



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

**CHIMICA DI COORDINAZIONE DEL BARIO(II) PER IL
COMPLESSAMENTO DEL RADIO-223 IN RADIOFARMACI PER
LA “*TARGETED ALPHA THERAPY*”**

RELATORE: PROF. VALERIO DI MARCO

CORRELATRICE: DOTT.SSA SARA FRANCHI

LAUREANDA: SILVIA GENTILE

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

INDICE	III
INDICE DELLE FIGURE.....	VII
INDICE DELLE TABELLE.....	XI
ABBREVIAZIONI	XIII
RIASSUNTO	XV
ABSTRACT.....	XVII
CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE.....	1
1.1 RADIOCHIMICA	1
1.1.1 Struttura nucleare	1
1.1.2 Carta dei nuclidi.....	2
1.1.3 Decadimenti nucleari	3
1.1.3.1 Decadimento α	4
1.1.3.2 Decadimenti β	4
1.1.3.3 Raggi γ , raggi X e conversione interna	5
1.2 RADIOFARMACI.....	6
1.2.1 Radiofarmaci <i>metal-based</i>	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
1.2.2.1 <i>Positron Emission Tomography</i> , PET	16
1.2.2.2 <i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i> , SPECT.....	17
1.2.3 Radiofarmaci terapeutici.....	17

1.2.4	Radiofarmaci teranostici	18
1.3	RADIO-223 IN MEDICINA NUCLEARE	19
CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI		25
CAPITOLO 3 – STUDIO DEGLI EQUILIBRI DI COMPLESSAMENTO.....		27
3.1	POTENZIOMETRIA.....	27
3.1.1	Elettrodo di vetro.....	27
3.1.2	Controllo della forza ionica.....	29
3.1.3	Determinazione delle costanti di equilibrio	30
3.1.3.1	Software PITMAP per l’elaborazione dei dati potenziometrici	30
3.1.3.2	Valutazione della bontà del <i>fitting</i>	32
3.1.3.3	Il problema dei falsi minimi	33
3.1.3.4	Scelta del modello di speciazione.....	33
3.1.4	Influenza dell’ambiente esterno	34
3.1.5	Limitazioni della potenziometria	34
3.2	SPETTROSCOPIA UV-VISIBILE.....	35
3.2.1	Principi teorici di base.....	36
3.2.2	Software <i>HypSpec</i> per l’elaborazione degli spettri UV-Visibili.....	37
3.2.3	Limitazioni della spettroscopia UV-Visibile	37
3.3	SPETTROSCOPIA NMR	38
3.3.1	Principi teorici di base.....	38
3.3.1.1	Tecniche monodimensionali $^1\text{H-NMR}$ e $^{31}\text{P-NMR}$	40
3.3.1.2	Tecniche bidimensionali	41
3.3.2	Software MATLAB per l’elaborazione dei dati NMR.....	41
CAPITOLO 4 – PARTE SPERIMENTALE		43
4.1	STRUMENTAZIONE	43

4.2	REAGENTI	43
4.3	PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI.....	44
4.3.1	Preparazione delle soluzioni dei leganti	44
4.3.2	Preparazione delle soluzioni di Ba ²⁺	45
4.3.3	Soluzioni per le misure potenziometriche	46
4.3.3.1	Soluzioni di NaOH.....	46
4.3.4	Soluzioni per la spettroscopia UV-Visibile.....	47
4.3.5	Soluzioni per la spettroscopia NMR.....	47
4.4	PROCEDURE SPERIMENTALI.....	48
4.4.1	Procedure sperimentali per le titolazioni potenziometriche	48
4.4.1.1	Apparato strumentale	48
4.4.1.2	Sequenza delle titolazioni potenziometriche.....	49
4.4.1.3	Calibrazione dell'elettrodo di vetro	50
4.4.1.4	Standardizzazione delle soluzioni di NaOH	50
4.4.1.5	Titolazioni delle soluzioni di leganti.....	51
4.4.1.6	Titolazioni delle miscele Ba ²⁺ -legante	51
4.4.1.7	Conservazione dell'elettrodo	52
4.4.2	Procedure sperimentali per la spettroscopia UV-Visibile	52
4.4.3	Procedure sperimentali per la spettroscopia NMR	53
CAPITOLO 5 – RISULTATI E DISCUSSIONE.....		55
5.1	COSTANTI DI ACIDITÀ DEI LEGANTI BIDENTATI.....	55
5.1.1	Potenziometria	55
5.1.1.1	Calibrazione dell'elettrodo di vetro	55
5.1.1.2	Standardizzazione delle soluzioni di NaOH	55
5.1.1.3	Determinazione delle costanti di acidità dei leganti bidentati	57

5.1.2	Spettroscopia UV-Visibile	59
5.2	COSTANTI DI COMPLESSAMENTO Ba ²⁺ -LEGANTI BIDENTATI.....	61
5.2.1	Potenziometria.....	61
5.2.2	Spettroscopia UV-Vis	63
5.3	COSTANTI DI ACIDITÀ DEI MACROCICLI.....	66
5.3.1	Potenziometria.....	66
5.3.2	Spettroscopia NMR.....	67
5.3.2.1	Andamento dei <i>chemical shift</i> dei segnali in funzione del pH	70
5.3.3	Diagrammi di distribuzione.....	76
5.4	COSTANTI DI COMPLESSAMENTO Ba ²⁺ -MACROCICLI	78
5.4.1	Valutazione qualitativa della cinetica di complessamento	78
5.4.2	Potenziometria.....	78
5.4.3	Spettroscopia NMR.....	80
5.4.3.1	Andamento dei <i>chemical shift</i> dei segnali in funzione del pH	83
5.4.4	Diagrammi di distribuzione.....	85
CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI		87
BIBLIOGRAFIA.....		91

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1.1 Carta dei nuclidi. Colori diversi indicano le differenti modalità di decadimento preferenziale. [10].....	2
Figura 1.2 Numero stimato di insorgenza di forme tumorali (A) e di decessi (B) in tutto il mondo nell'anno 2020, considerando tutte le fasce d'età (0-85+) e ambo i sessi. [20], [21].....	7
Figura 1.3 Proiezione dell'aumento percentuale del numero stimato dei nuovi casi di incidenza di tumore (A) e di decessi dovuti a tumore (B) per l'anno 2040 rispetto al 2020, considerando tutte le fasce d'età (0-85+) e ambo i sessi. [22], [23].....	7
Figura 1.4 Rappresentazione schematica di un radiofarmaco <i>metal-based</i> . [31].....	9
Figura 1.5 Generazione e catena di decadimento del ^{223}Ra . [15].....	20
Figura 4.1 Rappresentazione dell'apparato strumentale utilizzato per le titolazioni potenziometriche. [36].....	48
Figura 5.1 Curva di titolazione di una soluzione contenente 3 mL di H_2O , NaCl 0.15 M e 0.6 mL di HCl (0.0931 M) titolata con NaOH (soluzione B1).	56
Figura 5.2 Metodo di Gran applicato alla parte acida della curva di titolazione in Figura 5.1	56
Figura 5.3 Titolazioni potenziometriche con NaOH (B1) di soluzioni contenenti A) 2.7 mL di H_2O , NaCl 0.15 M, 0.3 mL di 2,3-HOPO (0.0099 M) e 0.3 mL di HCl (0.0931 M), B) 3.0 mL di H_2O , NaCl 0.15 M, 0.00315 g di acido malonico e 0.2 mL di HCl (0.0931 M), C) 3.0 mL di H_2O , NaCl 0.15 M, 0.00677 g di catecolo e 0.3 mL di HCl (0.0931 M), D) 2.7 mL di H_2O , NaCl 0.15 M, 0.3 mL di acido salicilico (0.0100 M) e 0.4 mL di HCl (0.0931 M).	58
Figura 5.4 Spettri UV-Vis a diversi pH di una soluzione contenente 1,2-HOPO ($6 \cdot 10^{-5}$ M). Il grafico a destra riporta l'andamento dell'assorbanza a 225 nm in funzione del pH e la relativa curva di <i>fitting</i>	60
Figura 5.5 Spettri UV-Vis a diversi pH di una soluzione contenente acido picolinico ($4 \cdot 10^{-4}$ M). Il grafico a destra riporta l'andamento dell'assorbanza a 265 nm in funzione del pH e la relativa curva di <i>fitting</i>	60
Figura 5.6 Titolazioni potenziometriche con NaOH (B1) di soluzioni contenenti A) 2.5 mL di H_2O , NaCl 0.15 M, 0.3 mL di 2,3-HOPO (0.0099 M), 0.2 mL di $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ (1.0093 M) e 0.3 mL di HCl (0.0931 M), B) 3.0 mL di H_2O , NaCl 0.15 M, 0.00311 g di acido malonico, 0.05026 g di $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ e 0.1 mL di HCl (0.0931 M), C) 3.0 mL di H_2O ,	

NaCl 0.15 M, 0.00363 g di catecolo, 0.05044 g di Ba(ClO ₄) ₂ e 0.3 mL di HCl (0.0931 M), D) 2.5 mL di H ₂ O, NaCl 0.15 M, 0.3 mL di acido salicilico (0.0100 M), 0.2 mL di Ba(ClO ₄) ₂ (1.0019 M) e 0.4 mL di HCl (0.0931 M).	62
Figura 5.7 Spettri UV-Vis a diversi pH di una soluzione contenente 1,2-HOPO (6·10 ⁻⁵ M) e Ba(ClO ₄) ₂ (6·10 ⁻³ M). Il grafico a destra riporta l'andamento dell'assorbanza a 225 nm in funzione del pH e la relativa curva di <i>fitting</i>	63
Figura 5.8 Spettri UV-Vis a diversi pH di una soluzione contenente acido picolinico (4·10 ⁻⁴ M) e Ba(ClO ₄) ₂ (0.4 M). Il grafico a destra riporta l'andamento dell'assorbanza in funzione del pH a 265 nm e la relativa curva di <i>fitting</i>	64
Figura 5.9 Rappresentazione grafica dei valori delle costanti di formazione ottenute per i sistemi Ba ²⁺ -legante bidentato e delle rispettive costanti condizionali calcolate a pH fisiologico (pH = 7.4). Sono riportati solo i valori di logβ e logβ' per i complessi di stechiometria 1:1 [ML].	65
Figura 5.10 Titolazioni potenziometriche con NaOH (B2) di soluzioni contenenti A) 1.2 mL di H ₂ O, NaCl 0.15 M, 1.3 mL di macrophospho (0.0019 M) e 0.2 mL di HCl (0.0931 M), B) 1.6 mL di H ₂ O, NaCl 0.15 M, 1.4 mL di oddm (0.0021 M) e 0.3 mL di HCl.	66
Figura 5.11 Spettri ¹ H-NMR (400 MHz, 298 K, 10% D ₂ O + 90% H ₂ O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente macrophospho 10 ⁻³ M. A sinistra è riportato l'intervallo di <i>chemical shift</i> dei protoni aromatici, a destra l'intervallo di <i>chemical shift</i> dei protoni alifatici. Il segnale a 3.34 ppm è dovuto alla presenza di tracce di metanolo.	68
Figura 5.12 Spettri ³¹ P-NMR (400 MHz, 298 K, 10% D ₂ O + 90% H ₂ O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente macrophospho 10 ⁻³ M.	68
Figura 5.13 Spettri ¹ H-NMR (400 MHz, 298 K, 10% D ₂ O + 90% H ₂ O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente oddm 10 ⁻³ M.	69
Figura 5.14 Andamenti dei <i>chemical shift</i> di alcuni gruppi funzionali del macrophospho al variare del pH e relative curve di <i>fitting</i>	70
Figura 5.15 Andamenti dei <i>chemical shift</i> di alcuni gruppi funzionali dell'oddm al variare del pH e relative curve di <i>fitting</i>	71
Figura 5.16 Spettri ¹ H-NMR (400 MHz, 298 K, 10% D ₂ O + 90% H ₂ O) di una soluzione acquosa (senza controllo della forza ionica) di macrophospho 10 ⁻³ M, basificata utilizzando idrossido di tetrametilammonio. Il segnale a ~ 3.2 ppm (fuori scala) è relativo ai gruppi metilici del tetrametilammonio.	72

Figura 5.17 Spettro $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, D_2O) dell'oddm dopo la sintesi a $\text{pH} > 9$ (non misurato accuratamente con pH-metro).	73
Figura 5.18 Spettri $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) del Kryptofix 22 al variare del pH.....	74
Figura 5.19 Spettro $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) di un nuovo batch di oddm la cui soluzione è stata preparata come riportato nel Paragrafo 4.3.1 e poi portata a pH 9.11.	74
Figura 5.20 Spettro $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) di un nuovo batch di oddm portato a pH 9.44 senza aver aggiunto HCl precedentemente.....	74
Figura 5.21 Sequenza di deprotonazione più probabile per il macrophospho.....	75
Figura 5.22 Sequenza di deprotonazione più probabile per l'oddm.....	76
Figura 5.23 Diagramma di distribuzione del macrophospho.....	77
Figura 5.24 Diagramma di distribuzione dell'oddm.	77
Figura 5.25 Titolazione potenziometrica con NaOH (B2) di una soluzione contenente 1.1 mL di H_2O , NaCl 0.15 M, 1.6 mL di macrophospho (0.0019 M), 0.3 mL di BaCl_2 (0.010 M) e 0.3 mL di HCl (0.0931 M).	79
Figura 5.26 Spettri $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente macrophospho 10^{-3} M e BaCl_2 10^{-3} M. A sinistra è riportato l'intervallo di <i>chemical shift</i> dei protoni aromatici, a destra l'intervallo di <i>chemical shift</i> dei protoni alifatici. Il segnale a 3.34 ppm è dovuto alla presenza di tracce di metanolo.	80
Figura 5.27 Spettri $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente macrophospho 10^{-3} M e BaCl_2 10^{-3} M.	81
Figura 5.28 Spettri $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente oddm 10^{-3} M e BaCl_2 10^{-3} M.....	81
Figura 5.29 Spettro TOCSY (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a pH 9.00 di una soluzione contenente oddm 10^{-3} M e BaCl_2 10^{-3} M. Sono riportati solo gli intervalli di <i>chemical shift</i> in cui sono presenti i segnali.	83
Figura 5.30 Andamenti dei <i>chemical shift</i> dei protoni e del ^{31}P del sistema Ba^{2+} -macrophospho al variare del pH	84
Figura 5.31 Andamenti dei <i>chemical shift</i> dei protoni del sistema Ba^{2+} -oddm al variare del pH	84
Figura 5.32 Diagramma di distribuzione del sistema Ba^{2+} -macrophospho.	86
Figura 5.33 Diagramma di distribuzione del sistema Ba^{2+} -oddm.	86

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1.1 Esempi di strutture di alcuni chelanti aciclici utilizzati in medicina nucleare. Per ognuno sono indicati anche gli atomi donatori e i radionuclidi per i quali può essere usato. [7], [37].....	12
Tabella 1.2 Esempi di strutture di alcuni chelanti macrociclici utilizzati in medicina nucleare. Per ognuno sono indicati anche gli atomi donatori e i radionuclidi per i quali può essere usato. [7], [37].....	12
Tabella 1.3 Esempi di <i>small molecules</i> coniugate a radionuclidi e rispettive applicazioni. [31].....	13
Tabella 1.4 Esempi di peptidi utilizzati in terapia (<i>Peptide Receptor Radionuclide Therapy</i> , PRRT) [31], [38], [39]	14
Tabella 1.5 <i>mAb</i> coniugati a radionuclidi approvati dall'FDA per la diagnosi o terapia di forme tumorali. [4], [40]	15
Tabella 1.6 Esempi di coppie teranostiche utilizzate in ambito clinico, con le rispettive modalità di decadimento preferenziali. [4], [46]	19
Tabella 1.7 Alcuni esempi di chelanti proposti in letteratura per il complessamento del radio-223. [15], [50].....	22
Tabella 2.1 Strutture dei leganti bidentati studiati in questo lavoro.....	26
Tabella 2.2 Struttura del chelante oddm studiato in questo lavoro di tesi.....	26
Tabella 3.1 Parametri del software PITMAP coinvolti nel calcolo delle costanti di equilibrio indagate.	30
Tabella 3.2 Parametri di MATLAB che vengono ottimizzati nell'analisi dei dati sperimentali NMR. Si considera il caso semplice della formazione di un unico complesso di stechiometria 1:1 (ML).....	42
Tabella 4.1 Concentrazioni delle soluzioni di leganti preparate. Le soluzioni sono numerate in ordine temporale di preparazione.	45
Tabella 4.2 Concentrazioni delle soluzioni di Ba(ClO ₄) ₂ e BaCl ₂ ·2H ₂ O preparate. Le soluzioni sono numerate in ordine temporale di preparazione.	45
Tabella 4.3 Valori dei parametri impostati per le calibrazioni dell'elettrodo e per le standardizzazioni delle soluzioni di base NaOH.	50
Tabella 4.4 Valori dei parametri impostati per le titolazioni potenziometriche dei leganti.	51

Tabella 4.5 Valori dei parametri impostati per le titolazioni potenziometriche delle miscele Ba^{2+} -legante.	52
Tabella 5.1 Parametri ottenuti per la standardizzazione delle soluzioni di NaOH (B1 e B2), titolate dieci volte ciascuna. L'errore riportato indica l'incertezza sul parametro, e viene fornita dall'algoritmo di <i>fitting</i>	57
Tabella 5.2 Fattori correttivi (%) e pK_a dei leganti ($T = 25^\circ C$, $I = NaCl$ 0.15 M). La forma completamente deprotonata di ogni legante è indicata da "L". Le cariche sono omesse per semplicità.	59
Tabella 5.3 Valori di pK_a dei leganti ottenuti dall'elaborazione dei dati UV-Vis. La forma completamente deprotonata di ogni legante è indicata da "L". Le cariche sono omesse per semplicità.	60
Tabella 5.4 Stechiometria e $\log\beta$ dei complessi Ba^{2+} -legante bidentato ottenute dall'elaborazione delle titolazioni potenziometriche. Le cariche sono omesse per semplicità.	63
Tabella 5.5 Stechiometria e $\log\beta$ dei complessi Ba^{2+} -legante bidentato ottenute dall'elaborazione dei dati UV-Vis. Le cariche sono omesse per semplicità.....	64
Tabella 5.6 pK_a dei macrocicli determinate mediante potenziometria ($T = 25^\circ C$, $I = NaCl$ 0.15 M).	67
Tabella 5.7 pK_a dei chelanti macrophospho e oddm ottenuti mediante 1H -NMR. I risultati sono la media dei singoli valori ottenuti dai <i>fitting</i> di ogni andamento di <i>chemical shift vs. pH</i> per ciascun gruppo funzionale.	73
Tabella 5.8 Stechiometria e $\log\beta$ dei complessi di Ba^{2+} con macrophospho ottenute mediante potenziometria ($T = 25^\circ C$, $I = NaCl$ 0.15 M). "L" rappresenta il macrophospho nella forma completamente deprotonata.	79
Tabella 6.1 Valori di pBa calcolati a pH 7.4 con i chelanti macropa, macrophospho e oddm ($C_L = 10^{-5}$ M, $C_M = 10^{-6}$ M).	88

ABBREVIAZIONI

A	Numero di massa, numero di nucleoni
AA	Amminoacidi
ACS	<i>American Cancer Society</i>
BFC	<i>Bifunctional chelator</i>
BM	<i>Targeting Biomolecule</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DTPA	Acido dietilentriamminopentaacetico
EC	Cattura elettronica
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>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Conversione interna
IT	Transizione isomerica
LET	<i>Linear Energy Transfer</i>
mAb	Anticorpi monoclonali
mHED	Meta-idrossiefedrina
N	Numero di neutroni
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PRRT	<i>Peptide Receptor Radionuclide Therapy</i>
RPT	<i>Radiopharmaceutical Therapy</i>
SPECT	<i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>
SSE	<i>Sum Squared Error</i>
TAT	<i>Targeted Alpha Therapy</i>
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TSP	Sale sodico dell'acido trimetilsilico propionico
WHO	<i>World Health Organization</i>
WNA	<i>World Nuclear Association</i>

Z	Numero atomico, numero di protoni
1,2-HOPO	2-idrossipiridina-1-ossido
2,3-HOPO	3-idrossi-2-piridone
m	Multipletto
d	Doppietto
t	Tripletto

RIASSUNTO

La *Targeted Alpha Therapy* (TAT) sfrutta α -emettitori in grado di eradicare cellule maligne di tumori primari o metastatici. Le particelle α emesse durante il decadimento dei radionuclidi causano la rottura di entrambi i filamenti del DNA, che difficilmente viene ripristinato da enzimi adibiti alla sua riparazione.

Un radionuclide che ha potenzialità promettenti per l'applicazione nella TAT è il ^{223}Ra ($t_{1/2}$ 11.4 d, abbondanza dell'emissione α 95.3%), già approvato in terapia come cloruro di radio ($[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$) e commercialmente noto come Xofigo[®]: la sua applicazione è volta al trattamento palliativo di metastasi ossee sintomatiche in pazienti colpiti da tumore prostatico resistente alla castrazione. L'efficacia clinica dimostrata da $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ ha indirizzato la ricerca verso lo sviluppo di nuovi radiofarmaci a base di ^{223}Ra che possano essere usati anche per il trattamento di tumori non ossei.

Per impiego in *Radiopharmaceutical Therapy* (RPT), tuttavia, ogni radionuclide deve essere incorporato in un sistema di trasporto in grado di garantirne il *delivery* selettivo al sito *target* e di impedirne il rilascio *in vivo*. Solitamente questo compito viene svolto da un chelante bifunzionale legato ad una molecola direzionante tramite un *linker*. Nel caso di Ra^{2+} , non esistono al momento attuale chelanti bifunzionali che formano complessi termodinamicamente stabili e cineticamente inerti, tali quindi da impedire la dissociazione e la biodistribuzione intrinseca del radionuclide in tessuti sani. Ne consegue che l'applicazione del ^{223}Ra alla TAT richiede di identificare preliminarmente questi chelanti. Poiché Ra^{2+} ha solo isotopi radioattivi, la sua chimica di coordinazione può essere studiata il suo surrogato stabile Ba^{2+} .

Nella prima parte di questo lavoro di tesi è stata studiata la chimica di coordinazione del Ba^{2+} con alcuni leganti bidentati (selezionati in base alle rispettive energie di legame con Ba^{2+} e Ra^{2+} , precedentemente determinate in uno studio computazionale), al fine di determinare quali di questi danno le interazioni più stabili con Ba^{2+} . I chelanti individuati sono stati (e in parte saranno) utilizzati per funzionalizzare una molecola ciclica (Kryptofix 22) dando origine a diversi chelanti macrociclici. Successivamente, sono state indagate la capacità complessanti di due di questi chelanti macrociclici nei confronti del Ba^{2+} .

Lo studio termodinamico dei chelanti è stato condotto mediante potenziometria, spettroscopia UV-Vis e NMR (principalmente monodimensionale $^1\text{H-NMR}$ e $^{31}\text{P-NMR}$) per l'ottenimento di dati sia quantitativi, quali le costanti di dissociazione acida ($\text{p}K_a$) dei chelanti e le costanti di formazione dei complessi Ba^{2+} -chelante ($\log\beta$), sia qualitativi, consentendo la valutazione della speciazione dei sistemi metallo-legante e della cinetica di complessamento.

I leganti bidentati caratterizzati in questo lavoro sono stati confrontati tra loro per valutare quale o quali potessero formare le interazioni più forti con il catione metallico. I chelanti macrociclici invece sono stati comparati con sistemi precedentemente sviluppati in letteratura.

ABSTRACT

Targeted Alpha Therapy (TAT) exploits α -emitters capable of eradicating malignant cells of primary or metastatic tumours. The α -particles emitted during the radionuclide's decay cause the double-strand breakage of DNA, which is hardly restored by enzymes dedicated to its repair.

For application in TAT, a promising radionuclide is ^{223}Ra ($t_{1/2}$ 11.4 d, α -emission abundance 95.3%), already approved in therapy as radium chloride ($[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$) and commercially known as Xofigo[®]: its application is aimed at the palliative treatment of symptomatic bone metastases in patients with castration-resistant prostate cancer. The clinical effectiveness demonstrated by $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ has directed research towards the development of new ^{223}Ra -based radiopharmaceuticals that could be used for the treatment of non-osseous tumours as well.

For use in Radiopharmaceutical Therapy (RPT), the radionuclide must be incorporated into a transport system capable of guaranteeing its selective delivery to the target site and preventing its release *in vivo*. Usually, this task is performed by a bifunctional chelator bound to a directional molecule via a linker. In the case of Ra^{2+} , there are currently no bifunctional chelators that form thermodynamically stable and kinetically inert complexes, such that the intrinsic dissociation and biodistribution of the radionuclide is prevented in healthy tissues. It follows that application of ^{223}Ra to TAT requires preliminary identification of these chelators. Since Ra^{2+} has only radioactive isotopes, its coordination chemistry can be studied its stable surrogate Ba^{2+} .

In the first part of this thesis work, the coordination chemistry of Ba^{2+} with some bidentate ligands (selected based on their binding energies with Ba^{2+} and Ra^{2+} previously calculated in a computational study) was investigated, to understand which among them yield the most stable interactions with Ba^{2+} . The identified chelators were (and in part will be) used to functionalize a cyclic molecule (Kryptofix 22) giving rise to several macrocyclic chelators. Next, the complexing ability of two of these macrocyclic chelators toward Ba^{2+} was investigated.

The thermodynamic study of the chelators was carried out by potentiometry, UV-Vis spectroscopy and NMR (mainly mono-dimensional ^1H -NMR and ^{31}P -NMR) to obtain both quantitative data, such as the acid dissociation constants ($\text{p}K_a$) of the chelators and the formation constants of Ba^{2+} -chelator complexes ($\log\beta$), and qualitative data, allowing assessment of the speciation of Ba^{2+} -chelator systems and complexation kinetics.

The bidentate ligands characterized in this work were compared to each other to evaluate which could yield the strongest interactions with the metal cation. The macrocyclic chelators were compared to previously developed systems in the literature.

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

La medicina nucleare si basa sull'utilizzo di radiofarmaci, composti biologicamente attivi che presentano nella loro struttura un elemento radioattivo, detto radionuclide, il quale durante il proprio decadimento emette radiazioni ionizzanti. [1]

I radiofarmaci possono essere utilizzati sia per scopi diagnostici, rendendo possibile il riconoscimento e l'identificazione di una condizione morbosa e patologica, tra cui cancro, problematiche cardiovascolari, endocrine e disturbi neurologici, sia per scopi terapeutici, come cura, in particolare, di condizioni tumorali. [1], [2] La ricerca scientifica si sta orientando verso la possibilità di unire questa duplice funzione in un unico composto o in composti chimicamente molto simili, dando vita a sistemi definiti 'teranostici'. L'obiettivo è di avere a disposizione radiofarmaci con lo stesso comportamento *in vivo* in modo tale che le immagini diagnostiche e di monitoraggio rispecchino quanto più possibile la distribuzione del radiofarmaco terapeutico. [1], [3]

I radionuclidi spesso vengono somministrati mediante sistemi di *drug delivery*¹ in grado di riconoscere selettivamente recettori molecolari o componenti intracellulari sovraespressi nelle cellule malate. Questo assicura non solo un'elevata efficacia e una minima tossicità rispetto ad altre opzioni di trattamento (come ad esempio la chemioterapia), ma anche la possibilità di personalizzare la terapia. [1], [3], [4], [5]

1.1 RADIOCHIMICA

1.1.1 Struttura nucleare

Per comprendere la radiochimica è necessario fare riferimento alla struttura atomica e più in particolare a quella nucleare.

Gli atomi rappresentano i costituenti fondamentali della materia e sono caratterizzati da un nucleo, un piccolo spazio (10^{-15} m) in cui sono condensati protoni (p), carichi positivamente, e neutroni (n), elettricamente neutri, attorno al quale orbitano particelle cariche negativamente, dette elettroni (e^-). La necessità di bilanciamento tra cariche, che rende neutro l'atomo isolato, si traduce in un'equivalenza tra il numero di protoni e quello di elettroni. [4], [6]

Protone e neutrone sono caratterizzati da masse simili, circa 1800 volte superiori alla massa dell'elettrone: $m_p (1.673 \cdot 10^{-27} \text{ kg}) \approx m_n (1.675 \cdot 10^{-27} \text{ kg}) \approx 1800 \cdot m_e (9.109 \cdot 10^{-31} \text{ kg})$. [4], [6]

¹ Con il termine *drug delivery* si intende la veicolazione di una formulazione farmaceutica atta a garantire un controllo in termini di rilascio di principio attivo nel tempo, durata dell'azione terapeutica e sito d'azione. Questi sistemi mirano ad una maggiore efficacia del farmaco, rispetto alle forme farmaceutiche convenzionali, minimizzando gli effetti avversi in altri distretti dell'organismo. [5]

Gli elementi chimici si differenziano tra loro in base al numero di protoni che possiedono nel nucleo, detto numero atomico Z . Tuttavia, per uno stesso elemento anche il numero di neutroni N può cambiare, portando alla variazione del numero di massa A , definito come somma del numero di neutroni e protoni (o numero di nucleoni). [4], [7], [8] Ogni specie atomica caratterizzata da un numero definito di particelle nucleari, cioè con specifici Z e A , prende il nome di nuclide, indicato dalla dicitura A_ZX_N , dove X indica il simbolo dell'elemento chimico. [7], [9]

Atomi dello stesso elemento sono definiti isotopi; dunque, essi presentano un uguale numero atomico, ma un diverso numero di neutroni. Nuclidi con diverso numero atomico, ma contenenti lo stesso numero di nucleoni A nel nucleo, sono definiti isobari; infine, nuclidi con gli stessi numeri A e Z ma con diverso stato energetico nucleare sono definiti isomeri. [7], [9]

1.1.2 Carta dei nuclidi

La tavola periodica degli elementi, nota anche come tavola di Mendeleev, è un modello in cui gli elementi chimici sono organizzati sulla base del numero di protoni e di elettroni negli orbitali atomici, rispecchiando le loro proprietà chimiche. Questo ordinamento, però, risulta poco efficace per la differenziazione degli isotopi, a causa del fatto che questi possiedono lo stesso numero di protoni e medesimo comportamento chimico. Isotopi diversi, tuttavia, mostrano proprietà fisiche diverse. [9] Per rappresentarli, dunque, si ricorre generalmente alla carta dei nuclidi (*Chart of Nuclides*, **Figura 1.1**), nota anche come carta di Segré, in cui sono raffigurati più di 3000 nuclidi di cui si conoscono informazioni sperimentali, ognuno caratterizzato da una propria configurazione di nucleoni. [7], [10] Sull'asse delle ascisse viene riportato il numero di neutroni N , invece sull'asse delle ordinate il numero di protoni Z . [9], [11] Ad ogni nuclide è associato un riquadro, il cui colore nella maggior parte dei casi indica l'emivita o la modalità di decadimento preferenziale (**Paragrafo 1.1.3**). [11]

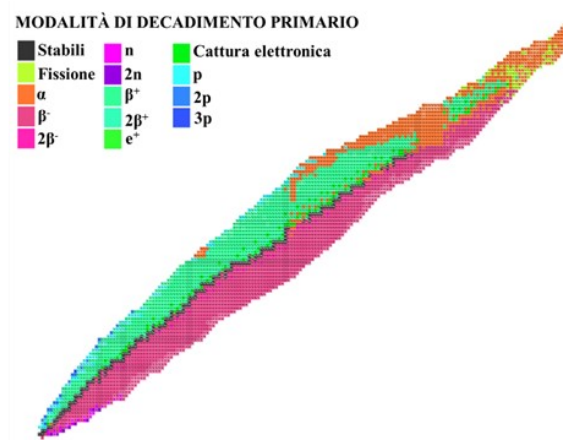


Figura 1.1 Carta dei nuclidi. Colori diversi indicano le differenti modalità di decadimento preferenziale. [10]

La stabilità dei nuclei è data da quattro interazioni: la forza elettromagnetica, che agisce tra singole particelle cariche generando repulsione tra i protoni che, quindi, tendono ad allontanarsi tra loro; la forza nucleare forte, un'interazione attrattiva particolarmente intensa a raggio d'azione molto breve (10^{-15} m) e indipendente dalla carica elettrica delle particelle, che si instaura tra nucleoni al fine di compensare la forza repulsiva (che da sola porterebbe alla disgregazione del nucleo) [6], [7], [12]; la forza nucleare debole, a bassa intensità, che agisce tra particelle elementari; infine, la forza gravitazionale che, essendo la più debole, non assume un ruolo particolarmente rilevante nella fisica nucleare. [7]

I nuclei stabili sono caratterizzati da combinazioni di Z , N e A che garantiscono una sufficiente energia di legame tra i nucleoni. Essi si trovano in una zona detta valle di stabilità e sono circa 300. [7]

Tra questi, i nuclei più leggeri ($A < 40$) hanno approssimativamente un ugual numero di protoni e neutroni, mentre i nuclei più pesanti ($A \geq 40$) sono caratterizzati da un eccesso di neutroni rispetto ai protoni, tale da poter contrastare la forza repulsiva tra le cariche positive presenti nel nucleo.

Quando i numeri Z e N non garantiscono il corretto bilanciamento delle interazioni tra nucleoni, i nuclidi risultano instabili e subiscono processi di decadimento (o disintegrazione), come spiegato nei paragrafi successivi. [4]

1.1.3 Decadimenti nucleari

Per ogni nuclide la forza complessiva instaurata nel nucleo è espressa da un parametro definito energia di *binding* nucleare media \bar{E}_B , che dipende dalla composizione di nucleoni (equazione 1.1) e il cui valore risulta massimo per i nuclei presenti nella valle di stabilità della carta dei nuclidi. Nel momento in cui due nucleoni interagiscono tra loro a distanze molto ravvicinate nel nucleo, si instaura tra essi una forza attrattiva e la loro energia diminuisce. La somma per tutti i nucleoni dell'energia liberata durante l'interazione prende il nome di energia di *binding* nucleare globale E_B . [4]

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

Un nuclide instabile X_1 , detto genitore, al fine di massimizzare \bar{E}_B e aumentare la sua stabilità, si trasforma spontaneamente in nuclide figlio X_2 , mediante un processo esotermico noto come decadimento radioattivo. [4], [9] Questo può avvenire mediante diverse modalità, tra cui quelli rilevanti per la medicina nucleare sono il decadimento α , i decadimenti β , l'emissione di radiazione e la conversione interna, come descritto nei paragrafi seguenti.

Il processo di decadimento è descritto dall'attività A del nuclide, ossia il numero di atomi $N(t)$ che decadono nell'unità di tempo t (equazione 1.2).

$$A = \frac{\partial N}{\partial t} \quad (1.2)$$

I decadimenti radioattivi seguono una legge cinetica di primo ordine, e le grandezze A e $N(t)$ risultano direttamente proporzionali (equazione 1.3). Nel SI l'attività è espressa in becquerel (1 Bq = 1 s⁻¹). [7], [9], [13]

$$A = \frac{\partial N}{\partial t} = \lambda \cdot N(t) = A(0) \cdot e^{-\lambda t} \quad (1.3)$$

Il fattore λ è detto costante di decadimento, che indica la probabilità che un nuclide decada nell'unità di tempo e si misura in s⁻¹; $A(0)$ corrisponde all'attività al tempo iniziale ($t = 0$). [7], [9]

Si definisce tempo di dimezzamento (o emivita) $t_{1/2}$ il tempo necessario affinché il numero di nuclei instabili iniziali N_0 si dimezzi; è correlato alla costante di decadimento secondo l'equazione 1.4 [4], [7]:

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

1.1.3.1 Decadimento α

Il processo di disintegrazione nucleare noto come decadimento α porta all'emissione di particelle α , che corrispondono a nuclei di elio, formati da due protoni e due neutroni (${}^4_2\text{He}_2^{2+}$). Questo decadimento è tipico di nuclei pesanti che presentano un rapporto $N:Z > 1$, in particolare se i neutroni nella struttura atomica sono in largo eccesso. Rispetto al nucleo di partenza, il nuclide generato presenta numero atomico e di massa inferiori rispettivamente di due e quattro unità (equazione 1.5). [7], [9], [14], [15]



1.1.3.2 Decadimenti β

Esistono tre tipi di decadimenti β , cioè β^- , β^+ e cattura elettronica. La caratteristica comune tra questi decadimenti è che il numero di massa rimane costante.

Decadimento β^- . Il nucleo instabile di partenza presenta un eccesso di neutroni (*neutron-rich*), dunque un neutrone viene trasformato in protone, con emissione di un elettrone e di un antineutrino² elettronico (equazione 1.6). [7], [9]

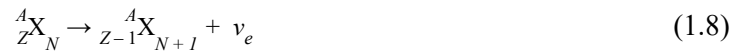
² L'antineutrino è l'antiparticella del neutrino; presenta carica elettrica nulla, massa coincidente a quella del neutrino, numero di spin uguale e opposto. [7]



Decadimento β^+ . Osservato per nuclei instabili con un eccesso di protoni (*proton-rich*), il decadimento β^+ prevede la trasformazione di un protone in neutrone, a cui è accompagnata l'emissione di un positrone (e^+)³ e un neutrino⁴ (equazione 1.7). [7], [9]



Cattura elettronica (EC). La cattura elettronica è un processo di trasformazione nucleare che coinvolge nuclei caratterizzati da un difetto di neutroni (*proton-rich*). Un e^- della nuvola atomica (generalmente nel primo guscio più interno) viene “catturato” dal nucleo, con conseguente trasformazione di un protone in neutrone ed emissione di un neutrino (equazione 1.8). [4], [7], [9]



1.1.3.3 Raggi γ , raggi X e conversione interna

Raggi γ . In seguito all'emissione di particelle α o β , conseguenti ai rispettivi decadimenti, i nuclei figli eccitati possono rilasciare energia sotto forma di radiazione elettromagnetica⁵, emettendo fotoni γ . In questo processo non si ha alcuna variazione della composizione di nucleoni; perciò, numero atomico e numero di massa rimangono costanti (equazione 1.9). [7] Nell'equazione 1.9 il simbolo * indica uno stato energetico nucleare eccitato. I raggi γ hanno lunghezza d'onda $\lambda < 10^{-11}$ m ed energia > 0.1 MeV. [4]

Il decadimento può essere istantaneo o richiedere tempi maggiori ($t_{1/2} \geq 1$ μ s); in questo caso si parla di nuclidi metastabili, i quali vanno incontro a una transizione isomerica (IT). [7]



Conversione interna (IC). La conversione interna è un processo in cui l'energia in eccesso del nucleo eccitato viene trasferita ad un elettrone di un orbitale atomico dei gusci più interni, causandone l'emissione. [4], [9]

Raggi X. Cattura elettronica e conversione interna causano una carenza di elettroni negli orbitali interni della struttura atomica, che viene eliminata tramite transizioni elettroniche successive, che

³ Il positrone è l'antiparticella dell'elettrone; presenta carica uguale e opposta rispetto ad e^- (quindi $1+$) e massa equivalente. [7]

⁴ Il neutrino è una particella subatomica elettricamente neutra, descritta da un numero di spin negativo ($-1/2$). [7]

⁵ Le radiazioni elettromagnetiche sono onde costituite da energia associata a campi elettrici e campi magnetici oscillanti in intensità durante la propagazione nello spazio. [60]

spostano la vacanza ad orbitali via via più esterni. La differenza di energia tra i livelli elettronici può essere emessa dal nuclide sotto forma di raggi X, che sono caratterizzati da lunghezza d'onda λ compresa nell'intervallo 0.1-10 nm ed energia < 10 keV. [4], [9]

Oltre ai raggi X, le transizioni elettroniche causate da processi di cattura elettronica e conversione interna, possono generare l'emissione di elettroni Meitner-Auger, ossia e^- a bassa energia di gusci esterni a cui è stata trasferita l'energia corrispondente alla transizione elettronica. [7], [9]

1.2 RADIOFARMACI

Il decreto legislativo 178 del maggio 1991, a seguito del recepimento della direttiva europea 89/343/CEE, include nell'ambito dei prodotti medicinali per uso umano le preparazioni radiofarmaceutiche. Viene definito il termine radiofarmaco come “qualsiasi medicinale che quando è pronto per l'uso, include uno o più radionuclidi (isotopi radioattivi) incorporati a scopo sanitario”. [16], [17]

Ad oggi, la medicina nucleare è un approccio importante e innovativo per la gestione di diverse patologie. Secondo alcuni dati aggiornati nel 2023 dalla WNA (*World Nuclear Association*), nei paesi sviluppati (che corrispondono a circa un quarto della popolazione mondiale) una persona su 50 ricorre alla medicina nucleare diagnostica, mentre la frequenza delle terapie con radiofarmaci è pari a circa un decimo di questa percentuale. [2], [18] I risultati più promettenti interessano soprattutto il campo oncologico, per il trattamento di condizioni tumorali. [19]

Secondo le stime riportate dal WHO (*World Health Organization*) nel 2019, i tumori sono una delle principali cause di morte prematura in tutti i paesi del mondo e si dimostrano un importante ostacolo all'aumento dell'aspettativa di vita della popolazione.

Uno studio (GLOBOCAN 2020) condotto dall'ACS (*American Cancer Society*) in collaborazione con lo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha reso possibile una valutazione completa del panorama oncologico mondiale, mediante stime di incidenza, mortalità e prevalenza per 185 paesi del mondo e per 36 diversi tipi di tumori, considerando il sesso e la fascia d'età. I dati registrati in merito all'anno 2020 hanno mostrato circa 19.3 milioni di casi di insorgenza di tumori e decessi di circa 10 milioni di persone (**Figura 1.2**). [19]

Inoltre, sono riportate previsioni in merito all'anno 2040, in cui si notano dati non incoraggianti nella progressione dei tumori; è previsto infatti un aumento significativo sia in termini di incidenza che di mortalità rispetto al 2020 (**Figura 1.3**). [19]

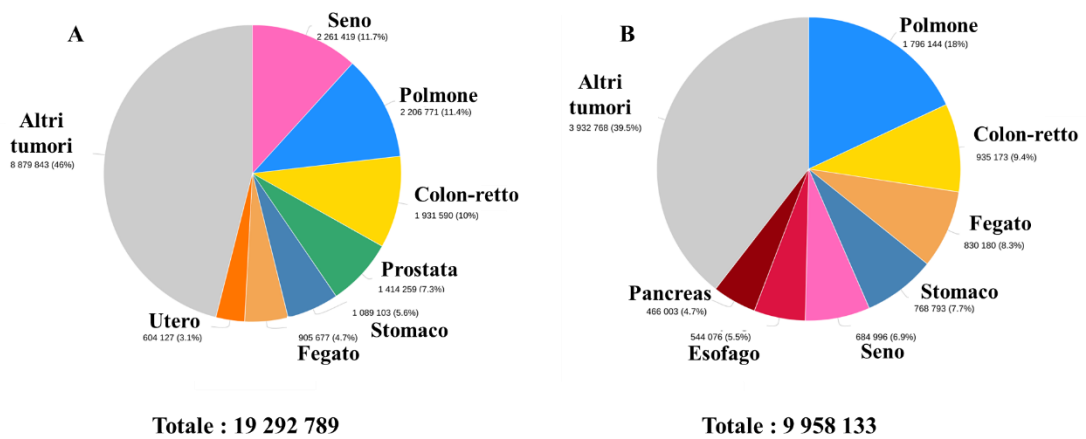


Figura 1.2 Numero stimato di insorgenza di forme tumorali (A) e di decessi (B) in tutto il mondo nell'anno 2020, considerando tutte le fasce d'età (0-85+) e ambo i sessi. [20], [21]

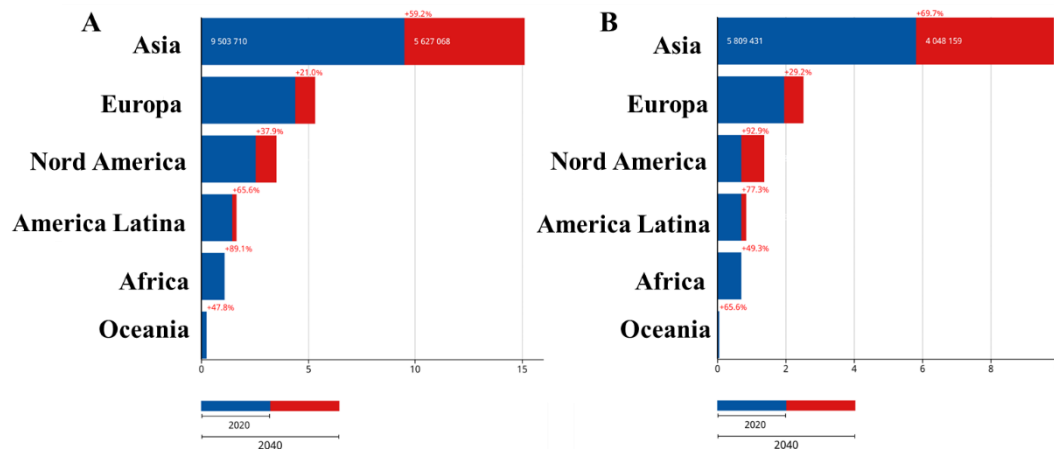


Figura 1.3 Proiezione dell'aumento percentuale del numero stimato dei nuovi casi di incidenza di tumore (A) e di decessi dovuti a tumore (B) per l'anno 2040 rispetto al 2020, considerando tutte le fasce d'età (0-85+) e ambo i sessi. [22], [23]

Per far fronte a queste stime preoccupanti, la ricerca scientifica si sta orientando anche a trattamenti condotti mediante l'utilizzo di radiofarmaci (*Radiopharmaceutical Therapy*, RPT, **Paragrafo 1.2.3**). Questi sono utili innanzitutto per l'*imaging* diagnostico che, grazie al rilevamento dall'esterno di radiazioni emesse dal nuclide instabile, permette di valutare aspetti funzionali e processi biochimici-metabolici a livello di organi, tessuti e cellule per l'identificazione della malattia o per il monitoraggio dell'azione terapeutica di un farmaco. Inoltre, possono essere utilizzati per la terapia vera e propria, il cui scopo è il *delivery* selettivo di livelli citotossici di radiazione alle cellule malate, evitando l'accumulo in siti *off-target*, al fine di trattare condizioni patologiche. [1], [24], [25], [26]

I radiofarmaci possono essere suddivisi in due categorie in base alla natura del nuclide scelto e alla struttura in cui esso viene incorporato: i radiofarmaci organici e quelli *metal-based*. I derivati organici sono caratterizzati da nuclidi di elementi non metallici, quali ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{124}I , che

vengono incorporati nel radiofarmaco mediante la formazione di un legame covalente. I radiofarmaci *metal-based*, invece, presentano nella loro struttura un radionuclide metallico che viene incorporato nel radiofarmaco sfruttandone la chimica di coordinazione. [27], [28] Questa seconda categoria è quella di gran lunga più versatile, ed è anche l'oggetto di questa tesi.

1.2.1 Radiofarmaci *metal-based*

L'ampia classe dei radiofarmaci *metal-based* può essere suddivisa in due sottocategorie: per i radiofarmaci *metal-essential* la presenza del nuclide metallico è una prerogativa fondamentale per il riconoscimento da parte del sito *target* e, di conseguenza, per l'attività biologica; nei radiofarmaci *metal-nonessential*, invece, il metallo non determina la biodistribuzione⁶ del farmaco stesso, perciò spesso può essere sostituito con un nuclide di un altro elemento chimico senza influenzare drasticamente le proprietà dell'intero composto. [27], [29], [30]

La coniugazione di questi radionuclidi a biomolecole direzionanti, però, è più difficile rispetto ai nuclidi metallici perché richiede in genere vari step di sintesi organica e purificazione.

I radionuclidi (sia metallici che non metallici) in grado di consentire intrinsecamente un tropismo⁷ verso uno specifico *target* sono poco comuni. Alcuni esempi sono [¹³¹I]NaI, selettivo per la tiroide e utilizzato per la terapia dei tumori tiroidei e trattamenti di ipertiroidismo grave; [²²³Ra]RaCl₂ (commercializzato come Xofigo[®]), in grado di localizzarsi nell'idrossiapatite [Ca₅(PO₄)₃(OH)] della matrice ossea e usato nel trattamento di metastasi ossee sintomatiche causate da tumori prostatici; [¹⁵³Sm]Sm-lexidronam e [⁸⁹Sr]SrCl₂, approvati per la cura palliativa⁸ in pazienti che mostrano dolore associato a metastasi osteoblastica e scheletrica. [4], [31], [32]

Ad oggi, la ricerca è indirizzata principalmente verso lo studio e lo sviluppo di radiofarmaci *metal-based* della classe *metal-nonessential*. La loro struttura a livello molecolare (descritta nei paragrafi successivi) li rende infatti particolarmente versatili e pertanto in grado di ampliare le tipologie di tumori diagnosticabili e/o trattabili in medicina nucleare, sempre considerando che lo

⁶ La farmacocinetica (ADME) è una branca della farmacologia che analizza quantitativamente l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione del farmaco in seguito alla sua somministrazione. In particolare, la biodistribuzione si riferisce al passaggio di farmaco dal circolo ematico ad un particolare distretto corporeo.

⁷ Con tropismo si intende la tendenza dei farmaci a localizzarsi e accumularsi in specifici siti anatomici, tra cui organi, tessuti o cellule.

⁸ Le cure palliative sono definite dalla Legge 38/2010 Art.2 come "insieme degli interventi terapeutici, diagnostici e assistenziali, rivolti sia alla persona malata sia al suo nucleo familiare, finalizzati alla cura attiva e totale dei pazienti la cui malattia di base, caratterizzata da un'inarrestabile evoluzione e da una prognosi infausta, non risponde più a trattamenti specifici". Consistono in un intervento mirato al benessere del paziente, senza però risolvere la vera e propria causa della patologia. [32]

scopo principale è garantire un corretto direccionamento al sito tumorale d'interesse mantenendo al minimo l'accumulo in tessuti sani.

Il successo della diagnosi/terapia condotta mediante l'utilizzo di questi radiofarmaci si basa sulla possibilità di selezionare, modulare e combinare tra loro le unità strutturali del radiofarmaco stesso (**Figura 1.4**): radionuclide, chelante bifunzionale, *linker* e agente di *targeting* (biomolecola direzionante).

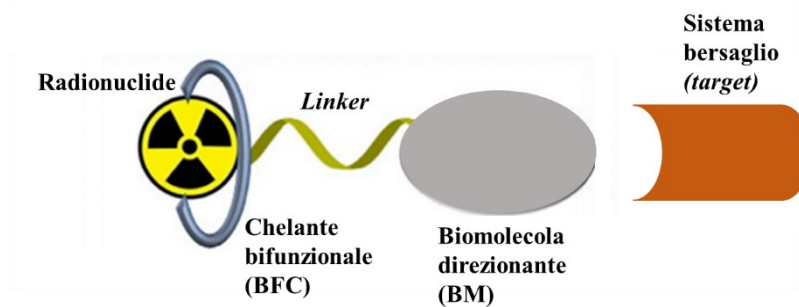


Figura 1.4 Rappresentazione schematica di un radiofarmaco *metal-based*. [31]

1.2.1.1 Radionuclide

La scelta del radionuclide si basa su diversi fattori, tra cui lo scopo medico del prodotto formulato (diagnosi o terapia), le proprietà fisiche e nucleari del radiometallo, la dose radioattiva che il trattamento richiede, il costo di produzione e la disponibilità. [4], [7], [24], [28], [31], [33]

Le proprietà del radionuclide riguardano la modalità di decadimento preferenziale, il trasferimento di energia lineare, l'emivita effettiva e la capacità di generazione di nuclidi figli radioattivi.

In particolare, la *Linear Energy Transfer* (LET, **Paragrafo 1.2.3**) è la quantità di energia depositata dalla radiazione ionizzante ad un materiale per unità di lunghezza ed è generalmente espressa in keV/ μm . Particelle che presentano LET elevata sono molto ionizzanti, pertanto causano gravi danni ai tessuti biologici, e trasferiscono la loro energia su brevi distanze. Al contrario, particelle con LET più bassa hanno raggio d'azione più elevato ma al contempo risultano meno citotossiche a causa della ridotta energia depositata al sito *target*. [7]

Anche l'emivita effettiva ($t_{1/2,\text{eff}}$) deve essere valutata per poter selezionare in modo appropriato il radionuclide. È definita come il tempo necessario per ridurre la quantità di sostanza radioattiva in un sistema biologico, mediante sia decadimento radioattivo, sia processi biologici intrinseci all'organismo. È diversa, invece, l'emivita biologica ($t_{1/2,\text{bio}}$), ossia un parametro farmacocinetico che indica il tempo necessario al dimezzamento della quantità iniziale di farmaco presente nel flusso sanguigno (eliminazione dal circolo ematico). [7], [33], [34]

Infine, la dosimetria del radiofarmaco si misura come quantità di dose assorbita ed è espressa dall'equazione 1.10:

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

in cui $d\varepsilon$ è l'energia media impartita dalla radiazione ionizzante alla materia in un elemento di volume, dm è la massa della materia nell'elemento di volume. Nel SI la dosimetria è espressa in gray ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J}\cdot\text{kg}^{-1}$). [7]

1.2.1.2 Chelante bifunzionale

Il chelante bifunzionale (*bifunctional chelator*, BFC), selezionato sulla base del radionuclide, è disegnato in modo da coordinare quest'ultimo e simultaneamente potersi legare covalentemente all'agente direzionante tramite il *linker*. Il complesso chelante-radionuclide deve essere termodinamicamente stabile e cineticamente inerte (considerando intervalli di pH rilevanti dal punto di vista biologico, ovvero circa $5 < \text{pH} < 7.5$ [7]) per assicurare un corretto accumulo del radionuclide presso il sito *target* impedendone il rilascio *in vivo*. Se questo accadesse, infatti, il nuclide seguirebbe la propria biodistribuzione intrinseca e si accumulerebbe in distretti dell'organismo sani (*off-target*), irradiandoli inutilmente, con possibili effetti collaterali indesiderati. [7], [15], [28], [35]

In particolare, la stabilità termodinamica deve essere tale da garantire l'esistenza del complesso metallo-legante nel flusso ematico, evitandone la dissociazione. Questo fenomeno è favorito una volta che il radiofarmaco viene somministrato, a causa dell'elevata diluizione che tende a spostare l'equilibrio a favore delle specie libere. La stabilità termodinamica viene quantificata determinando le costanti di complessamento, che permettono di valutare la tendenza del complesso a formarsi in soluzione. Queste costanti sono misurate utilizzando solitamente gli isotopi stabili del metallo di interesse mediante tecniche quali potenziometria e spettroscopie, ad esempio UV-Vis e NMR.

Simultaneamente deve essere garantita l'inerzia cinetica, cioè il complesso deve rimanere intatto per tempi sufficientemente lunghi, in modo da permettere l'utilizzo del radiofarmaco per l'applicazione desiderata, anche in presenza di ioni metallici e/o di leganti endogeni come proteine (transferrina, albumina sierica), peptidi ed enzimi, che possono causare fenomeni di transmetallazione e transchelazione rispettivamente, portando alla dissociazione del complesso. Anche l'inerzia cinetica è indice della stabilità del complesso *in vivo* e può essere determinata tramite studi di dissociazione acido-catalizzata e in plasma/siero. [7], [15], [27], [28], [36], [37] Oltre a ciò, è importante soprattutto che il BFC restituisca una resa di radiomarcatura (*radiolabelling yield*), ossia la frazione di radionuclide incorporato, sufficientemente elevata (in genere $> 95\%$), possibilmente in tempi brevi e in condizioni blande di temperatura e pH (Paragrafo 1.2.1.4).

Il complesso formato deve inoltre risultare stabile nei confronti di una decomposizione radiolitica, che potrebbe provocare dissociazione del complesso o rottura di legami covalenti nella struttura del radiofarmaco a seguito delle radiazioni ad alta energia emesse dal metallo. [7]

I chelanti bifunzionali possono essere classificati in due categorie: quelli aciclici e quelli macrociclici.

Chelanti aciclici. Spesso i chelanti aciclici (alcuni esempi sono riportati in **Tabella 1.1**) garantiscono una resa e una velocità di radiomarcatura elevate anche in condizioni blande di temperatura e pH, grazie alla loro struttura poco rigida. Tuttavia, in molti casi formano complessi poco stabili *in vivo* a causa della loro ridotta preorganizzazione strutturale: la loro struttura aperta può infatti richiedere sostanziali cambiamenti conformazionali durante il complessamento del radionuclide, che provocano una drastica diminuzione di entropia che contrasta la stabilità del complesso. Inoltre, i complessi con chelanti aciclici sono spesso caratterizzati da una bassa inerzia cinetica, che favorisce la dissociazione del complesso una volta iniettato nel circolo sanguigno, sempre a causa della struttura che di solito è tale da non incapsulare adeguatamente lo ione metallico.

Nonostante questi limiti, esistono numerosi esempi di radiofarmaci basati su chelanti aciclici. [7], [37], [38] Uno di questi è il primo radiofarmaco approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA), lo Zevalin™ (ibritumomab-triuxetano⁹⁰Y), che presenta nella struttura un derivato aciclico del DTPA (acido dietilentriamminopentaacetico) ed è utilizzato per il trattamento radioimmunoterapico del linfoma non Hodgkin. [7]

Chelanti macrociclici. Per la formazione di complessi dotati di elevata stabilità *in vivo*, spesso si preferisce l'utilizzo di leganti macrociclici (alcuni esempi sono riportati in **Tabella 1.2**), i quali possiedono una struttura più rigida e preorganizzata rispetto ai chelanti aciclici. Questa può conferire sia una maggiore stabilità termodinamica che un'elevata inerzia cinetica al complesso, evitandone la dissociazione *in vivo*. Lo svantaggio dei chelanti macrociclici può essere una lenta cinetica di complessamento/radiomarcatura. Nella maggior parte dei casi la velocità della reazione può essere aumentata aumentando la temperatura: ciò però risulta problematico soprattutto con direzionanti come gli anticorpi che, essendo strutture proteiche, subiscono processi di denaturazione. [7], [37], [38]

Tabella 1.1 Esempi di strutture di alcuni chelanti aciclici utilizzati in medicina nucleare. Per ognuno sono indicati anche gli atomi donatori e i radionuclidi per i quali può essere usato. [7], [37]

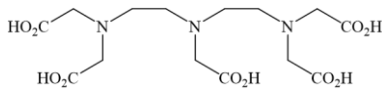
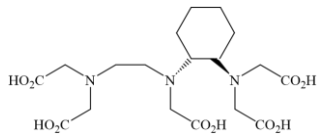
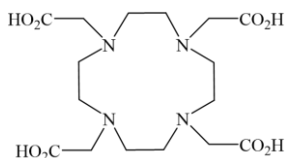
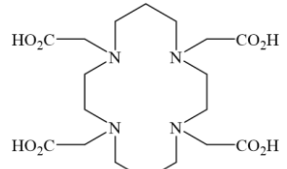
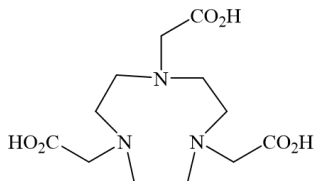
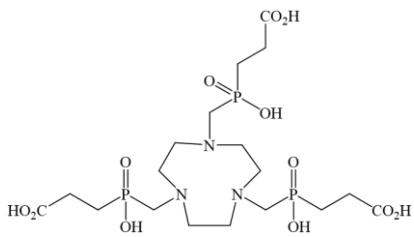
Chelanti aciclici	Atomi donatori	Ione radiometallico
<p style="text-align: center;">DTPA</p> 	N_3O_5	$[^{44/47}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ $[^{111}\text{In}]\text{In}^{3+}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}^{3+}$ $[^{86/90}\text{Y}]\text{Y}^{3+}$
<p style="text-align: center;">CHX-A''-DTPA</p> 	N_3O_5	$[^{111}\text{In}]\text{In}^{3+}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}^{3+}$ $[^{86/90}\text{Y}]\text{Y}^{3+}$

Tabella 1.2 Esempi di strutture di alcuni chelanti macrociclici utilizzati in medicina nucleare. Per ognuno sono indicati anche gli atomi donatori e i radionuclidi per i quali può essere usato. [7], [37]

Chelanti macrociclici	Atomi donatori	Ione radiometallico
<p style="text-align: center;">DOTA</p> 	N_4O_4	$[^{44/47}\text{Sc}]\text{Sc}^{3+}$ $[^{111}\text{In}]\text{In}^{3+}$ $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}^{3+}$ $[^{86/90}\text{Y}]\text{Y}^{3+}$ $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{3+}$
<p style="text-align: center;">TETA</p> 	N_4O_4	$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$
<p style="text-align: center;">NOTA</p> 	N_3O_3	$[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$ $[^{67/68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$
<p style="text-align: center;">TRAP</p> 	N_3O_3	$[^{67/68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$

1.2.1.3 Linker

Il *linker*, o spaziatore, è fondamentale per tenere legati e allo stesso tempo adeguatamente distanziati il complesso metallico e la biomolecola direzionante, al fine di minimizzare le possibili interferenze tra i due componenti che potrebbero portare ad una riduzione dell'affinità di *binding* tra la molecola direzionante e il *target*, al mancato riconoscimento, o ancora alla dissociazione del complesso. Inoltre, il *linker* può modulare la rigidità del sistema, promuovendone il movimento una volta somministrato, e/o l'idrofilia, così da favorire la farmacocinetica nelle fasi di assorbimento, distribuzione ed eliminazione. [7], [28]

1.2.1.4 Biomolecola direzionante

La biomolecola direzionante (*targeting biomolecule*, BM) indirizza il radiofarmaco al bersaglio molecolare, o *target* (ad esempio recettori sovraespressi, proteine denaturate, enzimi, *etc.*), così da favorire un accumulo selettivo di radioattività a livello tumorale. Per la veicolazione del sistema possono essere utilizzati *small molecules*, peptidi, proteine o anticorpi monoclonali. La BM deve possedere un'elevata selettività e specificità per determinate strutture molecolari, e il legame con il complesso metallico non deve modificare tale interazione in modo significativo. [28], [31]

Small molecules. Il vantaggio nell'utilizzo di piccole molecole organiche (amminoacidi, acidi grassi, *etc.*, di cui alcuni esempi sono riportati in **Tabella 1.3**) come vettori direzionanti è da attribuire alle loro dimensioni, che sono tali da garantire un'efficace permeazione attraverso la membrana plasmatica e consentono di raggiungere *target* intracellulari, presenti nel citoplasma o nel nucleo. Le *small molecules* sono anche in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, motivo per il quale vengono sfruttate in radiofarmaci diretti al cervello. [31]

Tabella 1.3 Esempi di *small molecules* coniugate a radionuclidi e rispettive applicazioni. [31]

<i>Small molecule</i>	Applicazione
[¹¹ C]metionina	<i>Imaging</i> di tumori al cervello
[¹¹ C]palmitato	<i>Imaging</i> del metabolismo degli acidi grassi
[¹⁸ F]FET (O-(2-[¹⁸ F]fluoroetil)-L-tirosina)	<i>Imaging</i> del trasporto amminoacidico
[¹⁸ F]FLT (3-[¹⁸ F]fluoro-3-deossitimina)	Monitoraggio della proliferazione cellulare
[¹⁸ F]FDG (2-[¹⁸ F]fluoro-desossiglucosio)	<i>Imaging</i> del metabolismo del glucosio

Peptidi. I peptidi, sequenze di amminoacidi (AA) a basso peso molecolare (AA < 50), sono sfruttati come vettori direzionanti selettivi per recettori sovraespressi a livello tumorale. Alcuni esempi sono elencati in **Tabella 1.4**. [27], [38]

I peptidi sono tipicamente progettati e sintetizzati come analoghi di peptidi endogeni: presentano modifiche chimiche che non alterano la capacità di riconoscimento da parte del recettore, o addirittura la migliorano, ma permettono di evitare fenomeni proteolitici provocati da enzimi presenti all'interno dell'organismo. [39]

I vantaggi dei peptidi sono molteplici: essi, infatti, diffondono rapidamente nei tessuti, formano interazioni ligando-recettore che possono determinare l'internalizzazione del peptide a livello cellulare, sono sintetizzati facilmente in maniera automatica o manuale e, infine, la loro farmacocinetica è relativamente rapida.

Uno svantaggio, però, è l'elevata ritenzione a livello renale, che può provocare un *uptake* non desiderato del radiofarmaco in questi organi e generare nefrotossicità. [31], [38], [39]

Tabella 1.4 Esempi di peptidi utilizzati in terapia (*Peptide Receptor Radionuclide Therapy*, PRRT) [31], [38], [39]

Peptidi	Recettore bersaglio	Applicazione
SSTR		
Analoghi della somatostatina ⁹ : Octreotide DTPA-Octreotide	Recettore per la somatostatina, sovraespresso in tumori neuroendocrini e del sistema nervoso	<i>Imaging</i> e trattamento di tumori neuroendocrini
GRPR		
Analoghi del GRP ¹⁰ : NeoBOMB1	Recettore per il peptide di rilascio della gastrina, sovraespresso in diverse masse tumorali	<i>Imaging</i> e trattamento di tumori al seno

Anticorpi monoclonali (mAb). Gli anticorpi monoclonali sono immunoglobuline prodotte in laboratorio a partire da un singolo clone di globulo bianco, progettate per avere specificità e affinità per un determinato e unico antigene. [40], [41] Sono in grado di localizzarsi nella zona tumorale grazie al riconoscimento di antigeni liberi sovraespressi nelle masse cancerose o antigeni presenti sulla superficie cellulare. [7], [39]

I mAb sono caratterizzati da un'ottima specificità di legame. Ciononostante, l'elevata dimensione (~ 150 kDa) degli anticorpi comporta una lenta circolazione nel flusso ematico, con *uptake* nel

⁹ La somatostatina è un peptide endogeno regolatorio che inibisce la produzione di alcuni ormoni. [38]

¹⁰ Il GRP (*Gastrin-Releasing Peptide*) è il peptide di rilascio della gastrina, che agisce a livello del sistema nervoso centrale ed enterico regolando risposte primarie a stimoli fisiologici, come termoregolazione, funzione immunitaria, contrattilità muscolare, *etc.* [38]

tumore limitato nel tempo, e un aumento dell'emivita plasmatica a causa del rallentamento delle cinetiche di metabolismo ed eliminazione [27], [31], [40]. Inoltre, essendo strutture proteiche, sono sensibili ad aumenti di temperatura, che potrebbero provocare denaturazione dell'anticorpo stesso.

Per cercare di limitare queste problematiche, ma conservando l'elevata affinità e selettività che caratterizza le immunoglobuline, si utilizzano spesso frammenti di anticorpi. [7], [27], [31]

In **Tabella 1.5** sono elencati i coniugati di mAb marcati con radionuclidi approvati ad oggi dall'FDA per diagnosi e cura di specifiche forme tumorali.

Tabella 1.5 *mAb* coniugati a radionuclidi approvati dall'FDA per la diagnosi o terapia di forme tumorali. [4], [40]

Nome commerciale	Anticorpo	Nuclide	Applicazione
CEA-Scan	Arcitumomab	^{99m}Tc	<i>Imaging</i> SPECT del tumore colonrettale
Verluma	Nofetumomab merpentan	^{99m}Tc	Identificazione del carcinoma polmonare a piccole cellule
OncoScint	Satumomab pendetide	^{111}In	<i>Imaging</i> SPECT del tumore colonrettale e ovarico
ProstaScint	Capromab penetide	^{111}In	<i>Imaging</i> SPECT di PSMA (recettore di cellule a livello della prostata) in pazienti post prostatectomia
Zevalin	Ibritumomab tiuxetano	^{90}Y	Trattamento del linfoma non-Hodgkin

1.2.2 Radiofarmaci diagnostici

Ad oggi, più di 10.000 ospedali nel mondo si servono della medicina nucleare e nel 90% dei casi utilizzando i radiofarmaci per scopi diagnostici. La diagnosi sfrutta i radionuclidi come marcatori *in vivo*, sia per osservare eventuali disfunzioni biochimiche a livello di organi e tessuti, che possono essere associate a condizioni patologiche, sia per monitorare gli effetti e l'efficacia di terapie a cui sono sottoposti i pazienti. I radionuclidi impiegati nell'*imaging* devono decadere emettendo radiazioni caratterizzate da un elevato potere penetrante e con una bassa capacità di interagire con tessuti biologici e strutture molecolari: sono quindi prive di potere terapeutico. Grazie ad opportuni e sofisticati sistemi computerizzati, l'emissione di queste radiazioni viene

visualizzata come un insieme di punti nello spazio, che permettono la ricostruzione di un'immagine della zona anatomica analizzata. [2], [42]

Le due tecniche maggiormente utilizzate sono la tomografia a emissione di positroni (*Positron Emission Tomography*, PET) e la tomografia computerizzata a emissione di singolo fotone (*Single-Photon Emission Computed Tomography*, SPECT). [2], [4], [42]

1.2.2.1 *Positron Emission Tomography, PET*

La PET prevede l'utilizzo di emettitori β^+ (nuclei carenti di neutroni). I positroni (e^+) prodotti durante il loro decadimento vanno incontro ad un fenomeno definito annichilazione (*annihilation*): scontrandosi con gli elettroni della materia circostante, essi generano una coppia di fotoni γ di energia pari a 511 keV e versi di propagazione opposti. [2], [27], [28], [31]

La rilevazione della posizione di questi fotoni e la differenza di tempo con cui colpiscono un detector esterno rende possibile l'identificazione spaziale dell'origine del positrone. [31]

I più comuni nuclidi utilizzati per la PET sono alcuni non metalli, quali ^{11}C ($t_{1/2}$ 20 min, β^+ 100%) e ^{18}F ($t_{1/2}$ 109 min, β^+ 97%), che decadono emettendo preferenzialmente particelle β^+ e che sono caratterizzati da un'emivita relativamente breve, ottimale per minimizzare l'esposizione del paziente alla radiazione. Alternative a questi radionuclidi prevedono l'utilizzo di metalli come ^{64}Cu ($t_{1/2}$ 12.7 h), ^{86}Y ($t_{1/2}$ 14.7 h), ^{68}Ga ($t_{1/2}$ 67.6 min), ^{89}Zr ($t_{1/2}$ 3.3 d). [1], [28], [31]

Due esempi di composti contenenti radionuclidi sfruttati in diagnostica PET sono [^{18}F]FDG (2-fluoro-desossiglucosio) e [^{11}C]mHED (meta-idrossiefedrina).

Il [^{18}F]FDG permette la valutazione dell'attività metabolica di un tumore, nonché il monitoraggio dei trattamenti antitumorali a cui è sottoposto il paziente, mediante l'osservazione della distribuzione del farmaco nell'organismo. Il [^{18}F]FDG è infatti un analogo del glucosio che, come tale, viene riconosciuto da un trasportatore cellulare (fondamentale per l'*uptake* dello zucchero) e internalizzato nelle cellule, dove subisce una fosforilazione *enzyme-mediated* ma non i successivi processi metabolici della glicolisi. In questo modo il composto rimane bloccato all'interno della cellula e viene localizzato dal tomografo PET. Poiché le masse tumorali sono caratterizzate da sovraespressione di trasportatori del glucosio e stimolata vascolarizzazione per favorire l'arrivo di nutrienti, [^{18}F]FDG tende ad accumularsi nelle zone malate. [27], [34], [43]

La [^{11}C]mHED è sfruttata per l'*imaging* di patologie legate all'alterazione della trasmissione adrenergica del sistema nervoso simpatico (SNS), soprattutto a livello cardiaco. La sua struttura richiama quella della noradrenalina, un neurotrasmettitore rilasciato dalle cellule nervose durante la trasmissione simpatica; pertanto, viene riconosciuta da un trasportatore adibito al *reuptake* dei neurotrasmettitori per l'immagazzinamento. Questo meccanismo fisiologico può venire meno a causa della mancata integrità dei terminali nervosi simpatici, che viene valutata mediante l'uso di [^{11}C]mHED. [34]

1.2.2.2 *Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT*

La SPECT sfrutta l'emissione di singoli fotoni γ a bassa energia (100-250 keV), generati in seguito a processi di cattura elettronica o di transizione isomerica. A differenza della PET, l'immagine ottenuta restituisce una distribuzione spaziale tridimensionale del radionuclide all'interno del corpo. [27], [31]

I traccianti maggiormente utilizzati sono radionuclidi quali ^{99m}Tc ($t_{1/2}$ 6 h) e ^{123}I ($t_{1/2}$ 13.3 h). In particolare, il ^{99m}Tc è utilizzato per la valutazione della perfusione miocardica in pazienti sottoposti a forti condizioni di stress, che possono presentare un ridotto apporto di sangue al cuore, e per l'*imaging* di forme metastatiche a livello osseo in pazienti oncologici. [27], [42]

Il ^{123}I , invece, è maggiormente indicato in ambito neurologico per valutare, ad esempio, la funzionalità di recettori per neurotrasmettitori, le cui alterazioni possono provocare patologie quali morbo di Parkinson (disfunzioni del sistema dopaminergico) o disturbi neurologici (disfunzioni del sistema serotoninergico). [42]

1.2.3 **Radiofarmaci terapeutici**

La terapia con radionuclidi (*Radiopharmaceutical Therapy, RPT*) mira ad eradicare selettivamente le cellule malate, evitando il più possibile l'irradiazione delle cellule sane, con lo scopo di minimizzare gli effetti avversi che sarebbero provocati dall'azione del radiofarmaco in siti *off-target*. Simultaneamente, con la RPT si vuole rendere possibile una regolazione della dose sulla base delle esigenze di ogni paziente, per formulare una terapia personalizzata. [7], [24], [44] Durante il decadimento, i radionuclidi per applicazioni terapeutiche devono generare radiazioni in grado di provocare danni irreversibili al DNA, con conseguente citotossicità e morte delle cellule per apoptosi, come le particelle α , β^- e gli elettroni Auger. L'efficacia della terapia e gli eventuali danni collaterali che essa può provocare dipendono strettamente dalle caratteristiche che contraddistinguono le particelle, tra cui energia, LET e potere di penetrazione nei tessuti. [24], [27]

Radiazioni α . Sono caratterizzate da elevata energia cinetica (5-8 MeV) ed elevata LET ($\sim 80 \text{ keV}/\mu\text{m}$), perciò sono in grado di depositare molta energia in un intervallo spaziale ristretto (40-100 μm). Questo può causare nelle cellule la rottura di entrambi i filamenti di DNA, che difficilmente vengono ripristinati da parte degli enzimi adibiti alla riparazione del DNA. A seguito del danno irreversibile, conseguono apoptosi e morte cellulare; questi effetti letali risultano indipendenti dalla dose somministrata e dal ciclo mitotico delle cellule stesse. [15], [44], [45] Avendo un limitato potere penetrante, gli emettitori α in genere rendono possibile minimizzare il danneggiamento di tessuti sani circostanti al tumore; al contempo, però, essi non sono idonei all'eradicazione di masse tumorali ampie, bensì di piccoli tumori o micrometastasi localizzate in specifiche zone dell'organismo.

Esempi di emettitori α utilizzati in terapia sono ^{223}Ra ($t_{1/2}$ 11.4 d), ^{149}Tb ($t_{1/2}$ 4.15 h), ^{211}At ($t_{1/2}$ 7.21 h), ^{212}Bi ($t_{1/2}$ 61 min), ^{213}Bi ($t_{1/2}$ 45.6 min), ^{225}Ac ($t_{1/2}$ 10 d). [7], [15], [45]

Radiazioni β^- . Rispetto alle radiazioni α , le β^- sono caratterizzate da minore energia (0.1-2.2 MeV) e minore LET (~ 0.2 keV/ μm), tali per cui la densità energetica viene distribuita in un intervallo spaziale più ampio (0.5-10 mm), corrispondente a circa 50-1000 diametri cellulari. [27], [44]

L'elevato potere penetrante assicura una sufficiente dose a ciascuna cellula di masse tumorali ampie, con il rischio, però, di estendere l'irraggiamento anche a cellule sane di tessuti circostanti (*cross-fire effect*). I danni provocati, però, non eguagliano quelli dati dalle radiazioni α : le particelle β^- causano infatti la rottura di un singolo filamento di DNA, che è un possibile substrato di meccanismi riparativi endogeni. A causa di ciò, i danni provocati da queste radiazioni sono direttamente proporzionali alla quantità di particelle β^- emesse e quindi alla dose somministrata. [27], [45]

Esempi di emettitori β^- utilizzati in terapia sono ^{90}Y ($t_{1/2}$ 64 h), ^{177}Lu ($t_{1/2}$ 159 h), ^{131}I ($t_{1/2}$ 8 d). [7], [24], [27], [45]

Elettroni Auger. Sono particelle a bassa energia (1-10 keV) ma elevata LET (4-26 keV/ μm) e presentano un intervallo di penetrazione nei tessuti (1-20 μm) addirittura inferiore al diametro cellulare (~ 10 μm). Sono efficaci per bersagliare singole cellule metastatiche distribuite all'interno dell'organismo, grazie alla capacità di raggiungere compartimenti subcellulari e produrre potenti effetti letali. Allo stesso tempo, il rischio di *cross-fire* a cellule sane circostanti diminuisce drasticamente. Una potenziale difficoltà di questo approccio terapeutico è la necessità di dover portare il radionuclide all'interno della cellula e in prossimità del nucleo cellulare affinché il radiofarmaco eserciti la sua funzione.

Esempi di nuclidi utilizzati per la terapia con elettroni Auger sono $^{193\text{m}}\text{Pt}$ ($t_{1/2}$ 4.3 d), $^{195\text{m}}\text{Pt}$ ($t_{1/2}$ 4 d), ^{125}I ($t_{1/2}$ 60 d). [7], [45]

1.2.4 Radiofarmaci teranostici

Sistemi emergenti definiti teranostici sfruttano l'*imaging* medico-nucleare al fine di incrementare l'efficacia delle terapie. La strategia adottata è la seguente: si somministra al paziente un coniugato marcato con un radionuclide diagnostico per valutare lo stato della patologia in atto; dai dati di *imaging* si ottengono informazioni in merito alla biodistribuzione del radiofarmaco all'interno dell'organismo (sito di localizzazione preferenziale, e verifica che non si abbia accumulo in distretti *off-target*) e alla dosimetria ideale del coniugato; sulla base di questi dati, poi, viene formulato un regime terapeutico basato sulla somministrazione dello stesso coniugato ma marcato con un radionuclide terapeutico che abbia la medesima biodistribuzione *in vivo*. Il

vantaggio è la formulazione di regimi terapeutici *ad hoc* e personalizzati per le esigenze dei singoli pazienti. [1], [4]

Un primo approccio formulativo prevede la sintesi di un bioconiugato marcato con un singolo radionuclide intrinsecamente teranostico, il quale cioè decade con diverse modalità “complementari”, ovvero emettendo radiazioni γ o β^+ utili per l'*imaging* e simultaneamente anche radiazioni α , β^- o elettroni Auger utili per la terapia. In alternativa, gli agenti teranostici possono essere costituiti da una coppia di radionuclidi diversi di uno stesso elemento chimico, uno adatto all'*imaging* e uno adatto alla terapia. Questo approccio è spesso considerato ideale perché consente di progettare e usare due radiofarmaci chimicamente identici tra loro, che quindi hanno la stessa biodistribuzione e lo stesso comportamento *in vivo*. Un terzo approccio consiste invece nell'uso di una coppia di radionuclidi di elementi diversi ma con proprietà chimiche simili tra loro e modalità di emissione complementari. Nonostante questa ultima strategia sia talvolta considerata non ideale, sono disponibili esempi di coppie teranostiche formate da elementi differenti utilizzate con successo nella clinica, perché l'informazione diagnostica risulta ben rappresentativa della distribuzione della dose terapeutica. [4], [27]

In **Tabella 1.6** sono riportati alcuni esempi di agenti teranostici, con le rispettive modalità di decadimento, ad oggi in uso in ambito clinico.

Tabella 1.6 Esempi di coppie teranostiche utilizzate in ambito clinico, con le rispettive modalità di decadimento preferenziali. [4], [46]

Agente diagnostico		Agente terapeutico		Indicazione clinica
^{123}I	EC	^{131}I	β^-	Ipertiroidismo e tumori alla tiroide e del sistema adrenergico
^{111}In	EC	^{90}Y	β^-	Linfoma non-Hodgkin
^{68}Ga	EC	^{177}Lu	β^-	Tumori neuroendocrini e alla prostata

1.3 RADIO-223 IN MEDICINA NUCLEARE

Il radio, un metallo alcalino-terroso scoperto da Marie Curie e dal marito Pierre Curie nel 1898, esiste sottoforma di 33 isotopi radioattivi, di cui quattro presenti in natura perché generati dal decadimento di nuclidi primordiali. Il ^{228}Ra ($t_{1/2}$ 5.7 anni) e il ^{226}Ra ($t_{1/2}$ 1600 anni) non sono idonei all'applicazione in medicina nucleare a causa della lunga emivita, che esporrebbe inutilmente i pazienti a radiazioni per periodi eccessivamente lunghi. Il ^{224}Ra ($t_{1/2}$ 3.6 d) era stato in passato introdotto in medicina come cura di dermatosi benigne, lesioni vascolari, sciatica, reumatismo articolare, e anemia; successivamente è stato usato anche per il trattamento della spondilite anchilosante, una malattia infiammatoria cronica che colpisce la colonna vertebrale. Ad oggi però

non è più in uso a causa dei gravi effetti collaterali osservati in seguito alle terapie citate: i pazienti sottoposti alla somministrazione di ^{224}Ra sviluppavano tumori secondari in seguito al trattamento. Il ^{223}Ra ($t_{1/2}$ 11.4 d), al contrario, ha mostrato evidenze promettenti e significative in ambito medico. L'interesse nei suoi confronti è dovuto sia all'ottimale emivita che lo contraddistingue, sia alla sua catena di decadimento che produce nuclidi figli, a loro volta radioattivi ed emettitori di particelle α . [15], [47], [48]

La catena di decadimento del ^{223}Ra (**Figura 1.5**) rilascia un'energia globale pari a 28 MeV, conseguente alla produzione di più particelle α (abbondanza 95.3%), β^- (3.6%) e raggi γ (1.1%)¹¹. La produzione del ^{223}Ra si basa sul decadimento del ^{227}Th , a sua volta generato dal decadimento del ^{227}Ac in generatori $^{227}\text{Ac}/^{227}\text{Th}$. [15], [48]

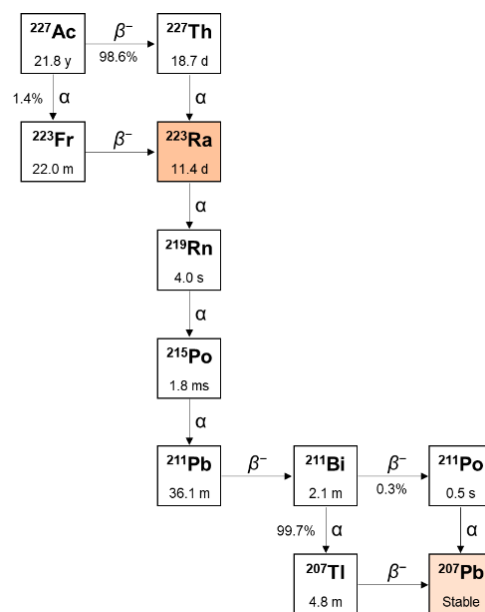


Figura 1.5 Generazione e catena di decadimento del ^{223}Ra . [15]

La *Targeted Alpha Therapy* (TAT) sfrutta emettitori α (**Paragrafo 1.2.3**) per eradicare cellule maligne nel trattamento di forme tumorali primarie o metastatiche. Un efficace nuclide già approvato in uso clinico e promettente per nuove applicazioni terapeutiche è il ^{223}Ra . [15]

Il radio, presente in soluzione acquosa come catione Ra^{2+} , ha un comportamento simile al Ca^{2+} endogeno, un componente dell'idrossiapatite presente nella matrice ossea: una volta introdotto nell'organismo in forma "libera" (ad esempio come sale), Ra^{2+} si accumula selettivamente nelle ossa. In ambito clinico, questa caratteristica intrinseca del catione Ra^{2+} è stata sfruttata per formulare un farmaco a base di ^{223}Ra adatto alla cura di metastasi ossee, il cui sviluppo è spesso osservato (con una frequenza del 90%) in pazienti colpiti da stadi avanzati di tumori

¹¹ I raggi γ emessi dal ^{223}Ra consentono il monitoraggio della biodistribuzione del radiofarmaco nell'organismo mediante SPECT; tuttavia, la qualità delle immagini generate è molto bassa.

prostatici. [49] Grazie alle particelle α emesse dal radionuclide durante il decadimento, infatti, viene provocata la morte delle cellule osteoblastiche danneggiate dal tumore, donando al paziente sollievo dal dolore osseo. [50], [51]

A seguito di numerosi studi preclinici e clinici che hanno mostrato risultati incoraggianti, nel 2013 un sale di ^{223}Ra , $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ o Xofigo[®], è stato approvato dall'FDA e dall'EMA (*European Medicines Agency*) per uso clinico, poiché le precedenti evidenze scientifiche avevano dimostrato un'efficacia di questo radiofarmaco sia in termini di sopravvivenza dei pazienti trattati, sia di ritardo nella manifestazione di sintomi associati a dolori scheletrici. L'applicazione terapeutica è attualmente di successo, anche se limitata a soggetti colpiti da un cancro alla prostata metastatico e resistente alla castrazione. [15], [49]

Il $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ viene somministrato mediante sei iniezioni di una sua soluzione in tampone citrato ogni quattro settimane. A seguito dell'assorbimento si assiste ad una selettiva biodistribuzione a livello osseo, con simultaneo metabolismo e rapida eliminazione di circa l'80% della quantità somministrata (a 24 ore dalla somministrazione meno dell'1% di farmaco è ancora presente nel circolo ematico). L'eliminazione preferenziale avviene per via intestinale e fecale, mentre solo il 5% è escreto tramite urine; Xofigo[®] non risulta quindi né nefropatico né epatotossico. I rischi associati all'utilizzo del radiofarmaco sono dovuti alla possibile insorgenza di tumori secondari a causa dell'esposizione alle radiazioni emesse dal nuclide. [15], [51]

L'efficacia clinica dimostrata dal $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ ha generato un grande interesse da parte della ricerca per la possibilità di applicare il ^{223}Ra anche al trattamento di patologie tumorali non ossee, mediante sistemi di *drug delivery* che coniughino questo nuclide a vettori direzionanti indirizzandolo a *target* biologici specifici. [15], [50], [51]

Per formulare potenziali radiofarmaci a base di ^{223}Ra e in grado di trattare tumori non ossei è fondamentale avere a disposizione un chelante bifunzionale (**Paragrafo 1.2.1.2**), da coniugare successivamente a una biomolecola direzionante (**Paragrafo 1.2.1.4**), capace di garantire la formazione di un complesso stabile che venga accumulato nel sito d'interesse. La scelta o la progettazione di un chelante adeguato si basa sulla chimica di coordinazione del catione metallico: informazioni di tipo termodinamico e cinetico vengono generalmente ottenute in ambiente acquoso studiando i complessi di isotopi stabili.

La conoscenza del comportamento del radio in soluzione acquosa, però, è piuttosto limitata per diverse ragioni. Innanzitutto, questo elemento presenta solo isotopi radioattivi, e ciò rende difficile ottenere dati mediante tecniche termodinamiche classiche (**Capitolo 3**).

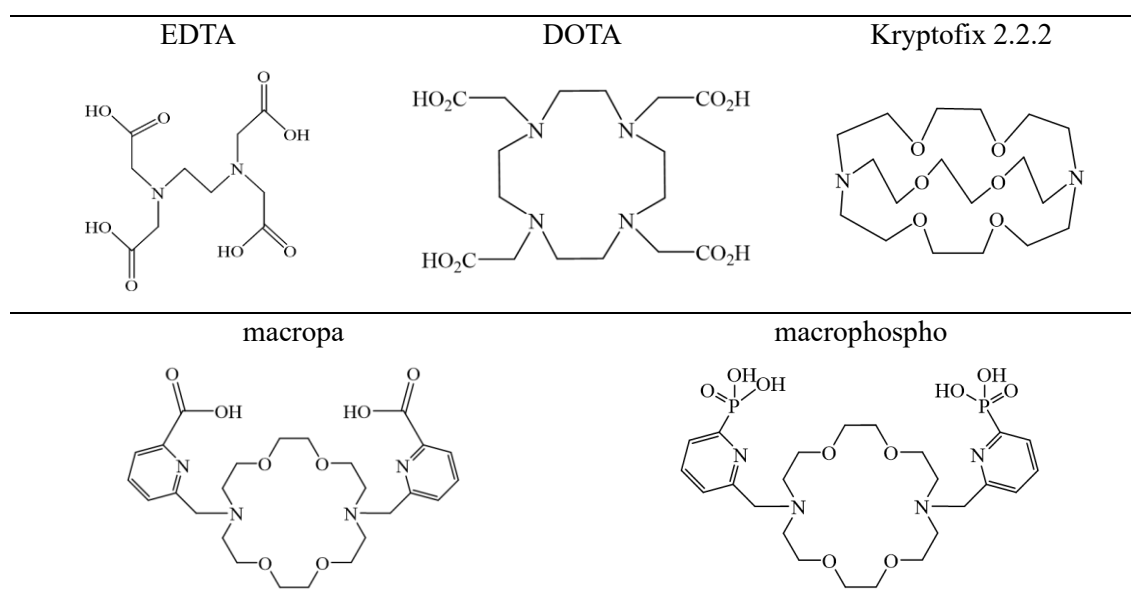
Secondariamente, è il più grande catione metallico con numero di ossidazione +2 e ciò porta ad interazioni elettrostatiche metallo-legante più deboli rispetto a ioni più piccoli (con rapporto carica:raggio ionico elevato). [15], [52], [53]

Un surrogato non radioattivo spesso utilizzato per questo tipo di misure, grazie alle numerose somiglianze con il radio, è il bario: anch'esso è un metallo alcalino-terroso, presenta numero di

ossidazione +2, ha dimensioni paragonabili a quelle di Ra^{2+} e la chimica di questi due elementi è sufficientemente simile. [48], [52]

Tra i pochi chelanti proposti in letteratura per la coordinazione del $[^{223}Ra]Ra^{2+}$, la maggior parte è macrociclica (alcuni esempi sono riportati in **Tabella 1.7**). Le loro caratteristiche strutturali sono tali da garantire un elevato numero di atomi donatori, per soddisfare gli alti numeri di coordinazione che il Ra^{2+} può raggiungere, e una cavità relativamente spaziosa, per ospitare questo catione dall'elevato raggio ionico. [15], [53]

Tabella 1.7 Alcuni esempi di chelanti proposti in letteratura per il complessamento del radio-223. [15], [50]



I primi tentativi di studiare la chimica di coordinazione del ^{223}Ra in soluzione acquosa si sono concentrati sia su chelanti aciclici, ad esempio l'EDTA, sia su macrocicli, come DOTA e Kryptofix 2.2.2. A seguito di studi di estrazione competitiva condotti sui complessi $[^{223}Ra][Ra(DOTA)]$ e $[^{223}Ra][Ra(Kryptofix\ 2.2.2)]$, è stata dimostrata la capacità dei due macrocicli di legare il catione metallico Ra^{2+} in soluzione acquosa, in misura maggiore rispetto all'EDTA. Tuttavia, questi chelanti sono stati abbandonati a causa delle basse rese di radiomarcatura. [15], [48], [53]

Questi primi studi sulla chimica di coordinazione del ^{223}Ra hanno avuto un successo limitato, e si sono pertanto ricercati dei chelanti alternativi; studi più recenti si sono concentrati su un chelante macrociclico denominato macropa (**Tabella 1.7**), che ha generato interesse da parte della comunità scientifica, dal momento che era già utilizzato come chelante per la coppia teranostica $^{132/135}La$ e per l'emettitore α ^{225}Ac , coniugato con un antigene di membrana specifico per la prostata come vettore direzionante. Oltre ad avere una cavità spaziosa in grado di ospitare grandi ioni metallici come Ra^{2+} e Ba^{2+} , il macropa dispone di numerosi atomi donatori sia nell'anello centrale chiamato Kryptofix 22 (a 18 atomi, di cui due azoti e quattro ossigeni), sia nei due bracci

lateralmente costituiti da due molecole di acido picolinico, che mettono a disposizione due azoti e due ossigeni per la coordinazione al catione metallico.

Per verificare il complessamento tra macropa e radio, sono stati condotti alcuni studi di caratterizzazione utilizzando il bario come surrogato: la $\log\beta$ di $[\text{Ba}(\text{macropa})]$ a pH fisiologico (pH = 7.4) è di circa 10, dunque sufficientemente elevata per la formazione di un complesso termodinamicamente stabile in soluzione acquosa. Inoltre, la resa di radiomarcatura di $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa})]$ del 95% ottenuta dopo 5 minuti a temperatura ambiente ha evidenziato un significativo miglioramento rispetto a chelanti più convenzionali, come $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{DOTA})]$ (15%) e $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{EDTA})]$ (35%). [15], [53] Per valutare la stabilità del complesso, infine, esso è stato incubato a 37°C in siero umano e dopo 12 giorni il 90% di complesso è risultato integro. La caratterizzazione *in vivo* di $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa})]$, confrontata con $^{223}\text{Ra}[\text{RaCl}_2]$, ha avuto esiti positivi, con biodistribuzione selettiva a livello osseo, rapida *clearance* ematica ed escrezione per via renale e intestinale con accumulo a livello della milza ridotto rispetto a $^{223}\text{Ra}[\text{RaCl}_2]$.

In seguito alla dimostrazione *in vivo* della stabilità di $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa})]$ sono stati valutati due sistemi:

- $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa}-\beta\text{-alanina})]$, in cui è stato introdotto un gruppo isotiocianato (azoto reattivo) ad un acido picolinico in catena laterale, in grado a sua volta di coniugarsi con una alanina che funge da *linker*.

La resa di radiomarcatura ottenuta dopo 5 minuti a temperatura ambiente è stata del 90% e la stabilità termodinamica evidenziata *in vitro* del 70%. Per quanto riguarda la sua biodistribuzione, questo derivato rispecchia il comportamento *in vivo* del complesso $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa})]$;

- $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa-DUPA})]$, in cui $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa})]$ è stato coniugato con una *small molecule* (DUPA) selettiva per un antigene di membrana delle cellule prostatiche, che funge da vettore direzionante.

La resa di radiomarcatura, ottenuta nelle stesse condizioni dei complessi precedentemente analizzati, è stata del 95% e la stabilità termodinamica evidenziata *in vitro* del 90%. La sua biodistribuzione, inaspettatamente, è risultata uguale a quella di $^{223}\text{Ra}[\text{RaCl}_2]$, evidenziando quindi un rilascio di $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}^{2+}]$ dal coniugato e un aumento della radioattività accumulata a livello osseo.

Sebbene i risultati *in vivo* di $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}(\text{macropa-DUPA})]$ non abbiano portato ai risultati sperati, la ricerca si sta espandendo alla sintesi e allo studio di analoghi del macropa per il complessamento del $^{223}\text{Ra}[\text{Ra}^{2+}]$. [15], [53]

Un secondo esempio di chelante proposto recentemente in letteratura per il complessamento del Ra^{2+} è il macrophospho (**Tabella 1.7**), caratterizzato dallo stesso anello a 18 atomi del macropa e da due bracci laterali in cui due acidi carbossilici presenti nel macropa sono sostituiti da due acidi fosfonici. I motivi per cui è stata proposta l'introduzione dell'acido fosfonico nella struttura di un

legante per il Ra^{2+} sono due: l'esistenza in soluzione acquosa e in condizioni di neutralità del dianione PO_3^{2-} ($\text{p}K_{a1} = 1.8$ e $\text{p}K_{a2} = 7.1$), che funge da base forte di Lewis per gli ioni metallici come Ra^{2+} e Ba^{2+} ; l'elevata affinità del Ra^{2+} per l'idrossiapatite nelle ossa da cui si ipotizza la possibilità che Ra^{2+} formi un legame stabile anche con il fosfonato. Dalla struttura cristallografica del complesso $[\text{Ba}(\text{macrophospho})]$ disponibile in letteratura, sono stati identificati gli atomi del legante che contribuiscono all'interazione con il catione metallico, tra cui i due azoti e quattro ossigeni dell'anello e due azoti e due ossigeni delle catene laterali. Questa coordinazione restituisce una struttura a prisma trigonale distorto tetracappato, che presenta una cavità spaziosa per il posizionamento del Ba^{2+} . Finora in letteratura è stata condotta solo una caratterizzazione termodinamica di $[\text{Ba}(\text{macrophospho})]$, che ha evidenziato una diminuzione della stabilità termodinamica di questo complesso rispetto a $[\text{Ba}(\text{macropha})]$. [30], [54]

Il macrophospho non è ancora stato testato con il $[\text{}^{223}\text{Ra}]\text{Ra}^{2+}$ in condizioni di radiomarcatura. Solo questi esperimenti e i successivi saggi di stabilità *in vitro* e *in vivo* saranno effettivamente determinanti per la possibilità di usare il macrophospho in radiofarmaci. [30], [54]

CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

Il successo clinico di [^{223}Ra]RaCl₂ per il trattamento di metastasi ossee in pazienti colpiti da tumore prostatico resistente alla castrazione ha generato un forte interesse da parte della comunità scientifica. Attualmente la ricerca mira allo sviluppo di nuovi radiofarmaci a base di ^{223}Ra per la *targeted alpha therapy* applicata al trattamento di tumori non ossei. A questo scopo, è necessario disporre di chelanti capaci di formare complessi termodinamicamente stabili e cineticamente inerti con lo ione metallico Ra^{2+} , tali da evitare la dissociazione dei complessi stessi *in vivo*.

In questo progetto di tesi sono stati studiati alcuni chelanti, sia bidentati che macrociclici, utilizzando lo ione metallico Ba^{2+} come surrogato non radioattivo del Ra^{2+} (**Paragrafo 1.3**).

Uno studio computazionale via *Density Functional Theory*¹², svolto parallelamente a questo lavoro nell'ambito di una tesi di dottorato, ha permesso il calcolo teorico delle energie di legame tra i cationi metallici Ra^{2+} e Ba^{2+} e una serie di chelanti bidentati selezionati in modo da esplorare diversi atomi donatori (principalmente ossigeno, azoto e fosforo). Tra questi, i leganti in grado di dare le interazioni di legame più forte sono stati selezionati (**Tabella 2.1**) e studiati nella prima parte di questo lavoro di tesi, per determinare le costanti di formazione dei loro complessi di Ba^{2+} . Lo scopo è valutare quali leganti bidentati formino i complessi più stabili termodinamicamente e siano quindi più promettenti per poter costruire chelanti macrociclici per il ^{223}Ra .

Secondariamente, questo lavoro di tesi ha l'obiettivo di indagare le proprietà complessanti, nei confronti del Ba^{2+} , di due chelanti macrociclici: il macrophospho e l'oddm (**Tabella 1.7** e **Tabella 2.2**).

Entrambi i chelanti sono stati sintetizzati apportando delle modifiche strutturali al macropa (**Tabella 1.7**), mediante l'introduzione di diversi leganti bidentati come bracci laterali (al posto dell'acido picolinico del macropa). La funzione dei bracci è non solo quella di completare la sfera di coordinazione del catione metallico, ma anche di aumentare l'affinità termodinamica del chelante nei confronti del metallo rispetto al solo anello macrociclico non funzionalizzato.

I sostituenti sono stati selezionati in base ai calcoli computazionali prima citati e ai risultati della caratterizzazione dei leganti bidentati eseguita nella prima parte della tesi. Nel macrophospho sono legate, come bracci laterali, due molecole di acido 2-piridilfosfonico (non studiato nella prima fase di questo lavoro perché non disponibile commercialmente), mentre nell'oddm sono inserite due molecole di acido malonico.

In ambito di ricerca di nuovi chelanti per scopi radiofarmaceutici è abbastanza comune condurre sia studi di radiomarcatura, sia studi preliminari di chimica di coordinazione con ioni metallici non radioattivi per ottenere informazioni sulla termodinamica dei complessi in soluzione. In

¹² Realizzato in collaborazione con il gruppo della prof.ssa Laura Orian presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

letteratura, infatti, sono già disponibili degli studi condotti sui complessi di Ba^{2+} con macrophospho e oddm; tuttavia, per il sistema Ba^{2+} -macrophospho è disponibile una sola pubblicazione, mentre per il sistema Ba^{2+} -oddm gli studi disponibili non sono recenti e soprattutto riportano alcuni risultati non coerenti tra loro. [30], [54], [55], [56]

Si è deciso, quindi, di ripetere la caratterizzazione dei due sistemi Ba^{2+} -macrocielo, sia per completarne la caratterizzazione mediante spettroscopia NMR (non riportata in letteratura), sia per confermare i dati riportati negli articoli precedenti.

Inoltre, l'obiettivo futuro del nostro gruppo di ricerca è di condurre studi di radiomarcatura dei chelanti con ^{223}Ra . In letteratura questi studi sono stati proposti per il macrophospho ma non ancora eseguiti, mentre l'oddm non è mai stato considerato per il complessamento del ^{223}Ra , ma soltanto del Ba^{2+} .

Tabella 2.1 Strutture dei leganti bidentati studiati in questo lavoro.

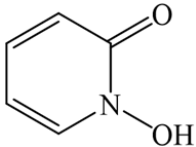
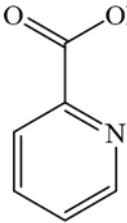
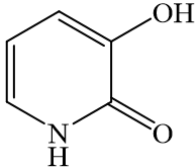
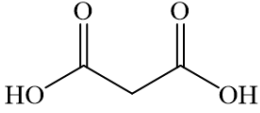
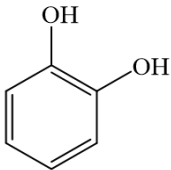
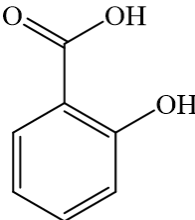
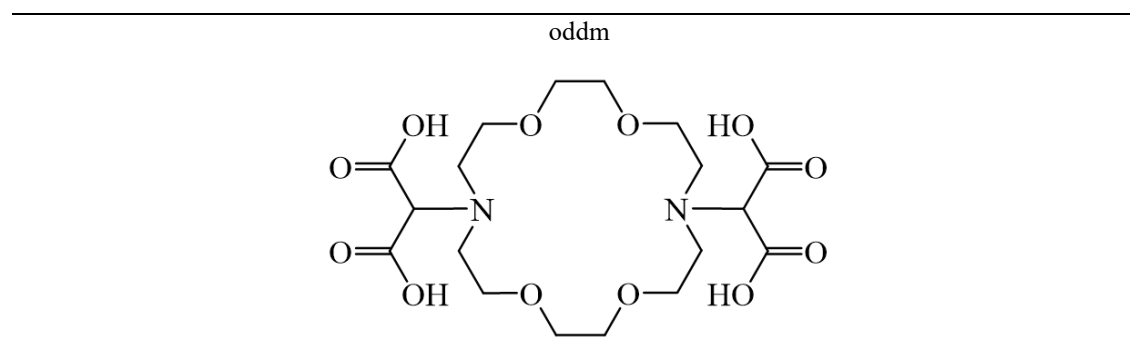
1,2-HOPO 2-idrossipiridina-1-ossido	Acido picolinico	2,3-HOPO 3-idrossi-2-piridone
		
Acido malonico	Catecolo	Acido salicilico
		

Tabella 2.2 Struttura del chelante oddm studiato in questo lavoro di tesi.



CAPITOLO 3 – STUDIO DEGLI EQUILIBRI DI COMPLESSAMENTO

Lo studio degli equilibri di complessamento metallo-legante rende possibile la determinazione della speciazione, ossia il numero, la stechiometria e le costanti di formazione dei complessi presenti in soluzione. Le tecniche analitiche di indagine devono necessariamente essere sensibili ad una proprietà della soluzione in esame che dipenda dalla formazione del complesso metallico; simultaneamente, però, le misure non devono perturbare l'equilibrio del sistema.

Dal punto di vista sperimentale, lo studio degli equilibri di complessamento di un sistema metallo-legante può essere condotto mediante tecniche elettrochimiche e spettroscopiche.

3.1 POTENZIOMETRIA

Al fine di esaminare il complessamento tra metallo e legante, la tecnica analitica più comunemente impiegata è la potenziometria, sia per la semplicità di utilizzo e il basso costo dell'apparato strumentale, sia per l'accuratezza dei dati quantitativi ottenuti, grazie ai quali è possibile determinare le costanti di formazione dei complessi in soluzione.

La potenziometria è una tecnica di analisi basata sulle proprietà elettrochimiche di una soluzione in cui sono presenti gli analiti. In particolare, essa si basa sulla misurazione della differenza di potenziale, definita anche forza elettromotrice (f.e.m.), di un sistema composto da un elettrodo indicatore, il cui potenziale dipende dall'attività di una delle specie coinvolte nell'equilibrio di complessamento, e da un elettrodo di riferimento, il cui potenziale è indipendente dalla composizione della soluzione in esame.

Per lo studio dei sistemi metallo-legante spesso è possibile usare l'elettrodo di vetro, mediante il quale viene determinato il pH della soluzione, che dipende dalla concentrazione di ioni H_3O^+ (per semplicità indicati come H^+) liberati dalla reazione di complessamento (equazione 3.1). I leganti infatti sono quasi sempre acidi di Brønsted, e la formazione del legame con il metallo generalmente ne causa la deprotonazione. [36], [57], [58] Le variazioni di pH in una soluzione in cui ha luogo la formazione di complessi dipende quindi dalle reazioni che hanno luogo e dalle loro costanti di equilibrio.



3.1.1 Elettrodo di vetro

L'elettrodo di vetro è caratterizzato dalla presenza di un bulbo che contiene una soluzione tampone a pH costante. Una volta immerso all'interno della soluzione a pH incognito, si crea una differenza di potenziale a livello della membrana di vetro, dovuta al diverso contenuto di ioni H^+

presenti nelle due soluzioni, per cui si può scrivere un'equazione, detta legge di Nernst estesa, che esprime la differenza di potenziale in funzione dell'attività degli ioni H^+ (equazione 3.2).

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

dove:

- E^0 è il potenziale standard dell'elettrodo e comprende vari contributi costanti, tra cui i potenziali elettrodi dei riferimenti esterno ed interno e il potenziale di asimmetria della membrana (attribuito a minime variazioni geometriche nella forma del bulbo);
- R è la costante universale dei gas, che vale $8.31447 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$;
- T è la temperatura assoluta del sistema, espressa in K;
- n è il numero di elettroni scambiati nel sistema, pari a 1 nel caso dell'elettrodo di vetro;
- F è la costante di Faraday, che vale $96485.309 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$ e rappresenta la carica di una mole di elettroni. Complessivamente il rapporto $\frac{RT}{nF}$ è definito pendenza di Nernst (S), che vale 59.2 mV a 25°C e con $n = 1$;
- α_H e α_M sono le attività rispettivamente dello ione H^+ e di un generico catione interferente M^+ ;
- k_M è il coefficiente di selettività associato allo ione M^+ presente in soluzione, e la sommatoria è riferita a tutti i cationi interferenti presenti in soluzione. Gli interferenti più comuni sono K^+ e Na^+ ; quest'ultimo nel presente lavoro di tesi è stato introdotto come NaOH durante le titolazioni e come NaCl per il controllo della forza ionica (**Paragrafo 3.1.2**). È da ricordare che un elettrodo è tanto più selettivo quanto più piccole sono le costanti di selettività associate agli ioni interferenti.
- E_j è il potenziale di giunzione e si genera all'interfaccia tra il setto poroso dell'elettrodo di riferimento esterno e la soluzione in esame. Solitamente, essendo un potenziale molto piccolo e pressoché costante, può essere ritenuto trascurabile in un intervallo di pH tra circa 2 e 12.

Possono esistere condizioni sfavorevoli all'utilizzo dell'elettrodo di vetro, tali per cui si ottengono risultati poco accurati; ciò in particolare accade a pH molto basici oppure molto acidi, e in queste condizioni si originano quindi l'errore alcalino e l'errore acido. Il primo di questi errori si verifica quando la concentrazione di ioni M^+ è molto maggiore rispetto a quella degli ioni H^+ , per cui si assiste ad un'interferenza da parte dei cationi M^+ presenti in soluzione. In queste condizioni il prodotto $k_M \alpha_M$ non risulta più trascurabile rispetto ad α_H e ciò causa una lettura di pH inferiore al valore reale. L'errore acido è invece dovuto ad una sovrasaturazione dei siti superficiali dell'elettrodo, il cui potenziale varia quindi col pH in maniera non più coerente con quel che accade ad altro pH. Pertanto, il valore di pH restituito dallo strumento risulta superiore rispetto al valore reale.

3.1.2 Controllo della forza ionica

La forza ionica è una grandezza che esprime la concentrazione totale degli ioni in soluzione ed è calcolata secondo l'equazione 3.3:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2 \quad (3.3)$$

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

Per ottenere dati quantitativi accurati relativi alle costanti di equilibrio, in principio sarebbe necessario utilizzare le attività delle varie specie coinvolte (equazione 3.4) al posto delle concentrazioni.

$$a_i = C_i \gamma_i \quad (3.4)$$

in cui C_i è la concentrazione all'equilibrio della specie i -esima e γ_i è il suo coefficiente di attività. Quest'ultimo indica la deviazione dal comportamento ideale dovuta alla forza ionica e dipende dalla forza ionica I attraverso equazioni che possono essere anche molto complicate e di difficile utilizzo. L'equazione più semplice, valida in condizioni di estrema diluizione, è quella di Debye-Hückel (equazione 3.5):

$$\log(\gamma) = -0.509 |z_+ z_-| I^{\frac{1}{2}} \quad (3.5)$$

In generale si può dedurre, almeno in prima approssimazione, che i coefficienti di attività dipendono dalla forza ionica: se quindi questa rimane costante, anche i coefficienti di attività possono essere ritenuti costanti, ed essere conglobati nella costante di equilibrio. Dal punto di vista pratico questo aspetto è importante per la determinazione sperimentale delle costanti di equilibrio. Difficilmente, infatti, si hanno a disposizione i coefficienti di attività; dunque, risulta spesso necessario approssimare l'attività alla sola concentrazione.

Per far sì che la forza ionica rimanga costante è necessario l'impiego di un elettrolita di supporto in concentrazione molto maggiore rispetto a quella di tutte le altre specie presenti in soluzione, tale per cui le variazioni di forza ionica indotte dalle reazioni chimiche non modifichino significativamente il valore di I . Questo elettrolita deve essere inerte, cioè non essere in grado di reagire con le specie coinvolte negli equilibri in esame. Molto spesso come elettroliti di supporto sono utilizzati sali di metalli alcalini e anioni con carica 1^- .

Applicando questa teoria all'equazione di Nernst estesa (equazione 3.2) è possibile sostituire le attività a_H e a_M con le concentrazioni all'equilibrio degli ioni H^+ e M^+ (indicate con $[H^+]$ e $[M^+]$) per ottenere costanti definite stechiometriche, ossia che dipendono dal mezzo in cui è stata eseguita la misura. Al contrario, per l'ottenimento delle costanti termodinamiche è necessario l'utilizzo delle attività, che sono indipendenti dal mezzo in cui è avvenuta la reazione in esame.

[58]

L'elettrolita di supporto usato in questo lavoro di tesi è NaCl 0.15 M, simile a quello dell'ambiente fisiologico, destinazione ultima del radiofarmaco.

3.1.3 Determinazione delle costanti di equilibrio

3.1.3.1 Software PITMAP per l'elaborazione dei dati potenziometrici

Le titolazioni potenziometriche, eseguite da un titolatore automatico, restituiscono dati sperimentali che consistono in una serie di punti per cui ad ogni volume noto di titolante aggiunto alla soluzione corrisponde un valore di potenziale misurato. L'elaborazione dei dati sperimentali permette di ottenere le costanti di equilibrio che coinvolgono le specie presenti in soluzione, mediante confronto tra i valori di potenziale registrati dallo strumento e i valori teorici ottenuti con l'equazione di Nernst (equazione 3.2) per ogni punto. Il software utilizzato in questo lavoro di tesi per l'elaborazione dei dati potenziometrici e il calcolo delle costanti di equilibrio è PITMAP, scritto in linguaggio Turbo Pascal e funzionante in ambiente DOS. [58]

Per il trattamento degli equilibri di complessamento, l'aspetto critico da considerare è che le specie presenti in soluzione non sono note a priori. Pertanto, è necessario ipotizzare un possibile modello di speciazione (numero e stechiometria delle specie), sulla base di eventuali analisi preliminari, studi già presenti in letteratura e/o ragionamenti basati sul buon senso chimico. I complessi, che possono contenere un diverso numero di ioni metallici (M), molecole di legante (L) e protoni (H), sono rappresentati dalla formula generale $[M_mL_lH_h]$. Per permettere al software di eseguire un'elaborazione corretta, è necessario fornire come *input* i valori dei vari parametri coinvolti nei calcoli, riportati in **Tabella 3.1**: a partire da questi e mantenendo costanti gli eventuali parametri noti, viene eseguita l'ottimizzazione dei parametri non noti.

Tabella 3.1 Parametri del software PITMAP coinvolti nel calcolo delle costanti di equilibrio indagate.

Parametri non termodinamici		Costanti di equilibrio	
E^0	Potenziale standard	K_w	Autoprotolisi dell'acqua
S	Pendenza di Nernst	$K_{a,carb}$	Acidità dell'acido carbonico
k_{Na}	Costante di errore alcalino	$K_{a,L}$	Acidità del legante
imp	Impurezze acide o basiche	$\beta_{m,l,h}$	Formazione degli n complessi $[M_mL_lH_h]$
α	Grado di carbonatazione della base NaOH impiegata per la titolazione		
C_b	Titolo della base		
C_L	Titolo del legante		
C_M	Titolo del metallo		

Una volta inseriti i valori di partenza, PITMAP calcola la curva di titolazione teorica risolvendo un sistema di equazioni che comprende i bilanci di massa (equazioni 3.6, 3.7 e 3.8) per le specie presenti in soluzione e le equazioni descrittive delle costanti di equilibrio (equazione 3.9).

$$C_M = [M] + \sum_i^n m \beta_{m,l,h} [M]^m [L]^l [H]^h \quad (3.6)$$

$$C_L = [L] + \sum_i^n l \beta_{m,l,h} [M]^m [L]^l [H]^h \quad (3.7)$$

$$C_H = [H] + \sum_i^n h \beta_{m,l,h} [M]^m [L]^l [H]^h \quad (3.8)$$

$$\beta_{m,l,h} = \frac{[M_m L_l H_h]}{[M]^m [L]^l [H]^h} \quad (3.9)$$

dove:

- C_L , C_M e C_H sono le concentrazioni stechiometriche (note) di legante, metallo e ione idronio;
- $[L]$, $[M]$ e $[H]$ sono le concentrazioni all'equilibrio di legante, metallo e protone incognite. La risoluzione del sistema consente di ottenere un valore teorico della concentrazione all'equilibrio di H, da cui (attraverso l'equazione di Nernst 3.2) è possibile ricavare un potenziale teorico per ogni singolo punto sperimentale a disposizione;
- n è il numero di specie ipotizzate nel sistema all'equilibrio, in aggiunta ad M, L e H;
- m , l e h sono i coefficienti stechiometrici rispettivamente di metallo, legante e protone per le varie specie: è bene ricordare che m e l assumono necessariamente valori positivi (per indicare la presenza nel complesso di metallo e legante) o nulli (se metallo o legante non sono presenti), mentre h può assumere valori negativi nel caso in cui la specie preveda la perdita di protoni. Ad esempio, un valore di $h = -1$ indica la perdita di un protone, che è equivalente a dire che si ha l'acquisizione di gruppo ossidrilico (OH^-);
- $\beta_{m,l,h}$ sono le costanti di equilibrio, dette costanti di formazione globali delle specie, i cui valori di partenza vengono impostati arbitrariamente. PITMAP, attraverso la risoluzione iterativa e completa del sistema, è in grado di ottimizzare i valori di $\beta_{m,l,h}$, in modo tale che il valore teorico risultante di $[H]$ renda più piccola possibile la differenza tra i potenziali sperimentali e i potenziali teorici calcolati con l'equazione di Nernst (equazione 3.2).
È possibile ed è anzi opportuno ripetere l'ottimizzazione modificando la speciazione iniziale, variando i valori arbitrari di partenza dei parametri o scartando alcuni punti sperimentali non significativi; questo può essere utile per assicurare l'ottenimento di valori accurati.

L'accuratezza della curva di titolazione ottimizzata restituita da PITMAP e dei dati ottenuti in seguito all'elaborazione dipende sia dalle condizioni sperimentali in cui è stata svolta l'analisi,

sia dalla robustezza e dall'efficienza dell'algoritmo di *fitting* utilizzato per la stima dei valori teorici risultanti. L'algoritmo deve necessariamente essere non lineare, dal momento che la funzione da ottimizzare descrittiva della composizione della soluzione in esame non è lineare nei suoi parametri, e deve permettere l'ottimizzazione di funzioni implicite, poiché alcune variabili (come le costanti di equilibrio) provocano la variazione della concentrazione degli ioni H⁺ in maniera implicita.

Gli algoritmi di *fitting* sfruttati da PITMAP sono il metodo del semplice e il metodo del *pit-mapping*, che si basano sul metodo dei minimi quadrati. [58]

3.1.3.2 Valutazione della bontà del *fitting*

Una volta effettuata l'elaborazione dei dati sperimentali, è necessario valutare la bontà del *fitting*, dunque l'aderenza tra la curva sperimentale e quella calcolata. Per fare ciò si considera il parametro σ_{fit}^2 (equazione 3.10), proporzionale alla sommatoria dei quadrati degli scarti tra la curva sperimentale e quella teorica (ottimizzata).

$$\sigma_{\text{fit}}^2 = \sum_{i=1}^N \frac{(E_{i,\text{calc}} - E_{i,\text{sper}})^2}{N-P} \quad (3.10)$$

Nell'equazione:

- N è il numero di punti sperimentali;
- P è il numero di parametri ottimizzati dal programma;
- $E_{i,\text{calc}}$ è il valore del potenziale elettrodoico calcolato per il punto sperimentale i -esimo mediante l'equazione di Nernst estesa (equazione 3.2);
- $E_{i,\text{sper}}$ è il valore del potenziale elettrodoico registrato nel corso della titolazione potenziometrica per il punto i -esimo.

La funzione σ_{fit}^2 dipende dalla dispersione dei dati sperimentali rispetto al valore calcolato, ma non dal numero di punti sperimentali a disposizione: grazie a ciò è possibile confrontare *fitting* di esperimenti differenti tra loro. Inoltre, mediante confronto con il valore teorico atteso di σ_{fit} , è possibile eseguire una valutazione assoluta della bontà del *fitting*. Il voltmetro utilizzato in questo lavoro per la misurazione dei potenziali ha una risoluzione di ± 0.1 mV, da cui è possibile ottenere la varianza, che per una distribuzione uniforme di ampiezza a è espressa come $\sigma^2 = a/12$, dunque $\sigma \approx 0.289 \cdot a$. Il valore teorico atteso per σ_{fit} , considerando solo l'errore strumentale, vale quindi 0.0289 mV, cioè i dati ottenuti dall'elaborazione presentano un'incertezza minima di circa 0.03 mV. Nella pratica, tuttavia, è necessario considerare anche altri errori sperimentali, sempre più probabili a mano a mano che aumenta la complessità del sistema analizzato. In base all'esperienza pregressa, un *fitting* è da ritenersi buono se σ_{fit} ottenuto assume valori non superiori

a 0.5 mV nel caso di titolazioni acido-base o di soli leganti, e nell'intervallo di circa 0.5-1.0 mV per titolazioni di soluzioni contenenti simultaneamente legante e metallo. [58]

3.1.3.3 Il problema dei falsi minimi

Per determinate combinazioni di parametri ottimizzati, l'algoritmo di *fitting* può convergere in un punto definito 'falso minimo', in cui σ_{fit}^2 assume un valore che non corrisponde al minimo assoluto della funzione ma ad un minimo relativo. La convergenza ad un minimo relativo restituisce parametri non corretti, ed è quindi una fonte di errore che può essere molto importante in fase di elaborazione dati. La probabilità che l'algoritmo converga ad un falso minimo aumenta all'aumentare della complessità della funzione che deve essere ottimizzata.

Per riconoscere questi punti di minimo relativo è possibile adottare alcune strategie:

- Ripetere il *fitting* attribuendo diversi valori di partenza ai parametri da ottimizzare, dal momento che solo alcune specifiche combinazioni di parametri permettono di convergere su uno specifico falso minimo;
- Ripetere il *fitting* con un algoritmo di *fitting* differente;
- Confrontare i valori ottimizzati ottenuti dal *fitting* con i valori attesi, se disponibili in letteratura o se ipotizzati sulla base delle condizioni sperimentali dell'analisi potenziometrica. Tanto maggiore è la differenza, tanto più è probabile che sia stato raggiunto un falso minimo. [58]

3.1.3.4 Scelta del modello di speciazione

Come detto in precedenza (**Paragrafo 3.1.3.1**), per l'elaborazione dei dati potenziometrici è necessario ipotizzare un modello di speciazione, dal momento che il numero e la stechiometria delle specie presenti in soluzione non sono noti a priori. È dunque importante valutare il *fitting* ottenuto per diversi modelli ipotizzati, al fine di individuare la speciazione corretta.

In primo luogo, è bene confrontare i valori di σ_{fit} ottenuti per i diversi modelli proposti; il valore di σ_{fit} più basso corrisponde al modello corretto, per il quale è minimizzata la differenza tra la curva sperimentale e quella teorica calcolata dall'algoritmo. Inoltre, è importante valutare se tutte le specie scelte siano davvero presenti in soluzione oppure se risultino solo utili a compensare errori sperimentali o strumentali commessi durante l'analisi. La valutazione può avvenire sulla base di alcune regole empiriche:

- Se la curva di titolazione teorica è scadente rispetto ai punti sperimentali, la speciazione scelta è errata;
- Se la curva teorica è buona in determinati intervalli e scadente in altri, il modello scelto è parzialmente corretto;

- Se la curva teorica è buona, ma in seguito al *fitting* alcuni parametri assumono valori irrealistici o molto diversi tra esperimenti ripetuti, il modello presenta più specie di quelle che realmente sono presenti in soluzione;
- Se il *fitting* è buono e i valori dei parametri sono ragionevoli, è possibile individuare specie non realmente presenti in soluzione eseguendo diverse potenziometrie in condizioni sperimentali differenti e confrontando i valori ottenuti. Per le specie esistenti in soluzione i valori delle costanti di equilibrio sono indipendenti dalle condizioni sperimentali, mentre per specie inesistenti si osserva una correlazione tra i valori ottimizzati e le condizioni di lavoro. [58]

3.1.4 Influenza dell'ambiente esterno

Il potenziale misurato durante una titolazione potenziometrica può essere influenzato dall'ambiente esterno; in particolare alcuni fattori, quali temperatura, luce e umidità dell'aria, possono assumere una rilevanza tale da provocare errori non trascurabili.

In primo luogo, la temperatura influenza il potenziale E , sia perché da essa dipende E^0 , sia perché è una variabile dell'equazione di Nernst (equazione 3.2). Per ogni variazione di temperatura di 1°C, il potenziale registrato subisce una modifica di circa 1 mV; pertanto, per evitare oscillazioni nel potenziale, la cella di misura viene posta in un sistema termostato, così che venga garantita una temperatura costante durante tutto il corso dell'esperimento. Anche il volume erogato dalle burette automatiche dipende dalla temperatura dell'ambiente di lavoro: affinché l'errore risulti trascurabile è necessario lavorare in condizioni controllate tra circa 20°C e 30°C.

In secondo luogo, anche la luce solare e l'umidità relativa del laboratorio possono influire sul valore del potenziale, introducendo errori sistematici non trascurabili. La prima può provocare una variazione della costante E^0 anche di 2 mV entro lo stesso giorno; la seconda, se troppo bassa, è in grado di portare alla generazione di campi elettrici fluttuanti che causano dati anomali nella misura di potenziale.

Per minimizzare le possibili oscillazioni indesiderate del potenziale, è quindi opportuno porre il sistema di misura all'interno di una scatola buia opaca, circondata interamente da una rete metallica in grado di fungere da gabbia di Faraday. [58]

3.1.5 Limitazioni della potenziometria

Nonostante i vantaggi dei metodi potenziometrici (**Paragrafo 3.1**), esistono alcune limitazioni che possono rendere inaffidabili i dati ottenuti in merito allo studio degli equilibri in soluzione.

La potenziometria è una tecnica analitica intrinsecamente poco robusta, poiché la concentrazione di ioni H^+ , e dunque la forza elettromotrice del sistema, è influenzata solo indirettamente dalla formazione dei complessi e può essere condizionata da equilibri acido-base di impurezze di

qualsiasi origine presenti in soluzione. Inoltre, mentre nel caso di sistemi semplici il modello di speciazione è di semplice intuizione, con l'aumentare della complessità c'è il rischio di compensare minime variazioni di pH registrate con la presenza di complessi inesistenti, giungendo ad una valutazione errata del modello di speciazione in esame. Essendo impossibile eliminare nella loro totalità le eventuali impurezze presenti, è fondamentale eseguire con attenzione l'esperimento per limitare l'insorgenza di errori e successivamente valutare con attenzione il *fitting* ottenuto.

La potenziometria è inoltre una tecnica esclusivamente quantitativa, dunque non consente di ottenere alcuna informazione qualitativa, ad esempio in merito alla struttura delle specie presenti in soluzione.

Un ulteriore limite di questa tecnica analitica riguarda la presenza del potenziale di giunzione, che risulta non trascurabile in soluzioni in cui la concentrazione di ioni H^+ e OH^- è eccessivamente elevata, ossia a condizioni estreme di pH ($pH < 2$ o $pH > 12$), tali per cui le misurazioni non risultano accurate. Come visto, tra l'altro, è comunque necessario condurre le analisi potenziometriche a valori di pH compresi tra 2 e 12 per evitare l'errore acido a valori di pH molto bassi e l'errore alcalino a valori di pH molto alti (**Paragrafo 3.1.1**).

Infine, gli equilibri di reazione che interessano il sistema in esame devono essere rapidi, cioè andare a completezza in tempi dell'ordine dei minuti. Questo perché il potenziale rilevato in ogni punto sperimentale deve essere all'equilibrio, così da rendere possibile una correlazione tra esso, la composizione del sistema stesso e le costanti termodinamiche. Se i tempi di equilibrio fossero maggiori, sarebbe necessario prolungare (ad esempio a ore o a giorni) la durata delle titolazioni potenziometriche; in queste condizioni, tuttavia, i parametri di calibrazione dell'elettrodo (E^0 e S) subirebbero derive inevitabili e significative, restituendo dati inaffidabili. [58]

3.2 SPETTROSCOPIA UV-VISIBILE

Lo studio degli equilibri di complessamento metallo-legante può essere condotto anche mediante tecniche spettroscopiche, tra cui una delle più importanti è l'UV-Visibile. La sua utilità è data dal fatto che la formazione di complessi può comportare la modifica dello spettro UV-Visibile della soluzione stessa.

La spettroscopia UV-Visibile è una tecnica sperimentale basata sull'interazione tra materia e radiazioni elettromagnetiche, caratterizzate da una lunghezza d'onda compresa tra 200 e 400 nm (regione dell'ultravioletto) e tra 400 e 800 nm (regione visibile dello spettro), che rende possibile una valutazione quantitativa e qualitativa delle specie presenti in soluzione.

3.2.1 Principi teorici di base

La radiazione elettromagnetica emessa da una sorgente può essere in parte assorbita dal campione in analisi; se ciò accade il fascio di luce emergente dal campione ha un'intensità minore del fascio in entrata, a causa dell'assorbimento da parte del campione stesso. Per valutare l'intensità di luce trasmessa è possibile utilizzare una grandezza definita trasmittanza (T), calcolata secondo l'equazione 3.11:

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

dove:

- I è l'intensità della radiazione emergente dal campione dopo averlo attraversato;
- I_0 è l'intensità della radiazione incidente, ovvero la quantità di luce totale emessa dalla sorgente.

Il logaritmo negativo della trasmittanza è l'assorbanza (A), che definisce la quantità di luce assorbita dal campione (equazione 3.12).

$$A = -\log_{10} T = -\log_{10} \frac{I}{I_0} \quad (3.12)$$

La legge di Lambert-Beer (equazione 3.13) stabilisce una proporzionalità diretta tra l'assorbanza e la concentrazione di analita assorbente presente in soluzione.

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda b C \quad (3.13)$$

In questa equazione:

- A_λ indica l'assorbanza ad una determinata lunghezza d'onda; essa è adimensionale;
- b è il cammino ottico (espresso in cm), ossia la lunghezza fisica che il raggio luminoso percorre nell'attraversare interamente il campione in analisi. Per la spettroscopia UV-Visibile è di uso comune l'utilizzo di celle con cammino ottico di 1 cm;
- ε_λ , definito coefficiente di estinzione molare ed espresso in $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, descrive la capacità di assorbimento di un campione con concentrazione 1 M in una cella di cammino ottico unitario (1 cm). È specifico per ogni specie presente in soluzione. Maggiore è il valore di ε , maggiore è la sensibilità del metodo spettroscopico utilizzato per l'analisi del composto in esame.
- C è la concentrazione molare (mol/L) dell'analita assorbente presente in soluzione. [58], [59], [60]

3.2.2 Software *HypSpec* per l'elaborazione degli spettri UV-Visibili

Le costanti di formazione dei complessi possono essere determinate mediante l'elaborazione di dati ottenuti dalla spettroscopia UV-Visibile, che in questo lavoro di tesi consistono in andamenti di assorbanze in funzione del pH a diverse lunghezze d'onda. Il software utilizzato per eseguire il *fitting* è *HypSpec*, che rende possibile la risoluzione di un sistema complesso di equazioni comprendente la legge di Lambert-Beer (equazione 3.14), i bilanci di massa (equazioni 3.15 e 3.16), le costanti di acidità del legante (equazione 3.17, per un acido monoprotico HL) e le costanti di formazione dei complessi (equazione 3.18, per il complesso ML). Per semplicità, le equazioni qui riportate costituiscono un esempio relativo ad un sistema contenente un acido monoprotico HL, un metallo M ed un unico complesso di stechiometria ML. [58]

$$A_{ML+HL-M} - A_{HL} - A_M - A_L = b (\varepsilon_{HL}[HL] + \varepsilon_M[M] + \varepsilon_{ML}[ML] - \varepsilon_{HL}C_{HL} - \varepsilon_L C_L - \varepsilon_M C_M) \quad (3.14)$$

$$[HL] + [ML] + [L] = C_{HL} \quad (3.15)$$

$$[M] + [ML] = C_M \quad (3.16)$$

$$K_a = \frac{[L^-][H^+]}{[HL]} \quad (3.17)$$

$$\beta_{m,l} = \frac{[M_m L_l]}{[M]^m [L]^l} \quad (3.18)$$

Le grandezze che vengono ottimizzate dall'algoritmo di *fitting* sono le ε di tutte le specie e le costanti di formazione dei complessi, β .

3.2.3 Limitazioni della spettroscopia UV-Visibile

La spettroscopia UV-Visibile rappresenta raramente la tecnica migliore per lo studio degli equilibri di complessamento di sistemi metallo-legante, a causa di alcune sue limitazioni. Generalmente è preferibile affiancare i dati quantitativi ottenuti per via spettroscopica a dati ottenuti per via potenziometrica (maggiormente accurati).

Innanzitutto, sistemi con speciazione complessa sono difficili da analizzare mediante spettroscopia UV-Visibile, poiché il numero di parametri che l'algoritmo di *fitting* deve ottimizzare è elevato; di conseguenza aumenta il rischio di introdurre errori nei risultati ottenuti dall'elaborazione.

In secondo luogo, non sempre la formazione del complesso metallico causa una modifica nello spettro di assorbimento del solo legante o del solo metallo o, ancora, i diversi complessi in soluzione possono presentare spettri molto simili tra loro e difficili da discriminare. La

conseguenza è che l'elaborazione dei dati spettroscopici fornisce risultati poco ripetibili e dunque poco affidabili. [58]

3.3 SPETTROSCOPIA NMR

Anche la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) rende possibile lo studio di equilibri acido-base o di formazione di complessi metallo-legante dal punto di vista qualitativo e quantitativo. Mediante NMR si possono distinguere gli intorni chimici di determinati nuclei di una molecola e spesso quindi risalire alla struttura chimica della molecola stessa.

Come per la spettroscopia UV-Visibile, anche l'NMR è basato sulla valutazione delle differenze tra spettri della stessa soluzione al variare di alcuni fattori quali pH e/o concentrazioni totali di legante e metallo.

3.3.1 Principi teorici di base

La spettroscopia NMR è una tecnica analitica applicabile solo a nuclei caratterizzati da un numero quantico di spin nucleare (I) maggiore di zero, come ad esempio ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P . Lo spin è una proprietà intrinseca di ogni nucleo e genera un momento di dipolo magnetico nucleare (μ). I momenti magnetici dei nuclei presenti in un campione sono normalmente orientati in modo casuale nello spazio; invece, se si applica un campo magnetico esterno (B_0), i momenti di dipolo dei nuclei si orientano in senso parallelo o antiparallelo rispetto ad esso. Il numero di orientazioni possibili per ogni nucleo dipende dal numero quantico di spin e vale $2I + 1$: orientazioni diverse sono associate a stati energetici differenti. Nel caso di nuclei dipolari come ^1H , ^{13}C e ^{31}P , il numero quantico di spin vale $I = \frac{1}{2}$ e i possibili stati energetici quindi sono due, descritti dai numeri quantici magnetici (m) $-\frac{1}{2}$ e $+\frac{1}{2}$.

Per promuovere la transizione dallo stato meno energetico a quello più energetico è necessario fornire la corretta quantità di energia (ΔE) richiesta per l'eccitazione degli spin nucleari mediante irradiazione con un'onda elettromagnetica. In termini di frequenza (ν), la radiazione incidente deve essere caratterizzata da una ben precisa ν definita frequenza di Larmor o di risonanza (equazione 3.19):

$$\nu = \frac{\mu B_0}{h I} \quad (3.19)$$

Nell'equazione:

- μ è il momento magnetico nucleare, corrispondente al modulo del campo magnetico generato dai nuclei in seguito al loro moto rotatorio, che si oppone a B_0 . È direttamente proporzionale alla costante giromagnetica γ , che è specifica per ogni nucleo (equazione 3.20);

$$\mu = \frac{\gamma I h}{2 \pi} \quad (3.20)$$

- h è la costante di Planck, che vale $6.62618 \cdot 10^{-34}$ J·s;

L'energia necessaria per l'eccitazione degli spin nucleari, però, è anche influenzata dall'intorno chimico di ogni nucleo: dipende infatti dalla posizione specifica del nucleo nella struttura molecolare e dal solvente, visto che la maggior parte delle volte il campione si trova in soluzione. Ciò è dato dal fatto che i moti elettronici producono una schermatura attorno ai nuclei, che quindi risentono di un campo magnetico locale (B_{loc}) minore di B_0 . Maggiore è la densità elettronica, maggiore è il modulo del campo magnetico indotto dalla rotazione degli elettroni, e minore è la frequenza richiesta per la transizione. In termini matematici, per valutare la schermatura dei nuclei si fa riferimento all'equazione 3.21:

$$B_{loc} = B_0(1 - \sigma) \quad (3.21)$$

in cui B_{loc} è il modulo del campo magnetico effettivamente percepito dal nucleo in esame, mentre il termine σ è detto costante di schermo ed è adimensionale.

L'esperimento NMR viene condotto irraggiando il campione con un intervallo di frequenze tale da promuovere le transizioni di spin di tutti i nuclei, che risuonano a frequenze diverse a seconda del loro intorno chimico. Una volta assorbita la radiazione, i nuclei eccitati tornano allo stato fondamentale emettendo parte di questa radiazione, in un processo definito rilassamento.

I moderni strumenti NMR nella maggior parte dei casi lavorano in modalità impulsata: le frequenze vengono generate e indirizzate sul campione come impulsi. Questi vengono di solito ripetuti varie volte (ad intervalli di tempo scelti in base al tempo di rilassamento dei nuclei), così da registrare un elevato numero di spettri, che sommati restituiscono uno spettro NMR dell'analita in esame caratterizzato da un migliore rapporto segnale/rumore. Lo spettro NMR riporta l'intensità dei segnali associati ai diversi nuclei in funzione della frequenza di risonanza.

Poiché la frequenza di Larmor dipende da B_0 , per poter confrontare spettri ottenuti applicando campi magnetici esterni di diversa intensità, si utilizza normalmente una grandezza definita spostamento chimico (*chemical shift*, δ) al posto di ν . Per calcolare il *chemical shift* (definito dall'equazione 3.22), la frequenza di Larmor di ogni nucleo viene riferita a quella di un nucleo di riferimento. Nel caso dell'NMR del protone ($^1\text{H-NMR}$), il riferimento scelto per convenzione è il tetrametilsilano (TMS), i cui dodici protoni sono equivalenti e risuonano a campi più alti rispetto ai protoni di quasi tutte le molecole organiche. Il *chemical shift* è espresso in parti per milione (ppm) e quello dei protoni del TMS per definizione vale 0 ppm.

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{TMS}}}{\nu_{\text{TMS}}} 10^6 \quad (3.22)$$

Dal punto di vista analitico, la spettroscopia NMR è utile nello studio degli equilibri di complessamento poiché i segnali dei nuclei NMR-attivi del legante subiscono una variazione di *chemical shift* in seguito alla formazione del complesso metallico, sia perché influenzati dall'intorno chimico generato dal centro metallico, sia perché questo può generare un cambio nella conformazione del legante.

Dall'analisi di spettri ottenuti in diverse condizioni sperimentali (diverso pH o diverse concentrazioni di metallo e legante), è possibile ottenere informazioni in merito al numero delle specie presenti in soluzione, alla loro abbondanza relativa e ad informazioni strutturali delle molecole, come la loro flessibilità o rigidità conformazionale. Talvolta, nel caso dei complessi, è anche possibile individuare quali atomi del legante sono coinvolti nella coordinazione al centro metallico. [58], [59], [60], [61]

3.3.1.1 Tecniche monodimensionali ^1H -NMR e ^{31}P -NMR

Tra le varie tecniche NMR monodimensionali, la più semplice ed utilizzata è quella protonica (^1H -NMR), in cui si osservano i protoni del campione. ^1H è l'isotopo più abbondante dell'idrogeno ed è caratterizzato da un rapporto giromagnetico relativamente alto: queste due proprietà del nucleo ^1H permettono alla tecnica di essere piuttosto sensibile.

Nel presente lavoro di tesi, oltre alla spettroscopia ^1H -NMR, sono stati acquisiti vari spettri utilizzando la tecnica monodimensionale ^{31}P -NMR, poiché uno dei chelanti studiato per il complessamento dello ione metallico Ba^{2+} contiene atomi di fosforo. Anche il ^{31}P è un nucleo con numero di spin pari a $\frac{1}{2}$, dunque valgono le stesse considerazioni viste in precedenza per i nuclei dipolari.

L'esperimento monodimensionale viene condotto in due fasi distinte: preparazione e rivelazione. Inizialmente viene applicato un impulso di frequenza detto "di 90°", cioè in grado di indurre un'orientazione dello spin nucleare (che per convenzione viene rappresentato lungo l'asse z) lungo l'asse y: questa è la fase della preparazione. Una volta terminato l'impulso, viene registrato il segnale prodotto dal rilassamento dei nuclei. Questa è la fase di rivelazione, e il segnale ottenuto è chiamato FID (*free induction decay*). Lo spettro si ottiene calcolando la trasformata di Fourier del FID e permette di valutare gli spostamenti chimici dei nuclei in esame, e di conseguenza di risalire al loro intorno chimico. Anche la molteplicità (o struttura fine) dei segnali dà informazioni sull'intorno chimico dei vari nuclei; inoltre, integrando i picchi è possibile determinare il numero relativo di nuclei protonici che hanno contribuito alla generazione di ogni segnale. Studi di NMR monodimensionale condotti in acqua al variare del pH consentono di individuare cambiamenti nei valori di *chemical shift* per i diversi nuclei in funzione del pH. L'elaborazione di questi dati permette di ottenere le K_a degli equilibri acido-base e le costanti di formazione (β) dei complessi metallici presenti in soluzione. [59], [60], [62]

3.3.1.2 Tecniche bidimensionali

Lo spettro risultante dall'esperimento NMR bidimensionale (o di correlazione, 2D-NMR) è caratterizzato da due assi, in cui sono riportati i valori di *chemical shift*: questi possono essere riferiti allo stesso nucleo (correlazione omonucleare, che nella maggior parte dei casi è tra protoni, ^1H - ^1H), oppure a nuclei differenti (correlazione eteronucleare). Nel primo caso gli spettri presentano dei picchi diagonali, corrispondenti alla proiezione dello spettro monodimensionale del nucleo in esame, che invece non esistono negli spettri di correlazione eteronucleare. In entrambi i casi, i picchi fuori dalla diagonale (picchi di correlazione o *cross-peaks*) indicano interazione tra nuclei diversi. [63]

La tecnica 2D-NMR omonucleare più semplice è detta COSY (*CO*rrelation *SP*ectroscopy) in cui in entrambe le dimensioni sono rappresentati i *chemical shift* di protoni. I *cross-peaks* nello spettro risultante evidenziano i nuclei accoppiati scalarmente tra loro fino ad un massimo di circa tre legami chimici di distanza.

Un secondo esperimento 2D-NMR omonucleare è il TOCSY (*TO*tal *CO*rrelation *SP*ectroscopy), che si differenzia dal COSY perché permette di vedere accoppiamenti tra protoni distanziati da più di tre legami chimici (fino a 5-6). [63], [64]

3.3.2 Software MATLAB per l'elaborazione dei dati NMR

L'ottimizzazione dei dati sperimentali ottenuti dall'analisi NMR monodimensionale è stata eseguita tramite MATLAB, un programma di calcolo che fornisce lo strumento *Curve Fitter*, ideato per eseguire *fitting* di punti sperimentali. Grazie a ciò è possibile ottenere i valori delle costanti degli equilibri acido-base e della formazione di complessi metallo-legante, e i rispettivi errori associati alla procedura di *fitting* stessa. Il *fitting* si basa sul confronto tra i valori degli spostamenti chimici o delle intensità dei segnali ottenuti sperimentalmente e i valori teorici calcolati dall'algoritmo per ogni punto sperimentale, che vengono ottimizzati in modo iterativo per minimizzare gli scarti tra i due valori. *Curve Fitter* è in grado di costruire un grafico costituito dai punti sperimentali importati come vettori colonna sul *workspace* (*chemical shift* dei segnali in funzione del pH), per poi eseguire l'ottimizzazione.

Come per PITMAP (**Paragrafo 3.1.3.1**) e per *HypSpec* (**paragrafo 3.2.2**), anche per l'elaborazione con MATLAB è necessario ipotizzare un modello di speciazione, scelto in seguito alla valutazione degli spettri NMR ottenuti o da studi presenti già in letteratura. Per permettere al software di eseguire una elaborazione accurata, è fondamentale inserire degli *input* ragionevoli per i parametri dell'equazione di *fitting* (**Tabella 3.2**).

Tabella 3.2 Parametri di MATLAB che vengono ottimizzati nell'analisi dei dati sperimentali NMR. Si considera il caso semplice della formazione di un unico complesso di stechiometria 1:1 (ML).

Parametri richiesti	
<i>a, b, c, etc.</i>	<i>Chemical shift</i> delle specie presenti in soluzione dalla più protonata (H_nL) a quella meno protonata (L^{n-})
<i>h, k, q, etc.</i>	Costanti di acidità del legante
<i>b</i>	Costante di formazione del complesso
<i>p</i>	Costante di proporzionalità tra le intensità del segnale NMR e $[ML]$

Gli indici di bontà di adattamento restituiti da MATLAB permettono di valutare il *fitting* mediante una misura della differenza tra i dati sperimentali e i dati teorici stimati con il modello matematico scelto. Alcuni dei più significativi sono il coefficiente di determinazione (R^2) e la somma dei quadrati degli errori (Sum Squared Error, SSE). R^2 misura la proporzione di varianza totale dei valori y (*chemical shift* dei nuclei) rispetto alla loro media per modelli di regressione lineare; pertanto, può assumere valori compresi tra 0 e 1. Se $R^2 \sim 1$, la precisione dei valori di y teorici calcolati a partire dai valori delle variabili indipendenti x (pH) è elevata. Per modelli non lineari è utilizzato l'*adjusted-R²*, che include un fattore correttivo che dipende dal numero di coefficienti variabili usati nell'equazione. [65] SSE, invece, misura la deviazione totale dei dati sperimentali dai dati ottenuti dal *fitting*. Valori prossimi a 0 indicano che il modello elaborato ha una componente di errore casuale minima e che, dunque, i risultati previsti e ottenuti dal *fitting* sono accurati.

CAPITOLO 4 – PARTE SPERIMENTALE

4.1 STRUMENTAZIONE

- Sistema Veolia Purelab Chorus (acqua ultrapura)
- Titolatore automatico Metrohm 765 Dosimat, dotato di cella di capacità 10 mL (con mantello termostato a doppia parete) e burette da 5 mL
- Termostato ad acqua Falc SB 5, con controllo di temperatura FA 90
- Sistema di erogazione e pre-saturazione dell'azoto, costituito da due gorgogliatori in serie contenenti il primo NaOH 0.05 M e il secondo H₂SO₄ 0.05 M
- Elettrodo di vetro combinato Hamilton pH 0-14
- pH-metro Metrohm 713
- pH metro Mettler Toledo SevenEasy
- Elettrodo di vetro combinato Crison pH 0-14
- 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
- Idrossido di sodio, NaOH, EMSURE, titolo 99-100%
- Acido perclorico, HClO₄, Sigma-Aldrich, 70%
- Acido cloridrico, HCl, Sigma-Aldrich, 37%
- Cloruro di sodio, NaCl, Sigma-Aldrich, ≥ 99.0%
- Idrossido di tetrametilammonio, C₄H₁₃NO, Sigma-Aldrich, ≥ 97%
- Acqua deuterata, D₂O, 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
- Acido picolinico, C₆H₅NO₂, Sigma-Aldrich, 99%
- 1,2-HOPO, C₅H₅NO₂, Sigma-Aldrich, ≥ 98%
- 2,3-HOPO, C₅H₅NO₂, Sigma-Aldrich, 98%
- Acido malonico, C₃H₄O₄, Sigma-Aldrich, 99%
- Catecolo, C₆H₆O₂, Sigma-Aldrich, ≥ 99.0%
- Acido salicilico, C₇H₆O₃, Prolabo, titolo 99.8%

- Perclorato di bario, Ba(ClO₄)₂, EMSURE
- Cloruro di bario diidrato, BaCl₂·2H₂O, JANSSEN, titolo 99%
- Kryptofix 22, C₁₂H₂₆N₂O₄, Sigma-Aldrich, ≥ 99.0%
- macrophospho, prodotto di sintesi¹³
- oddm, prodotto di sintesi¹⁴

4.3 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI

Le concentrazioni delle soluzioni utilizzate in questo lavoro di tesi sono espresse in molarità (M = mol/L). Se non diversamente specificato, il solvente di impiego per la preparazione delle soluzioni è l'acqua ultrapura. Tutte le soluzioni sono state preparate in matracci tarati in vetro e, quando non in uso, sono state conservate in frigorifero (+ 4 °C).

4.3.1 Preparazione delle soluzioni dei leganti

Leganti bidentati. Le soluzioni dei leganti bidentati sono state preparate per pesata diretta dei prodotti commerciali con bilancia analitica e successiva solubilizzazione in acqua ultrapura, senza il controllo della forza ionica. Il titolo per ciascuna soluzione, calcolato in base alla pesata, è riportato in **Tabella 4.1**.

Macro cicli. Le soluzioni dei macrocicli studiati in questo lavoro sono state preparate per pesata diretta dei prodotti di sintesi con bilancia analitica e successiva solubilizzazione in acqua ultrapura con NaCl 0.15 M.

Il macrophospho è stato sintetizzato in forma cloridrata, quindi le sue soluzioni acquose sono acide. L'oddm, invece, è stato sintetizzato come sale di Na⁺ che, sciolto in soluzione acquosa, le conferisce un pH basico. Alla soluzione di oddm è stata aggiunta una opportuna quantità di HCl 0.10 M ($I = \text{NaCl } 0.15 \text{ M}$) (6 equivalenti rispetto alla concentrazione di legante) per impedirne la carbonatazione, che sarebbe favorita in ambiente basico. Il titolo per ciascuna soluzione, calcolato in base alla pesata, è riportato in **Tabella 4.1**.

^{13/14} I macrocicli sono stati sintetizzati in collaborazione con il gruppo del prof. Fabrizio Mancin presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Padova.

Tabella 4.1 Concentrazioni delle soluzioni di leganti preparate. Le soluzioni sono numerate in ordine temporale di preparazione.

N° soluzione	Legante	Concentrazione (M)
L1	Acido picolinico	0.1886
L2	1,2-HOPO	0.0469
L3	2,3-HOPO	0.0191
L4	Acido malonico	0.0818
L5	Catecolo	0.1183
L6	Acido salicilico	0.0100
L7	Acido picolinico	0.9095
L8	1,2-HOPO	0.0530
L9	2,3-HOPO	0.0228
L10	Acido malonico	0.0815
L11	Acido malonico	0.0816
L12	Acido malonico	0.0894
L13	2,3-HOPO	0.0099
L14	macrophospho	0.0019
L15	oddm	0.0021

4.3.2 Preparazione delle soluzioni di Ba²⁺

Le soluzioni contenenti Ba²⁺ sono state preparate per pesata diretta di Ba(ClO₄)₂ o BaCl₂·2H₂O con bilancia analitica e successiva dissoluzione in acqua ultrapura a forza ionica non controllata (per Ba(ClO₄)₂) oppure in soluzione acquosa di NaCl 0.15 M (per BaCl₂). Il titolo per ciascuna soluzione, calcolato in base alla pesata, è riportato in **Tabella 4.2**.

Tabella 4.2 Concentrazioni delle soluzioni di Ba(ClO₄)₂ e BaCl₂·2H₂O preparate. Le soluzioni sono numerate in ordine temporale di preparazione.

N° soluzione	Sale di bario	Concentrazione (M)
M1	Ba(ClO ₄) ₂	1.0171
M2	Ba(ClO ₄) ₂	0.9950
M3	Ba(ClO ₄) ₂	1.0792
M4	Ba(ClO ₄) ₂	1.0093
M5	Ba(ClO ₄) ₂	1.0019
M6	BaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0100

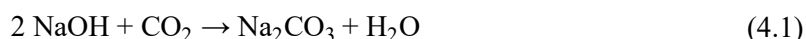
4.3.3 Soluzioni per le misure potenziometriche

Le soluzioni utilizzate per le analisi potenziometriche sono state ottenute mediante pesata diretta dei reagenti e del solvente, o in alternativa diluendo le soluzioni degli analiti precedentemente preparate (**Paragrafo 4.3.1 e 4.3.2**) e portando poi a volume nella cella di misura con una quantità opportuna di soluzione acquosa di NaCl 0.15 M. Quest'ultima è stata usata per mantenere costante la forza ionica della soluzione.

4.3.3.1 Soluzioni di NaOH

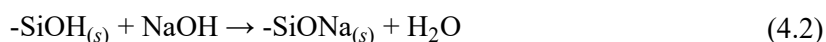
Le soluzioni di NaOH sono state utilizzate come titolante nelle titolazioni potenziometriche eseguite in questo lavoro di tesi.

Le soluzioni basiche a contatto con l'anidride carbonica CO₂ presente nell'atmosfera subiscono il fenomeno della carbonatazione (descritto dall'equazione 4.1 nel caso dell'NaOH), reazione irreversibile che causa la diminuzione del titolo di NaOH nel tempo. La formazione *in situ* di una miscela di base forte (NaOH) e una base debole diprotica (Na₂CO₃) prodotta dalla carbonatazione complicherebbe la trattazione degli equilibri acido-base, rendendo di fatto NaOH inutilizzabile come titolante.



Per minimizzare il rischio di carbonatazione sono state attuate delle misure preventive nella preparazione delle soluzioni. Innanzitutto, per eliminare le tracce di CO₂ disciolte nel solvente, l'acqua ultrapura è stata portata ad ebollizione e mantenuta alla temperatura di 100°C per circa 15 minuti. Successivamente, i pellet di NaOH pesati sono stati lavati con la stessa acqua ultrapura bollita e riportata a temperatura ambiente in ambiente protetto, così da eliminare il carbonato formatosi sulla superficie esterna. Una volta solubilizzati i pellet di NaOH nel solvente, è stata aggiunta una quantità opportuna di NaCl per rendere la concentrazione salina pari a 0.15 M.

La soluzione di base così preparata è stata conservata in un contenitore di polietilene reso impermeabile alla CO₂ mediante rivestimento con fogli di alluminio fissati con nastro isolante. L'uso del polietilene, al posto del vetro, mira ad evitare che i gruppi silanolicci del vetro reagiscano con NaOH causandone una diminuzione del titolo (equazione 4.2).



Infine, a livello dell'imboccatura del recipiente è stata inserita una siringa impaccata con calce sodata, composta da Ca(OH)₂ per circa il 75%, H₂O per circa il 20%, NaOH per circa il 3% e KOH per circa il 2%.

Tuttavia, la carbonatazione non è completamente evitabile e può lentamente avere luogo anche a seguito di questi numerosi accorgimenti. L'esperienza suggerisce di utilizzare la soluzione di NaOH come titolante al massimo per circa un mese.

Le soluzioni di base utilizzate in questo lavoro di tesi sono caratterizzate da una concentrazione nominale di NaOH 0.10 M ($I = \text{NaCl}$ 0.15 M); il titolo esatto è stato determinato mediante una serie di titolazioni potenziometriche eseguite con una soluzione di HCl 0.10 M, precedentemente standardizzata.

4.3.4 Soluzioni per la spettroscopia UV-Visibile

Le soluzioni per la spettroscopia UV-Visibile (per i leganti analizzati mediante questa tecnica) sono state preparate analogamente a quanto riportato nei **Paragrafi 4.3.1 e 4.3.2**, con solvente acquoso senza controllo della forza ionica.

La variazione di pH delle soluzioni è stata eseguita mediante piccole aggiunte di una base forte (NaOH) e/o di un acido forte (HClO_4) a concentrazione tale (1 M o 0.10 M) da evitare di diluire le soluzioni in seguito alla regolazione del pH. La misura del pH è stata condotta mediante elettrodo di vetro combinato calibrato con soluzioni tampone commerciali a pH 4.01 e 7.00.

4.3.5 Soluzioni per la spettroscopia NMR

Le soluzioni per le misure NMR sono state preparate diluendo le soluzioni precedentemente preparate (**Paragrafo 4.3.1 e 4.3.2**) con un solvente costituito da una miscela di acqua ultrapura e D_2O in rapporto 90:10 in volume. È stata aggiunta a tutte le soluzioni anche una piccola quantità di TSP che funge da riferimento interno per la calibrazione degli spettri.

La regolazione del pH è stata eseguita mediante aggiunte di NaOH e/o HCl, entrambi 1 M o 0.10 M, senza produrre diluizioni nella soluzione contenente metallo e legante. La misura del pH è stata condotta come descritto per le misure di spettroscopia UV-Visibile. In alcune condizioni il pH è stato regolato mediante piccole aggiunte di idrossido di tetrametilammonio come sostituto di NaOH.

4.4 PROCEDURE SPERIMENTALI

4.4.1 Procedure sperimentali per le titolazioni potenziometriche

4.4.1.1 Apparato strumentale

Le titolazioni potenziometriche sono state condotte mediante l'utilizzo di un titolatore automatico costituito da una buretta intercambiabile, un potenziometro e un sensore di temperatura (Figura 4.1). L'apparato strumentale è gestito esternamente da un computer.

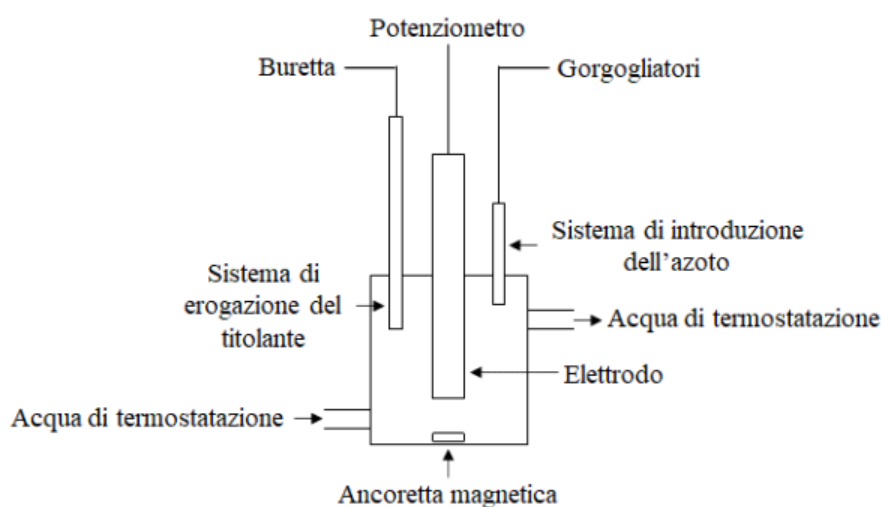
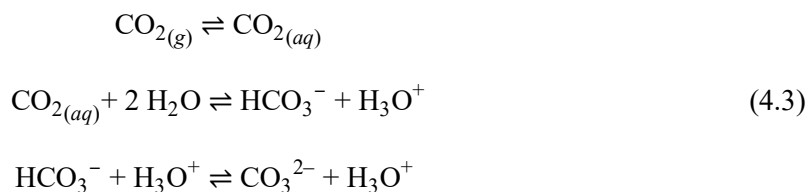


Figura 4.1 Rappresentazione dell'apparato strumentale utilizzato per le titolazioni potenziometriche. [36]

Il sistema di misura è stato mantenuto all'interno di una gabbia di Faraday e al riparo dalla luce, per evitare disturbi elettromagnetici provenienti dall'ambiente esterno e per ridurre il rischio di deriva degli elettrodi di vetro e di riferimento dovuta alla luce solare (Paragrafo 3.1.4).

Durante le titolazioni, la cella di misura è stata mantenuta ad una temperatura costante (25 ± 0.2 °C) con un termostato ad acqua, e la soluzione è stata mescolata mediante un agitatore magnetico impostato ad una velocità di agitazione circa costante per tutti gli esperimenti condotti. Inoltre, utilizzando NaOH come titolante, è stato necessario mantenere la cella in atmosfera inerte di azoto (purificato e presaturato da gorgogliatori posti a monte dell'apparato strumentale) per minimizzare la presenza di CO₂ nell'ambiente di misura, per ridurre il rischio di carbonatazione (Paragrafo 4.3.3.1), cioè per evitare la deriva del pH e della f.e.m. a causa della liberazione di ioni H₃O⁺ dovuta alla solubilizzazione dell'anidride carbonica (favorita in ambiente neutro e basico) (equazione 4.3).



Il controllo delle aggiunte di titolante alla soluzione in esame e la registrazione del potenziale avvengono automaticamente. Questo consente sia di ridurre i tempi di registrazione dei dati sperimentali, sia di minimizzare i potenziali errori casuali che potrebbero incorrere eseguendo manualmente gli esperimenti.

Per gestire il titolatore automatico è stato utilizzato il programma *Automat1*, che permette di impostare i seguenti parametri:

- V_{\min} (mL): volume minimo di titolante aggiunto;
- V_{\max} (mL): volume massimo di titolante aggiunto;
- V_{fin} (mL): volume totale di titolante aggiunto, oltre il quale la titolazione viene arrestata;
- t_{\min} (s): tempo minimo di attesa tra aggiunte successive;
- t_{\max} (s): tempo massimo di attesa tra aggiunte successive;
- E_{fin} (mV): valore di potenziale in corrispondenza del quale la titolazione viene arrestata;
- E_{att} (mV): variazione di potenziale attesa dopo l'aggiunta di titolante. Il volume di ogni singola aggiunta (compreso tra V_{\min} e V_{\max}) viene calcolato dal programma in base alla variazione di f.e.m. indotta dall'aggiunta precedente. E_{att} è stato posto pari a 5.00 mV in tutte le titolazioni eseguite in questo lavoro di tesi;
- d (mV/min): deriva massima ammessa del potenziale affinché possa essere eseguita l'aggiunta successiva. Questa viene comunque eseguita qualora il tempo di attesa superi t_{\max} , ma in tal caso il programma indicherebbe il valore precedente come punto di non equilibrio. Questo parametro è stato fissato pari a 0.10 mV/min in tutte le titolazioni.

Il programma restituisce in un file i punti sperimentali registrati come valori di potenziale in funzione del volume di titolante aggiunto, e per ciascuno di essi viene indicato se il potenziale misurato è stabile (deriva $< d$) oppure no.

4.4.1.2 Sequenza delle titolazioni potenziometriche

Per lo studio degli equilibri di complessamento delle miscele metallo-legante è stato necessario operare per fasi successive. Innanzitutto, l'elettrodo di vetro è stato calibrato con una soluzione precedentemente standardizzata di HCl 0.10 M ($I = \text{NaCl}$ 0.15 M) (**Paragrafo 4.4.1.3**), utilizzata successivamente anche per determinare il titolo esatto delle soluzioni di titolante (NaOH).

Una volta standardizzate le soluzioni di NaOH e HCl, sono state eseguite le titolazioni potenziometriche delle soluzioni dei leganti, con lo scopo di determinarne le costanti di acidità (o

costanti di dissociazione acida, pK_a). Successivamente, la soluzione di titolante NaOH è stata utilizzata per titolare le miscele Ba^{2+} -legante, al fine di determinare le costanti di formazione dei complessi presenti in soluzione.

Gli esperimenti sono stati condotti in una cella di misura con volumi iniziali pari sempre a circa 3 mL per garantire la completa immersione della parte sensibile dell'elettrodo di misura.

Le titolazioni potenziometriche sono state eseguite per i seguenti sistemi: Ba^{2+} -2,3-HOPO, Ba^{2+} -Acido malonico, Ba^{2+} -Catecolo, Ba^{2+} -Acido salicilico, Ba^{2+} -macrophospho, Ba^{2+} -oddm (oltre che per i rispettivi leganti senza l'aggiunta di Ba^{2+}).

4.4.1.3 Calibrazione dell'elettrodo di vetro

La calibrazione dell'elettrodo di vetro è stata eseguita mediante sei aggiunte di volumi noti e costanti di HCl, precedentemente standardizzato, ad un volume pari a 3 mL di acqua ultrapura con NaCl 0.15 M. I parametri impostati nel programma sono riportati in **Tabella 4.3**.

La calibrazione è stata effettuata prima di ogni titolazione delle basi (NaOH) preparate, per ottenere il parametro ottimizzato E^0 . È stata invece omessa prima delle titolazioni sia delle soluzioni dei leganti sia delle miscele metallo-legante, in quanto in questi casi il parametro E^0 è stato ottimizzato durante l'elaborazione dei dati.

4.4.1.4 Standardizzazione delle soluzioni di NaOH

Per determinare il titolo esatto delle soluzioni di NaOH, è stata eseguita una titolazione della soluzione ottenuta in seguito alla procedura di calibrazione utilizzando NaOH come titolante (la procedura è stata ripetuta una decina di volte per ogni nuova soluzione di NaOH). I parametri impostati nel programma sono riportati in **Tabella 4.3**. Per il calcolo della concentrazione di NaOH è stato impiegato inizialmente il metodo di Gran e successivamente, per ottenere un valore più accurato, si è proseguito mediante elaborazione dei dati sperimentali con PITMAP.

Tabella 4.3 Valori dei parametri impostati per le calibrazioni dell'elettrodo e per le standardizzazioni delle soluzioni di base NaOH.

Parametro	Valore impostato	
	Calibrazione	Standardizzazione NaOH
V_{\min} (mL)	0.10	0.02
V_{\max} (mL)	0.10	0.20
V_{fin} (mL)	0.60	5.00
t_{\min} (s)	40.0	40.0
t_{\max} (s)	80.0	80.0
E_{fin} (mV)	Valore arbitrario elevato	-280.0

4.4.1.5 Titolazioni delle soluzioni di leganti

Le soluzioni per le titolazioni potenziometriche dei leganti sono state preparate secondo quanto riportato nei **paragrafi 4.3.1 e 4.3.3**. Ad un opportuno volume di soluzione iniziale di legante è stato aggiunto un volume di acqua ultrapura con forza ionica controllata, affinché il volume totale risultasse 3 mL e la concentrazione compresa in un intervallo di 0.001-0.02 M; a questa soluzione è stato poi aggiunto HCl 0.10 M ($I = \text{NaCl } 0.15 \text{ M}$) per ottenere un pH di partenza di circa 2. Le titolazioni sono state arrestate automaticamente dallo strumento a $\text{pH} \sim 12$, o in alternativa arrestate manualmente quando si osservava la presenza di un precipitato in soluzione. I parametri impostati nel programma per i leganti bidentati e per i macrocicli studiati sono riportati in **Tabella 4.4**.

Tabella 4.4 Valori dei parametri impostati per le titolazioni potenziometriche dei leganti.

Parametri	Valore impostato
V_{\min} (mL)	0.01
V_{\max} (mL)	0.20
V_{fin} (mL)	5.00
t_{\min} (s)	40.0
t_{\max} (s)	80.0
E_{fin} (mV)	-280.0

4.4.1.6 Titolazioni delle miscele Ba^{2+} -legante

Le miscele Ba^{2+} -legante titolate sono state preparate a partire dalla soluzione iniziale di legante (**Paragrafo 4.3.1 e 4.3.3**) a cui sono stati aggiunti un volume di acqua ultrapura a forza ionica controllata, tale da raggiungere un volume complessivo di 3 mL, e un volume di HCl per raggiungere un pH di circa 2. La soluzione di metallo, preparata come riportato nel **paragrafo 4.3.2**, è stata aggiunta per ultima in modo tale da ottenere in cella una concentrazione opportuna, compresa nell'intervallo 0.001-0.05 M. Infine, la soluzione così costituita è stata titolata con NaOH. Come per le titolazioni dei soli leganti, anche queste sono state arrestate automaticamente dallo strumento a $\text{pH} \sim 12$, o in alternativa arrestate manualmente quando si osservava la presenza di un precipitato in soluzione. I parametri impostati nel programma sono riportati in **Tabella 4.5**.

Tabella 4.5 Valori dei parametri impostati per le titolazioni potenziometriche delle miscele Ba²⁺-legante.

Parametri	Valori impostati	
	Ba ²⁺ -Legante bidentato	Ba ²⁺ -Macrocielo
V_{\min} (mL)	0.01	0.01
V_{\max} (mL)	0.20	0.20
V_{fin} (mL)	5.00	5.00
t_{\min} (s)	80	90
t_{\max} (s)	160	180
E_{fin} (mV)	-280.0	-280.0

4.4.1.7 Conservazione dell'elettrodo

Prima e dopo ogni titolazione, l'elettrodo di vetro è stato lavato con acqua ultrapura e asciugato delicatamente (senza strofinarlo) con della carta assorbente. Nel caso di utilizzo di ioni metallici o di comparsa di precipitati il lavaggio è stato eseguito anche con acido nitrico circa 0.1 M. Quando non utilizzato, l'elettrodo è stato conservato in una soluzione di ftalato acido di potassio circa 0.15 M.

4.4.2 Procedure sperimentali per la spettroscopia UV-Visibile

Le misure spettrofotometriche sono state eseguite per i soli leganti acido picolinico e 1,2-HOPO, e per i rispettivi complessi con Ba²⁺, utilizzando uno spettrometro UV-Vis Cary 60 e una coppia di cuvette in quarzo con cammino ottico pari a 1 cm nell'intervallo spettrale 200-800 nm.

Ogni lettura della soluzione in esame è stata preceduta dall'acquisizione di uno spettro della soluzione di bianco, costituito da acqua ultrapura. Al termine dell'acquisizione di ogni spettro la cuvetta è stata lavata con acqua ultrapura.

L'apparato strumentale per l'analisi UV-Vis delle soluzioni è gestito da un computer nel quale è possibile osservare l'acquisizione in tempo reale dello spettro; in esso è installato il programma *Cary WinUV* che permette di esportare un file excel, in cui sono riportati i valori di assorbanza in funzione della lunghezza d'onda. Dal file è possibile ricostruire lo spettro di assorbimento del campione in esame, e lo stesso file può essere importato per l'elaborazione su *HypSpec*.

Le soluzioni dei leganti sono state preparate secondo quanto riportato nei **paragrafi 4.3.1 e 4.3.4** e analizzate mediante spettroscopia UV-Visibile. In particolare, sono stati acquisiti degli spettri al variare del pH nell'intervallo 2-12 ogni ~ 0.5 unità di pH.

Le concentrazioni dei leganti utilizzate sono pari a $4 \cdot 10^{-4}$ M per l'acido picolinico e $6 \cdot 10^{-5}$ M per l'1,2-HOPO.

Le soluzioni di miscele Ba²⁺-legante sono state preparate secondo quanto riportato nei **paragrafi 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.4**. La soluzione di metallo è stata aggiunta in volume tale da rendere la

concentrazione di Ba^{2+} pari a 0.4 M nella soluzione contenente l'acido picolinico e pari a 0.006 M nella soluzione contenente l'1,2-HOPO.

Analogamente a quanto eseguito per le soluzioni dei leganti, anche per le miscele Ba^{2+} -legante è stata acquisita una serie di spettri al variare del pH (ogni ~ 0.5 unità di pH) con le stesse modalità descritte in precedenza.

4.4.3 Procedure sperimentali per la spettroscopia NMR

In questo lavoro di tesi sono stati acquisiti gli spettri ^1H -NMR e alcuni spettri bidimensionali TOCSY di soluzioni contenenti un legante oppure una miscela Ba^{2+} -legante, a diversi valori di pH e diversi valori di temperatura, preparate secondo quanto riportato nei **paragrafi 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.5**.

L'acquisizione degli spettri è stata eseguita con il programma Topspin 3.5; i *chemical shift* (δ) dei segnali sono riportati in parti per milione (ppm) e riferiti allo standard interno TSP ($\delta = 0$ ppm), mentre la soppressione del segnale dell'acqua è stata effettuata mediante l'*excitation sculpting pulse scheme*. Gli spettri ^{31}P sono calibrati, invece, con una soluzione di acido fosforico all'85% in acqua, il cui *chemical shift* è pari a zero. Le analisi NMR, sia per le soluzioni di leganti sia per sistemi Ba^{2+} -legante, sono state effettuate acquisendo spettri a valori di pH compresi tra 2 e 12, ogni ~ 0.5 unità di pH.

Le misure NMR sono state effettuate per i sistemi Ba^{2+} -macrophospho e Ba^{2+} -oddm in rapporto stechiometrico 1:1 e con concentrazioni pari a 0.001 M.

CAPITOLO 5 – RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 COSTANTI DI ACIDITÀ DEI LEGANTI BIDENTATI

La caratterizzazione dei leganti, con lo scopo di determinarne le costanti di dissociazione acida (pK_a), è propedeutica allo studio degli equilibri di complessamento dei sistemi metallo-legante. Questo vale quando i leganti presentano proprietà basiche di Brønsted e di Lewis, cioè se nella loro struttura presentano protoni che competono con gli ioni metallici nel complessamento. In questo lavoro di tesi le proprietà acido-base dei leganti, sia bidentati che macrocicli, sono state indagate mediante diverse tecniche, tra cui la potenziometria, la spettrofotometria UV-Vis e la spettroscopia NMR.

5.1.1 Potenziometria

5.1.1.1 Calibrazione dell'elettrodo di vetro

Nella calibrazione dell'elettrodo di vetro il potenziale può essere influenzato da vari fattori, tra cui la costante E^0 , la pendenza di Nernst (S), il potenziale di giunzione (E_j) ed eventuali impurezze acide o basiche (imp). Tra questi, il potenziale di giunzione E_j non è considerato una variabile significativa poiché risulta trascurabile nelle condizioni di lavoro adottate; il parametro S è mantenuto costante e pari al valore teorico $\frac{RT}{nF} \ln 10$, calcolato alla temperatura sperimentale di lavoro (espressa in K). [36] Pertanto, il programma PITMAP ottimizza solo i valori di E^0 e delle impurezze acide o basiche presenti in soluzione.

La calibrazione dell'elettrodo può essere condotta attraverso misure dedicate, o eseguita contestualmente durante le titolazioni di interesse. Nel nostro caso si è seguita prevalentemente la seconda strada. In generale, nelle calibrazioni eseguite in questo lavoro di tesi il parametro E^0 è risultato sempre compreso nell'intervallo di 410-420 mV, mentre imp nell'ordine delle μmol (di acido o di base).

5.1.1.2 Standardizzazione delle soluzioni di NaOH

La standardizzazione della base (**Paragrafo 4.4.1.4**) è stata eseguita titolando una soluzione di HCl a titolo noto (0.0931 M).

Il titolo della soluzione di NaOH è stato inizialmente determinato applicando il metodo di Gran alla curva di titolazione, da cui è stato possibile ricavare il volume equivalente. Un esempio di curva di titolazione per la standardizzazione di NaOH e l'applicazione del metodo di Gran sono riportati rispettivamente in **Figura 5.1** e in **Figura 5.2**.

Nel seguente lavoro di tesi le concentrazioni delle soluzioni di NaOH preparate sono risultate pari a 0.0992 ± 0.0024 M (soluzione B1) e 0.0933 ± 0.0035 M (soluzione B2).

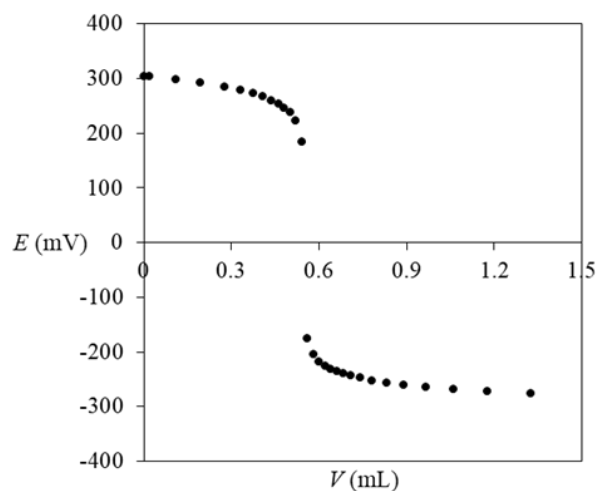


Figura 5.1 Curva di titolazione di una soluzione contenente 3 mL di H₂O, NaCl 0.15 M e 0.6 mL di HCl (0.0931 M) titolata con NaOH (soluzione B1).

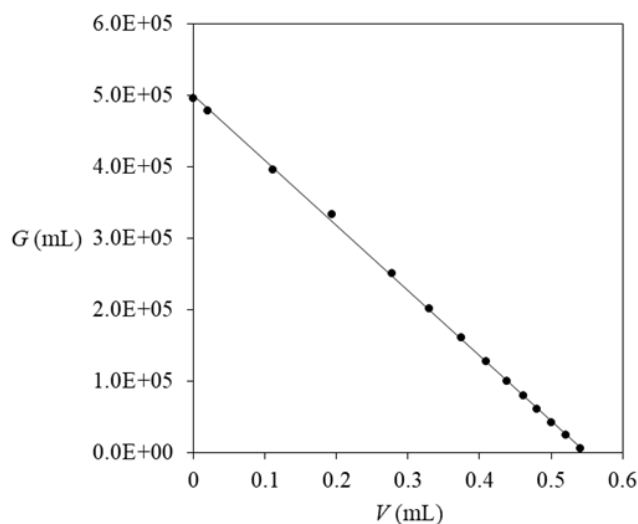


Figura 5.2 Metodo di Gran applicato alla parte acida della curva di titolazione in **Figura 5.1**.

I dati sperimentali ottenuti sono stati poi elaborati mediante il *software* PITMAP per ottimizzare diversi parametri influenti sulla misura del potenziale, quali:

- E^0, imp ;
- C_b : concentrazione della soluzione di NaOH;
- $\alpha, pK_{a1,carb}, pK_{a2,carb}$: rispettivamente indicano il grado di carbonatazione della soluzione di NaOH e le due costanti di dissociazione acida dell'acido carbonico. Il parametro α indica il rapporto tra ioni carbonato e ioni idrossido espresso in percentuale (equazione 5.1):

$$\alpha = \frac{2n_{\text{CO}_3^{2-}}}{n_{\text{OH}^-}} \quad (5.1)$$

Sperimentalmente α è risultato sempre prossimo a zero, indicando la presenza di quantità trascurabili di CO_2 in soluzione. Pertanto, le costanti di dissociazione acida dell'acido carbonico sono irrilevanti, e si è preferito mantenerle fisse a valori pari a quelli riportati in letteratura (rispettivamente 5.86 e 8.95, a temperatura 25°C e forza ionica comparabile alle condizioni di lavoro adottate) [66];

- pK_{Na} : costante di errore alcalino;
- pK_{w} : costante di autoprotolisi dell'acqua.

I parametri ottimizzati sono quindi: E^0 , imp , C_b , α , pK_{Na} , pK_{w} . I valori di ciascun parametro ottenuti dall'elaborazione dei dati sperimentali sono riportati in **Tabella 5.1**. Il parametro S invece è stato mantenuto costante e pari al valore teorico $\frac{RT}{nF} \ln 10$.

Tabella 5.1 Parametri ottenuti per la standardizzazione delle soluzioni di NaOH (B1 e B2), titolate dieci volte ciascuna. L'errore riportato indica l'incertezza sul parametro, e viene fornita dall'algoritmo di *fitting*.

N° soluzione	C_b effettiva	α (%)	pK_{Na}	pK_{w}
B1	0.10292	~ 0	11.3568 ± 0.0047	13.49 ± 0.15
B2	0.09094	~ 0	11.482 ± 0.018	13.5538 ± 0.0025

Dal momento che α , pK_{Na} e pK_{w} influenzano il potenziale registrato dall'elettrodo nello stesso intervallo di pH (neutro e basico), questi tre parametri sono strettamente correlati tra loro; pertanto, essi assumono scarso significato se considerati singolarmente, mentre interpretano correttamente i dati se considerati nel loro insieme.

5.1.1.3 Determinazione delle costanti di acidità dei leganti bidentati

La tecnica potenziometrica è stata utilizzata per la caratterizzazione dei seguenti chelanti: 2,3-HOPO, acido malonico, catecolo e acido salicilico.

Per il sistema contenente il catecolo, a $\text{pH} > 9$ è stata osservata la formazione di un precipitato (intorbidimento della soluzione), probabilmente causata dall'ossidazione del composto in ambiente basico: i dati corrispondenti sono stati scartati.

Le curve di titolazione ottenute per ciascun legante sono riportate in **Figura 5.3**. Per il catecolo (**Figura 5.3, C**) la linea orizzontale tratteggiata è posta in corrispondenza del valore di potenziale (circa pari a 140 mV) a cui è stata osservata la precipitazione; i punti sperimentali registrati a valori di $E < -140$ mV sono stati esclusi dal *fitting*.

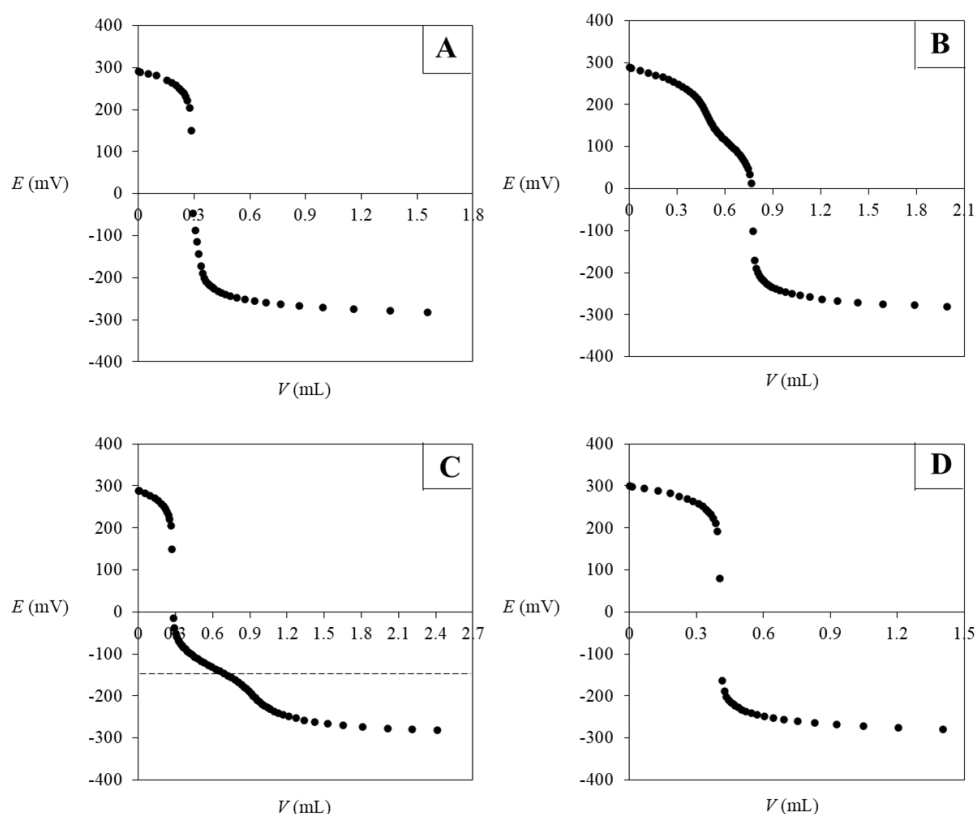


Figura 5.3 Titolazioni potenziometriche con NaOH (B1) di soluzioni contenenti **A**) 2.7 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 0.3 mL di 2,3-HOPO (0.0099 M) e 0.3 mL di HCl (0.0931 M), **B**) 3.0 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 0.00315 g di acido malonico e 0.2 mL di HCl (0.0931 M), **C**) 3.0 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 0.00677 g di catecolo e 0.3 mL di HCl (0.0931 M), **D**) 2.7 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 0.3 mL di acido salicilico (0.0100 M) e 0.4 mL di HCl (0.0931 M).

Il potenziale dell'elettrodo registrato durante la titolazione potenziometrica di un legante dipende dai seguenti parametri:

- E^0 , S , imp , C_b , α , $pK_{a1,carb}$, $pK_{a2,carb}$, pK_{Na} e pK_w (**Paragrafo 5.1.1.1 e 5.1.1.2**);
- C_L : concentrazione della soluzione di legante;
- $pK_{a,L}$: costanti di dissociazione acida, il cui numero dipende dal legante considerato.

I parametri ottimizzati durante l'elaborazione sono stati E^0 , imp , C_L e le $pK_{a,L}$. I parametri non ottimizzati, invece, sono stati mantenuti costanti e pari ai valori ricavati dalla standardizzazione di NaOH. In **Tabella 5.2** sono indicati i valori dei parametri risultanti dall'elaborazione dei dati sperimentali (**Figura 5.3**), per ogni legante analizzato.

Tabella 5.2 Fattori correttivi (%) e pK_a dei leganti ($T = 25^\circ\text{C}$, $I = \text{NaCl } 0.15 \text{ M}$). La forma completamente deprotonata di ogni legante è indicata da “L”. Le cariche sono omesse per semplicità.

	pK_a $\text{H}_2\text{L} \rightleftharpoons \text{HL} + \text{H}$	pK_a $\text{HL} \rightleftharpoons \text{L} + \text{H}$	pK_a da letteratura
2,3-HOPO	–	8.677 ± 0.053	8.59 [67]
Acido malonico	2.6806 ± 0.0032	5.2514 ± 0.0035	2.59, 5.15 [68]
Catecolo	9.169 ± 0.034	n.d.	8.34, 13.66 [69]
Acido salicilico	2.939 ± 0.051	n.d.	2.75, 13.40 [70]

* n.d.: non determinato nelle condizioni sperimentali adottate.

I valori ottimizzati delle costanti di dissociazione acida dei leganti bidentati sopracitati sono in accordo con i dati riportati in letteratura. Le condizioni sperimentali di temperatura sono comparabili tra questo lavoro di tesi e gli studi di letteratura, con differenze nella scelta del sale (e la relativa concentrazione) utilizzato per mantenere la forza ionica costante. Tuttavia, questo non ha influito eccessivamente sul valore delle pK_a trovate. Le $pK_a > 12$ non sono state determinate in questo lavoro perché al di fuori dell'intervallo di pH esplorato ed esplorabile con tecnica potenziometrica: per consentire l'elaborazione dei dati, i loro valori sono stati fissati a quelli riportati in letteratura.

5.1.2 Spettroscopia UV-Visibile

Nel caso delle misure spettrofotometriche non è necessaria alcuna calibrazione o standardizzazione preventiva delle soluzioni di acido e di base, e si è proceduto direttamente all'acquisizione degli spettri UV-Visibile al variare del pH per i vari chelanti indagati.

Gli spettri UV-Vis dell'1,2-HOPO e dell'acido picolinico sono stati acquisiti a valori di pH compresi nell'intervallo 2-12, ogni ~ 0.5 unità di pH, e sono riportati rispettivamente in **Figura 5.4** e in **Figura 5.5**.

Entrambi i leganti presentano un picco massimo di assorbimento: $\lambda_{\text{max}} = 318 \text{ nm}$ per l'1,2-HOPO da valori di $\text{pH} > 10$, $\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$ per acido picolinico. Selezionando opportune lunghezze d'onda (non necessariamente pari a λ_{max}), l'assorbanza può aumentare o diminuire all'aumentare del pH, ma in entrambi i casi la sua variazione è massima in corrispondenza delle pK_a .

Per il sistema contenente l'1,2 HOPO è stato osservato un andamento irregolare dei valori di assorbanza a $\text{pH} > 6.5$: si ipotizza che questo comportamento sia dovuto all'ossidazione della molecola in ambiente basico [72]; i punti sperimentali registrati a valori di $\text{pH} > 6.5$ sono stati esclusi dal *fitting*.

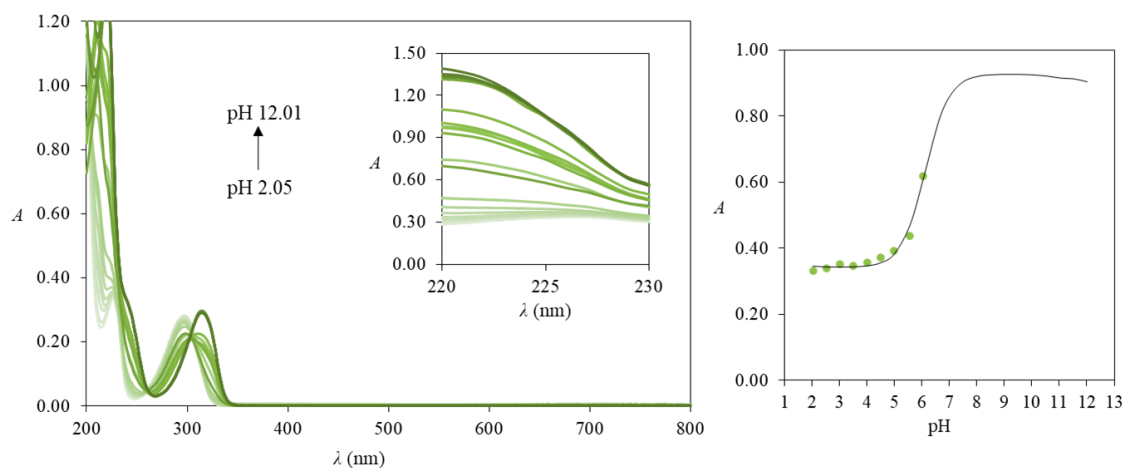


Figura 5.4 Spettri UV-Vis a diversi pH di una soluzione contenente 1,2-HOPO ($6 \cdot 10^{-5}$ M). Il grafico a destra riporta l'andamento dell'assorbanza a 225 nm in funzione del pH e la relativa curva di *fitting*.

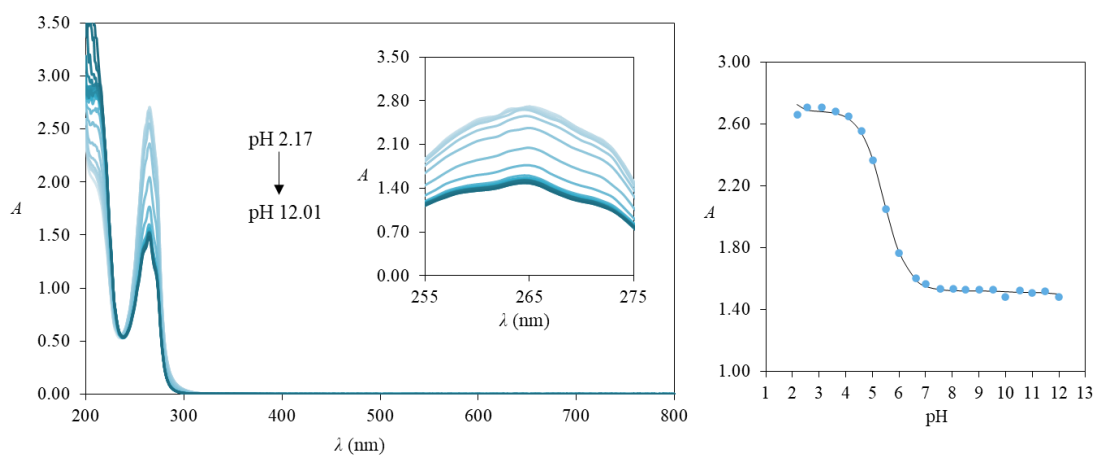


Figura 5.5 Spettri UV-Vis a diversi pH di una soluzione contenente acido picolinico ($4 \cdot 10^{-4}$ M). Il grafico a destra riporta l'andamento dell'assorbanza a 265 nm in funzione del pH e la relativa curva di *fitting*.

In **Tabella 5.3** sono riportati i valori di pK_a ottenuti in seguito all'elaborazione dei dati sperimentali con *HypSpec*.

Tabella 5.3 Valori di pK_a dei leganti ottenuti dall'elaborazione dei dati UV-Vis. La forma completamente deprotonata di ogni legante è indicata da "L". Le cariche sono omesse per semplicità.

	pK_a	pK_a	pK_a da letteratura
	$H_2L \rightleftharpoons HL + H$	$HL \rightleftharpoons L + H$	
1,2-HOPO	–	6.1284 ± 0.0044	5.78 [73]
Acido picolinico	n.d.	5.4360 ± 0.0057	1.01, 5.19 [73]

* n.d.: non determinato nelle condizioni sperimentali adottate.

I valori delle pK_a dei leganti bidentati sopracitati sono in accordo con i dati riportati in letteratura (ottenuti mediante potenziometria). Si osservano lievi variazioni presumibilmente dovute all'incertezza degli esperimenti UV-Vis e alle diverse forze ioniche esplorate nel nostro caso e in letteratura ($I = \text{KCl } 0.2 \text{ M [73]}$). La $pK_a < 2$ dell'acido picolinico, riportata dal riferimento 73, non è stata determinata in questo lavoro perché al di fuori dell'intervallo di pH esplorato: per consentire l'elaborazione dei dati, il suo valore è stato fissato a quello riportato in letteratura.

5.2 COSTANTI DI COMPLESSAMENTO Ba^{2+} -LEGANTI BIDENTATI

Come riportato nel **Paragrafo 3.1.3.1**, la speciazione dei sistemi metallo-legante non si conosce a priori, ma deve essere ipotizzata. Per sistemi che coinvolgono un metallo e un legante bidentato è ragionevole supporre che, lavorando (come nei nostri casi) in presenza di un largo eccesso di Ba^{2+} , il complesso predominante che si forma in soluzione sia $[\text{ML}]^{(2-n)+}$. Infatti, i complessi con più di un catione metallico sono improbabili dato che i leganti studiati sono bidentati (hanno a disposizione solo due siti di interazione da condividere con Ba^{2+}), e allo stesso tempo i complessi con più leganti che interagiscono con un solo catione metallico sono anch'essi improbabili dato che il largo eccesso stechiometrico di Ba^{2+} (concentrazioni di metallo circa 50-100 volte superiori a quelle di legante) a cui si è lavorato favorisce la formazione di complessi poveri di legante per il principio di Le Chatelier. Le alte concentrazioni di Ba^{2+} sono state fondamentali per favorire la formazione del complesso in soluzione, a causa della bassa stabilità termodinamica dei complessi in esame.

Per ogni sistema l'ottimizzazione è stata comunque ripetuta con diversi modelli, fino ad arrivare a quello più probabile in base alla bontà del *fitting*.

5.2.1 Potenzimetria

In seguito alla caratterizzazione dei leganti sono stati investigati i loro complessi con Ba^{2+} , allo scopo di determinarne la speciazione, la stechiometria e il valore delle costanti di complessamento ($\log\beta$).

I sistemi Ba^{2+} -2,3-HOPO, Ba^{2+} -acido malonico, Ba^{2+} -catecolo e Ba^{2+} -acido salicilico sono stati studiati mediante potenziometria. In **Figura 5.6** sono riportate le rispettive curve di titolazione con NaOH.

Per il sistema Ba^{2+} -catecolo la linea orizzontale tratteggiata è posta in corrispondenza del valore di potenziale (pari circa a -90 mV) a cui è stata osservata la formazione di un precipitato (intorbidimento della soluzione), probabilmente causata dall'ossidazione in ambiente basico della frazione di legante libero presente in soluzione; i punti sperimentali registrati a valori di $E < -90 \text{ mV}$, pertanto, sono stati esclusi dal *fitting*.

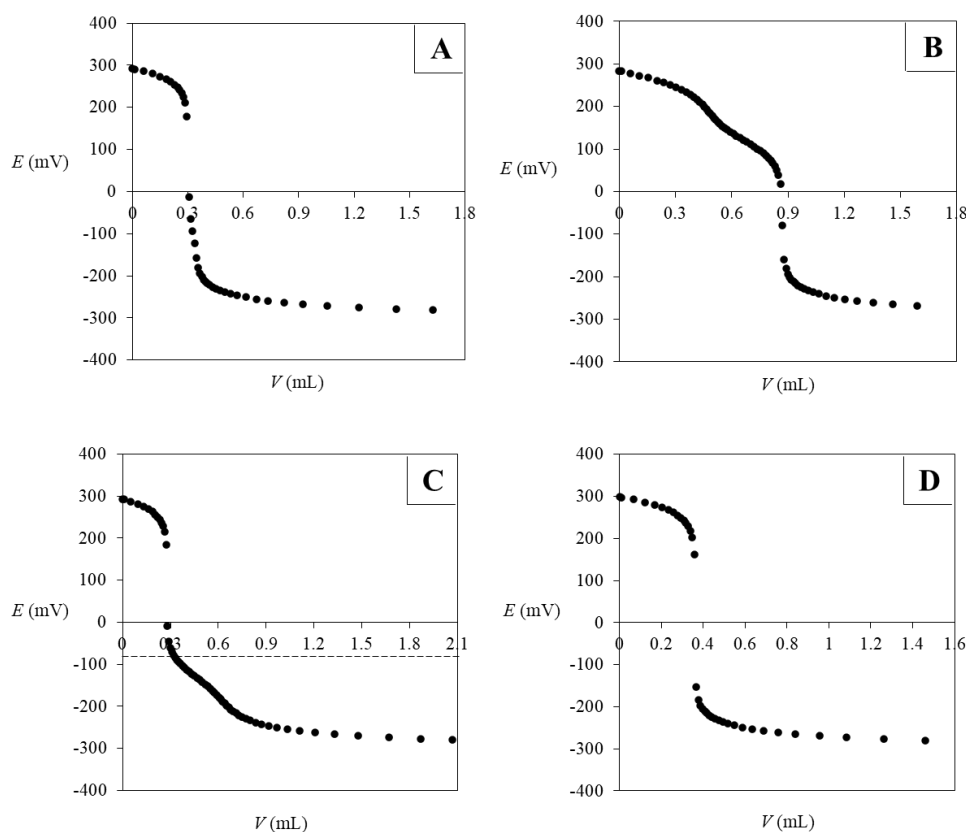


Figura 5.6 Titolazioni potenziometriche con NaOH (B1) di soluzioni contenenti **A**) 2.5 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 0.3 mL di 2,3-HOPO (0.0099 M), 0.2 mL di Ba(ClO₄)₂ (1.0093 M) e 0.3 mL di HCl (0.0931 M), **B**) 3.0 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 0.00311 g di acido malonico, 0.05026 g di Ba(ClO₄)₂ e 0.1 mL di HCl (0.0931 M), **C**) 3.0 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 0.00363 g di catecolo, 0.05044 g di Ba(ClO₄)₂ e 0.3 mL di HCl (0.0931 M), **D**) 2.5 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 0.3 mL di acido salicilico (0.0100 M), 0.2 mL di Ba(ClO₄)₂ (1.0019 M) e 0.4 mL di HCl (0.0931 M).

Il potenziale dell'elettrodo registrato durante la titolazione di sistemi metallo-legante dipende dai seguenti parametri:

- E^0 , S , imp , C_b , α , $pK_{a1,carb}$, $pK_{a2,carb}$, pK_{Na} e pK_w (**Paragrafo 5.1.1.1 e 5.1.1.2**);
- C_L e $pK_{a,L}$ (**Paragrafo 5.1.1.3**);
- C_M : titolo della soluzione dello ione metallico;
- $\beta_{m,l,h}$: costanti di formazione dei complessi metallo-legante.

I parametri ottimizzati durante l'elaborazione sono stati E^0 , imp e le varie $\beta_{m,l,h}$. I parametri non ottimizzati, invece, sono stati mantenuti costanti e pari ai valori ricavati dalla standardizzazione di NaOH e dalla caratterizzazione del solo legante. Anche il titolo della soluzione dello ione metallico C_M è stato mantenuto costante.

In **Tabella 5.4** sono riportati i valori delle costanti di complessamento con Ba²⁺ per ogni legante analizzato, mentre i risultati sono discussi nel **Paragrafo 5.2.2** insieme a quelli ottenuti mediante UV-Vis.

Tabella 5.4 Stechiometria e $\log\beta$ dei complessi Ba^{2+} -legante bidentato ottenute dall'elaborazione delle titolazioni potenziometriche. Le cariche sono omesse per semplicità.

Legante bidentato	Stechiometria e $\log\beta$ dei complessi formati	
	[ML]	[ML ₂]
2,3-HOPO	1.33 ± 0.10	-
Acido malonico	1.036 ± 0.010	3.0015 ± 0.0050
Catecolo	5.931 ± 0.050	-
Acido salicilico	3.535 ± 0.057	-

5.2.2 Spettroscopia UV-Vis

In seguito alla caratterizzazione dei leganti sono stati investigati i sistemi Ba^{2+} -1,2-HOPO e Ba^{2+} -acido picolinico. Gli spetti UV-Vis sono stati acquisiti a valori di pH compresi nell'intervallo 2-12, ogni ~ 0.5 unità di pH, e sono riportati rispettivamente in **Figura 5.7** e in **Figura 5.8**.

Entrambi i sistemi presentano dei massimi di assorbimento ($\lambda_{\text{max}} = 314$ nm e $\lambda_{\text{max}} = 220$ nm per 1,2-HOPO, $\lambda_{\text{max}} = 265$ nm per acido picolinico) nell'intervallo di lunghezze d'onda indagato (200-800 nm).

Sia per Ba^{2+} -1,2-HOPO che per Ba^{2+} -acido picolinico è stata osservata la formazione di un precipitato rispettivamente a $\text{pH} > 10$ e $\text{pH} > 8.5$. Si tratta presumibilmente di carbonato di bario (BaCO_3), un sale poco solubile in acqua la cui formazione è favorita a pH basici (a causa della carbonatazione della soluzione) e in condizioni di eccesso di bario. [74] I punti sperimentali registrati in seguito alla precipitazione di BaCO_3 sono stati esclusi dal *fitting*.

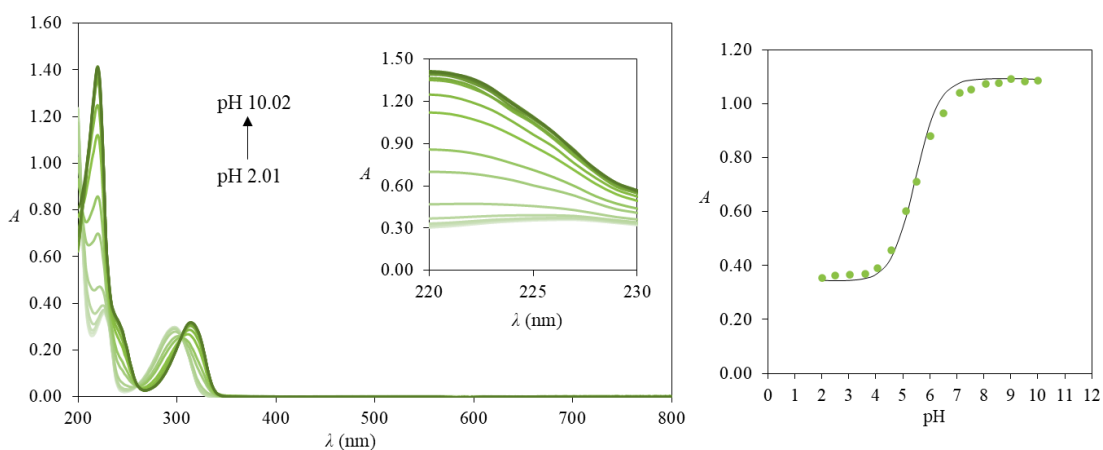


Figura 5.7 Spettri UV-Vis a diversi pH di una soluzione contenente 1,2-HOPO ($6 \cdot 10^{-5}$ M) e $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ ($6 \cdot 10^{-3}$ M). Il grafico a destra riporta l'andamento dell'assorbanza a 225 nm in funzione del pH e la relativa curva di *fitting*.

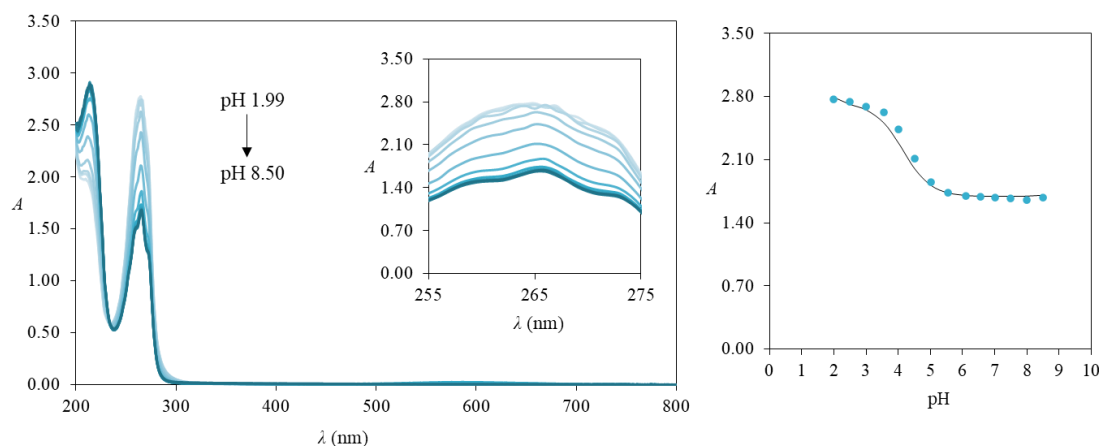


Figura 5.8 Spettri UV-Vis a diversi pH di una soluzione contenente acido picolinico ($4 \cdot 10^{-4}$ M) e $\text{Ba}(\text{ClO}_4)_2$ (0.4 M). Il grafico a destra riporta l'andamento dell'assorbanza in funzione del pH a 265 nm e la relativa curva di *fitting*.

In **Tabella 5.5** sono riportati le stechiometrie e i valori delle costanti di complessamento ottenuti in seguito all'elaborazione dei dati sperimentali con *HypSpec*.

Tabella 5.5 Stechiometria e $\log\beta$ dei complessi Ba^{2+} -legante bidentato ottenute dall'elaborazione dei dati UV-Vis. Le cariche sono omesse per semplicità.

Legante bidentato	Stechiometria e $\log\beta$ dei complessi formati	
	[ML]	[ML(OH)]
1,2-HOPO	2.7849 ± 0.0045	-
Acido picolinico	1.6795 ± 0.0053	-7.999 ± 0.018

In **Figura 5.9** sono riassunti i risultati delle costanti di formazione dei complessi ottenuti per tutti i sistemi Ba^{2+} -legante bidentato studiati in questo lavoro di tesi.

Per ogni sistema è stata calcolata anche la rispettiva $\log\beta'$ a pH 7.4. La $\log\beta'$ viene definita costante condizionale di complessamento e ha lo scopo di quantificare l'effettiva stabilità dei complessi in presenza di equilibri acido-base concomitanti. β' si calcola moltiplicando β per un coefficiente detto frazione di distribuzione di L (α_L), che rappresenta la frazione molare del legante presente nella forma completamente deprotonata al pH di interesse (equazioni 5.1 e 5.2).

$$\alpha_L = \frac{1}{10^{\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2} - 2\text{pH}} + 10^{\text{p}K_{a2} - \text{pH}} + 1} \quad (5.1)$$

$$\beta' = \beta \cdot \alpha_L \quad (5.2)$$

Il calcolo della stabilità effettiva è particolarmente rilevante a pH fisiologico, essendo questa la condizione in cui il radiofarmaco verrebbe a trovarsi in condizioni di impiego. Pertanto, le costanti condizionali sono state calcolate a $\text{pH} = 7.4$, e sono riportate anch'esse in **Figura 5.9**.

Come si evince dal grafico, complessi con costanti di formazione ($\log\beta$) elevate non sempre sono i più stabili termodinamicamente a pH fisiologico (ciò è osservato ad esempio per il catecolo e per l'acido salicilico). Tra i leganti studiati, l'acido malonico, l'1,2-HOPO e l'acido picolinico si sono dimostrati i più promettenti, poiché a pH 7.4 sono completamente deprotonati e quindi $\log\beta'$ risulta uguale a $\log\beta$.

Sulla base dei risultati fin qui ottenuti, il nostro gruppo di ricerca ha deciso di utilizzare questi leganti bidentati per funzionalizzare il macrociclo Kryptofix 22 creando chelanti multidentati da studiare per il complessamento del ^{223}Ra .

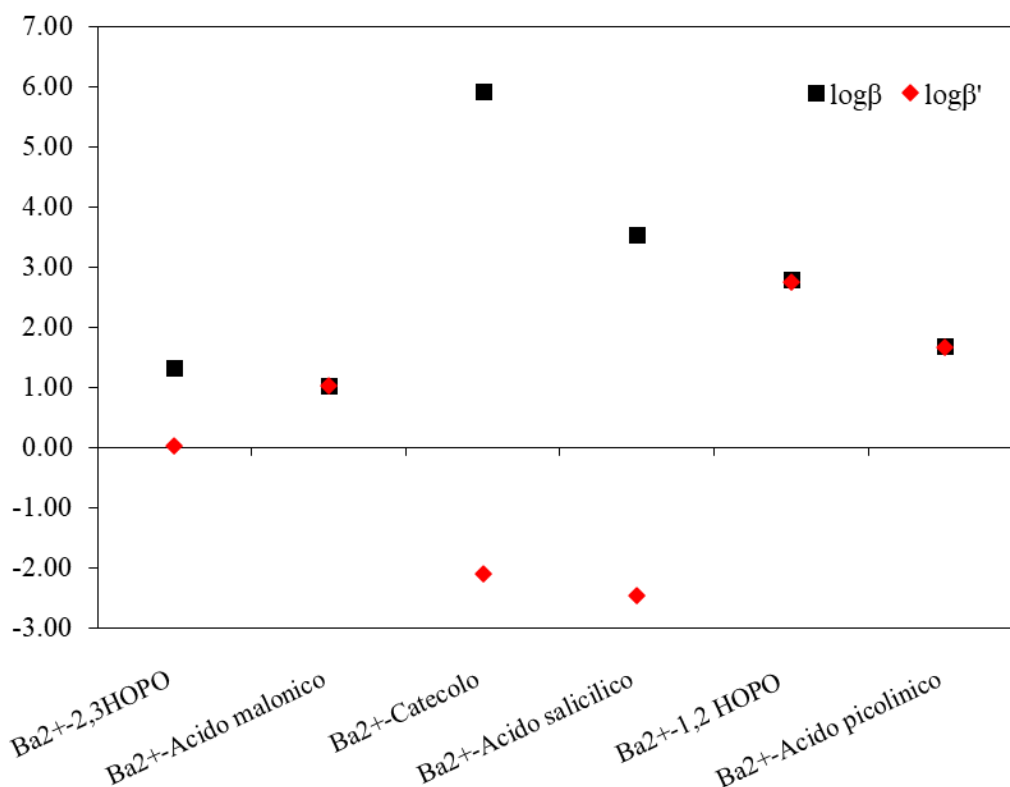


Figura 5.9 Rappresentazione grafica dei valori delle costanti di formazione ottenute per i sistemi Ba^{2+} -legante bidentato e delle rispettive costanti condizionali calcolate a pH fisiologico (pH = 7.4). Sono riportati solo i valori di $\log\beta$ e $\log\beta'$ per i complessi di stechiometria 1:1 [ML].

5.3 COSTANTI DI ACIDITÀ DEI MACROCICLI

5.3.1 Potenziometria

In seguito alla calibrazione dell'elettrodo di vetro e alla standardizzazione del titolante NaOH (Paragrafi 5.1.1.1 e 5.1.1.2), sono state eseguite le titolazioni potenziometriche del macrophospho e dell'oddm. Esempi delle curve di titolazione ottenute per ciascun chelante sono riportate in **Figura 5.10**.

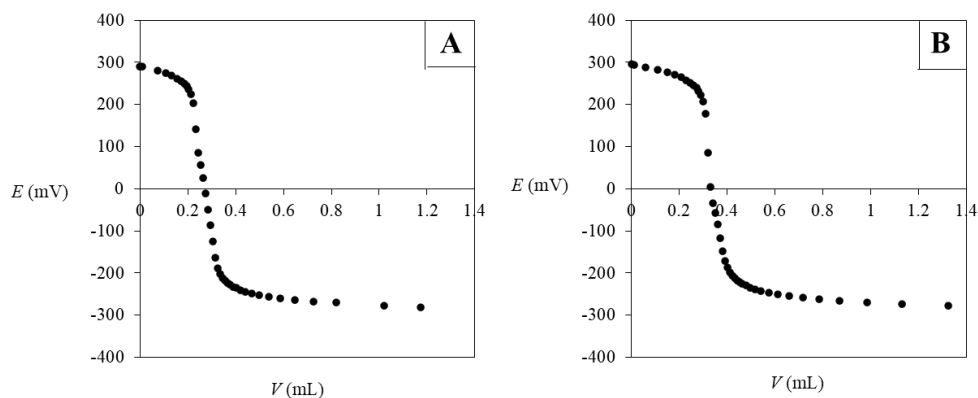


Figura 5.10 Titolazioni potenziometriche con NaOH (B2) di soluzioni contenenti **A**) 1.2 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 1.3 mL di macrophospho (0.0019 M) e 0.2 mL di HCl (0.0931 M), **B**) 1.6 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 1.4 mL di oddm (0.0021 M) e 0.3 mL di HCl.

Come discusso nel **Paragrafo 5.1.1.3**, i parametri ottimizzati durante l'elaborazione sono stati E^0 , imp , C_L e le $pK_{a,L}$, mentre i parametri non ottimizzati sono stati mantenuti costanti e pari ai valori ricavati dalla standardizzazione di NaOH.

Il macrophospho possiede otto siti di protonazione/deprotonazione e quindi potenzialmente fino a otto pK_a . Dall'elaborazione della curva di titolazione (**Figura 5.10, A**) sono stati osservati quattro deprotonazioni, le cui pK_a sono indicate in **Tabella 5.6**. I valori ottenuti in questo lavoro sono in accordo con quanto riportato in letteratura (nei due studi precedenti le costanti sono risultate pari a 1.50, 5.68, 6.37, 7.82 e 8.68, e pari a 2.34, 5.81, 6.52, 8.06 e 8.51). [30], [54] Tuttavia, nelle nostre condizioni sperimentali non è stata ottenuta una quinta pK_a , indicata invece negli studi precedentemente eseguiti (1.50 e 2.34 rispettivamente). Il valore di questa pK_a probabilmente è troppo basso per essere determinato accuratamente lavorando nell'intervallo di pH 2-12, come evidenziato anche dallo scarso accordo tra i dati di letteratura. [30], [54] Inoltre, l'attribuzione delle pK_a trovate ai gruppi funzionali del chelante risulta ragionevole sulla base sia di buon senso chimico sia di nozioni presenti in letteratura. [30], [54]. Infatti, entrambi i gruppi fosfonici si comportano da acidi forti quando sono completamente protonati, perdendo il primo H^+ a valori di pH estremamente bassi ($pK_a \ll 2$). Anche i due azoti delle piridine risultano

particolarmente acidi in quanto presentano gruppi elettron-attrattori in posizione orto ($pK_a \sim$ tra 0 e 1, non determinabili ai pH di lavoro). Pertanto, le quattro pK_a ottenute sono ragionevolmente relative alla deprotonazione dei rimanenti H^+ dei due fosfonati e alla deprotonazione dei due azoti dell'anello macrociclico.

L'oddm invece possiede sei siti di protonazione/deprotonazione e quindi fino a sei pK_a . Le costanti di acidità ottenute dall'elaborazione della curva di titolazione (**Figura 5.10, B**) sono riportate in **Tabella 5.6**. Il numero di deprotonazioni osservato per l'oddm è pari a tre, in accordo con quanto riportato in letteratura. L'accordo tra i valori delle costanti, però, non è altrettanto buono (in letteratura le costanti indicate sono pari a 3.31, 8.00 e 8.60). [56] Per valutare la correttezza dei valori ottenuti è stato necessario integrare i risultati potenziometrici con lo studio NMR, come discusso nel **Paragrafo 5.3.2**. Per quanto riguarda l'attribuzione delle pK_a ai gruppi funzionali della molecola, è ragionevole assegnare le ultime due pK_a agli azoti dell'anello e la prima (tra quelle ottenute) a un gruppo carbossilico. Le altre tre probabilmente non sono state osservate perché troppo basse (< 2).

Tabella 5.6 pK_a dei macrocicli determinate mediante potenziometria ($T = 25^\circ C$, $I = NaCl$ 0.15 M).

Equilibrio	macrophospho	oddm
$H_4L \rightleftharpoons H_3L^- + H^+$	5.69 ± 0.11	n.d.
$H_3L^- \rightleftharpoons H_2L^{2-} + H^+$	6.31 ± 0.16	3.992 ± 0.061
$H_2L^{2-} \rightleftharpoons HL^{3-} + H^+$	7.67 ± 0.14	7.680 ± 0.079
$HL^{3-} \rightleftharpoons L^{4-} + H^+$	8.79 ± 0.19	8.213 ± 0.099

n.d.: non determinato nelle condizioni sperimentali adottate.

5.3.2 Spettroscopia NMR

Gli spettri 1H -NMR del macrophospho e dell'oddm al variare del pH sono stati registrati a completamento dei dati potenziometrici, e sono mostrati rispettivamente in **Figura 5.11** e in **Figura 5.13**. Per lo studio del macrophospho è stata impiegata anche la spettroscopia ^{31}P -NMR con disaccoppiamento del protone: gli spettri acquisiti a diversi pH sono riportati in **Figura 5.12**.

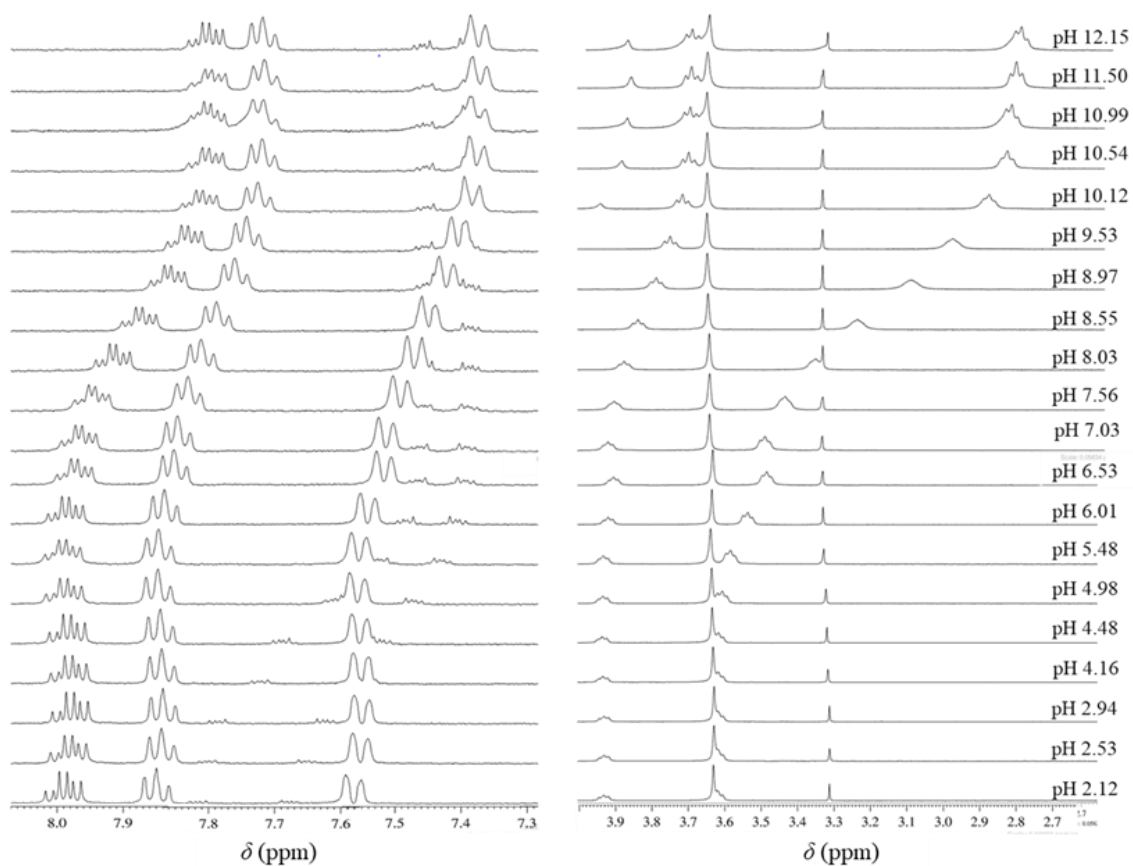


Figura 5.11 Spettri $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente macrophospho 10^{-3} M. A sinistra è riportato l'intervallo di *chemical shift* dei protoni aromatici, a destra l'intervallo di *chemical shift* dei protoni alifatici. Il segnale a 3.34 ppm è dovuto alla presenza di tracce di metanolo.

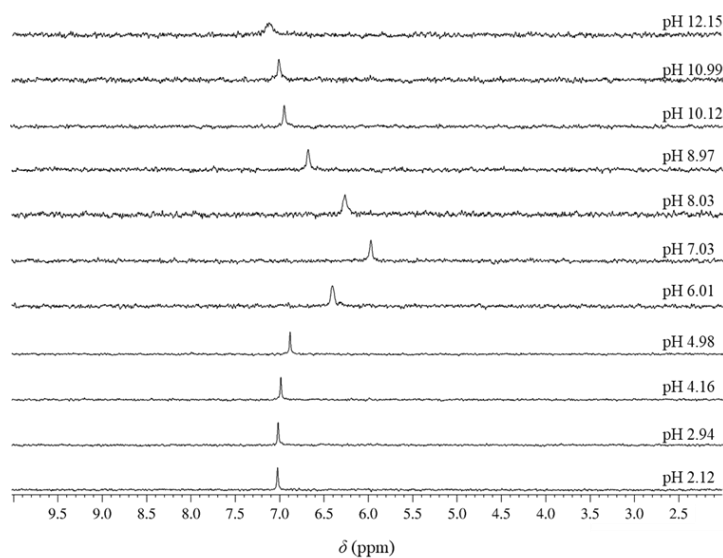


Figura 5.12 Spettri $^{31}\text{P-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente macrophospho 10^{-3} M.

Per il macrophospho si osservano i seguenti segnali: nella regione aromatica si distinguono un multipletto (m) attribuito al protone in orto al gruppo fosfonico (l'elevata molteplicità è infatti dovuta all'accoppiamento scalare ^1H - ^{31}P oltre che ^1H - ^1H), un tripletto (t) associato al protone in meta al gruppo fosfonico e un doppietto (d) attribuito al protone in para. Nella regione alifatica si identificano un singoletto attribuito al metilene che funge da *linker* tra l'anello centrale del chelante e l'acido 2-piridilfosfonico (questo compare solo a valori di $\text{pH} \geq 10$ perché presumibilmente a valori di pH inferiori viene soppresso insieme al segnale dell'acqua), due tripletti attribuiti ai due metileni $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ e $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ dell'anello, e un singoletto associato ai metileni $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$. Il segnale del fosforo è sempre uno solo, indice della simmetria della molecola che viene mantenuta al variare del pH .

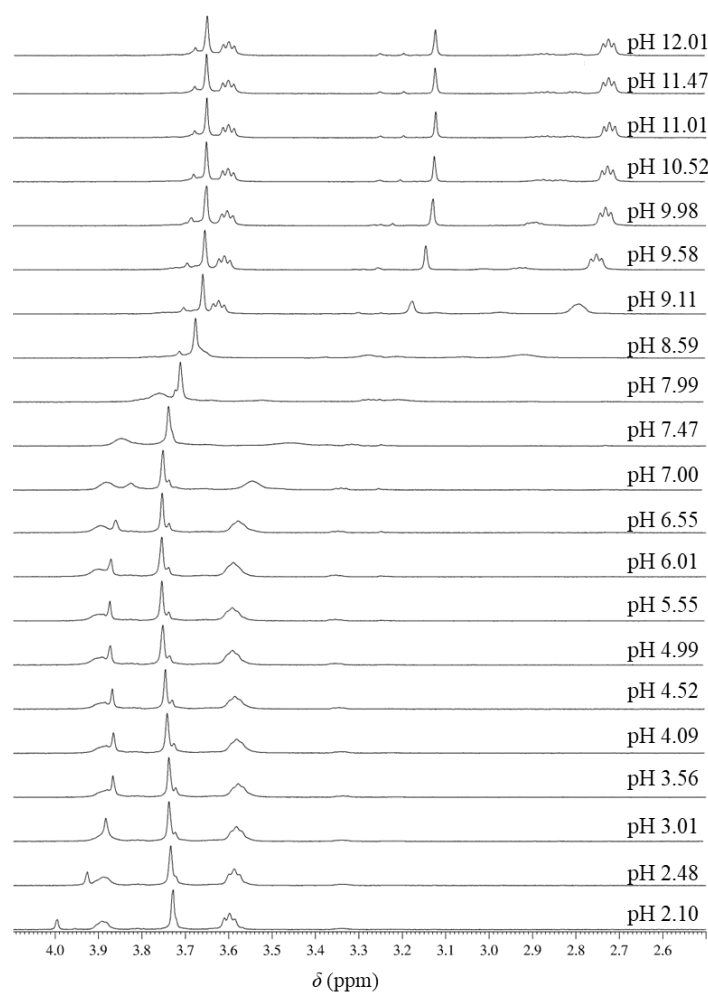


Figura 5.13 Spettri ^1H -NMR (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente 10^{-3} M.

Per l'oddm si osservano i seguenti segnali: un singoletto attribuito al gruppo metinico centrale dell'acido malonico (a cui è legato l'anello), due tripletti attribuiti ai due metileni $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ e $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ dell'anello, e un singoletto relativo ai metileni $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$. A valori di $\text{pH} > 9$ è stata

osservata la comparsa di un altro singoletto intenso ($\delta = 3.1-3.2$ ppm) che verrà discusso nel **Paragrafo 5.3.2.1**.

5.3.2.1 Andamento dei *chemical shift* dei segnali in funzione del pH

Gli andamenti dei *chemical shift* al variare del pH per il macrophospho e per l'oddm sono riportati rispettivamente in **Figura 5.14** e in **Figura 5.15**. Per entrambi i leganti, il singoletto dei gruppi $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ non subisce significative variazioni di *chemical shift* al variare del pH, poiché questi metileni sono lontani dai siti di protonazione e deprotonazione della molecola. Tutti gli altri segnali subiscono una generale diminuzione, più o meno marcata, del *chemical shift* con l'aumento del pH, a causa della schermatura dei nuclei, coerente con la diminuzione della carica netta della molecola e l'aumento di densità elettronica in seguito alla deprotonazione.

I protoni che restituiscono segnali con una elevata variazione di *chemical shift* sono ragionevolmente i più vicini ai siti in cui avviene la deprotonazione. Inoltre, l'andamento dei *chemical shift* dei segnali dimostra che la loro variazione risulta massima per valori di pH prossimi alle pK_a : infatti, in questi intervalli di pH gli spettri NMR cambiano in modo piuttosto netto, mentre via via che ci si allontana dalle pK_a gli spettri non subiscono significative variazioni.

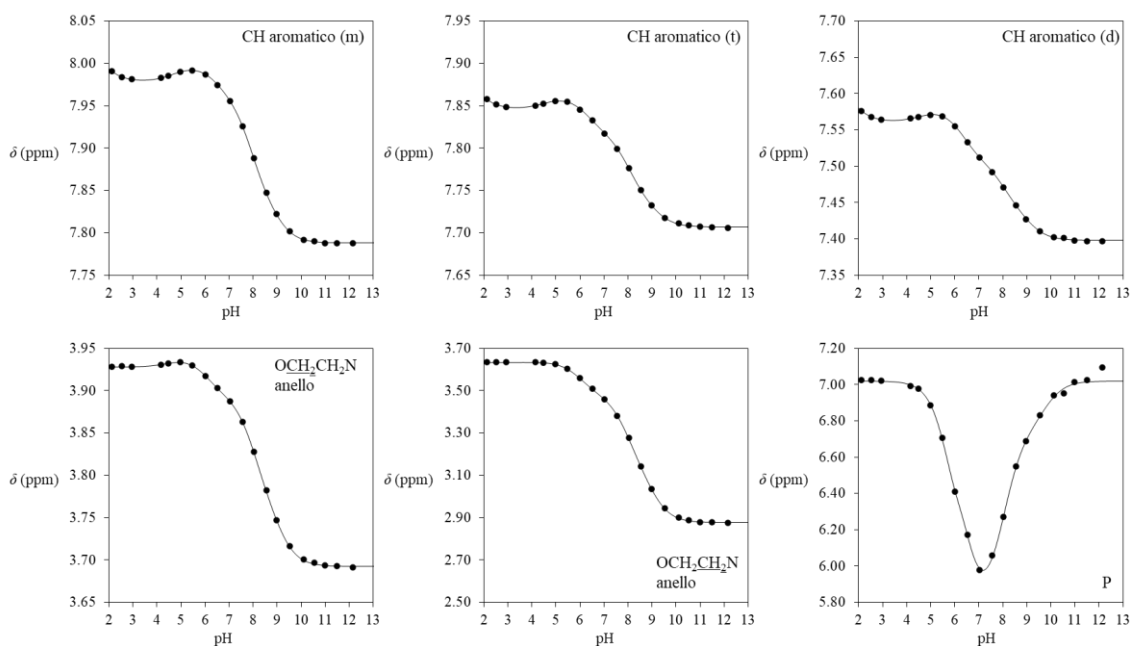


Figura 5.14 Andamenti dei *chemical shift* di alcuni gruppi funzionali del macrophospho al variare del pH e relative curve di *fitting*.

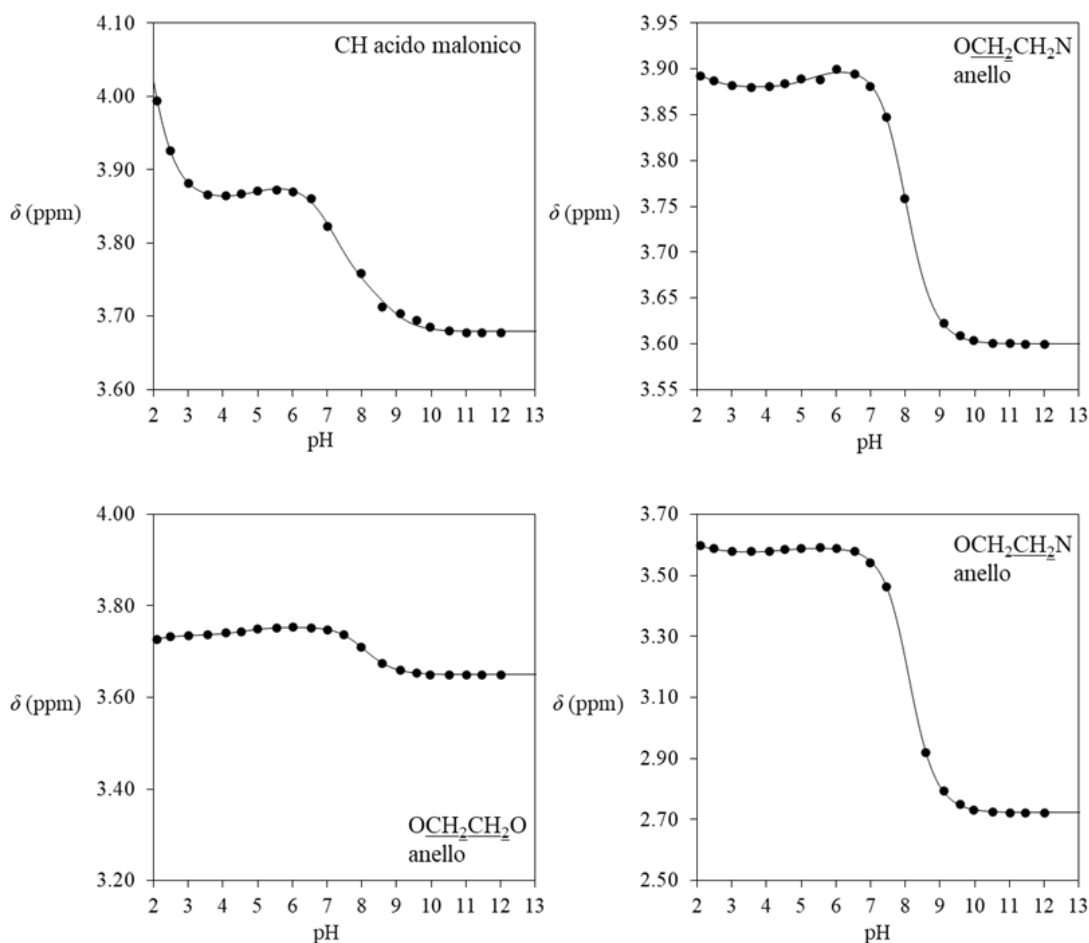


Figura 5.15 Andamenti dei *chemical shift* di alcuni gruppi funzionali dell'oddm al variare del pH e relative curve di *fitting*.

Una caratteristica inattesa, ma anche in comune, tra tutti gli andamenti è quello che si osserva nell'intervallo di pH tra ~ 3 e ~ 6 : l'andamento è opposto rispetto a quello generalmente atteso (diminuzione del *chemical shift* all'aumentare del pH). È stato inizialmente ipotizzato che i chelanti potessero complessare gli ioni sodio (Na^+) introdotti come NaOH per la modifica del pH e come NaCl per il controllo della forza ionica. Pertanto, sono stati acquisiti degli spettri $^1\text{H-NMR}$, al variare del pH, di una soluzione acquosa (senza controllo di forza ionica) contenente macrophospho a cui è stata aggiunta una base forte alternativa a NaOH, ossia l'idrossido di tetrametilammonio, per la modifica del pH. Questa base è stata scelta perché il complessamento del tetrametilammonio è meno favorito rispetto a quello di Na^+ a causa dell'elevata dimensione del catione.

In **Figura 5.16** sono riportati gli spettri $^1\text{H-NMR}$ al variare del pH basificata utilizzando tetrametilammonio idrossido. Per semplicità nella figura sono riportati solo alcuni valori di pH.

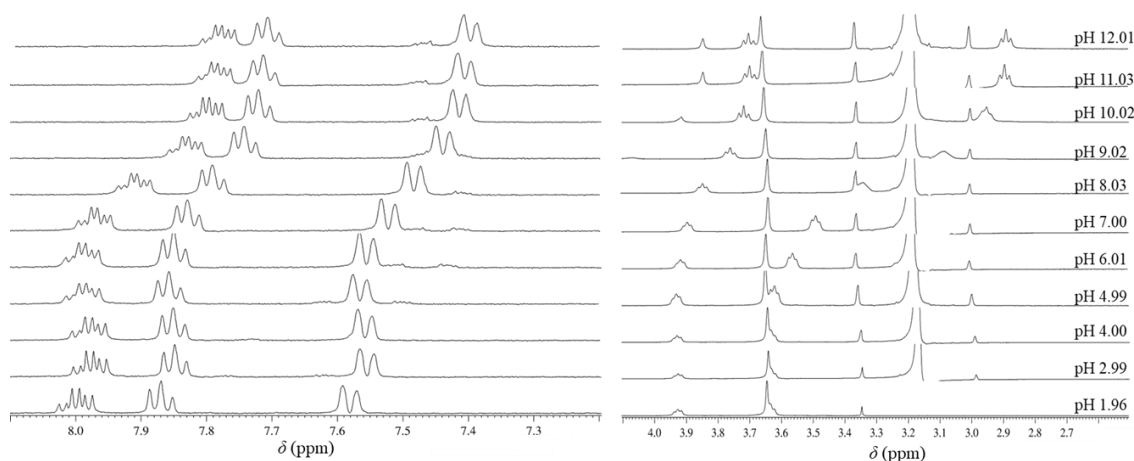


Figura 5.16 Spettri $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) di una soluzione acquosa (senza controllo della forza ionica) di macrophospho 10^{-3} M, basificata utilizzando idrossido di tetrametilammonio. Il segnale a ~ 3.2 ppm (fuori scala) è relativo ai gruppi metilici del tetrametilammonio.

Gli spettri riportati in **Figura 5.16** non presentano sostanziali differenze rispetto a quelli di **Figura 5.11**. Pertanto, la modifica della base utilizzata per la regolazione del pH non influisce sull'andamento dei *chemical shift* al variare del pH: da ciò si può inoltre dedurre che il complessamento del Na^+ sia ininfluenza.

È stato quindi ipotizzato che i peculiari andamenti osservati in **Figura 5.14** e in **Figura 5.15** siano dovuti alla presenza di legami a idrogeno intramolecolari, che si possono instaurare tra gli azoti del macrociclo (o della piridina per il macrophospho) e i gruppi carbossilici o fosfonici dei bracci laterali. Questa ipotesi sembra ragionevole in quanto studi paralleli e precedenti condotti dal nostro gruppo di ricerca su altri chelanti macrociclici mostrano che questo andamento è comune a molecole che nella loro struttura presentano atomi di azoto e gruppi carbossilici in catena laterale, mentre non è stato osservato in composti che non sono in grado di formare legami a idrogeno intramolecolari.

I dati sperimentali sono stati elaborati con il *software* MATLAB al fine di determinare i valori di pK_a di entrambi i leganti studiati. I risultati sono mostrati in **Tabella 5.7**.

Tabella 5.7 pK_a dei chelanti macrophospho e oddm ottenuti mediante $^1\text{H-NMR}$. I risultati sono la media dei singoli valori ottenuti dai *fitting* di ogni andamento di *chemical shift* vs. pH per ciascun gruppo funzionale.

Equilibrio	macrophospho	oddm
$\text{H}_5\text{L}^+ \rightleftharpoons \text{H}_4\text{L} + \text{H}^+$	1.502 ± 0.048	n.d.
$\text{H}_4\text{L} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^- + \text{H}^+$	4.54 ± 0.19	1.74 ± 0.28
$\text{H}_3\text{L}^- \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}^{2-} + \text{H}^+$	6.27 ± 0.19	4.83 ± 0.38
$\text{H}_2\text{L}^{2-} \rightleftharpoons \text{HL}^{3-} + \text{H}^+$	7.991 ± 0.045	7.44 ± 0.29
$\text{HL}^{3-} \rightleftharpoons \text{L}^{4-} + \text{H}^+$	9.078 ± 0.057	8.27 ± 0.30

n.d.: non determinato nelle condizioni sperimentali adottate.

Per entrambi i chelanti è stata ottenuta una costante di dissociazione acida in più rispetto alla potenziometria. Per il macrophospho i risultati NMR sono in buon accordo con quelli potenziometrici (**Tabella 5.6**). La pK_a pari a 1.502 è stata determinata mediante l'elaborazione degli andamenti dei *chemical shift* dei protoni aromatici (non di quelli alifatici), perché ragionevolmente è associata all'azoto piridinico del braccio laterale.

Per l'oddm la determinazione dei valori di pK_a e il loro confronto con i risultati potenziometrici sono stati complicati a causa del picco incognito che compare in ambiente basico a $\text{pH} > 9$. Sono state condotte le seguenti prove per determinare l'origine di questo segnale:

- Spettro $^1\text{H-NMR}$ in D_2O dell'oddm immediatamente dopo la sintesi (**Figura 5.17**);
- Spettri $^1\text{H-NMR}$ a diversi pH del Kryptofix 22 (**Figura 5.18**);
- Spettro $^1\text{H-NMR}$ di un nuovo *batch* di oddm la cui soluzione è stata preparata come riportato nel **Paragrafo 4.3.1** e successivamente portata a pH 9.11 (**Figura 5.19**);
- Spettro $^1\text{H-NMR}$ di un nuovo *batch* di oddm la cui soluzione è stata preparata senza aggiunta di HCl e portata direttamente a pH 9.44 (**Figura 5.20**).

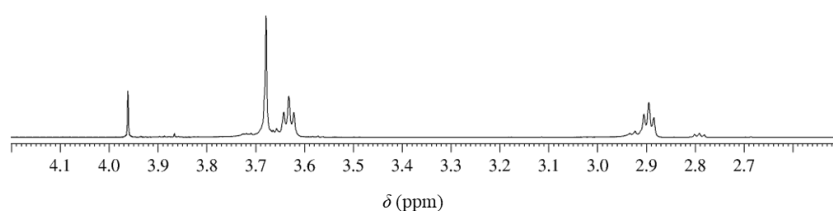


Figura 5.17 Spettro $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, D_2O) dell'oddm dopo la sintesi a $\text{pH} > 9$ (non misurato accuratamente con pH-metro).

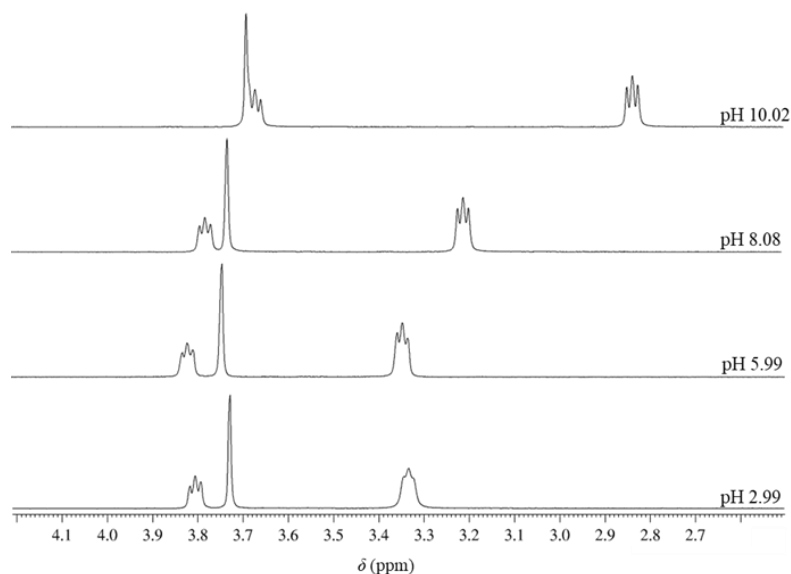


Figura 5.18 Spettri $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) del Kryptofix 22 al variare del pH.

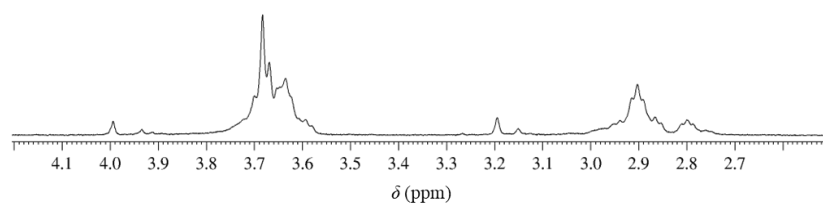


Figura 5.19 Spettro $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) di un nuovo *batch* di oddm la cui soluzione è stata preparata come riportato nel **Paragrafo 4.3.1** e poi portata a pH 9.11.

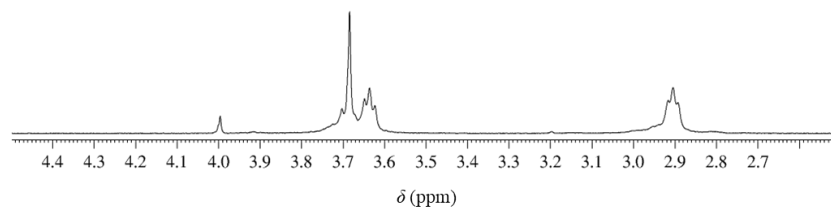


Figura 5.20 Spettro $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) di un nuovo *batch* di oddm portato a pH 9.44 senza aver aggiunto HCl precedentemente.

In seguito all'analisi dei vari spettri, si può notare che il picco a 3.2 ppm, che compare in ambiente basico, sia esclusivamente presente in **Figura 5.19**, corrispondente alla soluzione portata prima a pH acido e poi a pH 9. È ragionevole credere, dunque, che il chelante subisca un processo degradativo in seguito all'aggiunta di HCl. Non è stato possibile arrivare ad una conclusione definitiva, ma l'ipotesi più probabile è che avvenga la parziale decarbossilazione dell'acido malonico, favorita in ambiente acido per acidi 3-ossocarbossilici. Dalla letteratura non risulta del tutto chiaro se durante gli studi precedenti dell'oddm sia stata incontrata questa stessa difficoltà poiché non è riportata alcuna analisi NMR in acqua a pH variabili. Tuttavia, l'ipotesi di una eventuale degradazione del chelante è importante perché permette nel nostro caso di escludere i

valori di pK_a ottenuti dalla potenziometria e di tenere valide le pK_a calcolate dall'elaborazione dei dati NMR. Ciò in virtù del fatto che in potenziometria non è possibile discriminare diverse molecole presenti in soluzione, mentre all'NMR, per la determinazione delle costanti di acidità, sono stati considerati solo i valori di *chemical shift* attribuiti ai protoni dell'oddm.

Per entrambi i chelanti, i valori ottenuti mediante potenziometria e mediante NMR per la pK_a presente nell'intervallo di pH 3.9-5.7 non sono in buon accordo tra loro (differiscono di ~ 1 unità di pH). Questo può essere attribuito all'anomalo andamento del *chemical shift* dei segnali già discusso in precedenza.

La sequenza di deprotonazione più probabile per il macrophospho e l'oddm è mostrata rispettivamente in **Figura 5.21** e **Figura 5.22**.

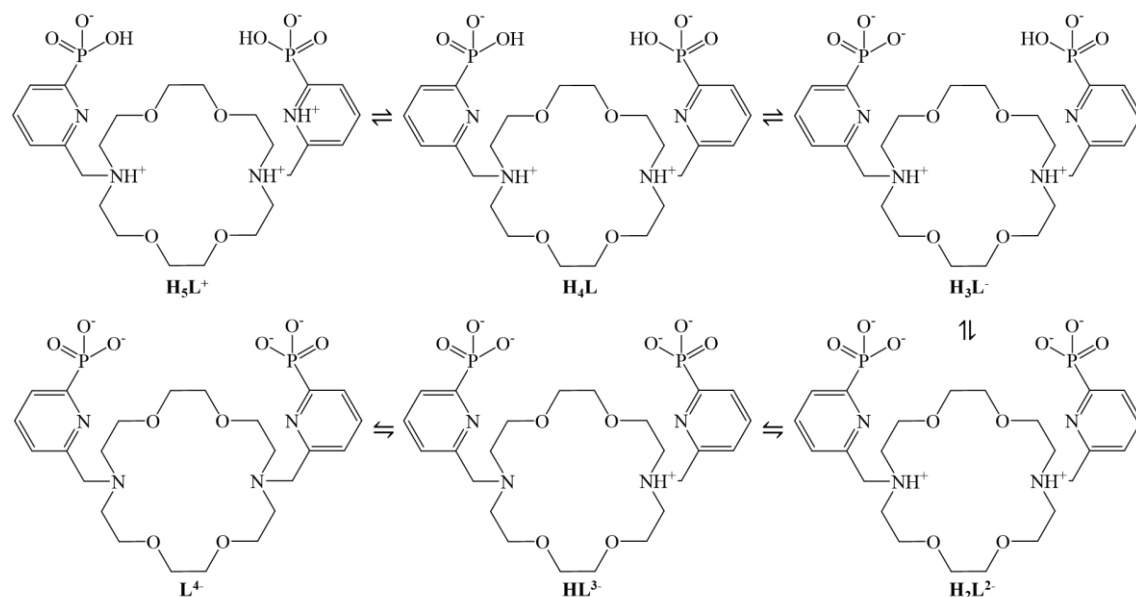


Figura 5.21 Sequenza di deprotonazione più probabile per il macrophospho.

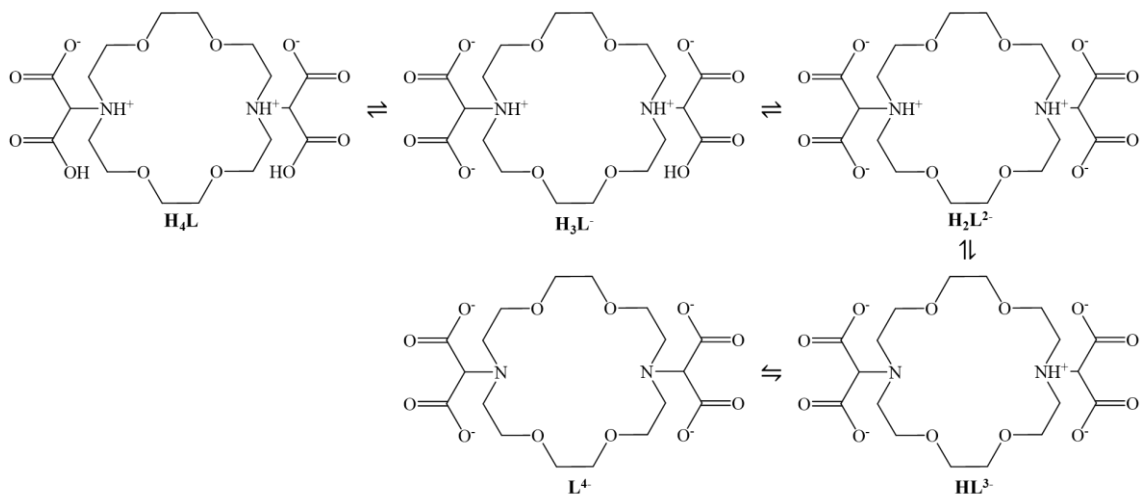


Figura 5.22 Sequenza di deprotonazione più probabile per l'oddm.

5.3.3 Diagrammi di distribuzione

Per visualizzare graficamente la speciazione di un sistema all'equilibrio termodinamico, è utile tracciare il corrispondente diagramma di distribuzione, che rappresenta la quantità relativa (come frazione molare o concentrazione) delle varie specie presenti in soluzione al variare del pH. Nei diagrammi di distribuzione dei soli leganti solitamente si riporta in ordinata la frazione molare (α) poiché il diagramma stesso non dipende dalla concentrazione totale di legante.

Il diagramma di distribuzione del macrophospho è stato tracciato utilizzando le pK_a ottenute mediante potenziometria (ritenute più affidabili perché non soggette a eventuali influenze conformazionali dovute a legami a idrogeno), con l'aggiunta di quella relativa all'equilibrio $H_5L^+ \rightleftharpoons H_4L + H^+$ ricavata da NMR. Per quello dell'oddm, invece, sono state usate le pK_a determinate via NMR per i motivi discussi nel **Paragrafo 5.3.2.1**.

I diagrammi di distribuzione del macrophospho e dell'oddm sono rappresentati rispettivamente in **Figura 5.23** e in **Figura 5.24**.

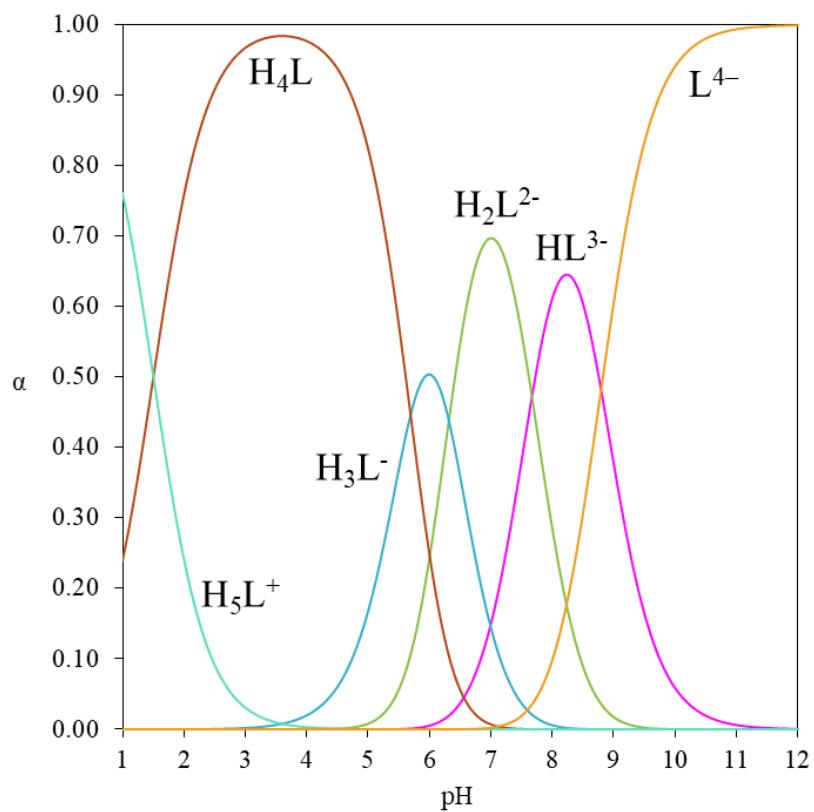


Figura 5.23 Diagramma di distribuzione del macrofosfo.

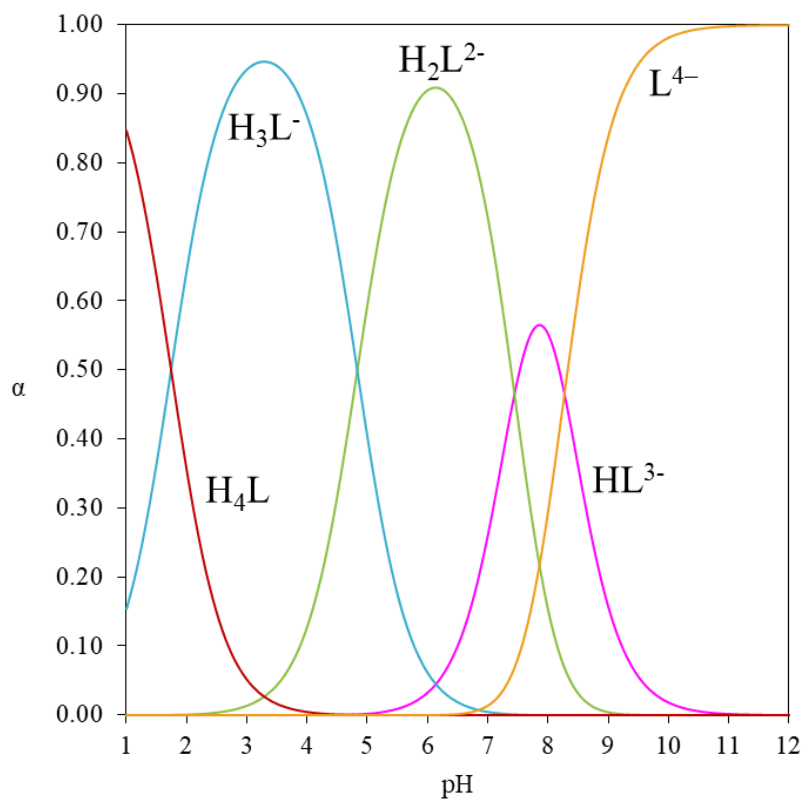


Figura 5.24 Diagramma di distribuzione dell'oddm.

5.4 COSTANTI DI COMPLESSAMENTO Ba²⁺-MACROCICLI

5.4.1 Valutazione qualitativa della cinetica di complessamento

Dopo la caratterizzazione dei macrocicli, sono stati investigati i loro complessi di Ba²⁺, allo scopo di determinarne la speciazione, la stechiometria e il valore delle costanti di complessamento ($\log\beta$).

Prima di procedere alla caratterizzazione termodinamica dei sistemi Ba²⁺-macrocielo si è deciso di condurre un'analisi qualitativa preliminare della cinetica di complessamento, perché, mentre le reazioni acido-base sono generalmente molto rapide, gli equilibri di complessamento possono richiedere tempi anche molto più lunghi. In particolare, è necessario verificare che la cinetica sia sufficientemente rapida da rispettare i requisiti della potenziometria (i tempi di attesa tra un'aggiunta e l'altra di titolante possono essere di alcuni minuti al massimo). Inoltre, per condurre esperimenti di termodinamica con qualsiasi tecnica è necessario che i sistemi siano in condizioni di equilibrio.

Per entrambi i leganti sono stati acquisiti degli spettri ¹H-NMR preliminari, solo ad alcuni valori di pH, di soluzioni contenenti il chelante in esame e un'opportuna quantità di Ba²⁺ tale da garantire un rapporto 1:1, che sono stati poi confrontati con gli spettri ¹H-NMR del solo legante, per verificare che il complessamento avvenisse nel breve intervallo di tempo necessario alla preparazione della soluzione e all'acquisizione dello spettro. Gli spettri così ottenuti (qui non riportati) hanno confermato, sia per il macrophospho che per l'oddm, una cinetica di complessamento rapida nei confronti del bario: è stato possibile, quindi, condurre l'analisi potenziometrica in cella senza tempi di attesa eccessivamente lunghi (anche se per precauzione i tempi impostati sono comunque maggiori rispetto ai tempi di attesa per il solo legante).

5.4.2 Potenziometria

Una curva di titolazione del sistema Ba²⁺-macrophospho è riportata in **Figura 5.25**. È stato invece deciso di non condurre lo studio potenziometrico per il sistema Ba²⁺-oddm in quanto, in fase di elaborazione dati, non sarebbe stato possibile individuare e tenere conto dell'eventuale degradazione del chelante, che avrebbe reso inaffidabili i risultati.

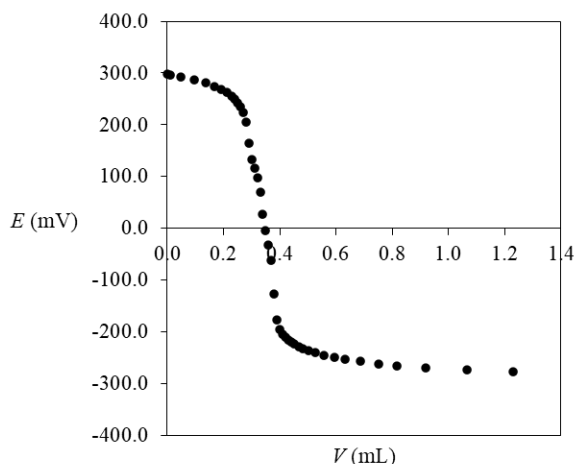


Figura 5.25 Titolazione potenziometrica con NaOH (B2) di una soluzione contenente 1.1 mL di H₂O, NaCl 0.15 M, 1.6 mL di macrophospho (0.0019 M), 0.3 mL di BaCl₂ (0.010 M) e 0.3 mL di HCl (0.0931 M).

Come discusso nel **Paragrafo 5.2.1**, i parametri ottimizzati durante l’elaborazione dei sistemi Ba²⁺-legante sono stati E^0 , imp e le varie $\beta_{m,l,h}$. I parametri non ottimizzati, invece, sono stati mantenuti costanti e pari ai valori ricavati dalla standardizzazione di NaOH e dalla caratterizzazione del macrophospho. Anche il titolo della soluzione dello ione metallico C_M è stato mantenuto costante perché è una quantità esattamente nota.

Per lo studio degli equilibri di complessamento, come spiegato nel **Paragrafo 3.1.3.1**, la speciazione dei sistemi metallo-legante non si conosce a priori, ma deve essere ipotizzata. L’ottimizzazione dei risultati è stata quindi ripetuta con diversi modelli, fino all’individuazione della speciazione più probabile sulla base dei risultati del *fitting*. In **Tabella 5.8** sono riportati la stechiometria dei complessi e i relativi valori delle costanti di complessamento tra Ba²⁺ e macrophospho.

Tabella 5.8 Stechiometria e $\log\beta$ dei complessi di Ba²⁺ con macrophospho ottenute mediante potenziometria ($T = 25^\circ\text{C}$, $I = \text{NaCl } 0.15 \text{ M}$). “L” rappresenta il macrophospho nella forma completamente deprotonata.

$\log\beta_{[\text{BaL}]^{2-}}$	6.32 ± 0.26
$\log\beta_{[\text{BaLH}]^-}$	14.31 ± 0.25
$\log\beta_{[\text{BaLH}_2]}$	21.366 ± 0.092

Se si confrontano i valori delle costanti di complessamento per il sistema Ba²⁺-macrophospho ottenute dalla potenziometria con quelli riportati in letteratura, si nota un ottimo accordo. [30] L’unica differenza è che in questo lavoro di tesi non è stato osservato il complesso [BaLH₃]⁺ in quanto il modello di speciazione con questo quarto complesso restituiva un *fitting* comparabile

all'elaborazione senza $[\text{BaLH}_3]^+$: con bontà di *fitting* comparabili è opportuno considerare valido il modello di speciazione con il minor numero di complessi. [30] Tuttavia anche la costante di complessamento dell'eventuale $[\text{BaLH}_3]^+$ riportata in letteratura evidenzia come questa specie sia minoritaria in tutto l'intervallo di pH di interesse, cioè che la stessa specie non sia particolarmente significativa. [30]

5.4.3 Spettroscopia NMR

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei complessi di Ba^{2+} con il macrophospho e con l'oddm sono stati registrati principalmente per ricavare informazioni sulla struttura delle specie in soluzione e sulla cinetica degli equilibri presenti in soluzione, ma anche per confermare i risultati potenziometrici. Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei sistemi Ba^{2+} -macrophospho e Ba^{2+} -oddm, acquisiti al variare del pH, sono rappresentati rispettivamente in **Figura 5.26** e in **Figura 5.28**.

Per lo studio del sistema Ba^{2+} - macrophospho è stata impiegata anche la spettroscopia $^{31}\text{P-NMR}$ con disaccoppiamento del protone. Gli spettri acquisiti a diversi pH sono riportati in **Figura 5.27**.

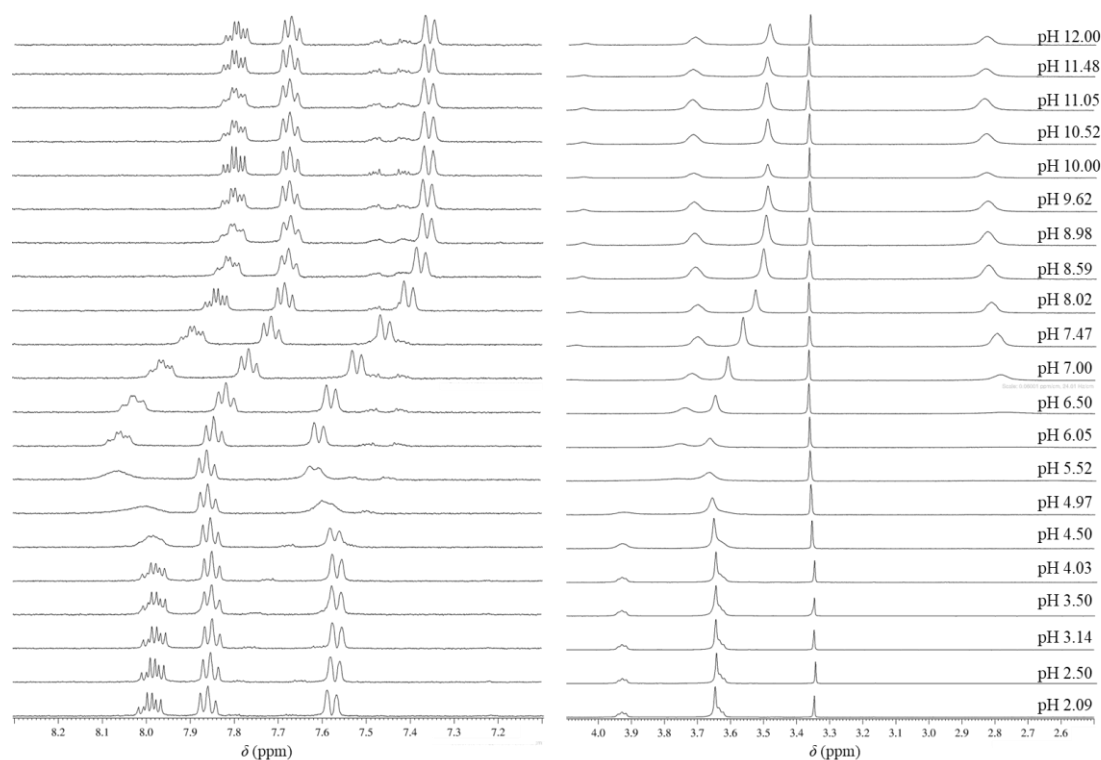


Figura 5.26 Spettri $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente macrophospho 10^{-3} M e BaCl_2 10^{-3} M. A sinistra è riportato l'intervallo di *chemical shift* dei protoni aromatici, a destra l'intervallo di *chemical shift* dei protoni alifatici. Il segnale a 3.34 ppm è dovuto alla presenza di tracce di metanolo.

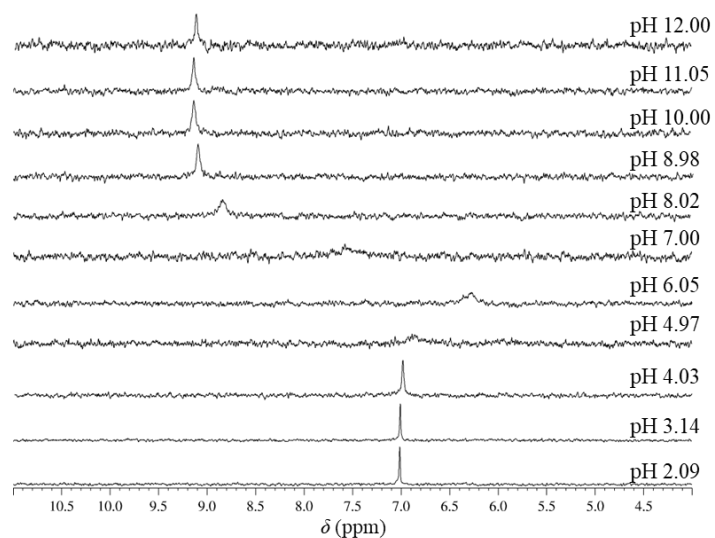


Figura 5.27 Spettri ^{31}P -NMR (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente macrophospho 10^{-3} M e BaCl_2 10^{-3} M.

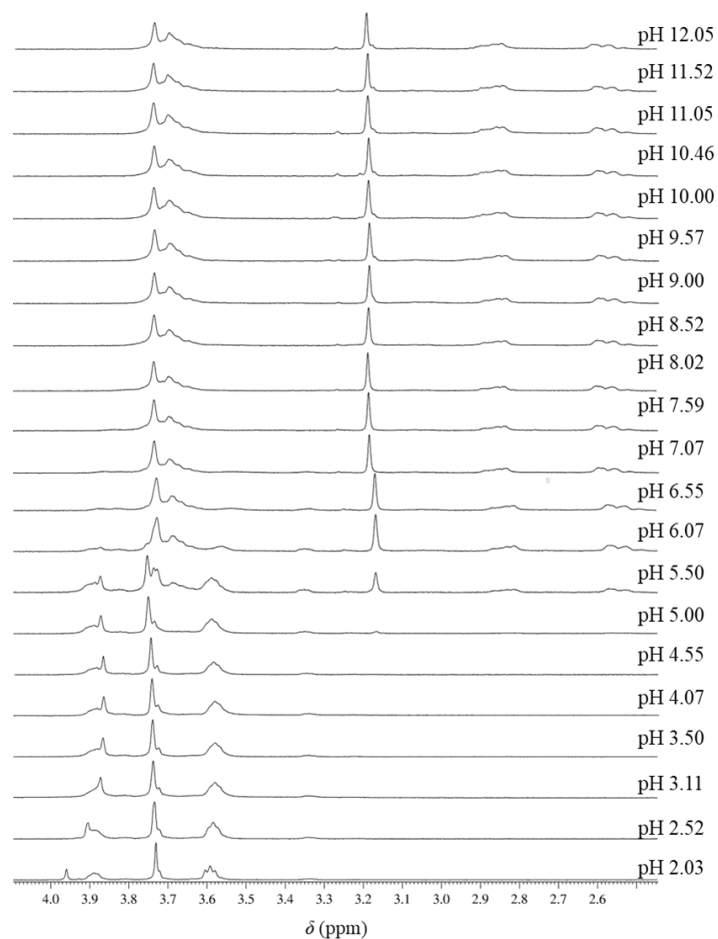


Figura 5.28 Spettri ^1H -NMR (400 MHz, 298 K, 10% D_2O + 90% H_2O) a diversi valori di pH di una soluzione contenente oddm 10^{-3} M e BaCl_2 10^{-3} M.

Gli spettri registrati per i sistemi Ba^{2+} -macrophospho e Ba^{2+} -oddm differiscono dagli spettri del solo legante, in accordo con la presenza dei complessi, solo a determinate condizioni di pH ($pH > 4.5$ con macrophospho, $pH > 5$ con oddm). A pH più acidi, invece, gli spettri sono uguali a quelli del solo legante, indicando che in queste condizioni i complessi non sono stabili.

Per il sistema Ba^{2+} -macrophospho le costanti di complessamento prevedono che sia presente in soluzione una quantità significativa di Ba^{2+} libero (e di conseguenza anche di legante libero) a pH circa 5-7. Osservando gli spettri registrati, però, in questo intervallo di pH non si è in grado di discriminare i segnali del complesso dai segnali del legante libero: questo suggerisce che le specie siano in rapido scambio tra loro rispetto al *time scale* dell'NMR e che i segnali visibili siano mediati tra quelli delle singole specie. La situazione opposta si verifica nel caso del sistema Ba^{2+} -oddm, per cui è possibile distinguere lo spettro del legante fino a $pH \sim 5$, mentre da $pH \sim 7$ lo spettro visibile è quello del complesso. A pH intermedi (circa 5-7) negli spettri si osservano contemporaneamente i segnali sia del legante libero (che diminuiscono in intensità all'aumentare del pH) sia del complesso (che aumentano in intensità all'aumentare del pH). Ciò indica uno scambio lento tra il legante libero e il complesso rispetto al *time scale* dell'NMR.

Per il sistema Ba^{2+} -macrophospho l'aspetto generale degli spettri dei complessi e l'attribuzione dei segnali rispecchiano quelli del solo legante: anche in questo caso, infatti, nella regione aromatica si distinguono il multipletto del CH in orto al gruppo fosfonico, il tripletto associato al CH in meta rispetto al fosfonato e il doppietto attribuito al CH in para; nella regione alifatica il singoletto attribuito al metilene che funge da *linker* tra l'anello centrale del chelante e l'acido 2-piridilfosfonico (visibile solo a $pH > 7$), i due tripletti attribuiti ai due metileni OCH_2CH_2N e OCH_2CH_2N , e il singoletto dei metileni OCH_2CH_2O .

Per il sistema Ba^{2+} -oddm, l'attribuzione dei segnali ai rispettivi nuclei è più complicata in quanto i picchi sono molto allargati e sovrapposti tra loro. Nell'intervallo $2.03 < pH < 5.00$ lo spettro è coincidente con quello del legante libero. Da $pH 5.50$ in poi si osserva la comparsa dello spettro del complesso, in cui il tripletto dei protoni adiacenti all'azoto dell'anello (OCH_2CH_2N) è sdoppiato in due multipletti allargati di area uguale. Questi due segnali accoppiano tra loro, come dimostrato dallo spettro bidimensionale TOCSY (**Figura 5.29**), pertanto sono stati attribuiti ai protoni assiali ed equatoriali che per motivi conformazionali risultano non più magneticamente equivalenti.

Il singoletto intenso che compare a ~ 3.2 ppm a $pH \geq 5.50$ corrisponde al picco incognito osservato negli spettri del solo legante: nel caso del sistema Ba^{2+} -oddm, questo si vede a partire da valori di pH molto inferiori perché la molecola associata a questo segnale potrebbe essere anch'essa in grado di complessare il catione metallico.

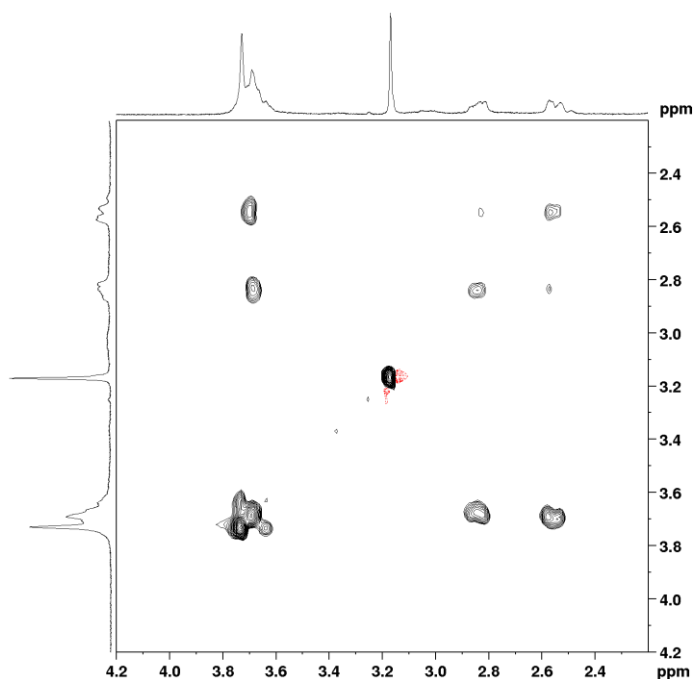


Figura 5.29 Spettro TOCSY (400 MHz, 298 K, 10% D₂O + 90% H₂O) a pH 9.00 di una soluzione contenente oddm 10⁻³ M e BaCl₂ 10⁻³ M. Sono riportati solo gli intervalli di *chemical shift* in cui sono presenti i segnali.

5.4.3.1 Andamento dei *chemical shift* dei segnali in funzione del pH

Gli andamenti dei *chemical shift* al variare del pH per i sistemi Ba²⁺-macrofosfo e Ba²⁺-oddm sono riportati rispettivamente in **Figura 5.30** e in **Figura 5.31**.

Per il sistema Ba²⁺-macrofosfo, tutti i segnali, sia ¹H sia ³¹P, subiscono variazioni più o meno marcate al variare del pH. Questo vale anche per il singoletto attribuito ai metileni OCH₂CH₂O dell'anello, diversamente dagli spettri del solo legante. Ciò conferma in primo luogo la presenza di complessi in soluzione, e inoltre permette di assumere che tutti gli atomi donatori del macrofosfo (anche gli O dell'anello) siano coinvolti nel complessamento del Ba²⁺, o comunque che l'intera molecola risenta di significativi cambiamenti conformazionali quando si lega a Ba²⁺. Per alcuni segnali la variazione di *chemical shift* è estremamente netta a pH ~ 5, indicando che intorno a questo pH avviene il complessamento del Ba²⁺. A pH > 5 invece l'andamento è più graduale, mentre a pH > 8-9 i *chemical shift* di tutti i segnali rimangono costanti, in accordo con il modello di speciazione ricavato mediante potenziometria che prevede la presenza di tre complessi diversamente protonati. Come nel caso del legante libero, il segnale del fosforo è sempre unico, indice della simmetria della molecola che viene mantenuta anche in presenza del Ba²⁺ e al variare del pH.

Per il sistema Ba²⁺-oddm, invece, l'andamento dei *chemical shift* in funzione del pH mostra nettamente la distinzione tra lo spettro del legante e quello del complesso. Il singoletto attribuito

ai metileni $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$ dell'anello, così come nel solo legante, non subisce significative variazioni al variare del pH; dunque, non viene riportato nella figura sottostante.

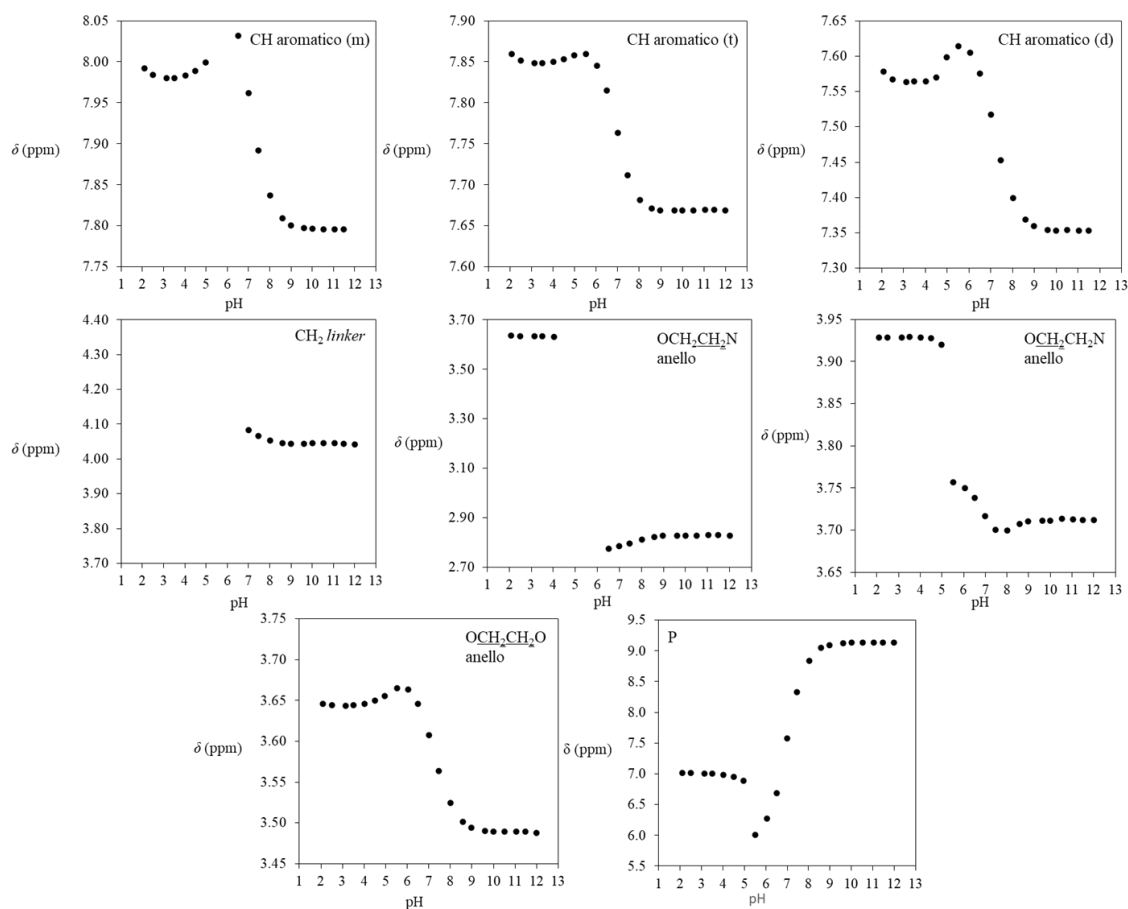


Figura 5.30 Andamenti dei *chemical shift* dei protoni e del ^{31}P del sistema Ba^{2+} -macrophospho al variare del pH.

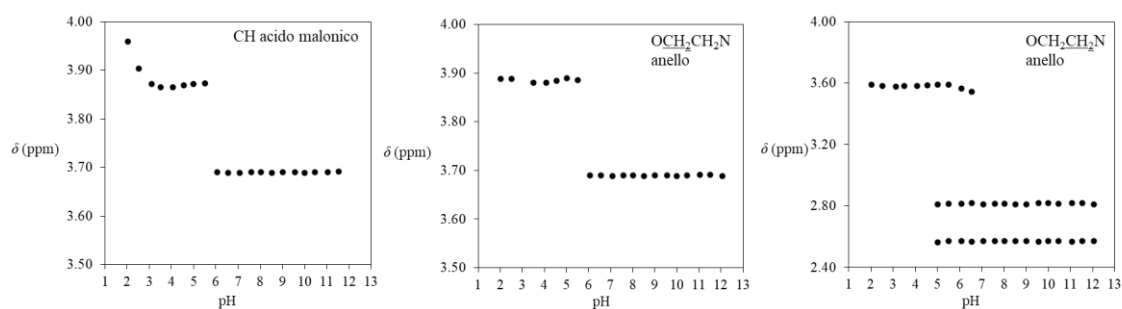


Figura 5.31 Andamenti dei *chemical shift* dei protoni del sistema Ba^{2+} -oddm al variare del pH.

Anche in questo caso, come per Ba^{2+} -macrophospho, la variazione di *chemical shift* tra legante libero e complesso è molto netta, ma i segnali del complesso rimangono sempre a *chemical shift* costanti al variare del pH. Pur non potendo confrontare i dati con quelli ottenuti mediante un'altra tecnica, questo indica che tra Ba^{2+} e oddm si forma un unico complesso che non subisce fenomeni

di protonazione/deprotonazione. È stato ipotizzato che il complesso sia $[\text{BaL}]^{2-}$ (stechiometria 1:1 metallo:legante) per analogia ed esperienza con altri complessi metallici di chelanti macrociclici.

Una volta ipotizzato questo modello di speciazione, l'elaborazione con MATLAB per l'ottenimento della costante di complessamento del sistema Ba^{2+} -oddm è stata eseguita considerando la variazione di intensità dei segnali dello spettro attribuiti al complesso (è stato escluso il picco comparso a pH 5.50 a ~ 3.2 ppm). Dagli spettri riportati in **Figura 5.28** è stato difficile ricavare le intensità di ciascun segnale, per la sovrapposizione e la mancata struttura fine dei segnali. Pertanto, sono state usate le intensità del solo nucleo $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, che per il complesso è splittato nei due segnali già commentati. La costante di complessamento $\log\beta$ tra Ba^{2+} e oddm per il complesso $[\text{BaL}]^{2-}$ è stata ottenuta come media delle singole costanti calcolate per ciascuno dei due segnali sdoppiati ed è risultata pari a 7.26 ± 0.22 . Dal confronto con il valore riportato in letteratura, per cui $\log\beta_{[\text{BaL}]^{2-}}$ risulta pari a 9.76, si nota un evidente disaccordo. [55]

La discrepanza potrebbe essere attribuita al fatto che il dato ottenuto in questo lavoro tiene conto della degradazione del chelante a pH acidi, mentre nel lavoro disponibile in letteratura non viene riportato questo comportamento, per cui si deve desumere che la degradazione del chelante non sia stata presa in considerazione. [55]

5.4.4 Diagrammi di distribuzione

I diagrammi di distribuzione dei sistemi Ba^{2+} -macrophospho e Ba^{2+} -oddm sono stati tracciati ponendo $C_L = C_M = 10^{-3}$ M in modo da rispecchiare le condizioni sperimentali adottate, e sono riportati rispettivamente in **Figura 5.32** e in **Figura 5.33**.

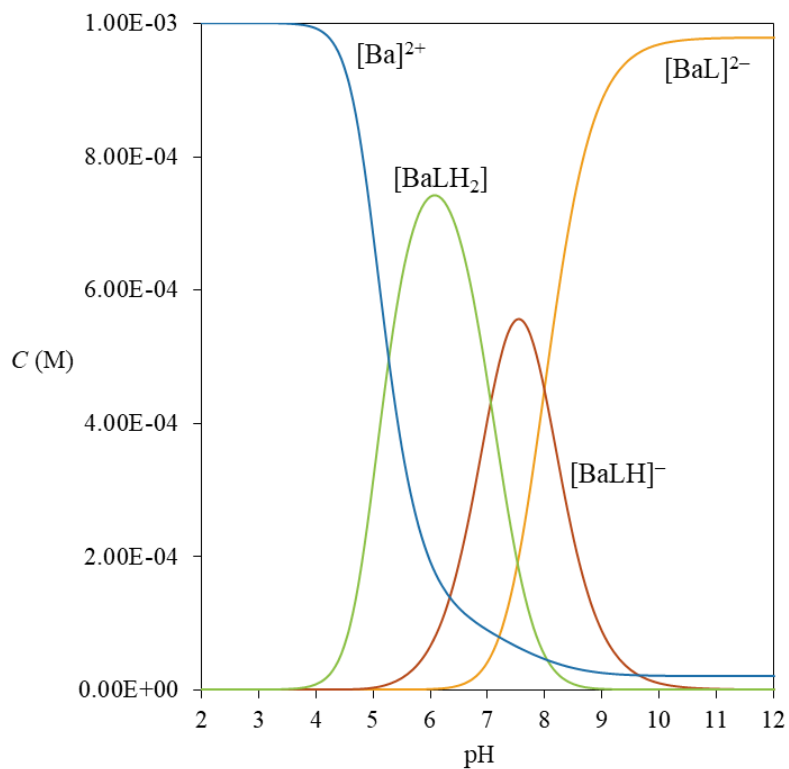


Figura 5.32 Diagramma di distribuzione del sistema Ba²⁺-macrophospho.

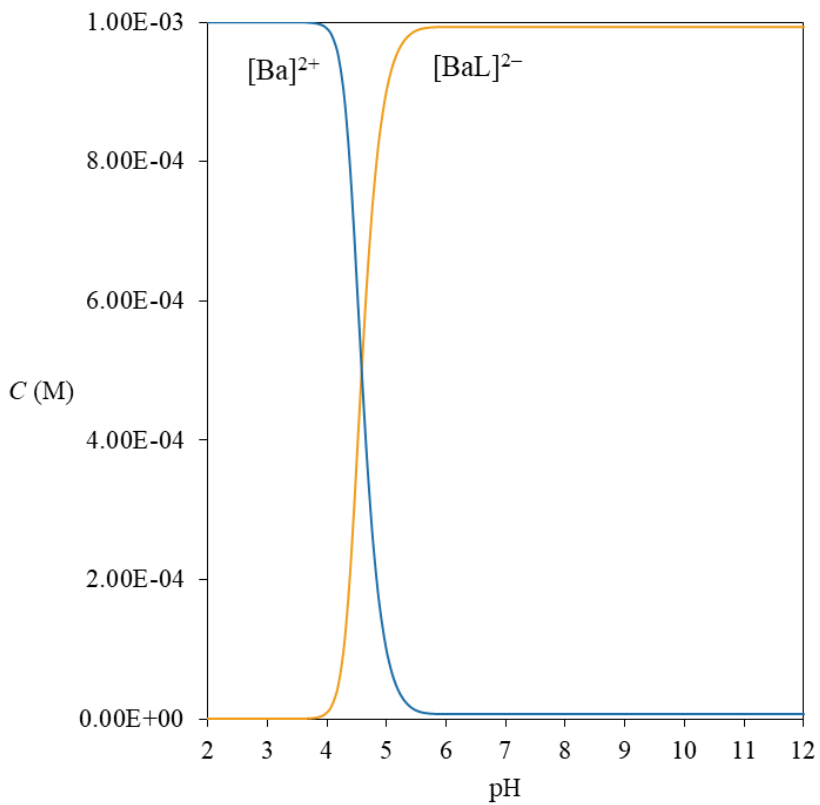


Figura 5.33 Diagramma di distribuzione del sistema Ba²⁺-oddm.

CAPITOLO 6 – CONCLUSIONI

Lo scopo principale del presente lavoro di tesi è di porre delle basi solide per lo sviluppo di nuovi radiofarmaci a base di ^{223}Ra con indicazioni terapeutiche volte alla cura di tumori non ossei, per i quali invece è già commercialmente disponibile il cloruro di radio-223 (^{223}Ra] RaCl_2 , Xofigo[®]). Un passaggio chiave per lo sviluppo di nuovi radiofarmaci *metal-based* è la scelta opportuna di chelanti che garantiscano la formazione di complessi termodinamicamente stabili e cineticamente inerti con il radionuclide scelto, per evitarne la dissociazione *in vivo*. In questo lavoro si sono quindi proposti dei chelanti e se ne sono studiate le proprietà termodinamiche (e limitatamente anche quelle cinetiche) dei loro complessi con Ba^{2+} , il surrogato stabile di Ra^{2+} .

Lo studio termodinamico dei chelanti studiati in questo lavoro di tesi è stato condotto per via potenziometrica, UV-Vis e NMR; mediante queste tecniche sono state ottenute sia le costanti di acidità dei leganti ($\text{p}K_a$) sia le costanti di formazione ($\log\beta$) dei complessi Ba^{2+} -chelante.

La prima fase di questo lavoro si è concentrata sullo studio di una serie di leganti bidentati che sono stati precedentemente selezionati in base alle rispettive energie di legame con Ba^{2+} e Ra^{2+} calcolate in uno studio DFT (effettuato in collaborazione con il gruppo della professoressa Laura Orian).

Tra questi l'1,2-HOPO, l'acido picolinico e l'acido malonico si sono rivelati i più promettenti poiché, oltre a dare complessi caratterizzati da una buona stabilità termodinamica (relativamente agli altri leganti considerati), a pH fisiologico (~ 7.4) sono completamente deprotonati e quindi $\log\beta'$ risulta uguale a $\log\beta$. Pertanto, il nostro gruppo di ricerca ha deciso di sfruttare alcuni di questi leganti per funzionalizzare il macrociclo Kryptofix 22.

I due chelanti multidentati studiati nella seconda parte di questo lavoro, macrophospho e oddm, sono stati sintetizzati funzionalizzando il Kryptofix 22 sui due atomi di azoto, rispettivamente con due molecole di acido 2-piridilfosfonico e con due molecole di acido malonico.

Per lo studio del sistema Ba^{2+} -macrophospho sono state integrate le informazioni ottenute mediante potenziometria e uno studio NMR. La potenziometria ha consentito di determinare il numero e la stechiometria dei complessi, ovvero la speciazione, con le relative costanti di complessamento, oltre che le costanti di acidità del legante. Mediante la spettroscopia NMR è stato possibile principalmente valutare in modo qualitativo la cinetica degli equilibri in cui le diverse specie sono coinvolte. Dalle costanti di complessamento si evince che a $\text{pH} < 7$ sia prevista la presenza di Ba^{2+} libero e di legante libero in soluzione. A questi valori di pH, però, non è possibile distinguere lo spettro del complesso dallo spettro del solo legante: questo indica che le specie sono in rapido scambio tra loro rispetto al *time scale* dell'NMR, e quindi suggerisce che i complessi siano caratterizzati da una certa labilità cinetica.

Per lo studio del sistema Ba^{2+} -macrophospho è stata fondamentale la spettroscopia NMR. Purtroppo, a causa di un comportamento imprevisto dell'oddm in ambiente acido, lo studio sia

del legante che del complesso in soluzione per via potenziometrica non ha condotto a risultati affidabili. È stato ipotizzato che avvenga la decarbossilazione delle due molecole di acido malonico nei bracci laterali in ambiente acido. In potenziometria questo processo non è rilevabile, pertanto le costanti ottenute terrebbero conto anche della specie generata dalla degradazione della molecola. Al contrario, all’NMR è possibile discriminare, sia negli spettri del solo legante sia in quelli del complesso, un picco intenso (singoletto) nella zona dei protoni alifatici. Per ottenere dei risultati quanto più affidabili possibile è stato sufficiente non considerare gli andamenti di *chemical shift* di questo picco, ma elaborare solo i segnali attribuiti all’oddm e al complesso Ba²⁺-oddm. Oltre alla determinazione delle costanti di dissociazione acida e della costante di complessamento, anche in questo caso l’NMR è stato utile per valutare la dinamica degli equilibri che avvengono in soluzione: per il sistema Ba²⁺-oddm è stato possibile distinguere lo spettro del legante da quello del complesso nell’intervallo di pH in cui sono presenti entrambi. Le specie in soluzione sono quindi sottoposte ad uno scambio lento rispetto al *time scale* dell’NMR; perciò, ci si può aspettare che il complesso Ba²⁺-oddm sia meno labile di quelli tra Ba²⁺ e macrophospho. Il passaggio successivo (e finale) di questa tesi è il confronto tra la forza complessante dei chelanti indagati nei confronti di Ba²⁺. Tale confronto non può essere condotto dal semplice confronto dei valori di $\log\beta$, in quanto questi non tengono conto degli equilibri acido-base dei leganti (quindi delle costanti di acidità), e non sono comunque confrontabili in caso di stechiometrie metallo-legante differenti. Un confronto rigoroso della forza di chelanti differenti nei confronti di uno stesso ione metallico può essere invece condotto calcolando il pM. Questo parametro termodinamico, calcolato sulla base delle pK_a e delle $\log\beta$, è definito come il logaritmo negativo della concentrazione di metallo libero in soluzione ($pM = -\log[M^{m+}]$) ed esprime quindi la misura in cui il metallo è complessato dal legante in determinate condizioni di concentrazioni e pH. Valori elevati di pM corrispondono ad una maggiore stabilità dei complessi metallo-legante, poiché indicano che la concentrazione di metallo libero in soluzione è minore. Il pM dipende da diversi fattori, tra cui il pH, la concentrazione di legante (C_L) e la concentrazione di metallo (C_M) scelti per il calcolo, oltre che dalle costanti di equilibrio del sistema. Generalmente in ambito di radiofarmaci il pM si calcola a pH 7.4 e ponendo $C_L = 10^{-5}$ M e $C_M = 10^{-6}$ M. [27], [53], [76] In **Tabella 6.1** è riportato l’andamento del pM (che in questo caso viene indicato come pBa) a pH 7.4 per i complessi di Ba²⁺ con i chelanti macropa, macrophospho e oddm.

Tabella 6.1 Valori di pBa calcolati a pH 7.4 con i chelanti macropa, macrophospho e oddm ($C_L = 10^{-5}$ M, $C_M = 10^{-6}$ M).

Legante	pBa
macropa	11.69 [75]
macrophospho	7.07
oddm	7.29

Dal confronto tra i valori di pBa ottenuti per i chelanti multidentati studiati in questo lavoro e il valore di pBa del macropa riportato in letteratura, si conclude che il macrophospho e l'oddm formano complessi molto meno stabili termodinamicamente rispetto al macropa (di ~ 4 ordini di grandezza).

Per l'oddm la minor capacità chelante osservata potrebbe essere dovuta alla parziale degradazione del legante in soluzione, che diminuisce la quantità di legante disponibile per il complessamento. I risultati ottenuti per entrambi i chelanti non sembrano ottimali da un punto di vista termodinamico per il complessamento di Ba^{2+} , se confrontati con il macropa. L'effettiva possibilità di usarli come complessanti per applicazioni radiofarmaceutiche sarà però valutata mediante studi di radiomarcatura con ^{223}Ra , previsti nei prossimi mesi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Shende and S. Gandhi, “Current strategies of radiopharmaceuticals in theranostic applications,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 64. Editions de Sante, Aug. 01, 2021.
- [2] F. B. Payolla, A. C. Massabni, and C. Orvig, “Radiopharmaceuticals for diagnosis in nuclear medicine: A short review,” *Ecletica Quimica*, vol. 44, no. 3, pp. 11–19, 2019.
- [3] S. Salih, A. Alkatheeri, W. Alomaim, and A. Elliyanti, “Radiopharmaceutical Treatments for Cancer Therapy, Radionuclides Characteristics, Applications, and Challenges,” *Molecules*, vol. 27, no. 16. MDPI, Aug. 01, 2022.
- [4] J. S. Lewis, A. D. Windhorst, and B. M. Zeglis, *Radiopharmaceutical Chemistry*. Springer Nature Switzerland, 2019.
- [5] K. Jain Editor, “Drug Delivery Systems.” [Online]. Available: <http://www.springer.com/series/7651>
- [6] A. Gottardo, J. Javier, V. Dobon, R. Depalo, and A. Boso, “Introduzione alla Fisica Nucleare,” Istituto Nazionale di Fisica Nucleare, Jun. 2022.
- [7] A. Vértes, S. Nagy, Z. Klencsar, R. G. Lovas, and F. Rosch, *Handbook of Nuclear Chemistry*, Second Edi. Springer, 2011.
- [8] M. Pfützner, M. Karny, L. V. Grigorenko, and K. Riisager, “Radioactive decays at limits of nuclear stability,” *Rev Mod Phys*, vol. 84, no. 2, pp. 567–619, Apr. 2012.
- [9] D. L. Bailey, J. L. Humm, A. Todd-Pokropek, and A. Van Aswegen, *Nuclear Medicine Physics: A Handbook for Teachers and Students*. Austria: International Atomic Energy Agency, 2014.
- [10] NuBASE 2020, “Nuclide Chart.”
- [11] A. Sonzogni, “NNDC Chart of Nuclides,” EDP Sciences, 2007.
- [12] Fanti M, “Fisica Generale,” in *Fisica Generale*, Milano, 2021.
- [13] H. H. Coenen *et al.*, “Open letter to journal editors on: International Consensus Radiochemistry Nomenclature Guidelines,” *Annals of Nuclear Medicine*, vol. 32, no. 3. Springer Tokyo, pp. 236–238, Apr. 01, 2018.
- [14] N. Demello, “Chem 192: Introductory Chemistry,” LibreTexts. [Online]. Available: <https://LibreTexts.org>
- [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,” *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, vol. 8, no. 1. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, Dec. 01, 2023.
- [16] Consiglio delle comunità europee, “Gazzetta ufficiale delle Comunità europee,” Bruxelles, May 1989.

- [17] “I radiofarmaci,” Agenzia Italiana del Farmaco.
- [18] World National Association, “Radioisotopes in Medicine,” 2023.
- [19] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021.
- [20] International Agency for Research on Cancer, “Estimated number of new cases in 2020.” [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0
- [21] International Agency for Research on Cancer, “Estimated number of deaths in 2020.” [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0
- [22] International Agency for Research on Cancer, “Estimated number of new cases from 2020 to 2040.” [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars>
- [23] International Agency for Research on Cancer, “Estimated number of deaths from 2020 to 2040.” [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bars?types=1>
- [24] S. St. James *et al.*, “Current status of radiopharmaceutical therapy,” *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 109, no. 4. Elsevier Inc., pp. 891–901, Mar. 15, 2021.
- [25] Elena Meli, *La terapia con radioligandi in oncologia*. RPP Italia, 2022.
- [26] Duccio Volterrani, Paola Anna Erba, Giuliano Mariani, and F. Orsini, *Fondamenti di medicina nucleare*. Springer-Verlag Italia, 2010.
- [27] T. I. Kostelnik and C. Orvig, “Radioactive main group and rare earth metals for imaging and therapy,” *Chemical Reviews*, vol. 119, no. 2. American Chemical Society, pp. 902–956, Jan. 23, 2019.
- [28] S. Bhattacharyya and M. Dixit, “Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals,” *Dalton Transactions*, vol. 40, no. 23. pp. 6112–6128, Jun. 21, 2011.
- [29] S. C. Chow, “Bioavailability and bioequivalence in drug development,” *Wiley Interdiscip Rev Comput Stat*, vol. 6, no. 4, pp. 304–312, 2014.

- [30] 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.
- [31] K. Vermeulen, M. Vandamme, G. Bormans, and F. Cleeren, "Design and Challenges of Radiopharmaceuticals," *Seminars in Nuclear Medicine*, vol. 49, no. 5. W.B. Saunders, pp. 339–356, Sep. 01, 2019.
- [32] Federazione Cure Palliative, "Cure Palliative."
- [33] D. A. Smith, K. Beaumont, T. S. Maurer, and L. Di, "Relevance of Half-Life in Drug Design," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 61, no. 10. American Chemical Society, pp. 4273–4282, May 24, 2018.
- [34] M. R. Kilbourn and P. J. H. Scott, *Handbook of radiopharmaceuticals : methodology and applications*.
- [35] D. Gaynor and D. M. Griffith, "The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: Beyond platinum," *Dalton Transactions*, vol. 41, no. 43. Royal Society of Chemistry, pp. 13239–13257, Nov. 21, 2012.
- [36] S. Franchi, V. Di Marco, "Studio della formazione di complessi di Ag(I) e Cd(II) con derivati solforati di poliazacicloalcani (progetto ISOLPHARM)".
- [37] E. W. Price and C. Orvig, "Matching chelators to radiometals for radiopharmaceuticals," *Chemical Society Reviews*, vol. 43, no. 1. Royal Society of Chemistry, pp. 260–290, Jan. 07, 2014.
- [38] A. Dash, S. Chakraborty, M. R. A. Pillai, and F. F. R. Knapp, "Peptide receptor radionuclide therapy: An overview," *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, vol. 30, no. 2. Mary Ann Liebert Inc., pp. 47–71, Mar. 01, 2015.
- [39] P. Kręcis, K. Czarnecka, L. Królicki, E. Mikiciuk-Olasik, and P. Szymański, "Radiolabeled peptides and antibodies in medicine," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 32, no. 1. American Chemical Society, pp. 25–42, Jan. 20, 2021.
- [40] C. A. Boswell and M. W. Brechbiel, "Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view," *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 34, no. 7. pp. 757–778, Oct. 2007.
- [41] "Anticorpi monoclonali (MAB)," ISSalute.
- [42] S. Adak, R. Bhalla, K. K. Vijaya Raj, S. Mandal, R. Pickett, and S. K. Luthra, "Radiotracers for SPECT imaging: Current scenario and future prospects," *Radiochimica Acta*, vol. 100, no. 2. pp. 95–107, Feb. 2012.
- [43] K. B. Contractor and E. O. Aboagye, "Monitoring predominantly cytostatic treatment response with ¹⁸F-FDG PET," *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 50, no. SUPPL. 1. May 01, 2009.

- [44] G. Sgouros, L. Bodei, M. R. McDevitt, and J. R. Nedrow, “Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 19, no. 9. Nature Research, pp. 589–608, Sep. 01, 2020.
- [45] Faiçal. Azaiez *et al.*, *Nuclear physics for medicine*. European Science Foundation, 2014.
- [46] J. R. Ballinger, “Theranostic radiopharmaceuticals: established agents in current use,” 2018.
- [47] J. P. Adloff, “The laboratory notebooks of Pierre and Marie Curie and the discovery of polonium and radium”.
- [48] G. Henriksen, P. Hoff, and R. H. Larsen, “Evaluation of potential chelating agents for radium,” 2002.
- [49] J. Norum, E. R. Traasdahl, A. Totth, C. Nieder, and J. A. Olsen, “Health Economics and Radium-223 (Xofigo®) in the Treatment of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer (mCRPC): A Case History and a Systematic Review of the Literature,” *Glob J Health Sci*, vol. 8, no. 4, pp. 1–9, Jul. 2015.
- [50] 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.
- [51] L. Florimonte, L. Dellavedova, and L. S. Maffioli, “Radium-223 dichloride in clinical practice: a review,” *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 43, no. 10. Springer Berlin, pp. 1896–1909, Sep. 01, 2016.
- [52] P. L. Brown, A. V. Matyskin, and C. Ekberg, “The aqueous chemistry of radium,” *Radiochim Acta*, vol. 110, no. 6–9, pp. 505–513, Jun. 2022, doi: 10.1515/ract-2021-1141.
- [53] 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.
- [54] D. J. Fiszbein *et al.*, “Tuning the kinetic inertness of Bi³⁺ complexes: the impact of donor atoms on diaza-18-crown-6 ligands as chelators for ²¹³Bi Targeted Alpha Therapy,” *Inorg Chem*, vol. 60, no. 12, pp. 9199–9211, Jun. 2021.
- [55] 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 Sr²⁺/Ca²⁺ and Pb²⁺/Zn²⁺ Selectivities in Aqueous Solution,” 1993.
- [56] L. Burai, É. Tóth, S. Seibig, R. Scopelliti, and A. E. Merbach, “Solution and solid-state characterization of Eu(II) chelates: A possible route towards redox responsive MRI contrast agents,” *Chemistry - A European Journal*, vol. 6, no. 20, pp. 3761–3770, Oct. 2000.
- [57] Bertini I., Caglioti L., Faita G., Giusto D., and Ugo R., “Enciclopedia della chimica,” in *Enciclopedia della chimica*, 1st ed., vol. 3, 1977.

- [58] V. Di Marco, “Studio della formazione di complessi tra alluminio e molecole di interesse ambientale, biologico e farmaceutico”, Tesi di dottorato, Università di Padova, 1998.
- [59] Bacalini M.V. and D’Errico S., *L’esame di stato per chimici*, Terza. EdiSES edizioni.
- [60] Silberberg S.M., *CHIMICA: La natura molecolare della materia e delle sue trasformazioni*, Terza. OO, 2004.
- [61] V. Domenici and A. Veracini, “Risonanza Magnetica Nucleare: passato, presente e futuro di una tecnica spettroscopica che ha cambiato la chimica e non solo. Parte II.”
- [62] O. Kühl, “Phosphorus-31 NMR spectroscopy: a concise introduction for the synthetic organic and organometallic chemist”. Springer, 2008.
- [63] M. Sturlese, “The anti-apoptotic proteins DJ-1 and Mcl-1: molecular basis of different protein-ligand interactions leading to apoptosis,” Tesi di dottorato, Università di Padova, 2011.
- [64] C. Santi, “Spettroscopia 2D-NMR.” [Online]. Available: www.metodifisici.net
- [65] The MathWorks, “Coefficient of Determination (R-Squared).”
- [66] James N. Butler, *Carbon dioxide equilibria and their applications*. Lewis Publishers, 1991.
- [67] V. Di Marco, G. Bombi, and A. Tapparo, “*J. Chem. Soc.*”, 2427, 1999.
- [69] P. Buglyo, E. Kiss, and T. Kiss, “*Inorg. Chirn. Acta*”, 306, 174, 2000.
- [70] V. Manjula and P. Bhattacharya, “*J. Inorg. Biochem.*”, 41, 63, 1991.
- [71] M. Jezowska-Bojczuk and K. et al Hozlowski, “*J. Chem. Soc., Dalton Trans*”, 2903, 1990.
- [72] D. Dash, M. Baral, and B. K. Kanungo, “Synthesis of a new tetradentate chelator with 1-Hydroxy-2(1H)-pyridinone (HOPO) as chelating unit: Interaction with Fe (III), solution thermodynamics and DFT studies,” *J Mol Struct*, vol. 1222, Dec. 2020.
- [73] T. Jakusch, K. Gajda-Schranz, and T. Kiss, “*J. Inorg. Biochem*”, 100, 1521, 2006.
- [74] T. W. Clarkson, “*Inorganic and organometal pesticides*,” 2001.
- [75] N. A. Thiele, S. N. Macmillan, and J. J. Wilson, “Rapid dissolution of BaSO₄ by macropa, an 18-membered macrocycle with high affinity for Ba²⁺,” *J Am Chem Soc*, vol. 140, no. 49, pp. 17071–17078, Dec. 2018.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il prof. Valerio Di Marco per il suo costante supporto e per i suoi consigli e insegnamenti che mi hanno permesso di svolgere al meglio questo progetto di tesi.

Ringrazio Sara Franchi, a cui sono e sarò sempre grata, per la sua pazienza, disponibilità e impegno con cui mi ha guidata in questo percorso. Grazie di cuore per avermi supportata in questo anno di lavoro.