\gamma$  è definito rapporto giromagnetico ed è una proprietà intrinseca di ogni nucleo.

Oltre alla specie atomica, anche l'intorno chimico dei nuclei determina la quantità di energia necessaria per l'eccitazione degli spin nucleari. I moti elettronici nelle vicinanze del nucleo, dovuti agli altri atomi presenti nella struttura molecolare e al solvente, producono un campo magnetico locale ( $B_{\text{loc}}$ ), di minore intensità rispetto a  $B_0$ , che può avere lo stesso verso di  $B_0$  oppure verso opposto, agendo quindi da "schermatura". Il valore effettivo del campo magnetico risentito dai nuclei è dunque dato dall'equazione 3.9:

$$B = B_0 - B_{\text{loc}} \quad (3.9)$$

Maggiore è la densità elettronica dell'intorno chimico, maggiore è il modulo di  $B_{\text{loc}}$  opposto a  $B_0$ , e minore è la frequenza richiesta per la transizione. Di conseguenza, nuclei circondati da atomi meno elettronegativi subiscono una schermatura maggiore rispetto a quelli circondati da atomi più elettronegativi, pertanto subiscono la transizione di spin ad una frequenza minore.

Per esprimere la variazione di frequenza assorbita dai nuclei dell'analita (rispetto a un nucleo preso come riferimento) viene introdotta una grandezza definita spostamento chimico (*chemical shift*,  $\delta$ ). Nella spettroscopia  $^1\text{H}$ -NMR il riferimento scelto per convenzione è il tetrametilsilano (TMS), caratterizzato da dodici protoni che risuonano tutti alla stessa frequenza e risultano più fortemente schermati rispetto a quelli della maggior parte delle comuni molecole organiche. Il *chemical shift* di un protone viene espresso dall'equazione 3.10:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{TMS}}}{\nu_{\text{TMS}}} 10^6 \quad (3.10)$$

Dove  $\nu$  è la frequenza di risonanza del protone in esame e  $\nu_{\text{TMS}}$  è la frequenza dei protoni del tetrametilsilano. Il valore di  $\delta$ , espresso in parti per milione (ppm), è indipendente dal campo magnetico applicato  $B_0$ ; questo consente di confrontare tra loro spettri ottenuti con strumenti differenti, riportando l'intensità dei segnali associati ai diversi nuclei dell'analita in funzione del *chemical shift*.

L'esperimento NMR prevede l'irraggiamento del campione con un impulso di campo magnetico oscillante ( $B_1$ ), in grado di eccitare un intervallo di frequenze che consente la transizione di spin di tutti i nuclei di una determinata specie atomica (ad esempio  $^1\text{H}$  o  $^{13}\text{C}$ ). In seguito, parte della radiazione assorbita viene emessa durante il rilassamento dei nuclei allo stato fondamentale. Negli esperimenti NMR questo processo viene quasi sempre ripetuto più volte, irraggiando il campione con molti impulsi ripetuti separati da opportuni intervalli di tempo, che consentono il rilassamento dei nuclei e l'acquisizione del segnale. In questo modo viene registrato un elevato numero di spettri, dalla cui somma è possibile ricavare uno spettro dell'analita con un migliore rapporto segnale/rumore.

La tecnica NMR può essere utilizzata nello studio degli equilibri di complessamento, in quanto i segnali dei nuclei NMR-attivi del legante generalmente subiscono una variazione di *chemical shift* in seguito alla formazione del complesso con lo ione metallico. Tale fenomeno si verifica a causa della variazione dell'intorno chimico generata dal centro metallico, e per l'eventuale cambio di conformazione del legante nel passaggio dallo stato libero allo stato complessato.

Dalle analisi di una soluzione metallo-legante, ottenute raccogliendo una serie di spettri in cui vengono variate le condizioni sperimentali (il pH o le concentrazioni di metallo e legante), si possono acquisire diverse tipologie di informazioni relative alla formazione dei complessi. Oltre alla determinazione del numero di specie presenti in soluzione e talvolta della loro abbondanza relativa, questa tecnica permette anche di conoscere alcune proprietà strutturali delle molecole e come queste varino in seguito alla formazione dei complessi. In alcuni casi è anche possibile determinare quali atomi del legante sono impegnati nel legame di coordinazione con lo ione metallico.

### 3.2.2 $^1\text{H}$ -NMR

La tecnica NMR monodimensionale più utilizzata è quella protonica. L'osservazione del protone presenta alcuni vantaggi rispetto ad altri nuclei NMR-attivi, in quanto  $^1\text{H}$  è l'isotopo dell'idrogeno più abbondante in natura ed è caratterizzato da un elevato rapporto giromagnetico; queste proprietà rendono la tecnica  $^1\text{H}$ -NMR molto più sensibile rispetto all'NMR di altri nuclei.

Nella fase iniziale dell'esperimento viene applicato un impulso di frequenza tale per cui l'orientazione della risultante dei momenti magnetici nucleari (detta magnetizzazione) viene ruotata di 90°. Una volta terminato l'impulso, viene registrato il segnale prodotto dal rilassamento dei nuclei, definito FID (*free induction decay*), che nel tempo si riduce di intensità. Il FID di ciascun nucleo inoltre oscilla nel tempo con frequenza pari alla frequenza di Larmor del nucleo stesso. Di conseguenza, per un campione che contiene protoni con differenti frequenze di risonanza, il segnale raccolto è dato da una combinazione di altrettanti FID. Attraverso la procedura matematica nota come trasformata di Fourier, lo strumento converte il segnale misurato in funzione del tempo (il FID) in un grafico in funzione delle frequenze, cioè lo spettro NMR vero e proprio.

L'intorno chimico dei vari nuclei  $^1\text{H}$  viene descritto non solo dal valore di *chemical shift*, ma anche dalla molteplicità dei segnali, ossia dal numero di picchi che compongono un segnale spettrale, con la quale è possibile determinare la correlazione tra i nuclei  $^1\text{H}$  della molecola studiata. Il motivo per cui si osserva la molteplicità (o struttura fine) dei segnali è l'accoppiamento spin-spin, un fenomeno in cui gli stati di spin di un nucleo influenzano la frequenza di risonanza dei nuclei che lo circondano. In linea generale, nell'analisi  $^1\text{H}$ -NMR è possibile osservare la molteplicità dei segnali nel caso di accoppiamenti con protoni legati allo stesso carbonio (idrogeni geminali) o ad atomi di carbonio adiacenti (idrogeni vicinali), ma in alcuni casi si possono osservare anche degli accoppiamenti tra nuclei  $^1\text{H}$  collocati a distanze maggiori (ad esempio tra i protoni aromatici). Nello spettro di un composto, la struttura fine di ciascun segnale (che viene identificata come un singoletto, doppietto, tripletto, quartetto...) restituisce dunque delle importanti informazioni strutturali in merito alla connettività degli atomi. Dal confronto tra le aree dei vari segnali è inoltre possibile determinare il numero relativo di protoni coinvolti nella generazione di ogni segnale.

Solitamente i campioni vengono disciolti in un solvente deuterato, in cui un'elevata percentuale di atomi di idrogeno (attorno al 99%) è sostituita dal deuterio, che non genera alcun segnale nella regione spettrale dell'analita. L'ossido di deuterio ( $\text{D}_2\text{O}$ ) è un solvente che viene spesso utilizzato in sostituzione dell'acqua, il cui segnale può interferire con la misura dei segnali della molecola in esame. Per poter studiare i segnali dei nuclei protonici dell'analita in acqua, come avviene nella caratterizzazione degli equilibri acido-base e di complessamento (**Paragrafo 3.2.4**), si può in alternativa effettuare la soppressione del segnale del solvente mediante una sequenza di impulsi in grado di eliminare selettivamente il segnale di un picco molto intenso alla frequenza desiderata dall'operatore, come quello dovuto all' $\text{H}_2\text{O}$ . In questo modo è possibile vedere i segnali dell'analita annullando quasi completamente l'interferenza dovuta ai protoni del solvente. Un aspetto negativo di questa procedura è che essa sopprime qualsiasi segnale che risuoni ad una frequenza uguale o vicina

a quella dei protoni dell'acqua. Un esempio di sequenza per la soppressione del segnale del solvente, utilizzata anche in questo lavoro di tesi, è l'*excitation sculpting pulse scheme*.

### 3.2.3 TECNICHE BIDIMENSIONALI: TOCSY E HSQC

Gli esperimenti NMR bidimensionali (o di correlazione, 2D-NMR) forniscono degli spettri costituiti da due assi, in cui sono riportati i valori di *chemical shift*. I segnali dell'analita nei due assi sono riferiti allo stesso nucleo (solitamente il protone) nella correlazione omonucleare, mentre si riferiscono a due nuclei differenti nella correlazione eteronucleare. Nel primo caso gli spettri sono simmetrici rispetto alla diagonale e su questa sono sempre disposti dei picchi che corrispondono alla proiezione dello spettro monodimensionale del nucleo in esame. In entrambe le modalità (omonucleare e eteronucleare), i segnali fuori dalla diagonale (detti picchi di correlazione o *cross-peaks*) indicano l'esistenza di un'interazione tra nuclei diversi.

La raffigurazione di uno spettro 2D-NMR richiederebbe tre dimensioni: i due assi dei *chemical shift* e un terzo asse perpendicolare relativo all'intensità dei segnali. Tuttavia, per semplicità gli spettri 2D-NMR vengono rappresentati come grafici bidimensionali, in cui l'intensità dei picchi è proiettata sul piano mediante una scala di colori oppure attraverso curve di livello.

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate le tecniche bidimensionali TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) ed HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*). La prima è una tecnica omonucleare  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , che mostra correlazioni tra tutti i protoni dello stesso sistema di spin, permettendo di vedere accoppiamenti tra nuclei fino ad una distanza di 5-6 legami chimici. L'HSQC è invece una tecnica eteronucleare che permette di identificare le correlazioni tra nuclei (spesso  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , come in questa tesi) direttamente legati, ossia distanziati da un solo legame. Poiché la correlazione è eteronucleare, lo spettro ottenuto non risulta simmetrico, e non sono presenti i picchi di autocorrelazione disposti sulla diagonale.

### 3.2.4 DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI DI COMPLESSAMENTO

Tutti gli studi  $^1\text{H}$ -NMR monodimensionali eseguiti nel presente lavoro di tesi sono stati condotti su campioni preparati in soluzioni acquose a diversi valori di pH. Gli spettri così ottenuti consentono di individuare le variazioni di *chemical shift* dei nuclei protonici in funzione del pH, da cui è possibile ricavare le costanti di acidità ( $K_a$ ) del legante nello studio degli equilibri acido-base e le costanti di complessamento ( $\beta$ ) delle specie che si formano nelle soluzioni metallo-legante.

La formazione dei complessi, in base alle proprietà termodinamiche e cinetiche del sistema studiato, può dare due possibili esiti nello spettro NMR. Se l'equilibrio tra il legante libero e il complesso metallo-legante risulta lento rispetto alla scala dei tempi dell'esperimento NMR, queste specie

appaiono come due segnali distinti, la cui intensità dipende dalla loro concentrazione relativa nella soluzione in esame. In presenza di equilibri rapidi si ottiene invece un unico segnale, il cui *chemical shift* è dato dalla media tra i valori dei  $\delta$  che il legante e il complesso avrebbero se fossero distinti, pesata rispetto alla concentrazione relativa delle due specie in soluzione. L'andamento delle intensità dei segnali nel primo caso, o quello dei *chemical shift* nel secondo caso, possono fornire le informazioni quantitative richieste.

#### 3.2.4.1 Elaborazione dei dati $^1\text{H-NMR}$ tramite il software *Origin*

Per l'elaborazione dei dati sperimentali ottenuti dall'analisi  $^1\text{H-NMR}$  è stato utilizzato il programma di calcolo *Origin* in cui, selezionando la voce '*Nonlinear curve fit*', si possono eseguire i *fitting* dei punti sperimentali con un'equazione opportuna, se necessario anche inserita manualmente dall'utente. In una fase iniziale è necessario ipotizzare un possibile modello di speciazione, che viene scelto valutando gli spettri NMR ottenuti, oppure sulla base di dati presenti in letteratura e/o ricavati mediante altre tecniche. In seguito, occorre ricavare l'equazione teorica che permette di descrivere in modo opportuno i dati sperimentali. Tale funzione deve esprimere la relazione tra l'intensità dei segnali osservati, oppure il valore dei loro *chemical shift*, e il pH, tenendo conto degli equilibri acido-base del legante ( $K_a$ ) e degli equilibri di formazione dei complessi ( $\beta$ ) inclusi nel modello di speciazione scelto. Il programma confronta, per ogni punto sperimentale, i *chemical shift* o le intensità dei segnali ottenuti sperimentalmente con i valori teorici calcolati dall'algoritmo, che vengono ottimizzati in modo iterativo per minimizzare le differenze tra i due valori.

Il *software* restituisce inoltre dei parametri che si possono usare come indici di bontà per valutare il *fitting* e confrontarlo con quelli ottenuti scegliendo altri modelli teorici. Uno di questi indici è la somma dei quadrati degli scarti (*Residual Sum of Squares*, RSS), che misura la deviazione dei dati teorici calcolati dal *fitting* da quelli sperimentali, e che deve essere il più basso possibile.

#### 3.2.5 VANTAGGI E LIMITI DELLA SPETTROSCOPIA NMR

La formazione di un complesso metallo-legante può essere studiata mediante la tecnica NMR solo se gli spettri si modificano in seguito al complessamento, condizione che si verifica quando i nuclei NMR-attivi monitorati del legante (ossia i protoni  $^1\text{H}$ ) si trovano vicini ai siti di coordinazione del metallo. Questa proprietà permette in genere di determinare anche quali atomi del legante sono impegnati nel legame con lo ione metallico e di individuare eventuali cambi conformazionali indotti dal complessamento. La spettroscopia NMR è dunque in grado di fornire informazioni aggiuntive rispetto al metodo potenziometrico, oltre ad essere utilizzata come tecnica di supporto dei risultati potenziometrici. Inoltre, le titolazioni NMR possono essere condotte anche in situazioni in cui non è

possibile utilizzare la potenziometria, ovvero in condizioni estreme di pH e quando le reazioni di complessamento risultano lente (**Paragrafo 3.1.5**).

Lo svantaggio principale della spettroscopia NMR è che essa fornisce dati quantitativi meno accurati rispetto alla potenziometria: da questo limite, tuttavia, consegue il vantaggio di poter utilizzare l'NMR con un setup sperimentale meno rigoroso.

### 3.3 SPETTROFOTOMETRIA UV-Vis

La spettrofotometria UV-Visibile è una tecnica spettroscopica di comune impiego che si basa sulle proprietà di molecole o ioni metallici di assorbire radiazioni elettromagnetiche nel campo dell'ultravioletto (200-400 nm), della luce visibile (400-800 nm) e del vicino IR (800-1000 nm). Le analisi spettroscopiche di assorbimento UV-Vis permettono di ottenere informazioni di tipo sia quantitativo che qualitativo sulle specie presenti in una soluzione. Nello studio degli equilibri di complessamento metallo-legante, questa tecnica può risultare utile nei casi in cui lo spettro UV-Visibile della soluzione si modifichi in seguito alla formazione dei complessi.

#### 3.3.1 PRINCIPI TEORICI DELL'ASSORBIMENTO UV-Vis

Quando un campione di materia viene investito da una radiazione elettromagnetica con un'energia sufficiente (nell'intervallo 200-1000 nm), si può verificare un fenomeno di assorbimento, in cui parte dell'energia della radiazione viene trasferita alle molecole del campione causando transizioni elettroniche. Di conseguenza, il fascio di luce incidente sul campione presenta un'intensità maggiore rispetto al fascio emergente. L'entità dell'assorbimento di radiazione da parte del campione può essere descritta in termini di trasmittanza ( $T$ ), definita come il rapporto tra l'intensità  $I$  della radiazione emergente dal campione e l'intensità  $I_0$  del raggio incidente. Una grandezza più comunemente utilizzata è l'assorbanza ( $A$ ), definita dall'equazione 3.11:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (3.11)$$

Secondo la legge di Lambert-Beer (equazione 3.12), il valore dell'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione  $C$  della sostanza assorbente, oltre che alla lunghezza del percorso compiuto dalla radiazione attraverso il campione ( $b$ ):

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda b C \quad (3.12)$$

In cui:

- $A_\lambda$  rappresenta l'assorbanza, il cui valore è adimensionale, misurata ad una determinata lunghezza d'onda  $\lambda$ ;
- $b$  indica il cammino ottico, espresso in cm. Nelle comuni analisi di assorbimento UV-Vis si utilizzano solitamente delle celle con cammino ottico di 1 cm;
- $\varepsilon_\lambda$  è il coefficiente di estinzione molare, una costante caratteristica della specie in esame, e si misura in  $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ .  $\varepsilon_\lambda$  esprime l'assorbanza di una sostanza misurata ad una determinata  $\lambda$ , a concentrazione 1 M e in una cella di cammino ottico pari a 1 cm. Maggiore è il valore di  $\varepsilon_\lambda$  di una sostanza, maggiore è la sensibilità della tecnica per l'analisi di tale composto;
- $C$  è la concentrazione molare (mol/L) della sostanza in esame.

Lo strumento utilizzato per la misura dell'assorbanza è lo spettrofotometro UV-Vis, che restituisce uno spettro in cui viene riportato il valore di  $A$  in funzione della lunghezza d'onda  $\lambda$ . Lo spettro UV-Visibile di un composto dipende principalmente dai gruppi cromofori che caratterizzano la molecola, ma anche dalla natura solvente utilizzato, che può interagire con i cromofori stessi. Per consentire la misura di assorbanza di un campione, il solvente e la cella di misura devono presentare un'assorbanza nulla o trascurabile nell'intervallo di lunghezze d'onda in cui la sostanza assorbe. Inoltre, gli spettri UV-Vis di composti con uno o più gruppi acidi sono influenzati anche dal pH della soluzione, in quanto ogni forma diversamente protonata della molecola può presentare uno spettro differente.

### 3.3.2 DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI DI COMPLESSAMENTO

Lo studio degli equilibri di complessamento metallo-legante può essere condotto mediante la registrazione degli spettri UV-Vis di una serie di soluzioni che contengono i vari componenti ma a concentrazioni o a pH differenti, allo scopo di ricavare gli andamenti dell'assorbanza ad opportuni valori di lunghezza d'onda (spesso corrispondenti ai massimi di assorbimento). Essendo l'assorbanza una proprietà additiva, lo spettro risultante è dato dalla somma dei contributi di ogni singola specie assorbente presente in soluzione. La determinazione delle costanti di formazione dei complessi può essere ottenuta mediante la risoluzione di un sistema complesso di equazioni (equazione 3.13), che comprende l'applicazione della legge di Lambert-Beer, i bilanci di massa relativi al metallo e al legante, le espressioni delle costanti di acidità del legante e delle costanti di formazione dei complessi. Ad esempio, se le specie presenti sono un acido monoprotico HL, un metallo M ed un complesso di stechiometria ML, le equazioni sono le seguenti:

$$\begin{aligned}
 A &= A_{ML} + A_{HL} + A_M + A_L = b(\varepsilon_{HL}[HL] + \varepsilon_M[M] + \varepsilon_{ML}[ML] - \varepsilon_{HL}C_{HL} - \varepsilon_L C_L - \varepsilon_M C_M) \\
 [HL] + [ML] + [L] &= C_L \\
 [M] + [ML] &= C_M
 \end{aligned}
 \tag{3.13}$$

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

$$\beta = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

Risolviendo il sistema di equazioni relativo al modello di speciazione ipotizzato, si ricava una funzione che esprime il valore dell'assorbanza al variare del pH. A partire da questa funzione è possibile, mediante un programma di calcolo, eseguire il *fitting* dei punti sperimentali. I parametri che vengono ottimizzati dall'algoritmo di *fitting* sono i coefficienti di estinzione molare ( $\epsilon_\lambda$ ) di tutte le specie e le costanti di formazione dei complessi ( $\beta_{m,l,h}$ ). Due software di calcolo utilizzabili sono *Origin* (impiegato anche per l'elaborazione dei dati NMR) e *HypSpec* [28].

### 3.3.3 VANTAGGI E LIMITI DELLA SPETTROFOTOMETRIA UV-Vis

La spettrofotometria UV-Vis può essere sfruttata quando almeno una specie presente in soluzione presenta dei cromofori e la formazione del complesso metallo-legante comporta una modifica dello spettro di assorbimento rispetto a quello delle specie libere. I principali vantaggi della tecnica UV-Vis sono la possibilità di operare in un intervallo di pH più ampio e di utilizzare concentrazioni inferiori di uno o due ordini di grandezza rispetto alle analisi potenziometriche, caratteristica che risulta particolarmente utile quando i leganti sono poco solubili o sono disponibili in quantità limitata. Tuttavia, un limite importante di questa tecnica è la minore accuratezza per i dati quantitativi ottenuti rispetto alla potenziometria, soprattutto nei sistemi caratterizzati da un elevato numero di specie.

## **CAPITOLO 4 – PARTE SPERIMENTALE**

### **4.1 STRUMENTAZIONE**

- Titolatore automatico Metrohm 765 Dosimat, dotato di burette da 5 mL
- Cella potenziometrica dotata di mantello termostato a doppia parete, con una capacità di 10 mL
- Termostato ad acqua Falc SB 5, con controllo di temperatura FA 90
- Sistema Veolia Purelab Chorus (acqua ultrapura)
- Sistema di erogazione e pre-saturazione dell'azoto, composto da due gorgogliatori in serie, il primo contenente NaOH 0.05 M e il secondo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 M
- Elettrodo di vetro combinato Hamilton pH 0-14
- pH-metro Metrohm 713
- Elettrodo di vetro combinato Crison pH 0-14
- pH-metro XS pH50 VioLab (XS Instruments)
- Sonda termometrica Metrohm 6.1110.100, Pt 1000/B/2
- Bilancia analitica Gibertini CA 312
- Bilancia tecnica Gibertini TM 560-2R
- Spettrofotometro UV-Vis Cary 60 (Agilent), con cuvette in quarzo di cammino ottico 1 cm
- Spettrometro NMR 400 MHz Bruker AMX 400

### **4.2 REAGENTI**

- Acqua ultrapura prodotta dal sistema Veolia Purelab Chorus
- Idrossido di sodio, NaOH, EMSURE, titolo 99-100%
- Acido cloridrico, HCl, Sigma-Aldrich, 37%
- Cloruro di sodio, NaCl, Sigma-Aldrich, ≥ 99.0%
- Acqua deuterata, D<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich, 99%
- Sale sodico dell'acido trimetilsilico propionico (TSP), Sigma-Aldrich, ≥ 99.0%
- Tamponi commerciali a pH 4.01 e 7.00 (XS Instruments)

- Cloruro di bario diidrato,  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , JANSSEN, titolo 99%
- macrocat, prodotto di sintesi<sup>18</sup>
- oddm, prodotto di sintesi<sup>1</sup>
- macroHOPO, prodotto di sintesi<sup>1</sup>

### 4.3 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI

Nel presente lavoro di tesi la concentrazione di ogni soluzione viene espressa in molarità ( $M = \text{mol/L}$ ). Il solvente utilizzato per la preparazione delle soluzioni è l'acqua ultrapura, in cui è sempre stato disciolto anche cloruro di sodio come elettrolita di supporto in quantità tale da ottenere una forza ionica pari a 0.15 M (**Paragrafo 3.1.2**). Nei paragrafi successivi viene utilizzata la notazione (Na)Cl per specificare che la molarità indicata è riferita agli ioni  $\text{Cl}^-$ , mentre la concentrazione di ioni sodio dipende dalla composizione della soluzione. Quando non in uso, le soluzioni dei leganti sono state conservate in frigorifero (+ 4 °C).

#### 4.1.1 SOLUZIONI DEI LEGANTI E DI $\text{Ba}^{2+}$

Ciascuna soluzione di legante è stata preparata in un matraccio tarato di vetro. I prodotti di sintesi sono stati pesati con bilancia analitica e solubilizzati in acqua ultrapura con NaCl 0.15 M. Nella **Tabella 4.1** è riportato l'elenco delle soluzioni preparate con le relative concentrazioni, calcolate in base alla pesata considerando i seguenti valori di massa molare: 506.60 g/mol per il macrocat, 466.44 g/mol per l'oddm, 104.06 g/mol per l'acido malonico e 508.57 g/mol per il macroHOPO.

**Tabella 4.1** Titolo delle soluzioni di legante preparate

Soluzione	Legante	Concentrazione (mM)
L1	macrocat	3.356
L2	oddm	2.154
L3	acido malonico	5.285
L4	macroHOPO	5.584
L5	macrocat	3.474
L6	macroHOPO	5.663

<sup>18</sup> La sintesi dei leganti macrociclici è stata eseguita dalla dott.ssa Sara Franchi in collaborazione con il gruppo del prof. Fabrizio Mancin presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

Per la preparazione di una soluzione contenente lo ione  $\text{Ba}^{2+}$  a forza ionica controllata è stato utilizzato il sale  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  disciolto in acqua ultrapura, alla quale è stato aggiunto  $\text{NaCl}$  come elettrolita di supporto. Le quantità dei due sali, pesate alla bilancia analitica, sono state tali da ottenere delle concentrazioni di  $\text{Ba}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$  uguali rispettivamente a 20 mM e 0.15 M.

#### 4.1.2 SOLUZIONI DI TITOLANTE PER LE MISURE POTENZIOMETRICHE

Nella maggior parte delle analisi potenziometriche eseguite in questo lavoro di tesi la base impiegata come titolante è una soluzione di  $\text{NaOH}$  a una concentrazione nominale di 0.1 M, contenente come elettrolita  $\text{NaCl}$  ( $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M). Per conoscere con esattezza il titolo della base sono state condotte una serie di titolazioni acido-base, utilizzando una soluzione di  $\text{HCl}$  0.1 M: questa è stata preparata diluendo l'acido cloridrico concentrato in acqua ultrapura, nella quale è stata disciolta una quantità opportuna di  $\text{NaCl}$ , e il suo titolo esatto è stato determinato mediante standardizzazione con uno standard primario ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro) a concentrazione nota (**Paragrafo 4.4.1.2**).

Un aspetto importante da considerare quando si utilizzano soluzioni basiche è il processo di carbonatazione, che causa una diminuzione progressiva del titolo della base nel tempo. Tale fenomeno è dovuto alla presenza di  $\text{CO}_2$  atmosferica la quale, disciogliendosi in soluzione, dà luogo alla seguente reazione irreversibile (equazione 4.1):



La carbonatazione genera una miscela di base forte ( $\text{NaOH}$ ) e base debole diprotica ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), che renderebbe più complessa la trattazione degli equilibri acido-base se tale soluzione fosse usata come titolante. Poiché le modifiche causate dalla carbonatazione della soluzione della base non possono essere trascurate, è necessario limitare questo fenomeno adottando degli accorgimenti nella preparazione e conservazione della base.

In primo luogo, l'acqua ultrapura utilizzata come solvente è stata portata ad ebollizione per almeno 15 minuti allo scopo di allontanare le tracce di  $\text{CO}_2$  in essa disciolte, lasciandola poi raffreddare in ambiente protetto. Una parte dell'acqua è stata poi usata per lavare i pellet di  $\text{NaOH}$  pesati in precedenza, in modo tale da rimuovere i residui di carbonato presenti sulla superficie. Dopo aver rapidamente solubilizzato nell'acqua bollita i pellet di  $\text{NaOH}$  e una quantità opportuna di  $\text{NaCl}$ , la soluzione di base è stata chiusa all'interno di un contenitore di polietilene, rivestito con fogli di alluminio fissati da nastro isolante per ridurre il più possibile l'ingresso di anidride carbonica per diffusione nella plastica. La sostituzione del vetro con il polietilene serve ad evitare la possibile reazione di  $\text{NaOH}$  con i gruppi silanolicci presenti sulla superficie del vetro (equazione 4.2), che causerebbe una diminuzione progressiva del titolo della base.



Inoltre, l'imboccatura del recipiente presenta una siringa contenente calce sodata (una miscela la cui composizione è data dal 75% di  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , dal 20% di  $\text{H}_2\text{O}$ , dal 3% di  $\text{NaOH}$  e dal 2% di  $\text{KOH}$ ), utile ad estrarre la  $\text{CO}_2$  presente nell'aria che entra all'interno del contenitore durante le titolazioni e a depositarla in forma di carbonati insolubili. Nonostante le numerose precauzioni appena descritte, la carbonatazione della base non è del tutto eliminabile: l'esperienza pregressa ha mostrato che ogni soluzione di  $\text{NaOH}$  può essere utilizzata come titolante per un periodo massimo di 30 giorni circa.

Nelle analisi del legante oddm, per impedire il contatto iniziale e prolungato di questo composto con un ambiente fortemente acido, le titolazioni potenziometriche sono state condotte portando la soluzione di analita ad un pH iniziale di circa 12 e utilizzando come titolante la soluzione standardizzata di  $\text{HCl}$  0.1 M.

#### 4.1.3 SOLUZIONI PER LE SPETTROSCOPIE NMR E UV-Vis

Per le analisi di spettroscopia NMR, le soluzioni descritte nel paragrafo 4.3.1 sono state opportunamente diluite in una miscela di acqua ultrapura e  $\text{D}_2\text{O}$ , con un rapporto in volume pari a 90:10, e sempre in presenza di  $\text{NaCl}$  0.15 M. Nelle soluzioni è stata aggiunta anche una piccola quantità TSP, un riferimento interno che viene spesso usato nelle misure NMR condotte in solventi acquosi al posto del tetrametilsilano. La soluzione NMR di legante è stata preparata utilizzando un volume della soluzione iniziale (**Paragrafo 4.3.1**) tale da ottenere una concentrazione finale di legante pari a 1 mM. Per le miscele  $\text{Ba}^{2+}$ -legante sono stati impiegati dei volumi delle soluzioni iniziali di legante e di  $\text{BaCl}_2$  (**Paragrafo 4.3.1**) tali da ottenere un rapporto stechiometrico 1:1, con concentrazioni pari a 1 mM.

Nelle analisi dei leganti studiati mediante spettroscopia UV-Vis sono state utilizzate le soluzioni descritte nel **Paragrafo 4.3.1**, opportunamente diluite con acqua ultrapura ( $I(\text{Na})\text{Cl} = 0.15 \text{ M}$ ) in modo da ottenere degli spettri con un valore di assorbanza compreso nell'intervallo desiderato ( $A \leq 1.5$ ).

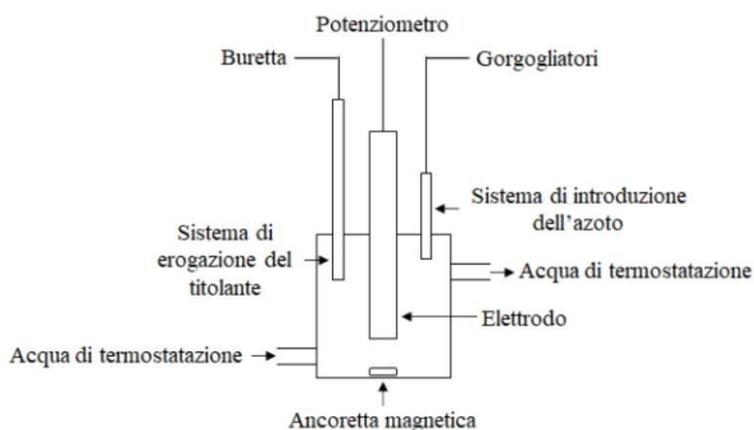
Per ottenere le variazioni di pH volute nelle soluzioni per le spettroscopie NMR e UV-Vis sono stati aggiunti piccoli volumi di un acido forte ( $\text{HCl}$  1 M o 0.1 M) e/o di una base forte ( $\text{NaOH}$  1 M o 0.1 M), tali per cui la diluizione della soluzione di partenza risultasse trascurabile. La misura del pH è stata condotta utilizzando un elettrodo di vetro combinato calibrato con tamponi commerciali a pH 4.01 e 7.00.

## 4.2 PROCEDURE SPERIMENTALI

### 4.2.1 PROCEDURE SPERIMENTALI PER LE TITOLAZIONI POTENZIOMETRICHE

#### 4.2.1.1 Strumentazione

L'apparato strumentale impiegato nelle titolazioni potenziometriche si compone di un titolatore automatico con buretta intercambiabile, un potenziometro e un sensore di temperatura, che vengono gestiti tramite un computer esterno. Il potenziometro misura la fem mediante un elettrodo di vetro combinato (**Figura 4.1**).



**Figura 4.1** Rappresentazione dei componenti dell'apparato strumentale impiegato nelle titolazioni potenziometriche.

Durante gli esperimenti, la cella di misura in cui viene introdotta la soluzione di analita è stata mantenuta a una temperatura costante ( $25.0 \pm 0.2$  °C) con un termostato ad acqua. La composizione e la temperatura sono state mantenute uniformi nella soluzione tramite l'utilizzo di un agitatore magnetico, impostato ad una velocità di agitazione costante in tutti gli esperimenti. Inoltre, tutto il sistema di misura è stato posto al riparo dalla luce all'interno di una gabbia di Faraday per limitare il più possibile le derive di potenziale dovute a fattori ambientali (**Paragrafo 3.1.4**).

Nella cella sono stati adottati degli accorgimenti per minimizzare il contatto della soluzione con la CO<sub>2</sub> atmosferica, la cui solubilizzazione è favorita in ambiente neutro e basico (equazione 4.3). A tale scopo all'ambiente della cella viene fornito un flusso costante di azoto purificato e presaturato.



Il titolatore automatico viene gestito utilizzando il programma *Automat1*, che permette di regolare l'erogazione del titolante sulla base di alcuni parametri impostati prima di iniziare la titolazione:

- $V_{\min}$  (mL): volume minimo di titolante aggiunto per ogni punto della titolazione;
- $V_{\max}$  (mL): volume massimo di titolante aggiunto per ogni punto della titolazione;
- $V_{\text{fin}}$  (mL): volume complessivo di titolante aggiunto, oltre il quale la titolazione viene fermata;
- $t_{\min}$  (s): tempo minimo di attesa tra aggiunte successive;
- $t_{\max}$  (s): tempo massimo di attesa tra aggiunte successive;
- $E_{\text{fin}}$  (mV): valore di potenziale in corrispondenza del quale la titolazione viene arrestata;
- $E_{\text{att}}$  (mV): variazione di potenziale attesa dopo l'aggiunta di titolante, fissato ad un valore di 5.00 mV in tutte le titolazioni. Il programma determina il volume di ogni singola aggiunta (compreso tra  $V_{\min}$  e  $V_{\max}$ ) in base alla variazione di f.e.m. indotta dall'aggiunta precedente.
- $d$  (mV/min): deriva massima ammessa del potenziale affinché possa iniziare l'aggiunta successiva, impostato ad un valore di 0.10 mV/min in tutte le titolazioni. Se il tempo di attesa risultasse maggiore rispetto a  $t_{\max}$ , il titolatore eseguirebbe comunque l'aggiunta successiva, ma in tal caso il valore di potenziale registrato verrebbe segnato dal programma come punto di non equilibrio.

I punti sperimentali della titolazione vengono registrati dal programma *Automat1* come valori di potenziale in funzione del volume di titolante aggiunto. A fianco di ciascun valore di potenziale viene indicato se durante la misura è stata raggiunta la condizione di equilibrio o meno.

#### 4.2.1.2 Standardizzazione della soluzione di HCl

La standardizzazione della soluzione di HCl 0.1 M (**Paragrafo 4.3.2**) è stata eseguita utilizzando come standard primario il carbonato di sodio, la cui polvere è stata precedentemente posta ad essiccare in muffola a 260-270 °C per due ore. Al fine di ottenere un risultato più accurato, il titolo della soluzione viene determinato eseguendo dieci titolazioni ripetute, nelle quali avvengono le seguenti reazioni (equazione 4.4):



Per ciascuna titolazione lo standard primario (~ 0.026 g) è stato pesato accuratamente mediante bilancia analitica e disciolto all'interno della cella di misura con 3 mL di acqua ultrapura contenente NaCl 0.15 M, mentre la soluzione di HCl da titolare è stata collegata alla buretta del titolatore automatico. Dei due punti di equivalenza disponibili per il carbonato, base diprotica, viene registrato solamente il secondo essendo maggiormente accurato. A tale scopo, la soluzione nella cella viene portata ad un pH inferiore mediante l'aggiunta iniziale di 3.0 mL di HCl 0.1 M. I parametri nel programma *Automat1* sono stati impostati ai valori indicati nella **Tabella 4.2**. Al termine di ogni titolazione è stata misurata la temperatura della cella. La concentrazione esatta è stata calcolata per

ogni titolazione utilizzando il metodo di linearizzazione di Gran; dalla media aritmetica dei valori ottenuti è stato ricavato il titolo esatto della soluzione di HCl.

#### 4.2.1.3 Calibrazione dell'elettrodo di vetro

La soluzione di HCl standardizzata (**Paragrafo 4.4.1.2**) è stata impiegata per la calibrazione dell'elettrodo di vetro, che viene eseguita mediante l'aggiunta di sei aliquote di un volume noto e costante di HCl ad una soluzione di acqua ultrapura con NaCl 0.15 M (3 mL) posta nella cella di misura. Nella **Tabella 4.2** sono riportati i parametri impostati nel programma. Questa procedura precede ogni titolazione di NaOH che viene eseguita per la standardizzazione della base (**Paragrafo 4.4.1.4**), allo scopo di ottenere per ciascuna di esse il valore del parametro  $E^0$  grazie all'elaborazione dei dati con il programma PITMAP.

#### 4.2.1.4 Standardizzazione delle soluzioni di NaOH

Il titolo esatto delle soluzioni di NaOH preparate (**Paragrafo 4.3.2**) è stato determinato eseguendo una serie di dieci misure ripetute, che consistono nella titolazione con NaOH della soluzione presente nella cella di misura al termine di ogni calibrazione. La **Tabella 4.2** riporta i valori impostati per i parametri nel programma *Automat1*. Per ciascuna titolazione è stata calcolata la concentrazione di NaOH utilizzando il metodo di linearizzazione di Gran; dalla media aritmetica di tali valori è stato ottenuto un titolo orientativo della soluzione, successivamente sostituito con un valore più accurato a seguito dell'elaborazione dei dati sperimentali con il programma PITMAP.

**Tabella 4.2** Valori dei parametri del programma *Automat1* impostati per eseguire la calibrazione dell'elettrodo e la standardizzazione delle soluzioni dei titolanti (NaOH e HCl).

Parametro	Standardizzazione HCl	Calibrazione elettrodo	Standardizzazione NaOH
$V_{\min}$ (mL)	0.02	0.10	0.02
$V_{\max}$ (mL)	0.20	0.10	0.20
$V_{\text{fin}}$ (mL)	5.00	0.60	5.00
$t_{\min}$ (s)	40.0	40.0	40.0
$t_{\max}$ (s)	80.0	80.0	80.0
$E_{\text{fin}}$ (mV)	280.0	1000 (valore arbitrario elevato)	-280.0

#### 4.2.1.5 Titolazioni delle soluzioni di legante

Ciascun legante studiato nel presente lavoro di tesi è stato titolato al fine di determinarne le costanti di dissociazione acida (o costanti di acidità). In ogni titolazione un opportuno volume di soluzione di legante è stato aggiunto nella cella di misura e diluito in acqua ultrapura con NaCl 0.15 M, in modo tale da ottenere un volume finale di 3 mL e una concentrazione di legante pari a 1 mM. Nel caso dei composti macrocat e macroHOPO, la soluzione così preparata è stata portata a un pH ~ 2 aggiungendo HCl 0.1 M, e titolata con NaOH 0.1 M fino a pH di circa 12. Al contrario, alla soluzione di oddm è stato aggiunto NaOH 0.1 M per ottenere un pH iniziale di circa 12, e il titolante impiegato è HCl 0.1 M; la titolazione è stata arrestata al raggiungimento di un pH ~ 2. I parametri impostati nel programma *Automat1* per i diversi leganti sono riportati nella **Tabella 4.3**.

#### 4.2.1.6 Titolazioni delle miscele Ba<sup>2+</sup>-legante

Nel presente lavoro di tesi le titolazioni potenziometriche delle miscele Ba<sup>2+</sup>-legante per lo studio degli equilibri di complessamento sono state eseguite per i leganti macrocat e macroHOPO. La soluzione da analizzare è stata preparata nella cella di misura mediante un'opportuna diluizione della soluzione di legante (**Paragrafo 4.3.1**) in acqua ultrapura ( $I = \text{NaCl } 0.15 \text{ M}$ ) e l'aggiunta di un opportuno volume di soluzione di BaCl<sub>2</sub> (**Paragrafo 4.3.1**), in modo tale da ottenere 3 mL di soluzione con concentrazioni di metallo e legante entrambe pari 1 mM (e dunque un rapporto

stechiometrico metallo-legante di 1:1). Tale soluzione è stata portata a pH  $\sim 2$  mediante l'aggiunta di HCl 0.1 M; in seguito è stata lasciata in agitazione per alcuni minuti, allo scopo di consentire il raggiungimento dell'equilibrio. La titolazione è stata condotta utilizzando come titolante NaOH 0.1 M e impostando i parametri nel programma *Automat1* secondo quanto riportato nella **Tabella 4.3**. Le tempistiche di queste titolazioni sono state dilatate, rispetto a quelle di tutte le precedenti, per tenere conto di (possibili) inerzie cinetiche nelle reazioni di complessamento.

**Tabella 4.3** Valori dei parametri del programma *Automat1* impostati per le titolazioni potenziometriche dei leganti e delle miscele Ba<sup>2+</sup>-legante.

Parametri	Leganti	Miscele Ba <sup>2+</sup> -legante
$V_{\min}$ (mL)	0.01	0.01
$V_{\max}$ (mL)	0.20	0.20
$V_{\text{fin}}$ (mL)	5.00	5.00
$t_{\min}$ (s)	40.0	80
$t_{\max}$ (s)	80.0	160
$E_{\text{fin}}$ (mV)	-280.0 (280.0 per oddm)	-280.0

#### 4.2.1.7 Conservazione dell'elettrodo

All'inizio e al termine di ogni titolazione, l'elettrodo di vetro è stato pulito con acqua ultrapura e asciugato tamponando delicatamente con carta assorbente. Qualora nella soluzione titolata fossero presenti ioni metallici o precipitati, il lavaggio è stato eseguito anche con acido nitrico  $\sim 0.1$  M. Quando non in uso, l'elettrodo è stato mantenuto immerso in una soluzione di ftalato acido di potassio circa 0.15 M.

#### 4.2.2 PROCEDURE SPERIMENTALI PER LA SPETTROSCOPIA NMR

Le titolazioni NMR delle soluzioni di legante o di miscele Ba<sup>2+</sup>-legante (preparate come descritto nel **Paragrafo 4.3.3**) sono state eseguite mediante l'acquisizione di una serie di spettri <sup>1</sup>H-NMR al variare del pH, ogni  $\sim 0.5$  unità di pH nell'intervallo 2-12. Gli spettri sono stati acquisiti utilizzando il programma Topspin 3.5. I valori di *chemical shift* ( $\delta$ ) dei segnali sono misurati in parti per milione (ppm) e gli spettri sono stati calibrati attribuendo il valore di 0 ppm al segnale del TSP (il riferimento interno). La soppressione del segnale dell'acqua è stata effettuata mediante la sequenza di impulsi denominata *excitation sculpting pulse scheme* (**Paragrafo 3.2.2**). La temperatura generalmente

impostata durante l'esecuzione delle misure è stata di 25 °C; in alcuni casi sono stati acquisiti degli spettri a temperature più elevate (45 o 65 °C) nel tentativo di rendere più stretti e quindi più risolti alcuni segnali che davano coalescenza negli spettri ottenuti a 25 °C.

Oltre alle misure finalizzate a determinare le costanti di acidità dei leganti e di formazione dei complessi con il Ba<sup>2+</sup>, sono state eseguite anche alcune analisi qualitative delle cinetiche di complessamento metallo-legante, nelle quali gli spettri <sup>1</sup>H-NMR di una miscela Ba<sup>2+</sup>-legante ad alcuni valori rappresentativi di pH sono stati acquisiti in un breve arco di tempo dopo la preparazione delle soluzioni, allo scopo di valutare la rapidità con cui si verifica la formazione dei complessi.

#### 4.2.3 PROCEDURE SPERIMENTALI PER LA SPETTROFOTOMETRIA UV-Vis

Nel presente lavoro di tesi la spettrofotometria UV-Vis è stata impiegata solamente per l'analisi delle soluzioni di macrocat, allo scopo di determinarne le costanti di acidità. In modo analogo alla procedura utilizzata nelle titolazioni NMR, l'analisi UV-Vis è stata eseguita mediante l'acquisizione di vari spettri della soluzione di legante a diversi valori di pH (uno ogni ~ 0.5 unità) compresi nell'intervallo 2-12. Per ciascuna misura, la soluzione campione è stata versata in una cuvetta di quarzo con cammino ottico di 1 cm. Lo strumento utilizzato è gestito da un computer esterno tramite il programma *Cary WinUV*. L'acquisizione degli spettri del campione è stata preceduta dalla lettura di uno spettro della soluzione di bianco, costituito da acqua ultrapura, per la correzione della linea di base. Per quanto riguarda il campione, nel caso in cui il valore di assorbanza dei picchi nell'intervallo di lunghezze d'onda 200-800 nm fosse risultato troppo elevato (superiore a 1.5), l'acquisizione veniva ripetuta dopo aver diluito opportunamente la soluzione. Al termine di ogni acquisizione la cuvetta è stata lavata con acqua ultrapura. Tramite il programma *Cary WinUV* i dati ottenuti sono stati esportati in un file excel e disposti in una tabella che riporta i valori di assorbanza in funzione della lunghezza d'onda, da cui è possibile ricostruire lo spettro di assorbimento.

## CAPITOLO 5 – RISULTATI E DISCUSSIONE

### 5.1 STANDARDIZZAZIONI DEI TITOLANTI PER LA POTENZIOMETRIA

#### 5.1.1 STANDARDIZZAZIONE DI HCl

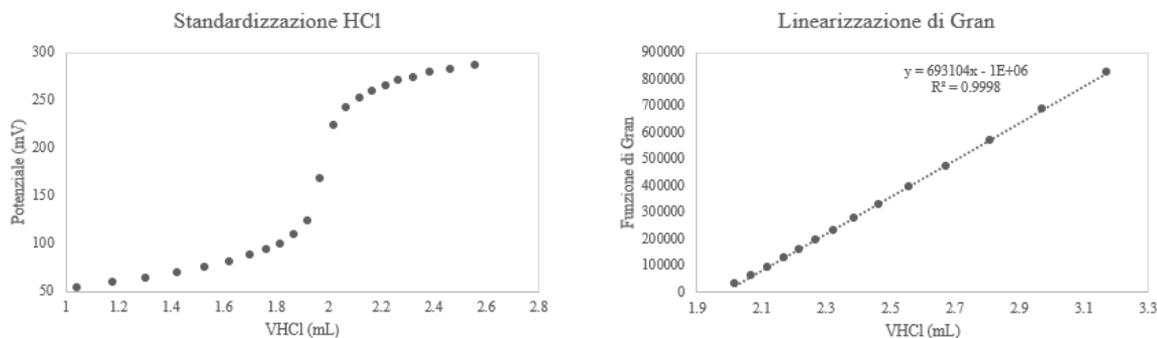
La concentrazione della soluzione di HCl è stata determinata titolando quantità note dello standard primario Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (**Paragrafo 4.4.1.2**) ed elaborando i dati ottenuti in ciascuna titolazione con il metodo di linearizzazione di Gran, che si basa sull'applicazione della legge di Nernst (equazione 3.2) all'elettrodo di vetro (equazione 5.1):

$$E = E^0 + S \cdot \log [H^+] \quad (5.1)$$

dove i termini  $E$  ed  $E^0$  rappresentano rispettivamente il potenziale misurato dall'elettrodo e il potenziale standard, mentre il parametro  $S$  indica pendenza di Nernst ( $S = \frac{RT}{F} \ln 10$ , il cui valore è stato calcolato utilizzando la temperatura sperimentale espressa in K). La concentrazione di idrogenioni  $[H^+]$  è definita dall'espressione (equazione 5.2):

$$[H^+] = \frac{n_{HCl} - 2n_{Na_2CO_3}}{V_0 + V} \quad (5.2)$$

in cui  $n_{HCl}$  e  $n_{Na_2CO_3}$  rappresentano rispettivamente le moli di HCl e quelle di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,  $V_0$  è il volume iniziale della soluzione e  $V$  è il volume di HCl aggiunto per ogni punto della titolazione. Tramite una procedura di linearizzazione dei dati, il metodo di Gran consente di determinare il punto equivalente della titolazione senza conoscere il valore di  $E^0$ , motivo per cui non è stata eseguita la calibrazione dell'elettrodo; il punto equivalente viene estrapolato dall'equazione della retta interpolante i punti linearizzati, e dal volume di equivalenza si ricava la concentrazione incognita di HCl. Un esempio di curva di titolazione con la relativa linearizzazione di Gran è illustrato in **Figura 5.1**. Il titolo della soluzione di HCl è stato calcolato come media aritmetica dei valori ottenuti nelle dieci titolazioni effettuate ed è risultato pari a  $0.1119 \pm 0.0016$  M.



**Figura 5.1** A sinistra: esempio di curva di titolazione con HCl di una soluzione di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , preparata mescolando 0.02632 g di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 3.0 mL di acqua ultrapura con NaCl 0.15 M e 3.0 mL di HCl ( $I(\text{Na})\text{Cl} = 0.15 \text{ M}$ ). A destra: linearizzazione della parte acida della curva di titolazione con il metodo di Gran.

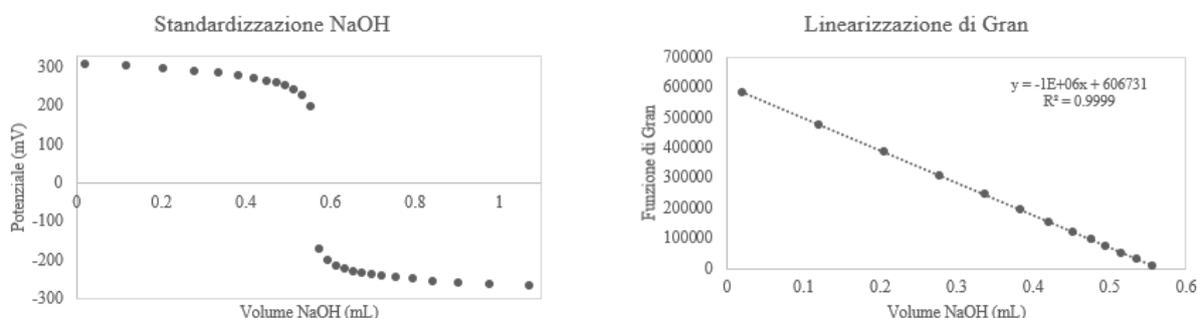
### 5.1.2 CALIBRAZIONE DELL'ELETTRODO DI VETRO

Nella fase di elaborazione dei dati sperimentali, l'algoritmo di *fitting* deve ottimizzare diversi parametri capaci di modificare il potenziale di Nernst, il cui numero può diventare elevato specialmente nel caso di sistemi molto complessi. Poiché l'ottimizzazione contemporanea di tali parametri può dare notevoli problemi di correlazione tra le variabili, e fornire risultati inaffidabili, si preferisce determinare mediante appositi esperimenti i valori di alcune di queste grandezze, i quali possono essere successivamente impostati come termini costanti nell'elaborazione dei dati sperimentali delle soluzioni più complicate.

La procedura di calibrazione dell'elettrodo di vetro è stata eseguita prima di ogni titolazione di NaOH allo scopo di ottimizzare la costante  $E^0$  e il parametro *imp*, che rappresenta la quantità di impurezze acide o basiche eventualmente presenti nella soluzione; i valori ottenuti in ogni calibrazione sono stati utilizzati per l'elaborazione della successiva titolazione di NaOH. Altri fattori che influenzano il potenziale nella calibrazione dell'elettrodo di vetro sono il potenziale di giunzione ( $E_j$ ), che risulta trascurabile nell'intervallo di pH considerato, e la pendenza di Nernst ( $S = \frac{RT}{F} \ln 10$ ), il cui valore viene calcolato in base alla temperatura sperimentale e inserito come termine noto e costante nell'elaborazione dei dati. In ogni calibrazione effettuata il valore ottimizzato del parametro  $E^0$  è risultato compreso nell'intervallo di 410-420 mV, mentre per *imp* è sempre stato ottenuto un valore nell'ordine delle  $\mu\text{mol}$ .

### 5.1.3 STANDARDIZZAZIONE DI NaOH

La standardizzazione di NaOH (**Paragrafo 4.4.1.4**) è stata eseguita mediante una serie di titolazioni della soluzione di HCl precedentemente standardizzata. La concentrazione della base è stata calcolata inizialmente come media aritmetica dei valori ottenuti per ciascuna titolazione applicando il metodo della linearizzazione di Gran. Un esempio di curva di titolazione e il corrispondente grafico linearizzato (riferito alla parte acida della curva) sono riportati in **Figura 5.2**. I titoli delle soluzioni di NaOH preparate in questo lavoro di tesi, calcolati mediante la procedura appena descritta, sono risultati pari a  $0.1108 \pm 0.0044$  M (soluzione B1) e  $0.1471 \pm 0.0019$  M (soluzione B2).



**Figura 5.2** A sinistra: esempio di curva di titolazione con NaOH (soluzione B1) di una soluzione contenente 0.6 mL di HCl a titolo noto (0.1119 M) e 3.0 mL di acqua ultrapura con NaCl 0.15 M. A destra: linearizzazione della parte acida della curva di titolazione con il metodo di Gran.

In seguito, i dati ottenuti da ciascuna titolazione sono stati elaborati utilizzando il programma PITMAP per ottimizzare i valori di diversi parametri capaci di influenzare la misura del potenziale:

- il grado di carbonatazione della soluzione di base ( $\alpha$ ), un parametro espresso in percentuale che viene calcolato secondo l'equazione 5.3. Poiché il valore di  $\alpha$  che si ottiene dai dati sperimentali assume sempre un valore molto basso ( $\leq 0.0002$  %), l'influenza delle costanti di acidità dell'acido carbonico sulla misura del potenziale risulta trascurabile. Per tale motivo si è scelto di impostare per le  $pK_a$  delle specie  $H_2CO_3$  e  $HCO_3^-$  dei valori costanti, pari a quelli riportati in letteratura (rispettivamente 5.86 e 8.95, misurate alla temperatura di 25°C e in condizioni di forza ionica simili a quelle adoperate in questo lavoro di tesi), anziché farli ottimizzare all'algoritmo;

$$\alpha = 100 \frac{2n_{CO_3^{2-}}}{n_{OH^-}} \quad (5.3)$$

- $E^0$  ed  $imp$ , i cui valori per ciascuna titolazione sono stati ottimizzati con la calibrazione dell'elettrodo;

- la costante di errore alcalino ( $pK_{Na}$ );
- la costante di autoprotolisi dell'acqua ( $K_w$ );
- titolo della soluzione di NaOH ( $C_b$ ). Il valore ottimizzato dall'algoritmo di *PITMAP* rappresenta un risultato più accurato rispetto al titolo ricavato mediante la linearizzazione di Gran, nel cui calcolo non sono inclusi i contributi dei parametri appena descritti alla misura del potenziale.

La pendenza di Nernst ( $S$ ) è stata invece fissata al valore calcolato con l'espressione  $\frac{RT}{F} \ln 10$ . Nella **Tabella 5.1** sono riportati i valori dei parametri ottimizzati relativi alle soluzioni di NaOH preparate.

**Tabella 5.1** Valori ottimizzati dei parametri relativi alle soluzioni di NaOH preparate, ottenuti mediante l'elaborazione dei dati della standardizzazione con *PITMAP*. L'errore riportato rappresenta la deviazione standard del parametro calcolata dall'algoritmo di fitting.

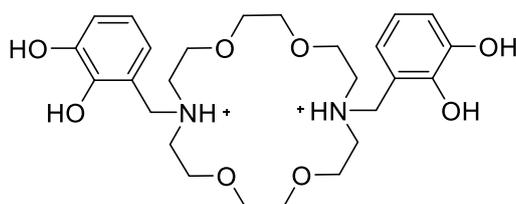
Soluzione di NaOH	$C_b$ effettiva (M)	$\alpha$ (%)	$pK_{Na}$	$K_w$
B1	$0.1156 \pm 0.0044$	0.0002	$11.4518 \pm 0.0099$	$-13.44320 \pm 0.00059$
B2	$0.1535 \pm 0.0019$	$\sim 0$	$11.3767 \pm 0.0061$	$-13.412 \pm 0.011$

$\alpha$ ,  $pK_{Na}$  e  $pK_w$  presentano tra loro una correlazione molto stretta in quanto influenzano la misura di potenziale nello stesso intervallo di pH (neutro e basico); di conseguenza, per interpretare correttamente i dati, questi tre parametri non devono essere considerati singolarmente ma nel loro insieme.

## 5.2 CARATTERIZZAZIONE DEL LEGANTE MACROCAT

### 5.2.1 COSTANTI DI ACIDITÀ DEL MACROCAT

Nel macrocat (**Figura 5.3**) i possibili siti donatori per l'interazione con gli ioni metallici sono presenti sia nei due sostituenti laterali (in totale quattro ossigeni) che nell'anello centrale (due azoti e quattro ossigeni). Sei tra questi dieci siti, e precisamente i quattro ossigeni fenolici dei sostituenti assieme ai due azoti amminici dell'anello, sono anche potenzialmente sede di equilibri acido-base; la prima parte della caratterizzazione del legante ha come obiettivo la determinazione delle sue costanti di dissociazione acida, dato che queste non sono ancora state riportate in nessuno studio in letteratura.



**Figura 5.3** Struttura del macrocat, nella forma completamente protonata, indicata come  $H_6L^{2+}$ .

Questa determinazione risulta necessaria anche per lo studio degli equilibri di complessamento  $Ba^{2+}$ -macrocat, in quanto i protoni possono competere con gli ioni  $Ba^{2+}$  durante la formazione dei complessi.

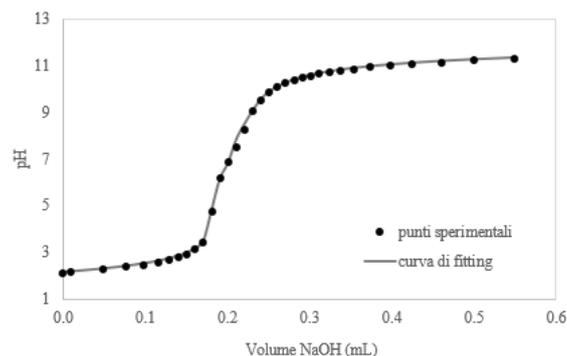
Delle (teoriche) sei  $pK_a$  che il macrocat potrebbe possedere, è possibile, ed anzi probabile, individuarne sperimentalmente un numero inferiore, in quanto alcuni equilibri di protonazione/deprotonazione possono avvenire a pH troppo estremi, che non hanno rilevanza a fini farmaceutici e che non possono nemmeno essere indagati con accuratezza dal punto di vista sperimentale. Le proprietà acido-base del macrocat sono state studiate utilizzando la potenziometria e la spettroscopia NMR.

#### 5.2.1.1 Potenzimetria

In seguito alla standardizzazione della soluzione di titolante NaOH, sono state eseguite tre titolazioni potenziometriche di una soluzione di macrocat, utilizzando la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.1.5**. Durante la misurazione, a  $pH > 10.5$  è stato osservato un cambiamento di colore della soluzione, che potrebbe essere attribuibile alla variazione cromatica conseguente ad una deprotonazione, oppure, più probabilmente (vedi paragrafo successivo) all'ossidazione del composto in ambiente basico. Un comportamento simile, a  $pH > 9$ , era stato riscontrato anche per il catecolo nelle analisi potenziometriche condotte in condizioni simili in un precedente lavoro di tesi condotto nel nostro gruppo di ricerca [24]. Nell'elaborazione dei dati potenziometrici sono stati inclusi i parametri che influenzano il potenziale elettrodo misurato, cioè:

- $C_b$ ,  $pK_{Na}$ ,  $pK_w$  e  $\alpha$ , mantenuti fissi ai valori ottenuti nella standardizzazione di NaOH (**Paragrafo 5.1.3**);
- $E^0$  e  $imp$ , che sono stati ottimizzati;
- $S$ , mantenuto costante al valore calcolato in base alla temperatura registrata nella titolazione
- $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  dell'acido carbonico, fissate rispettivamente a 5.86 e 8.95;
- la concentrazione della soluzione di legante analizzata,  $C_L$ , ottimizzata;
- le costanti di dissociazione acida,  $pK_{a,L}$ , il cui numero non è noto a priori, ma viene determinato eseguendo varie prove di ottimizzazione, includendo in ciascuna un numero differente di  $pK_a$  e scegliendo il modello che restituisce il migliore indice di bontà del *fitting*. Tali costanti sono a loro volta state ottimizzate.

Nella **Figura 5.4** è riportato un esempio di curva di *fitting* di una titolazione potenziometrica del legante, mentre i valori delle costanti di acidità ottimizzate dall'algorithm sono indicati in **Tabella 5.2**.



**Figura 5.4** Curva di *fitting* per una titolazione potenziometrica del macrocat con NaOH. La soluzione da analizzare è stata preparata con 0.894 mL di soluzione L1 (**Paragrafo 4.3.1**), 2.106 mL di acqua ultrapura ( $I = \text{NaCl } 0.15\text{M}$ ) e 0.1 mL di HCl 0.1119 M.

I punti sperimentali registrati a  $\text{pH} > 10.5$  (valori a cui è stata osservata la variazione di colore della soluzione) sono stati inclusi nella curva di titolazione in quanto la bontà del *fitting* non è migliorata in loro assenza.

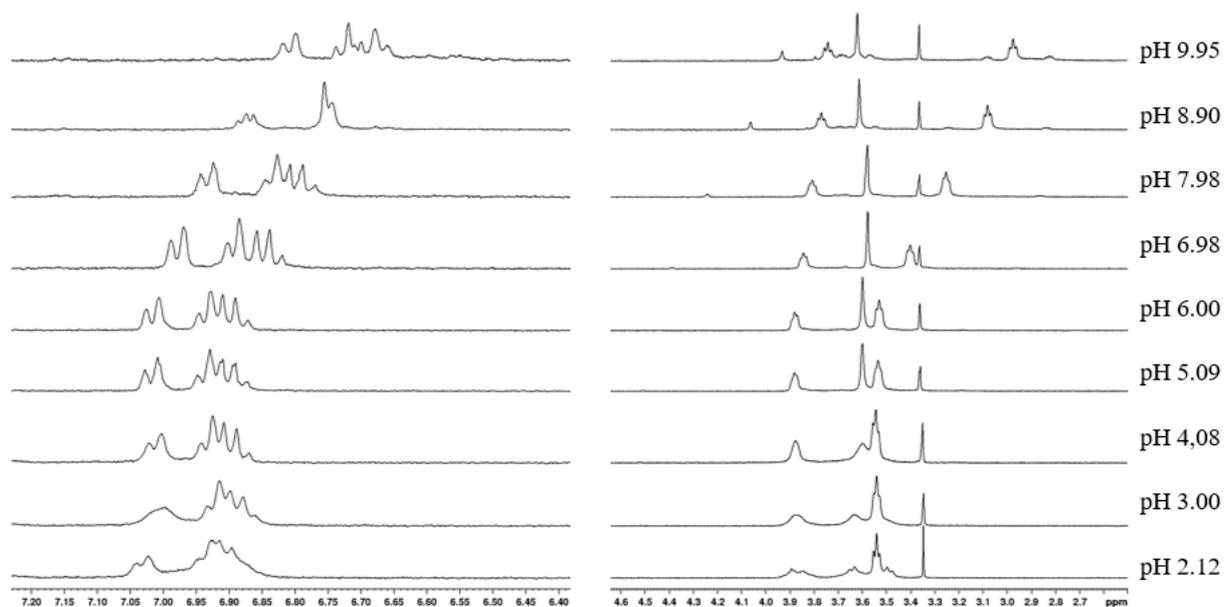
**Tabella 5.2**  $\text{p}K_a$  del legante macrocat determinate mediante potenziometria ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl } 0.15\text{ M}$ ).

Equilibrio	$\text{p}K_{a,L}$
$\text{p}K_{a1}: \text{H}_6\text{L}^{2+} \rightleftharpoons \text{H}_5\text{L}^+ + \text{H}^+$	<b>2.207</b> $\pm$ 0.016
$\text{p}K_{a2}: \text{H}_5\text{L}^+ \rightleftharpoons \text{H}_4\text{L} + \text{H}^+$	<b>6.479</b> $\pm$ 0.022
$\text{p}K_{a3}: \text{H}_4\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^- + \text{H}^+$	<b>8.356</b> $\pm$ 0.018
$\text{p}K_{a4}: \text{H}_3\text{L}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}^{2-} + \text{H}^+$	<b>10.102</b> $\pm$ 0.018

Il numero di costanti di dissociazione acida individuato per il macrocat mediante l'analisi potenziometrica è pari a quattro. Gli equilibri acido-base indicati nella **Tabella 5.2**, in cui non compaiono le due forme maggiormente deprotonate della molecola, si basano sull'ipotesi ragionevole per cui ciascun residuo di catecolo dovrebbe subire una sola deprotonazione nell'intervallo di  $\text{pH } 2-12$ , mentre la perdita del secondo protone avverrebbe in condizioni più basiche ( $\text{pH} \gg 12$ ); questo comportamento risulterebbe coerente con i valori di  $\text{p}K_a$  della molecola di catecolo, pari a 8.34 e 13.66, misurate in condizioni sperimentali simili a quelle utilizzate nel presente lavoro. [30] Per poter attribuire le  $\text{p}K_a$  ai diversi gruppi funzionali del macrocat, i dati ottenuti sono stati integrati con l'analisi NMR del legante.

### 5.2.1.2 Spettroscopia NMR

L'analisi  $^1\text{H-NMR}$  delle soluzioni acquose di macrocat a diversi pH è stata condotta secondo la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.2**. In **Figura 5.5** è riportata una selezione degli spettri  $^1\text{H-NMR}$  ottenuti, nella quale è possibile osservare l'andamento dei *chemical shift* dei segnali al variare del pH.



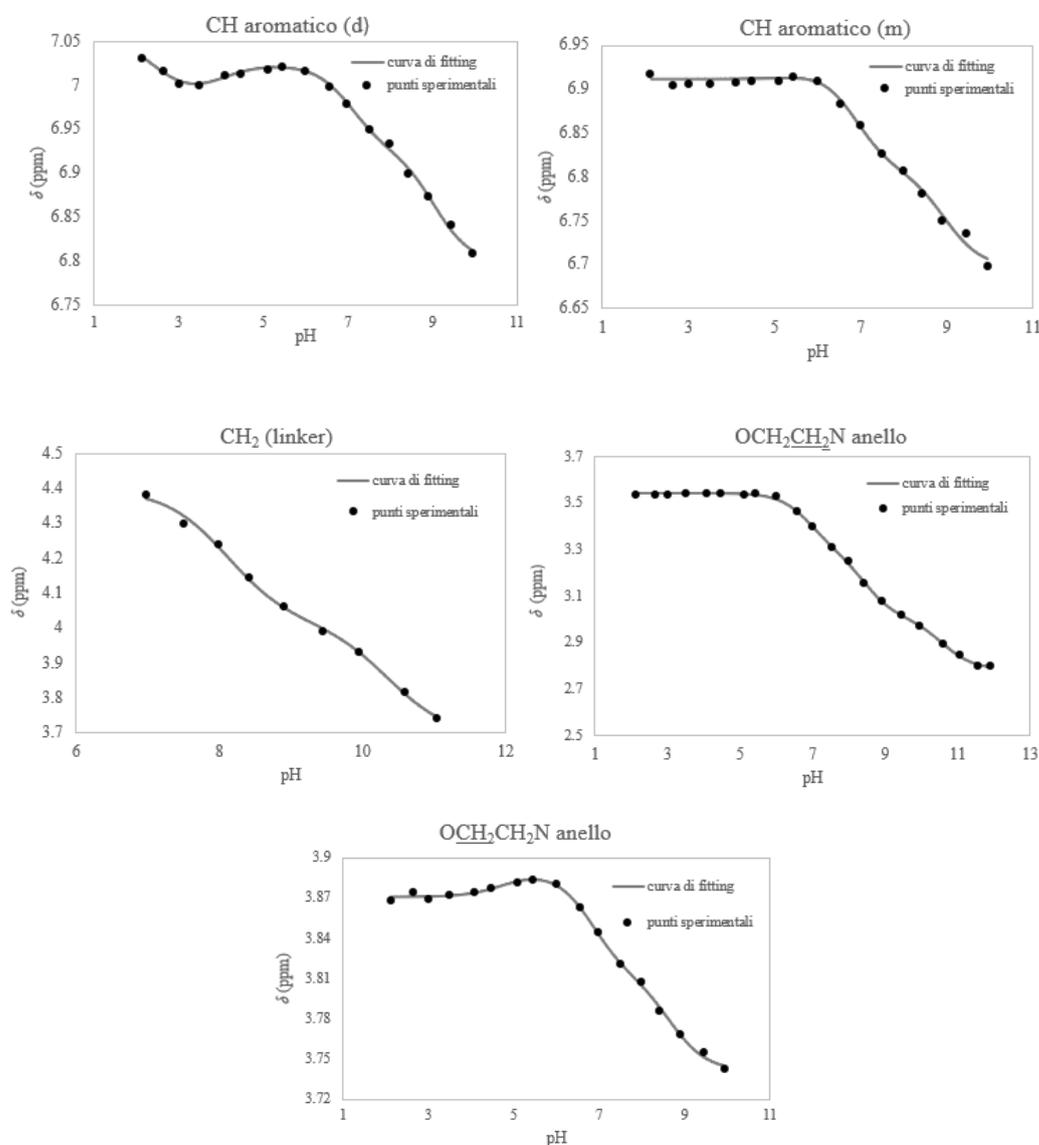
**Figura 5.5** Spettri  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, 298 K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente macrocat 1 mM a differenti valori di pH. A sinistra è riportato l'intervallo di *chemical shift* dei protoni aromatici, a destra quello dei protoni alifatici. Il picco a 3.34 ppm è dovuto al metanolo presente in tracce nella soluzione.

Nella regione aromatica si possono distinguere un doppietto (d) e un multipletto (m), mentre nella regione alifatica si osservano i seguenti segnali (elencati in ordine decrescente di  $\delta$ ):

- un singoletto attribuito ai protoni del metilene che funge da *linker* tra le molecole di catecolo e l'anello centrale, il quale compare nell'intervallo di  $\delta$  compreso tra 3.8 e 4.5 ppm solamente a pH  $> 6.5$ , probabilmente perché a valori di pH inferiori il segnale risulta prossimo a quello dell'acqua e viene dunque soppresso insieme a quest'ultimo;
- un tripletto attribuito ai protoni del metilene  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  dell'anello centrale. A pH 2 il segnale appare splittato in due multipletti, suggerendo che la struttura del legante completamente protonato risulta più rigida e meno simmetrica rispetto alle altre forme diversamente protonate;

- un singoletto associato ai protoni dei metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  dell'anello centrale, ben osservabile quando non è sovrapposto ad altri segnali, ossia a  $\text{pH} > 4$ . In modo analogo ai protoni dei metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ , a  $\text{pH} 2$  il segnale appare splittato in due multipletti;
- un tripletto associato ai protoni del metilene  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  dell'anello centrale.

Gli spettri a  $\text{pH}$  superiori a 9.5 non sono stati presi in considerazione nell'elaborazione dei dati sperimentali a causa della presenza di ulteriori segnali attribuibili alla comparsa di prodotti di degradazione del chelante, dovuti presumibilmente all'ossidazione del catecolo. I dati relativi all'andamento dei *chemical shift* di ciascun segnale al variare del  $\text{pH}$  (**Figura 5.6**) sono stati elaborati con il software *Origin*, allo scopo di determinare il numero e il valore delle  $\text{pK}_a$  del legante.



**Figura 5.6** Andamenti dei *chemical shift* dei segnali  $^1\text{H-NMR}$  di una soluzione di macrocat al variare del  $\text{pH}$ .

Come si può vedere nei grafici riportati in **Figura 5.6**, i segnali dei protoni alifatici ed aromatici della molecola subiscono una generale diminuzione del *chemical shift* all'aumentare del pH; questa variazione è coerente con la maggiore schermatura dei nuclei dovuta all'aumento di densità elettronica in seguito alla deprotonazione. La variazione di  $\delta$  è più marcata per i nuclei che si trovano in prossimità dei siti della molecola in cui avviene la deprotonazione. Ad esempio, il *chemical shift* del singoletto relativo ai protoni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  rimane sostanzialmente invariato all'aumentare del pH, essendo questi nuclei lontani dai siti di deprotonazione della molecola. Inoltre, la variazione di  $\delta$  per un particolare protone risulta più marcata nell'intervallo di pH prossimo al valore della  $pK_a$  relativa all'equilibrio acido/base del sito di protonazione più vicino. Ad esempio, l'unico segnale che mostra una diminuzione di *chemical shift* nell'intervallo di pH 2-3 è il doppietto nella regione aromatica; si può quindi dedurre che la specie più protonata ( $\text{H}_6\text{L}^{2+}$ ) abbia un valore di  $pK_{a1}$  compreso in tale intervallo, e che la sua deprotonazione coinvolga un gruppo ossidrilico di uno dei due catecoli della molecola. Una costante di acidità così bassa può essere ragionevolmente attribuita ad un ossidrilico se si considera che la perdita del protone consente la formazione di un legame a idrogeno intramolecolare con l'ammina protonata più vicina. In aggiunta, tutti i segnali dei protoni vicini ai siti acidi della molecola presentano una diminuzione (più o meno marcata) di *chemical shift* a  $\text{pH} > 6$ .

Utilizzando il programma di calcolo *Origin*, sono state eseguite diverse prove di *fitting* dei dati sperimentali relativi all'andamento di  $\delta$  di ciascun segnale in funzione del pH, in ognuna delle quali è stato ipotizzato un numero differente di  $pK_a$ ; il modello teorico più adatto a descrivere ogni curva sperimentale è stato scelto valutando quale *fitting* restituisse il miglior indice di bontà. La curva teorica che ha fornito il *fitting* migliore è stata quella di un legante tetraprotico (equazione 5.5). Tale equazione è stata ricavata mediante la risoluzione di un sistema che comprende il bilancio di massa, le espressioni relative a ciascuna delle quattro costanti di acidità del legante e l'equazione 5.4; quest'ultima descrive il *chemical shift* osservato  $\delta_{\text{oss}}$  per un nucleo  $^1\text{H}$  in presenza di un equilibrio rapido di interconversione delle specie rispetto alla scala dei tempi NMR (come accade generalmente per gli equilibri acido-base):

$$\delta_{\text{oss}} = \chi_{\text{L}}\delta_{\text{L}} + \chi_{\text{HL}}\delta_{\text{HL}} + \chi_{\text{H}_2\text{L}}\delta_{\text{H}_2\text{L}} + \chi_{\text{H}_3\text{L}}\delta_{\text{H}_3\text{L}} + \chi_{\text{H}_4\text{L}}\delta_{\text{H}_4\text{L}} \quad (5.4)$$

$\delta_{\text{oss}}$  è quindi uguale alla somma dei contributi delle diverse specie presenti in soluzione, ciascuno pesato per la rispettiva frazione molare ( $\chi$ ).

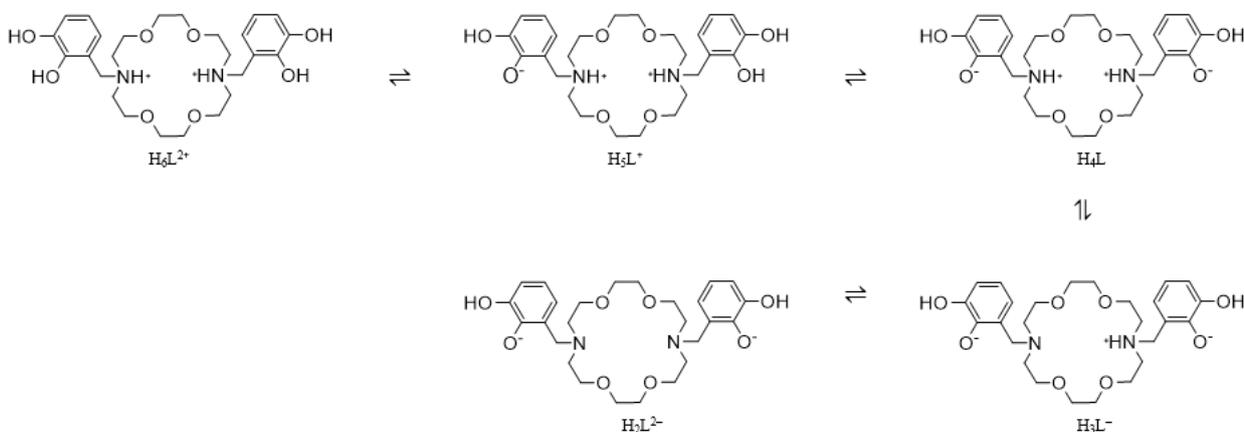
$$\delta_{\text{oss}} = \frac{a \cdot 10^{pK_{a1} + pK_{a2} + pK_{a3} + pK_{a4} - 4\text{pH}} + b \cdot 10^{pK_{a2} + pK_{a3} + pK_{a4} - 3\text{pH}} + c \cdot 10^{pK_{a3} + pK_{a4} - 2\text{pH}} + d \cdot 10^{pK_{a4} - \text{pH}} + e}{10^{pK_{a1} + pK_{a2} + pK_{a3} + pK_{a4} - 4\text{pH}} + 10^{pK_{a2} + pK_{a3} + pK_{a4} - 3\text{pH}} + 10^{pK_{a3} + pK_{a4} - 2\text{pH}} + 10^{pK_{a4} - \text{pH}} + 1} \quad (5.5)$$

dove i parametri a, b, c, d ed e rappresentano i *chemical shift* delle varie forme diversamente protonate del legante.

I risultati riportati in **Tabella 5.3** sono stati ottenuti calcolando le medie dei valori delle quattro  $pK_a$  ricavati dall'elaborazione dei dati di ciascun segnale  $^1\text{H-NMR}$ , e sono in buon accordo con quelli potenziometrici (**Tabella 5.2**). Inoltre, ciascuna costante di dissociazione acida è stata attribuita ad un diverso sito di protonazione della molecola in base alle considerazioni descritte in precedenza e alla basicità dei gruppi funzionali che caratterizzano il legante. In linea generale, le ammine terziare risultano più basiche rispetto al catecolo ( $pK_{a1} \sim 8.3$ ) e, come già descritto, nel macrocat il primo ossidrilico di ciascun catecolo risulta particolarmente acido per la vicinanza all'ammina: per questi motivi la sequenza di deprotonazione più probabile è quella mostrata in **Figura 5.7**, in cui il primo gruppo ossidrilico di entrambe le molecole di catecolo si deprotona a pH più acidi rispetto ai due azoti del macrociclo centrale.

**Tabella 5.3**  $pK_a$  del macrocat ottenute mediante l'elaborazione dei dati  $^1\text{H-NMR}$ . I risultati rappresentano la media dei singoli valori ottenuti dai *fitting* delle curve *chemical shift* vs. pH di ciascun segnale della molecola.

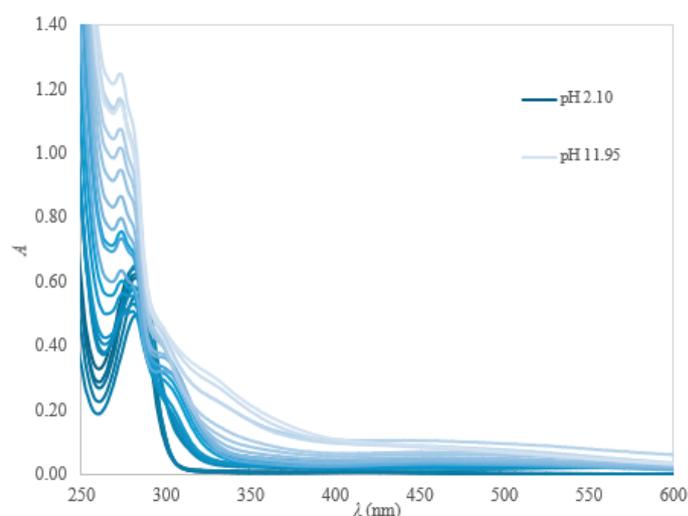
Equilibrio	$pK_{a,L}$
$pK_{a1}: \text{H}_6\text{L}^{2+} \rightleftharpoons \text{H}_5\text{L}^+ + \text{H}^+$	<b>2.28</b> $\pm$ 0.54
$pK_{a2}: \text{H}_5\text{L}^+ \rightleftharpoons \text{H}_4\text{L} + \text{H}^+$	<b>6.94</b> $\pm$ 0.31
$pK_{a3}: \text{H}_4\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^- + \text{H}^+$	<b>8.66</b> $\pm$ 0.25
$pK_{a4}: \text{H}_3\text{L}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}^{2-} + \text{H}^+$	<b>10.49</b> $\pm$ 0.17



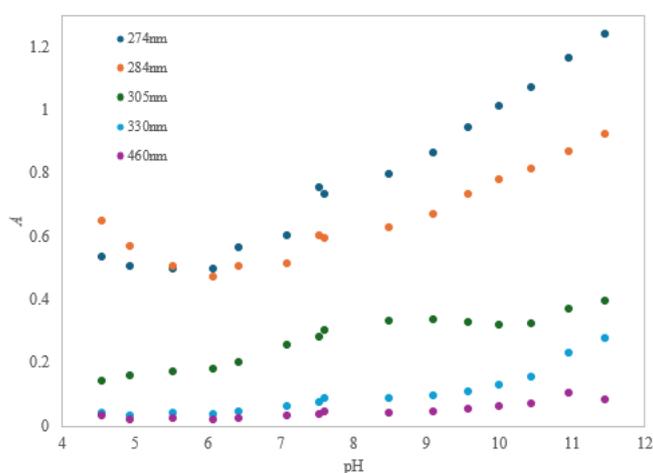
**Figura 5.7** Sequenza di deprotonazione più probabile per il macrocat.

### 5.2.1.3 Spettrofotometria UV-Vis

Gli spettri UV-Visibile della soluzione di macrocat sono stati acquisiti a diversi valori di pH nell'intervallo 2-12, uno ogni  $\sim 0.5$  unità di pH, secondo la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.3**. L'andamento dell'assorbanza al variare del pH è stato valutato selezionando le lunghezze d'onda corrispondenti ai massimi di assorbimento ( $\lambda_{\max}$ ): 274 nm, 284 nm, 305 nm, 330 nm e 460 nm. Gli spettri delle soluzioni di macrocat acquisiti a diversi valori di pH sono riportati in **Figura 5.8**, mentre l'andamento dell'assorbanza in funzione del pH è rappresentato nel grafico in **Figura 5.9**.



**Figura 5.8** Spettri UV-Vis di una soluzione contenente macrocat 0.25 mM ( $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M). Nel grafico viene riportata una porzione (250 – 600 nm) dell'intero intervallo di  $\lambda$  acquisite (200 – 800 nm).



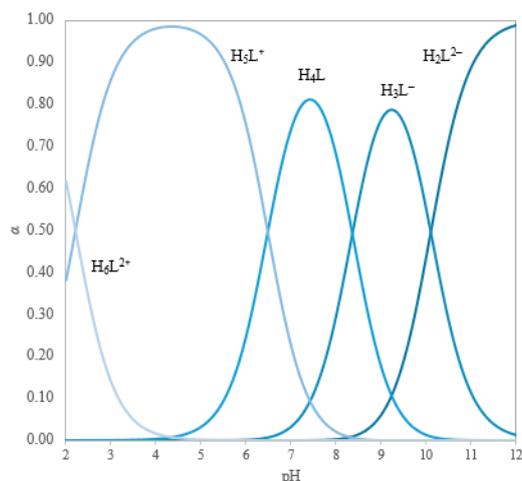
**Figura 5.9** Andamento dell'assorbanza misurata a 274, 284, 305, 330 e 460 nm in funzione del pH.

Come nel caso dell'NMR, per ciascuna delle  $\lambda_{\max}$  sono stati effettuati vari tentativi per elaborare i dati sperimentali mediante il *software Origin*, utilizzando equazioni opportune per descrivere l'andamento

dell'assorbanza in funzione del pH. Tuttavia, nessun tentativo ha fornito buoni *fitting* e valori ragionevoli di  $pK_a$ ; per tale motivo le misure UV non sono state prese in considerazione per la determinazione delle  $pK_a$  del macrocat. Si può comunque osservare che l'assorbanza subisce variazioni più marcate a  $pH > 6-7$ , perciò i dati UV-Vis sono qualitativamente in accordo con quelli potenziometrici e NMR.

#### 5.2.1.4 Diagramma di distribuzione

La speciazione del legante in soluzione acquosa all'equilibrio termodinamico può essere rappresentata attraverso il corrispondente diagramma di distribuzione, mostrato in **Figura 5.10**. Tale grafico riporta la frazione molare ( $\alpha$ ) delle diverse specie presenti in soluzione in funzione del pH. Il diagramma di distribuzione del macrocat è stato ottenuto utilizzando il programma *Hyperquad simulation and speciation (HySS)*, nel quale sono stati inseriti i valori di  $pK_a$  ottenuti dalle titolazioni potenziometriche in quanto più accurati. Le specie indicate nel grafico sono rappresentate in **Figura 5.7**, in cui viene mostrata la sequenza con cui avviene la perdita dei protoni dai siti acidi della molecola all'aumentare del pH.



**Figura 5.10** Diagramma di distribuzione del macrocat nell'intervallo di pH 2-12.

#### 5.2.2 COSTANTI DI COMPLESSAMENTO $Ba^{2+}$ -MACROCAT

La speciazione, la stechiometria dei complessi e i rispettivi valori delle costanti di complessamento ( $\log\beta$ ) del sistema  $Ba^{2+}$ -macrocat sono state studiate mediante titolazioni potenziometriche e  $^1H$ -NMR.

### 5.2.2.1 Valutazione qualitativa della cinetica di complessamento

Per poter condurre studi termodinamici su complessi metallo-legante, i sistemi in esame devono raggiungere le condizioni di equilibrio in ogni punto sperimentale. Mentre le reazioni di scambio protonico (acido-base) sono generalmente molto rapide, in alcuni casi la formazione dei complessi può richiedere dei tempi molto lunghi (anche diverse ore). Per verificare qualitativamente la cinetica della reazione di complessamento metallo-legante, sono stati acquisiti degli spettri  $^1\text{H-NMR}$  ad alcuni valori di pH (4, 6 e 8) di soluzioni preparate di fresco e contenenti macrocat e  $\text{Ba}^{2+}$  in rapporto molare 1:1, dal cui confronto con gli spettri relativi al solo legante agli stessi pH è stato possibile valutare se la reazione di complessamento è sufficientemente rapida da avvenire nell'intervallo di tempo che intercorre tra la preparazione della soluzione e l'analisi NMR. Solamente lo spettro della soluzione a pH 8 è risultato differente rispetto a quello del solo legante, dimostrando che la formazione del complesso è veloce a questo pH. La soluzione a pH 6 ha dato uno spettro solo di poco diverso da quello del legante, suggerendo la formazione di una piccola quantità di complesso. Lo spettro della soluzione a pH 4 invece è rimasto sostanzialmente identico a quello del solo legante. Attraverso queste informazioni si può dedurre che il complessamento del macrocat con il bario avviene in tempi sufficientemente brevi per poter essere studiato mediante la tecnica potenziometrica (anche se con una bassa stabilità termodinamica, come emerso dalle misure successive). Per precauzione si è ritenuto comunque opportuno impostare dei tempi d'attesa più lunghi tra un'aggiunta e l'altra di titolante rispetto a quelli impiegati nelle titolazioni del solo legante (vedi **Tabella 4.3**).

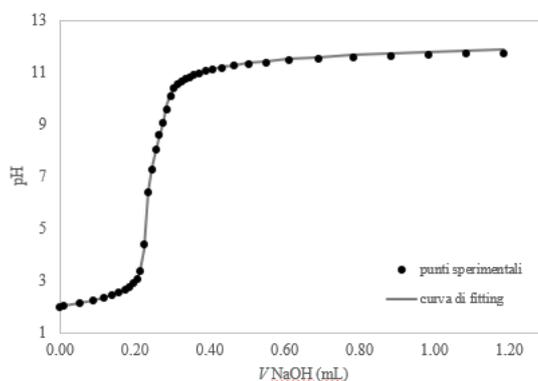
### 5.2.2.2 Potenziometria

Poiché la valutazione della cinetica di complessamento (**Paragrafo 5.2.2.1**) ha dato conferma della possibilità di condurre le misure potenziometriche delle soluzioni  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat, sono state eseguite tre titolazioni secondo la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.1.6**. Come nelle titolazioni del solo legante, a pH basici ( $> 11$ ) è comparsa una colorazione rossastra dovuta probabilmente all'ossidazione del composto. Per tale ragione sono stati eseguiti due tentativi di *fitting*: nel primo sono stati inclusi tutti i punti sperimentali mentre nel secondo sono stati scartati quelli corrispondenti a  $\text{pH} > 11$ . Questa ultima modalità è quella adottata nell'elaborazione finale in quanto ha fornito degli indici di ottimizzazione migliori. Nell'elaborazione dei dati sperimentali sono stati inclusi i seguenti parametri capaci di influenzare il potenziale misurato:

- $E^0$ ,  $S$ ,  $C_b$ ,  $\text{p}k_{\text{Na}}$ ,  $\alpha$ ,  $\text{imp}$ ,  $\text{p}K_w$ ,  $\text{p}K_{a1,\text{carb}}$  e  $\text{p}K_{a2,\text{carb}}$  dell'acido carbonico (**Paragrafo 5.1.3 e 5.2.1.1**);

- $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$  e  $pK_{a4}$  del legante, mantenute fisse ai valori indicati in **Tabella 5.2**;
- $C_L$  e la concentrazione dello ione metallico nella soluzione analizzata,  $C_M$ , mantenute costanti;
- le costanti di complessamento,  $\beta_{m,l,h}$ , il cui numero non è noto a priori, e che vengono ottimizzate.

L'ottimizzazione dei dati è stata ripetuta utilizzando diversi modelli di speciazione, che differiscono nel numero e nella stechiometria delle specie presenti in soluzione, fino a individuare quello che restituisce un migliore indice di bontà del *fitting*. Oltre al valore di  $\beta_{m,l,h}$ , sono stati ottimizzati anche i parametri  $E^0$  e  $imp$ . In **Figura 5.11** è riportato un esempio di curva di *fitting* per la titolazione di una soluzione  $Ba^{2+}$ -macrocat, mentre i risultati dell'elaborazione dei dati sperimentali sono indicati in **Tabella 5.4**.



**Figura 5.11** Esempio di curva di *fitting* per la titolazione potenziometrica di una soluzione contenente macrocat e  $BaCl_2$ , entrambi a concentrazione 1 mM, con NaOH. La soluzione da analizzare è stata preparata con 0.960 mL di soluzione L5 (**Paragrafo 4.3.1**), 0.150 mL di soluzione di  $BaCl_2$  (**Paragrafo 4.3.1**), 1.890 mL di acqua ultrapura ( $I = NaCl$  0.15 M) e 0.3 mL di HCl 0.1119 M.

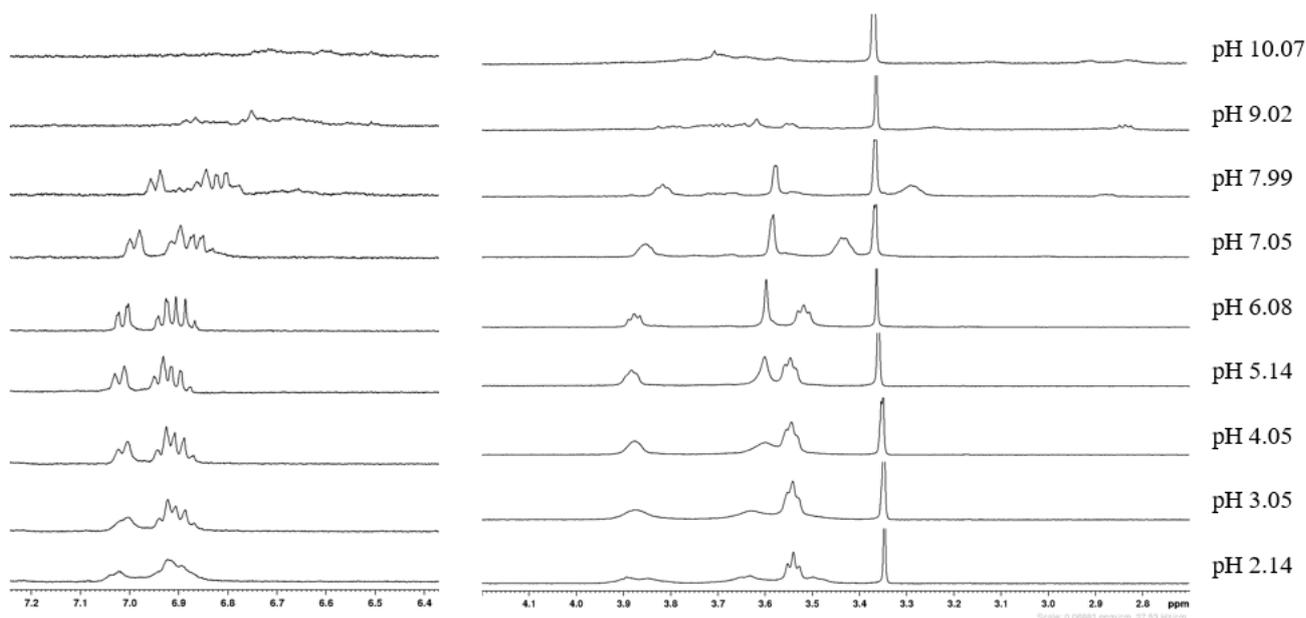
**Tabella 5.4** Stechiometria e  $\log\beta$  del complesso  $Ba^{2+}$ -macrocat ottenute dall'elaborazione dei dati potenziometrici ( $T = 25^\circ C$ ,  $I = (Na)Cl$  0.15 M).

Stechiometria	$\log\beta$
$BaH_2L$	$4.91 \pm 0.11$

Il modello di speciazione che ha restituito il miglior indice di bontà del *fitting* è quello caratterizzato da un unico complesso, con un rapporto stechiometrico bario-macrocat 1:1, in cui il legante si trova nella forma più deprotonata osservabile in ambiente acquoso ( $H_2L^{2-}$ ).

### 5.2.2.3 Spettroscopia NMR

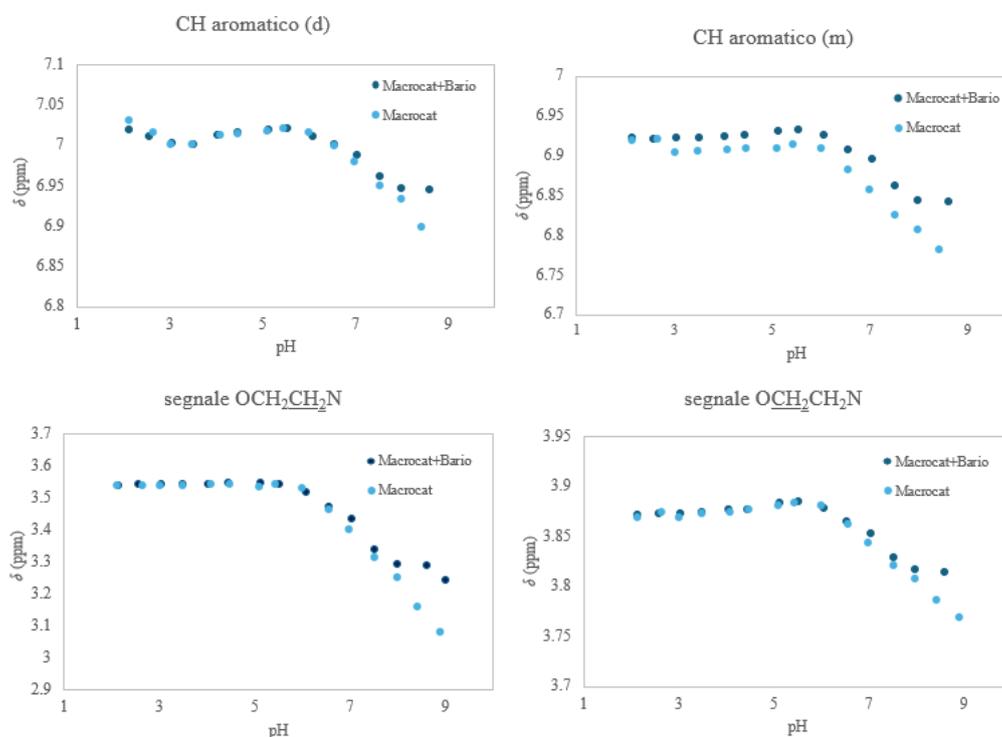
Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  delle soluzioni di  $\text{Ba}^{2+}$  e legante sono risultati utili per acquisire delle informazioni di carattere qualitativo sulle specie in soluzione, oltre che sulla cinetica di complessamento del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat (**Paragrafo 5.2.2.1**). Una selezione degli spettri  $^1\text{H-NMR}$  acquisiti a diversi pH è mostrata in **Figura 5.12**.



**Figura 5.12** Spettri  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, 298 K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente macrocat  $10^{-3}$  M e  $\text{BaCl}_2$   $10^{-3}$  M a diversi valori di pH. A sinistra è riportato l'intervallo di *chemical shift* dei protoni aromatici, a destra quello dei protoni alifatici. Il picco a 3.34 ppm è dovuto al metanolo presente in tracce nella soluzione.

A pH inferiori a 6.5, gli spettri del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat risultano identici a quelli del solo legante, a dimostrazione del fatto che in queste condizioni non si verifica la formazione di complessi. In condizioni più basiche, fino a circa pH 9, i segnali conservano la stessa forma di quelli del solo legante ma differiscono nel valore di *chemical shift* (vedi **Figura 5.5**), suggerendo la comparsa di almeno un complesso metallo-legante. Poiché in questo intervallo di pH non si osservano entrambi i segnali distinti del complesso e del legante libero ma un unico segnale mediato, si può dedurre che le specie siano in rapido scambio rispetto alla scala dei tempi dell' $^1\text{H-NMR}$  (**Paragrafo 3.2.4**). Negli spettri a pH  $> 9$  i segnali del complesso non sono facilmente identificabili a causa della presenza di ulteriori segnali, indice della comparsa di prodotti di degradazione del chelante (già osservata negli spettri del solo legante a pH superiori a 9.5).

In linea generale, l'attribuzione dei segnali negli spettri del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat a  $\text{pH} < 9$  rispecchia quella degli spettri del solo legante: nella regione aromatica si osservano un doppietto (d) e un multipletto (m), mentre nella regione alifatica si distinguono i segnali dei protoni del macrociclo centrale, ossia un singoletto associato ai metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  e due tripletti attribuiti ai metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  e  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ; non è invece osservabile il segnale relativo al metilene che funge da *linker* tra l'anello centrale e il catecolo, probabilmente perché soppresso insieme al segnale dell'acqua. In **Figura 5.13** sono riportati i dati sperimentali relativi all'andamento dei *chemical shift* di ciascun segnale al variare del pH.



**Figura 5.13** Andamenti dei *chemical shift* dei segnali  $^1\text{H}$ -NMR del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat e del solo legante al variare del pH.

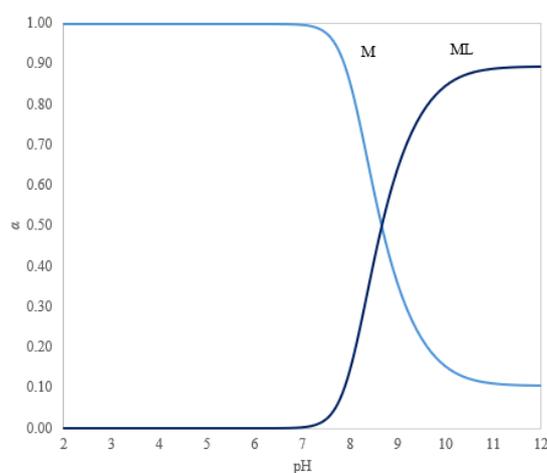
In linea generale, nell'intervallo di  $\text{pH} 6.5-9$  i segnali del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat mostrano un valore di  $\delta$  più elevato di quello dei rispettivi segnali negli spettri del solo legante; questo aumento di *chemical shift* dei segnali è coerente con la diminuzione della densità elettronica degli atomi del legante in seguito al complessamento dello ione metallico.

Per il sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat non è stato possibile eseguire un'elaborazione quantitativa dei dati NMR per ottenere la costante di complessamento, a causa del numero insufficiente di punti sperimentali utilizzabili nel *fitting*. La presenza del complesso è infatti osservabile solamente negli spettri delle soluzioni con un  $\text{pH}$  compreso tra 6.5 e 9; oltre tale valore la degradazione del chelante interferisce

con gli equilibri di complessamento metallo-legante. Sebbene le analisi  $^1\text{H-NMR}$  delle soluzioni  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat non abbiano fornito dati quantitativi in merito alla costante di formazione del complesso, le informazioni di carattere qualitativo sugli equilibri termodinamici di complessamento sono risultate utili come supporto dei dati potenziometrici.

#### 5.2.2.4 Diagramma di distribuzione e calcolo del pM

Il diagramma di distribuzione del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat è stato ottenuto utilizzando il programma *HySS*, in cui sono stati impostati come dati di *input* i valori di  $\text{p}K_a$  del macrocat ottenuti dalle titolazioni potenziometriche, e la stechiometria e la  $\log\beta$  del complesso determinate mediante potenziometria. Il diagramma di distribuzione è riportato in **Figura 5.14**.

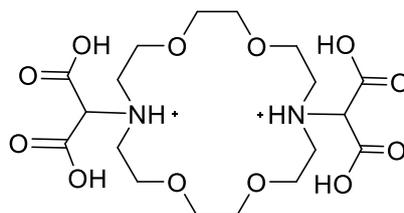


**Figura 5.14** Diagramma di distribuzione del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat. Le concentrazioni iniziali di legante e metallo sono state impostate pari a  $10^{-3}$  M.

Per determinare l'effettiva stabilità del complesso a pH fisiologico, ossia nelle condizioni in cui si verrebbe a trovare il radiofarmaco, è stato calcolato anche il pM, il cui valore corrisponde al logaritmo decimale negativo della concentrazione di metallo libero in soluzione all'equilibrio in determinate condizioni sperimentali. In letteratura, il pM viene solitamente determinato a pH 7.4, con delle concentrazioni iniziali di legante ( $C_L$ ) e metallo ( $C_M$ ) uguali rispettivamente a  $10^{-5}$  M e  $10^{-6}$  M. Con questo valore di  $C_M$ , un pM di 6 corrisponde ad avere tutto il metallo libero in soluzione mentre valori di  $\text{pM} > 6$  denotano che il metallo viene sempre più complessato dal chelante. Per il sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat è stato ottenuto un valore di pM pari a 6.0, indicativo di una stabilità termodinamica insufficiente per questo complesso, dal momento che tutto il bario sarebbe libero in queste condizioni.

### 5.3 CARATTERIZZAZIONE DEL LEGANTE ODDM

A differenza del macrocat, l'oddm (**Figura 5.15**) presenta l'anello centrale (Kryptofix 22) funzionalizzato con due residui di acido malonico, direttamente legati agli azoti del macrociclo. I possibili siti della molecola con cui può avvenire la coordinazione dello ione metallico sono i quattro gruppi carbossilici presenti nei due bracci laterali del chelante, oltre ai due azoti e ai quattro ossigeni dell'anello centrale.



**Figura 5.15** Struttura dell'oddm, nella forma completamente protonata, indicata come  $H_6L^{2+}$ .

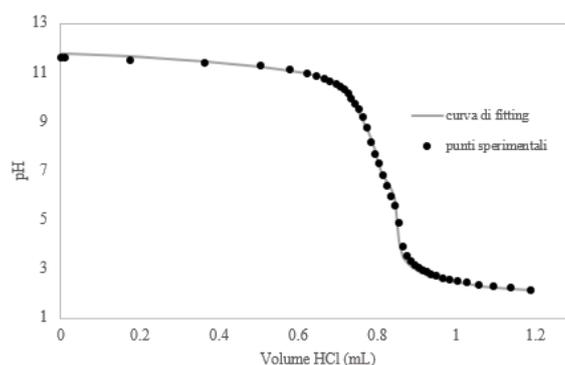
In letteratura sono disponibili alcuni studi non recenti di caratterizzazione dell'oddm e dei suoi complessi con il  $Ba^{2+}$ , i quali tuttavia riportano dei risultati non coerenti tra loro. [30], [31] In un precedente lavoro di tesi svolto nel nostro gruppo di ricerca [23] è stata dunque ripetuta la caratterizzazione del sistema  $Ba^{2+}$ -legante. Qui, la soluzione di oddm è stata resa acida aggiungendo una quantità opportuna di HCl 0.10 M, il quale nella sua forma sintetizzata renderebbe la soluzione basica e quindi soggetta a carbonatazione. Tuttavia, è stato evidenziato un possibile processo di degradazione dovuto alla preventiva acidificazione della soluzione di oddm; per tale motivo nel presente lavoro di tesi è stata ripetuta la caratterizzazione dell'oddm mediante studi potenziometrici ed  $^1H$ -NMR, al fine di ottenere dei valori di  $pK_a$  e  $\log\beta$  non alterati (per quanto possibile) dall'eventuale degradazione del chelante.

#### 5.3.1 COSTANTI DI ACIDITÀ DELL'ODDM

Il composto possiede in totale sei siti di protonazione/deprotonazione; per alcuni di questi è ragionevole pensare che i rispettivi equilibri acido/base avvengano al di fuori dell'intervallo di pH 2-12. Poiché l'acido malonico presenta una  $pK_{a1}$  piuttosto acida (2.59 [30]), si può dedurre che un gruppo carbossilico di ciascun residuo di acido malonico della molecola rimanga deprotonato nell'intero intervallo di pH studiato.

### 5.3.1.1 Potenzimetria

Le titolazioni potenziometriche della soluzione di oddm sono state eseguite secondo la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.1.5**. Come spiegato in precedenza, la probabile degradazione del chelante in ambiente acido può portare ad ottenere dei risultati non corretti nella determinazione delle  $pK_a$ ; per tale motivo si è scelto di condurre le analisi partendo da un pH basico e utilizzando come titolante HCl 0.1 M, al fine di preservare il legante da un contatto prolungato con l'ambiente acido, limitando e ritardando il più possibile la formazione dei suoi prodotti di degradazione. Come discusso nel **Paragrafo 5.2.1.1**, nell'elaborazione dei dati sperimentali sono stati ottimizzati i parametri  $E^0$ ,  $imp$ ,  $C_L$  e le diverse  $pK_a$  del legante, mentre sono stati mantenuti fissi i parametri  $C_b$ ,  $pK_{Na}$ ,  $pK_W$ ,  $pK_{a1,carb}$ ,  $pK_{a2,carb}$  ed  $S$ . Dall'elaborazione dei dati sperimentali relativi alle curve di titolazione sono state ottenute quattro  $pK_a$ , i cui valori sono indicati in **Tabella 5.5**.



**Figura 5.16** Curva di *fitting* per una titolazione potenziometrica dell'oddm con HCl. La soluzione da analizzare è stata preparata con 1.550 mL di soluzione L2 (**Paragrafo 4.3.1**), 1.450 mL di acqua ultrapura ( $I = \text{NaCl } 0.15 \text{ M}$ ) e 0.7 mL di NaOH 0.1156 M.

Dai valori dei parametri ottimizzati nell'elaborazione delle singole curve sperimentali sono emerse delle divergenze tra una titolazione e l'altra; motivo per cui il *fitting* globale ha restituito uno scarso indice di bontà ( $\sigma_{fit} > 0.5$ ).

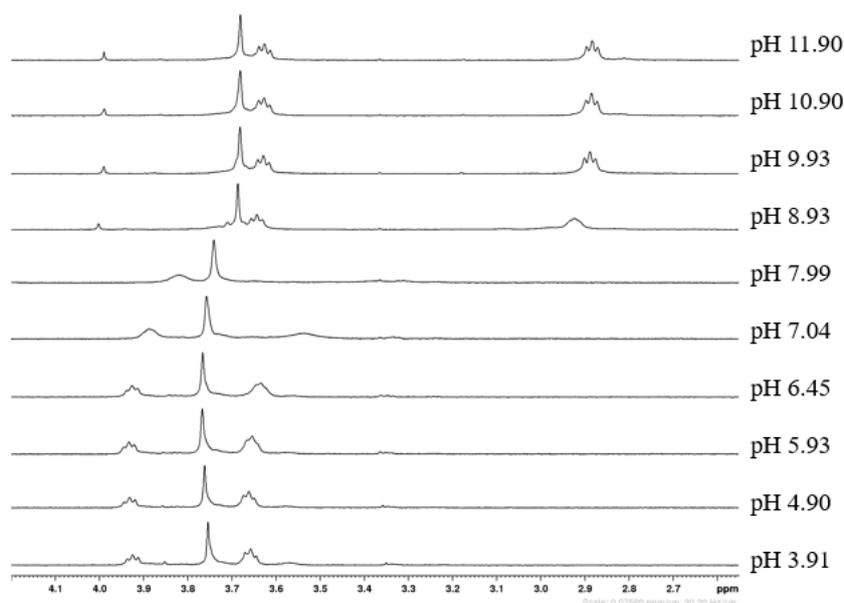
**Tabella 5.5**  $pK_a$  del legante oddm determinate mediante potenziometria ( $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl } 0.15\text{ M}$ ).

<b>Equilibrio</b>	<b><math>pK_{a,L}</math></b>
$pK_{a3}: \text{H}_4\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^- + \text{H}^+$	<b><math>6.44 \pm 0.13</math></b>
$pK_{a4}: \text{H}_3\text{L}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}^{2-} + \text{H}^+$	<b><math>6.62 \pm 0.14</math></b>
$pK_{a5}: \text{H}_2\text{L}^{2-} \rightleftharpoons \text{HL}^{3-} + \text{H}^+$	<b><math>8.49 \pm 0.10</math></b>
$pK_{a6}: \text{HL}^{3-} \rightleftharpoons \text{L}^{4-} + \text{H}^+$	<b><math>9.207 \pm 0.083</math></b>

Gli equilibri acido-base descritti nella **Tabella 5.5**, in cui non compaiono le due forme maggiormente protonate della molecola, si basano sull'ipotesi ragionevole secondo cui a  $\text{pH} > 2$  ciascun residuo di acido malonico presenta sempre almeno un gruppo carbossilico deprotonato, per cui le prime due  $pK_a$  non possono essere rilevate nelle condizioni sperimentali adottate. Sia il numero che il valore delle costanti di acidità ricavate risultano in disaccordo con i risultati ottenuti nel precedente lavoro di tesi (3.992, 7.680, 8.213 [24]) e con i dati disponibili in letteratura (3.31, 8.00 e 8.60 [31]; 3.03, 7.35 e 7.95 [32]). Tale discrepanza è probabilmente dovuta al fatto che, come spiegato, nei lavori precedenti non era stata verificata la stabilità dell'oddm in ambiente acido: l'eccessiva acidificazione delle soluzioni potrebbe infatti aver consentito la reazione di decarbossilazione già all'inizio delle titolazioni, modificando così la natura dei composti presenti in soluzione e di conseguenza anche i valori delle costanti di acidità ricavate dalle analisi potenziometriche.

#### 5.3.1.2 Spettroscopia NMR

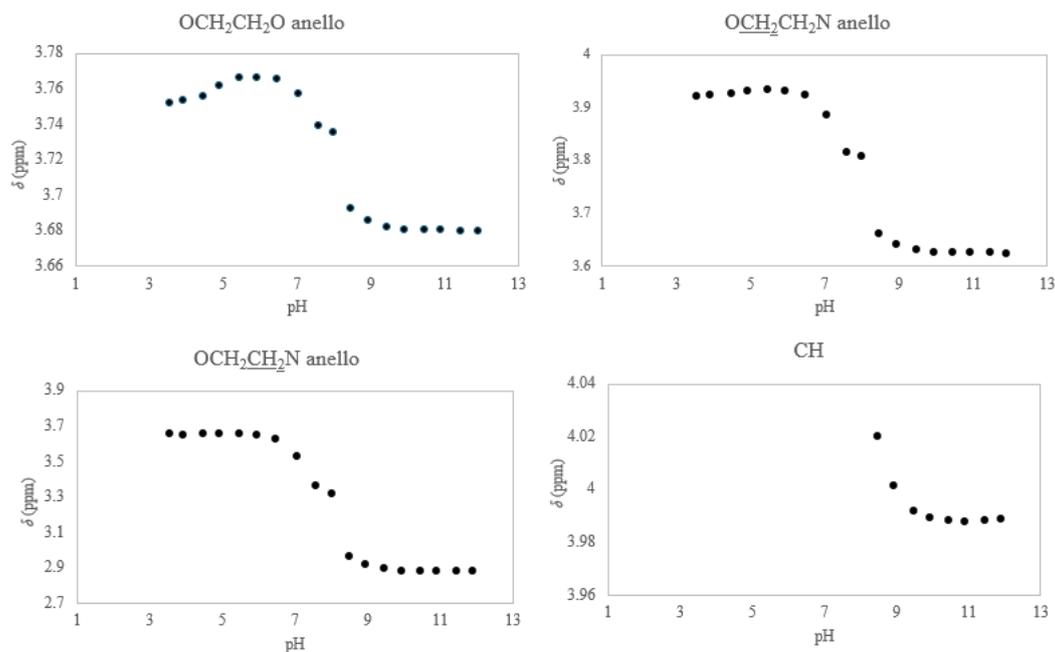
La caratterizzazione dell'oddm mediante spettroscopia  $^1\text{H}$ -NMR è stata eseguita a completamento dei dati potenziometrici, secondo la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.2**. In **Figura 5.17** è riportata una selezione degli spettri della soluzione di legante a diversi valori di  $\text{pH}$ .



**Figura 5.17** Spettri  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, 298 K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente oddm 1 mM a differenti valori di pH.

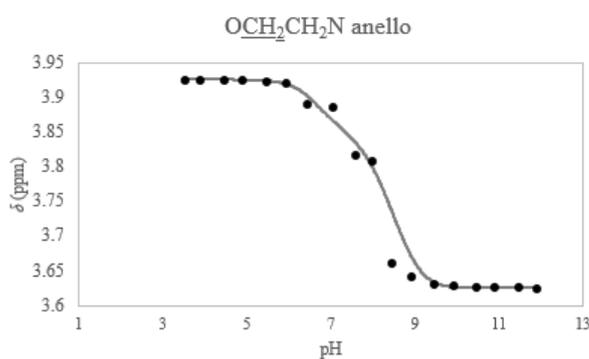
Come per il macrocat, anche per l'oddm si distinguono i segnali appartenenti ai protoni dell'anello centrale: un tripletto attribuito ai metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ , un singoletto per i metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  e un ulteriore tripletto per i metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ . A  $\text{pH} > 8.5$  è presente anche un singoletto attribuito al gruppo  $-\text{CH}$  dell'acido malonico legato ad un azoto dell'anello centrale, mentre a  $\text{pH}$  inferiori tale segnale viene probabilmente soppresso insieme a quello dell'acqua. Gli spettri a  $\text{pH} < 3.5$  (riportati in **Figura 5.22**) non sono stati considerati in fase di elaborazione dei dati sperimentali per la presenza di ulteriori segnali attribuibili al prodotto di degradazione dell'oddm.

Gli andamenti dei *chemical shift* di ciascun segnale al variare del  $\text{pH}$  sono mostrati in **Figura 5.18**. L'elaborazione delle curve sperimentali con il *software Origin* è stata condotta come spiegato nei paragrafi precedenti. La determinazione delle  $\text{p}K_a$  è risultata complicata e non ha restituito dei risultati in buon accordo con quelli ottenuti dalle misure potenziometriche. Poiché per tutti i segnali si osserva una variazione significativa del *chemical shift* solamente nell'intervallo di  $\text{pH}$  tra 6 e 10, una possibile ragione può essere che attraverso questa procedura di *fitting* risulta difficile apprezzare la presenza di più  $\text{p}K_a$  con valori vicini tra loro in un intervallo di  $\text{pH}$  limitato. Tale ipotesi è coerente con le informazioni ottenute dalla potenziometria (**Paragrafo 5.3.1.1**), secondo le quali il legante è caratterizzato da quattro  $\text{p}K_a$  tutte comprese tra 6.4 e 9.2.



**Figura 5.18** Andamenti dei *chemical shift* dei segnali  $^1\text{H-NMR}$  di una soluzione di oddm al variare del pH.

Per verificare ulteriormente che ci fosse compatibilità tra i dati NMR e quelli potenziometrici, gli andamenti dei *chemical shift* dei vari segnali registrati sono stati interpolati utilizzando come modello teorico un'equazione in cui le costanti di acidità del legante sono state fissate ai valori ricavati dalla potenziometria e sono stati ottimizzati solo i *chemical shift* teorici delle diverse specie. Un discreto indice di bontà del *fitting* è stato ottenuto nell'elaborazione dei punti sperimentali relativi al tripletto dei metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  (la rispettiva curva di *fitting* è riportata come esempio in **Figura 5.19**).

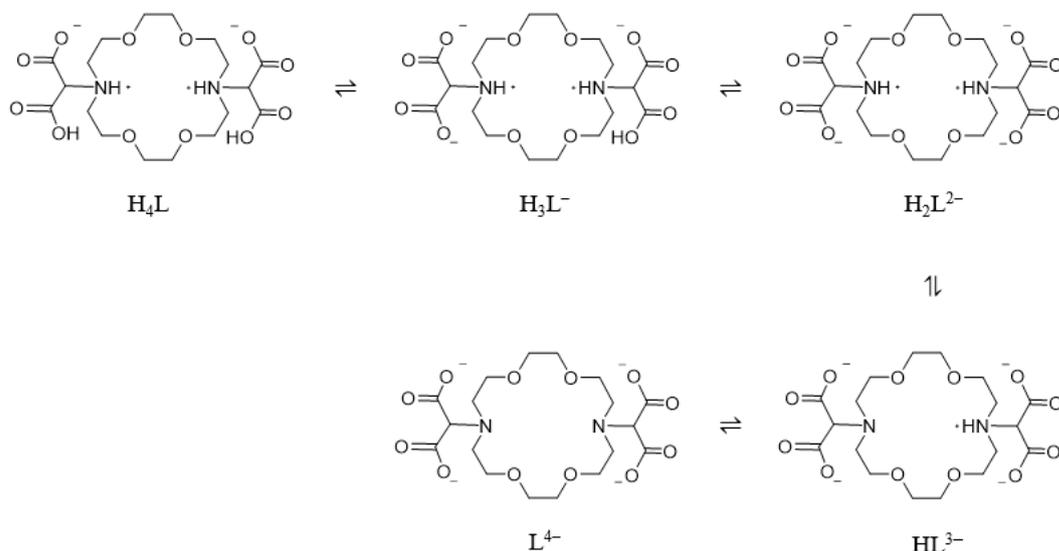


**Figura 5.19** Curva di *fitting* del *chemical shift* in funzione del pH del tripletto  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ . La curva teorica rappresenta l'equazione per un modello che rispecchia i dati potenziometrici, in cui le  $\text{pK}_a$  del legante sono fissate a 6.44, 6.62, 8.49 e 9.207.

Sebbene mediante l'analisi  $^1\text{H-NMR}$  non sia stato possibile determinare i valori delle costanti di acidità del legante, le informazioni acquisite supportano i risultati ottenuti dalle titolazioni potenziometriche.

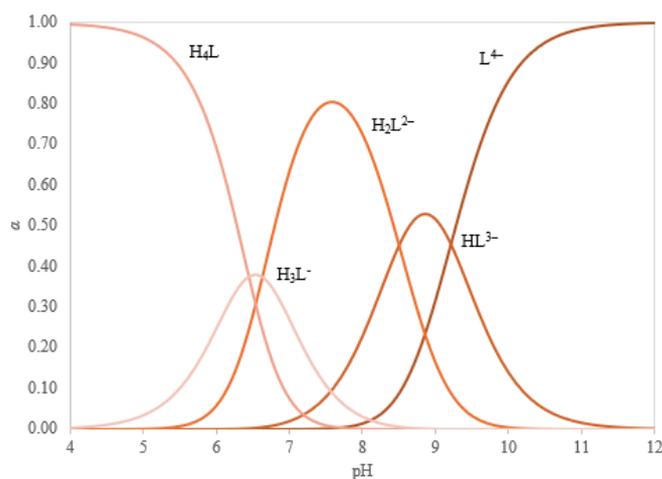
### 5.3.1.3 Diagramma di distribuzione

La sequenza di deprotonazione mostrata in **Figura 5.20** è stata proposta sulla base delle proprietà acide dei singoli gruppi funzionali che compongono la molecola, ovvero l'acido malonico ( $pK_{a1} = 2.59$ ,  $pK_{a2} = 5.15$  [29]) e l'ammina terziaria del macrociclo.



**Figura 5.20** Sequenza di deprotonazione più probabile per l'oddm.

Il diagramma di distribuzione dell'oddm, mostrato in **Figura 5.21**, è stato ottenuto con il programma *HySS*, utilizzando i valori di  $pK_a$  determinati nello studio potenziometrico.

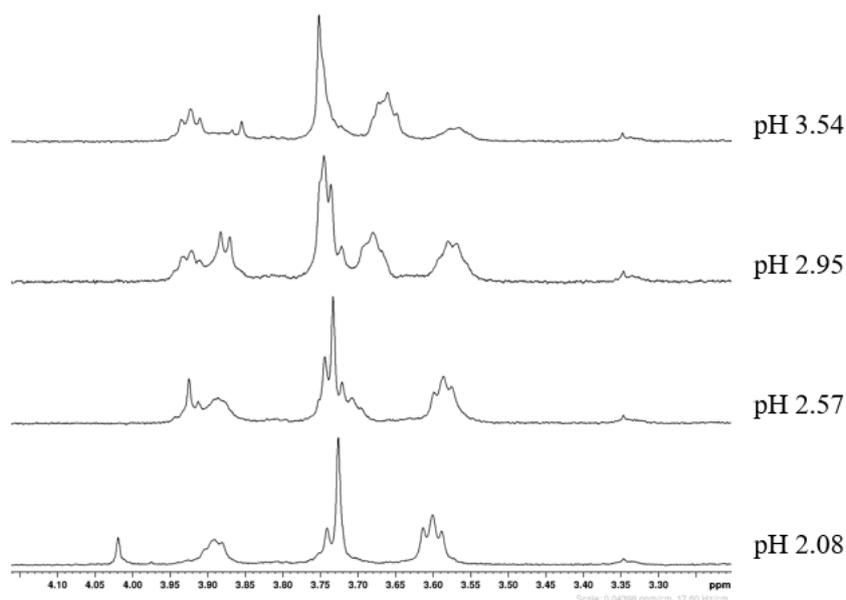


**Figura 5.21** Diagramma di distribuzione dell'oddm. Non sono stati considerati i valori di  $pH < 4$ , condizione in cui si verifica la degradazione del legante.

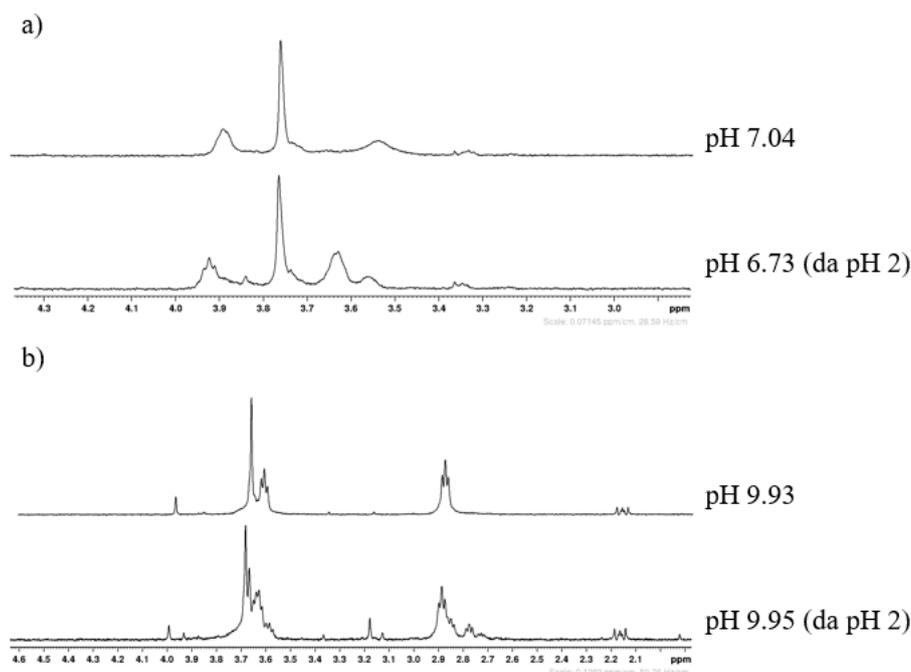
### 5.3.2 DECARBOSSILAZIONE DELL'ODDM

Come accennato nei precedenti paragrafi, durante la caratterizzazione dell'oddm sono stati adottati alcuni accorgimenti al fine di evitare che un'eventuale degradazione del legante in ambiente acido possa verificarsi durante le misure e di conseguenza influenzare i valori di  $pK_a$  ottenuti. In aggiunta, sono state condotte delle analisi finalizzate a verificare se l'ipotesi della degradazione dell'oddm a pH acido fosse corretta e, in tal caso, se tale fenomeno fosse effettivamente dovuto alla decarbossilazione dell'acido malonico presente nei bracci laterali della molecola.

La comparsa di almeno un prodotto di degradazione a pH acidi è stata inizialmente osservata negli spettri  $^1\text{H-NMR}$  della soluzione di oddm, nei quali la presenza di picchi incogniti è risultata particolarmente evidente a pH inferiori a circa 3.5 (**Figura 5.22**). Le soluzioni acide in cui sono apparsi tali segnali sono state successivamente portate a pH più basici con NaOH e analizzate nuovamente mediante spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ , ottenendo gli spettri mostrati in **Figura 5.23**.



**Figura 5.22** Spettri  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, 298 K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente oddm 1 mM a pH acidi.

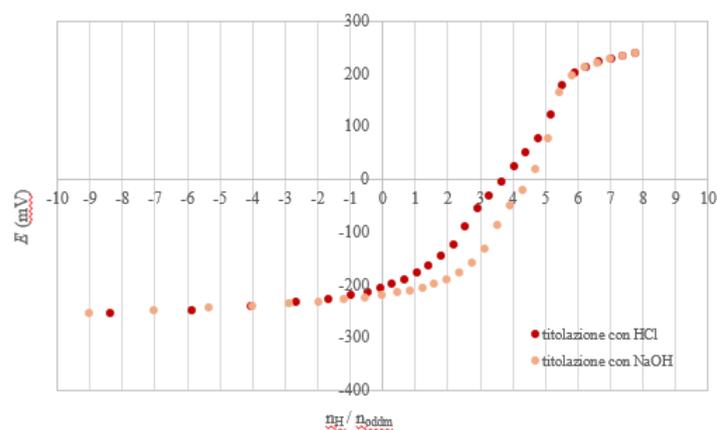


**Figura 5.23** Spettri <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, 298 K, 10% D<sub>2</sub>O + 90% H<sub>2</sub>O, I = (Na)Cl 0.15 M) di una soluzione di oddm 1 mM **a)** In alto: spettro della soluzione di legante portata a pH 7.04 con HCl partendo da pH 12; in basso: spettro della soluzione portata nuovamente a pH circa neutro (6.73) con NaOH dopo essere stata acidificata fino a pH 2. **b)** In alto: spettro della soluzione di legante portata a pH 9.93 con HCl partendo da pH 12; in basso: spettro della soluzione portata nuovamente a pH ~10 con NaOH dopo essere stata acidificata fino a pH 2.

In **Figura 5.23** è possibile confrontare gli spettri di due soluzioni di oddm a due valori di pH (pH ~ 7 e pH ~ 10): negli spettri delle soluzioni riportate a pH neutro/alcalino dopo acidificazione sono presenti dei picchi aggiuntivi, a dimostrazione del fatto che i segnali incogniti osservati nelle soluzioni di oddm a pH acido (**Figura 5.22**) sono dovuti a una parziale e irreversibile degradazione delle molecole di legante in ambiente acido, con la conseguente comparsa di prodotti di reazione che rimangono presenti anche dopo aver basificato nuovamente le soluzioni.

Un'ulteriore prova a supporto di questo fenomeno è stata osservata anche attraverso misure potenziometriche eseguendo una retrotitolazione: una soluzione di oddm è stata inizialmente titolata con HCl secondo la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.1.5**, dopodiché la soluzione acida risultante è stata titolata con NaOH fino al raggiungimento di pH ~ 12. I punti sperimentali sono mostrati nel grafico in **Figura 5.24**, nel quale viene riportato il potenziale misurato in funzione del rapporto tra le moli di protoni e le moli di legante ( $n_{H^+}/n_{\text{oddm}}$ ) anziché del volume di titolante aggiunto. In questo modo è possibile confrontare direttamente le due curve di titolazione le quali, riferendosi alla stessa soluzione in esame, dovrebbero teoricamente coincidere (nel limite dell'errore sperimentale) se non

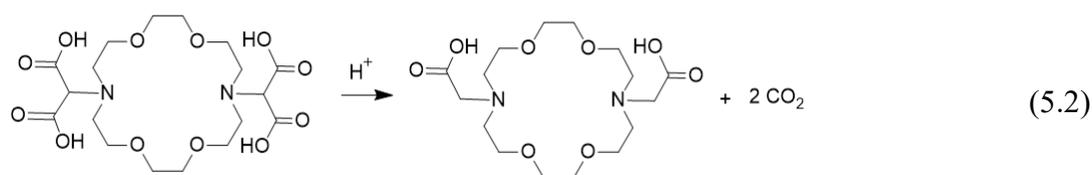
si verificasse nessuna reazione a carico del legante. Inoltre, con questo grafico è possibile conoscere in maniera approssimativa quante costanti di acidità del composto sono osservabili nell'intervallo di pH considerato: il numero di unità riportate sull'asse delle ascisse in corrispondenza delle quali la curva di titolazione mostra una pendenza elevata rappresenta infatti il numero indicativo di  $pK_a$  della molecola in esame.



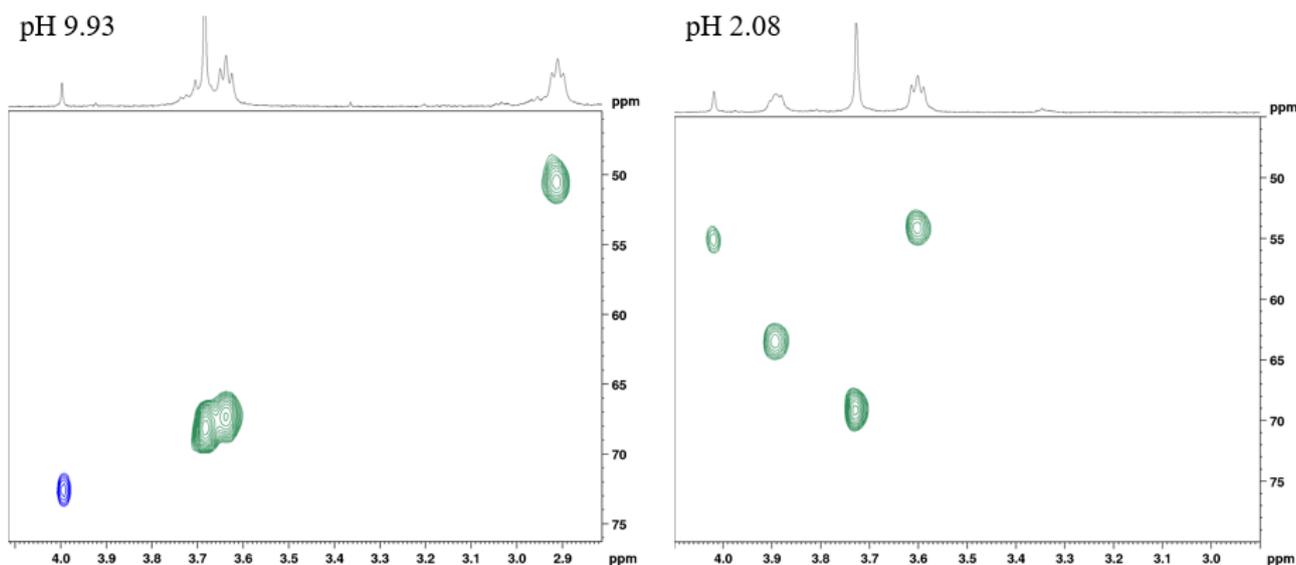
**Figura 5.24** Retrotitolazione dell'oddm: Confronto tra le due curve sperimentali relative a una soluzione preparata con 1.550 mL di soluzione L2 (**Paragrafo 4.3.1**), 1.450 mL di acqua ultrapura ( $I = \text{NaCl } 0.15 \text{ M}$ ) e 0.8 mL di NaOH 0.1156 M. Il titolante impiegato nella titolazione “di andata” è HCl 0.1119 M mentre in quella “di ritorno” è stato utilizzato NaOH 0.1156 M.

Come si osserva in **Figura 5.24**, l'andamento della curva della titolazione iniziale con HCl (detta titolazione “di andata”) non coincide con quello della titolazione “di ritorno” con NaOH; tale comportamento suggerisce la presenza di specie differenti nelle due analisi potenziometriche della stessa soluzione, che risulta coerente con l'ipotesi secondo cui in condizioni acide il legante subisce una modifica chimica irreversibile. In particolare, dall'osservazione della pendenza di ciascuna curva, la soluzione analizzata durante la prima titolazione presenta indicativamente cinque  $pK_a$ , mentre nella titolazione “di ritorno” si individua un numero di costanti di acidità pari a quattro.

La prova sperimentale che ha confermato in modo definitivo la degradazione dell'oddm nelle condizioni acide adoperate durante le analisi è stata fornita dal confronto degli spettri NMR bidimensionali HSQC di due soluzioni di oddm, una a pH 10 e l'altra a pH 2, riportati in **Figura 5.25**. Dalle informazioni strutturali ottenute è stata inoltre confermata l'ipotesi secondo cui la reazione coinvolta in tale processo è la decarbossilazione dell'acido malonico presente nei due bracci laterali del legante, rappresentata nell'equazione 5.2:



L'acquisizione di tali spettri è stata eseguita utilizzando un esperimento HSQC modificato in modo da mostrare la molteplicità dei segnali del  $^{13}\text{C}$ , in modo analogo alla sequenza DEPT-135 (*distortionless enhancement by polarization transfer*), che consente di differenziare i carboni nella struttura della molecola sulla base del numero di idrogeni a cui sono legati: in particolare i carboni CH e  $\text{CH}_3$  restituiscono dei segnali positivi mentre i carboni  $\text{CH}_2$  appaiono come dei picchi negativi. Questa tecnica ha permesso dunque di riconoscere i segnali appartenenti all'oddm (pH 10) e quelli del prodotto di degradazione (pH 2), in quanto il carbonio metinico presente nei bracci laterali del legante viene mostrato come un segnale positivo (pH 10), mentre il corrispondente carbonio metilenico del prodotto decarbossilato restituisce un segnale negativo (pH 2).



**Figura 5.25** Spettri HSQC (400 MHz, 298K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione di oddm a pH 9.93 (a sinistra) e a pH 2.08 (a destra). Sull'asse delle ascisse sono riportati lo spettro  $^1\text{H}$ -NMR e i valori di *chemical shift* dei protoni, mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di  $\delta$  relativi ai nuclei  $^{13}\text{C}$ . I picchi negativi ( $\text{CH}_2$ ) sono raffigurati in verde, quelli positivi ( $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_3$ ) in blu.

Nello spettro HSQC della soluzione di oddm a pH basico ( $\sim 10$ ) il segnale attribuibile al carbonio del braccio laterale del legante (che si presenta nello spettro  $^1\text{H}$ -NMR come un singoletto a 3.99 ppm) appare come un picco positivo, confermando la presenza del gruppo metinico che contraddistingue l'oddm; al contrario, il segnale corrispondente nello spettro HSQC dell'oddm a pH  $\sim 2$  appare come un picco negativo, a dimostrazione del fatto che in ambiente acido il legante subisce una modifica

tale per cui il CH dei bracci laterali diventa un gruppo CH<sub>2</sub>. La reazione in grado di spiegare questa differenza negli spettri delle due soluzioni è la decarbossilazione delle molecole di acido malonico, mostrata nell'equazione 5.2. Poiché nello spettro dell'oddm a pH 2 il segnale del protone che compare a 4.02 ppm mostra solamente un picco negativo, mentre non è presente il picco positivo che compare a pH basico, si può dedurre che la decarbossilazione avvenga in modo quantitativo e su entrambi i bracci laterali della molecola di oddm.

### 5.3.3 COSTANTI DI COMPLESSAMENTO Ba<sup>2+</sup>-ODDM

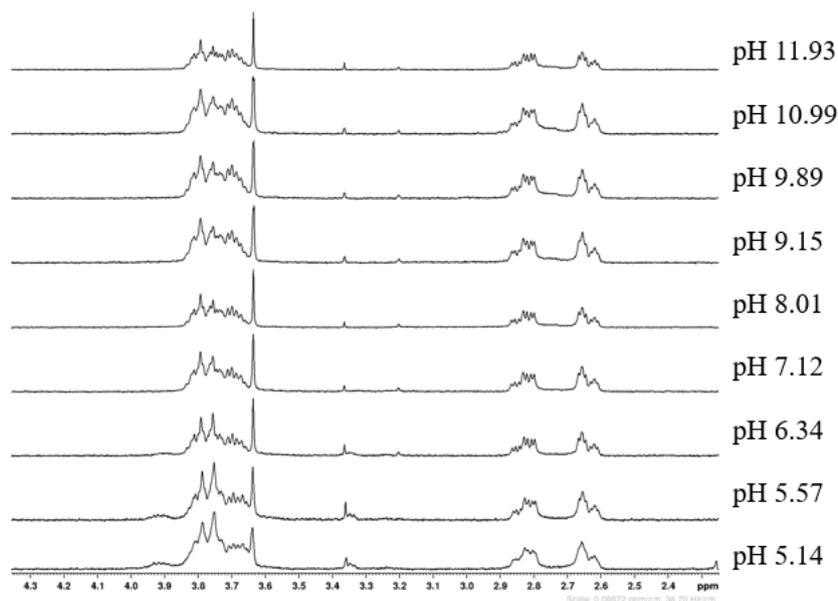
Dopo aver dimostrato che l'oddm può andare incontro a decarbossilazione non solo a pH < 2 ma anche nelle condizioni acide raggiunte durante le analisi del presente lavoro (**Paragrafo 5.3.2**), è stato condotto uno studio sugli equilibri di complessamento con il Ba<sup>2+</sup> con l'obbiettivo di ottenere dei valori di logβ che non siano influenzati dalla presenza del prodotto di degradazione del chelante. A tal fine, nell'elaborazione dei dati sperimentali sono stati utilizzati i valori di pK<sub>a</sub> ottenuti dalla caratterizzazione del legante (**Paragrafo 5.3.1**), che differiscono da quelli riportati negli studi precedenti. Poiché nell'analisi potenziometrica del sistema Ba<sup>2+</sup>-oddm l'andamento del potenziale nella porzione acida della curva di titolazione risulterebbe influenzato dalla presenza del prodotto di degradazione del legante, si è deciso di utilizzare solamente la spettroscopia <sup>1</sup>H-NMR per lo studio del complessamento Ba<sup>2+</sup>-oddm.

#### 5.3.3.1 Valutazione qualitativa della cinetica di complessamento

Prima di procedere con la caratterizzazione termodinamica del sistema Ba<sup>2+</sup>-oddm è stata condotta una valutazione qualitativa della cinetica di complessamento, in modo analogo a quanto descritto nel **Paragrafo 5.2.2.1** per il sistema Ba<sup>2+</sup>-macrocat. Sono stati dunque acquisiti rapidamente degli spettri <sup>1</sup>H-NMR di soluzioni preparate al momento contenenti oddm e Ba<sup>2+</sup> a diversi valori di pH (5, 7 e 9), con un rapporto molare metallo-legante pari a 1:1; ciascuno spettro è stato poi confrontato con quello relativo al solo legante allo stesso valore di pH. Per tutte le soluzioni analizzate è stata riscontrata una variazione significativa tra lo spettro della miscela Ba<sup>2+</sup>-oddm e quello del solo legante, dimostrando che la formazione del complesso risulta sufficientemente rapida da avvenire nell'intervallo di tempo che intercorre tra la preparazione della soluzione e l'analisi NMR. Tali osservazioni hanno dunque confermato una cinetica di complessamento rapida nei confronti del bario.

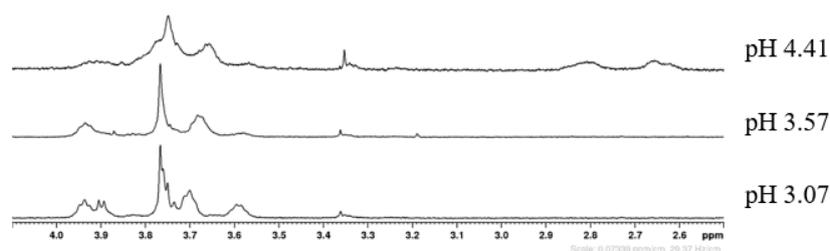
### 5.3.3.2 Spettroscopia NMR

Attraverso l'analisi  $^1\text{H-NMR}$  delle soluzioni di  $\text{Ba}^{2+}$  e oddm a diversi valori di pH è stato possibile ipotizzare la speciazione e determinare il valore delle costanti di complessamento per il sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -legante. Una selezione degli spettri  $^1\text{H-NMR}$  acquisiti a diversi pH è mostrata in **Figura 5.26**.



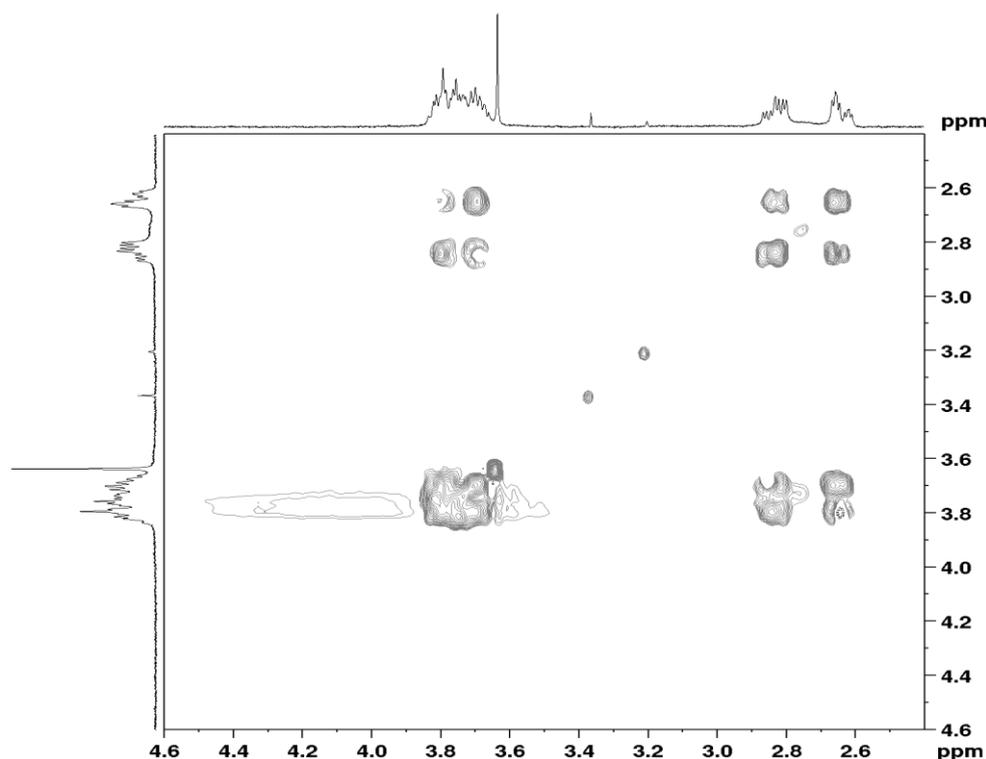
**Figura 5.26** Spettri  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, 298 K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente oddm  $10^{-3}$  M e  $\text{BaCl}_2$   $10^{-3}$  M a pH > 5.

In tutte le soluzioni a pH > 4, gli spettri registrati per il sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -oddm differiscono dai relativi spettri del solo legante allo stesso pH (**Figura 5.17**), indice della presenza di complessi in tali condizioni di pH. Poiché la forma dello spettro risulta pressoché invariata nell'intervallo di pH 5-12, si può ipotizzare che in tali condizioni esista un'unica specie, nella quale il legante si trova probabilmente nella forma completamente deprotonata ( $\text{L}^{4-}$ ), ossia quella che risulta prevalente a pH basici (> 10). Per analogia ed esperienza nel complessamento di metalli con altri leganti macrociclici, il complesso ipotizzato è  $[\text{BaL}]^{2-}$ , caratterizzato da un rapporto stechiometrico metallo/legante di 1:1. In condizioni più acide la forma dello spettro varia, e a pH < 4 risulta identica a quella delle soluzioni di solo legante, in cui compaiono anche i segnali dovuti al prodotto di decarbossilazione dell'oddm (**Figura 5.27**).

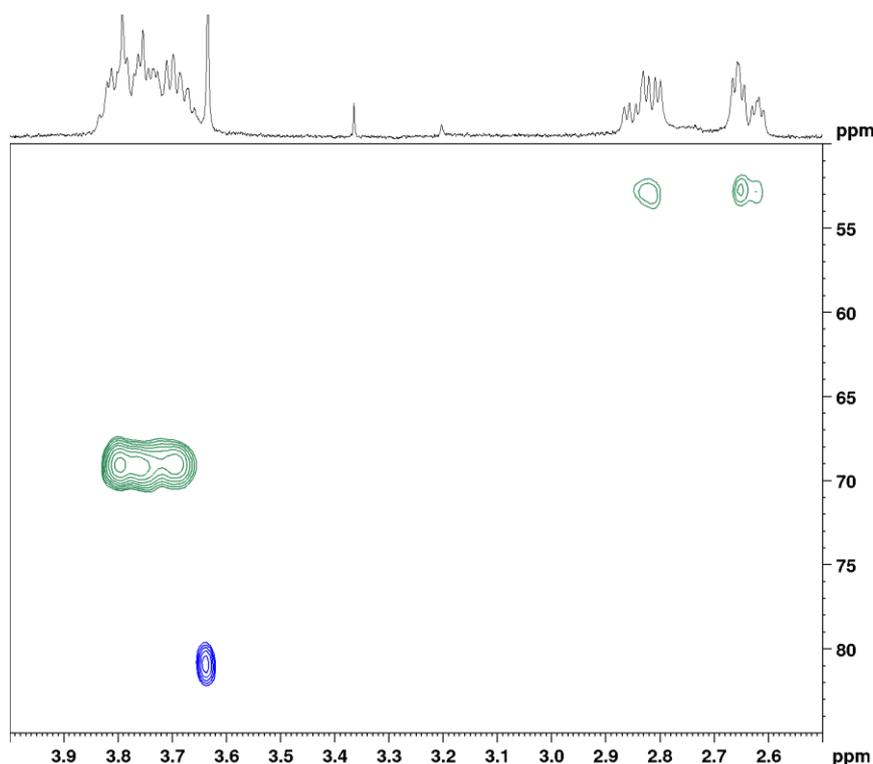


**Figura 5.27** Spettri  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, 298 K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente oddm  $10^{-3}$  M e  $\text{BaCl}_2$   $10^{-3}$  M a pH acidi ( $< 5$ ).

Negli spettri in cui appare il complesso  $\text{Ba}^{2+}$ -legante (pH 5-12) l'assegnazione dei segnali ai rispettivi nuclei risulta complicata, in quanto la molteplicità e i valori di *chemical shift* differiscono da quelli dei segnali del solo legante. La maggiore molteplicità dei segnali che caratterizzano il complesso (ad eccezione del singoletto a 3.70 ppm) è probabilmente dovuta al fatto che i protoni assiali ed equatoriali dei metileni dell'anello centrale non risultano magneticamente equivalenti per ragioni conformazionali legate alla coordinazione dello ione metallico. Al fine di ottenere informazioni utili per l'attribuzione dei segnali ai rispettivi nuclei sono stati acquisiti gli spettri bidimensionali TOCSY ed HSQC della soluzione di oddm e  $\text{Ba}^{2+}$ , mostrati rispettivamente in **Figura 5.28** e **5.29**.



**Figura 5.28** Spettro TOCSY  $^1\text{H-}^1\text{H}$  (400 MHz, 298 K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente oddm  $10^{-3}$  M e  $\text{BaCl}_2$   $10^{-3}$  M a pH 9.89.



**Figura 5.29** Spettro HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400MHz, 298K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente  $\text{oddm}$   $10^{-3}$  M e  $\text{BaCl}_2$   $10^{-3}$  M a pH 9.89. Sull'asse delle ascisse sono riportati lo spettro  $^1\text{H}$ -NMR e i valori di *chemical shift* dei protoni, mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di  $\delta$  relativi ai nuclei  $^{13}\text{C}$ . I picchi negativi ( $\text{CH}_2$ ) sono raffigurati in verde, quelli positivi ( $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_3$ ) in blu.

Attraverso lo spettro HSQC mostrato in **Figura 5.29** è stato possibile attribuire con certezza l'unico segnale positivo, che corrisponde ad un singoletto a 3.70 ppm nello spettro  $^1\text{H}$ -NMR, al CH dell'acido malonico, in accordo con l'assenza di accoppiamenti per questo segnale nello spettro TOCSY. Inoltre, considerando il probabile ordine di schermatura dei vari metileni che compongono l'anello centrale, è stato ipotizzato che i segnali del protone nell'intervallo di  $\delta$  compreso tra 2.6 e 2.9 ppm appartengano ai metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  mentre quelli a 3.6-3.8 ppm siano attribuibili ai metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  e  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ . Lo spettro HSQC mostra inoltre che i multipletti a 2.6-2.9 ppm sono originati da due diversi tipi di protoni legati ad uno stesso carbonio, supportando l'ipotesi che questi siano relativi ai protoni assiali ed equatoriali  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ , che accoppiano tra loro come dimostrato dal TOCSY. Lo stesso si verifica probabilmente anche per i protoni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ , dato che il *pattern* dei segnali TOCSY è analogo e mostra l'accoppiamento sia tra due diversi protoni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  sia tra questi e i protoni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ . L'individuazione dei segnali relativi ai protoni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  è complicata dal fatto che essi sono sovrapposti a quelli dei protoni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  ed accoppiano solo tra loro, perciò non sono distinguibili né tramite HSQC né tramite TOCSY. Sulla base dello spettro monodimensionale, tuttavia, si deduce che anche questi protoni diano almeno due multipletti perché

un unico singoletto sarebbe molto più intenso rispetto a quello dei protoni CH, con un rapporto delle aree pari a 4:1 che invece non si osserva.

Come illustrato in **Figura 5.26** e **5.27**, i *chemical shift* dei segnali del complesso rimangono costanti al variare del pH; inoltre, a pH compresi tra ~ 4 e 5-6 sono visibili due diversi *set* di segnali con intensità relative variabili, originati dal complesso e dal legante libero, indice di uno scambio lento tra queste due specie rispetto al *time scale* dell’NMR. Di conseguenza la  $\log\beta$  non può essere determinata studiando l’andamento del  $\delta$  dei segnali al variare del pH come nei sistemi in scambio rapido, ma si è studiata la variazione di intensità dei segnali attribuiti al complesso  $[\text{BaL}]^{2-}$ , proporzionale alla sua concentrazione (equazione 5.3) e quindi dipendente dal pH della soluzione.

$$i = k \cdot [\text{BaL}]^{2-} \quad (5.3)$$

L’unico segnale di cui è stato possibile ricavare l’intensità ( $i$ ) dagli spettri è quello attribuibile ai nuclei  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  (2.6-2.9 ppm), non essendo sovrapposto a picchi di altri nuclei. Per ciascuno dei due multipletti e per la loro somma è stata riportata l’intensità del segnale (espressa come rapporto tra l’integrale del segnale considerato e quello del picco del TSP a 0 ppm) in funzione del pH della soluzione. L’equazione di *fitting* per l’elaborazione dei dati sperimentali (equazione 5.4) è stata ottenuta attraverso la risoluzione di un sistema che comprende l’equazione 5.3, gli equilibri di complessamento secondo il modello di speciazione ipotizzato (ossia un unico complesso  $[\text{BaL}]^{2-}$ ), gli equilibri acido-base del legante, le cui  $\text{p}K_a$  sono riportate in **Tabella 5.5**, e i bilanci di massa relativi al legante e allo ione metallico.

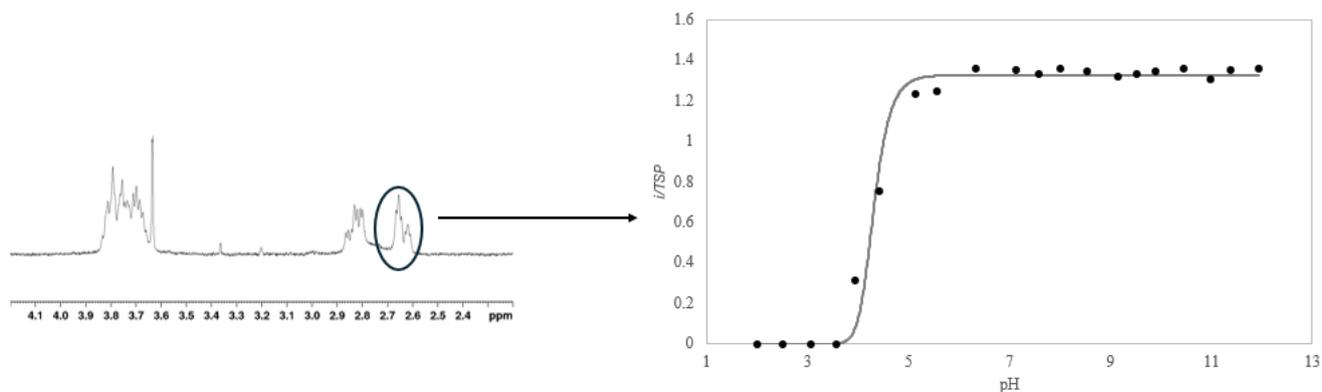
$$i = k \cdot \frac{\beta \cdot C_M + \beta \cdot C_L + \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_6} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_6 K_5} + \frac{[\text{H}^+]^3}{K_6 K_5 K_4} + \frac{[\text{H}^+]^4}{K_6 K_5 K_4 K_3}\right) \pm \sqrt{\left(\beta \cdot C_M + \beta \cdot C_L + \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_6} + \frac{[\text{H}^+]^2}{K_6 K_5} + \frac{[\text{H}^+]^3}{K_6 K_5 K_4} + \frac{[\text{H}^+]^4}{K_6 K_5 K_4 K_3}\right)\right)^2 + 4 \cdot \beta^2 \cdot C_L C_M}}{2\beta} \quad (5.4)$$

Nell’equazione sopra riportata compaiono i seguenti parametri:

- $k$  è una costante di proporzionalità;
- $\beta$  è la costante di formazione del complesso  $[\text{BaL}]^{2-}$ ;
- $C_M$  e  $C_L$  rappresentano rispettivamente le concentrazioni stechiometriche del metallo e del legante, entrambe pari a 0.001 M;
- $[\text{H}^+]$  rappresenta la concentrazione di idrogenioni nella soluzione;
- $K_3, K_4, K_5$  e  $K_6$  sono le costanti di acidità dell’oddm.

Il *fitting* delle curve sperimentali è stato eseguito mediante il programma *Origin*, utilizzando l’equazione 5.4. I parametri noti inseriti nell’equazione sono  $C_M, C_L$  e le  $\text{p}K_a$  dell’oddm (elencate in **Tabella 5.5**), mentre il parametro  $k$  e la costante di formazione del complesso ( $\log\beta_{\text{BaL}}$ ) sono stati

ottimizzati dall'algoritmo. In **Figura 5.30** è mostrato un esempio della curva di *fitting* ottenuta dall'elaborazione dei dati sperimentali relativi al multipletto centrato a 2.64 ppm.



**Figura 5.30** A sinistra: Spettro  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, 298K, 90%  $\text{H}_2\text{O}$  +10%  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione di oddm e  $\text{BaCl}_2$  a pH  $\sim 10$ ; il segnale cerchiato corrisponde ad uno dei due multipletti dei nuclei  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ . A destra: punti sperimentali e curva di *fitting* relativi all'andamento dell'intensità del segnale in funzione del pH.

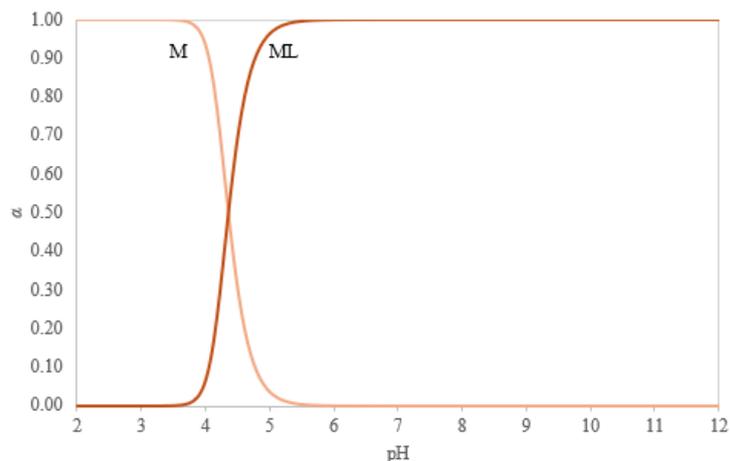
La costante di formazione del complesso  $[\text{BaL}]^{2-}$  ( $\log\beta_{\text{BaL}}$ ) è stata calcolata come media dei valori ricavati in ognuno dei tre *fitting* delle curve sperimentali (una per ciascuno dei due multipletti e una per la loro somma) ed è risultata pari a  $16.64 \pm 0.27$ . Il valore della costante di complessamento  $\text{Ba}^{2+}$ -oddm riportata in letteratura, ( $\log\beta_{\text{BaL}} = 9.76$  [32]), e quello determinato nel precedente lavoro di tesi condotto dal nostro gruppo di ricerca ( $\log\beta_{\text{BaL}} = 7.26 \pm 0.22$  [24]) risultano in totale disaccordo con il presente studio. Ciò, tuttavia, era prevedibile considerando che le fonti precedenti non avevano tenuto conto della decarbossilazione dell'oddm a pH acido.

**Tabella 5.6**  $\log\beta$  del complesso  $\text{Ba}^{2+}$ -oddm ottenuta dall'elaborazione dei dati potenziometrici ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M).

Stechiometria	$\log\beta$
BaL	$16.64 \pm 0.27$

### 5.3.3.3 Diagramma di distribuzione e calcolo del pM

Il diagramma di distribuzione del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -oddm è stato ottenuto utilizzando il programma *HySS*. Il diagramma restituito dal *software* è riportato in **Figura 5.31**.

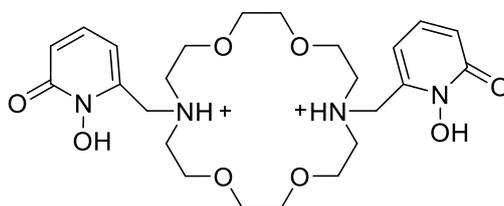


**Figura 5.31** Diagramma di distribuzione del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -oddm. Le concentrazioni iniziali di legante e metallo sono state impostate pari a  $10^{-3}$  M.

Sulla base della  $\log\beta$  del complesso  $[\text{BaL}]^{2-}$ , è stato determinato anche il pM, il cui valore si può ricavare dai dati del diagramma di distribuzione che si ottiene impostando nel *software HySS* le condizioni indicate nel **Paragrafo 5.2.2.3**. Il valore di pM ottenuto per il sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -oddm è risultato pari a 14.6, mostrando che l'oddm è in grado di complessare fortemente il  $\text{Ba}^{2+}$  nelle condizioni considerate.

#### 5.4 CARATTERIZZAZIONE DEL LEGANTE macroHOPO

L'ultimo chelante macrociclico studiato nel presente lavoro di tesi è il macroHOPO, rappresentato in **Figura 5.32**. Oltre ai siti donatori dell'anello centrale (due azoti e quattro ossigeni), la molecola presenta altri quattro ossigeni nei due sostituenti laterali che possono essere coinvolti nella coordinazione dello ione metallico.



**Figura 5.32** Struttura del macroHOPO, nella forma completamente protonata, indicata come  $\text{H}_4\text{L}^{2+}$ .

Nel presente lavoro è stata condotta la caratterizzazione del macroHOPO e dei suoi complessi con il  $\text{Ba}^{2+}$ , utilizzando i metodi potenziometrico e di spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  già applicati allo studio degli altri due chelanti macrociclici, allo scopo di determinare le costanti di dissociazione acida del legante, la speciazione e le costanti di complessamento  $\text{Ba}^{2+}$ -legante. Questi dati non sono ancora stati riportati

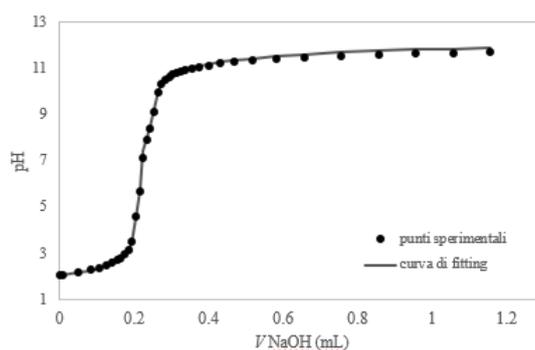
in letteratura dato che il macroHOPO è un composto nuovo, che è stato sintetizzato e studiato per la prima volta dal nostro gruppo di ricerca.

#### 5.4.1 COSTANTI DI ACIDITÀ DEL macroHOPO

In base al numero di siti della molecola in cui può avvenire la protonazione/deprotonazione, per il macroHOPO si possono determinare fino a quattro costanti di acidità. Poiché la struttura del chelante presenta due ammine terziarie nell'anello centrale e due molecole di 1,2-HOPO come sostituenti laterali, il cui valore di  $pK_a$  risulta pari a 5.78 [33], è ragionevole pensare che tutti gli equilibri acido-base avvengano nell'intervallo di pH tra 2 e 12 considerato nelle misure sperimentali.

##### 5.4.1.1 Potenzimetria

Per la caratterizzazione del macroHOPO mediante potenziometria sono state eseguite tre titolazioni con l'elettrodo di vetro secondo la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.1.5.**, utilizzando come titolante la soluzione di NaOH 0.1535 M precedentemente standardizzata (**Paragrafo 5.1.3**). Come discusso nel **Paragrafo 5.2.1.1**, nell'elaborazione dei dati sperimentali i valori dei parametri  $C_b$ ,  $pK_{Na}$ ,  $pK_W$  ricavati dalla standardizzazione della base sono stati mantenuti fissi, come anche le costanti di acidità dell'acido carbonico,  $pK_{a1,carb}$  e  $pK_{a2,carb}$ , ed  $S$ ; sono stati ottimizzati i valori delle diverse  $pK_a$  del legante e dei parametri  $E^0$ ,  $imp$  e  $C_L$ . Il *fitting* delle tre curve di titolazione ha restituito quattro  $pK_a$ , i cui valori sono indicati in **Tabella 5.6**. Un esempio di curva di titolazione del macroHOPO è riportato in **Figura 5.33**.



**Figura 5.33** Curva di *fitting* per una titolazione potenziometrica del macroHOPO con NaOH 0.1535 M (soluzione B2). La soluzione da analizzare è stata preparata con 0.597 mL di soluzione L4 (**Paragrafo 4.3.1**), 2.403 mL di acqua ultrapura ( $I = \text{NaCl } 0.15\text{M}$ ) e 0.25 mL di HCl 0.1119 M.

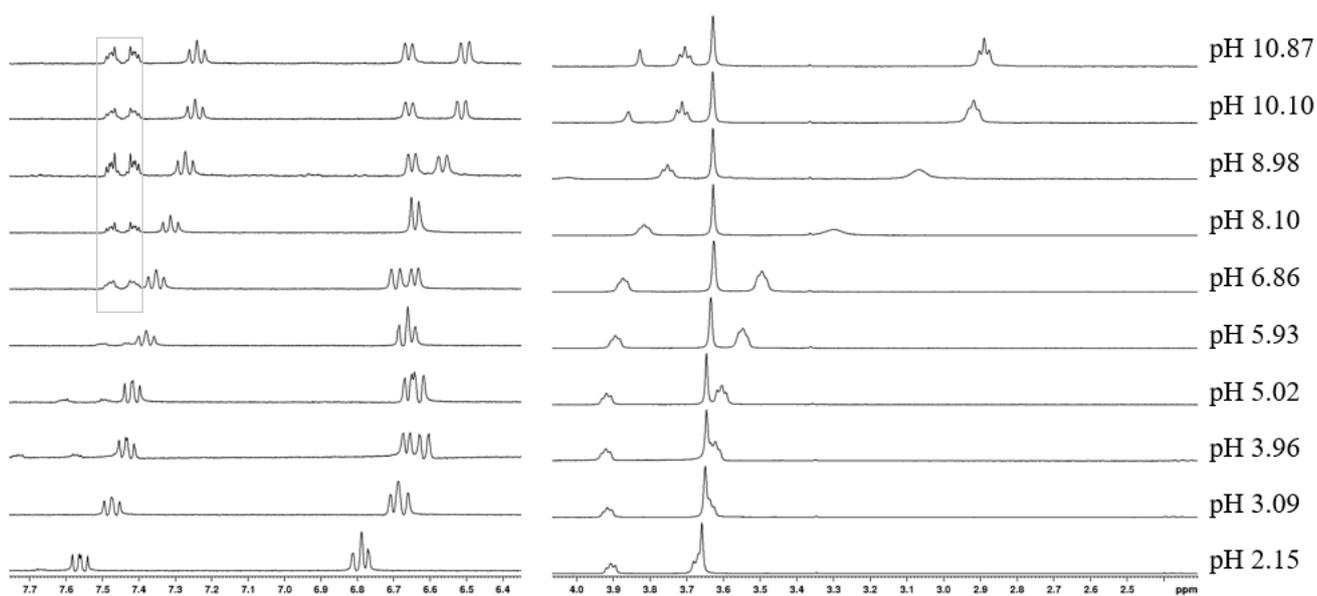
**Tabella 5.6**  $pK_a$  del legante macroHOPO determinate mediante potenziometria ( $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M).

Equilibrio	$pK_{a,L}$
$pK_{a1}: \text{H}_4\text{L}^{2+} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^+ + \text{H}^+$	$2.57 \pm 0.19$
$pK_{a2}: \text{H}_3\text{L}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L} + \text{H}^+$	$5.42 \pm 0.14$
$pK_{a3}: \text{H}_2\text{L} \rightleftharpoons \text{HL}^- + \text{H}^+$	$8.03 \pm 0.21$
$pK_{a4}: \text{HL}^- \rightleftharpoons \text{L}^{2-} + \text{H}^+$	$8.37 \pm 0.22$

Dall'analisi potenziometrica sono state ottenute quattro costanti di acidità, per cui nell'intervallo di pH considerato nelle misure sperimentali (2-12) è effettivamente possibile osservare gli equilibri di protonazione/deprotonazione di tutti i siti acidi della molecola.

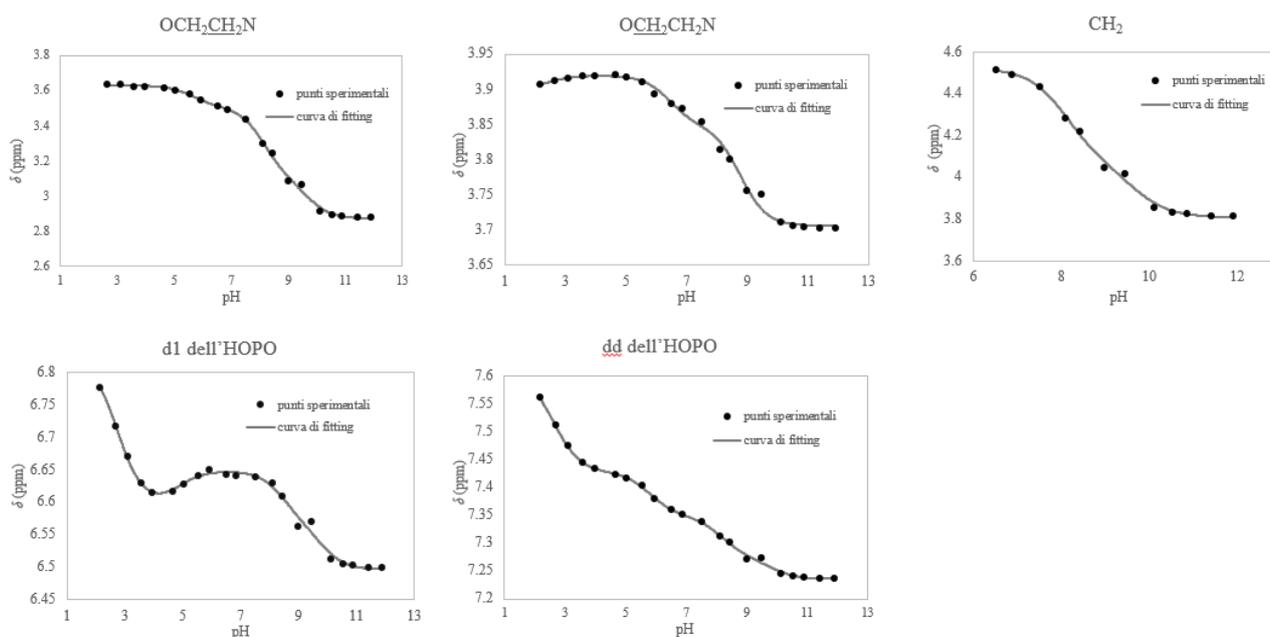
#### 5.4.1.2 Spettroscopia NMR

Gli spettri  $^1\text{H}$ -NMR delle soluzioni acquose di macroHOPO a diversi pH sono stati acquisiti secondo la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.2**. In **Figura 5.34**, in cui viene riportata una selezione degli spettri ottenuti, è possibile osservare l'andamento dei *chemical shift* dei vari segnali del composto al variare del pH.



**Figura 5.34** Spettri  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz, 298 K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente macroHOPO 1 mM a diversi valori di pH. A sinistra è riportato l'intervallo di *chemical shift* 6.4-7.7 ppm, a destra l'intervallo di *chemical shift* dei protoni alifatici. I segnali evidenziati dal riquadro grigio sono dovuti a delle impurezze presenti nei tubi NMR, quindi non appartengono al composto in esame.

Come negli spettri degli altri due chelanti macrociclici in studio, la regione alifatica presenta tre segnali attribuibili ai protoni del Kryptofix 22: un tripletto a valori di  $\delta$  tra 3.7 e 3.9 ppm attribuito al metilene  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ , un singoletto associato ai metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  (3.63 ppm) ed un tripletto attribuito ai metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ , il cui valore di *chemical shift* nelle diverse soluzioni di legante varia approssimativamente tra 3.7 ppm (pH 2) e 2.9 ppm (pH 12). Inoltre, a pH basici è possibile distinguere un singoletto attribuibile ai protoni del metilene che funge da *linker*, la cui intensità diminuisce gradualmente fino a scomparire a  $\text{pH} < 6.5$ , a causa della soppressione insieme al segnale dell'acqua. A valori di  $\delta$  più elevati, vicini all'intervallo tipico dei protoni aromatici, si osservano i segnali relativi ai protoni dell'HOPO: due doppietti (d1 e d2,  $\delta = 7.2\text{-}7.6$  ppm, CH in orto e para rispetto al carbonile) ed un doppietto di doppietti (dd,  $\delta = 6.4\text{-}6.9$  ppm, CH in meta al carbonile). Per ciascuno dei segnali appena descritti, le costanti di dissociazione acida del legante sono state determinate mediante l'elaborazione dei dati sperimentali relativi all'andamento dei *chemical shift* al variare del pH (**Figura 5.35**).



**Figura 5.35** Andamenti dei *chemical shift* dei segnali  $^1\text{H-NMR}$  del macroHOPO al variare del pH e relative curve di *fitting*.

In **Figura 5.35** non sono stati riportati i grafici relativi al singoletto dei metileni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$  e al doppietto d2 dell'HOPO, la cui variazione di *chemical shift* risulta meno marcata rispetto a quella degli altri segnali della molecola.

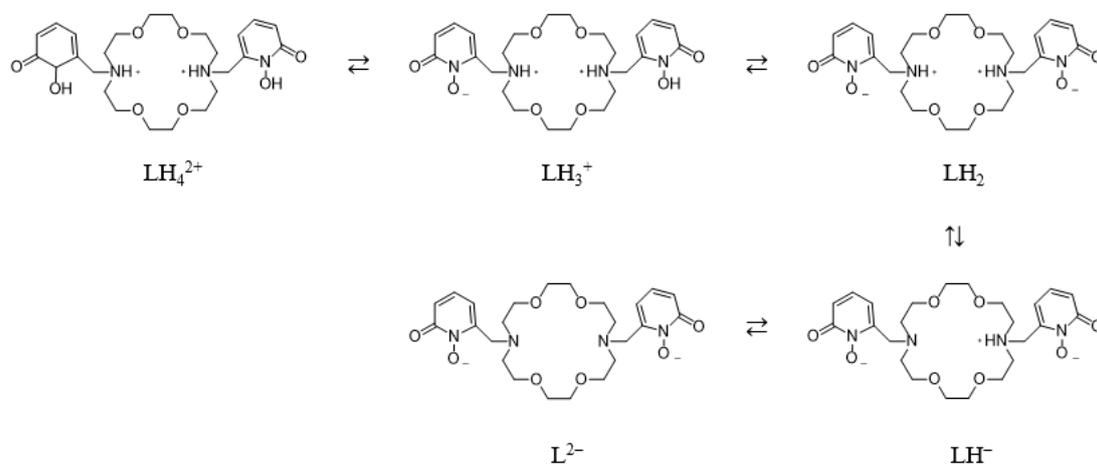
L'equazione teorica che ha fornito i migliori indici di bontà del *fitting* è quella che descrive l'andamento di  $\delta$  in funzione del pH per un legante caratterizzato da quattro costanti di acidità, in

accordo con i dati potenziometrici. Le  $pK_a$  del macroHOPO riportate in **Tabella 5.7** sono state ottenute calcolando la media dei valori delle quattro  $pK_a$  ricavati dai *fitting* dei dati di ciascun segnale.

**Tabella 5.7**  $pK_a$  del legante macroHOPO determinate mediante spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  ( $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M).

Equilibrio	$pK_{a,L}$
$pK_{a1}: \text{H}_4\text{L}^{2+} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^+ + \text{H}^+$	$2.51 \pm 0.55$
$pK_{a2}: \text{H}_3\text{L}^+ \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L} + \text{H}^+$	$5.59 \pm 0.34$
$pK_{a3}: \text{H}_2\text{L} \rightleftharpoons \text{HL}^- + \text{H}^+$	$8.20 \pm 0.37$
$pK_{a4}: \text{HL}^- \rightleftharpoons \text{L}^{2-} + \text{H}^+$	$9.72 \pm 0.42$

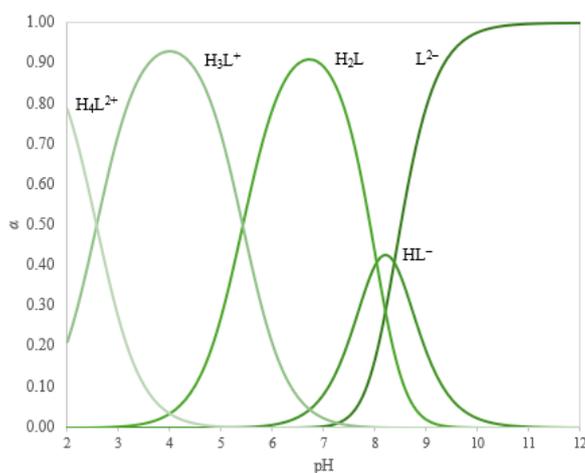
Ad eccezione della  $pK_{a4}$ , i valori delle costanti di acidità ottenute dall'analisi  $^1\text{H-NMR}$  del macroHOPO risultano in accordo con i dati potenziometrici riportati in **Tabella 5.6**. Confrontando gli andamenti di  $\delta$  relativi ai protoni dell'HOPO, che risentono maggiormente della deprotonazione di questo gruppo funzionale, con quelli dei nuclei  $^1\text{H}$  dell'anello centrale è possibile assegnare le  $pK_a$  ottenute ai rispettivi siti acidi della molecola. Come si osserva in **Figura 5.35**, i segnali relativi ai protoni dell'HOPO presentano a  $\text{pH} < 5$  una marcata diminuzione del *chemical shift*, a differenza dei segnali relativi ai protoni alifatici, in cui  $\delta$  diminuisce solamente a  $\text{pH}$  superiori a 6: si può quindi dedurre che le prime due  $pK_a$  appartengano ai gruppi acidi nelle due molecole di HOPO, mentre le ultime due appartengano alle ammine terziarie. Sulla base di queste osservazioni, la sequenza di deprotonazione del macroHOPO più probabile è quella mostrata in **Figura 5.36**. I gruppi ossidrilici del macroHOPO risultano particolarmente acidi rispetto all'1,2-HOPO grazie alla possibilità di formare legami a idrogeno intramolecolari con le rispettive ammine protonate nell'anello, come già osservato per il macrocat.



**Figura 5.36** Sequenza di deprotonazione più probabile per il macroHOPO.

### 5.4.1.3 Diagramma di distribuzione

Il diagramma di distribuzione del macroHOPO è stato tracciato con il programma *HySS*, impostando i valori di  $pK_a$  ottenuti dall'analisi potenziometrica (**Tabella 5.6**), ritenuti più accurati rispetto a quelli ricavati mediante la spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ . Le specie indicate nel grafico si riferiscono alle forme più o meno protonate della molecola rappresentate in **Figura 5.36**.



**Figura 5.37** Diagramma di distribuzione del macroHOPO nell'intervallo di pH 2-12.

### 5.4.2 COSTANTI DI COMPLESSAMENTO $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO

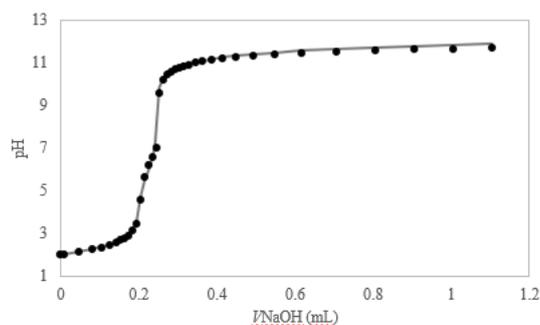
Come per gli altri sistemi  $\text{Ba}^{2+}$ -legante studiati in questo lavoro di tesi, a seguito della caratterizzazione del chelante sono state condotte delle analisi potenziometriche e di spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  finalizzate a conoscere la speciazione, la stechiometria e il valore delle costanti di formazione ( $\log\beta$ ) dei complessi del macroHOPO con il bario.

#### 5.4.2.1 Potenzimetria

Per la caratterizzazione del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO sono state eseguite tre titolazioni potenziometriche secondo la procedura descritta nel **Paragrafo 4.4.1.6**, utilizzando come titolante NaOH. Analogamente allo studio potenziometrico dei complessi  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat (**Paragrafo 5.2.2.1**), nell'elaborazione dei dati sperimentali sono stati inclusi i seguenti parametri:

- $E^0$ ,  $S$ ,  $C_b$ ,  $pK_{\text{Na}}$ ,  $\alpha$ ,  $imp$ ,  $pK_w$ ,  $pK_{a1,carb}$  e  $pK_{a2,carb}$ ;
- $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$ ,  $pK_{a3}$  e  $pK_{a4}$  del legante, mantenute fisse ai valori indicati in **Tabella 5.6**;
- $C_L$  e  $C_M$ , pari a 0.001 M;
- le costanti di complessamento,  $\beta_{m,l,h}$ , il cui numero non è noto a priori.

Oltre al valore di  $\beta_{m,l,h}$ , sono stati ottimizzati anche  $E^0$  e  $imp$ . L'ottimizzazione di ogni curva sperimentale è stata ripetuta utilizzando diversi modelli di speciazione, scegliendo poi quello che restituisse il migliore indice di bontà del *fitting*. In **Figura 5.38** è riportato un esempio di *fitting* dei punti sperimentali di una titolazione della soluzione  $Ba^{2+}$ -legante, mentre in **Tabella 5.8** sono riportate le costanti di complessamento ottenute dall'elaborazione dei dati sperimentali con *PITMAP*.



**Figura 5.38** Curva di *fitting* per una titolazione potenziometrica di una soluzione contenente macroHOPO e  $BaCl_2$ , entrambi a concentrazione 1 mM, con NaOH 0.1535 M (soluzione B2). La soluzione da analizzare è stata preparata con 0.589 mL di soluzione L6 (**Paragrafo 4.3.1**), 0.150 mL di soluzione di  $BaCl_2$  (**Paragrafo 4.3.1**), 2.261 mL di acqua ultrapura ( $I = NaCl$  0.15M) e 0.25 mL di HCl 0.1119 M.

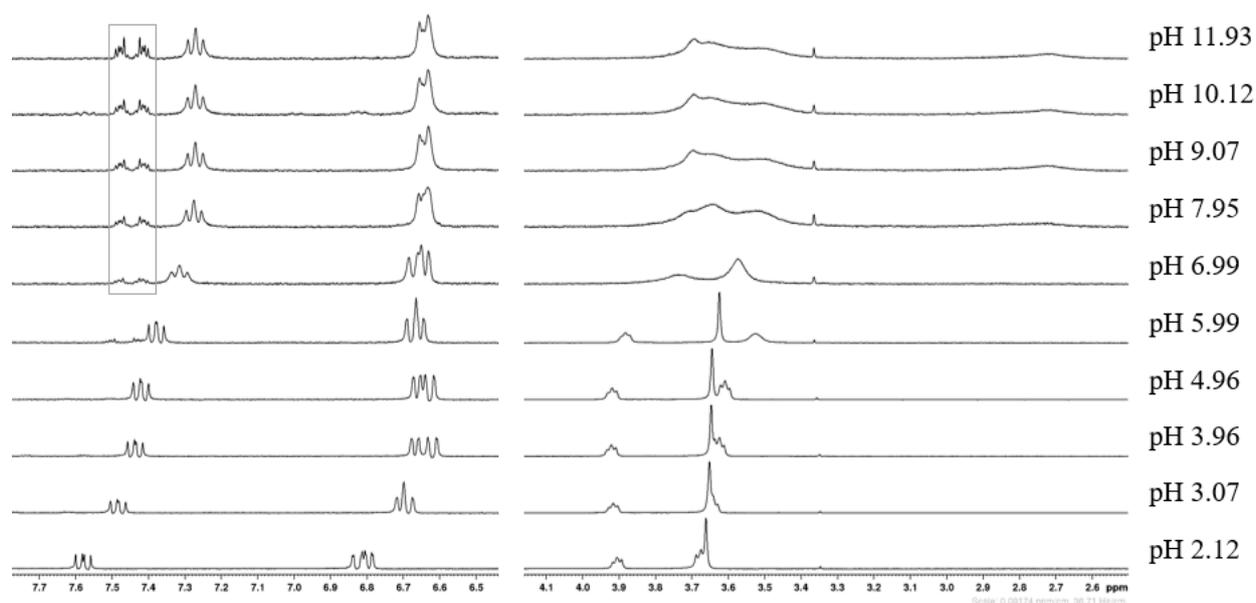
**Tabella 5.8** Stechiometria e  $\log\beta$  dei complessi  $Ba^{2+}$ -macroHOPO ottenuti dall'elaborazione dei dati potenziometrici ( $T = 25^\circ C$ ,  $I = (Na)Cl$  0.15 M).

<u>Stechiometria</u>	<u><math>\log\beta</math></u>
BaL	$6.88 \pm 0.10$
BaHL <sup>+</sup>	$13.578 \pm 0.097$

Il modello di speciazione che ha restituito il miglior indice di bontà del *fitting* è quello caratterizzato da due specie, BaL e BaHL<sup>+</sup>, entrambe caratterizzate da un rapporto stechiometrico bario-macroHOPO di 1:1.

#### 5.4.2.2 Spettroscopia NMR

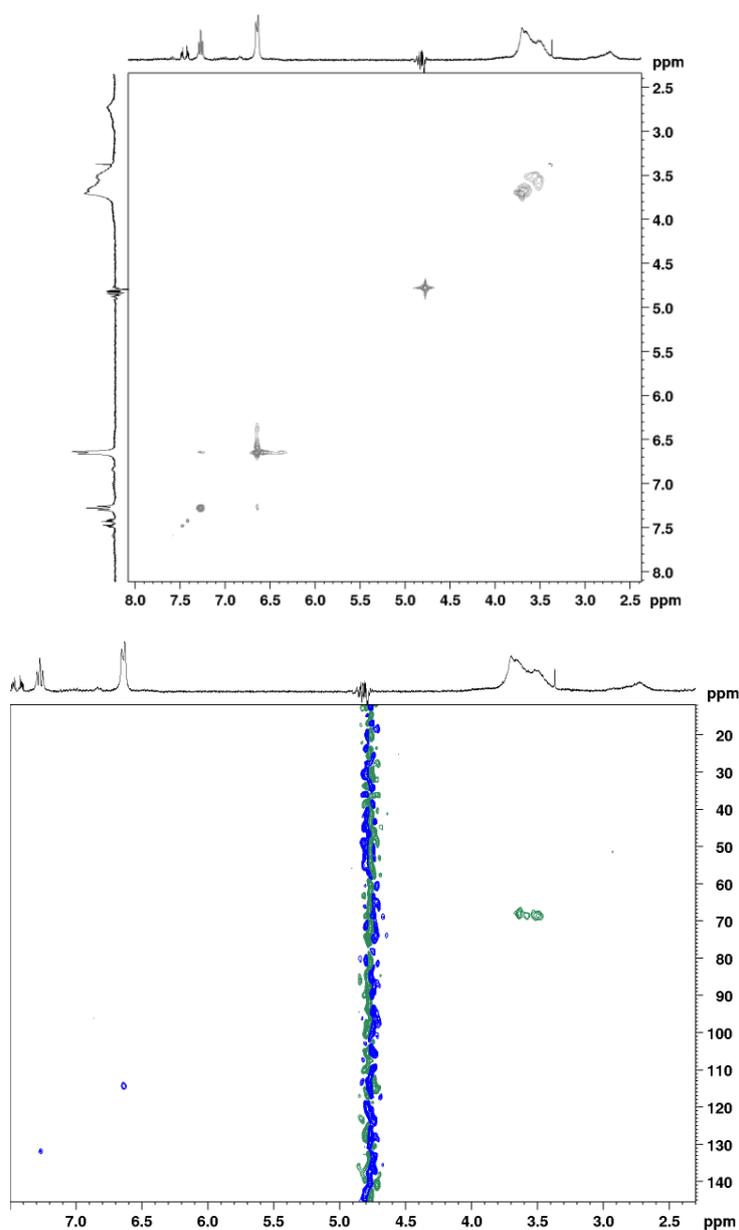
Attraverso gli spettri <sup>1</sup>H-NMR delle soluzioni di  $Ba^{2+}$  e macroHOPO sono state ottenute delle informazioni qualitative sui complessi presenti in soluzione, a supporto dei dati potenziometrici. Una selezione degli spettri <sup>1</sup>H-NMR delle soluzioni  $Ba^{2+}$ -legante a diversi pH è mostrata in **Figura 5.39**.



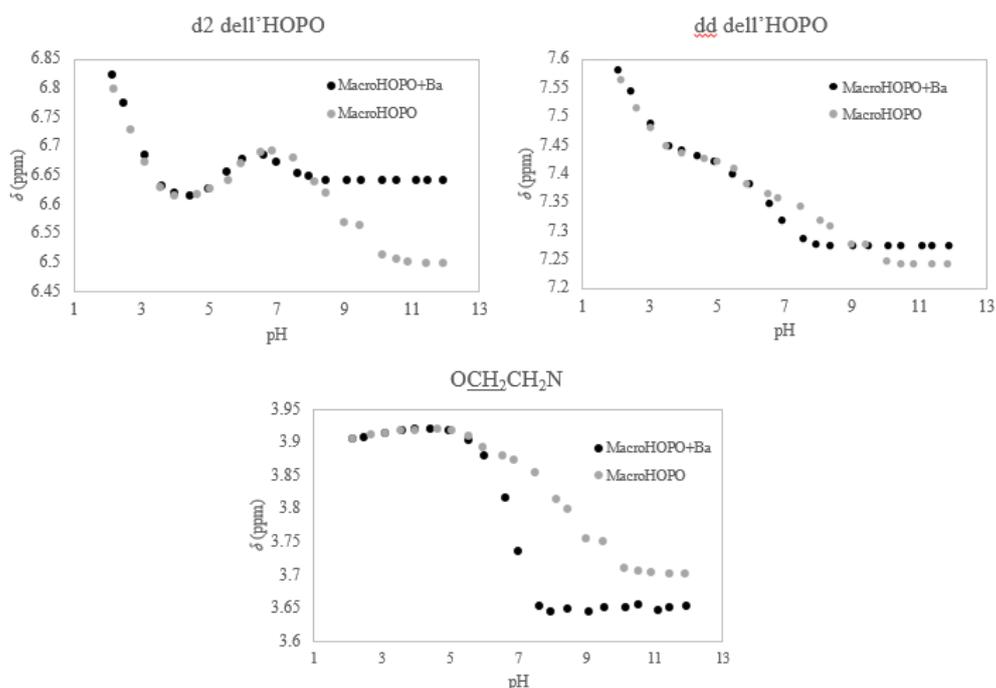
**Figura 5.39** Spettri  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, 298 K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M) di una soluzione contenente macroHOPO  $10^{-3}$  M e  $\text{BaCl}_2$   $10^{-3}$  M a differenti valori di pH. A sinistra è riportato l'intervallo di *chemical shift* 6.5-7.7, a destra l'intervallo di *chemical shift* dei protoni alifatici. I segnali evidenziati dal riquadro grigio sono dovuti a delle impurezze presenti nei tubi NMR, quindi non appartengono al composto in esame.

A  $\text{pH} < 6.0$  gli spettri delle soluzioni  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO risultano identici a quelli del solo legante allo stesso pH (mostrati in **Figura 5.34**), a dimostrazione del fatto che in queste condizioni non si verifica la formazione di complessi. Il complessamento si osserva a pH più basici, in cui la forma e il valore di *chemical shift* dei picchi cambiano in ogni spettro fino a  $\text{pH} \sim 8.5$ , oltre il quale l'aspetto generale degli spettri rimane pressoché invariato. Nelle soluzioni in cui compaiono i complessi  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO, la regione alifatica dello spettro presenta dei picchi molto allargati e sovrapposti completamente diversi dai segnali del solo legante; per tale motivo l'esatta attribuzione di ciascun segnale del complesso ai rispettivi nuclei risulta complicata, anche dopo l'osservazione degli spettri bidimensionali TOCSY ed HSQC (**Figura 5.40**). Sulla base della schermatura e del *chemical shift* dei nuclei di  $^{13}\text{C}$ , tuttavia, è ragionevole attribuire il segnale centrato a 2.72 ppm ai protoni  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$  e il multipletto a 3.4-3.8 ppm a tutti i protoni  $\text{OCH}_2$ . Per confronto con gli spettri del solo legante si è inoltre ipotizzato che il segnale a 3.5-3.6 ppm sia dovuto ai gruppi  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ , mentre quello a 3.6-3.7 ppm sia dovuto ai  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ . Non è chiaro se il gruppo  $\text{CH}_2$  dia un segnale in questa regione dello spettro o se non sia visibile per la vicinanza alla risonanza dell'acqua. Al contrario, per i protoni dell'HOPO l'attribuzione dei segnali rispecchia quella degli spettri del solo legante. Per alcuni nuclei è stato quindi possibile mettere a confronto l'andamento del *chemical shift*

al variare del pH negli spettri della miscela  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO con quello degli spettri del solo legante (Figura 5.41).



**Figura 5.40** Spettri  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY (in alto) e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (in basso) di una soluzione contenente macroHOPO  $10^{-3}$  M e  $\text{BaCl}_2$   $10^{-3}$  M a pH  $\sim 10$  (400 MHz, 298K, 10%  $\text{D}_2\text{O}$  + 90%  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $I = (\text{Na})\text{Cl}$  0.15 M). Per lo spettro HSQC, sull'asse delle ascisse sono riportati lo spettro  $^1\text{H}$ -NMR e i valori di *chemical shift* dei protoni, mentre sull'asse delle ordinate sono riportati i valori di  $\delta$  relativi ai nuclei  $^{13}\text{C}$ . I picchi negativi ( $\text{CH}_2$ ) sono raffigurati in verde, quelli positivi ( $\text{CH}$ ,  $\text{CH}_3$ ) in blu.

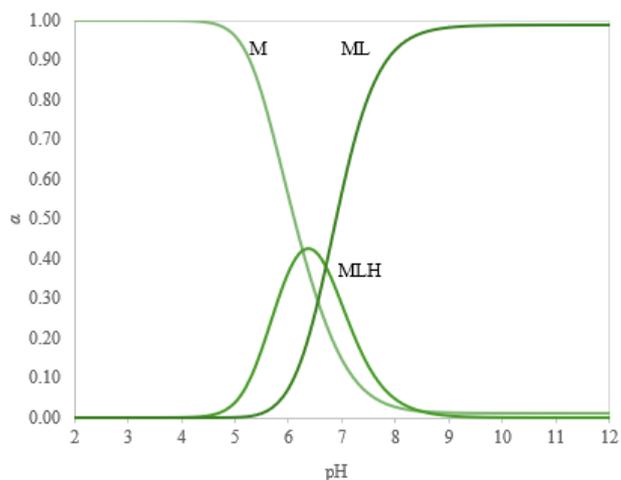


**Figura 5.41** Andamenti dei *chemical shift* di alcuni segnali  $^1\text{H-NMR}$  del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO e del solo legante al variare del pH.

Come accennato in precedenza, nelle soluzioni  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO a  $\text{pH} < 6$  compaiono solamente i segnali del legante, mentre a pH più elevati i valori di *chemical shift* riferiti al sistema metallo-legante differiscono da quelli del solo legante per tutti i segnali (**Figura 5.41**). In particolare, per il sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -legante, tutti i segnali mostrano inizialmente una diminuzione (più o meno marcata) del  $\delta$  rispetto ai corrispondenti segnali del solo legante, mentre a pH più basici (circa a  $\text{pH} > 8.5$ ) presentano un *chemical shift* costante. Questo comportamento suggerisce l'esistenza di due (o più) specie metallo-legante differenti, caratterizzate da un diverso grado di schermatura dei nuclei del legante, probabilmente dovuto alla presenza di (almeno) due forme diversamente protonate del legante. Tale ipotesi risulta coerente con il modello di speciazione ottenuto mediante l'analisi potenziometrica, secondo cui il sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO presenta due complessi diversamente protonati. Poiché nell'intervallo di pH 8.5-12 la forma prevalente del legante è quella completamente deprotonata ( $\text{L}^{2-}$ ), la specie più probabile in queste condizioni è  $[\text{BaL}]$ , in accordo con il modello elaborato dai dati potenziometrici.

#### 5.4.2.3 Diagramma di distribuzione e calcolo del pM

In **Figura 5.42** è riportato il diagramma di distribuzione del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO.



**Figura 5.42** Diagramma di distribuzione del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO. Le concentrazioni iniziali di legante e metallo sono state impostate pari a  $10^{-3}$  M.

Oltre alle costanti di complessamento delle specie  $[\text{BaL}]$  e  $[\text{BaLH}]^+$  ricavate nello studio potenziometrico, è stato determinato anche il pM secondo le condizioni indicate nel **Paragrafo 5.2.2.3** (pH 7.4,  $C_L = 10^{-5}$  M,  $C_M = 10^{-6}$  M), il cui valore è risultato pari a 6.4. Questo indica una modesta stabilità termodinamica dei complessi tra  $\text{Ba}^{2+}$  e macroHOPO, dato che il 25 % del bario risulta libero nelle condizioni adottate.

## CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI

Nella progettazione di nuovi radiofarmaci a base di  $^{223}\text{Ra}$  per il trattamento di tumori non ossei, una fase fondamentale riguarda l'identificazione di opportuni chelanti, in grado di formare con il radionuclide dei complessi dotati di un'elevata stabilità termodinamica ed inerzia cinetica, affinché non si verifichi la loro dissociazione *in vivo*.

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo lo studio delle proprietà complessanti termodinamiche di tre chelanti di natura macrociclica nei confronti dello ione  $\text{Ba}^{2+}$ , utilizzato come sostituto non radioattivo del  $\text{Ra}^{2+}$ . La caratterizzazione termodinamica di questi composti e dei loro complessi con il catione metallico è stata condotta mediante tecniche di potenziometria, spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  e parzialmente UV-Vis, attraverso le quali sono state determinate le costanti di dissociazione acida dei chelanti ( $\text{p}K_a$ ) e le costanti di formazione ( $\log\beta$ ) dei complessi  $\text{Ba}^{2+}$ -legante.

La struttura dei macrocicli studiati in questo lavoro riprende quella del macropa, il chelante che fino ad oggi ha dato i risultati più promettenti per il complessamento del  $\text{Ra}^{2+}$ , nella quale i due atomi di azoto dell'anello centrale (Kryptofix 22) sono entrambi funzionalizzati con una molecola di acido picolinico. I tre composti in studio (macrocat, oddm e macroHOPO) sono stati invece sintetizzati funzionalizzando il macrociclo centrale rispettivamente con due molecole di catecolo, acido malonico e 1,2-HOPO.

Nelle analisi potenziometriche e  $^1\text{H-NMR}$  del macrocat volte a determinare il numero e il valore delle  $\text{p}K_a$  del legante è stato osservato un processo degradativo del composto in ambiente basico, probabilmente dovuto all'ossidazione del catecolo. La caratterizzazione del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macrocat mediante potenziometria in ambiente acido e neutro ha permesso di determinare il numero e la stechiometria dei complessi con i relativi valori di  $\log\beta$ . Mediante la spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  è stato possibile osservare che il complessamento avviene a  $\text{pH} > 6.5$  (con  $C_L = C_{\text{Ba}} = 10^{-3} \text{ M}$ ) e che legante libero e complesso sono in rapido scambio rispetto al *time scale* dell' $^1\text{H-NMR}$ .

Lo studio del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -oddm, già caratterizzato in alcuni articoli non recenti e in un precedente lavoro di tesi svolto nel nostro gruppo di ricerca, è stato ripreso con l'obiettivo di verificare se le condizioni acide adoperate durante le analisi possano provocare la decarbossilazione del chelante (come ipotizzato nel lavoro di tesi precedente), e di ottenere dei nuovi valori di  $\text{p}K_a$  e  $\log\beta$  evitando la presenza del prodotto di decarbossilazione.

Spettri  $^1\text{H-NMR}$  acquisiti dopo l'acidificazione della soluzione di oddm, e l'analisi potenziometrica del chelante mediante retrotitolazione, hanno dimostrato la presenza di un processo degradativo irreversibile che si verifica in condizioni anche moderatamente acide, non solamente a  $\text{pH} < 2$  come era stato invece riportato negli studi precedenti. La conferma definitiva di tale fenomeno è stata ottenuta mediante uno studio NMR condotto impiegando la tecnica bidimensionale HSQC, il quale

ha permesso di dimostrare che la reazione coinvolta nella degradazione dell'oddm è la decarbossilazione di entrambe le molecole di acido malonico nei bracci laterali. La caratterizzazione dell'oddm e dei suoi complessi con il  $\text{Ba}^{2+}$  è stata quindi condotta evitando il contatto del legante con l'ambiente acido.

L'elaborazione dei dati potenziometrici, supportati dai dati  $^1\text{H-NMR}$ , ha restituito quattro costanti di acidità per l'oddm; negli studi precedenti sono riportate solamente tre  $pK_a$ , i cui valori sono in disaccordo con quelli ottenuti nel presente lavoro. Si può dunque desumere che le costanti di dissociazione acida ricavate nei precedenti studi non siano ascrivibili all'oddm ma al suo prodotto di degradazione, che presenta un minor numero di siti di protonazione.

Poiché il valore di  $\log\beta$  determinato mediante l'analisi potenziometrica del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -oddm verrebbe influenzato dalla presenza della specie decarbossilata, nel caso questo si formasse anche in piccola quantità, la formazione dei complessi è stata studiata solamente attraverso la spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$ , con la quale è possibile discriminare i segnali del chelante da quelli relativi al suo prodotto di degradazione. A  $\text{pH} > 4$  è stata osservata la presenza di un unico complesso; quest'ultimo e il legante libero sono in scambio lento rispetto al *time scale* dell' $^1\text{H-NMR}$  nell'intervallo di  $\text{pH}$  in cui sono presenti entrambi. Ciò ha consentito di determinare il valore di  $\log\beta$  del complesso analizzando la variazione di intensità dei suoi segnali in funzione del  $\text{pH}$ .

Per lo studio del sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -macroHOPO, che a differenza dei precedenti non ha mostrato fenomeni di degradazione, sono state integrate le informazioni acquisite dagli studi potenziometrici e  $^1\text{H-NMR}$ . Il numero e i valori delle costanti di acidità del chelante determinate con le due tecniche sono risultati in accordo tra loro. Dall'analisi potenziometrica sono stati ottenuti il numero di complessi  $\text{Ba}^{2+}$ -legante, la loro stechiometria e i rispettivi valori di  $\log\beta$ . Lo studio di spettroscopia  $^1\text{H-NMR}$  ha fornito delle informazioni qualitative che supportano i risultati ottenuti per via potenziometrica.

La valutazione finale delle proprietà complessanti dei tre chelanti macroclichi nei confronti del bario prevede il confronto tra i valori di  $\text{pM}$  ottenuti per ciascun sistema  $\text{Ba}^{2+}$ -legante. Come già discusso nel **Capitolo 5**, questo parametro può essere utilizzato per confrontare la forza di leganti diversi nei confronti di un catione metallico, e costituisce un metodo di paragone più rigoroso rispetto ai soli valori di  $\log\beta$ . Infatti, a differenza di questi ultimi, il  $\text{pM}$  tiene conto della competizione con gli equilibri acido-base del chelante (e quindi delle  $pK_a$ ), e consente il confronto dei leganti anche in caso di differenti stechiometrie dei complessi. Valori di  $\text{pM}$  più elevati corrispondono ad una minore concentrazione di metallo libero in soluzione e quindi ad una maggiore stabilità dei complessi.

In ambito radiofarmaceutico il  $\text{pM}$  si calcola solitamente a  $\text{pH} 7.4$ , ponendo le concentrazioni iniziali di legante e metallo rispettivamente pari a  $10^{-5}$  M e  $10^{-6}$  M. Perciò  $\text{pM}$  risulta sempre  $\geq 6$  e valori molto superiori a 6 indicano la formazione di complessi molto stabili.

In **Tabella 6.1** sono riportati i valori di pM (chiamato in questo caso pBa) a pH 7.4 per i complessi Ba<sup>2+</sup>-chelante relativi ai composti macrociclici indagati in questa tesi (macrocat, oddm e macroHOPO) e quelli relativi a chelanti con una struttura macrociclica analoga riportati in studi precedenti (macropa e macrophospho).

**Tabella 6.1** Valori di pBa dei chelanti macrociclici calcolati a pH 7.4 ( $C_L = 10^{-5}$  M,  $C_M = 10^{-6}$  M).

<b>Chelante macrociclico</b>	<b>pBa</b>
macrocat	6.0
oddm	14.6
macroHOPO	6.4
macropa	11.7 [34]
macrophospho	6.4 [24]

Dal confronto tra i pBa dei composti macrociclici studiati nel presente lavoro di tesi, si osserva che l'oddm è in grado di formare complessi più stabili rispetto al macropa da un punto di vista termodinamico (di circa tre ordini di grandezza). In effetti la costante di complessamento per Ba<sup>2+</sup>-oddm ( $\log\beta = 16.64$ ) risulta la più alta tra tutte quelle finora riportate per complessi di Ba<sup>2+</sup> 1:1 con chelanti completamente protonati, superiore anche a quelle di Ba<sup>2+</sup>-macropa ( $\log\beta = 11.45$  [20]) e di Ba<sup>2+</sup>-DTPA ( $\log\beta = 11.04$  [35]). Al contrario, macrocat e macroHOPO presentano una capacità complessante nei confronti del bario molto più bassa (di 6-8 ordini di grandezza), che risulta inferiore o pari a quella del macrophospho. Gli studi termodinamici discussi in questa tesi sono stati condotti a scopo predittivo, ma l'effettiva possibilità di impiegare tali composti come agenti complessanti per scopi radiofarmaceutici sarà valutata mediante studi di radiomarcatura con <sup>223</sup>Ra condotti in parallelo al presente lavoro e nei prossimi mesi.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] J. S. Lewis, A. D. Windhorst, and B. M. Zeglis, “Radiopharmaceutical Chemistry,” 2019.
- [2] R. Van Grieken and M. De Bruin, Eds., *Nomenclature for radioanalytical chemistry (IUPAC Recommendations 1994)*, vol.66, no.12. IUPAC, 1994.
- [3] D. L. Bailey, J. L. Humm, A. Todd-Pokropek, and A. Van Aswegen, “Nuclear Medicine Physics: A Handbook for Teachers and Students,” Vienna, 2014.
- [4] Z. Sóti, J. Magill, and R. Dreher, “Karlsruhe Nuclide Chart – New 10th edition 2018,” *EPJ Nuclear Sciences & Technologies*, vol. 5, p. 6, 2019, doi: 10.1051/epjn/2019004.
- [5] M. Sitarz, “Research on production of new medical radioisotopes with cyclotron,” Doctoral Thesis, University of Warsaw, University of Nantes, Warsaw, 2019. Accessed: Oct. 08, 2024. [Online]:[https://www.researchgate.net/publication/338934620\\_Research\\_on\\_production\\_of\\_new\\_medical\\_radioisotopes\\_with\\_cyclotron](https://www.researchgate.net/publication/338934620_Research_on_production_of_new_medical_radioisotopes_with_cyclotron)
- [6] A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsár, R. G. Lovas, and F. Rosch, *Handbook of Nuclear Chemistry*. 2011.
- [7] P. Brugarolas *et al.*, “Fifty Years of Radiopharmaceuticals,” *J Nucl Med Technol*, vol.48, no.2, pp.34S-39S, 2020.
- [8] “Art. 21-Disposizioni particolari per i radiofarmaci,” *Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana*, pp.10–10, 1991.
- [9] T. I. Kostelnik and C. Orvig, “Radioactive Main Group and Rare Earth Metals for Imaging and Therapy,” Jan. 23, 2019, *American Chemical Society*. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00294.
- [10] K. Vermeulen, M. Vandamme, G. Bormans, and F. Cleeren, “Design and Challenges of Radiopharmaceuticals,” Sep. 01, 2019, *W.B. Saunders*. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2019.07.001.
- [11] S. Beykan, “Implementation and Optimization of Dosimetry for Theranostics in Radiopeptide Therapies,” Doctoral thesis, Graduate School of Life Sciences, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Güzelyurt, 2019. doi: 10.25972/OPUS-19955.
- [12] E. W. Price and C. Orvig, “Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals,” Jan. 07, 2014, *Royal Society of Chemistry*. doi:10.1039/c3cs60304k.
- [13] C. F. Ramogida and C. Orvig, “Tumour targeting with radiometals for diagnosis and therapy,” *Chemical Communications*, vol.49, no.42, pp.4720–4739, Apr. 2013, doi:10.1039/c3cc41554f.
- [14] S. Bhattacharyya and M. Dixit, “Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals,” Jun. 21, 2011. doi:10.1039/c1dt10379b.

- [15] S. Franchi, M. Asti, V. Di Marco, and M. Tosato, "The Curies' element: state of the art and perspectives on the use of radium in nuclear medicine," Dec. 01, 2023, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi:10.1186/s41181-023-00220-4.
- [16] F. D. C. Guerra Liberal, A. A. S. Tavares, and J. M. R. S. Tavares, "Palliative treatment of metastatic bone pain with radiopharmaceuticals: A perspective beyond Strontium-89 and Samarium-153," Apr. 01, 2016, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/j.apradiso.2016.01.003.
- [17] S. Adler *et al.*, "A Study of Rn-219 Outgassing and Pb-211 Contamination from Ra-223 In dry, Liquid, and Murine Tissue Samples," *Health Phys*, vol. 118, Sep. 2019.
- [18] L. Florimonte, L. Dellavedova, and L. S. Maffioli, "Radium-223 dichloride in clinical practice: a review," Sep. 01, 2016, *Springer Berlin*. doi: 10.1007/s00259-016-3386-5.
- [19] D. S. Abou *et al.*, "Towards the stable chelation of radium for biomedical applications with an 18-membered macrocyclic ligand," *Chem Sci*, vol. 12, no. 10, pp. 3733–3742, Mar. 2021, doi: 10.1039/d0sc06867e.
- [20] A. S. Ivanov *et al.*, "Elucidating the coordination chemistry of the radium ion for targeted alpha therapy," *Chemical Communications*, vol.58, no.71, pp.9938–9941, Aug. 2022, doi:10.1039/d2cc03156f.
- [21] G. Henriksen, P. Hoff, and R. H. Larsen, "Evaluation of potential chelating agents for radium," 2002.
- [22] M. E. Simms *et al.*, "Reining in Radium for Nuclear Medicine: Extra-Large Chelator Development for an Extra-Large Ion," *Inorg Chem*, vol.62, no.50, pp. 20834–20843, Dec. 2023, doi:10.1021/acs.inorgchem.3c02985.
- [23] K. Baba, K. Nagata, T. Yajima, and T. Yoshimura, "Synthesis, Structures, and Equilibrium Reactions of La(III) and Ba(II) Complexes with Pyridine Phosphonate Pendant Arms on a Diaza-18-crown-6 Ether," *Bull Chem Soc Jpn*, vol. 95, no. 3, pp. 466–475, 2022.
- [24] S. Gentile, "Chimica di coordinazione del bario(II) per il complessamento del radio-223 in radiofarmaci per la 'Targeted Alpha Therapy,'" Tesi Magistrale, Università degli Studi di Padova, 2024.
- [25] "Production of radionuclides Basic principle of a cyclotron - Pictorial View of Nuclear Medicine Cyclotrons for Medical Radionuclide Production." Accessed: Aug. 28, 2024. [Online]. [https://www.nuclearmedicineeurope.eu/wp-content/uploads/2020/04/Pictorial-view-Cyclotrons\\_2020\\_web.pdf](https://www.nuclearmedicineeurope.eu/wp-content/uploads/2020/04/Pictorial-view-Cyclotrons_2020_web.pdf)
- [26] B. G. Katzung, *Farmacologia generale e clinica*, XI edizione italiana. Piccin, 2021.

- [27] V. Di Marco, "Studio della formazione di complessi tra alluminio e molecole di interesse ambientale, biologico e farmaceutico," Tesi di Dottorato, Università degli Studi di Padova, 1997.
- [28] "HypSpec." [Online]. Available: <http://www.hyperquad.co.uk/>
- [29] V. Manjula and P. K. Bhattacharya, "Ternary complexes of catechol and amino acids," *J Inorg Biochem*, vol. 41, no. 1, pp. 63–69, Jan. 1991, doi: 10.1016/0162-0134(91)85011-5.
- [30] P. Buglyo, E. Kiss, and T. Kiss, *Inorganica Chimica Acta*. 2000.
- [31] L. Burai, É. Tóth, S. Seibig, R. Scopelliti, and A. E. Merbach, "Solution and solid-state characterization of EuII chelates: A possible route towards redox responsive MRI contrast agents," *Chemistry - A European Journal*, vol. 6, no. 20, pp. 3761–3770, Oct. 2000, doi: 10.1002/1521-3765(20001016)6:20<3761::AID-CHEM3761>3.0.CO;2-6.
- [32] E. Brucher, J. Emri, P. Solymosi, L. B. Sztanyikb, and L. Vargab, "1,10-Diaza-4,7,13,16-tetraoxacyclooctadecane-1,10-bis(malonate), a Ligand with High Sr<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> Selectivities in Aqueous Solution," 1993.
- [33] T. Jakusch, K. Gajda-Schranz, Y. Adachi, H. Sakurai, T. Kiss, and L. Horváth, "Solution equilibrium characterization of insulin-mimetic Zn(II) complexes," *J Inorg Biochem*, vol.100, no.9, pp. 1521–1526, Sep. 2006, doi:10.1016/J.JINORGBIO.2006.05.003.
- [34] N. A. Thiele, S. N. Macmillan, and J. J. Wilson, "Rapid Dissolution of BaSO<sub>4</sub> by Macropa, an 18-Membered Macrocyclic with High Affinity for Ba<sup>2+</sup>," *J Am Chem Soc*, vol.140, no.49, pp. 17071–17078, Dec. 2018, doi:10.1021/jacs.8b08704.
- [35] T. Sekine, Y. Kawashima, T. Unnai, and M. Sakairi, "Studies of the Alkaline Earth Complexes in Various Solutions. IV. Solvent Extraction Study of Radium(II) Complexes with Some Aminocarboxylic Acids in Perchlorate Media," *Bull Chem Soc Jpn*, vol.41, no.12, pp. 3013–3015, 1968.

## **RINGRAZIAMENTI**

Per la stesura del presente lavoro un ringraziamento dovuto e sentito va al prof. Valerio Di Marco per la disponibilità, attenzione e gentilezza dimostrate nei miei riguardi, nonché per le spiegazioni e gli utili suggerimenti che mi ha fornito durante tutto il percorso di tesi.

Da ultimo, ma non meno prezioso, vorrei ricordare il contributo della dott.ssa Sara Franchi, che con cortesia e disponibilità mi ha guidata in questo percorso e mi ha permesso di svolgere al meglio il progetto di tesi.