



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**STUDIO DELLA FORMAZIONE DI COMPLESSI DI
1,4,7-TRIS[2-(METILSULFANIL)ETIL]-1,4,7-TRIAZACICLONONANO
CON Ag(I), Cu(II) e Cu(I)**

Relatore: Prof. Valerio Di Marco

Controrelatore: Prof. Fabrizio Mancin

LAUREANDO: Alessandro Del Vecchio

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

Capitolo 1 INTRODUZIONE	1
Radionuclidi	1
Storia.....	1
Struttura nucleare.....	3
Decadimenti radioattivi	6
Radiofarmaci	8
Progettazione radiofarmaci	10
Radiofarmaci per la diagnostica	12
Tomografia ad emissione di positroni.....	12
Tomografia computerizzata ad emissione di singolo fotone.....	13
Radiofarmaci per la terapia	15
Radiofarmaci per la teranostica	16
Produzione di radionuclidi	16
Progetto SPES	17
Progetto ISOLPHARM	18
Argento-111.....	19
Chelanti per argento-111	20
Radioisotopi del rame.....	21
Chelanti per rame-67 rame-64	22
Riduzione <i>in vivo</i> di Cu ²⁺	25
Capitolo 2 SCOPO DELLA TESI	27
Capitolo 3 METODICHE STRUMENTALI UTILIZZATE	33
Potenziometria.....	33
Elettrodo di vetro	34
Controllo della forza ionica	36
Determinazione costanti di formazione	37

Principio del metodo	37
Programma PITMAP per l'elaborazione dei dati potenziometrici.....	39
Pesatura dei dati sperimentali.....	40
Valutazione della bontà del <i>fitting</i>	41
Il problema dei falsi minimi	42
Scelta del modello di speciazione	42
Controllo dei sistemi di misura.....	43
Limiti del metodo potenziometrico	44
Spettroscopia NMR	45
Interferenza del protone dell'acqua	48
Spettrofotometria UV-vis	49
Radiazione elettromagnetica.....	49
Interazione radiazione-materia: legge di Lambert Beer	50
Spettri UV-vis.....	51
Studio degli equilibri di complessamento.....	52
Studio delle cinetiche di formazione	52
Vantaggi e limiti della spettrofotometria UV-vis	53
Voltammetria ciclica	53
Elettrolita di supporto	56
L'interfaccia dell'elettrodo	57
Gli elettrodi.....	58
Elaborazione dei dati voltammetrici.....	59
Capitolo 4 PARTE SPERIMENTALE	61
Strumentazione	61
Reagenti.....	62
Preparazione delle soluzioni.....	62
Soluzioni di HNO ₃	63
Soluzioni di NaOH	63
Soluzioni degli ioni metallici e dei leganti	64
Procedure sperimentali	64

Titolazioni potenziometriche	64
Calibrazione dell'elettrodo di vetro.....	65
Standardizzazione della soluzione di HNO ₃	65
Standardizzazione della soluzione di NaOH.....	66
Titolazioni delle soluzioni di leganti.....	66
Conservazione degli elettrodi.....	67
Spettroscopia NMR	67
Spettrofotometria UV-vis	68
Cinetica di complessamento.....	68
Costanti di stabilità.....	68
Stechiometria Cu ²⁺ -NO ₃ S.....	69
Voltammetria ciclica.....	69
Voltammetrie cicliche del bianco.....	70
Voltammetria cicliche dei complessi rame-NO ₃ S.....	70
Capitolo 5 RISULTATI E DISCUSSIONE	73
Standardizzazioni	73
Standardizzazione di HNO ₃	73
Calibrazione dell'elettrodo	73
Standardizzazione di NaOH	74
Costanti di acidità di NO ₃ S.....	75
Potenziometria con elettrodo di vetro.....	76
Spettroscopia NMR	77
Andamento del <i>chemical shift</i> dei segnali in funzione del pH.....	79
Complessi di Ag ⁺	85
Analisi qualitativa della cinetica di complessamento.....	85
Analisi termodinamica.....	86
Determinazione della costante di complessamento a stadi	90
Determinazione delle costanti di complessamento globali	92
Complessi di Cu ²⁺	95
Analisi qualitativa della cinetica di complessamento.....	95

Analisi termodinamica.....	97
Determinazione delle costanti di complessamento a stadi	99
Determinazione della stechiometria dei complessi	100
Determinazione delle costanti di complessamento globali	103
Complessi Ag ⁺ -TACN-Bu e Cu ²⁺ - TACN-Bu	104
Ag ⁺ -TACN-Bu	104
Cinetiche di complessamento Cu ²⁺ -TACN-Bu	105
Studio termodinamico Cu ²⁺ -TACN-Bu.....	105
Complessi di Cu ⁺ mediante voltammetria ciclica.....	109
Capitolo 6 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE	113
APPENDICE 1	117
BIBLIOGRAFIA.....	121

ABBREVIAZIONI

<i>A</i>	Numero di massa o numero di nucleoni
BFC	<i>Bifunctional chelator</i>
CB-DO2A	4,10-bis(carbossimetil)-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecano
CB-TE2A	4,11-bis(carbossimetil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]esadecano
CFSE	<i>Crystal Field Stabilization Energy</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
Cyclam	1,4,7,10- tetrazaciclotetradecano
Cyclen	1,4,7,10-tetraazaciclododecano
DO2A2S	Acido 1,7-bis[2-metilsulfoniletil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano- -4,10-diacetico
DO2P	Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,7-dimetanfosfonico
DO3P	Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-trimetanfosfonico
DO3S	1,4,7-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano
DO3SAm	1,4,7 - tris[2-metilsulfoniletil]-10-metilacetammide]-1,4,7,10- -tetrazaciclododecano
DO4S	1,4,7,10-tetrakis[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano
DOTA	Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacetico
DOTP	Acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrametanfosfonico
EC	Cattura elettronica
Fem	Forza elettromotrice
Gly	Glicina
Glu	Glutammato
HSAB	<i>Hard and Soft Acids and Bases</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>

IC	Conversione interna
INFN-LNL	Istituto Nazionale di Fisica Nucleare-Laboratori Nazionali di Legnaro
ISOL	<i>Isotope Separation On Line</i>
ISOLPHARM	<i>ISOL technique for radoPHARMaceuticals</i>
LET	<i>Linear Energy Transfer</i>
<i>N</i>	Numero di neutroni
NC	Numero di coordinazione
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
N03S	1,4,7-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7-triazaciclononano
PEG	<i>Polietilenglicole</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
RIB	<i>Radioactive Ion Beam</i>
SPECT	<i>Single-Photon Emission Computed Tomography</i>
SPES	<i>Selective Production of Exotic Species</i>
TACD3S	1,5,9-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,5,9-triazaciclododecano
TACN	1,4,7-triazaciclononano
TACN-Bu	1,4,7-tributil-1,4,7-triazaciclononano
TE4S	1,4,8,11-tetrakis[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano
TETA	Acido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacetico
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TRI4S	1,4,7,10-tetrakis[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7,10-tetraazaciclotridecano
UC _x	Carburo di uranio
<i>Z</i>	Numero di protoni

RIASSUNTO

Il presente lavoro di tesi riguarda lo studio della formazione dei complessi di Ag^+ , Cu^{2+} e Cu^+ con il chelante 1,4,7-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7-triazaciclononano, con potenzialità di impiego come radiofarmaci.

L'argento-111 è un nuclide d'interesse per la medicina nucleare in quanto presenta un decadimento β^- con emissione di particelle a media energia ($E = 360$ keV) e un tempo di emivita abbastanza lungo (7.47 giorni), caratteristiche che lo rendono un valido candidato per la radioimmunoterapia. Inoltre, potrebbe essere usato sia nella diagnosi mediante SPECT, grazie all'emissione γ a bassa energia ($E_\gamma = 245.4$ e 342.1 keV), sia come agente teranostico in combinazione con argento-103 e argento-104, isotopi adatti alla PET in quanto emettitori β^+ .

Oltre all'argento-111, anche il rame-64 e il rame-67 rappresentano una possibile coppia teranostica. Il primo radionuclide, grazie alla co-emissione di particelle β^+ e β^- può essere potenzialmente utilizzato in medicina nucleare sia per scopi diagnostici, tramite PET, che terapeutici; il secondo, invece, essendo un emettitore β^- e di raggi γ , potrebbe essere impiegato nell'*imaging* mediante SPECT e nella terapia.

Per poter utilizzare un radiometallo in medicina nucleare, è necessario ideare un radiofarmaco che lo contenga e lo direzioni nel sito d'interesse evitandone il rilascio in zone non desiderate. I radiofarmaci *metal-based* sono generalmente costituiti dal radionuclide di interesse, da una biomolecola *carrier* che consente il legame con i recettori *target*, da un chelante bifunzionale che fornisce al complesso metallico stabilità termodinamica e inerzia cinetica in condizioni fisiologiche, e da un *linker* che unisce il complesso alla biomolecola e che consente di modulare le proprietà dell'intero radiofarmaco.

In questo lavoro di tesi ci si è focalizzati sulla parte del chelante e sulle sue interazioni con gli ioni metallici di interesse, e si è considerato come possibile chelante il 1,4,7-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7-triazaciclononano. La formazione dei complessi di tale chelante con Ag^+ , Cu^{2+} e Cu^+ in soluzione acquosa è stata indagata mediante l'uso di tecniche potenziometriche, spettroscopiche NMR, spettrofotometriche UV-vis e voltammetriche, al fine di determinarne le proprietà termodinamiche e cinetiche. Tali proprietà sono state poi confrontate con quelle di sistemi simili studiati in precedenza,

per permettere di valutare le potenzialità del chelante considerato in ambito radiofarmaceutico.

ABSTRACT

The current thesis work concerns the study of the formation of Ag^+ , Cu^{2+} and Cu^+ complexes with the chelating agent 1,4,7-tris[2-(methylsulfanyl)ethyl]-1,4,7-triazacyclononane, with potential use as radiopharmaceuticals.

Silver-111 is a nuclide of interest for nuclear medicine. It has a β^- decay with the emission of medium-energy particles ($E = 360 \text{ keV}$) and a fairly long half-life (7.47 days), characteristics that make it a good candidate for radioimmunotherapy. Furthermore, it could be used in the SPECT diagnosis, thanks to the low energy γ emission ($E_\gamma = 245.4$ and 342.1 keV). Also, silver-111 is a theranostic agent in combination with silver-103 and silver-104, isotopes suitable for PET as they are β^+ emitters.

Another possible theranostic couple is represented by copper-64 and copper-67. The first radionuclide, thanks to the co-emission of β^+ and β^- particles, can potentially be used in nuclear medicine both for diagnostic purposes, through PET, and for therapeutic purposes. The second radionuclide is a β^- and γ rays emitter and so it could be used in diagnostics (SPECT) and in therapy.

In order to use a radiometal in nuclear medicine, it is necessary to devise a radiopharmaceutical that contains it and directs it to the site of interest, avoiding the release of radioactivity in unwanted areas. Metal-based radiopharmaceuticals generally consist of the radionuclide of interest, a carrier biomolecule that allows binding to target receptors, a bifunctional chelator that provides the metal complex with thermodynamic stability and kinetic inertia under physiological conditions, and a linker that unites the complex to the biomolecule and which allows to modulate the properties of the radiopharmaceutical.

This thesis work focalized on the chelator part of the radiopharmaceutical, and on its interactions with the metal ions of interest, and 1,4,7-tris[2-(methylsulfanyl) ethyl]-1,4,7-triazacyclonane was considered as possible chelator. The formation of Ag^+ , Cu^{2+} and Cu^+ complexes with this chelator in aqueous solution has been investigated using potentiometric, voltammetric, NMR spectroscopic and UV-vis spectrophotometric, in

order to determine their thermodynamic and kinetic properties. The analyzed chelator and its complexes with Ag^+ , Cu^{2+} and Cu^+ were compared with systems previously studied, with the aim to evaluate the considered chelator as possible radiopharmaceutical component.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Radionuclidi

La medicina nucleare è la branca specialistica della medicina che utilizza radionuclidi, atomi che emettono radiazioni e/o particelle, a scopo terapeutico e diagnostico. [1] Un radiofarmaco è definito come un farmaco che, quando pronto all'uso, contiene al suo interno uno o più radionuclidi. I radiofarmaci sono ampiamente utilizzati nella diagnosi e, negli ultimi anni, hanno avuto un crescente impiego anche nella terapia di varie condizioni patologiche, quali ad esempio le terapie oncologiche, le cure palliative del dolore da metastasi ossee, la sinoviectomia, *ecc.* In particolare, in oncologia la terapia con radionuclidi ha un elevato potenziale in quanto generalmente presenta una limitata tossicità, migliora sensibilmente il tempo di sopravvivenza del paziente e/o la sua qualità di vita, e può quindi essere più efficace rispetto ad altre terapie antitumorali come la chemioterapia e la radioterapia.[2]

Con quasi 20 milioni di nuovi casi all'anno e dieci milioni di morti nel mondo nel 2020, il cancro è una delle malattie più devastanti per l'uomo, e secondo le agenzie internazionali questi numeri sono destinati ad aumentare. [2] Una continua ricerca in ambito radiofarmaceutico riveste quindi un'importanza significativa, considerato il contributo che questa disciplina può dare alla cura e alla diagnosi delle patologie oncologiche. [2][3]

1.1.1 Storia

Nel 1895 Wilhelm Conrad Röntgen, un professore tedesco di fisica, giunse alla scoperta dei raggi X. Durante alcuni esperimenti con tubi a raggi catodici egli osservò che dall'anodo venivano emesse radiazioni in grado di impressionare le lastre fotografiche. Con successivi approfondimenti Röntgen dimostrò che tali raggi

potevano ionizzare i gas e suscitare la fluorescenza di particolari sostanze; sottolineò inoltre il loro notevole potere penetrante nella materia ed evidenziò come la loro traiettoria non venisse deviata da campi elettrici e magnetici. Tale scoperta fu molto importante anche per la medicina in quanto, tramite i raggi X, in funzione del loro diverso assorbimento da parte dei tessuti organici, si potevano ottenere delle “fotografie” per trasparenza dell’interno del corpo umano. [3][4] Nel 1896, sulla base della scoperta di Röntgen, il fisico Antoine Henri Becquerel studiò le radiazioni emesse dai sali di uranio. L’esperimento consisteva nel mettere delle lastre fotografiche all’interno di un involucro di carta nera impenetrabile alla luce, disporre i sali d’uranio sopra di esso, esporre tutto al sole e successivamente sviluppare le lastre. La presenza delle sagome dei cristalli di uranio sulle pellicole alla fine dell’esperimento portarono Becquerel alla deduzione che i sali fosforescenti di uranio assorbissero la luce solare ed emettessero una radiazione penetrante in grado di attraversare la carta nera e impressionare la lastra. Ripetendo l’esperimento in assenza di luce Becquerel osservò che si ottenevano ugualmente delle pellicole impressionate escludendo quindi la possibilità che tale fenomeno fosse dovuto alla radiazione solare. Altri studi condotti in seguito dimostrarono che tale comportamento era legato all’uranio stesso, in particolare ad un nuovo tipo di radiazione, portando di fatto alla scoperta della radioattività.

Questa scoperta introdusse un nuovo ambito di ricerca orientato a determinare la presenza in natura di altri elementi che presentassero la stessa proprietà dell’uranio e, soprattutto, le caratteristiche delle radiazioni emesse. In questo contesto, nel 1897 Curie e Schmidt osservarono proprietà analoghe ai sali di uranio nei sali di torio. Nel 1898 i coniugi Curie riuscirono a isolare dalla pechblenda alcuni composti di bismuto aventi una radioattività molto superiore a quella dell’uranio, che venne attribuita ad un nuovo elemento, il polonio. Nello stesso anno, in collaborazione con Bémont, essi ottennero dalla pechblenda anche cloruro di bario fortemente radioattivo: denominarono radio l’elemento, fino ad allora sconosciuto, che era presente in quantità minime e che produceva la radioattività. Tra il 1899 e il 1903 i coniugi Curie ne studiarono le proprietà ed effettuarono le prime osservazioni sugli effetti fisiologici delle sostanze radioattive. Nel 1903 vinsero, insieme a Becquerel, il premio Nobel per la fisica per le loro ricerche sulla radioattività.

1.1.2 Struttura nucleare

Il termine nuclide si riferisce ad una singola specie nucleare individuata da un numero specifico sia di protoni che di neutroni. Esso viene indicato con il simbolo dell'elemento, preceduto dai valori del numero atomico Z (numero di protoni) in basso, e del numero di massa A (numero di nucleoni, cioè protoni più neutroni) in alto, secondo la seguente notazione: A_ZX , dove X rappresenta il simbolo chimico dell'elemento. [3]

Quando i nuclidi hanno uguale numero atomico, ma diverso numero di massa, vengono detti isotopi: essi sono caratterizzati dallo stesso comportamento chimico, ma differiscono per le proprietà fisiche. [7] Stessi nuclidi che differiscono solamente per lo stato energetico del nucleo vengono invece chiamati isomeri. Se un nuclide si trova in uno stato eccitato e perdura per un tempo significativo (superiore a un picosecondo), è detto metastabile: tale condizione viene espressa scrivendo la lettera "m" a destra del numero di massa. Infine, atomi di elementi diversi si definiscono isobari quando hanno lo stesso numero di massa e isotoni quando hanno lo stesso numero di neutroni.

In natura esistono 90 elementi (dall'idrogeno, il più leggero, all'uranio, il più pesante) e circa 270 isotopi naturali. Oltre a questi esistono oggi molti nuclidi creati artificialmente. La carta dei nuclidi (*Chart of nuclides*) è una rappresentazione grafica di tutti i nuclidi noti, naturali e artificiali (oltre 3000). Essi vengono rappresentati con un quadratino il cui colore indica di solito il principale tipo di decadimento dello stato fondamentale o l'emivita del nuclide (**Paragrafo 1.1.3**) (**Figura 1.1**).

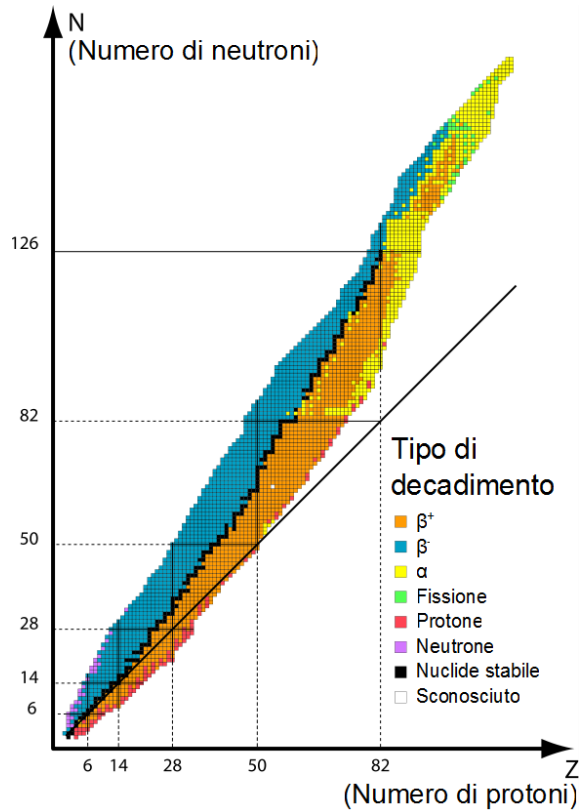


Figura 1.1 Karlsruhe Nuclide Chart. Ogni punto rappresenta un nuclide e il relativo colore indica il tipo di decadimento.[76]

La stabilità del nucleo è data dal bilanciamento di due forze, quella elettromagnetica (repulsione tra i protoni a causa della loro carica elettrica) e quella nucleare forte a corto raggio, responsabile della coesione dei nucleoni. I nuclidi stabili sono situati in una regione molto limitata della carta dei nuclidi chiamata fascia di stabilità. In particolare, per nuclei leggeri il numero di protoni generalmente eguaglia quello dei neutroni ($Z = N$, dove N è il numero di neutroni), mentre per quelli più pesanti ($Z \geq 20$) il numero di neutroni è superiore a quello di protoni, poiché la crescente repulsione elettrostatica di questi ultimi viene compensata con un numero via via maggiore di neutroni. I nuclidi instabili, invece, sono caratterizzati da un eccesso di protoni o neutroni, che comporta uno sbilanciamento delle due forze; essi tendono a raggiungere uno stato di equilibrio mediante processi detti decadimenti radioattivi (**Paragrafo 1.1.3**). [7]

La massa del nucleo non corrisponde alla somma della massa dei protoni e neutroni di cui è costituito (gli elettroni non vengono considerati in quanto la loro massa è trascurabile rispetto a quella di protoni e neutroni), ma è di poco inferiore, perché la

fusione dei nucleoni per formare il nucleo libera un'energia ΔE , comportando una diminuzione della massa Δm secondo la legge di Einstein (equazione 1.1).

$$\Delta E = \Delta mc^2 \quad (1.1)$$

Dove c è la velocità della luce.

Dall'energia nucleare, ovvero l'energia necessaria per dividere il nucleo nei suoi costituenti, è possibile calcolare l'energia media per nucleone (equazione 1.2):

$$\bar{E} = E_{nucleare}/A \quad (1.2)$$

Riportando in grafico l'energia media per nucleone in funzione del numero di nucleoni (**Figura 1.2**), si osserva per i nuclidi leggeri un rapido aumento di \bar{E} all'aumentare del numero di massa, a parte per la presenza di alcuni minimi relativi. Tale andamento perdura fino al raggiungimento del nuclide più stabile, il ferro-56 (^{56}Fe), dopodiché all'aumentare di A quest'energia diminuisce. Pertanto, i nuclidi più leggeri del ^{56}Fe acquistano stabilità fondendosi per ottenere un peso maggiore, mentre quelli più pesanti si dividono in nuclidi più leggeri. [3][9] Questi processi vengono denominati rispettivamente fusione nucleare, in cui i nuclei di due o più atomi si uniscono fra loro formando un nucleo di un nuovo elemento chimico, e fissione nucleare, in cui il nucleo si scinde in due frammenti di massa simile liberando una grande quantità di energia.

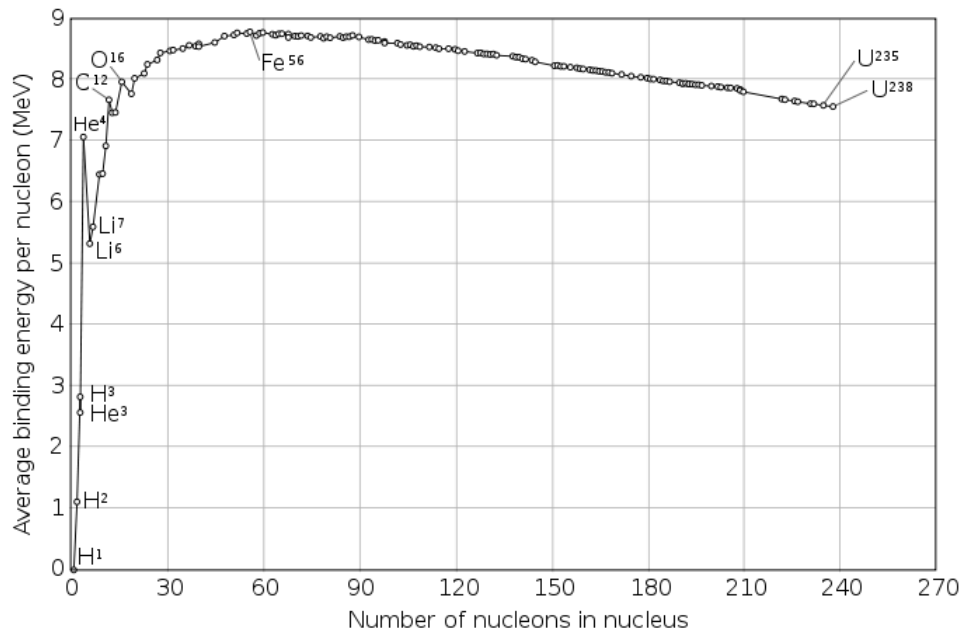


Figura 1.2 Rappresentazione grafica dell'andamento dell'energia media per nucleone in funzione del loro numero. [76]

1.1.2 Decadimenti radioattivi

I decadimenti radioattivi sono una conseguenza dell'instabilità di alcuni nuclidi, che tendono, emettendo radiazione o particelle ad alta energia, a raggiungere una maggiore stabilità. Il prodotto di un decadimento viene denominato “nucleo figlio” mentre il nuclide di partenza è chiamato “nucleo padre”.

Tutti i decadimenti radioattivi seguono una legge cinetica del primo ordine (equazione 1.3):

$$A_t = -\frac{dN_t}{dt} = \lambda \cdot N_t = A_0 \cdot e^{-\lambda t} \quad (1.3)$$

Dove A_t indica l'attività della sostanza al tempo t , ovvero il numero di decadimenti nell'unità di tempo; A_0 l'attività al tempo zero e N_t il numero di nuclidi radioattivi presenti al tempo t . λ è la costante di decadimento radioattivo e rappresenta la probabilità che il decadimento avvenga nell'unità di tempo; è una grandezza caratteristica di ogni nuclide e non dipende né dalla pressione né dalla temperatura.

[6][7]

Un altro parametro molto utilizzato per esprimere la probabilità di decadimento di un nuclide è il tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$), il quale rappresenta il tempo necessario perché il numero di nuclei radioattivi diventi la metà del valore iniziale (equazione 1.4); $t_{1/2}$ è dipendente solamente dalla probabilità di decadimento λ .

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

Esistono sei tipi di decadimenti radioattivi, di cui tre sono particolarmente importanti in medicina nucleare: i decadimenti alfa (α), beta (β) e gamma (γ). Gli altri tre tipi di decadimento sono la fissione spontanea, l'emissione di un protone e l'emissione di un neutrone. [7][8]

Decadimento α

Nel processo di decadimento alfa il nucleo padre emette una particella di ${}^4_2\text{He}$ (particella α) trasformandosi in un nucleo figlio caratterizzato da due protoni e due neutroni in meno. Tale processo è uno dei più comuni tra i nuclidi più pesanti del piombo ($Z > 82$ e $A > 200$) e ricchi di protoni.

Le particelle α sono caratterizzate da un alto potere ionizzante e da una bassa capacità penetrante nella materia. [8][10]

Decadimento β

Nei processi di decadimento beta rimane inalterato il numero di massa tra nucleo padre e nucleo figlio; varia invece il numero di elettroni o di positroni (antiparticelle degli elettroni caratterizzate dalla stessa massa, dallo stesso spin e da una carica opposta, positiva) a seconda del tipo di decadimento. In questa categoria rientrano tre diverse tipologie di decadimento: decadimento β^- , decadimento β^+ e cattura elettronica.

Nel decadimento β^- , il nuclide padre, caratterizzato da un eccesso di neutroni, decade tramite la trasformazione di un neutrone in un protone e l'emissione di un elettrone e un antineutrino (particella elementare elettricamente neutra e di massa trascurabile). Pertanto, il numero atomico del nuclide figlio risulta incrementato di un'unità.

Nel decadimento β^+ , il nuclide padre, caratterizzato da un eccesso di protoni, decade tramite la trasformazione di un protone in un neutrone e l'emissione di un positrone e un neutrino (antiparticella dell'antineutrino con carica zero e massa trascurabile). Pertanto, il numero atomico del nuclide figlio risulta diminuito di un'unità.

Nella cattura elettronica, avviene invece un processo nel quale un protone del nucleo del nuclide padre, caratterizzato da un eccesso di protoni, cattura un elettrone dai gusci circostanti e si trasforma in neutrone emettendo un neutrino. Pertanto, il numero atomico del nuclide figlio risulta diminuito di un'unità. La cattura elettronica causa una vacanza in un guscio elettronico interno, la quale viene colmata da una cascata di transizioni elettroniche che sposta la vacanza verso i gusci più esterni. Ogni transizione causa l'emissione di raggi X (radiazione elettromagnetica) e/o di elettroni Meitner-Auger (elettroni dei gusci esterni a cui è stata ceduta l'energia della transizione elettronica). (**Figura 1.3**) [8][10][11]

Le radiazioni β hanno una maggiore capacità penetrante e un minor potere ionizzante rispetto alle particelle α .

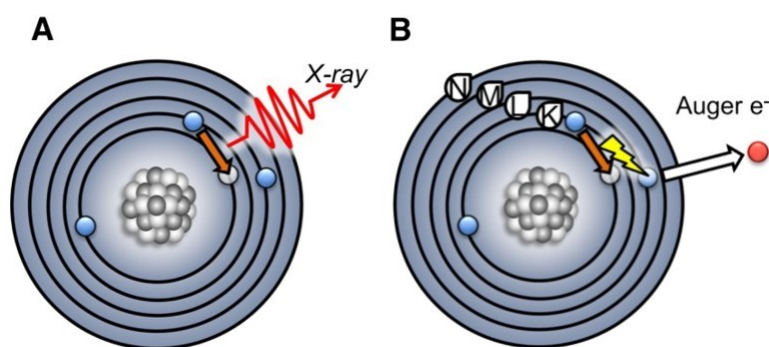


Figura 1.3 Rappresentazione grafica di due diversi processi: emissione di raggi X (A); emissione di un elettrone Meitner-Auger (B) [11]

Decadimento γ

I processi di decadimento gamma sono spesso conseguenti ai decadimenti α e β , in quanto i nuclei figli possono trovarsi in uno stato energetico eccitato. Per raggiungere lo stato fondamentale, quindi, vengono emessi raggi γ (radiazioni elettromagnetiche di altissima frequenza, tra 10^{19} e 10^{22} Hz, e quindi di lunghezza d'onda molto ridotta). In questo processo non cambia né il numero di massa né il numero atomico, ma varia soltanto l'energia del nucleo. [8][10]

1.2 Radiofarmaci

Come accennato in precedenza, un radiofarmaco è definito come un medicinale che quando è pronto all'uso include uno o più radionuclidi incorporati a scopo sanitario (direttiva CEE 89/343, decreto legislativo n°178).

I radiofarmaci si dividono in due grandi classi a seconda della strategia d'incorporazione dei radionuclidi: i derivati organici e i radiofarmaci *metal-based*. I radiofarmaci di natura organica incorporano radionuclidi non metallici (come ad esempio fluoro-18, carbonio-11, azoto-13, ossigeno-15 e iodio-123) mediante la formazione di legami covalenti, mentre i *metal-based* si basano principalmente sulla chimica di coordinazione di radionuclidi metallici. La ridotta varietà di decadimento dei radionuclidi "organici" limita le possibili applicazioni dei radiofarmaci organici

rispetto a quelli *metal-based*. [12] Oggigiorno questi ultimi rivestono quindi l'interesse maggiore.

A seconda della funzione del radiometallo, i radiofarmaci *metal-based* si dividono a loro volta in due classi, *metal-essential* e *metal-nonessential*. Nei radiofarmaci *metal-essential* il radiometallo è essenziale per l'azione biologica; ne è un esempio il tecnezio-99m (^{99m}Tc)-sestamibi (Cardiolite®), un agente di *imaging* cardiaco composto da un centro $[\text{}^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}^+$ coordinato da sei molecole di metossiisobutilisonitrile (MIBI), leganti lipofili che facilitano l'assorbimento del ^{99m}Tc nel miocardio; cambiando metallo il radiofarmaco non esplica la sua funzione, in quanto si osserva una biodistribuzione, cioè un assorbimento del farmaco da parte dei diversi tessuti e organi, nettamente differente. [13] I radiofarmaci *metal-nonessential* invece mostrano un comportamento *in vivo* indipendente dal metallo. Ne è un esempio il lutezio-177 (^{177}Lu) oxodotreotide (Lutathera®), utilizzato per la terapia delle forme tumorali del tratto gastro-entero-pancreatico. [14]

La scelta del radionuclide dipende da vari parametri, tra cui ad esempio il tipo e l'energia di decadimento, l'emivita ($t_{1/2}$) e l'energia lineare trasferita (LET, *Linear Energy Transfer*). L'emivita del radioisotopo non deve essere né troppo breve, altrimenti il processo di produzione, eventuale distribuzione e utilizzo del radiofarmaco può risultare non sostenibile, né troppo lunga, per evitare l'esposizione del paziente ad una dose di radioattività eccessivamente prolungata. [12] La LET rappresenta l'energia trasferita da una radiazione ionizzante a un materiale per unità di distanza, ed è comunemente espressa in keV/ μm per i sistemi biologici. Un valore elevato della LET (100-200 keV/ μm) indica una radiazione altamente ionizzante, a corto raggio e poco penetrante, come le radiazioni α , β e gli elettroni Meitner-Auger. Queste radiazioni, infatti, sono utilizzate per scopi terapeutici ad esempio in oncologia, poiché sono in grado di provocare danni alle cellule tumorali. Le radiazioni con valore di LET basso (0.2-0.3 keV/ μm), come i raggi γ , sono invece molto penetranti e vengono utilizzate per scopi diagnostici in quanto non interagiscono con i tessuti biologici. [12][15]

1.2.1 Progettazione dei radiofarmaci

I due principali metodi adottati per la progettazione dei radiofarmaci sono il metodo integrato e il metodo del chelante bifunzionale (*bifunctional chelator*, BFC).

Nel primo metodo il radionuclide è parte integrante della molecola biologicamente attiva, cioè è direttamente incorporato in essa e può condizionarne il comportamento biologico *in vivo*. Alcuni esempi sono ^{18}F -fluorodeossiglucosio, ^{11}C -colina e $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ -[Cys^{3,4,10},D-Phe⁷]-melanocyte-stimulating-hormone₃₋₁₃(CCMSH).

[16][17] Nel metodo del BFC, invece, il radiometallo viene coordinato con un chelante bifunzionale coniugato covalentemente con una molecola *carrier* attraverso un *linker*.

Il radiofarmaco basato su BFC è schematizzato in **Figura 1.4**. [12][16]

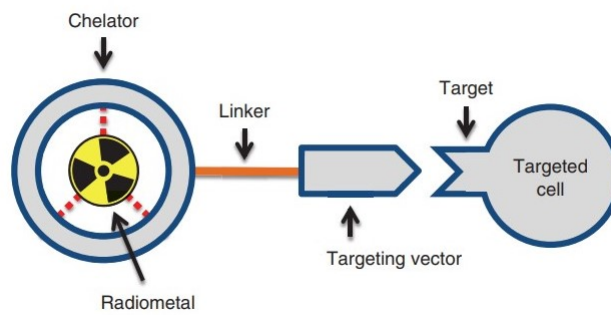


Figura 1.4 Rappresentazione schematica di un radiofarmaco basato sull'uso di un BFC [16]

La molecola *carrier*, o *targeting vector*, è generalmente una biomolecola (come peptidi, proteine, anticorpi), un composto naturale modificato (ad esempio zuccheri, nucleosidi e nucleotidi modificati) oppure un altro costrutto sintetico (piccole molecole, nanoparticelle, liposomi). [18] Il *targeting vector* interagisce con determinati recettori cellulari o partecipa a fenomeni di trasporto o a vie metaboliche dei tessuti malati; consente quindi di localizzare il bersaglio biologico e accumulare il radiofarmaco presso il sito *target*. Inoltre, esso determina spesso la farmacocinetica dell'intero radiofarmaco, ovvero il processo di assorbimento, biotrasformazione, distribuzione ed eliminazione del radiofarmaco nell'organismo in un determinato intervallo temporale. [19]

Il *linker* ha la funzione di unire attraverso legami covalenti il complesso del radiometallo e il *targeting vector*, senza alterare l'affinità di quest'ultima molecola verso il suo bersaglio biologico; esso inoltre può essere usato per modulare la farmacocinetica e la biodistribuzione del radiofarmaco. I *linker* più comuni sono a base

di polietilenglicole (PEG), acido 6-amminoesanoico (Ahx) e amminoacidi (Glu e Gly). [16]

Il radiometallo è la sorgente della radiazione sfruttata a scopo medico e viene scelto in base al suo utilizzo (diagnostico o terapeutico), al tipo di decadimento, al trasferimento lineare di energia (LET) e all'emivita. [19] La maggior parte di quelli utilizzati in medicina nucleare sono resi disponibili come acquoioni ($[^{64}\text{Cu}]\text{Cu}^{2+}$, $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga}^{3+}$, $[^{90}\text{Y}]\text{Y}^{3+}$, $[^{111}\text{In}]\text{In}^{3+}$, $[^{177}\text{Lu}]\text{Lu}^{3+}$, e $[^{225}\text{Ac}]\text{Ac}^{3+}$). [12][16]

Il chelante bifunzionale ha un duplice scopo in quanto consente la coniugazione con il *linker* (e quindi con il *targeting vector*) e coordina il radiometallo, impedendone il rilascio *in vivo*, che potrebbe causare l'accumulo di attività in siti non desiderati. [6] [12] La scelta del chelante si basa pertanto su alcuni parametri quali la cinetica di formazione e la stabilità termodinamica del complesso, e l'inerzia cinetica del decomplessamento. [20] La cinetica di complessamento deve essere possibilmente rapida a temperature vicine a quella ambiente: se i tempi di reazione fossero lunghi, infatti, potrebbero essere incompatibili con l'emivita breve di alcuni radiometalli, mentre se le temperature richieste fossero elevate, l'attività biologica del radiofarmaco potrebbe risultarne compromessa, soprattutto nel caso di molecole *carrier* sensibili alla temperatura come proteine e anticorpi. La valutazione della stabilità termodinamica del complesso e dell'inerzia cinetica di decomplessamento è molto importante poiché, quando il radiofarmaco viene somministrato al paziente, l'elevata diluizione nel flusso sanguigno può favorire la dissociazione del complesso. Entrambe le stabilità, termodinamica e cinetica, hanno anche un ruolo fondamentale nel prevenire reazioni parassite che possono aver luogo nel circolo sanguigno, cioè reazioni di transchelazione e di transmetallazione. Nelle prime, il radiometallo può essere complessato da altri leganti endogeni (ad esempio enzimi e proteine del siero), mentre nelle seconde è il chelante che può interagire con metalli endogeni presenti nel sangue a concentrazioni relativamente molto più elevate di quelle del radionuclide (Ca^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} ecc.). [6][12][16][20][21][22] In entrambi i casi si avrebbe la rottura del complesso tra il radiometallo e il radiofarmaco, che per quanto visto può comportare la mancata azione farmacologica e l'insorgenza di effetti collaterali indesiderati.

1.2.2 Radiofarmaci per la diagnostica

La capacità di visualizzare i tumori e di monitorare in modo non invasivo la loro progressione nel tempo e/o in seguito a terapia è di grande importanza in medicina nucleare e per la qualità di vita del paziente. Le tecniche principalmente 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) (**Figura 1.5**), che permettono di ottenere immagini tridimensionali. [18]

1.2.2.1 Tomografia ad emissione di positroni

La PET richiede l'utilizzo di emettitori di positroni, ovvero radionuclidi carenti di neutroni che convertono un protone in neutrone con conseguente emissione di un positrone. Quest'ultimo, interagendo con gli elettroni circostanti, carichi negativamente, dà origine a un processo di annichilazione, producendo due raggi γ di energia pari a 511 keV in versi opposti (circa 180° l'uno dall'altro). [12][23] Specifici *scanner* rilevano questi raggi γ e consentono di determinare il punto di annichilazione del positrone con un'accuratezza di pochi millimetri.

La PET è una tecnica relativamente recente nella medicina nucleare; pertanto, sono ancora molti gli studi volti ad identificare i radioisotopi ottimali per la sua applicazione. [24] Il fluoro-18 (^{18}F) rappresenta attualmente il “*gold standard*” per la PET, grazie alla semplicità della sua produzione e alla sua energia di emissione di positroni. Tuttavia, questo radionuclide presenta alcuni limiti, quali l'emivita breve ($t_{1/2} \sim 110$ min), che ne limita il trasporto, e la complessità della sintesi di molecole marcate con ^{18}F , la quale richiede numerosi passaggi e presenta un processo di purificazione complesso. Il radiofarmaco più utilizzato nella tomografia a emissione di positroni è il ^{18}F -fluorodeossiglucosio (FDG), sviluppato negli anni '70, che, essendo in grado di superare la barriera ematoencefalica, consente ad esempio la diagnosi di malattie cerebrali come l'Alzheimer. [12][18][23][25]

Alcuni radiometalli utilizzati oppure studiati per potenziali applicazioni nella PET sono riportati in **Tabella 1.1**. [23][25]

Tabella 1.1 Esempi di radiometalli utilizzati o studiati per un potenziale impiego nella PET.

Radiometallo	$t_{1/2}$ (ore)	Energia β^+ (keV)
Gallio-68	1.1	1899
Rame-64	12.7	653
Gallio-66	9.5	4153
Rame-60	0.4	1912, 1982, 2947, 3774
Rame-61	3.3	932, 1215
Rame-62	0.16	2937
Scandio-64	4.0	1474
Ittrio-86	14.7	1221, 1545
Zirconio-89	78.4	902
Terbio-152	17.5	2620, 2970
Rubidio-82	0.02	2601, 3378
Cobalto-55	17.5	1021, 1499

1.2.2.2 Tomografia computerizzata ad emissione di singolo fotone

La SPECT si basa sulla rilevazione dei raggi γ emessi dai traccianti in seguito al decadimento di un radionuclide per cattura elettronica o per transizione isomerica (processo che vede l'emissione di radiazione elettromagnetica da parte di nuclidi metastabili). Tale tecnica utilizza uno strumento, la γ -camera, in cui i fotoni emessi vengono incanalati verso il collimatore e rilevati da uno scintillatore solido a base di ioduro di sodio; in seguito al passaggio in alcuni fotomoltiplicatori, il segnale viene rielaborato da un computer che restituisce un'immagine tridimensionale. Per ottenere un'elevata nitidezza, i raggi γ devono avere bassa energia (100-250 keV), in modo da

poter essere filtrati facilmente dal collimatore e attenuati in modo efficiente dal rivelatore. Il radionuclide più utilizzato nella SPECT è il ^{99m}Tc usato per scintigrafie scheletriche (medronato-MDP, oxidronato-HDP), epatiche, renali, cerebrali (Ceretec®, Neurolite®), tiroidee e nell'*imaging* della perfusione miocardica (Cardiolite®, Myoview®). [12][18][24][25]

Altri radiometalli utilizzati nella SPECT sono riportati in **Tabella 1.2**. [24]

Tabella 1.2 Esempio di radiometalli utilizzati o studiati per un possibile impiego nella SPECT.

Radiometallo	$t_{1/2}$ (ore)	Energia γ (keV)
Gallio-67	78.24	93, 185, 300
Indio-111	67.20	171
Tallio-201	73	167
Oro-198	40	411

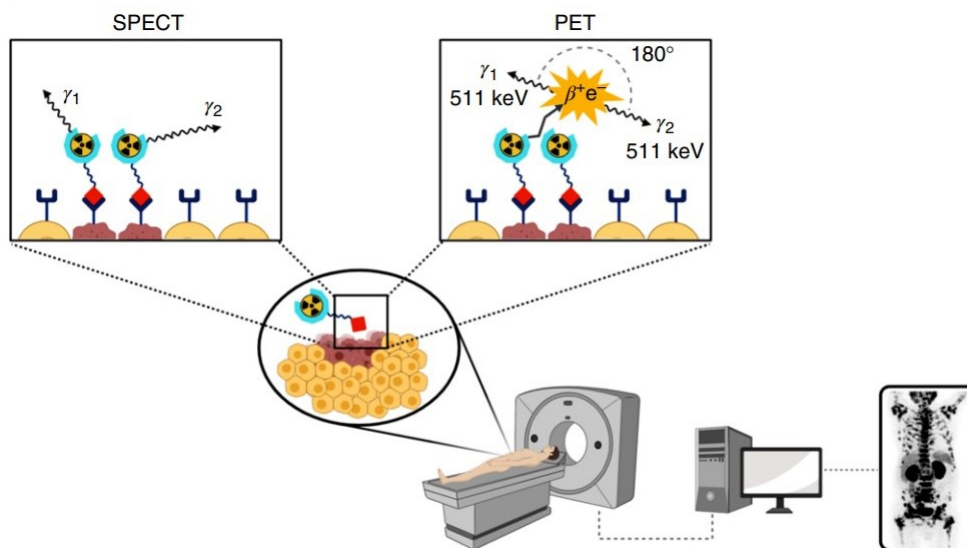


Figura 1.5 Rappresentazione dei processi diagnostici SPECT e PET. [31]

1.2.3 Radiofarmaci per la terapia

La *targeted radionuclide therapy* consiste nell'uso della radioattività per danneggiare selettivamente cellule malate e trattare varie condizioni patologiche, spesso tumorali. La citotossicità è dovuta alla radiazione emessa da un opportuno radionuclide, che viene trasportato in modo selettivo nel sito malato. Rispetto ad altri trattamenti come la chemioterapia, la radioterapia e la terapia ormonale, la *targeted radionuclide therapy* costituisce un approccio più vantaggioso, in quanto minimizza la radiazione a cui sono esposti i tessuti sani e la massimizza invece sul sito *target* uccidendo le cellule malate. [26] Il tipo di radionuclide da utilizzare dipende dalla tipologia e dallo stadio della malattia. [3][27]

I radionuclidi per la terapia sono caratterizzati dall'emissione di elettroni di Meitner-Auger, di particelle α o di particelle β^- . Queste radiazioni hanno un valore elevato della LET, perciò interagiscono con i tessuti causando danni irreversibili al DNA e portando alla morte delle cellule.

Gli elettroni Meitner-Auger sono poco penetranti (1-20 μm nei tessuti) e molto ionizzanti ($\text{LET} = 4\text{-}26 \text{ keV}/\mu\text{m}$): queste caratteristiche li rendono ideali per il trattamento di piccole masse tumorali formate da singole cellule. Tuttavia, essendo caratterizzati da un forte potere ionizzante, l'uso di emettitori di elettroni Meitner-Auger richiede meccanismi di *targeting* in grado di condurre il radionuclide molto vicino al nucleo cellulare cancerogeno, e possibilmente al suo interno. [11]

Le particelle α sono caratterizzate da un elevato valore della LET (circa $80 \text{ keV}/\mu\text{m}$) e da un basso potere penetrante (10-100 μm nei tessuti). Come gli elettroni Meitner-Auger, sono adatte al trattamento di piccole metastasi. Tuttavia, prima di raggiungere un nuclide stabile, gli emettitori di particelle α presentano spesso una lunga serie di decadimenti radioattivi, che rendono difficile la ritenzione dei nuclidi figli in prossimità del sito *target* e possono danneggiare anche cellule o tessuti sani. [3][28]

Le particelle β sono più penetranti rispetto alle particelle α (0.5-10 mm) e hanno un valore più basso della LET (circa $0.2 \text{ keV}/\mu\text{m}$), perciò sono indicate per il trattamento di masse tumorali di più ampie dimensioni. Per via del loro maggiore potere penetrante si verifica il *cross fire effect*, ovvero il meccanismo per cui l'azione terapeutica si realizza anche se il radionuclide non si trova direttamente nel sito *target* ma in cellule vicine. [29] Tale effetto può rappresentare sia un vantaggio, in quanto permette il

trattamento di tumori macroscopici, sia uno svantaggio, perché può danneggiare i tessuti sani adiacenti alla massa tumorale. [3][28]

1.2.4 Radiofarmaci per la teranostica

La teranostica è un concetto innovativo in medicina nucleare basato sull'integrazione di un metodo diagnostico e di uno specifico intervento terapeutico. Tale combinazione permette al medico di effettuare un trattamento personalizzato e più efficace del paziente sin dalle prime fasi della malattia.

Alcuni radionuclidi sono intrinsecamente teranostici, in quanto emettono diversi tipi di radiazioni, mentre altri agenti teranostici sono costituiti da una coppia di radioisotopi. Se la coppia è formata da due isotopi dello stesso elemento con emissioni complementari, è possibile utilizzare lo stesso radiofarmaco (marcato alternativamente con uno dei due isotopi) per scopi diagnostici e terapeutici e avere quindi lo stesso comportamento *in vivo*. Alcuni esempi sono le coppie ittrio-90/ittrio-86 e rame-67/rame-64. Quando la coppia invece è costituita da radionuclidi di elementi diversi, come ad esempio indio-111/ittrio-90, le informazioni diagnostiche possono essere meno rappresentative della distribuzione della dose terapeutica a causa dei diversi comportamenti dei rispettivi radiofarmaci. [12][27][30][31]

1.3 Produzione di radionuclidi

Esistono diverse modalità per la produzione dei radionuclidi. Per applicazioni in medicina nucleare, è necessario tenere in considerazione alcuni parametri quali la resa, l'attività specifica e la purezza radionuclidica che possono essere raggiunte, oltre che il costo e la quantità con cui i radionuclidi possono essere prodotti. [32]

La resa del processo di produzione è importante perché è necessario disporre di metodi efficienti che permettano di produrre i radionuclidi in quantità sufficiente a soddisfare la richiesta.

L'attività specifica è definita come il rapporto tra l'attività dell'isotopo considerato e la massa della sostanza che lo contiene e in genere viene espressa in MBq/mg. Questo

parametro è indice della diluizione del radionuclide dovuta alla presenza di isotopi stabili non desiderati, denominati *carrier*. Se il radionuclide ottenuto non presenta altri suoi isotopi stabili si definisce *carrier-free* (attività specifica elevata), altrimenti è definito *carrier-added* (attività specifica ridotta). I radionuclidi *carrier-free* sono preferibili in medicina nucleare, in quanto non presentano altri isotopi stabili che possono competere nell'interazione con i siti *target* delle cellule tumorali riducendo l'efficacia del radiofarmaco. In particolare, un valore elevato dell'attività specifica è necessario nelle terapie mirate in cui la saturazione dei recettori *target* si verifica a basse concentrazioni. [33]

La purezza radionuclidica esprime invece la presenza nel prodotto di altre specie radioattive non desiderate, derivanti dal processo di produzione. Tali impurezze devono essere evitate al fine di non esporre il paziente a radiazioni non necessarie o a dosi eccessive.

Attualmente i radionuclidi vengono prodotti utilizzando reattori nucleari o acceleratori, di cui i ciclotroni sono la tipologia principale. Tuttavia, i costi elevati e le difficoltà di produzione di alcuni radionuclidi di interesse per la medicina nucleare sono condizioni che ancora ostacolano il loro impiego. La ricerca è quindi orientata verso il miglioramento e il potenziamento delle tecnologie esistenti e verso lo sviluppo di nuovi metodi di produzione, che consentano di ottenere valori adeguati di resa, attività specifica e purezza radionuclidica.

1.3.1 Progetto SPES

Il progetto SPES (*Selective Production of Exotic Species*) è un progetto multidisciplinare dei Laboratori Nazionali di Legnaro (LNL) dell'Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (INFN), che ha lo scopo di realizzare un apparato sperimentale (*facility* SPES) in grado di produrre fasci di ioni radioattivi (RIBs, *Radioactive Ion Beams*) ricchi in neutroni e caratterizzati da un'elevata attività specifica e purezza radionuclidica. [34][35]

La produzione dei RIBs si basa sulla tecnica ISOL (*Isotope Separation On-Line*) in cui il fascio di protoni prodotto dall'acceleratore primario, con un'energia di circa 40 MeV, viene fatto collidere su un bersaglio, il *target* primario, generalmente carburo di uranio (UC_x contenente Uranio-238). L'impatto induce la fissione del *target*, con la

formazione di radioisotopi *neutron-rich* con numero atomico tra 28 e 57. La reazione avviene all'interno di una camera, che viene mantenuta ad una temperatura di 2200-2300°C e una pressione di 10^{-6} mbar, che consente l'estrazione per evaporazione dei prodotti ottenuti. Essi possono dunque uscire dal *target* e venire indirizzati verso la sorgente di ionizzazione. Qui sono ionizzati positivamente e, infine, grazie alla carica acquisita, estratti e accelerati tramite l'applicazione di un potenziale elevato (40 kV), così da ottenere un RIB. [36] Il fascio, quindi, viene in una prima fase focalizzato e, in seguito, sottoposto a separazione tramite l'impiego di uno spettrometro di massa, in modo da ottenere un fascio isobarico. Infine, può essere necessario un ultimo passaggio che prevede una separazione chimica per eliminare i contaminanti isobarici presenti. La tecnica ISOL è considerata molto promettente per applicazioni in medicina nucleare, [35][36][37] grazie in particolare a due grandi vantaggi:

- Si può produrre un'elevata gamma di radionuclidi, anche tra quelli finora poco o per nulla indagati, permettendo quindi di ideare e studiare nuovi radiofarmaci; La tecnica risulta infatti molto flessibile in quanto consente di produrre diversi isotopi con lo stesso *target* di produzione, semplicemente modulando le impostazioni del separatore di massa. [38][39]
- Si ottengono radionuclidi con un'elevata purezza radionuclidica, poiché la separazione di massa permette di ottenere un fascio isobarico, in cui è presente solamente un isotopo dell'elemento voluto (attività specifica elevata). Inoltre, la successiva purificazione chimica consente di eliminare le impurezze legate alla presenza di isotopi di altri elementi, ma con la stessa massa atomica, sfruttando il loro diverso comportamento chimico.

1.3.2 Progetto ISOLPHARM

All'interno del progetto SPES rientra il progetto ISOLPHARM (ISOL *technique for radioPHARMaceuticals*), che ha come obiettivo la produzione di radionuclidi *carrier free* tramite l'utilizzo dei RIB prodotti con la *facility* SPES. La complessità del progetto richiede molteplici competenze e coinvolge diversi ambiti di ricerca: dalla chimica alla fisica nucleare, all'ingegneria, alle scienze dei materiali e alle tecnologie farmaceutiche. Al suo interno sono state create diverse *task* con compiti differenti:

produzione di radionuclidi e sviluppo di tecniche di purificazione, sintesi e caratterizzazione di chelanti, studio di *target* cellulari e *targeting vector*. [38][40]

La rappresentazione schematica del progetto ISOLPHARM è riportata in **Figura 1.6**.

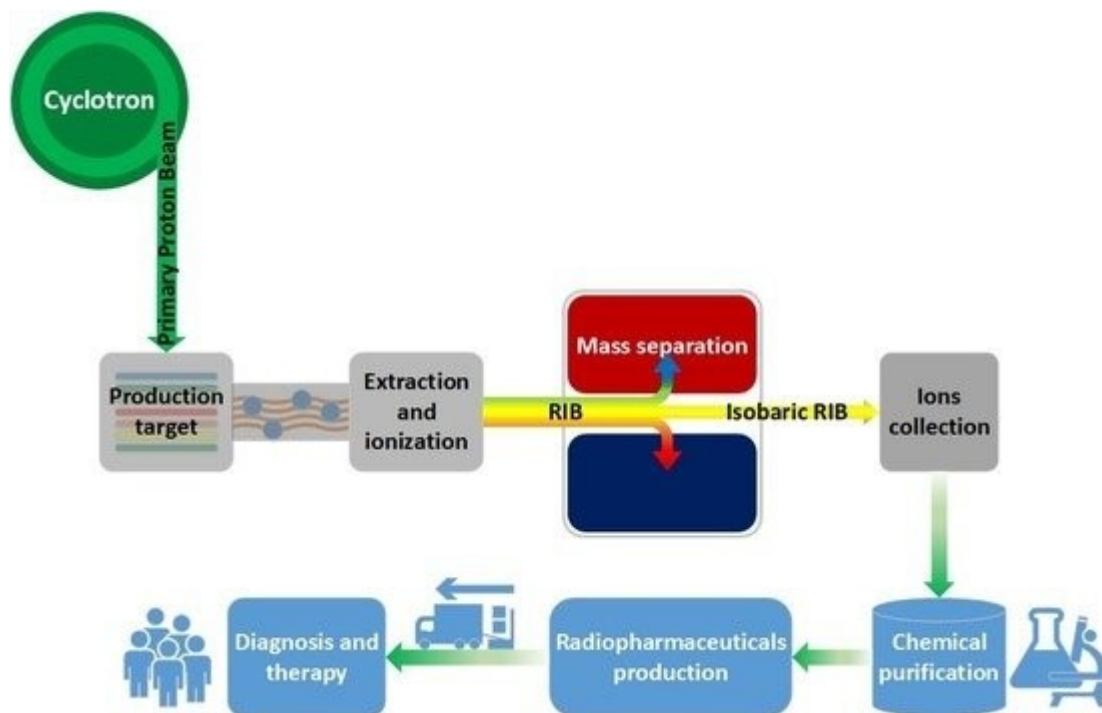
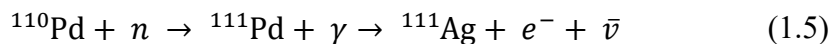


Figura 1.6 Rappresentazione schematica del progetto ISOLPHARM. [40]

1.4 Argento-111

L'argento-111 (^{111}Ag) è considerato un radionuclide promettente per la radioimmunoterapia grazie alle sue proprietà di decadimento: è un emettitore β^- caratterizzato da un'energia media di 360 keV, da una penetrazione nei tessuti di circa 1.8 mm e da un'emivita relativamente lunga di 7.45 giorni. Inoltre, potrebbe essere utilizzato anche nella diagnostica, in particolare nella SPECT, per via dell'emissione di raggi γ a bassa energia (245.4 e 342.1 keV), e potrebbe costituire un elemento teranostico tramite la combinazione con argento-103 (^{103}Ag) e argento-104 (^{104}Ag), emettitori β^+ adatti alla PET. [41][42]

Il metodo tradizionale per la produzione di ^{111}Ag prevede l'irraggiamento di un *target* di palladio-110 (^{110}Pd) con neutroni, al fine di ottenere ^{111}Pd ($t_{1/2} = 23.4$ minuti) che decade ad ^{111}Ag (reazione 1.5).



Tuttavia, la presenza di altri isotopi di palladio nel *target* (^{108}Pd e ^{109}Pd) limita l'attività specifica del ^{111}Ag ottenibile, in quanto essi possono dare cattura elettronica portando alla formazione dell'isotopo stabile ^{109}Ag . Una soluzione per ovviare a tale problema è l'utilizzo di *target* arricchiti in ^{110}Pd , che però sono molto costosi. [43][44]

La tecnica ISOL rappresenta un'alternativa molto interessante per produrre ^{111}Ag *carrier-free*. Grazie alla presenza del separatore di massa, è infatti possibile l'eliminazione di tutti i contaminanti isotopici presenti. La maggior parte dei contaminanti isobarici ha emivita breve e decade ad ^{111}Ag o ^{111}Pd . L'unico contaminante isobarico rilevante, presente come prodotto della fissione, è ^{111}Cd , che rappresenta anche il prodotto stabile del decadimento di ^{111}Ag e che può essere rimosso a posteriori usando procedure chimiche di separazione, che già sono state preliminarmente messe a punto nei nostri laboratori. [38][45]

1.4.1 Chelanti per argento-111

Lo sviluppo di radiofarmaci per applicazioni terapeutiche o teranostiche basati sui radioisotopi dell'argento è ancora limitato dalla assenza di chelanti in grado di formare con Ag^{+} complessi stabili *in vivo*. [46] Lo ione Ag^{+} ha configurazione elettronica di valenza d^{10} e pertanto è diamagnetico. Lo ione non ha nessuna particolare preferenza riguardo alla geometria di coordinazione, in quanto ha un'energia di stabilizzazione del campo cristallino (*Crystal Field Stabilization Energy*, CFSE) nulla. Le geometrie più comuni, tuttavia, sono quella lineare, quella trigonale planare e quella tetraedrica. Tale ione è inoltre polarizzabile a causa della sua bassa densità di carica, che lo rende un acido di Lewis *soft* secondo la teoria HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*); di conseguenza Ag^{+} preferisce la coordinazione con donatori *soft*, come ad esempio i solfuri. Tuttavia, sono noti anche complessi con donatori *hard* e *borderline* come atomi di ossigeno e di azoto presenti in leganti eterociclici, come piridine e fenantrolina, e leganti macrociclici, come eteri corona e criptandi. [26]

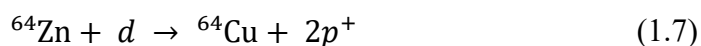
In letteratura sono descritti numerosi chelanti che potrebbero essere adatti per Ag^+ , ma finora nessuno è stato studiato per evidenziare se soddisfa le caratteristiche richieste per applicazioni radiofarmaceutiche. Alcuni esempi dei leganti studiati sono i derivati degli eteri corona di Spiess *et al.* [47], i tioeteri corona con differenti dimensioni dell'anello e numero di atomi di zolfo di Alberto *et al.* [48], il 10-ditio-4,7,13,16-tetrazaciclooctadecano ([18]aneN4S2) di Craig *et al.* [49] e il 10-metil-1,4-ditio-7,10-diazaciclododecano-7-etanamina di Riesen *et al.* [50]. Una classe di leganti molto promettente, che sarà trattata a parte (**Capitolo 2**), è invece quella relativa ai derivati solforati del 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (cyclen). [46]

1.5 Radioisotopi del rame

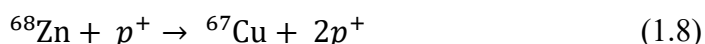
Il rame è un metallo particolarmente interessante per la medicina nucleare, poiché presenta molteplici radioisotopi (rame-60, rame-61, rame-62, rame-64, rame-67) che sono caratterizzati da diversi tipi di decadimento e che possono essere sfruttati in ambito sia diagnostico che terapeutico.

Gli isotopi rame-60 (^{60}Cu), rame-61 (^{61}Cu) e rame-62 (^{62}Cu) decadono con emissione di β^+ , il che li rende candidabili per l'impiego nella PET. La concomitante presenza di emissioni γ , tuttavia, costituisce una limitazione al loro potenziale utilizzo. [51]

La combinazione del rame-67 (^{67}Cu) e del rame-64 (^{64}Cu) potrebbe invece costituire un'ottima coppia teranostica. [52] ^{64}Cu è un emettitore di particelle β^+ ($E = 653.1 \text{ keV}$) e β^- ($E = 578.8 \text{ keV}$) ed ha un tempo di dimezzamento pari a 12.7 ore, caratteristiche che ne consentono un uso sia terapeutico che diagnostico (PET). Tale isotopo viene prodotto bombardando un *target* di Nichel-64 con un fascio di protoni (reazione 1.6) oppure un *target* di Zinco-64 con un fascio di deuteroni (nuclei di ^2H – reazione 1.7). Il primo metodo è quello più utilizzato in quanto permette di ottenere un'elevata resa di reazione e richiede un fascio ad energia relativamente bassa. [53][54]



^{67}Cu è un emettitore di particelle β^- ($E = 93 \text{ keV}$), presenta una co-emissione γ ($E = 185 \text{ keV}$) e ha un tempo di dimezzamento pari a 62.01 ore; perciò, è idoneo sia a scopi terapeutici che diagnostici tramite la SPECT. Tuttavia, il suo utilizzo è molto limitato per la mancanza di metodi di produzione efficienti. Attualmente il rame-67 viene ottenuto mediante bombardamento di un *target* di zinco-68 con un fascio di protoni con energia compresa tra i 20 e i 70 MeV (reazione 1.8), che però comporta la coproduzione di rame-64 e gallio-67, riducendo quindi la purezza radionuclidica del ^{67}Cu . [52][55][56]



Una possibile alternativa per la produzione di ^{67}Cu è l'impiego del metodo ISOL, grazie al quale si potrebbero ottenere, in quantità sufficienti e dallo stesso *target* di ZrGe, sia ^{67}Cu che ^{64}Cu , isolabili successivamente tramite il separatore di massa. [40]

1.5.1 Chelanti per rame-67 e rame-64

In soluzione acquosa gli stati d'ossidazione più comuni del rame sono +1 e +2. Cu^+ ha configurazione elettronica di valenza d^{10} , è diamagnetico ed ha un carattere *soft* secondo la teoria HSAB, che lo porta a prediligere le interazioni con leganti dotati di donatori *soft* (fosfine, tioeteri, isonitrili, *ecc*). Avendo un'energia di stabilizzazione del campo cristallino nulla, non possiede alcuna preferenza particolare per il numero e la geometria di coordinazione. I complessi più comuni sono quelli lineari, trigonali planari e tetraedrici. Cu^+ in soluzione acquosa non è stabile ed è soggetto ad una reazione di disproporzione con formazione di Cu^{2+} e Cu metallico.

Cu^{2+} ha una configurazione elettronica di valenza d^9 , è paramagnetico ed è classificato come ione *borderline*; pertanto, predilige l'interazione con donatori di tipo *borderline* (ammine, basi di Schiff, piridine, alogenuri, β -dichetonati *etc*). Ha una CFSE diversa da zero, che porta ad una preferenza per numeri di coordinazione di 4, 5 e 6 con strutture tetraedriche, quadrato planari, bipiramidali trigonali e ottaedriche. In particolare, nei complessi esacoordinati i legami con i due atomi apicali sono più deboli per l'effetto Jahn-Teller, il che dà origine a geometrie distorte. In soluzione acquosa Cu^{2+} può idrolizzare e precipitare come ossido di rame CuO o dare origine agli idrossidi $[\text{CuOH}]^+$, $[\text{Cu}(\text{OH})_2]_{(s)}$ e $[\text{Cu}(\text{OH})_3]^-$. L'entità di questi fenomeni

dipende da diversi parametri come il pH della soluzione, la concentrazione del rame e la presenza di leganti o altri ioni.

Lo stato di ossidazione del rame più stabile in soluzione acquosa è il (II), e pertanto Cu^{2+} è anche lo ione più utilizzato in medicina nucleare. Ad oggi diversi leganti bifunzionali sono stati studiati per questo metallo. Un'importante classe di chelanti sono i poliazamacrocicli, come il 1,4,7,10-tetraazociclododecano (cyclen), 1,4,8,11-tetraazociclotetradecano (cyclam), il 1,4,7-triazociclononano (TACN) (**Figura 1.7**), e i loro derivati poliamminocarbossilici come l'acido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1,4,7,10-tetraacetico (DOTA) e l'acido 1,4,8,11-tetraazociclotetradecano-1,4,8,11-tetraacetico (TETA) (**Figura 1.8**). Questi composti formano con Cu^{2+} dei complessi che risultano termodinamicamente stabili, ma che sono anche soggetti *in vivo* a labilità cinetica; ciò comporta la demetallazione con il conseguente accumulo del radiometallo in siti *off-target*, come ad esempio il fegato. [54][57][58] Successivi studi hanno ovviato al problema considerando alcuni derivati *cross-bridged* del cyclen, come il 4,10-bis(carbossimetil)-1,4,7,10-tetraazabicciclo [5.5.2]tetradecano (CB-DO2A) e il 4,11-bis(carbossimetil)-1,4,8,11-tetraazabicciclo [6.6.2]esadecano (CB-TE2A), in cui la presenza di un ponte etilenico tra due atomi di azoto opposti nell'anello centrale incrementa la rigidità della struttura sfavorendo la reazione di dissociazione *in vivo* (**Figura 1.8**). Tuttavia, l'utilizzo di questi chelanti è penalizzato da una lenta cinetica di formazione dei complessi, che obbliga all'utilizzo di condizioni più drastiche per la radiomarcatura (temperature elevate, tempi prolungati), non compatibili con l'impiego di *targeting vector* termolabili. [57][59]

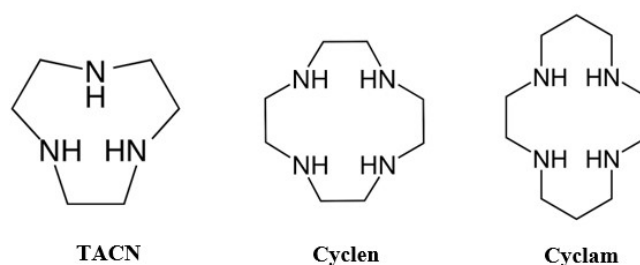


Figura 1.7 Strutture di TACN, Cyclen e Cyclam

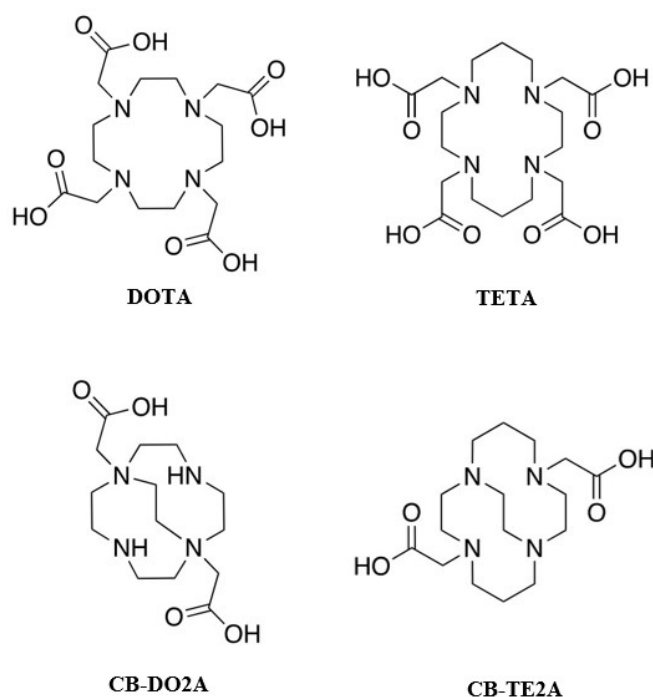


Figura 1.8. Struttura dei chelanti tetraazamacrociclici studiati per il rame.

Un'altra classe di chelanti studiata in letteratura è quella dei poliamminofosfonati, poliazamacrocicli funzionalizzati sugli atomi di azoto con uno o più gruppi fosfonici, che conferiscono al complesso un'elevata stabilità anche *in vivo*. In particolare, l'acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,7-dimetanfosfonico (DO2P), l'acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-trimetanfosfonico (DO3P) e l'acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetrametanfosfonico (DOTP) sono particolarmente interessanti per l'*imaging* delle ossa, dove si accumulano con facilità, probabilmente grazie al legame tra i gruppi metanfosfonati e l'idrossiapatite. (**Figura 1.9**) [58]

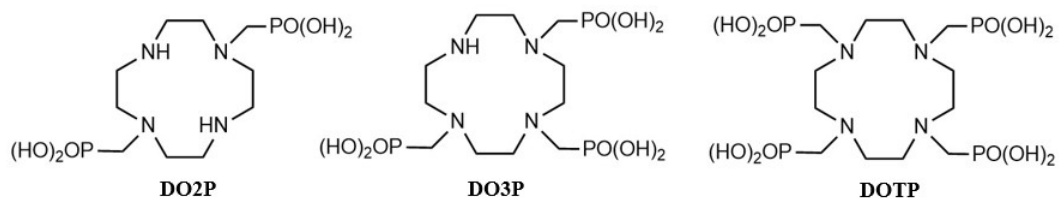


Figura 1.9 Struttura dei chelanti poliamminofosfonati studiati per il rame.

1.5.1.1 Riduzione *in vivo* di Cu^{2+}

Uno dei meccanismi che *in vivo* comportano la demetallazione dei complessi di Cu^{2+} è considerato essere la riduzione dello ione metallico da Cu^{2+} a Cu^+ ad opera di proteine endogene coinvolte nel metabolismo del rame. [77] Poiché lo ione Cu^+ risultante, come visto, predilige donatori a carattere *soft*, che non sono presenti nei chelanti finora proposti, il complesso che con Cu^{2+} risultava stabile diventa invece instabile con Cu^+ , e ciò può comportarne la rottura e il successivo accumulo dello ione in organi non bersaglio.

Una strategia che permetta di ovviare a questa problematica può essere quella di utilizzare un legante in grado di stabilizzare entrambi gli stati d'ossidazione del rame (+1 e +2). In questa maniera, infatti, se anche Cu^{2+} si riducesse a Cu^+ *in vivo*, la demetallazione verrebbe impedita, consentendo di ottenere una biodistribuzione più mirata e rendendo così possibile l'uso del radiofarmaco in medicina. Operativamente, un'idea può essere quella di scegliere chelanti caratterizzati dalla presenza di atomi donatori sia di zolfo che di azoto, e tali da poter modulare i gruppi funzionali chelanti a seconda dello stato di ossidazione dello ione. Si deve segnalare che né la strategia, né tantomeno l'idea operativa di utilizzare chelanti contenenti zolfo, sono state finora considerate nella letteratura specializzata sul radiorame.

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI

Uno dei passaggi chiave nella produzione di radiofarmaci a base di Ag-111, rame-67 e rame-64 è quello di disporre di chelanti che posseggano stabilità termodinamica e inerzia cinetica nei confronti del radionuclide in condizioni fisiologiche.

Il nostro gruppo di ricerca ha iniziato alcuni anni fa lo studio di una nuova classe di composti, derivati del 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (cyclen) (**Figura 1.7**), come possibili chelanti per Ag^+ e per $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$. L'idea è stata quella di funzionalizzare il cyclen con dei derivati metil-etil-tioeterei, dato che lo ione Ag^+ e lo ione Cu^+ hanno un carattere *soft* e pertanto prediligono donatori come lo zolfo, ma nello stesso tempo sono in grado di formare complessi stabili anche col *backbone* poliazacilico del cyclen. Tramite la N-funionalizzazione del cyclen con donatori tioeteri si è ottenuto il 1,4,7,10-tetrakis[2-metilsulfonietil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (DO4S), capostipite della prima famiglia di chelanti presa in esame (**Figura 2.1**), che ha dimostrato di formare complessi molto stabili con Ag^+ e Cu^+ . Tale stabilità è imputabile anche alla preorganizzazione strutturale del legante, in quanto sia nel complesso che nella forma libera le catene del DO4S hanno conformazione *syn* e gli atomi di azoto dell'anello sono quasi coplanari. Anche Cu^{2+} forma comunque complessi molto stabili col DO4S grazie soprattutto agli azoti del macrociclo, ma anche al contributo significativo di uno dei sostituenti tioeterei, il quale migliora la stabilità rispetto al cyclen tal quale.

Partendo dal DO4S, si sono variate le catene laterali sugli atomi di azoto, allo scopo di determinare gli effetti del diverso numero di atomi di zolfo presenti e delle differenze nei gruppi donatori sulle proprietà del complesso analizzato. Sono stati quindi presi in considerazione altri composti, mostrati in **Figura 2.1**. Il DO4S4Me ((2S,5S,8S,11S)-2,5,8,11-tetrametil-1,4,7,10-tetrakis[2-metilsulfanil)-etil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano) è caratterizzato dalla presenza dei gruppi metilici sull'anello che favoriscono la preorganizzazione del legante e ne aumentano la rigidità. Tale legante è risultato formare complessi maggiormente stabili con Ag^+ che non DO4S,

ma l'aumento di stabilità è stato modesto, per cui questo composto è stato abbandonato a causa della notevole complicatezza della sua sintesi, molto più elaborata e quindi costosa che non quella del DO4S. Il DO3S (1,4,7-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano) è analogo al DO4S ma possiede solo tre catene al fine di lasciare un atomo di azoto libero (non funzionalizzato) per consentire il legame con la molecola *carrier* (*targeting vector*). Il DO3SAm (1,4,7-tris[2-(metilsulfanil)etil]-10-acetammido-1,4,7,10-tetraazaciclododecano) è simile al DO3S con la differenza che il quarto atomo di azoto non è libero, ma funzionalizzato con un gruppo ammidico. Sia DO3S che DO3SAm sono risultati formare complessi con Ag^+ , Cu^{2+} e Cu^+ un po' meno stabili rispetto a quelli di DO4S, ma con differenze molto contenute (circa un ordine di grandezza in termini di costanti di equilibrio). DO2A2S (acido 1,7-bis[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-4,10-diacetico) presenta due catene tioeteree alternate a due gruppi carbossilati al fine di aumentare la solubilità del complesso in acqua e di assicurare il legame con la molecola *carrier*. [60] DO2A2S di fatto risulta un legante ibrido tra DO4S e DOTA, e si è dimostrato formare complessi un po' meno stabili di DO4S con Ag^+ e Cu^+ , mentre i complessi sono risultati avere stabilità molto elevata con Cu^{2+} , maggiore di quella di tutti gli altri composti considerati (e anche maggiore di quella del DOTA).

Questi composti hanno dato risultati molto promettenti per la medicina nucleare basata su argento-111 e rame-64/rame-67, in quanto, oltre alla accennata stabilità termodinamica, essi mostrano di possedere una notevole inerzia cinetica di decomplessamento e un'adeguata velocità di formazione dei complessi in condizioni fisiologiche. [46][60]

Dopo i composti basati sul cyclen e prima descritti, si è deciso di indagare dei poliazamacrocicli basati su un anello diverso dal cyclen (**Figura 2.1**), per valutare l'effetto della diversa dimensione dell'anello, nonché eventualmente di un diverso numero di azoti, sulle proprietà termodinamiche e cinetiche dei complessi con Ag^+ , Cu^{2+} e Cu^+ . Sono stati quindi presi in esame 1,5,9-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,5,9-triazaciclododecano (TACD3S), che presenta un anello a dodici termini e tre atomi di azoto, 1,4,7,10-tetrakis[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7,10-tetraazaciclotridecano (TRI4S) che possiede un anello più grande rispetto all'analogo DO4S (a tredici atomi anziché dodici), e 1,4,8,11-tetrakis[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano

(TE4S), che differisce dal TRI4S per la presenza di un ulteriore metilene. I risultati ottenuti dimostrano come la stabilità termodinamica e l'inerzia cinetica di decomplessamento diminuiscano al crescere della dimensione dell'anello e al diminuire del numero di azoti presenti, [57][61][75] cosicché si è potuto concludere che i derivati del cyclen sono complessivamente i migliori.

Il quadro sui poliazamacrocicli solforati e sulle loro proprietà complessanti nei confronti di Ag^+ , Cu^{2+} e Cu^+ non è ancora completo. Mancano (ovviamente) tutta una serie di macrocicli più grandi del TE4S, eventualmente contenenti un numero di atomi di azoto maggiore di quattro. Sono noti numerosissimi macrocicli con un numero di atomi maggiore di 14; tuttavia, nell'ambito della radiomedicina non risultano particolarmente studiati, in quanto, almeno nei confronti di Cu^{2+} , hanno mostrato proprietà termodinamiche o cinetiche peggiori rispetto ai macrocicli più piccoli. Tali composti sono comunque di interesse, in particolare quando nel macrociclo sono presenti anche altri eteroatomi come l'ossigeno o lo zolfo, ma non saranno trattati in questa tesi.

Invece, per completare il quadro sulle proprietà dei macrocicli solforati manca un derivato più piccolo tra quelli finora considerati, e cioè il TACN (1,4,7-triazaciclononano). Il TACN rappresenta un *backbone* molto importante, poiché, come accennato nel **Capitolo 1**, numerosi chelanti per il rame e per altri metalli sono basati su di esso, grazie alle sue favorevoli proprietà sia termodinamiche che cinetiche. Appare quindi necessario indagare il composto che si ottiene derivatizzando il TACN con leganti solforati analoghi a quelli finora considerati.

Lo scopo di questa tesi è stato dunque quello di studiare il NO3S (**Figura 2.2**), con l'obiettivo di valutare l'effetto che l'anello più piccolo, a nove termini, ha sul complessamento e in particolare sulla stabilità termodinamica, sia nei confronti di Ag^+ che di $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$.

Lo studio dei complessi è stato preceduto dalla determinazione delle costanti di dissociazione acida ($\text{p}K_a$) del chelante tal quale; tale misura è stata realizzata attraverso misure spettroscopiche NMR. In seguito, sono stati analizzati i complessi formati con Ag^+ e Cu^{2+} in soluzione acquosa conducendo studi termodinamici mediante spettroscopia NMR e spettrofotometria UV-vis; l'obiettivo è stato quello di ottenere le costanti di complessamento e la speciazione dei sistemi, ovvero il numero e la

stechiometria dei diversi complessi presenti. Per quanto riguarda Cu^+ , vista l'instabilità di tale ione in soluzioni acquose, i suoi complessi sono stati studiati indirettamente mediante voltammetria ciclica.

Tutte le misure sono state effettuate utilizzando isotopi stabili dell'argento e del rame; si può infatti considerare che gli isotopi radioattivi usati in medicina nucleare hanno lo stesso comportamento chimico degli isotopi stabili, per cui i dati ottenuti per questi ultimi possono essere poi applicati anche su argento-111, rame-64 e rame-67.

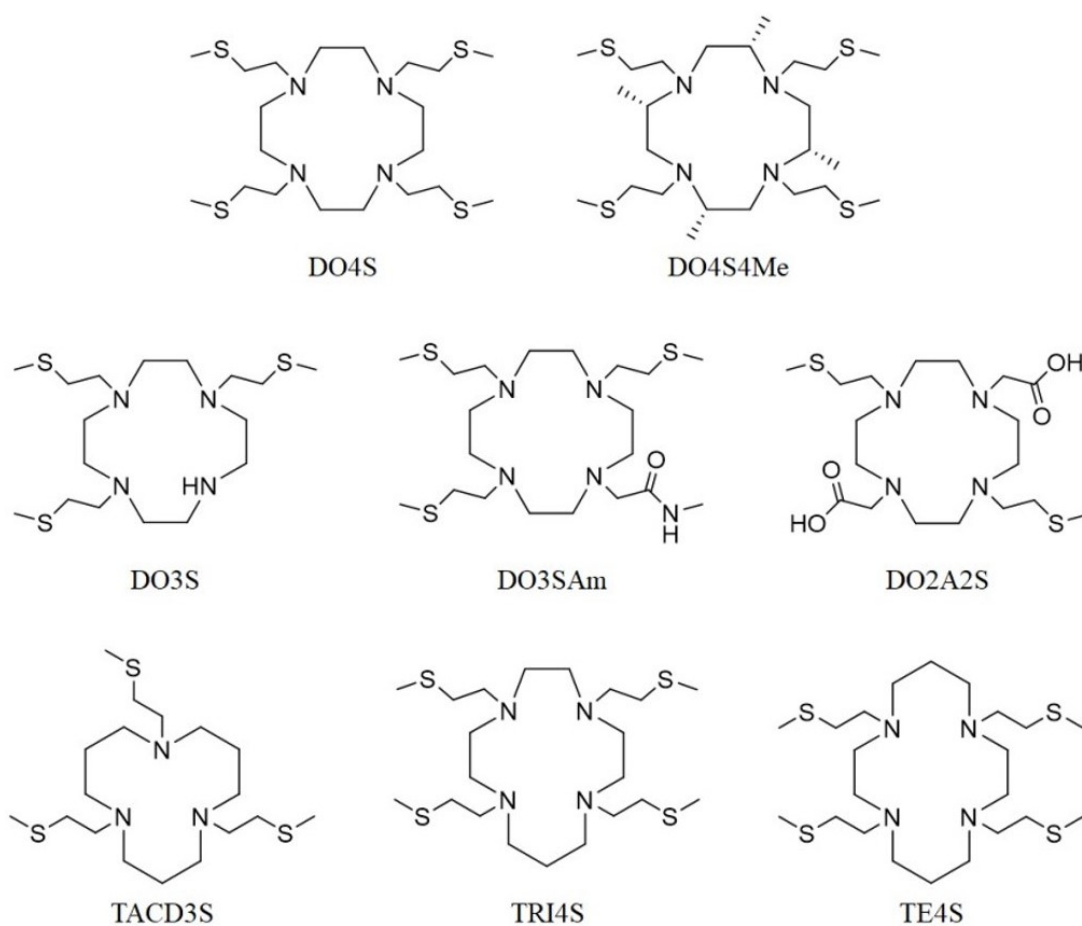


Figura 2.1 Strutture dei leganti DO4S, DO4SMe, DO3S, DO3SAm, DO2A2S, TACCD3S, TRI4S, TE4S chelanti studiati in lavori precedenti. [57][61][75]

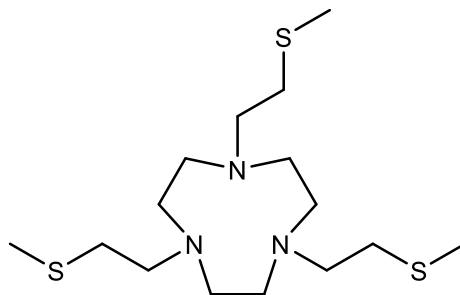


Figura 2.2 Struttura di NO3S il chelante studiato in questo lavoro di tesi.

CAPITOLO 3

METODICHE STRUMENTALI UTILIZZATE

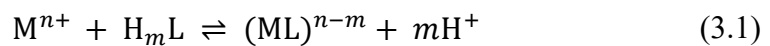
Durante questa tesi sono state utilizzate metodiche volte a determinare la situazione di equilibrio di sistemi metallo-legante, e la loro evoluzione cinetica. Nel caso dello studio di sistemi all'equilibrio, l'obiettivo è quello di determinare le costanti di formazione di tali complessi e la loro speciazione, ovvero il numero e la stechiometria delle specie presenti. Al fine di ottenere risultati validi ed affidabili le tecniche utilizzate devono soddisfare alcune caratteristiche, cioè essere sensibili ad una delle proprietà della soluzione che viene modificata in seguito alla formazione del complesso, e non perturbare il sistema studiato al fine di evitare la presenza di errori sistematici. [62] Anche nel caso degli studi cinetici, le tecniche utilizzabili a questo scopo devono essere sensibili ad una delle proprietà della soluzione che viene modificata in seguito alla formazione del complesso, e non perturbare il sistema studiato. Inoltre, è necessario che la risposta strumentale sia sufficientemente rapida rispetto alla velocità del processo monitorato.

Le tecniche generalmente utilizzate per tali studi e utilizzate nel seguente lavoro di tesi sono di seguito illustrate.

3.1 Potenziometria

Grazie alla semplicità d'utilizzo, al suo basso costo e alla possibilità di automatizzare le procedure, la potenziometria è una delle tecniche più utilizzate per lo studio degli equilibri di complessamento metallo-legante; risulta invece scarsamente impiegata per studi cinetici, e quanto segue su tale tecnica fa riferimento essenzialmente a misure termodinamiche.

La tecnica potenziometrica si basa sulla rilevazione all'equilibrio della forza elettromotrice (fem) di una cella galvanica costituita da due elettrodi: uno di riferimento, l'altro sensibile a una delle specie coinvolte negli equilibri di complessamento. La formazione dei complessi viene generalmente rilevata in modo indiretto, determinando la presenza degli ioni H^+ (H_3O^+), in quanto le reazioni di complessamento liberano solitamente protoni secondo la reazione 3.1.



Un elettrodo molto utilizzato per misurare i protoni è quello di vetro in quanto offre un'elevata sensibilità agli ioni H_3O^+ , è molto accurato, è di semplice utilizzo e richiede poca manutenzione. Oltre a questo, possono essere utilizzati anche altri elettrodi di misura specifici per determinati ioni metallici, a condizione che presentino caratteristiche comparabili a quelle dell'elettrodo di vetro, come ad esempio quello di prima specie ad argento utilizzabile per misurare Ag^+ .

3.1.1 Elettrodo di vetro

L'elettrodo di vetro è un dispositivo sensibile agli ioni H_3O^+ che permette di misurare una fem. È costituito da una sottile membrana di vetro la cui superficie esterna è posta in contatto con il sistema studiato, mentre quella interna è a contatto con una soluzione che solitamente è tamponata e comunque deve contenere ioni cloruro. La fem (E) dell'elettrodo si origina a causa delle diverse cariche ai due lati e può essere espressa attraverso l'equazione di Nernst (3.2).

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

Dove:

- E^0 è il potenziale standard dell'elettrodo, che racchiude diverse grandezze (tra cui il potenziale di asimmetria della membrana e i potenziali standard del riferimento interno all'elettrodo di vetro (elettrodo ad $Ag/AgCl/Cl^-$) e del riferimento esterno);
- R è la costante universale dei gas ($R = 8.31447 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$);

- T è la temperatura assoluta espressa in Kelvin;
- n indica il numero di elettroni scambiati (pari a 1 per l'elettrodo di vetro);
- F è la costante di Faraday ed esprime la quantità di carica elettrica di una mole di elettroni ($F = 96485.3 \text{ C mol}^{-1}$);
- a_{H} e a_{M} sono, rispettivamente, le attività dello ione H_3O^+ e di un generico catione interferente M^+ ;
- k_{M} rappresenta il coefficiente di selettività dell'elettrodo di vetro rispetto a M^+ , che solitamente è Na^+ o K^+ . Nel corrente lavoro di tesi si è introdotto lo ione Na^+ sia come elettrolita di supporto (come NaNO_3) sia durante le titolazioni (come NaOH). Se il prodotto $k_{\text{M}}a_{\text{M}}$ non è trascurabile rispetto ad a_{H} , la fem misurata è maggiore di quella reale e di conseguenza il pH determinato è minore. Questa situazione è nota come errore alcalino, che è pari alla differenza tra il valore del pH effettivo e quello sperimentalmente determinato. Esso è rivelante solo a pH molto basici, cioè laddove la concentrazione di M^+ è molto maggiore di quella di H_3O^+ . L'errore alcalino può essere ridotto significativamente utilizzando elettrodi commerciali realizzati con vetri particolari; in alternativa la sua entità può essere determinata attraverso esperimenti mirati.

Un altro tipo di errore è invece quello acido, non legato al parametro k_{M} , ma dato dalla sovrasaturazione dei siti superficiali dell'elettrodo a pH molto acidi; tale errore comporta una deviazione rispetto all'equazione di Nernst.

- E_j indica il potenziale di giunto liquido ed è dovuto alla diversa migrazione per diffusione degli ioni all'interfase tra la soluzione di misura e la soluzione interna all'elettrodo di riferimento. Tale differenza genera uno sbilanciamento di carica all'interfaccia e quindi dà un contributo alla fem dell'elettrodo, detto potenziale di giunto liquido. Il valore di E_j dipende da alcuni parametri quali la temperatura, la geometria dell'interfaccia tra le due fasi e la composizione delle soluzioni interna ed esterna. Gli elettrodi disponibili in commercio presentano un valore di E_j molto basso e costante, grazie soprattutto alla scelta dell'elettrolita per la soluzione interna, che è un sale molto concentrato (di solito KCl 3 M), ma questo è vero solo se si opera in un intervallo di pH approssimativamente compreso tra 2 e 12.5. A pH estremi, invece, E_j assume

un valore non trascurabile (e difficilmente determinabile), a causa del contributo significativo degli ioni ad alta mobilità H_3O^+ e OH^- . A pH estremi, quindi, le misure di pH sono poco accurate.

3.1.2 Controllo della forza ionica

L'equazione di Nernst (3.2) contiene le attività delle specie presenti in soluzione, che per un generico ione M è definita dalla formula (3.3):

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

dove γ è il coefficiente di attività e racchiude tutte le deviazioni rispetto all'idealità della specie considerata, e $[M]$ è la sua concentrazione. Esistono numerose equazioni volte a determinare il valore di γ per uno specifico sale sciolto in soluzione; quella più semplice, valida per soluzioni molto diluite (concentrazioni circa inferiori a 10^{-3} M), è l'equazione di Debye-Hückel (3.4):

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

dove:

- $z_+ z_-$ rappresentano le cariche degli ioni;
- I è la forza ionica, termine adimensionale, definito dall'equazione 3.5 in cui C_i e z_i sono rispettivamente la concentrazione molare o molale e la carica dello ione i -esimo.

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

Se la forza ionica della soluzione è maggiore di 10^{-3} M, l'equazione di Debye-Hückel non è valida, e diventerebbe necessario utilizzare altre equazioni via via più complicate. Quando la forza ionica supera circa 0.1 M, ogni equazione generale perde di significato, e subentrano equazioni nelle quali vi sono parametri che dipendono dallo ione specifico; tali parametri sono noti solo per gli ioni più comuni.

Indipendentemente dalla forza ionica della soluzione e quindi dalle equazioni da utilizzare, tuttavia, si osserva un comportamento comune: almeno in prima approssimazione, i coefficienti di attività possono rimanere costanti semplicemente

mantenendo la forza ionica costante. Il controllo della forza ionica risulta quindi di notevole importanza al fine di determinare le costanti di equilibrio, in quanto permette di sostituire le concentrazioni alle relative attività, e di inglobare il termine dei coefficienti di attività nella costante E^0 (per l'equazione di Nernst) o nella costante di equilibrio (per le costanti di equilibrio). Al fine di realizzare sperimentalmente questa situazione, alla soluzione in esame si aggiunge comunemente un elettrolita inerte avente concentrazione molto maggiore rispetto a quella di tutte le altre specie presenti, in modo tale che i coefficienti d'attività restino sostanzialmente costanti. Solitamente, come elettroliti vengono utilizzati sali di metalli alcalini e anioni monovalenti.

Le costanti di equilibrio ottenute con tale metodo vengono definite stechiometriche poiché dipendono dal mezzo in cui vengono condotte le analisi, a differenza delle costanti termodinamiche che invece non presentano alcuna dipendenza di questo tipo. Queste ultime possono essere ricavate in due modi: tramite la determinazione dei coefficienti di attività delle specie presenti negli equilibri, oppure attraverso l'estrapolazione a diluizione infinita delle costanti stechiometriche a diversi valori di forza ionica. [63]

3.1.3 Determinazione delle costanti di formazione

3.1.3.1 Principio del metodo

La titolazione potenziometrica viene condotta titolando con base forte una soluzione acida contenente il metallo e il legante; si ottengono una serie di punti in cui ad ogni volume noto di titolante aggiunto corrisponde una fem misurata. Mediante il confronto tra i dati ottenuti sperimentalmente dall'elettrodo e quelli calcolati teoricamente tramite l'equazione di Nernst (3.4) è possibile, attraverso una procedura iterativa, calcolare le costanti di formazione dei complessi.

Il processo richiede nella prima fase di ipotizzare il modello di speciazione del sistema studiato, cioè il numero e la stechiometria delle specie presenti. Le ipotesi si fondano sulla ragionevolezza e sul buon senso chimico; vengono pertanto considerate le proprietà acido-base sia del legante che del metallo e i sistemi analoghi precedentemente analizzati e riportati in letteratura, escludendo specie improbabili dal

punto di vista chimico. Nella seconda fase viene calcolata la curva di titolazione teorica tramite la risoluzione del sistema di equazioni del bilancio di massa per le specie presenti in soluzione (le cariche sono omesse per semplicità) (3.6):

$$\begin{aligned}
 [M]_0 &= [M] + \sum_i^n m \beta_{m,l,h} [M]^m [L]^l [H]^h \\
 [L]_0 &= [L] + \sum_i^n m \beta_{m,l,h} [M]^m [L]^l [H]^h \\
 [H]_0 &= [H] + \sum_i^n m \beta_{m,l,h} [M]^m [L]^l [H]^h
 \end{aligned}
 \tag{3.6}$$

dove:

- $[M]_0$, $[L]_0$, $[H]_0$ sono le concentrazioni stechiometriche di metallo, legante e protone, note in ogni punto sperimentale attraverso le quantità introdotte in soluzione
- n rappresenta il numero totale di specie presenti all'equilibrio in aggiunta a M, L e H
- m , l , h sono i coefficienti stechiometrici di metallo, legante e protone nella specie i -esima. Mentre i valori di m e l sono necessariamente pari o superiori a zero, quelli di h possono essere anche negativi per indicare una perdita di protoni, ovvero l'acquisizione di gruppi ossidrilici (ad esempio se $m = 1$, $l = 1$ e $h = -1$, la specie è MLH_{-1} che corrisponde a $MLOH$)
- $\beta_{m,l,h}$ sono le costanti di formazione globali delle specie espresse dall'equazione (3.7) alle quali, in un primo momento, viene attribuito un valore arbitrario

$$\beta_{m,l,h} = \frac{[M_m L_l H_h]}{[M]^m [L]^l [H]^h}
 \tag{3.7}$$

- $[M]$, $[L]$, $[H]$ indicano le concentrazioni all'equilibrio del metallo, del legante e del protone liberi e rappresentano le incognite del sistema. Utilizzando l'equazione di Nernst (3.4) è possibile, dal valore teorico di $[H]$ determinato dalla risoluzione del sistema, calcolare il valore teorico della fem (se anziché l'elettrodo di vetro se ne utilizzasse uno selettivo per lo ione metallico, la

grandezza d'interesse sarebbe [M]). Tale procedura deve essere ripetuta per ogni singolo punto sperimentale.

Nell'ultima fase della procedura è necessario modificare i valori delle costanti di formazione in modo tale da minimizzare la differenza tra le fem teoriche e quelle sperimentali ottenendo risultati più probabili per $\beta_{m,l,h}$ in funzione del modello di speciazione considerato. Tale calcolo viene svolto tramite una procedura iterativa implementata in uno specifico programma di calcolo denominato PITMAP (**Paragrafo 3.1.3.2**).

3.1.3.2 Programma PITMAP per l'elaborazione dei dati potenziometrici

Il programma PITMAP è stato scritto in linguaggio Turbo Pascal e funziona in ambiente DOS. [62] La prima operazione per l'elaborazione dei dati potenziometrici è la scelta delle specie che si ritengono essere presenti in soluzione come i componenti liberi e i possibili complessi metallo-legante. In seguito, è richiesto il caricamento dei dati potenziometrici e l'inserimento di valori plausibili per le costanti di formazione dei complessi presenti nel modello di speciazione considerato e per gli altri parametri non propriamente termodinamici, riportati in **Tabella 3.1**, che possono alterare il potenziale di Nernst dell'elettrodo.

Tabella 3.1 Parametri utilizzati nel programma PITMAP.

Grandezze “non termodinamiche”		Costanti di equilibrio	
Potenziale standard	E^0	Autoprotolisi H ₂ O	K_W
Pendenza di Nernst	S	Costanti metallo-legante	$\beta_{m,l,h}$
Costante di errore alcalino	k_{Na}	Costanti di acidità legante	K_{aL}
Impurezze iniziali acide/basiche	imp	Costanti di acidità acido carbonico	$K_{a,CARB}$
Titolo soluzione della base	C_B		
Carbonatazione soluzione base	α		
Titolo soluzione legante	C_L		
Titolo soluzione metallo	C_M		

Tali parametri possono essere mantenuti costanti ad un valore scelto o fatti variare durante l'elaborazione al fine di minimizzare, in modo iterativo, la differenza tra le fem teoriche e sperimentali. Inoltre, il programma permette di ripetere più volte il processo di ottimizzazione consentendo di modificare i valori dei diversi parametri, di escludere alcuni punti sperimentali ritenuti poco significativi e di selezionare un diverso modello di speciazione.

I risultati quantitativi ottenuti da questo processo presentano un'accuratezza che dipende sia dalle condizioni sperimentali, sia dall'efficienza e dalla robustezza del metodo di *fitting* utilizzato. Per tale motivo quest'ultimo deve soddisfare due requisiti: essere un metodo non-lineare poiché anche la funzione da ottimizzare (dipendente dalla composizione della soluzione) non è lineare nei parametri, e permettere il *fitting* di funzioni implicite, perché alcune variabili, come le costanti di equilibrio, modificano in modo implicito il valore della concentrazione degli ioni idrogeno liberi attraverso il sistema dei bilanci di massa.

Il programma PITMAP utilizza come algoritmi di *fitting* il metodo del semplice e il metodo del *pit-mapping* basati sulla tecnica dei minimi quadrati. [62]

3.1.3.3 Pesatura dei punti sperimentali

I metodi di *fitting* usati dal programma PITMAP attribuiscono al punto sperimentale *i*-esimo un peso statistico pari all'inverso della varianza (equazione 3.8):

$$\sigma_i^2 = \sigma_{E,i}^2 + \left[\left(\frac{dE}{dV} \right)_i \right]^2 \cdot \sigma_{V,i}^2 \quad (3.8)$$

dove:

- σ_i è la deviazione standard attribuita al punto sperimentale *i*-esimo
- $\sigma_{E,i}$ è la deviazione standard della fem
- $\sigma_{V,i}$ è la deviazione standard del volume
- $\left(\frac{dE}{dV} \right)_i$ è la pendenza della curva di titolazione calcolata al punto *i*-esimo

Tale pesatura ha lo scopo di dare maggiore importanza ai punti poco pendenti della curva di titolazione, e una minore importanza ai punti maggiormente pendenti i quali, in quanto tali, sono solitamente affetti da un'incertezza elevata.

3.1.3.4 Valutazione della bontà del *fitting*

Per valutare la validità e l'affidabilità dei dati ottenuti si calcola la funzione σ_{fit} (equazione 3.9) proporzionale alla somma dei quadrati degli scarti tra la curva teorica e quella sperimentale. [64]

$$\sigma_{fit} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(E_{i,cal} - E_{i,sper})^2}{(N - P)}} \quad (3.9)$$

dove:

- N rappresenta il numero di punti sperimentali;
- P indica il numero di parametri ottimizzati;
- $E_{i,cal}$ è il valore della fem calcolata nel punto i -esimo impostando determinati valori ai parametri
- $E_{i,sper}$ è il valore sperimentale della fem nel punto i -esimo

Tramite tale funzione è possibile confrontare *fitting* di esperimenti diversi anche se non hanno lo stesso numero di punti sperimentali, poiché essa dipende solamente dalla dispersione dei dati rispetto al valore calcolato. Inoltre, è anche possibile disporre di un valore di σ_{fit} teorico basato sulla risoluzione strumentale del voltmetro utilizzato (0.1 mV nei casi più comuni), che è pari a 0.03 mV, e col quale è possibile confrontare il valore effettivamente ottenuto. Valori sperimentali così bassi di σ_{fit} sono comunque improbabili a causa della presenza di altre fonti d'incertezza oltre alla risoluzione strumentale, incertezza che diviene via via maggiore quanto più numerosi sono i componenti aggiunti in soluzione durante una titolazione. In base all'esperienza acquisita, un *fitting* viene ritenuto valido quando σ_{fit} è inferiore a 0.1-0.2 mV nella calibrazione degli elettrodi, 0.3-0.5 mV nelle titolazioni acido-base e in quelle del legante e del metallo, e 0.5-1.0 mV nelle titolazioni di miscele metallo-legante.

3.1.3.5 Il problema dei falsi minimi

Un problema riscontrabile utilizzando i metodi di *fitting* precedentemente citati è dato dai falsi minimi, ovvero punti di minimo relativo della funzione σ_{fit} , che l'algoritmo invece interpreta come minimi assoluti. La probabilità che l'algoritmo incorra in falsi minimi aumenta all'aumentare della complessità del sistema e rende di conseguenza più probabile la restituzione di parametri ottimizzati errati. Per ovviare a questo problema esistono tre diverse tecniche in grado di distinguere punti di minimo relativo da quelli di minimo assoluto. La prima prevede la ripetizione del *fitting* con algoritmi differenti e si basa sul fatto che difficilmente essi convergono verso lo stesso falso minimo. La seconda consiste nel ripetere il *fitting* variando i valori dei parametri iniziali in quanto solo nel caso di un vero minimo l'algoritmo riporterà lo stesso risultato precedentemente trovato. La terza prevede il confronto dei valori ottenuti con quelli presenti in letteratura o comunque attesi in base alle condizioni sperimentali utilizzate per l'esperimento potenziometrico, per valutare la loro verosimiglianza e quindi affidabilità.

In caso di sistemi caratterizzati da un'elevata complessità, che comportano molti parametri da ottimizzare, è opportuno condurre gli esperimenti in modo sequenziale e condurre analisi separate per sistemi diversi a complessità crescente. In questo modo, infatti, è possibile, nei sistemi più semplici, ottimizzare alcuni parametri incogniti e in seguito introdurli come costanti per l'elaborazione di sistemi più complessi. In determinati casi, inoltre, in letteratura sono disponibili i valori di alcuni parametri che possono essere posti come costanti senza la necessità di doverli ottimizzare.

3.1.3.6 Scelta del modello di speciazione

Il metodo di *fitting* può essere svolto con affidabilità se è noto il modello di speciazione, cioè quali e quante specie sono presenti in soluzione. D'altra parte, questa conoscenza non è disponibile per sistemi metallo-legante nuovi. Per questo motivo, la scelta del modello di speciazione da adottare viene fatta attraverso un processo iterativo. Si impostano diversi modelli di speciazione, si esegue il *fitting* con ciascuno di essi, e si ottengono quindi diversi valori di σ_{fit} ; il modello corretto è in prima approssimazione quello che presenta il σ_{fit} minore in quanto dovrebbe presentare il

miglior accordo tra la curva sperimentale e quella calcolata. Tuttavia, non sempre è così: talvolta, infatti, la presenza di alcune specie in soluzione potrebbe semplicemente essere una modalità di compensazione di piccoli errori sistematici commessi durante le misure, e diminuire quindi il valore di σ_{fit} in maniera artificiosa. Normalmente è necessario seguire alcune regole empiriche che permettono la verifica finale della correttezza del modello scelto:

- Se il *fitting* è scadente in ogni punto o in buona parte della curva di titolazione, il modello di speciazione è errato
- Se il *fitting* è buono in qualche intervallo della curva, ma scadente negli altri, il modello di speciazione è corretto per la parte buona e va sistemato per quella rimanente
- Se il *fitting* è buono, ma alcuni parametri presentano valori irrealistici o molto diversi da un esperimento all'altro, il modello è sovrastimato, ovvero contiene più specie di quelle realmente presenti nel sistema; in tal caso si deve ripetere il *fitting* eliminando una alla volta le varie specie per identificare quella (o quelle) inesistente.

Infine, un metodo molto efficace che permette di evidenziare la presenza di modelli errati prevede di eseguire titolazioni in diverse condizioni sperimentali come, ad esempio, a differenti concentrazioni di metallo, di legante o differenti rapporti tra i due. Solo per le specie realmente esistenti, infatti, il valore ottimizzato della costante di equilibrio non dipende dalle condizioni sperimentali. [62]

3.1.4 Controllo dei sensori di misura

Nelle misure potenziometriche, in particolare in quelle condotte con elettrodo di vetro, la speciazione viene desunta in maniera indiretta, mediante il confronto tra la curva teorica e quella sperimentale. Quest'ultima, però, può essere (facilmente) modificata anche da impurezze acido-base estranee al metallo e al legante, oppure semplicemente dal malfunzionamento degli elettrodi o del sistema di misura in generale. Al fine di eliminare o quantomeno ridurre tali errori vi è la necessità di porre particolare

attenzione nella preparazione e conservazione delle soluzioni utilizzate per le titolazioni potenziometriche, e di controllare ogni dettaglio sperimentale.

È noto, ad esempio, che la luce solare può portare ad una deriva della costante E^0 degli elettrodi di riferimento, deriva che nei nostri laboratori è stata misurata essere anche di 2 mV entro lo stesso giorno (quindi molto significativa rispetto alla risoluzione strumentale, pari a 0.1 mV). Vi sono poi campi magnetici fluttuanti originati in condizioni di scarsa umidità atmosferica, che comportano delle momentanee oscillazioni della fem misurata dall'elettrodo di vetro. Anche la stessa temperatura deve essere tenuta controllata, in quanto è un parametro dell'equazione di Nernst ed è un fattore da cui dipende il parametro E^0 (che si modifica di circa 1 mV in seguito a una variazione di 1 °C). Per tali motivi le misure vengono effettuate in una scatola opaca rivestita da una gabbia di Faraday contenente una cella di misura posta in un sistema termostato.

La temperatura di laboratorio può causare un errore sistematico anche sui volumi di soluzione erogati dalle burette, le quali non sono termostate. Quest'errore può essere valutato attraverso il coefficiente di dilatazione termica dell'acqua, pari a $2.6 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$ a 25°C e 1 atm, che però risulta inferiore alla precisione delle burette a temperature vicine ai 25°C. Ne consegue che, se la temperatura del laboratorio è compresa tra circa 20 e 30 °C, l'errore di volume risulta trascurabile. [62]

3.1.5 Limiti del metodo potenziometrico

Il metodo potenziometrico presenta alcune limitazioni che talvolta rendono difficile o persino impossibile l'ottenimento di dati affidabili. Questo è dovuto in primo luogo all'uso di un elettrodo di vetro, sia perché esso misura la concentrazione di H_3O^+ , influenzata solo in modo indiretto dagli equilibri di complessamento, sia per la possibile presenza di impurezze acido-base che possono modificare il potenziale misurato. Un altro limite è dato dall'analisi di sistemi particolarmente complicati caratterizzati da un elevato numero di specie presenti, in quanto vi è la possibilità che alcuni complessi influenzino il pH solo in modo marginale, rendendo così ugualmente accettabili diversi modelli di speciazione. Inoltre, le misure potenziometriche non risultano accurate a pH inferiori a 2 e superiori a 12.5 per quanto visto nei paragrafi precedenti (impossibilità di conoscere con esattezza il potenziale di giunto liquido in

queste condizioni). In più, a pH molto basici subentra l'errore alcalino, mentre in condizioni di elevata acidità vi è l'errore acido. Tra l'altro, a pH molto acidi si aggiunge anche l'impossibilità di rilevare la variazione della concentrazione di H_3O^+ dovuta agli equilibri di complessamento in una condizione in cui $[\text{H}_3\text{O}^+]$ è di per sé molto elevata. La misura potenziometrica, infine, richiede che il sistema analizzato sia all'equilibrio durante l'intero corso della titolazione, al fine da consentire la correlazione del potenziale misurato con la composizione del sistema stesso. Pertanto, tale tecnica risulta utilizzabile solamente se le reazioni sono sufficientemente veloci, ovvero avvengono in tempi massimi dell'ordine di alcuni minuti; in caso contrario i parametri relativi alla calibrazione dell'elettrodo, come E^0 e la pendenza di Nernst, sono soggetti a derive che causano errori significativi.

3.2 Spettroscopia NMR

La spettroscopia NMR è una tecnica frequentemente utilizzata per lo studio degli equilibri acido-base e di complessamento metallo-legante in soluzione. Se i fenomeni studiati sono sufficientemente lenti, la tecnica è ottimamente adatta anche per monitorare le cinetiche.

Il metodo è basato sullo studio delle variazioni dello spettro, al modificarsi delle concentrazioni delle specie presenti in soluzione (metallo e legante) o del pH. Se, come spesso accade, si studia la spettroscopia ^1H , si possono misurare i segnali dei nuclei del legante in prossimità del centro metallico, i quali subiscono uno spostamento, variazione del *chemical shift*, tale da permettere la distinzione tra complesso e legante libero. A seconda delle proprietà termodinamiche e cinetiche del sistema studiato, è possibile ottenere uno spettro in cui vi siano solamente i segnali mediati del complesso e del legante libero, oppure uno in cui vi sia la presenza di entrambi i segnali separati. Dallo spettro è possibile ottenere diverse informazioni come il numero di specie presenti, la loro abbondanza e la distanza relativa dei nuclei dal centro metallico. [65] In particolare, il *fitting* delle curve sperimentali che riportano i *chemical shift* in funzione di un parametro (ad esempio il pH) possono permettere di determinare le

costanti di dissociazione acida (pK_a) delle specie coinvolte o le costanti di complessamento.[62]

Dati sperimentali più sofisticati possono essere ottenuti utilizzando il cosiddetto NMR bidimensionale.[63] Tali esperimenti sono caratterizzati da quattro fasi: preparazione, evoluzione, *mixing* e rivelazione (**Figura 3.1**). Inizialmente viene creata una coerenza di magnetizzazione attraverso una serie di impulsi a radiofrequenza, e successivamente vi è un periodo d'attesa (t_1) che viene variato nel corso della misura. La registrazione del FID avviene durante il tempo t_2 per ogni valore di t_1 e porta ad un insieme di dati in funzione delle due variabili temporali (t_1 e t_2). Lo spettro bidimensionale viene ottenuto mediante l'applicazione della trasformata di Fourier sulle dimensioni t_1 e t_2 nel dominio di frequenze F_2 e F_1 . Gli esperimenti possono avere una correlazione omonucleare (ovvero si riferiscono allo stesso nucleo) o eteronucleare (si riferiscono a nuclei diversi). Nel caso degli spettri bidimensionali omonucleari essi sono caratterizzati da una diagonale, che rappresenta la proiezione dello spettro monodimensionale, e da segnali esterni ad essa denominati *cross-peaks* (picchi di correlazione) dovuti all'interazione tra i nuclei presenti. Quest'ultima solitamente è di due tipi: scalare o dipolare. La prima è relativa all'interazione magnetica diretta tra nuclei connessi da alcuni legami chimici, la seconda, invece, fra nuclei sufficientemente vicini nello spazio, ma chimicamente non legati. Gli spettri bidimensionali eteronucleari sono invece caratterizzati dai soli *cross-peaks* e non presentano la diagonale tipica degli omonucleari.[61][66]

Gli spettri NMR bidimensionali più comuni sono:

- COSY (*CO*rrelation *Sp*ectroscop*Y*), tecnica omonucleare, in cui tramite la combinazione degli impulsi e delle tecniche in trasformata di Fourier si determinano tutti gli accoppiamenti spin-spin della molecola. Nello spettro i *cross-peaks* rivelano i nuclei accoppiati scalarmente caratterizzati da costanti di accoppiamento, J , comprese tra 3 e 15 Hz, quindi distanziati da meno di quattro legami chimici.
- TOCSY (*Total CO*rrelation *Sp*ectroscop*Y*), tecnica omonucleare, simile al COSY, ma che differisce per il periodo di *mixing*: non più un impulso a 90° , ma una sequenza complessa di impulsi chiamata *spin-lock*. In tale maniera la magnetizzazione di ogni singolo protone viene trasferita a tutti gli altri che

appartengono allo stesso sistema di spin. Tanto più breve è il tempo di *mixing*, tanto minore è la propagazione della magnetizzazione attraverso il sistema di spin. Per tempi di circa 20 ms si ha il trasferimento lungo un solo legame e pertanto lo spettro risultante è simile al COSY; al contrario, con tempi di *spin-lock* maggiori (circa 80-120 ms) il trasferimento avviene a tutti i protoni dello stesso sistema di spin con una distanza di massimo 5-6 legami chimici.

- HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) è una tecnica eteronucleare, in cui vengono fornite informazioni sulle relazioni tra due diversi tipi di nuclei nella struttura studiata. L'HSQC più comune coinvolge i nuclei ^1H e ^{13}C , e la magnetizzazione viene trasferita dal primo nucleo al secondo mediante una sequenza d'impulsi INEPT in modo da ottenere una sensibilità maggiore. Inoltre, al fine di massimizzare la magnetizzazione del primo nucleo e riuscire a modularla in ampiezza attraverso i termini che dipendono dalle frequenze del secondo nucleo e da t_1 , si impostano opportuni impulsi e valori di τ .
- HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) è una tecnica eteronucleare simile all'HSQC, ma si differenzia per la sequenza d'impulsi. In particolare, l'evoluzione durante t_1 viene fatta su termini a quanto multiplo (mentre per l'altra tecnica è su singolo quanto). Tuttavia, gli spettri che si ottengono sono molto simili a quelli di HSQC e sono caratterizzati dalla sola presenza dei *cross-peaks*. [61][63]

Uno dei limiti nell'utilizzo della spettroscopia NMR è dato dalla necessità che sia il metallo che i suoi complessi siano diamagnetici: se, infatti, fossero presenti centri paramagnetici, la misura non sarebbe possibile poiché si otterrebbero segnali allargati a causa dei tempi di rilassamento molto brevi.

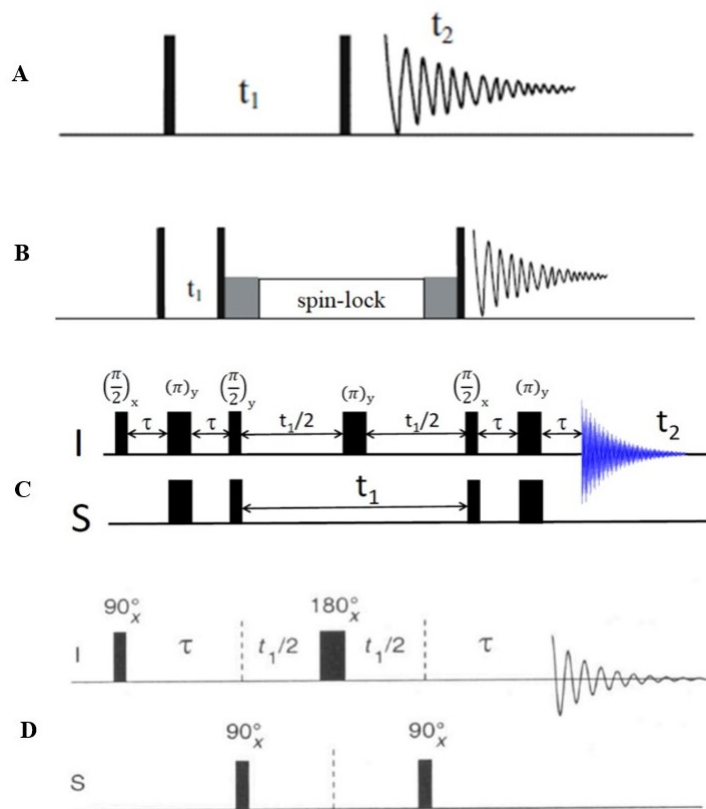
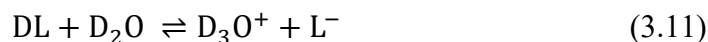
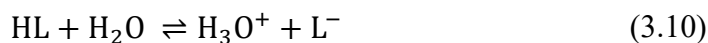


Figura 3.1 Sequenze degli impulsi degli esperimenti NMR bidimensionali di: COSY (A), TOCSY (B), HSQC (C) e HMQC (D). [61]

3.2.1 Interferenza del protone dell'acqua

Lo studio di complessi in soluzione acquosa richiede, durante l'analisi NMR, la minimizzazione dell'interferenza dovuta al protone dell'acqua. Questo può avvenire in due diversi modi: saturando il segnale dell'acqua o lavorando in acqua pesante (D_2O). Quest'ultima consente di ottenere uno spettro di maggior qualità, ma, allo stesso tempo, può modificare più o meno significativamente le costanti di equilibrio delle specie presenti. In particolare, può verificarsi un effetto isotopico primario, legato agli equilibri di scambio protonico tra solvente e le specie presenti in soluzione, o un effetto solvente (chiamato anche effetto isotopico secondario) relativo a tutti gli equilibri presenti nel sistema, compresi quelli in cui il solvente non è direttamente coinvolto. Ad esempio, per gli equilibri acido-base la costante di dissociazione per la reazione (3.10) è maggiore rispetto a quella della reazione (3.11) a causa della diversa

forza dei legami D-L (rispetto a H-L) e dei legami a idrogeno intermolecolari in D₂O (rispetto a H₂O). [67]



Tuttavia, gli effetti isotopici non influiscono in maniera significativa sulla natura delle specie presenti, ma solo sulle loro concentrazioni relative; pertanto, l'NMR in D₂O permette di ottenere dati qualitativi corretti anche per l'ambiente acquoso, mentre questo potrebbe non avvenire per i dati quantitativi che risultano quindi più incerti.[67]

3.3 Spettrofotometria UV-vis

La spettroscopia di assorbimento UV-visibile è un metodo basato sulla capacità di alcune molecole di assorbire le lunghezze d'onda dell'UV-visibile (200-800 nm) permettendo di ottenere informazioni quantitative e qualitative sul sistema studiato. Durante l'esperimento il campione viene colpito da una radiazione elettromagnetica, e in seguito all'assorbimento si verifica l'eccitazione di un elettrone che si trasferisce da un orbitale a bassa energia ad uno ad energia maggiore.

3.3.1 Radiazione elettromagnetica

La radiazione elettromagnetica è una forma di energia che consiste nell'oscillazione di un campo elettrico e un campo magnetico perpendicolarmente alla direzione di propagazione attraverso un moto ondulatorio. Nel modello corpuscolare essa viene descritta da fotoni, pacchetti energetici aventi energia espressa dall'equazione 3.12.

$$E = h \cdot \nu \quad (3.12)$$

Dove E è l'energia, h la costante di Plank (pari a $6.6261 \cdot 10^{-34}$ J/s) e ν è la frequenza della radiazione.

La radiazione è caratterizzata da diversi parametri:

- l'ampiezza (A) che esprime la lunghezza del vettore posto in corrispondenza ad un massimo;

- il periodo (T) indice del tempo, espresso in secondi, impiegato a passare da un punto di minimo al punto di massimo successivo;
- la frequenza (ν) che rappresenta il numero di oscillazioni condotte dalla radiazione in un secondo;
- la lunghezza d'onda (λ) che esprime la distanza che separa due punti di minimo o massimo adiacenti;
- la velocità di propagazione (v) che dipende dalle proprietà chimico fisiche del mezzo attraversato (indice di rifrazione);
- il numero d'onda ($\bar{\nu}$) indice del numero di oscillazioni che si propagano per unità di lunghezza;
- la potenza (P) che rappresenta l'energia della radiazione su una determinata area in un tempo definito;
- l'intensità (I) ovvero l'energia che colpisce un determinato volume in funzione del tempo. [63][68]

3.3.2 interazione radiazione-materia: legge di Lambert Beer

L'interazione tra la radiazione e la materia può portare a tre diversi processi: riflessione, rifrazione e assorbimento. Quest'ultimo prevede un trasferimento di energia da parte della radiazione verso la materia che comporta l'eccitazione del sistema da uno stato a bassa energia (stato fondamentale) a un altro con energia maggiore (stato eccitato).

L'energia totale di una molecola (somma dell'energia elettronica, vibrazionale e rotazionale) è quantizzata ovvero distribuita in una serie di livelli energetici. Pertanto, l'eccitazione del sistema avviene solamente quando l'energia assorbita dal fotone, in seguito alla radiazione, è pari alla differenza energetica tra i due livelli coinvolti, cioè quello fondamentale e quello eccitato.

La grandezza definita assorbanza (A) rappresenta l'entità della radiazione assorbita ed è definita dall'equazione 3.13.

$$A = -\log_{10} T \quad (3.13)$$

dove T esprime la trasmittanza, pari al rapporto tra l'intensità del raggio in seguito all'interazione con il campione (I) e l'intensità del raggio incidente (I_0).

L'entità dell'assorbimento dipende dalla concentrazione della sostanza assorbente e dalla lunghezza del percorso compiuto dalla radiazione attraverso la soluzione esaminata, secondo la legge di Lambert-Beer 3.14.

$$A = kbC \quad (3.14)$$

dove:

- b è il cammino ottico espresso in cm;
- C è la concentrazione della soluzione espressa in mol/L o g/L o g/100 mL;
- k è una costante caratteristica dell'assorbimento che dipende dalla sostanza analizzata, dal tipo di solvente utilizzato e dalla lunghezza d'onda della radiazione elettromagnetica. Questo parametro viene denominato in varie maniere a seconda dell'unità di misura usata per la concentrazione: coefficiente di estinzione molare se C viene espressa in mol/L, assorbività se C è in g/L, e coefficiente di estinzione specifico o assorbanza specifica se C è data in g/100 mL.[63][68]

3.3.3 Spettri UV-vis

Le energie utilizzate nella spettrofotometria UV-vis equivalgono alle differenze di energia tra i livelli energetici fondamentali ed eccitati degli atomi e delle molecole. La radiazione elettromagnetica, infatti, interagisce con gli elettroni degli orbitali più esterni promuovendoli temporaneamente ad uno stato eccitato. Per le sostanze inorganiche quest'energia è relativa a quella degli elettroni situati negli orbitali d e f . Nello specifico, per i metalli di transizione, si verifica il trasferimento di un elettrone da un orbitale d ad un altro ad energia superiore. Questo è possibile grazie alla presenza del campo dei leganti che rimuove la degenerazione orbitalica, realizzando una differenza energetica tra gli orbitali d grazie alle perturbazioni indotte dai donatori che coordinano il centro metallico secondo la teoria del campo cristallino. Maggiore è questa separazione, più energia è richiesta nel trasferimento dell'elettrone da un orbitale all'altro e minore è la lunghezza d'onda di assorbimento del complesso.

Lo spettrofotometro UV-vis, in seguito alla misura, restituisce uno spettro che riporta l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda e dipende dal tipo di cromofori della molecola studiata. Risulta essenziale la scelta del solvente che deve essere caratterizzato da un'elevata purezza, da un buon potere solvente, da un'assorbanza nulla nell'intervallo di assorbimento della sostanza analizzata, e dall'assenza di processi di perturbazione della struttura del campione. Inoltre, gli spettri UV-vis sono influenzati, oltre che dalla natura del solvente (che può interagire con il cromoforo), anche dal pH della soluzione, in quanto, nel caso di specie con diversi gruppi ionizzabili, ogni forma della molecola presenta un proprio spettro. [68]

3.3.4 Studio degli equilibri di complessamento

La tecnica spettrofotometrica UV-vis è molto adatta per lo studio degli equilibri di complessamento metallo-legante. Lo studio viene condotto mediante la registrazione di diversi spettri UV-vis di una serie di soluzioni che differiscono per la concentrazione di uno dei componenti (come diverso rapporto metallo-legante o diverso pH). Poiché l'assorbanza è una proprietà additiva, lo spettro che viene registrato è pari alla somma di tutti i singoli contributi delle specie assorbenti presenti. Mediante i bilanci di massa è possibile ricavare le concentrazioni analitiche delle specie presenti in soluzione che, applicate alla legge di Lambert Beer (3.13), permettono di determinare le costanti di formazione dei complessi.

Nel presente lavoro di tesi i dati sperimentali ottenuti con la spettrofotometria UV-vis sono stati elaborati utilizzando il programma PITMAP analogamente a quanto fatto con i dati potenziometrici (**Paragrafo 3.1.3.2**). Rispetto ai dati potenziometrici, in questo caso non sono presenti i parametri dell'equazione di Nernst, ma vi sono i valori dei coefficienti di estinzione molare.

3.3.5 Studio delle cinetiche di formazione

La spettrofotometria UV-vis consente la conduzione di studi cinetici mediante misurazioni dell'assorbanza in funzione del tempo.

Poiché la cinetica delle reazioni di complessamento dipende dal pH è essenziale mantenere questo parametro costante durante tutto il tempo della misura. A tal fine le soluzioni studiate sono addizionate a tamponi opportuni, scelti in maniera tale da non

interagire con le specie presenti in soluzione. Se invece il pH è molto acido (< 2) o basico (> 12), il potere tamponante dell'acqua è solitamente sufficientemente elevato e non è necessario aggiungere alcun tampone esterno, a parte l'acido forte o la base forte necessari per ottenere il pH richiesto.

3.3.6 Vantaggi e limiti della spettrofotometria UV-vis

La tecnica spettrofotometrica UV-vis presenta diversi vantaggi, tra cui quello di operare anche in condizioni di acidità o basicità elevate (pH inferiore a 2 o superiore a 12) e con concentrazioni di uno o due ordini di grandezza inferiori rispetto alle analisi potenziometriche, caratteristica utile soprattutto per leganti poco solubili o la cui disponibilità è limitata.

Tuttavia, la spettrofotometria UV-vis è considerata una tecnica meno accurata rispetto alla potenziometria, anche perché comporta una considerevole difficoltà di calcolo e di compensazione degli errori per sistemi caratterizzati da un elevato numero di specie. Infine, bisogna considerare che per alcuni leganti ed alcuni ioni metallici è inefficace, in quanto la formazione del complesso non modifica lo spettro di assorbimento rispetto a quello dei componenti liberi.

3.4 Voltammetria ciclica

La voltammetria ciclica è una tecnica di analisi che misura la corrente che fluisce imponendo all'elettrodo una scansione alternata di potenziale, prima in un verso (tipicamente verso i valori più negativi) e poi nel verso opposto. Viene frequentemente utilizzata per studiare le proprietà molecolari di un analita elettroattivo d'interesse. **(Figura 3.2)** [69]

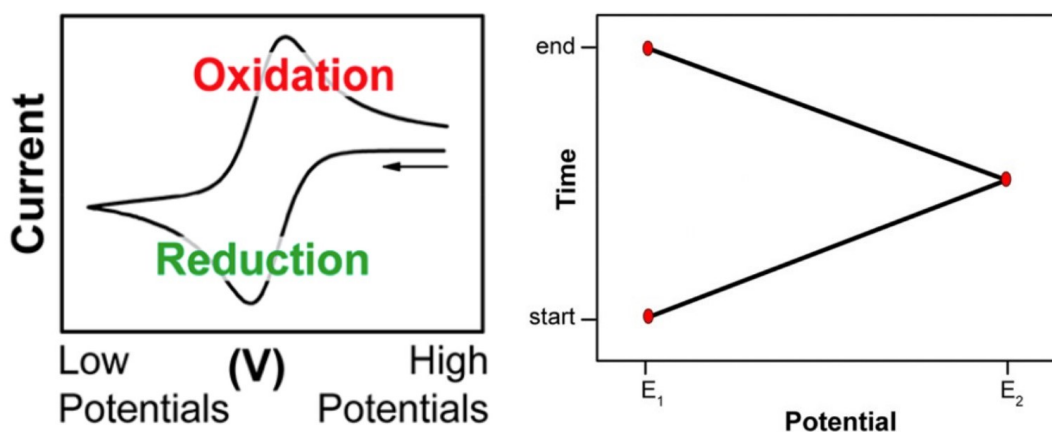
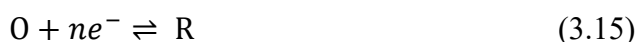


Figura 3.2 A sinistra generico aspetto di una voltammetria ciclica secondo la convenzione IUPAC; a destra andamento del potenziale applicato [69]

Si consideri il generico equilibrio redox (3.15) (le cariche vengono omesse per semplicità).



Durante l'esperimento voltammetrico, partendo da valori di potenziale alti, viene eseguita una scansione catodica verso potenziali negativi al fine di ridurre la specie O generando, di conseguenza, una corrente catodica. Con il procedere della misura cresce la concentrazione di R all'elettrodo a scapito di quella di O fino al raggiungimento della corrente di picco catodico. Dopo tale punto la corrente misurata diminuisce per l'assenza quasi totale della specie O sulla superficie dell'elettrodo che comporta un aumento dello strato di diffusione (spessore dello strato di soluzione attorno all'elettrodo) responsabile del rallentamento, nell'arrivo per diffusione, di altro O. Nella fase successiva del processo (scansione di ritorno), raggiunto il punto di inversione del potenziale, la direzione della scansione si inverte e la specie ridotta, precedentemente formata, viene ossidata per riformare O generando una corrente anodica analogamente a quanto avvenuto nella fase precedente.

Un parametro essenziale da considerare durante le analisi voltammetriche è la velocità di scansione, in quanto maggiore è il suo valore minore è lo spessore dello strato di diffusione e, di conseguenza, maggiore è la corrente osservata. Servendosi dell'equazione di Randles-Sevcik, che correla l'intensità di picco voltammetrico ad

alcuni parametri sperimentali e al coefficiente di diffusione stesso, è possibile calcolare il valore della velocità di scansione (equazione 3.16). [69]

$$i_p = 0.466nFAC^0 \left(\frac{nFvD_0}{RT} \right)^{1/2} \quad (3.16)$$

Dove:

- i_p rappresenta la corrente di picco, espressa in A
- n esprime il numero di elettroni scambiati
- A è l'area dell'elettrodo, espressa in cm^2
- C^0 indica la concentrazione dell'analita in soluzione, espressa in mol/cm^3
- v rappresenta la velocità di scansione, espressa in V/s
- D_0 è il coefficiente di diffusione della specie in esame, ed è espresso in cm^2/s

La relazione tra i_p e v è lineare se non sono presenti reazioni chimiche associate al trasferimento elettronico sia in soluzione, sia sulla superficie dell'elettrodo.

Gli esperimenti voltammetrici possono essere reversibili, quasi-reversibili e irreversibili. La prima condizione si verifica quando O ed R sono specie chimicamente stabili e il trasferimento elettronico è veloce. In questo caso tutto l'analita viene ridotto e riossidato senza alcuna perdita, e la differenza tra il potenziale di picco catodico e anodico è pari a $59/n$ mV. Inoltre, il rapporto tra le due correnti (anodica e catodica) è pari a uno in quanto le reazioni all'elettrodo sono veloci e le specie redox sono sotto controllo diffusivo. [70]

La condizione di quasi-reversibilità è legata alla presenza di limitazioni cinetiche al trasferimento elettronico. I potenziali dei picchi presentano una dipendenza dalla velocità di scansione: valori elevati portano il sistema ad un comportamento irreversibile, al contrario, valori bassi lo portano ad un comportamento reversibile. [71]

Infine, la condizione di irreversibilità si verifica quando sono presenti altre reazioni chimiche lente dopo il trasferimento elettronico, oppure è quest'ultimo che è molto lento. Caratteristica di questo tipo di curva voltammetrica è la mancanza del picco di ritorno che, di conseguenza, rende diverso da uno il rapporto tra la corrente anodica e quella catodica. [70]

3.4.1 Elettrolita di supporto

Il trasferimento di massa può avvenire secondo tre processi:

- Convezione, in cui il trasporto è dovuto al movimento di fluido. Si suddivide in convezione naturale, basata su gradienti di temperatura o di densità, e convezione forzata con l'impiego di una forza meccanica (ad esempio agitazione o vibrazione);
- Diffusione, che si realizza con la presenza di un gradiente di concentrazione tra due punti nella cella elettrochimica;
- Migrazione, in cui il movimento di specie cariche è dovuto alla presenza di campi elettrici, quindi di differenze di potenziale.

La voltammetria ciclica richiede, necessariamente, che i trasferimenti di massa da e verso l'elettrodo siano unicamente diffusivi. La corrente misurata durante l'esperimento, infatti, presenta una dipendenza dal flusso di reagente verso l'elettrodo secondo l'equazione 3.17, in cui $-J_i(0, t)$ rappresenta il flusso della specie i -esima all'interfaccia dell'elettrodo al tempo t . [71]

$$-J_i(0, t) = \frac{i}{nFA} \quad (3.17)$$

Per spostamenti monodimensionali lungo l'asse delle ascisse è valida l'equazione di Nernst-Planck (3.18).

$$J_i(x) = -D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x} - \frac{Fz_i}{RT} D_i C_i \frac{\partial \phi(x)}{\partial x} + C_i v(x) \quad (3.18)$$

dove:

$\frac{\partial C_i(x)}{\partial x}$ rappresenta il gradiente di concentrazione della specie i -esima alla distanza x , $\frac{\partial \phi(x)}{\partial x}$ indica il gradiente di potenziale, e $v(x)$ è la velocità con cui l'analita si muove in soluzione, espressa in cm/s.

Il flusso presenta una dipendenza dai contributi dovuti ai processi di convezione, diffusione e migrazione. Al fine di facilitare lo studio teorico del sistema, per trovare la relazione tra corrente e potenziale applicato, è conveniente limitare il flusso ai soli processi diffusivi. In questa condizione, dall'equazione di Nernst-Planck si ricava la prima legge di Fick (3.19).

$$J_i(x) = -D_i \frac{C_i(x)}{\partial x} \quad (3.19)$$

Sperimentalmente, per ottenere un regime unicamente diffusivo, si devono adottare alcuni accorgimenti. In particolare, per limitare la convezione, è necessario mantenere stabile e termostata la soluzione, al fine ridurre la presenza di forze meccaniche e gradienti di concentrazione o densità. Per evitare la migrazione, invece, è necessario introdurre in soluzione una concentrazione elevata (molto maggiore rispetto a quella dell'analita) di un elettrolita di supporto. La scelta di quest'ultimo è guidata da alcune condizioni e caratteristiche che esso deve rispettare nel sistema studiato. L'elettrolita, infatti, deve avere una buona solubilità nel solvente in cui è condotta la misura e deve essere sia chimicamente che elettroliticamente inerte. Oltre a rendere trascurabile il contributo del processo di migrazione, l'elettrolita di supporto assicura una maggiore conducibilità della soluzione in quanto bilancia le cariche elettriche e completa il circuito in seguito al trasferimento elettronico che avviene all'elettrodo. [69]

3.4.2 L'interfaccia dell'elettrodo

La superficie dell'elettrodo di lavoro presenta un doppio strato di cariche dovuto all'attrazione, da parte delle cariche presenti su di essa, di ioni di carica opposti della soluzione. La regione d'interfaccia dove si verifica la separazione di carica sull'elettrodo e sulla soluzione elettrolitica viene definita doppio strato elettrochimico (*electrochemical double layer* DL). Poiché questa regione condiziona le cinetiche dei trasferimenti elettronici, è essenziale disporre di modelli che ne descrivano correttamente le caratteristiche. [71]

Un primo modello è stato quello formulato da Helmholtz in cui le cariche sulla superficie dell'elettrodo richiamano dalla soluzione una carica netta uguale e contraria che si distribuisce ad una distanza fissa, con grandezze dell'ordine delle misure molecolari, realizzando la formazione di un doppio strato di carica.

Un altro modello è quello di Gouy-Chapman secondo il quale il profilo di carica non è più concentrato ad una distanza fissa dalla superficie dell'elettrodo, come nel caso precedente, ma diffonde gradualmente nella soluzione dando luogo allo strato diffusivo. Lo spessore dello strato dipende dalla concentrazione degli elettroliti e dai

moti termici. La concentrazione delle cariche diminuisce allontanandosi dall'elettrodo in quanto la forza di attrazione elettrostatica prevale sui moti termici.

Tuttavia, entrambi i modelli precedenti presentano delle limitazioni e non rappresentano correttamente la regione dell'interfaccia. È stato quindi introdotto il modello di Gouy-Chapman-Stern che propone una sintesi delle due teorie precedenti e considera gli ioni come cariche puntiformi. In questa teoria il doppio strato viene diviso in due regioni: un primo strato, a contatto con la superficie, costituito unicamente da solvente e da molecole adsorbite denominato *Stern layer* (o, in alternativa, *compact* o *Helmholtz layer*), e un secondo strato, chiamato *Inner Helmholtz Plane* (IHP). I controioni, responsabili del bilanciamento delle cariche sulla superficie dell'elettrodo formano il *diffusive layer*. Gli ioni, a causa della loro solvatazione, sono caratterizzati da un raggio idrodinamico maggiore e, di conseguenza, non possono avvicinarsi all'elettrodo per distanze inferiori a quelle dell'*Outer Helmholtz Plane* (OHP). Secondo questo modello il potenziale presente nell'interfase decade all'inizio linearmente e in un secondo momento pseudo-esponenzialmente.

Inoltre, poiché secondo Gouy-Chapman-Stern uno ione non riesce ad avvicinarsi, oltre l'OHP, all'interfaccia dell'elettrodo, esso risente di un potenziale inferiore rispetto a quello applicato, determinando un'influenza della struttura del doppio strato sulle velocità delle reazioni che avvengono all'elettrodo. [63][69]

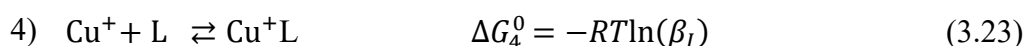
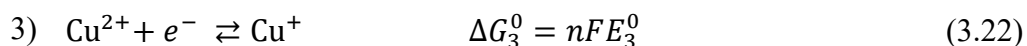
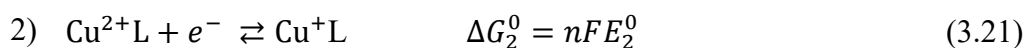
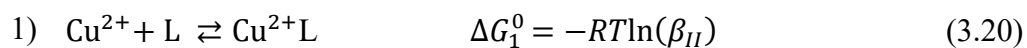
3.4.3 Gli elettrodi

La voltammetria ciclica prevede l'utilizzo di tre elettrodi: quello di riferimento, quello lavorante e il contro-elettrodo. Nel corso dell'esperimento la corrente fluisce tra gli ultimi due elettrodi (lavorante e contro-elettrodo), mentre quello di riferimento ha la funzione di misurare il potenziale dell'elettrodo lavorante. In dettaglio, l'elettrodo lavorante consente la realizzazione del processo redox mediante l'applicazione del potenziale relativo a quello dell'elettrodo di riferimento. La scelta del tipo di elettrodo da utilizzare è guidata dal materiale con cui esso è realizzato, sia perché da esso dipende l'intervallo di potenziale utilizzabile sperimentalmente, sia per la necessità che esso sia inerte. Inoltre, al fine di ottenere dati accurati, l'area superficiale deve essere nota e priva di qualsiasi impurità adsorbita. L'elettrodo di riferimento è

caratterizzato da un potenziale determinato e stabile indipendente dall'intensità della corrente che attraversa la cella in cui è posto; viene utilizzato per la determinazione del potenziale degli altri elettrodi presenti. Esso è caratterizzato dalla presenza di un setto poroso che permette di separarlo dalla soluzione analizzata, evitando in tal modo derive del potenziale. Inoltre, per limitare l'entità dei potenziali di giunzione, è necessario che sia l'elettrolita che il solvente utilizzati siano coerenti con quelli presenti nel compartimento interno dell'elettrodo. Infine, il contro-elettrodo consente la chiusura del circuito in quanto, in seguito all'applicazione del potenziale, l'elettrodo lavorante compie il processo redox generando una corrente che scorre in soluzione. Nel presente lavoro di tesi i tre elettrodi utilizzati per le misure voltammetriche sono stati un elettrodo a carbonio vetroso (*glassy carbon*) come elettrodo lavorante, un elettrodo di riferimento al calomelano saturo (SCE), e un filo di platino come contro-elettrodo.

3.4.4 Elaborazione dei dati voltammetrici

La voltammetria ciclica consente di ottenere informazioni termodinamiche sul sistema analizzato. Conoscendo le proprietà termodinamiche di uno dei due partner che partecipano alla reazione redox, infatti, i potenziali del picco catodico e anodico permettono di risalire alle costanti di stabilità delle specie ridotta o ossidata. In particolare, nel presente lavoro di tesi la voltammetria ciclica è stata utilizzata per determinare le proprietà termodinamiche dei complessi formati da Cu^+ . Considerando il ciclo termodinamico costituito dalle reazioni (3.20), (3.21), (3.22) e (3.23) è possibile determinare la relazione tra le costanti di stabilità dei complessi di Cu^{2+} e Cu^+ (dove L indica il legante):



Nella reazione (3.20) i dati derivano da misure condotte con le tecniche descritte in precedenza (potenziometriche e/o spettrofotometriche), mentre nella (3.21), che

rappresenta il processo analizzato mediante voltammetria ciclica, il valore di E^0 viene ottenuto calcolando la semisomma del potenziale di picco catodico e anodico (in quanto tale valore sperimentale rappresenta il potenziale di riduzione formale della coppia $\text{Cu}^{2+}\text{L}/\text{Cu}^+\text{L}$ che, in buona approssimazione, corrisponde al potenziale standard). E_3^0 viene ricavato dai dati presenti in letteratura, e ΔG_4^0 è il valore incognito da determinare.

Attraverso le tre reazioni di seguito riportate, 3.24, 3.25 e 3.26, è possibile determinare la relazione tra le costanti di formazione dei complessi di Cu^+ e Cu^{2+} ricavando in tal modo le costanti di stabilità dei complessi di Cu^+ .

$$\Delta G_4^0 = \Delta G_1^0 + \Delta G_2^0 - \Delta G_3^0 \quad (3.24)$$

$$-RT \ln(\beta_I) = -\ln(\beta_{II}) - nFE_2^0 + nFE_3^0 \quad (3.25)$$

$$\ln(\beta_I) = \ln(\beta_{II}) + \frac{nF}{RT}(E_2^0 - E_3^0) \quad (3.26)$$

CAPITOLO 4

PARTE SPERIMENTALE

4.1 Strumentazione

- Titolatore automatico Metrohm 765 Dosimat, dotato di burette da 1, 5, 20 mL
- Cella potenziometrica di capacità pari a circa 10 mL, con mantello termostato a doppia parete
- Termostato ad acqua Falc SB 5, con controllo di temperatura FA 90
- Sistema PureLab Chorus, Veolia (acqua ultrapura)
- Sistema di erogazione e pre-saturazione dell'azoto costituito da due gorgogliatori in serie, contenenti nell'ordine NaOH 0.05 M e H₂O Milli-Q
- Elettrodo di vetro combinato Hamilton pH 0-14
- Elettrodo di riferimento ad Ag/AgCl/KCl Crison con doppio giunto
- pH-metro Metrohm 713
- Sonda termometrica Metrohm 6.1110.100, Pt 1000/B/2
- Bilancia tecnica Gibertini TM 560-2R
- Bilancia analitica Gibertini CA 312
- Spettrometro NMR 400 MHz Bruker AMX 400
- Spettrometro NMR 600 MHz Bruker 600 UltraShield
- Spettrofotometro UV-vis Cary 60 (Agilent) equipaggiato con cuvette di quarzo con cammino ottico di 1 cm
- Cella voltammetrica a 6 colli di capacità pari a circa 10 mL, con mantello termostato a doppia parete
- Potenziostrato Autolab PGSTAT 302 N
- Elettrodo *glassy carbon, homemade* (GC-20), Tokai.
- Elettrodo al calomelano saturo (SCE), Schott Gerate.
- Filo di platino, *homemade*, Alfa Aesar

4.2 Reagenti

- Acqua ultrapura
- Nitrato di sodio, NaNO_3 , Sigma-Aldrich, $\geq 99.0\%$
- Acido nitrico, HNO_3 , Aristar – VWR Chemicals, 69% per analisi in tracce
- Carbonato di sodio anidro, Na_2CO_3 , Aldrich o Carlo Erba, titolo 99.95-100.5%
- Idrossido di sodio, NaOH , EMSURE, titolo 99-100 %
- NO_3S , $\text{C}_{15}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{S}_3$, CheMatech
- TACN-Bu, $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{N}_3$, prodotto di sintesi
- Nitrato di argento, AgNO_3 , Aldrich, 99.8%
- Acqua deuterata, D_2O , Aldrich, 99.9% D
- Acido nitrico deuterato, DNO_3 , Aldrich, 65% in D_2O , 99% D
- Idrossido di sodio deuterato, NaOD , Aldrich, 99.9% D
- Acido 3-(trimetilsilil)propionico, sale di sodio, TSP, Sigma-Aldrich, $> 99\%$
- Nitrato di rame(II) triidrato, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba, titolo minimo 99.5%
- Cloruro di sodio, NaCl , Sigma-Aldrich
- Bicarbonato di sodio, NaHCO_3 , Carlo Erba, 99.8%
- Acido solforico, H_2SO_4 , Sigma-Aldrich, 95.0-98.0 %
- Ftalato acido di potassio, $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$, Aldrich, 99.95%

4.3 Preparazione delle soluzioni

Nel presente lavoro di tesi tutte le concentrazioni sono espresse in molarità ($M = \text{mol/L}$). Le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua ultrapura come solvente e aggiungendo una quantità opportuna di $(\text{Na})\text{NO}_3$ (elettrolita di supporto) in modo tale da ottenere una forza ionica pari a 0.15 M. La notazione utilizzata col sodio tra parentesi indica che la concentrazione degli ioni NO_3^- è di 0.15 M, mentre quella di Na^+ è in alcuni casi maggiore, come nelle soluzioni di NaOH , ed in altri minore, come

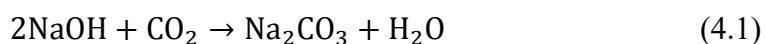
nelle soluzioni di HNO₃. Per le misure spettrofotometriche si è utilizzato NaCl come elettrolita di supporto in alternativa a NaNO₃.

4.3.1 Soluzione di HNO₃

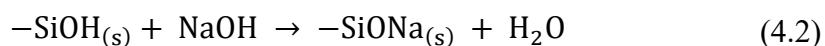
La soluzione di HNO₃ è stata preparata diluendo l'acido concentrato al fine di ottenere una concentrazione nominale di 0.1 M. Per determinare il titolo esatto si è eseguita una standardizzazione usando Na₂CO₃ anidro (standard primario) a concentrazione nota.

4.3.2 Soluzioni di NaOH

Le soluzioni basiche, come NaOH, a contatto con l'atmosfera sono soggette a carbonatazione, reazione descritta dall'equazione 4.1



Questo processo, essendo irreversibile e progressivo, causa una continua diminuzione del titolo di NaOH a favore della formazione *in situ* della miscela base forte-base diprotica debole (Na₂CO₃) che rende complessa l'analisi dei dati quando l'idrossido di sodio viene usato come titolante. Sperimentalmente, quindi, è necessario limitare la carbonatazione della base adottando alcuni accorgimenti durante la preparazione e la conservazione della soluzione. In particolare, l'acqua ultrapura utilizzata è stata inizialmente bollita al fine di rimuovere la CO₂ in essa disciolta. Tale acqua è stata quindi impiegata non solo come solvente ma anche per lavare i pellet di NaOH usati (al fine di rimuovere l'eventuale carbonato presente sulla superficie esterna). Un altro accorgimento è dato dal fatto che l'idrossido di sodio reagisce con i gruppi siliconici del vetro secondo l'equazione 4.2 causando una diminuzione nel tempo del titolo di NaOH; pertanto, la soluzione deve essere conservata in un recipiente di polietilene.



Per evitare l'ingresso della CO₂ nella soluzione il contenitore di polietilene è stato ricoperto da fogli di alluminio in modo da renderlo impermeabile all'anidride carbonica atmosferica, e l'imboccatura del recipiente è stata protetta utilizzando una siringa contenente calce sodata (composta approssimativamente dal 75% di Ca(OH)₂, dal 20% di H₂O, dal 3% di NaOH e dal 2% di KOH).

4.3.3 Soluzioni degli ioni metallici e dei leganti

Le soluzioni degli ioni metallici e quelle dei leganti sono state preparate pesando su bilancia analitica i sali di AgNO_3 , CuCl_2 e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, oppure i leganti, e diluendoli usando come solvente acqua ultrapura contenente $(\text{Na})\text{NO}_3$ 0.15 M (NaCl 0.15 M per le misure spettrofotometriche); nel caso delle misure NMR, il solvente era una miscela di acqua ultrapura e D_2O (90:10) contenente una minima quantità di TSP usato come riferimento interno e $(\text{Na})\text{NO}_3$ 0.15 M. Le concentrazioni delle soluzioni ottenute sono state di 19.282 mM e 5.004 mM per AgNO_3 , 20.321 mM per CuCl_2 , 21.556 mM per $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1.390 mM, 1.654, 3.201 mM e 1.232 mM per NO_3S , e 1.295 mM e 4.588 mM per TACN-Bu.

4.4 Procedure sperimentali

4.4.1 Titolazioni potenziometriche

L'apparato strumentale utilizzato per le titolazioni potenziometriche è costituito dal titolare automatico *Metrohm 765 Dosimat*, comandato da un computer; le componenti del titolare sono il potenziometro, il sensore di temperatura e le burette intercambiabili. La fem è stata misurata usando un elettrodo di vetro combinato, sostituito in alcune misure dall'elettrodo d'argento e da un elettrodo di riferimento ad $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$. La cella di misura durante il corso dell'esperimento è stata termostata a $25.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ con un termostato ad acqua. Inoltre, la presenza in cella di un'ancoretta magnetica ha permesso di mantenere sotto costante agitazione la soluzione. Tutte le misure sono state realizzate in atmosfera d'azoto, al fine di impedire la presenza di anidride carbonica, e all'interno di una gabbia di Faraday, per evitare derive del potenziale misurato dall'elettrodo di vetro. (**Paragrafo 3.1.4**). Per la conduzione dell'esperimento viene utilizzato il programma *Automat1* che attraverso una procedura automatizzata consente di controllare le erogazioni di titolante e registrare tutti i punti sperimentali, permettendo, in questo modo, di minimizzare eventuali errori casuali. Il programma permette nella fase iniziale di impostare alcuni parametri:

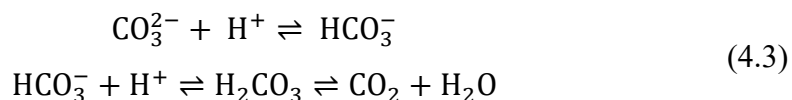
- V_{min} (mL): volume minimo di titolante aggiunto;
- V_{max} (mL): volume massimo di titolante aggiunto;
- V_{fin} (mL): volume totale di titolante aggiunto oltre il quale la titolazione viene fermata;
- t_{min} (s): tempo minimo di attesa tra aggiunte successive;
- t_{max} (s): tempo massimo di attesa tra aggiunte successive;
- E_{fin} (mV): fem in corrispondenza della quale la titolazione viene arrestata; tale parametro è alternativo a V_{fin} : la titolazione termina quando il volume è maggiore o uguale a V_{fin} , oppure la fem è maggiore o uguale a E_{fin} ;
- E_{att} (mV): variazione della fem attesa dopo l'aggiunta del titolante. Il volume di ogni aggiunta è calcolato dal programma in base alla variazione di fem indotta dall'aggiunta precedente ed è sempre compreso tra V_{min} e V_{max} .
- d (mV/min) deriva massima della fem ammessa affinché possa avvenire l'aggiunta successiva. Se il tempo d'attesa risulta maggiore rispetto a t_{max} , l'aggiunta avviene ugualmente, ma il programma indica la fem corrispondente come punto di non equilibrio.

4.4.1.1 Calibrazione dell'elettrodo di vetro

La calibrazione dell'elettrodo avviene mediante l'aggiunta successiva di sei aliquote di HNO₃ ad una soluzione contenente 3 mL di acqua ultrapura e (Na)NO₃ 0.15 M. I parametri impostati nel programma *Automat1* sono riportati in **Tabella 4.1**.

4.4.1.2 Standardizzazione della soluzione di HNO₃

La standardizzazione della soluzione di HNO₃ avviene usando carbonato di sodio, secondo le equazioni 4.3.



Il carbonato di sodio, precedentemente essiccato in muffola a 260 °C per circa due ore e quindi pesato su bilancia analitica (quantità orientativa: 0.026 g per ogni titolazione), è stato posto nella cella di misura e disciolto in 3 mL di acqua ultrapura contenenti (Na)NO₃ 0.15 M. A questa soluzione si sono aggiunti 3.0 mL di HNO₃ in modo tale

da ottenere una concentrazione molare di poco inferiore al doppio di quella del carbonato. Al termine della titolazione è stata misurata la temperatura e si è calcolato il titolo esatto di HNO_3 mediante il metodo di linearizzazione di Gran. I parametri impostati nel programma *Automat1* sono riportati in **Tabella 4.1**.

4.4.1.3 Standardizzazione della soluzione di NaOH

La soluzione di NaOH viene standardizzata dall'acido nitrico precedentemente titolato. A tale scopo si inseriscono in cella 0.6 mL dell'acido assieme a 3.0 mL di acqua ultrapura contenente $(\text{Na})\text{NO}_3$ 0.15 M. Il titolo esatto di NaOH è stato ottenuto inizialmente col metodo di linearizzazione di Gran e successivamente elaborando i dati con PITMAP che permette di ottenere risultati più accurati. I parametri impostati nel programma *Automat1* sono riportati in **Tabella 4.1**.

4.4.1.4 Titolazioni delle soluzioni dei leganti

Per le titolazioni delle soluzioni dei leganti nella cella di misura sono stati inseriti volumi opportuni di legante, acqua ultrapura con $(\text{Na})\text{NO}_3$ 0.15 M, e HNO_3 , al fine di ottenere un volume complessivo di circa 3 mL, una concentrazione di legante compresa nell'intervallo 1-1.5 mM e un pH iniziale pari a 2. Nell titolazione è stato utilizzato come titolante NaOH standardizzato (**Paragrafo 4.4.1.3**). I parametri impostati nel programma *Automat1* sono riportati in **Tabella 4.1**.

Tabella 4.1 Valori dei parametri impostati per la calibrazione dell'elettrodo, la standardizzazione di HNO₃, la standardizzazione di NaOH e la titolazione dei leganti.

Parametri	Valore impostato			
	Calibrazione	HNO ₃	NaOH	Leganti
V_{max} (mL)	0.10	0.05	0.02	0.01
V_{min} (mL)	0.10	0.20	0.20	0.10
V_{fin} (mL)	0.60	5.00(*)	5.00(*)	5.00(*)
t_{min} (s)	40.0	40.0	40.0	40.0
t_{max} (s)	60.0	60.0	60.0	80
E_{fin} (mV)	1000(*)	250	-330.0	-330.0

(*) valore arbitrario elevato, scelto affinché la titolazione terminasse in base al valore del parametro alternativo.

4.4.1.5 Conservazione degli elettrodi

All'inizio e alla fine di ogni titolazione gli elettrodi sono stati lavati con acqua ultrapura e asciugati con carta da filtro. Quando non in uso, l'elettrodo di vetro è stato conservato in una soluzione di ftalato acido di potassio circa 0.15 M.

4.4.2 Spettroscopia NMR

Il programma che è stato utilizzato per acquisire e processare gli spettri è Topspin 3.5 con sequenze e parametri standard di Bruker, mentre gli spettri NMR sono stati poi elaborati col programma Topspin 4.1.3. I *chemical shift* sono espressi in parti per milione e riferiti allo standard interno (acido 3-(trimetilsilil)propionico sale di sodio, TSP). Il segnale dell'acqua è stato soppresso usando l'*excitation sculpting pulse scheme*. Per le soluzioni contenenti sia il metallo che il legante il rapporto di quest'ultimi è stato fissato a 1:1. Il pH delle soluzioni, misurato con il pH-metro, è stato modificato tramite l'aggiunta di piccole aliquote di DNO₃ e NaOD in D₂O.

Oltre a misure finalizzate a determinare le costanti di dissociazione acida dei leganti e di complessamento, la tecnica NMR è stata utilizzata per stabilire l'assenza di eventuali inerzie cinetiche acquisendo gli spettri nel tempo.

4.4.3 Spettrofotometria UV-vis

Prima dell'acquisizione degli spettri UV-vis del campione è stato registrato quello della soluzione del "bianco", in alcuni casi contenente soluzioni tampone, in altri acqua ultrapura.

4.4.3.1 Cinetica di complessamento

Le misure di cinetica di complessamento sono state condotte preparando soluzioni metallo-legante in rapporto 1:1 a diversi pH. Al fine di mantenere costante il pH nel tempo, evitando eventuali modifiche dovute alle reazioni che hanno luogo in soluzione, si sono utilizzati dei tamponi. In particolare, quelli impiegati nel presente lavoro di tesi sono stati HCl 0.01 M (pH 2), acido cloroacetico/cloroacetato 1mM (pH 3.10), acido acetico/acetato 1 mM (pH 4.48), HEPES 1 mM (pH 7.15), oppure NaOH (pH 12). Per lo studio della cinetica sono stati registrati diversi spettri UV-vis nel tempo delle soluzioni contenenti metallo e legante.

4.4.3.2 Costanti di stabilità

Le misure delle costanti di stabilità sono state condotte preparando soluzioni contenenti metallo e legante in rapporto 1:1 a concentrazione 0.1 mM e a diversi pH. Il valore di pH desiderato per ogni soluzione è stato regolato mediante l'aggiunta di piccole aliquote di NaOH e HCl. Prima dell'acquisizione degli spettri le soluzioni sono state scaldate per un tempo opportuno a 70° C, perlomeno a pH molto acidi dove la cinetica di complessamento risulta essere molto lenta. Il pH è stato quindi nuovamente misurato ed eventualmente corretto. Questo processo è stato ripetuto fino a quando sia il profilo di assorbimento che il pH sono rimasti invariati, e quindi si è avuta certezza di essere alla condizione di equilibrio che permette di effettuare l'analisi spettrofotometrica UV-vis. I dati sono stati elaborati con il programma PITMAP.

4.4.3.3 Stechiometria Cu²⁺- NO₃S

La stechiometria dei complessi che si formano tra Cu²⁺ e NO₃S è stata indagata col metodo delle variazioni graduali, cioè preparando soluzioni con concentrazione di legante pari a 0.1 mM e di Cu²⁺ variabile, in modo da ottenere rapporti fra metallo e chelante compresi tra 0:1 e 3:1. Le soluzioni sono state ottenute in HEPES (pH 7.15) e in NaOH (pH 12.0).

A pH 12 si è indagata la stechiometria dei complessi usando il metodo di Job oltre a quello delle variazioni graduali. Il metodo di Job prevede la preparazione di diverse soluzioni contenenti metallo e legante, nelle quali la concentrazione totale (somma della concentrazione di legante e di metallo) viene mantenuta costante (0.2 mM) variandone però il rapporto.

Con entrambi i metodi si è poi misurata l'assorbanza delle soluzioni ad una lunghezza d'onda opportuna in funzione del rapporto metallo:chelante.

4.4.4 Voltammetria ciclica

Le misure di voltammetria ciclica sono state eseguite mediante il potenziostato *Autolab PGSTAT 302N* gestito dal *software NOVA 2.1*. L'apparato strumentale è costituito da un elettrodo lavorante *glassy carbon*, dall'elettrodo di riferimento al calomelano saturo (SCE) e dal contro elettrodo costituito da un filo di platino. Inizialmente, il *glassy carbon* è stato pulito mediante l'impiego di una carta abrasiva e una pasta diamantata da 0.25 µm. Prima di iniziare la misura voltammetrica, dopo aver introdotto la soluzione e aver sigillato la cella, è stato attivato un flusso di azoto con lo scopo di eliminare l'ossigeno atmosferico e quello disciolto in soluzione. Tale operazione è necessaria, poiché la presenza di ossigeno potrebbe causare una variazione del potenziale.

Il programma *NOVA 2.1* richiede l'impostazione di alcuni parametri per poter eseguire la misura:

- *Start potential (V)*: potenziale iniziale della scansione;
- *Upper vertex potential (V)*: massimo potenziale raggiunto nel corso della scansione;

- *Lower vertex potential (V)*: minimo potenziale raggiunto nel corso della scansione;
- *Stop potential (V)*: potenziale di fine scansione;
- *Number of scan*: numero delle scansioni di potenziale effettuate;
- *Scan rate (V/s)*: velocità della scansione di potenziale;
- *Step*: differenza di potenziale tra l'acquisizione di due punti diversi. Per uno *step* positivo la scansione procede verso l'*upper vertex*, nel caso contrario (*step* negativo) la scansione è diretta verso il *lower vertex potential*.

4.4.4.1 Voltammetrie cicliche del bianco

La procedura sperimentale per la voltammetria ciclica richiede inizialmente la registrazione dei voltammogrammi del "bianco". Questo è dato innanzitutto da una soluzione contenente solamente l'elettrolita di supporto, (Na)NO₃ 0.15 M, e poi da una soluzione del solo metallo, Cu(NO₃)₂. Queste misure permettono di determinare sia la presenza di impurezze che il comportamento elettrochimico del Cu²⁺ libero.

4.4.4.2 Voltammetrie cicliche dei complessi rame-NO₃S

La procedura per la registrazione delle voltammetrie cicliche dei complessi richiede l'inserimento, all'interno della cella galvanica, della soluzione del legante (NO₃S), dell'elettrolita di supporto (NaNO₃) e di Cu(NO₃)₂. Il rapporto tra le moli di legante e di metallo non è unitario, ma sbilanciato a favore del legante (nello specifico $n_{\text{NO}_3\text{S}} = 1.2 n_{\text{Cu}(\text{NO}_3)_2}$) in modo tale da essere certi dell'assenza di rame libero in soluzione, anche in considerazione della presenza di impurezze nel legante (cfr. **Capitolo 5**). Le misure voltammetriche sono state eseguite a diversi valori di pH, quest'ultimo misurato utilizzando un elettrodo di vetro. Partendo da una soluzione acida, l'aggiunta di piccole aliquote di NaOH (ed eventualmente di HNO₃ per eventuali controcorrezioni) ha permesso di variare il pH fino al raggiungimento di valori alcalini, acquisendo per ogni unità di pH il voltammogramma relativo. Tra due misure successive è stato necessario attivare il flusso di azoto e aspettare circa 5-10 minuti affinché la rimozione dell'ossigeno presente fosse completa. Inoltre, per ogni scansione è stata regolata la compensazione del potenziale, parametro funzionale al bilanciamento della resistenza

della soluzione al passaggio di corrente. Esso dipende da alcuni fattori, quali la soluzione esaminata, il tipo di elettrodi utilizzati nella misura e la loro distanza reciproca. Il valore fissato per la compensazione del potenziale è pari a quello più alto possibile, scelto in modo tale da evitare la formazione di divergenze del segnale. Alla fine delle misure gli elettrodi sono stati lavati con abbondante acqua ultrapura e conservati a secco.

CAPITOLO 5

RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Standardizzazioni

5.1.1 Standardizzazione di HNO₃

La standardizzazione di HNO₃ (un esempio è mostrato in **Figura 5.1**) è stata eseguita mediante titolazione di quantità note di Na₂CO₃. I dati sono stati elaborati con il metodo di Gran [73] che ha permesso la determinazione del titolo esatto dell'acido nitrico, pari a 0.1016 ± 0.0049 M.

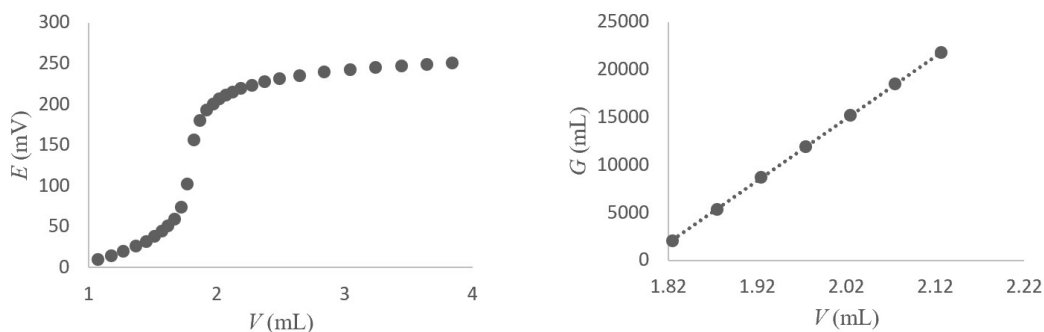


Figura 5.1 A sinistra: curva di titolazione con HNO₃ di una soluzione contenente 0.2601 g di Na₂CO₃, 3 mL di H₂O con NaNO₃ 0.15 M e 3.0 mL di HNO₃. A destra: linearizzazione di Gran applicata alla parte acida della curva di titolazione.

5.1.2 Calibrazione dell'elettrodo

Il potenziale, durante un esperimento potenziometrico, può essere influenzato da alcuni parametri quali la costante E^0 , la pendenza di Nernst (S), il potenziale di giunto liquido (E_j) e le impurezze acide o basiche presenti (imp). Sperimentalmente, nelle condizioni di lavoro usuali, si considerano solamente due parametri: E^0 e imp . Questo è dovuto al fatto che E_j è trascurabile se si lavora nell'intervallo di pH compreso tra 2

e 12.5 circa, mentre S dipende solo dalla temperatura secondo l'equazione 5.1, perlomeno per elettrodi di vetro di buona fattura.

$$S = \frac{RT}{F} \ln 10 \quad (5.1)$$

Utilizzando il programma PITMAP si sono ottimizzati i valori di E^0 e di imp . La calibrazione è stata condotta di tanto in tanto come controllo della affidabilità del metodo potenziometrico, e non prima di ogni altra titolazione; infatti, i valori di E^0 e di imp possono essere ottenuti anche dalle titolazioni successive alla calibrazione stessa, avendo constatato che i *fitting* delle curve risultano migliori se si ottimizzano per ogni titolazione anziché utilizzare i dati ottenuti da calibrazioni precedenti.

5.1.3 Standardizzazione di NaOH

La standardizzazione di NaOH (un esempio è mostrato in **Figura 5.2**) è stata eseguita mediante titolazione di quantità note di HNO_3 . I dati sono stati inizialmente elaborati con il metodo di Gran che ha permesso di determinare il titolo della soluzione, pari a 0.09934 ± 0.00070 M.

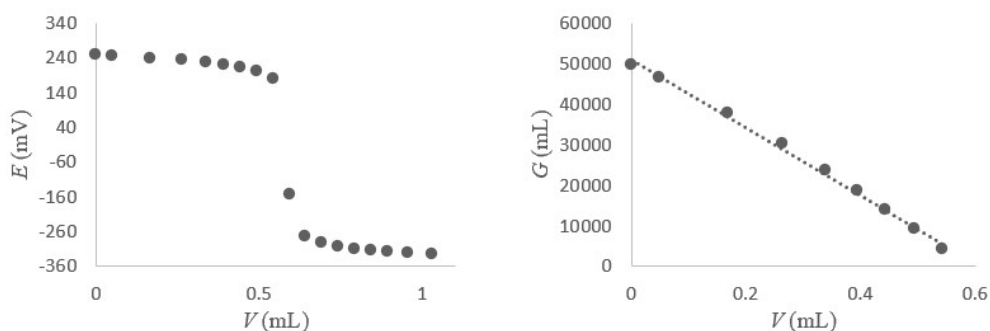


Figura 5.2 A sinistra: curva di titolazione con NaOH di una soluzione contenente 0.6 mL di HNO_3 (0.1016 M), 3 mL di H_2O con NaNO_3 0.15 M. A destra: linearizzazione di Gran applicata alla parte acida della curva di titolazione.

Successivamente è stata effettuata una seconda elaborazione utilizzando il programma PITMAP al fine di ottenere, oltre al titolo della soluzione di NaOH, anche altri parametri che possono influire sul potenziale misurato, e cioè E^0 , imp , pK_{Na} (costante di errore alcalino), pK_{W} (costate di autoprotolisi dell'acqua), α (grado di

carbonatazione della soluzione calcolato dall'equazione 5.2 ed espresso in percentuale).

$$\alpha = \frac{2n_{CO_3^{2-}}}{n_{OH^-}} \quad (5.2)$$

Sono stati ottimizzati e determinati i parametri: titolo della soluzione di NaOH pari a -0.099 ± 0.034 ; pK_{Na} pari a 11.377 ± 0.025 e pK_W pari a 13.642 ± 0.027 . α è risultato trascurabile e dunque è stato escluso dall'ottimizzazione. Nell'elaborazione vi sono anche altri parametri che possono modificare la curva di titolazione, ma sono stati mantenuti fissi: le costanti di dissociazione dell'acido carbonico ($pK_{a1,carb}$ $pK_{a2,carb}$) sono state considerate pari a valori riportati in letteratura (rispettivamente 5.86 e 8.95) [74], mentre la pendenza di Nernst (S) è stata mantenuta costante impostandola pari al valore teorico dato dall'equazione 5.1.

5.2 Costanti di acidità di NO3S

NO3S è un legante nuovo, che ci è stato fornito dalla Chematech dietro pagamento di un costo generosamente sostenuto dal professor Helmut R. Mäcke, dell'*University Medical Center di Freiburg, Department of Nuclear Medicine*. Il professor Mäcke collabora da alcuni anni col nostro gruppo di ricerca nello studio di nuovi chelanti per argento-111.

Per questo legante il primo obiettivo è quello di determinare le costanti di dissociazione acida (pK_a). Tale operazione risulta necessaria al fine di poter studiare, in seguito, gli equilibri di complessamento di ioni metallici con leganti aventi proprietà basiche di Brønsted e di Lewis, come ad esempio le poliammine cicliche funzionalizzate di cui il NO3S fa parte. In questi sistemi, infatti, il protone diviene un possibile competitore dello ione metallico nell'interazione con il chelante. Lo studio delle proprietà acido base di NO3S è stato condotto mediante due tecniche: la potenziometria e la spettroscopia NMR.

5.2.1 Potenziometria con elettrodo di vetro

Dopo la calibrazione dell'elettrodo e le standardizzazioni di HNO_3 e NaOH sono state condotte le misure potenziometriche delle soluzioni del legante. In queste misure la fem misurata è influenzata dai seguenti parametri:

- le costanti di dissociazione acida del legante (il numero delle $\text{p}K_a$ presenti dipende dal chelante specifico);
- il titolo effettivo della soluzione di legante, C_L ;
- i parametri di calibrazione dell'elettrodo e di standardizzazione di NaOH : E^0 , S , imp , C_b , $\text{p}K_{\text{Na}}$, $\text{p}K_{\text{W}}$, $\text{p}K_{a1,\text{carb}}$ e $\text{p}K_{a2,\text{carb}}$.

Sono state impostate fisse le grandezze S , C_b , $\text{p}K_{\text{Na}}$, $\text{p}K_{\text{W}}$, $\text{p}K_{a1,\text{carb}}$ e $\text{p}K_{a2,\text{carb}}$ ponendole pari ai valori ottenuti dalla standardizzazione della base, mentre gli altri parametri sono stati ottimizzati.

Studi su chelanti analoghi al NO_3S , eseguiti dal nostro gruppo di ricerca [57][61][75], dimostrano l'impossibilità di ottenere la prima $\text{p}K_a$ a causa degli effetti relativi alla completa protonazione degli atomi di azoto, ovvero effetti sterici e di repulsione elettrostatica, che fanno sì che il chelante totalmente protonato si formi solamente a pH estremamente acidi.[72]. Per i poliazamacrocicli con quattro azoti anche la seconda $\text{p}K_a$ è risultata molto acida, ma spesso determinabile perlomeno via NMR dato che il valore è risultato inferiore a 2 [57][61][75]. Le altre due $\text{p}K_a$, infine, hanno mostrato valori attorno a 7 ($\text{p}K_{a3}$) e 11 ($\text{p}K_{a4}$).

Il legante NO_3S è caratterizzato dalla presenza di tre atomi di azoto, anziché quattro, e quindi è teoricamente possibile determinare fino a tre costanti di dissociazione acida. Tuttavia, le misure potenziometriche su NO_3S non hanno permesso di determinare nessuna di queste, suggerendo che le costanti di dissociazione acida di questo legante siano inferiori a circa 2 e/o superiori a circa 12, cioè siano al di fuori dei limiti imposti dall'intervallo di pH esplorabile con questa tecnica. Un esempio di titolazione di NO_3S è mostrato in **Figura 5.3**.

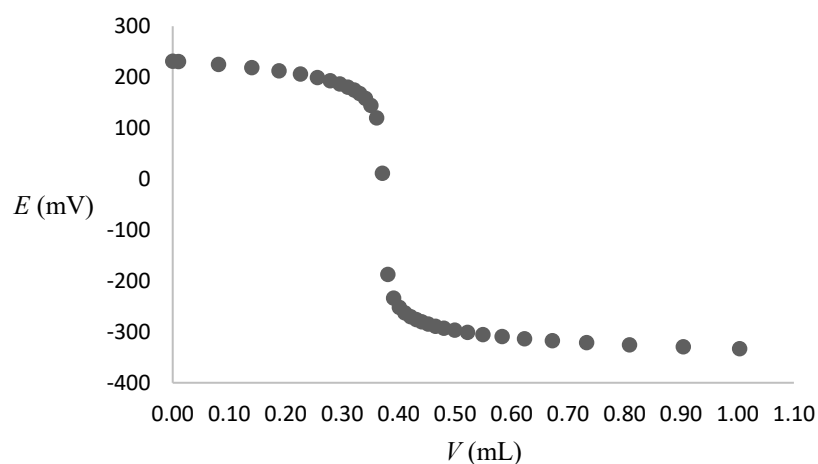
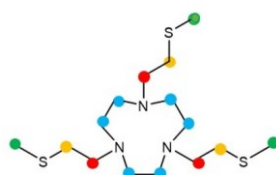


Figura 5.3 Dati potenziometrici di una soluzione contenente 3 mL di acqua e NaNO_3 0.15M, 0.937 mL di NO_3S (1 mM), e 0.3 mL di HNO_3 titolata con NaOH .

5.2.2 Spettroscopia NMR

Data l'impossibilità di ottenere informazioni mediante misure potenziometriche, si sono registrati una serie di spettri ^1H -NMR del legante a diversi pH. Rispetto alla potenziometria, infatti, la spettroscopia NMR presenta il vantaggio di poter studiare il sistema anche a pH molto acidi ($\text{pH} < 2$) e molto basici ($\text{pH} > 12$). Inoltre, tramite tale tecnica, è possibile fare delle valutazioni in merito alla struttura dei diversi composti e alla cinetica degli equilibri acido-base presenti.

Una selezione degli spettri di NO_3S ottenuti ai diversi pH è riportata in **Figura 5.4**. L'attribuzione dei segnali (**Tabella 5.1**) non presenta particolari complessità data l'elevata simmetria del chelante; pertanto, non è stata necessaria la registrazione degli spettri bidimensionali. In particolare, per NO_3S si distinguono i seguenti segnali: due singoletti, uno attribuito ai metileni dell'anello ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$) e l'altro ai gruppi metilici delle catene laterali (SCH_3), e due tripletti, relativi ai metileni delle catene laterali, uno legato all'azoto (NCH_2) e l'altro legato allo zolfo (SCH_2).



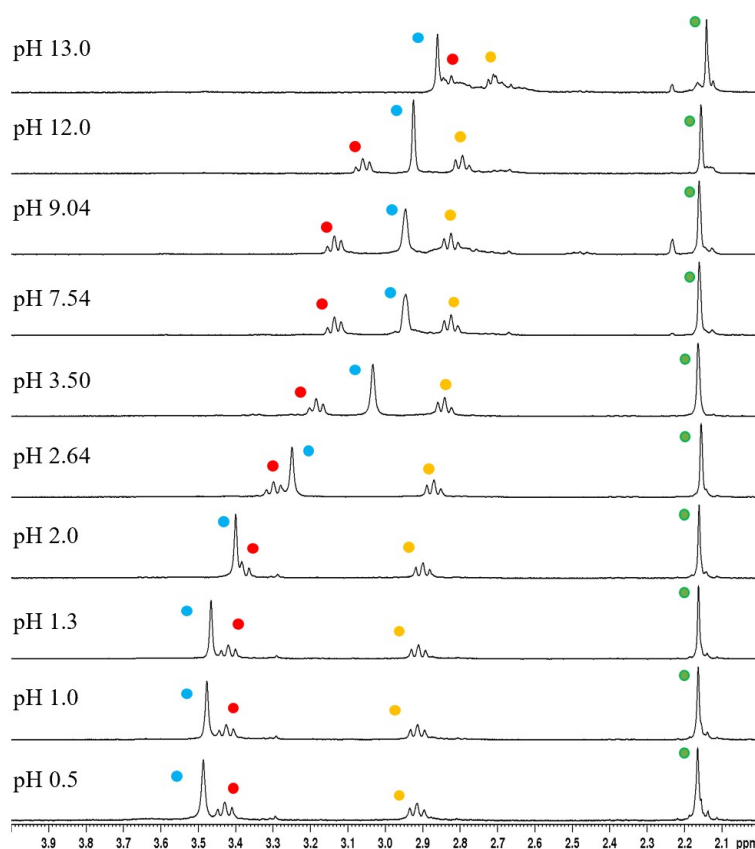


Figura 5.4 In alto: molecola di NO_3S con schema dei colori per l'assegnamento dei picchi. In basso: selezione di spettri NMR di una soluzione di NO_3S (1 mM) a diversi pH che sono indicati in fianco agli spettri ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, 90% H_2O + 10% D_2O , temperatura 298 K).

Tabella 2 Assegnazione dei segnali degli spettri $^1\text{H-NMR}$ di NO_3S a diversi pH.

Specie	Assegnazione
L	2.16 (s, 9, CH_3); 2.71-2.82 (t, 6, SCH_2); 2.82-2.94 (s, 12, NCH_2 anello); 2.85-3.13 (t, 6, NCH_2 catene)
HL^+	2.16 (s, 9, CH_3); 2.81-2.90 (t, 6, SCH_2); 2.93-3.32 (s, 12, NCH_2 anello); 3.13-3.34 (t, 6, NCH_2 catene)
H_2L^{2+}	2.16 (s, 9, CH_3); 2.84-2.91 (t, 6, SCH_2); 3.21-3.43 (t, 6, NCH_2 catene); 3.11-3.49 (s, 12, NCH_2 anello)

A valori di pH superiori a 12 si osserva la formazione di precipitato, che è attribuibile alla formazione di NO_3S completamente deprotonato (forma L, neutra). La

formazione di precipitati delle forme neutre di derivati simili al NO₃S è stata osservata anche per i chelanti precedentemente studiati [57][61][75], ed è dovuta al carattere alifatico e non-polare della molecola che la rende poco solubile in solventi polari. Le forme protonate risultano invece solubili per la presenza di una carica positiva (o più). Dall'analisi degli spettri è possibile fare delle considerazioni relative alle cinetiche di equilibrio acido base; in particolare, i segnali risultano stretti e ben definiti, e ciò suggerisce che NO₃S abbia una struttura poco dinamica e che eventuali equilibri conformazionali abbiano una velocità superiore a quella del *time scale* dell'NMR. Inoltre, poiché nello spettro non si osservano segnali diversi per le differenti specie del legante, anche la velocità delle reazioni di equilibrio ($[H_2L]^{2+} \rightleftharpoons [HL]^+ + H^+$ e $[HL]^+ \rightleftharpoons H^+ + L$) è maggiore rispetto al *time scale* dell'NMR.

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

Osservando gli spettri al variare del pH, si può notare che i segnali di SCH₃ non subiscono variazioni rilevanti di *chemical shift*. Ciò è dovuto al fatto che tali protoni sono distanti dagli azoti dell'anello, che sono il sito di protonazione/deprotonazione. Gli altri segnali, cioè quelli dei gruppi metilenici dell'anello (NCH₂) e delle catene (NCH₂ e SCH₂), mostrano invece una dipendenza molto più marcata dal pH, e ciò è vero in particolare per i protoni direttamente legati agli azoti: in effetti, gli SCH₂ sono meno soggetti a questo fenomeno rispetto ai gruppi metilenici dell'anello e delle catene. Fra i protoni legati agli azoti, quelli dell'anello subiscono una variazione maggiore del *chemical shift* dovuta, probabilmente, al rilassamento della tensione strutturale passando da pH acidi (molecola protonata) a basici (deprotonata): l'effetto si manifesta quindi in modo più significativo per l'anello che non per le catene. [61] In **Figura 5.5** sono riportati gli andamenti del *chemical shift* dei segnali dei gruppi metilenici dell'anello e delle catene in funzione del pH.

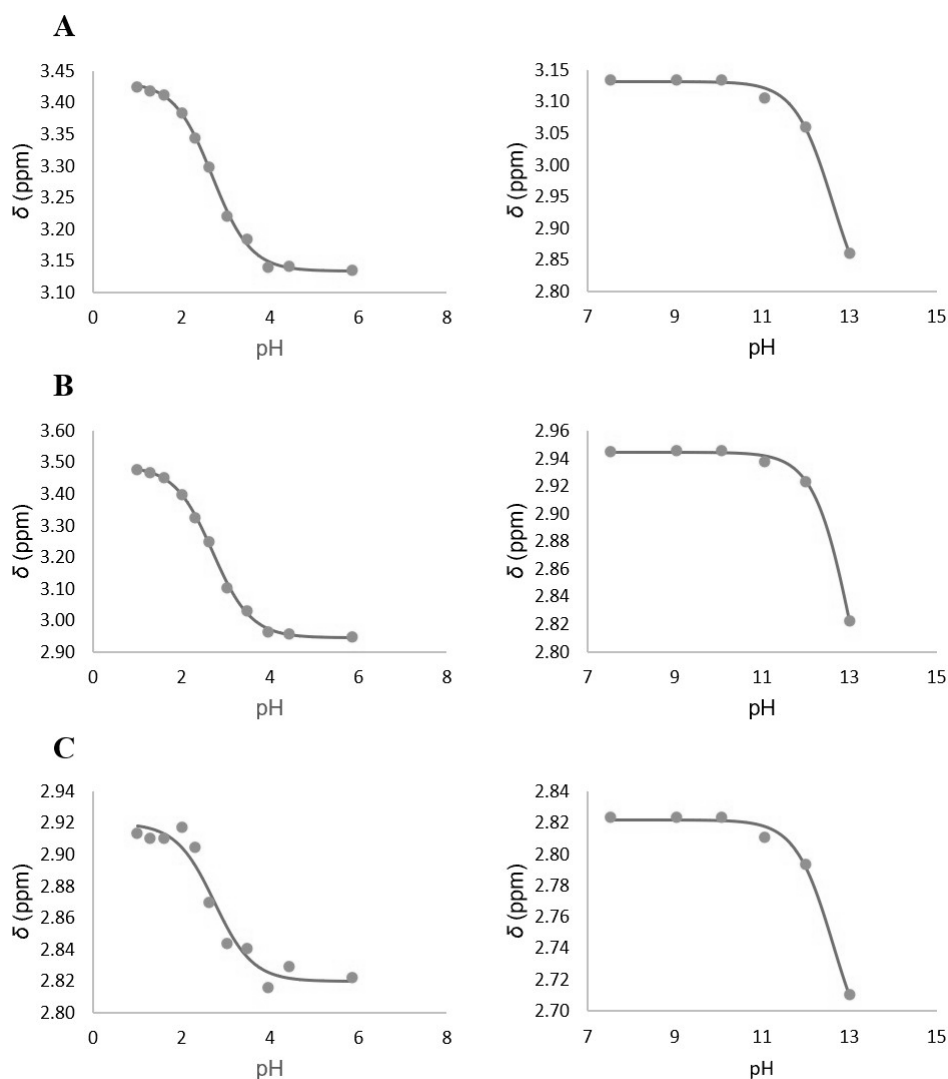


Figura 5.5 Andamenti del chemical shift di NCH_2 catene (A), NCH_2 anello (B) e SCH_2 (C) in funzione del pH, e relative curve di fitting.

I dati sono stati elaborati considerando additivo il *chemical shift* osservato (δ_{oss}). Il suo valore, quindi, è pari alla somma dei singoli contributi delle diverse specie presenti in soluzione, ognuno pesato per la propria frazione molare, come riportato nell'equazione 5.3. in cui viene considerato il generico equilibrio $HL^+ \rightleftharpoons L + H^+$.

$$\delta_{\text{oss}} = \chi_L \delta_L + \chi_{HL} \delta_{HL} \quad (5.3)$$

dove δ_L e δ_{HL} sono i *chemical shift* rispettivamente della specie L ed HL, mentre χ_L e χ_{HL} sono le frazioni molari delle specie presenti espresse dalle equazioni 5.4 e 5.5

$$\chi_{\text{HL}} = \frac{[\text{HL}]}{[\text{L}] + [\text{HL}]} = \frac{[\text{H}]/K_a}{([\text{H}]/K_a) + 1} = \frac{10^{\text{p}K_a - \text{pH}}}{(10^{\text{p}K_a - \text{pH}}) + 1} \quad (5.4)$$

$$\chi_{\text{L}} = 1 - \chi_{\text{HL}} \quad (5.5)$$

Dove K_a è la costante di acidità espressa dall'equazione 5.6

$$K_a = \frac{[\text{L}][\text{H}]}{[\text{HL}]} \quad (5.6)$$

Di conseguenza il *chemical shift* osservato può essere espresso secondo l'equazione 5.7:

$$\delta_{\text{oss}} = \delta_{\text{HL}} \frac{10^{\text{p}K_a - \text{pH}}}{(10^{\text{p}K_a - \text{pH}}) + 1} + \delta_{\text{L}} \left(1 - \frac{10^{\text{p}K_a - \text{pH}}}{(10^{\text{p}K_a - \text{pH}}) + 1} \right) = \frac{\delta_{\text{HL}} 10^{\text{p}K_a - \text{pH}} + \delta_{\text{L}}}{(10^{\text{p}K_a - \text{pH}}) + 1} \quad (5.7)$$

Mediante il *fitting* di δ_{oss} in funzione del pH è possibile ottenere il valore della costante di dissociazione acida e i termini δ_{L} e δ_{HL} delle specie coinvolte nell'equilibrio studiato.

I valori delle $\text{p}K_a$ ottenuti dall'elaborazione vengono riportati in **Tabella 5.2**.

Tabella 5.2 Valori delle $\text{p}K_a$ di NO3S. "L" indica il legante nella forma completamente deprotonata.

equilibri	$\text{p}K_a$
$\text{HL}^+ \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{L}$	12.719 ± 0.078
$\text{H}_2\text{L}^{2+} \rightleftharpoons \text{HL}^+ + \text{H}^+$	2.697 ± 0.021

Mediante le costanti di dissociazione acida di NO3S ricavate dalla spettroscopia NMR è stato possibile tracciare il diagramma di distribuzione del legante, che è mostrato in **Figura 5.6**. Si osserva che la specie prevalente a pH fisiologico è HL^+ , e che, come previsto dalla precipitazione osservata sperimentalmente, L si forma a pH maggiori di circa 12.

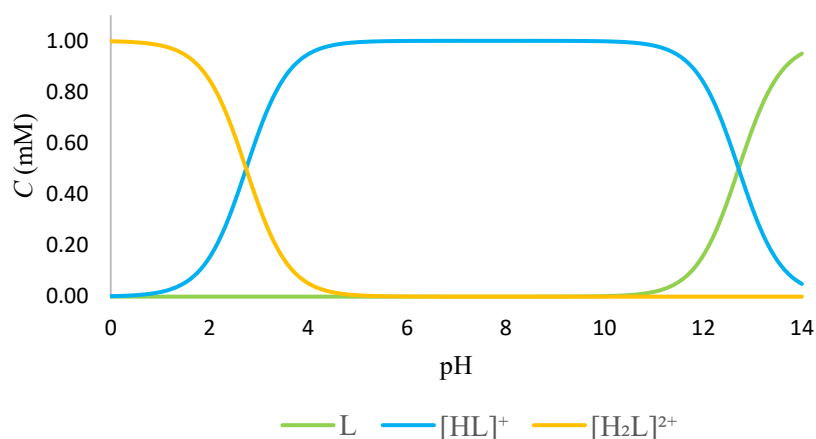


Figura 5.6 Diagramma di distribuzione di NO3S.

Le pK_a di NO3S possono essere confrontate con quelle riportate in letteratura per composti simili. In particolare, sono stati selezionati l'1,4,7-triazaciclononano (TACN) e l'1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononano (Me3[9]aneN3). [72] I valori di pK_a per TACN e Me3[9]aneN3 sono mostrati in **Tabella 5.3**.

Tabella 5.3 Costanti di dissociazione acida di TACN e Me3[9]aneN3.

Equilibrio	pK_a	
	TACN	Me3[9]aneN3
$H_3L^{3+} \rightleftharpoons H_2L^{2+} + H^+$	2.1	-0.4
$H_2L^{2+} \rightleftharpoons HL^+ + H^+$	6.86	5.1
$HL^+ \rightleftharpoons H^+ + L$	10.68	11.7

Si osserva innanzitutto che le prime due pK_a diminuiscono di circa due unità logaritmiche passando dal TACN al Me3[9]aneN3; tale risultato è dovuto alla funzionalizzazione degli atomi di azoto, in quanto le ammine da secondarie divengono terziarie e la presenza delle catene laterali destabilizza lo ione alchil-ammonio comportando una diminuzione della solvatazione. Anche per NO3S il valore della prima pK_a è presumibilmente molto basso e più simile a quello Me3[9]aneN3 piuttosto che a quello del TACN, dato che dai nostri esperimenti non è stato possibile determinarne il valore. Invece, la seconda costante di acidità del NO3S è risultata sorprendentemente molto inferiore (quasi tre ordini di grandezza) rispetto a quella del Me3[9]aneN3.

Per verificare se questo effetto è dovuto allo zolfo oppure alla catena (quella del NO3S è più lunga rispetto a quella del Me3[9]aneN3), si è deciso di sintetizzare e studiare un composto strutturalmente identico al NO3S, ma privo dello zolfo, e cioè l'1,4,7-tributil-1,4,7-triazaciclononano (TACN-Bu), mostrato in **Figura 5.7**. La caratterizzazione di questo legante è stata condotta in maniera analoga a quella descritta per NO3S, per cui sono stati ottenuti degli spettri NMR in funzione del pH; tali spettri sono mostrati in **Figura 5.8**. Il *fitting* dei dati ha permesso di determinare le sue costanti di dissociazione acida (**Tabella 5.4**) e quindi di tracciare il suo diagramma di distribuzione (**Figura 5.9**). I risultati dimostrano che la pK_a anomala di NO3S non è dovuta alla lunghezza della catena, ma piuttosto alla presenza degli atomi di zolfo, in quanto la pK_a di TACN-Bu è prossima a cinque, valore che risulta praticamente identico a quello della seconda pK_a di Me3[9]aneN3. Anche le altre due pK_a sono probabilmente molto simili a quelle di Me3[9]aneN3: la prima è sicuramente molto inferiore a 2 in quanto negli spettri NMR di TACN-Bu non si è osservata nessuna variazione fino a tale pH, mentre la seconda è prevista maggiore di 11-12 (pH così basici non sono stati indagati poiché si è sperimentalmente osservata la precipitazione di TACN-Bu in queste condizioni).

Non è chiara la ragione per cui la presenza dell'atomo di zolfo induca un così marcato effetto sulla seconda pK_a di NO3S. Poiché l'effetto induttivo è da escludere, l'ipotesi più probabile è che si tratti di un effetto strutturale, per cui in presenza di zolfo risulta favorita l'espulsione del secondo protone. Si può anche notare che un effetto simile, e tutto sommato dello stesso ordine di grandezza, è stato osservato anche quando si sono confrontate la pK_{a3} di DO4S (cfr. **capitolo 2**) con quella dell'analogo privo di zolfo (cyclen tetra butilato), in quanto il valore per DO4S risulta molto minore rispetto a quello determinato per il composto privo di zolfo. [60]

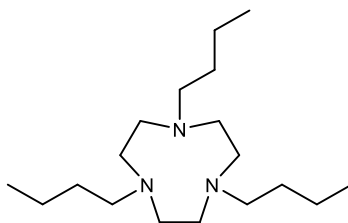


Figura 5.7 Struttura di TACN-Bu.

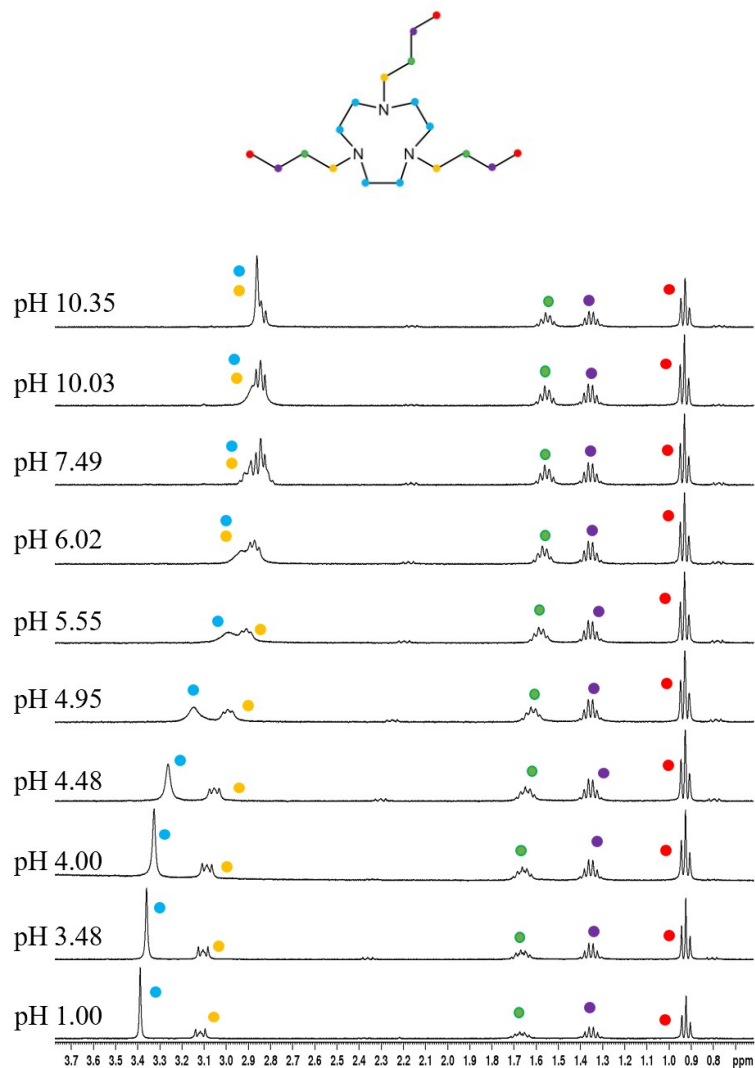


Figura 5.8 In alto: molecola di TACN-Bu con schema dei colori per l'assegnamento dei picchi. In basso: selezione di spettri NMR di una soluzione di TACN-Bu (1 mM) a diversi pH che sono indicati in fianco agli spettri ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, 90% H_2O + 10% D_2O , temperatura 298 K).

Tabella 5.4 Costanti di dissociazione acida di TACN-Bu.

Equilibrio	$\text{p}K_{\text{a}}$
$\text{H}_3\text{L}^{3+} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}^{2+} + \text{H}^+$	--
$\text{H}_2\text{L}^{2+} \rightleftharpoons \text{HL}^+ + \text{H}^+$	5.045 ± 0.050
$\text{HL}^+ \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{L}$	--

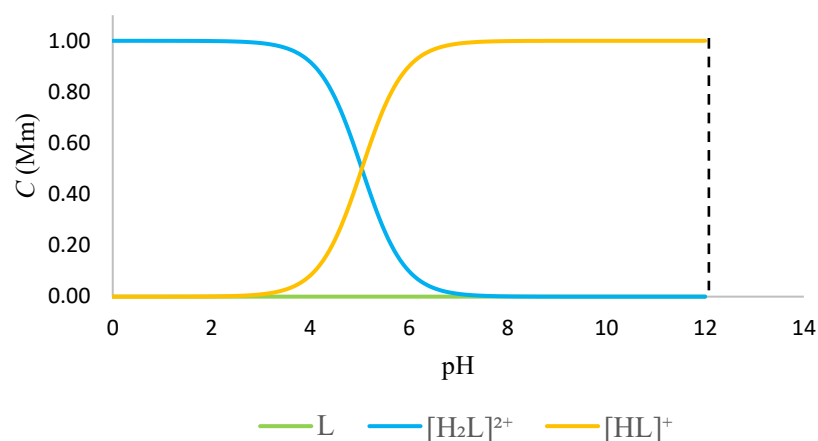


Figura 5.9 Diagramma di distribuzione di TACN-Bu.

5.3 Complessi di Ag^+

Successivamente alla caratterizzazione di NO_3S lo studio si è concentrato sui complessi argento-legante. L'obiettivo dell'analisi è stato quello di determinare la speciazione (numero dei complessi), la loro stechiometria e il valore delle costanti di complessamento (espresse come $\log\beta$). Come misura preliminare, si è studiata la cinetica di formazione dei complessi, per determinare le condizioni necessarie per il raggiungimento della condizione di equilibrio, a sua volta prerequisito per l'ottenimento di dati termodinamici affidabili.

5.3.1 Analisi qualitativa della cinetica di complessamento

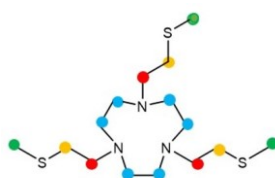
Lo ione Ag^+ è caratterizzato da una bassa densità di carica ed ha una configurazione elettronica di valenza d^{10} : tali caratteristiche lo rendono un centro metallico particolarmente labile suggerendo quindi cinetiche di complessamento veloci. Le proprietà cinetiche di una reazione di complessamento dipendono però anche dalle proprietà del legante, e un macrociclo, di per sé, tende a formare complessi con lentezza, in quanto l'inserimento dello ione metallico nel sito di legame del macrociclo può essere ostacolato stericamente e/o elettrostaticamente. Quest'ultima situazione

può essere particolarmente evidente a pH acidi, quando gli azoti del macrociclo sono protonati, e quindi carichi positivamente.

Per studiare la cinetica di formazione dei complessi di Ag^+ e NO_3S sono state preparate alcune soluzioni a diversi pH (in particolare a pH pari a 2.66; 5.50; 9.12) con un rapporto metallo:chelante pari a 1:1. Sono quindi stati registrati nel tempo alcuni spettri NMR considerando come tempo iniziale il momento in cui è stato aggiunto l'argento. I dati hanno confermato una cinetica di complessamento rapida a tutti i pH: già dopo cinque minuti, infatti, il sistema raggiunge l'equilibrio, senza rilevare variazioni negli spettri tra una misura e l'altra.

5.3.2 Analisi termodinamica

Sebbene normalmente si utilizzi (anche) la potenziometria per determinare la speciazione di un sistema metallo-legante, nel nostro caso non è stato possibile. Le titolazioni condotte con elettrodo di vetro e con elettrodo di argento hanno infatti restituito risultati non coerenti e con *fitting* sempre scadenti. La ragione di questi comportamenti è da attribuirsi alla presenza di impurezze acide o basiche non identificate nel legante fornitoci dalla Chematech; tali impurezze (oltre ai valori di $\text{p}K_a$ al di fuori o prossimi ai limiti dell'intervallo 2-12.5, cfr. **Paragrafo 5.2.2.1**) avevano anche impedito di ottenere risultati nelle titolazioni del legante da solo. Si è quindi abbandonata la potenziometria, e si è proceduto alla determinazione delle costanti di formazione dei complessi mediante misure spettroscopiche $^1\text{H-NMR}$. In **Figura 5.10** sono riportati gli spettri $^1\text{H-NMR}$ di soluzioni contenenti Ag^+ ed NO_3S a vari pH, mentre l'assegnazione dei segnali è indicata nella **Tabella 5.5**.



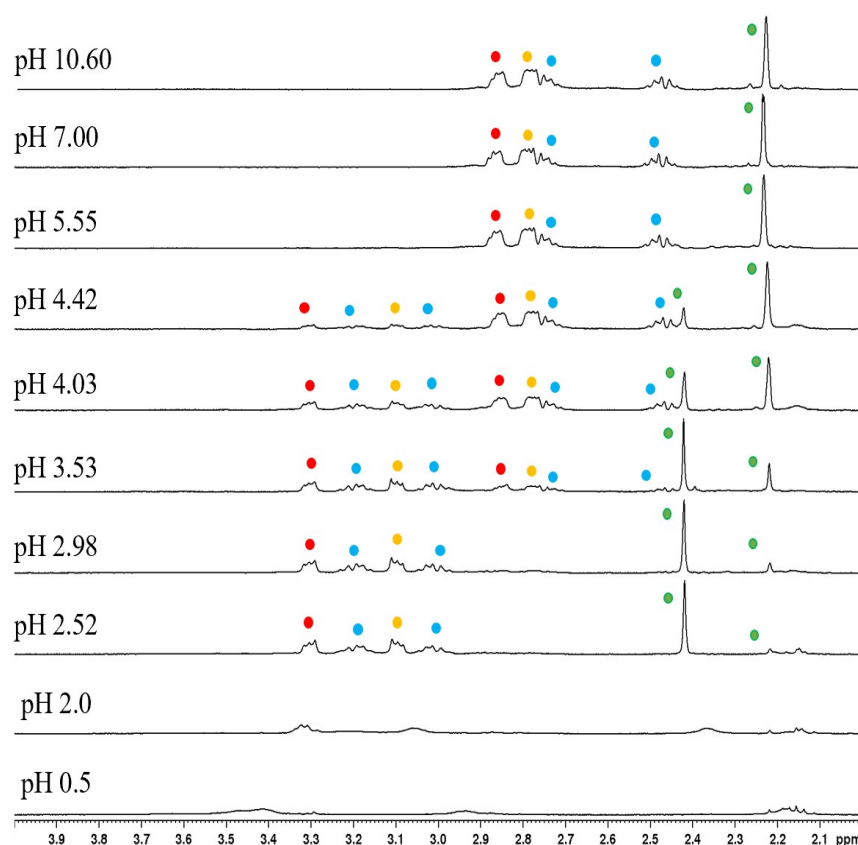


Figura 5.10 In alto: molecola di NO₃S, con schema dei colori utilizzato per l'assegnazione dei segnali. In basso: spettri NMR di una soluzione contenente Ag⁺ ed NO₃S (rapporto 1:1, C_L = C_M = 1 mM) a diversi pH, riportati in fianco a ciascuno spettro (¹H-NMR 400 MHz, 90% H₂O + 10% D₂O, temperatura 298 K).

Tabella 5.5 Assegnazione dei segnali degli spettri ¹H-NMR di soluzioni contenenti Ag⁺ ed NO₃S.

Specie	Assegnazione
[AgL] ⁺	2.22 (s, 9, CH ₃); 2.47-2.72 (t,t, 12, NCH ₂ anello); 2.77 (t, 6, SCH ₂); 2.86 (t, 6, NCH ₂ catene)
[AgLH] ²⁺	2.42 (s, 9, CH ₃); 3.02-3.21 (t,t, 12, NCH ₂ anello); 3.09 (t, 6, SCH ₂); 3.31 (t, 6, NCH ₂ catene)

Tutti i segnali ottenuti sono da attribuirsi a complessi, poiché i *chemical shift* e la forma sono differenti da quelli osservati per NO₃S da solo. Si osserva che ad alcuni pH (inferiori a 2.5 e superiori a 5.5) il gruppo SCH₃ si presenta come un unico singoletto, indicando o che tutti gli atomi di zolfo partecipano alla coordinazione del metallo, oppure che essi sono in scambio veloce tra loro. I segnali dei gruppi metilenici delle catene (SCH₂ e NCH₂) sono risolti in un tripletto, mentre quelli dell'anello sono

sdoppiati in due tripletti. Dallo studio degli spettri NMR bidimensionali (**Figure 5.11** e **5.12**) si evince che questi ultimi accoppiano tra loro, indicando che essi non appartengono a due diversi conformeri, ma sono dovuti, probabilmente, a protoni assiali ed equatoriali magneticamente non equivalenti per ragioni conformazionali.

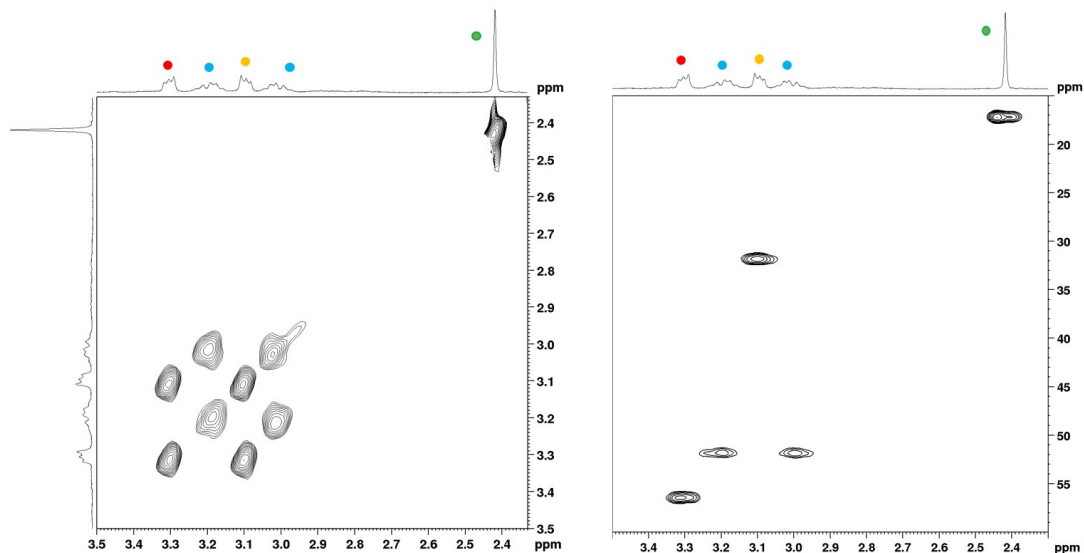


Figura 5.11 Spettri NMR bidimensionali di una soluzione contenente Ag^+ ed NO_3S ($C_L = C_M = 1$ mM, $pH = 2.52$) (400 MHz, 90% H_2O + 10% D_2O , temperatura 298 K). A sinistra: spettro TOCSY 1H - 1H ; a destra: spettro HSQC 1H - ^{13}C .

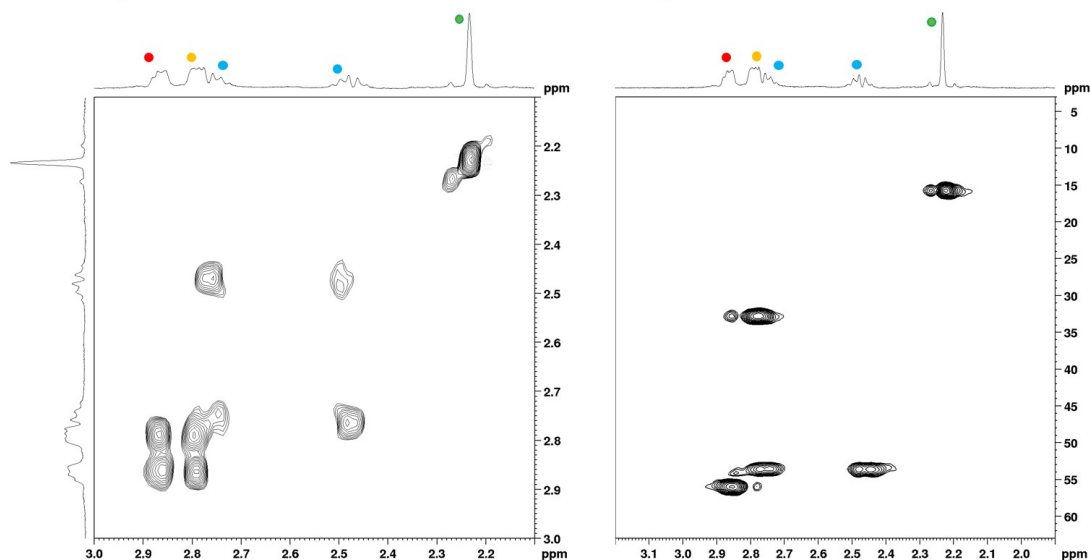


Figura 5.12 Spettri NMR bidimensionali di una soluzione contenente Ag^+ ed NO_3S ($C_L = C_M = 1$ mM, $pH = 10.60$) (400 MHz, 90% H_2O + 10% D_2O , temperatura 298 K). A sinistra: spettro TOCSY 1H - 1H ; a destra: spettro HSQC 1H - ^{13}C .

Tra pH 2.5 e 5.5 si osserva la formazione di due complessi differenti, la cui velocità di interconversione è lenta rispetto al *time scale* dell’NMR, in quanto si possono

osservare chiaramente due gruppi di segnali distinti. L'intensità dei segnali varia al cambiare del pH, in funzione della percentuale del complesso presente, fino a raggiungere il punto di massimo in presenza di una sola delle forme. Per attribuire alle due specie osservate una stechiometria, si devono considerare due aspetti. Innanzitutto, se miscelati con Ag^+ in soluzione acquosa, i composti simili discussi nel **capitolo 2** formano tutti solamente i complessi $[\text{AgLH}]$ ed $[\text{AgL}]$, che si differenziano tra loro per il contenuto di un protone. In secondo luogo, nel caso in esame tutti gli spettri sono stati ottenuti utilizzando rapporti metallo:legante pari ad 1:1, e si può escludere la formazione di complessi del tipo $[\text{Ag}_2\text{L}]$ (o $[\text{Ag}_3\text{L}]$, ecc.), in quanto la formazione di questi complessi implicherebbe la presenza di legante libero in soluzione, che non è stato osservato. Allo stesso tempo, si può escludere la formazione di specie come $[\text{AgL}_2]$ (o $[\text{AgL}_3]$, ecc.), poiché vi sarebbe dello ione argento libero che di per sé precipita a pH maggiori di circa 10; nelle nostre soluzioni, invece, non è mai stata osservata nessuna precipitazione a nessun pH. Si può quindi ragionevolmente concludere che i due complessi formati da Ag^+ e NO_3S siano $[\text{AgLH}]^{2+}$ ed $[\text{AgL}]^+$. Può sembrare sorprendente che un equilibrio di protonazione/deprotonazione sia lento rispetto al *timescale* dell'NMR, ma in realtà questo comportamento è stato osservato per sistemi simili [46] e può essere attribuito ad una modifica strutturale che intercorre nella molecola in seguito al processo.

A pH estremamente acidi ($\text{pH} < 2$) e a temperatura ambiente non si osserva stranamente né la presenza di legante libero, né quella del complesso. Questo suggerisce che ci si trova alla temperatura di coalescenza del sistema che comporta un appiattimento dei segnali NMR. Al fine di verificare la presenza di questa condizione si sono registrati gli spettri NMR della soluzione metallo-legante operando a pH acidi e a temperature diverse da quella ambiente (in particolare a 45°C e 65°C). I risultati ottenuti, mostrati nelle **Figure 5.13** e **5.14**, confermano che a pH acidi la temperatura ambiente è quella di coalescenza.

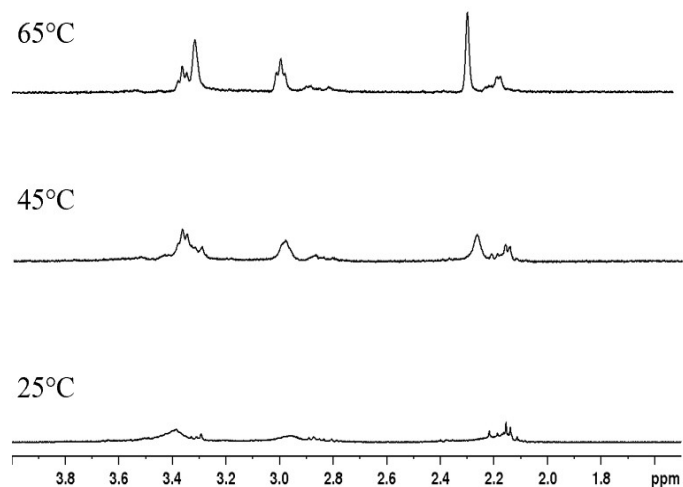


Figura 5.13 Spettri NMR di una soluzione contenente Ag^+ ed NO_3^- ($C_L = C_M = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 1$) ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, 90% H_2O + 10% D_2O).

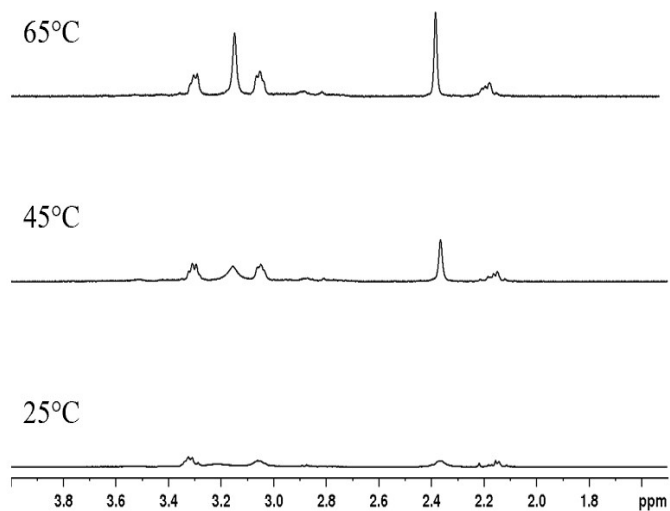


Figura 5.14 Spettri NMR di una contenente Ag^+ ed NO_3^- ($C_L = C_M = 1 \text{ mM}$, $\text{pH} = 2$) ($^1\text{H-NMR}$ 400 MHz, 90% H_2O + 10% D_2O).

5.3.2.1 Determinazione della costante di complessamento a stadi

A pH acidi il complesso è nella forma protonata ($[\text{AgLH}]^{2+}$) e dagli spettri si osservano valori di *chemical shift* più alti rispetto a quelli dei segnali di $[\text{AgL}]^+$. Questa caratteristica è in linea con quanto osservato per il legante libero, indicando che, in

seguito alla protonazione, i segnali vengono deschermati per il calo della densità elettronica.

Valutando l'andamento dell'intensità in funzione del pH è possibile determinare la costante di complessamento a stadi ($\log K$), che in pratica è identica alla pK_a di $[AgHL]^{2+}$. Ai fini dell'analisi è stato considerato il rapporto tra l'intensità del segnale del gruppo metilico (SCH_3) del complesso $[AgLH]^{2+}$ e la somma delle intensità dei segnali dello stesso gruppo per $[AgHL]^{2+}$ e $[AgH]^+$. Tale andamento è mostrato in **Figura 5.15**. Analogamente a quanto visto per la determinazione delle costanti di dissociazione acida del legante, anche qui i dati sono stati elaborati potendo utilizzare la stessa equazione di *fitting* (**Paragrafo 5.2.2.1**) e ottenendo il valore della pK_a di $[AgHL]^{2+}$ (**Tabella 5.6**).

Tabella 5.6 Costante di dissociazione acida per $[AgLH]^{2+}$.

Equilibrio	pK_a
$[AgLH]^{2+} \rightleftharpoons [AgL]^+ + H^+$	3.949 ± 0.026

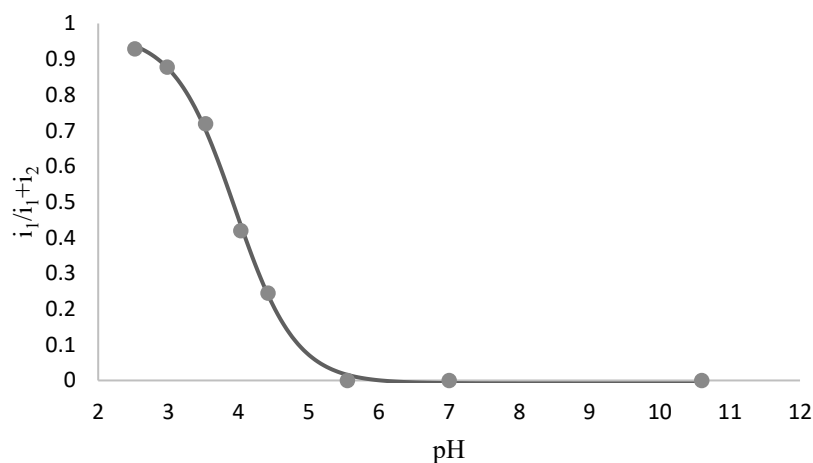


Figura 5.15 Andamento dell'intensità del segnale SCH_3 in funzione del pH, e relativa curva di fitting (cfr. spettri in **Figura 5.10**).

5.3.2.2 Determinazione delle costanti di complessamento globali

Per completare il quadro di speciazione è necessario determinare la costante di formazione di $[\text{AgL}^+]$, detta anche costante globale ($\log\beta$); da questa, nota la pK_a di $[\text{AgLH}^{2+}]$, è possibile determinare anche la costante globale per quest'ultima specie. Per il calcolo è stato utilizzato il programma PITMAP, e si sono utilizzati gli spettri registrati a 45, 55 e 65 °C dato che a temperatura ambiente il sistema è in coalescenza. Gli spettri ottenuti sono mostrati in **Figura 5.16**. Tra pH 1 e pH 2 non si rilevano né i segnali del complesso, né quelli del legante libero, indicando che lo scambio tra chelante libero e complessato è più veloce rispetto al *time scale* dell'NMR. Tuttavia, a pH 1 i segnali sono più spostati verso quelli di NO_3S libero, mentre a pH 2 sono più spostati verso quelli del complesso protonato. Questo è dovuto al fatto che quello che viene osservato è uno spettro mediato ovvero basato sulla media pesata sull'abbondanza delle specie presenti in soluzione. Si può quindi valutare l'andamento del *chemical shift* del segnale del gruppo metilico (SCH_3), quello più facilmente misurabile, in funzione del pH, conoscendo i corrispondenti valori del complesso (dato desunto a pH 2.98 e comunque visibile anche dagli spettri di **Figura 5.10**) e del legante libero. Per quest'ultimo dato, si è ragionevolmente ipotizzato che a pH 0 fosse presente solamente il legante libero (la qual cosa è stata verificata a posteriori sulla base delle costanti determinate). Processando i dati ottenuti è stato possibile determinare il valore delle costanti di complessamento globali (**Tabella 5.7**).

Tabella 5.7 Valori delle costanti di formazione globale dei complessi formati tra Ag^+ ed NO_3S .

Equilibrio	$\log \beta$
$\text{Ag}^+ + \text{L} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{AgLH}]^{2+}$	17.377 ± 0.059
$\text{Ag}^+ + \text{L} \rightleftharpoons [\text{AgL}]^+$	13.428 ± 0.059

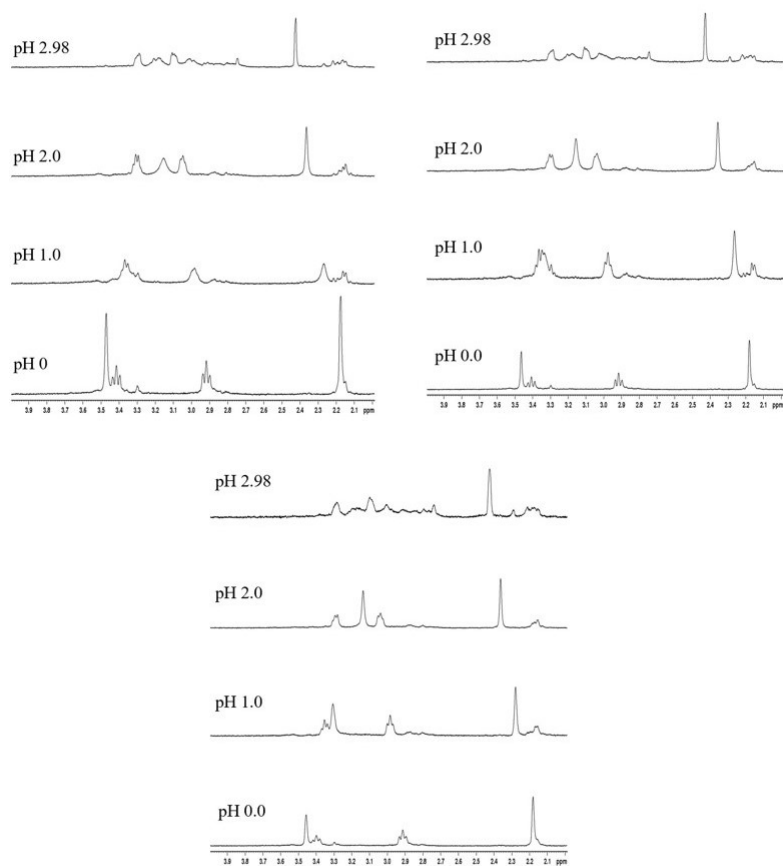


Figura 5.16 Spettri $1H$ -NMR di Ag^+ e NO_3S a diversi pH a diverse temperature. A sinistra $45^\circ C$, a destra $55^\circ C$ in basso $65^\circ C$.

Le costanti di equilibrio presentano una dipendenza dalla temperatura data dall'equazione 5.8.

$$-RT \ln K = \Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (5.8)$$

dove ΔG° , ΔH° e ΔS° sono rispettivamente la variazione di energia libera di Gibbs, di entalpia e di entropia standard; T è la temperatura; R è la costante dei gas e K è la costante di equilibrio.

Per verificare l'effetto della temperatura sulla costante di complessamento globale di argento- NO_3S , e da questo determinare la costante a temperatura ambiente, si sono confrontati i valori ottenuti dalle singole elaborazioni effettuate alle diverse temperature (**Tabella 5.8**).

Tabella 5.8 Valori di $\log\beta$ dei complessi formati da Ag^+ con NO_3S calcolate a diverse temperature.

Temperatura	Equilibrio	$\log \beta$
45°C	$\text{Ag}^+ + \text{L} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{AgLH}]^{2+}$	17.479 ± 0.059
	$\text{Ag}^+ + \text{L} \rightleftharpoons [\text{AgL}]^+$	13.525 ± 0.059
55°C	$\text{Ag}^+ + \text{L} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{AgLH}]^{2+}$	17.298 ± 0.061
	$\text{Ag}^+ + \text{L} \rightleftharpoons [\text{AgL}]^+$	13.349 ± 0.065
65°C	$\text{Ag}^+ + \text{L} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{AgLH}]^{2+}$	17.418 ± 0.053
	$\text{Ag}^+ + \text{L} \rightleftharpoons [\text{AgL}]^+$	13.462 ± 0.052

Dai dati si evince che una variazione della temperatura di 20°C genera un effetto non coerente e sostanzialmente trascurabile in quanto la costante si modifica di un fattore più piccolo dell'incertezza con cui si sono ottenuti i valori di $\log\beta$. Per tale motivo si è assunto che i valori delle costanti di complessamento globali a temperatura ambiente sono pari alla media di quelli determinati a 45, 55 e 65 °C.

La determinazione delle costanti di complessamento globali ha permesso di tracciare il diagramma di distribuzione per Ag^+ - NO_3S , mostrato in **Figura 5.17**.

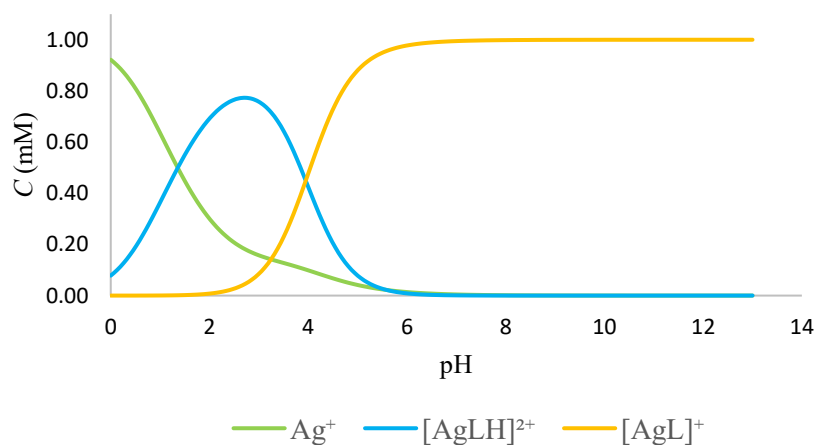


Figura 5.17 Diagramma di distribuzione per una soluzione contenente Ag^+ ed NO_3S ($C_L = C_M = 1 \text{ mM}$).

Il diagramma indica che il metallo libero è presente solamente a pH acidi, mentre per valori via via maggiori di pH si ha dapprima la formazione del complesso $[\text{AgLH}]^{2+}$ e poi quella di $[\text{AgL}]^+$. Quest'ultima specie è quella prevalente a pH fisiologico. I

risultati sono analoghi a quelli ottenuti negli studi precedenti relativi ai complessi di argento con altri leganti (DO4S, DO3S, DO3SAm, TRI4S). [46][61]

5.4 Complessi di Cu^{2+}

Dopo lo studio con Ag^+ , la formazione di complessi di NO_3S è stata studiata anche con Cu^{2+} .

5.4.1 Analisi qualitativa della cinetica di complessamento

Al fine di determinare le costanti di complessamento globali, come precedentemente spiegato nel caso dell'argento (**Paragrafo 5.3.1**), è necessario che il sistema esaminato sia all'equilibrio.

La cinetica di complessamento è stata dunque valutata a livello qualitativo mediante spettrofotometria UV-vis. Per ognuna delle soluzioni contenenti metallo e legante in rapporto 1:1, a uno specifico pH, sono stati registrati diversi spettri UV-vis nel tempo a partire dall'aggiunta del metallo alla soluzione. La cinetica di complessamento è stata indagata lavorando a temperatura ambiente e a pH 1, 2, 3.1, 4.5 e 7.15. Gli andamenti dell'assorbanza a 372 nm in funzione del tempo sono mostrati in **Figura 5.18**.

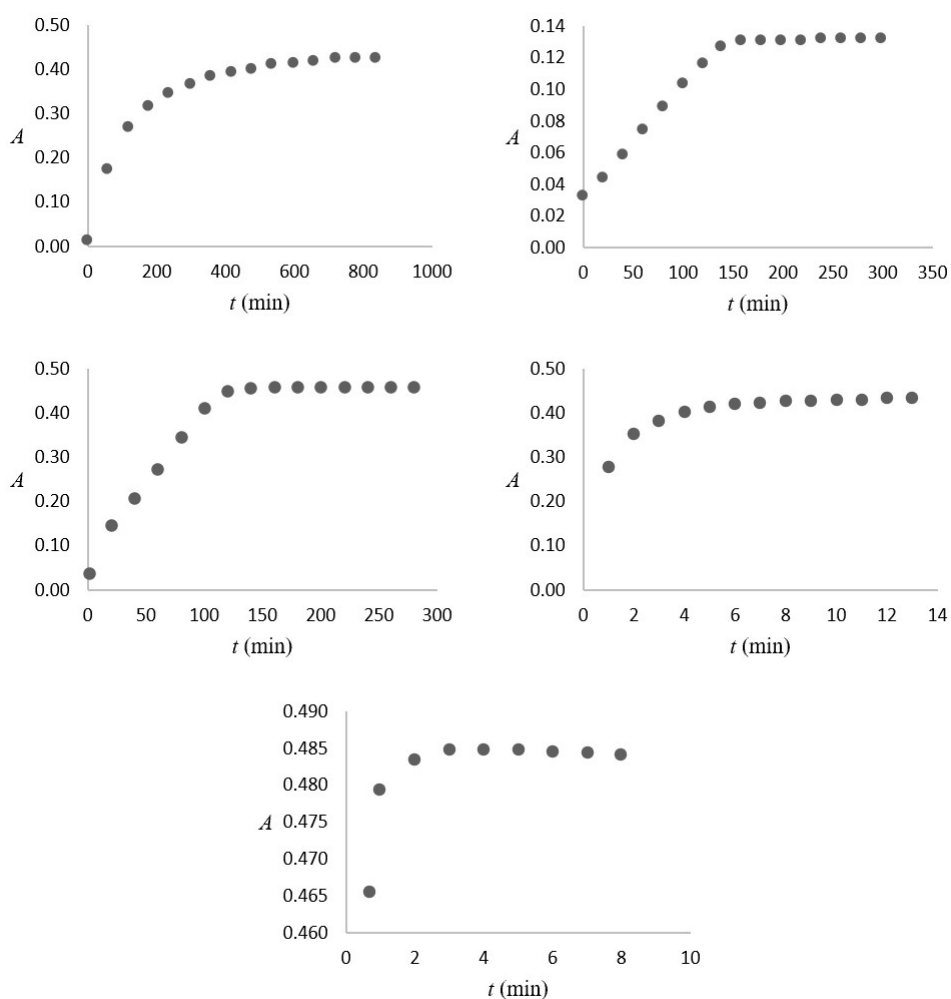


Figura 5.18 Andamento dell'assorbanza a 372 nm in funzione del tempo per soluzioni contenenti Cu^{2+} e NO_3S a diversi pH ($C_M = 0.1 \text{ mM}$, $C_L = 0.1 \text{ mM}$). In alto: a sinistra pH 1, a destra pH 2; in centro: a sinistra pH 3.1, a destra pH 4.5; in basso pH 7.15.

I dati dimostrano una cinetica veloce a pH pari o superiori a 4.5 con reazioni che raggiungono l'equilibrio in un tempo nell'ordine di qualche minuto, mentre per pH più acidi la cinetica è nettamente più lenta, con un tempo richiesto nell'ordine delle ore (2.5 ore a pH 2 e circa 10 ore a pH 1). La velocità ridotta a pH molto acidi è giustificabile dal fatto che in queste condizioni il legante è presente unicamente nella forma diprotonata; si genera una repulsione elettrostatica tra i protoni situati all'interno dell'anello del chelante e il catione Cu^{2+} , e tale repulsione ostacola l'ingresso dello ione metallico nel sito di legame e quindi la formazione del complesso.

Confrontando i dati cinetici con quelli ottenuti con l'argento si osserva che per Cu^{2+} le reazioni sono molto più lente. Ciò è attribuibile alla maggior carica di Cu^{2+} rispetto ad Ag^+ , che rende più difficile il suo ingresso nel sito di legame,

Un'ultima annotazione riguarda il particolare andamento cinetico osservato a pH 2 e a pH 3.1, che si è confermato identico anche ripetendo le misure. A tali pH la velocità sembra indipendente dalla concentrazione dei reagenti, come se la legge cinetica fosse di ordine zero. In prospettiva sarà necessario condurre uno studio cinetico approfondito per comprendere questo comportamento.

5.4.2 Analisi termodinamica

Anche nel caso di Cu^{2+} , così come per Ag^+ , non è stato possibile studiare i complessi con NO_3S per via potenziometrica, e per le stesse ragioni che dipendono come visto dal legante e non dallo ione metallico. Per Cu^{2+} , dunque, lo studio è stato condotto per via spettrofotometrica UV-Vis, sfruttando le variazioni consistenti di assorbanza che si osservano in seguito alla formazione dei complessi. Sono stati registrati spettri UV-vis a diversi pH. Per ovviare al problema relativo alla lentezza della cinetica di complessamento, le soluzioni sono state sottoposte a riscaldamento prolungato.

Gli spettri UV-vis registrati a pH neutri e acidi sono caratterizzati da una banda con un massimo a 372 nm dovuta al trasferimento di carica metallo-legante. A pH basici, invece, tale banda risulta assente, e al suo posto vi è un nuovo segnale a 280 nm. Dall'analisi dei dati ottenuti si constata la presenza di un punto isobestico a circa 340 nm che evidenzia l'esistenza di due diversi complessi del Cu^{2+} con NO_3S , uno prevalente a pH acidi-neutri e l'altro a pH basici. In **Figura 5.19** sono riportati alcuni spettri UV-vis a diversi pH.

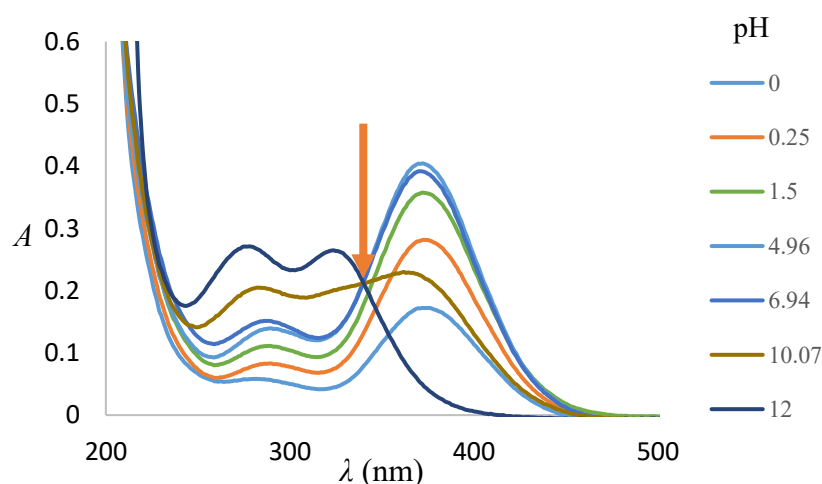


Figura 5.19 Selezione di spettri UV-vis di una soluzione contenente Cu^{2+} ed NO_3S ($C_L = C_M = 0.1 \text{ mM}$) a diversi pH. La freccia evidenzia il punto isobestico.

Al fine di determinare le costanti di complessamento (a stadi e/o globali) è stata valutata la variazione dell'assorbanza del picco a 372 nm in funzione del pH. Da tale analisi si riscontra che il complesso inizia a formarsi a pH 0 fino a raggiungere pH 2 dove la formazione del complesso è ultimata e pertanto non si osserva più una crescita nell'assorbanza. Per pH superiori a 7.5 l'assorbanza della banda a 372 nm diminuisce mentre cresce quella a 280 nm a dimostrazione che Cu^{2+} forma un secondo complesso con NO_3S . L'andamento complessivo a 372 nm è mostrato in **Figura 5.20**.

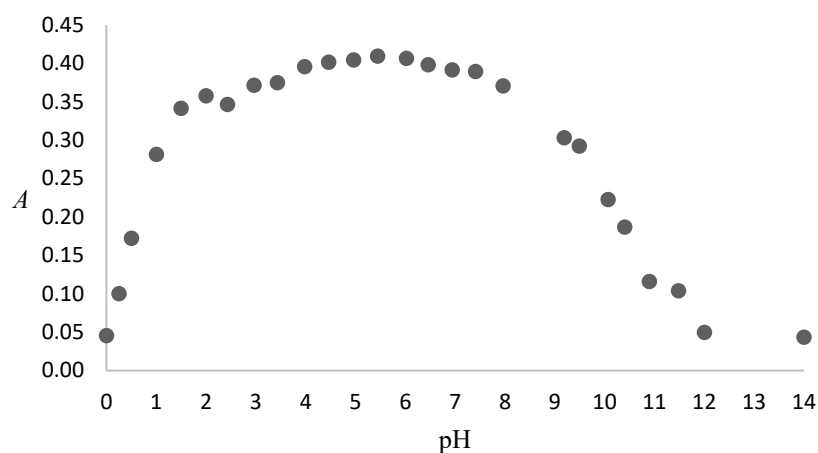
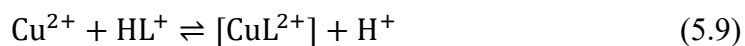


Figura 5.20 Andamento dell'assorbanza a 372 nm in funzione del pH per soluzioni contenenti Cu^{2+} ed NO_3S (cfr. Figura 5.19).

L'identità dei due complessi non è semplice da stabilire a priori. La formazione di specie di stechiometria diversa da 1:1 è stata scartata sulla base delle misure riportate nel paragrafo successivo, oltre che dal fatto che anche i leganti simili finora studiati formano con Cu^{2+} solo complessi 1:1. I due complessi formati tra Cu^{2+} e NO_3S sono quindi entrambi di stechiometria 1:1 e si differenziano per un protone: può trattarsi sia della coppia $[\text{CuLH}^{3+}]-[\text{CuL}^{2+}]$, sia di quella $[\text{CuL}^{2+}]-[\text{CuLOH}^+]$, e ovviamente anche di altre coppie acido-base meno probabili, ma comunque teoricamente ammissibili ($[\text{CuLH}_2^{4+}]-[\text{CuLH}^{3+}]$, $[\text{CuLOH}^+]-[\text{CuL}(\text{OH})_2]$, ecc.). La scelta è stata fatta preparando due soluzioni, una di Cu^{2+} e una di legante, entrambe a pH 4.0 e a concentrazione 0.1 mM; le due soluzioni sono state mescolate, e ne è stato misurato il pH dopo riscaldamento. Tale pH è risultato pari a 3.73, indicando una acidificazione (reazione 5.9) che è compatibile con la presenza in soluzione del complesso $[\text{CuL}^{2+}]$

ma non con quella del complesso $[\text{CuLH}^{3+}]$. Se, infatti, il complesso presente a pH 4 fosse quest'ultimo, la sua formazione a partire da rame (presente come Cu^{2+}) e legante (presente a questo pH come HL^+) non comporterebbe la liberazione di protoni (reazione 5.10).



Tra l'altro, la diminuzione di pH di 0.27 unità misurata sperimentalmente è pari a quella prevista a livello teorico per una soluzione con concentrazione di legante e metallo pari a 0.1 mM, che libera 0.1 mM di protoni e quindi decrementa teoricamente il pH da 4.0 a 3.7.

La coppia di complessi considerati presenti in soluzione dovrebbe quindi essere $[\text{CuL}^{2+}]$ - $[\text{CuLOH}^+]$. La presenza di $[\text{CuL}^{2+}]$ a pH acidi neutri è stata osservata anche per leganti simili studiati in precedenza [57]; inoltre, si può anche notare che è improbabile la formazione a pH acidi di specie già deprotonate, in quanto la deprotonazione a carico dell'acqua coordinata al centro metallico avviene solo dopo pH circa 8 per il rame libero, per cui è estremamente improbabile che possa avvenire a pH acidi nel rame legato. Si osservi infine che la speciazione scelta è stata successivamente confermata anche dall'elaborazione dei dati condotta col programma PITMAP (cfr. **Paragrafo 3.1.3.6**).

Un altro aspetto da evidenziare è che per NO3S si ha la formazione di un ulteriore complesso oltre a $[\text{CuL}^{2+}]$, che è inedita rispetto ai sistemi precedentemente studiati. La formazione della nuova specie, $[\text{CuLOH}^+]$, può essere in prima battuta attribuita alla mancata saturazione dei siti di legame di Cu^{2+} da parte di NO3S, e quindi alla presenza di acqua di coordinazione che a pH basici può deprotonare formando l'idrossocomplesso. Nei casi precedentemente studiati, al contrario, i 4 azoti, i 2 ossigeni (in DO2A2S), e i 3 o 4 zolfi permettevano di saturare lo ione metallico e quindi non consentivano la permanenza di acqua di coordinazione.

5.4.2.1 Determinazione delle costanti di complessamento a stadi

Elaborando i dati di **Figura 5.20** utilizzando un'equazione di *fitting* analoga a quella impiegata per l'analisi dei dati spettroscopici NMR (**Paragrafo 5.2.2.1**) sono state

determinate le costanti di complessamento a stadi per il sistema Cu^{2+} - NO_3S riportate in **Tabella 5.9**.

Tabella 5.9 Costanti di dissociazione acida dei complessi formati tra Cu^{2+} ed NO_3S .

Equilibrio	$\text{p}K_{\text{a}}$
$\text{Cu}^{2+} + [\text{LH}]^+ \rightleftharpoons [\text{CuL}]^{2+} + \text{H}^+$	0.365 ± 0.053
$[\text{CuL}]^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuL}(\text{OH})]^+ + \text{H}^+$	10.286 ± 0.031

5.4.2.2 Determinazione della stechiometria dei complessi

La stechiometria dei complessi è stata indagata mediante spettrofotometria UV-vis inizialmente utilizzando il metodo delle variazioni continue a pH 7.15 e 12. La concentrazione del chelante è stata fissata a 0.1 mM mentre quella del metallo è stata variata in modo tale da ottenere rapporti metallo:legante compresi tra 0:1 a 3:1. Gli spettri a pH 7.15, riportati in **Figura 5.21**, mostrano il progressivo incremento dell'assorbanza della banda a 372 nm, indice di una crescita della formazione del complesso. Analizzando l'andamento dell'assorbanza a 372 nm in funzione del rapporto tra il numero di moli di NO_3S e quello di Cu^{2+} si determina che Cu^{2+} e NO_3S formano unicamente complessi con stechiometria 1:1 a pH neutro. Dato che il complesso è il medesimo da pH acido fino a pH 9-10, si conferma che in tutto questo intervallo di pH la specie che si forma ha stechiometria 1:1, e come visto in precedenza è stata identificata essere $[\text{CuL}^{2+}]$.

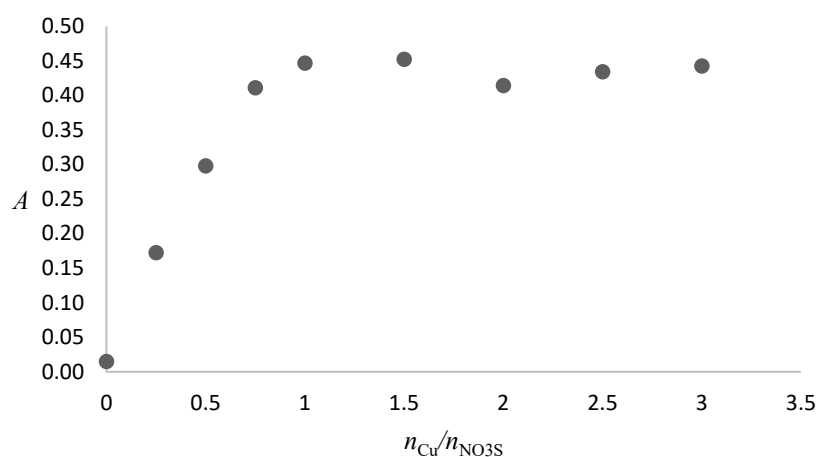


Figura 5.21 Andamento dell'assorbanza a 372 nm in funzione del rapporto molare tra metallo e legante per soluzioni contenenti Cu^{2+} ed NO_3S a pH 7.15 ($C_L = 0.1$ mM).

L'analisi a pH 12 si complica poiché l'assorbanza del complesso diviene abbastanza simile a quella di Cu^{2+} libero (un esempio è mostrato in **Figura 5.22**). Pertanto, l'assorbanza misurata a 280 nm in condizioni di eccesso di metallo non è relativa solamente al complesso rame-legante, ma è anche dovuta, almeno in parte, alla presenza di metallo libero. Si sono quindi registrati diversi spettri UV-vis del solo metallo a diverse concentrazioni, pari a quelle di eccesso ipotizzato. Riportando in grafico il nuovo valore di assorbanza, calcolato sottraendo al valore trovato sperimentalmente il contributo dovuto al rame in eccesso (ipotizzando una stechiometria 1:1), in funzione del rapporto metallo-legante, si è ottenuto l'andamento mostrato in **Figura 5.23**. L'andamento suggerisce la formazione di un complesso 1:1 ma i dati sono molto rumorosi, probabilmente a causa dell'incertezza introdotta con la sottrazione dello spettro di Cu^{2+} libero. Per avere un'ulteriore conferma sulla stechiometria, a pH 12 le soluzioni sono state studiate anche seguendo il metodo di Job. Questo prevede l'analisi di una serie di soluzioni a diverso rapporto metallo-legante in cui entrambe le concentrazioni delle specie vengono fatte variare mantenendo la loro somma costante ($C_M + C_L = 0.2$ mM). I risultati sono mostrati in **Figura 5.24**. Il metodo di Job, in maniera più sicura rispetto a quello delle variazioni continue, conferma la stechiometria 1:1 del complesso presente a pH 12.

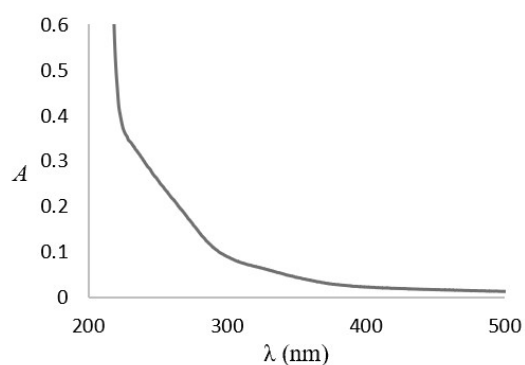


Figura 5.22 Spettri UV-vis di Cu^{2+} libero a pH 12 ($C_M = 0.1 \text{ mM}$).

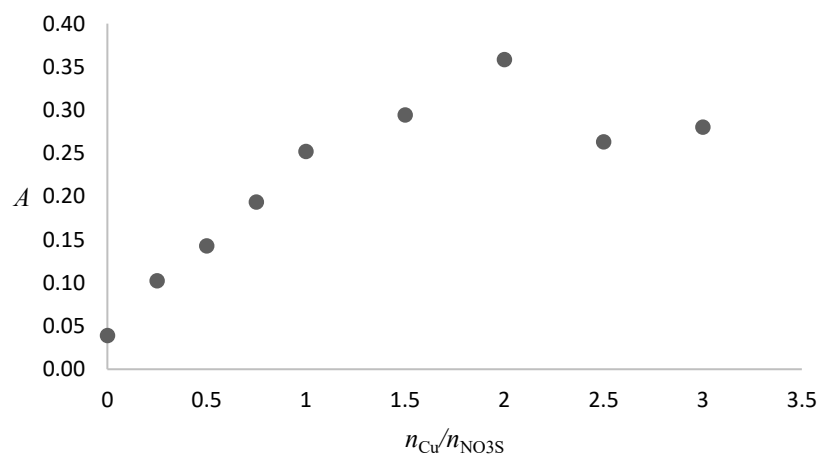


Figura 5.23 Andamento dell'assorbanza a 280 nm in funzione del rapporto molare tra metallo e legante per soluzioni contenenti Cu^{2+} ed NO_3S a pH 12 ($C_L = 0.1 \text{ mM}$).

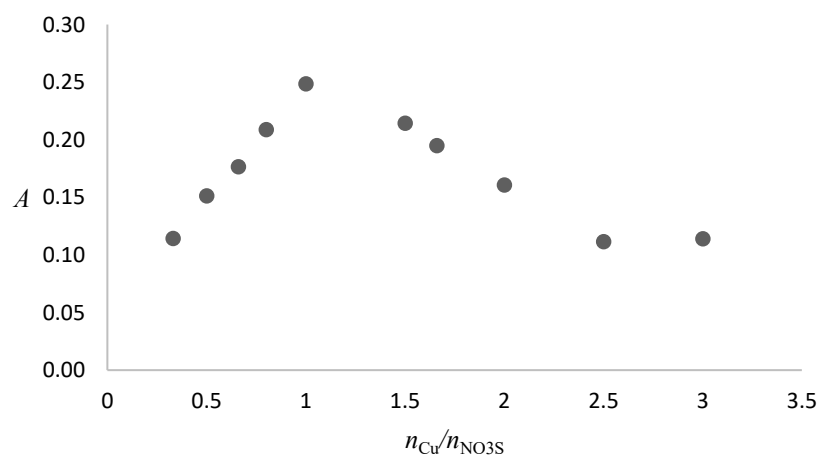


Figura 5.24 Andamento dell'assorbanza a 280 nm in funzione del rapporto molare tra metallo e legante per soluzioni contenenti Cu^{2+} ed NO_3S a pH 12 ($C_L + C_M = 0.2 \text{ mM}$).

5.4.2.3 Determinazione delle costanti di complessamento globali

Per determinare le costanti di complessamento globali è stato utilizzato il programma PITMAP. Ai fini dell'analisi è stato considerato l'andamento dell'assorbanza a 372 nm in funzione del pH. L'elaborazione comporta la valutazione di diversi parametri quali le concentrazioni di legante e metallo, le costanti di dissociazione acida di NO₃S (pK_a), i coefficienti di estinzione molare dei complessi (ϵ) e le loro costanti di formazione (β). Ad eccezione di questi ultimi due parametri, gli altri sono stati mantenuti fissi durante il processamento dei dati. Per confermare il modello di speciazione da noi ipotizzato, l'elaborazione con PITMAP è stata ripetuta più volte impostando ogni volta modelli differenti. I risultati ottenuti hanno confermato che i complessi presenti sono $[CuL]^{2+}$ e $[CuL(OH)]^+$ poiché per tali specie si ottengono *fitting* migliori (**Paragrafo 3.1.3.6**). I valori ottenuti per le costanti di complessamento globali sono riportati in **Tabella 5.10**.

Tabella 5.9 Valori delle costanti di formazione globali e dei coefficienti di estinzione molare dei complessi formati tra Cu^{2+} ed NO_3S .

Equilibrio	$\log \beta$	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$) a 372 nm
$Cu^{2+} + L \rightleftharpoons [CuL]^{2+}$	18.415 ± 0.053	3467.35 ± 0.11
$Cu^{2+} + L + H_2O \rightleftharpoons [CuL(OH)]^+ + H^+$	9.081 ± 0.031	633.35 ± 0.12

Dalle costanti di complessamento globali ottenute per via spettrofotometrica è stato possibile tracciare il diagramma di distribuzione per soluzioni contenenti Cu^{2+} ed NO_3S . Il diagramma è mostrato in **Figura 5.25**.

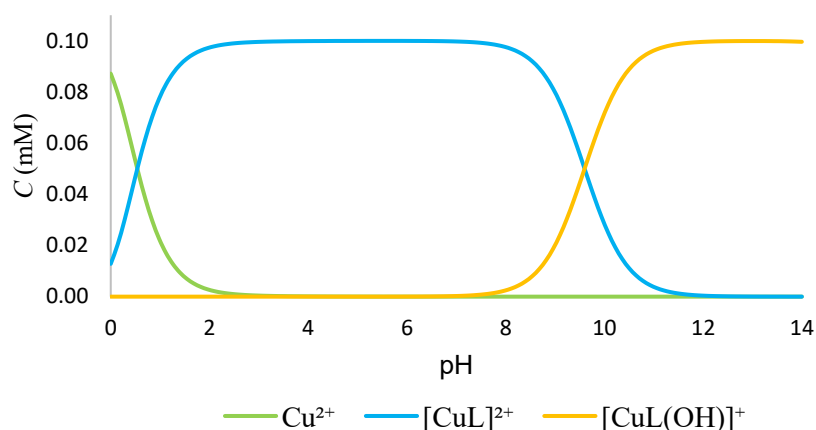


Figura 5.25 Diagramma di distribuzione per una soluzione contenente Cu^{2+} ed NO_3S ($C_L = C_M = 0.1$ mM).

Il diagramma mostra che il metallo libero è presente solamente a pH estremamente acidi, mentre per valori via via maggiori si ha dapprima la formazione del complesso $[CuL]^{2+}$ e poi, da pH 8, quella di $[CuL(OH)]^+$. Se si confronta tale speciazione con quella ottenuta per Ag^+ , si osserva che per Cu^{2+} sono assenti specie protonate; ciò è dovuto alla carica $2+$ del metallo che comporta maggiori repulsioni elettrostatiche rispetto a cationi monovalenti, e quindi sfavorisce ulteriori protonazioni sul complesso.

5.4.4 Complessi Ag^+ -TACN-Bu e Cu^{2+} -TACN-Bu

Il legante TACN-Bu non è utile per evidenziare il ruolo dello zolfo solo nelle proprietà acido-base anomale di NO_3S , ma anche nel complessamento di ioni metallici. Le differenze tra NO_3S e TACN-Bu possono infatti evidenziare se lo zolfo aumenta (o diminuisce) la forza dei complessi, e quindi suggerire se l'atomo si lega o meno allo ione metallico.

5.4.4.1 Ag^+ -TACN-Bu

Si è come prima cosa cercato di studiare i complessi tra Ag^+ e TACN-Bu. Tale studio è tuttavia risultato impossibile: infatti, ad ogni pH, si è osservata la formazione di un precipitato bianco all'atto del mescolamento dei due componenti. Per spiegare l'origine di questo precipitato, si deve considerare che la sintesi di TACN-Bu, condotta

al di fuori di questo lavoro di tesi, prevede l'alchilazione del TACN con un alogenuro (di solito cloruro) di butile, e quindi è possibile che il prodotto di sintesi contenga cloruro. In realtà, tutti i leganti simili già studiati, quando sono stati indagati esplicitamente, hanno dimostrato di contenere quantità non esigue di ione cloruro. [61] Lo ione Ag^+ si trova quindi in competizione con il chelante per la formazione dei complessi, e con lo ione cloruro per la formazione del sale poco solubile AgCl ($K_s = 1.07 \cdot 10^{-10}$). Se il legante forma complessi di forza apprezzabile, la competizione su AgCl viene vinta (anche per la bassa concentrazione di cloruro), e infatti per i chelanti finora studiati la precipitazione viene osservata solo a pH molto acidi, dove i complessi sono poco stabili. [61] La precipitazione osservata nelle miscele tra Ag^+ e TACN-Bu è stata quindi attribuita alla formazione di AgCl e alla scarsa forza dei complessi che si formano tra questi due composti. Ciò conferma, per quanto in maniera indiretta, il ruolo fondamentale dello zolfo nel garantire la formazione di complessi stabili con Ag^+ .

5.4.4.2 Cinetiche di complessamento Cu^{2+} -TACN-Bu

Si è quindi studiata la formazione dei complessi tra Cu^{2+} e TACN-Bu mediante spettrofotometria UV-vis, valutando come prima cosa la cinetica di complessamento per una soluzione contenente sia Cu^{2+} che il legante a concentrazione pari a 0.1 Mm e a pH 7.15. Dalla valutazione dell'andamento dell'assorbanza nel tempo si constata che l'equilibrio viene raggiunto dopo un tempo di circa 7.5 ore, nettamente superiore a quello riscontrato per NO3S che era di soli 3 minuti (**Figura 5.26**).

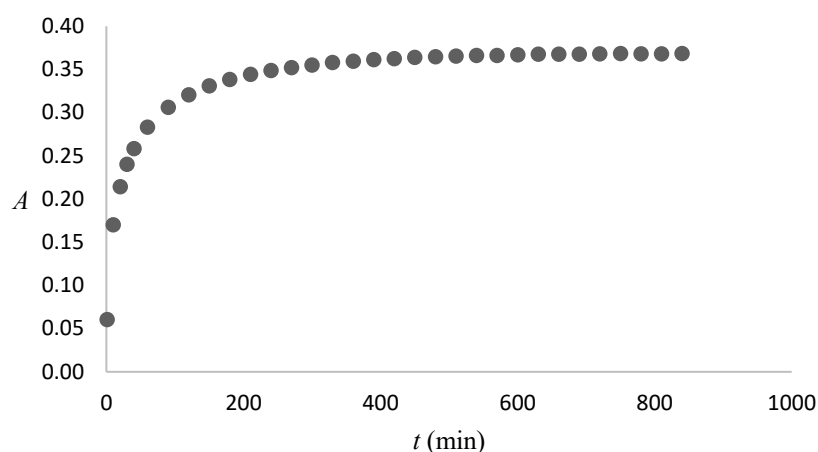


Figura 5.26 Andamento dell'assorbanza a 295 nm in funzione del tempo per una soluzione contenente Cu^{2+} e TACN-Bu a concentrazioni 0.1 mM e a pH 7.15.

I risultati cinetici confermano quindi l'esistenza di un contributo degli atomi di zolfo nell'interazione con il metallo la cui presenza incrementa la velocità della reazione di complessamento. Si può ipotizzare che lo zolfo interagisca con Cu^{2+} formando dei complessi a sfera esterna, i quali poi evolvono nel complesso finale, e che quindi lo zolfo agisca (almeno a livello cinetico) come catalizzatore per la reazione di complessamento.

5.4.4.3 Studio termodinamico Cu^{2+} -TACN-Bu

La speciazione del sistema Cu^{2+} - TACN-Bu è stata studiata mediante spettrofotometria UV-vis, utilizzando tempistiche e riscaldamento tali da garantire il raggiungimento dell'equilibrio. Si sono quindi registrati diversi spettri UV-vis a diversi pH (Figura 5.27). La Figura 5.28 riporta gli andamenti dell'assorbanza a 296 nm in funzione del pH.

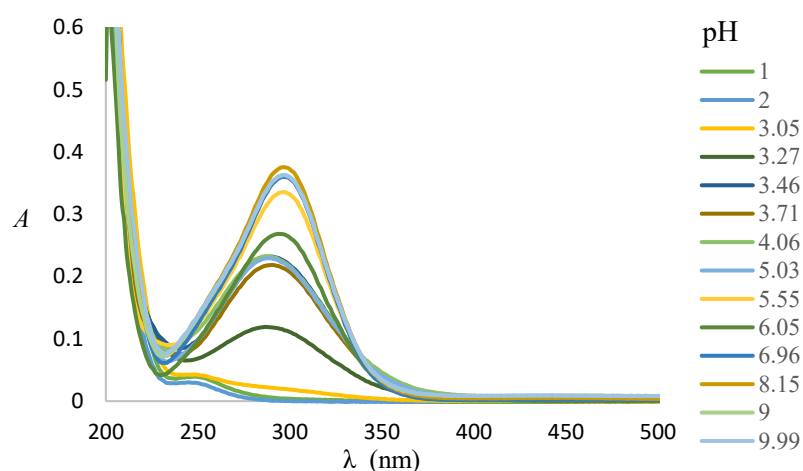


Figura 5.27 Spettri UV-vis di soluzioni contenenti Cu^{2+} e TACN-Bu ($C_M = C_L = 0.1 \text{ mM}$) a diversi pH.

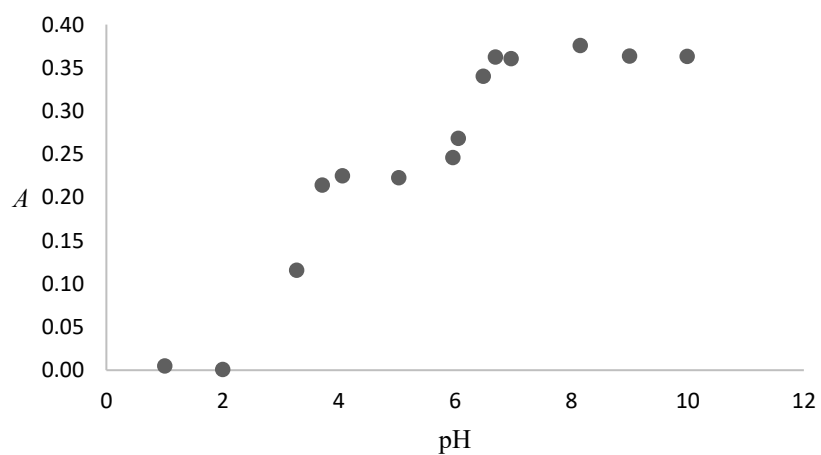


Figura 5.28 Andamento dell'assorbanza a 296 nm in funzione del pH per le soluzioni indagate di **Figura 5.27**.

Tabella 5.10 Valori delle costanti di formazione globale e dei coefficienti di estinzione molare dei complessi formati tra Cu^{2+} e TACN-Bu.

Equilibrio	$\log \beta$	$\epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ a 296 nm
$\text{Cu}^{2+} + \text{LH}^+ \rightleftharpoons [\text{CuLH}]^{3+}$	6.18 ± 0.16	2600 ± 350
$\text{Cu}^{2+} + \text{LH}^+ \rightleftharpoons [\text{CuL}]^{2+} + \text{H}^+$	-0.04 ± 0.15	3780 ± 150

I dati sono stati ottenuti attraverso un'elaborazione *ad hoc* descritta in **Appendice 1**, e sono riportati in **Tabella 5.10**. Il diagramma di distribuzione è mostrato in **Figura 5.29**.

A differenza di quanto accade per Cu^{2+} -NO3S, le specie presenti con questo legante sono $[\text{CuLH}]^{3+}$ e $[\text{CuL}]^{2+}$, e risultano molto diverse anche le costanti di complessamento e la $\text{p}K_a$ che lega i due complessi. Il diverso modello di speciazione e il diverso valore delle costanti di complessamento indicano che gli atomi di zolfo hanno un effetto significativo. Si può anche osservare che nel caso di NO3S i complessi sono più stabili che per TACN-Bu, in quanto la formazione ha inizio a pH più acido nel primo caso. Una stima più quantitativa e rigorosa della stabilità dei complessi è riportata nel **capitolo 6**, ma si può anticipare che NO3S forma effettivamente complessi molto più stabili con Cu^{2+} rispetto a TACN-Bu

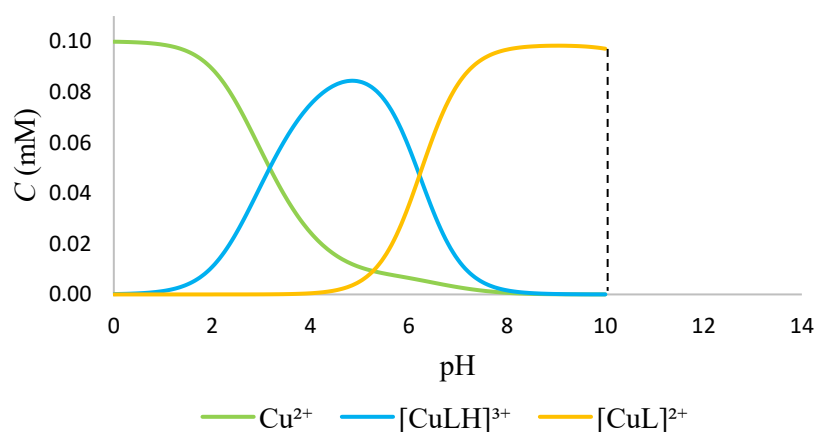


Figura 5.29 Diagramma di distribuzione del sistema Cu^{2+} -TACN-Bu.

5.5 Complessi di Cu^+ mediante voltammetria ciclica

Data l'instabilità di Cu^+ in soluzione acquosa, i suoi complessi con NO_3S sono stati studiati indirettamente utilizzando la voltammetria ciclica.

In seguito alla registrazione dei voltammogrammi ciclici del bianco che non hanno evidenziato la presenza di impurezze sono stati registrati quelli dei complessi del rame. (Figura 5.30).

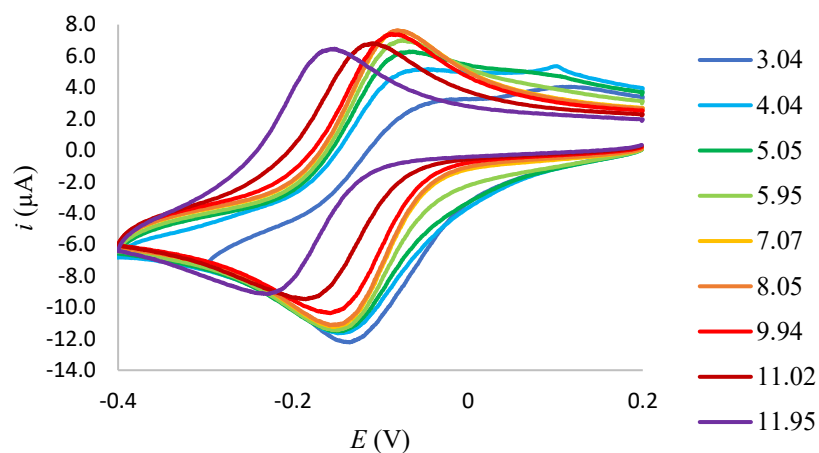
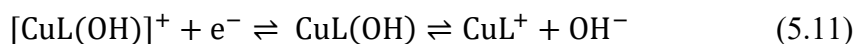


Figura 5.30 Voltammetrie cicliche di una soluzione acquosa contenente NaNO_3 0.15 M, Cu^{2+} e NO_3S ($C_M = 0.9853$ mM, $C_L = 1.2316$ mM) a diversi pH e a una velocità di scansione pari a 0.1 V/s.

I voltammogrammi ottenuti presentano due picchi assegnabili alla coppia redox $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$. Tale caratteristica è molto rilevante perché suggerisce sia l'assenza della reazione di demetallazione, sia la capacità del legante di stabilizzare entrambi gli stati d'ossidazione del metallo ai pH indagati. Inoltre, i risultati sperimentali evidenziano una variazione dei voltammogrammi in funzione del pH. In particolare, a pH minori di 4 si osserva la progressiva scomparsa dei picchi sia in riduzione che in ossidazione dovuta, probabilmente, all'instabilità del complesso con il conseguente rilascio di rame libero in soluzione. Nell'intervallo di pH compreso tra 4 e 9, invece, i potenziali del picco catodico e di quello anodico risultano indipendenti dal pH. Da questa proprietà è possibile dedurre che sia per Cu^{2+} che per Cu^+ è presente un unico

complesso. Per Cu^{2+} , come visto, la specie presente è $[\text{CuL}^{2+}]$, mentre per Cu^+ si può ipotizzare che sia $[\text{CuL}^+]$ in accordo a quello che è il comportamento di Ag^+ , ione chimicamente simile a Cu^+ . Se, d'altra parte, Cu^+ formasse complessi differenti, tali da prevedere la liberazione o il consumo di protoni durante la reazione redox, questo dovrebbe tradursi in una dipendenza dei voltammogrammi dal pH, che non è stata osservata. L'ipotesi che Cu^+ formi la specie CuL^+ è quindi plausibile.

Per pH superiori a 9 si osserva una modifica dei voltammogrammi col pH, ed uno spostamento dei potenziali di picco verso valori più negativi. Tale comportamento è spiegabile considerando che, a tali pH, Cu^{2+} forma con NO_3S il complesso $[\text{CuL}(\text{OH})]^+$. Se Cu^+ continua a formare il complesso $[\text{CuL}^+]$ anche a tali pH, la reazione redox sarebbe la (5.11), e quindi il suo potenziale standard redox sarebbe effettivamente dipendente dal pH in maniera coerente col dato sperimentale.



In prospettiva, si proveranno a condurre degli esperimenti di elettrolisi di soluzioni contenenti Cu^{2+} e NO_3S , in modo da isolare i complessi di Cu^+ per poterli studiare con altre tecniche (ad esempio NMR), ed ottenere così ulteriori indizi sulla stechiometria del complesso (o dei complessi) che Cu^+ forma.

La costante di stabilità del complesso CuL^+ è stata determinata utilizzando il ciclo termodinamico riportato nel **Paragrafo 3.4.4**. Dall'equazione 3.26 è stata determinata la costante di formazione del complesso CuL^+ il cui logaritmo è pari a 18.364. Analizzando la differenza tra il valore delle costanti β_{II} e β_{I} (costanti di formazione rispettivamente dei complessi $\text{Cu}^{2+}\text{-L}$ e $\text{Cu}^+\text{-L}$) si constata che essa è minima. Questo è spiegabile con il fatto che NO_3S presenta sia atomi di zolfo che atomi di azoto in grado di stabilizzare entrambi gli stati d'ossidazione del rame. È infatti ragionevole supporre che si verifichi un cambiamento dei gruppi coordinanti passando da Cu^+ a Cu^{2+} , in quanto il primo predilige atomi *soft* come lo zolfo, mentre il secondo atomi *borderline* come l'azoto.

La determinazione della costante di formazione del complesso ha permesso di tracciare il diagramma di distribuzione per il sistema $\text{Cu}^+\text{-NO}_3\text{S}$ (**Figura 5.31**).

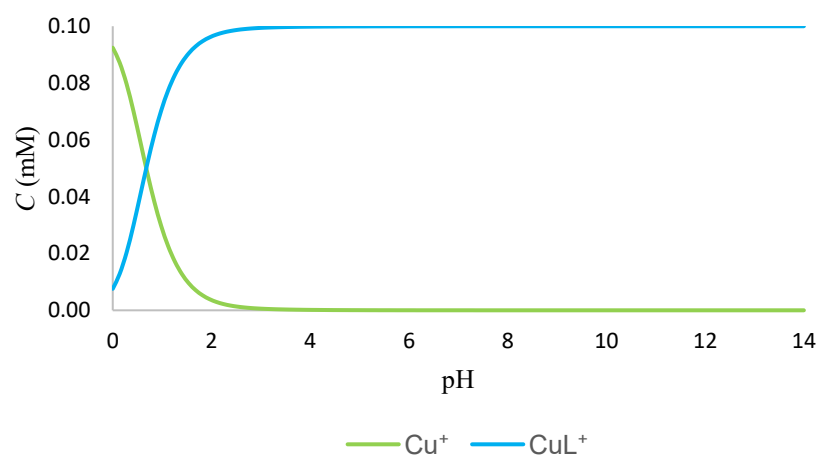


Figura 2.31 Diagramma di distribuzione per una soluzione contenente Cu^+ ed NO_3S ($C_{Cu^+} = C_{NO_3S} = 0.1$ mM).

Un altro dato ottenibile dallo studio voltammetrico riguarda il valore di $E_{1/2}$ (-0.118 V) determinato a pH fisiologico per la coppia CuL^{2+}/CuL^+ . Se si confronta questo valore con quello del potenziale di riduzione dei bioriducanti comunemente presenti in vivo (-0.159 V), si osserva che Cu^{2+} - NO_3S è incline ad una riduzione *in vivo* ($E_{1/2}$ presenta un valore più positivo rispetto al potenziale dei bioriducanti). [78] Tuttavia, la demetallazione dal complesso di Cu^+ risultante può essere impedita dall'elevata stabilità del complesso CuL^+ .

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Lo sviluppo di radiofarmaci *metal-based* richiede l'ideazione di chelanti che formino con il radiometallo complessi termodinamicamente stabili e cineticamente inerti. Il presente lavoro di tesi si colloca in questo ambito, e il suo obiettivo è stato quello di condurre uno studio termodinamico della formazione di complessi tra l'1,4,7-tris[2-(metilsulfanil)etil]-1,4,7-triazaciclononano (NO3S) e ioni Ag^+ , Cu^{2+} e Cu^+ , questi ultimi scelti poiché rappresentativi dei radionuclidi d'interesse per la medicina nucleare argento-111, rame-64 e rame-67.

Il legante e i suoi complessi sono stati analizzati impiegando diverse tecniche quali la potenziometria, la spettroscopia NMR, la spettrofotometria UV-vis e la voltammetria. Tali misure sono funzionali alla determinazione delle costanti di complessamento, parametri necessari alla comprensione della stabilità dei diversi complessi. Queste costanti non possono essere confrontate direttamente con quelle di altri leganti, in quanto non considerano né le diverse costanti di acidità dei chelanti, né le differenti stechiometrie dei complessi. Pertanto, al fine di poter eseguire il confronto tra i dati ottenuti e quelli riportati in altri lavori, a partire dalle costanti di complessamento globali è stato calcolato il pM, parametro che esprime la concentrazione di metallo libero a un determinato pH. Maggiore è il valore del pM, più alta è la stabilità dei complessi metallo-legante. Per convenzione, in ambito radiofarmaceutico, questo parametro viene calcolato a pH fisiologico (ovvero a pH pari a 7.4) e a concentrazioni di metallo e legante rispettivamente pari a 10^{-6} M e 10^{-5} M. In questa sede il confronto viene fatto tra il NO3S e gli altri chelanti solforati finora studiati ed elencati nel **Capitolo 2**.

Nel caso dell'argento il confronto tra i pM evidenzia che il NO3S non sia il legante ottimale poiché non forma con tale metallo i complessi più stabili (**Figura 6.1**). Per esso, infatti, si determina un valore di pAg^+ pari a 9.1, inferiore a quello di tutti gli altri composti simili finora studiati.

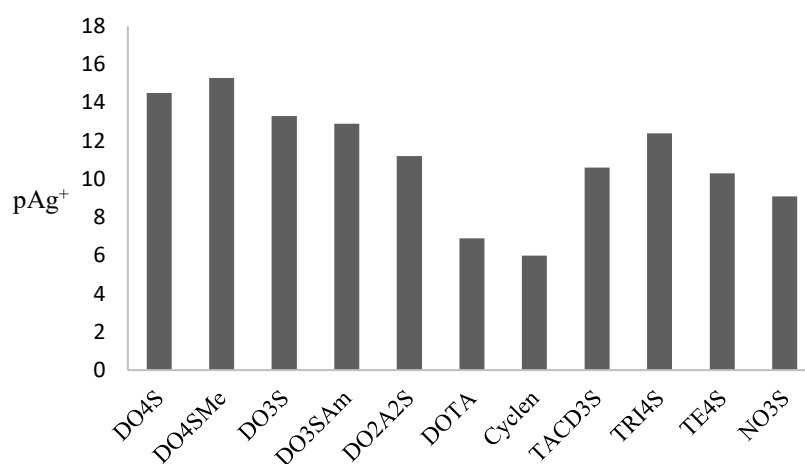


Figura 6.1 Confronto dei valori di pAg^+ dei diversi leganti a $pH\ 7.4$ ($C_M = 10^{-6}\ M$, $C_L = 10^{-5}\ M$).

NO3S forma complessi più stabili con l'argento solo rispetto al DOTA (acido 1,4,7,10-tetraazociclododecano-1,4,7,10-tetracetico) e al Cyclen. Per essi, infatti, la mancanza delle catene solforate causa una minor stabilità nei complessi che evidenzia l'importanza del contributo degli atomi di zolfo nell'interazione con il metallo.

Un altro aspetto interessante si evidenzia effettuando il confronto con TACD3S, caratterizzato da un anello più grande rispetto al NO3S, ma a parità di atomi di azoto e zolfo (tre per ciascuno). Si osserva che TACD3S presenta un valore del pM più elevato; ciò suggerisce che dimensioni maggiori dell'anello siano preferibili, probabilmente perché consentono di ospitare meglio al proprio interno lo ione argento. Sulla base dei dati ottenuti è quindi possibile dedurre che per i complessi d'argento la stabilità è condizionata sia dalla dimensione dell'anello sia del numero di atomi donatori presenti: la stabilità è migliore per dimensioni dell'anello pari a quelle del cyclen e in presenza di quattro atomi di azoto e di zolfo.

Per quanto riguarda i complessi di Cu^{2+} il valore del pM per NO3S è pari a 14.3. Anche in questo caso il confronto con gli altri leganti simili finora studiati evidenzia come NO3S formi anche con Cu^{2+} dei complessi che sono tra i meno stabili tra quelli formati dai vari chelanti solforati (**Figura 6.2**).

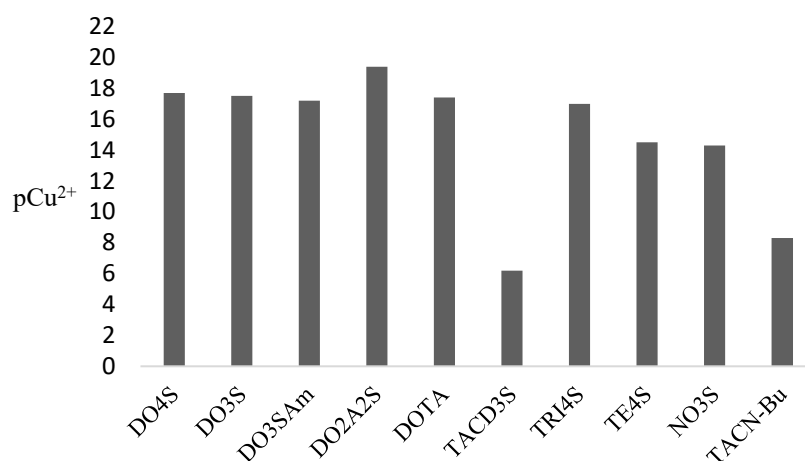


Figura 6.2 Confronto dei valori di pCu^{2+} dei diversi leganti a pH 7.4 ($C_M=10^{-6} M$ $C_L=10^{-5} M$).

A differenza dell'argento, tuttavia, la minore stabilità rispetto agli altri composti è meno marcata. Ad esempio, se si considera DO4S come metro di paragone, per Ag^+ la differenza è di oltre cinque ordini di grandezza, mentre per Cu^{2+} è di tre ordini. Inoltre, con Cu^{2+} il NO3S è un chelante molto migliore di TACD3S, in quanto forma complessi che sono otto ordini di grandezza più stabili. Ciò suggerisce che diminuendo la dimensione dell'anello si incrementa la stabilità del complesso. Probabilmente questo fenomeno è dovuto al fatto che lo ione Cu^{2+} , essendo più piccolo rispetto ad Ag^+ , viene accomodato meglio all'interno di un anello a sua volta di dimensioni più ridotte.

Come già accennato nel **Capitolo 5**, inoltre, il confronto tra i pM di NO3S e TACN-Bu evidenzia come il primo legante formi complessi aventi una stabilità di sei ordini di grandezza maggiore. Questa rappresenta una prova che gli atomi di zolfo dovrebbero interagire in maniera efficace con il metallo. Il confronto già citato con DO4S e coi suoi derivati dimostra comunque che anche Cu^{2+} predilige il cyclen come *backbone* in composti solforati.

Infine sono stati considerati anche i complessi di Cu^+ in virtù della loro possibile importanza nei processi di bioriduzione a partire dai complessi di Cu^{2+} . Mediante studi voltammetrici è stata confermata la capacità di NO3S di coordinare il Cu^+ ed è stato calcolato il valore di pCu^+ a pH fisiologico, che è risultato pari a 14.0. Confrontando questo valore con quelli ottenuti in studi precedenti (**Figura 6.3**) si osserva ancora una volta come NO3S non formi i complessi più stabili tra i composti esaminati, anche se la differenza di stabilità non è eccessiva (circa 3 ordini di grandezza rispetto al DO4S, in accordo col corrispondente dato per Cu^{2+}).

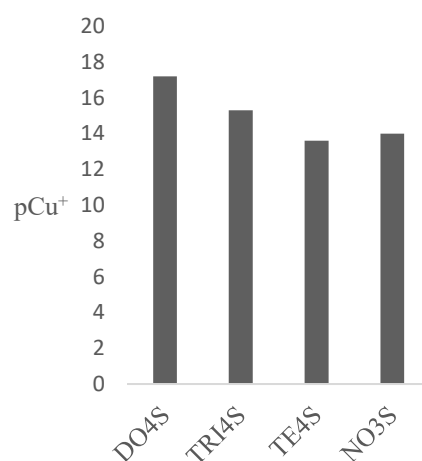


Figura 3.3 Confronto dei valori di pCu^+ dei diversi leganti a pH 7.4 ($C_M=10^{-6} M$ $C_L=10^{-5} M$).

I dati ottenuti dimostrano come anche per tale ione la stabilità del complesso è influenzata sia dalla dimensione dell'anello, sia dal numero di atomi donatori presenti, analogamente a quello che si verifica per i complessi di Cu^{2+} .

In prospettiva, come si è accennato nel **Capitolo 5**, i sistemi studiati necessitano di alcune misure ulteriori prima di poterli considerare conclusi. Si studierà quindi la cinetica di formazione tra Cu^{2+} e NO3S per valutare la natura inusuale osservata ad alcuni pH per la reazione, e si condurranno delle elettrolisi dei complessi di Cu^{2+} per ottenere i complessi di Cu^+ e poterli studiare in particolare via NMR. I risultati ottenuti mostrano comunque che il legante NO3S è di per sé meno adatto ad applicazioni in medicina nucleare rispetto ad altri leganti simili finora studiati, in quanto, perlomeno da un punto di vista termodinamico nei confronti di argento e rame, non presenta le caratteristiche migliori. Lo studio condotto con NO3S è stato comunque utile per poter definire quali sono i chelanti solforati più promettenti, che sulla base dei dati mostrati nelle figure precedenti risultano essere DO4S per Ag^+ e Cu^+ , e DO2A2S per Cu^{2+} . Su questi chelanti sono state programmate delle misure radiochimiche ed *in vivo*.

APPENDICE 1

Calcolo delle costanti di complessamento globale del sistema Cu^{2+} -TACN-Bu

Le costanti sono state ottenute mediante spettrofotometria UV-vis. (**Paragrafo 5.4.4.2**) Ai fini dell'elaborazione sono stati considerati i seguenti equilibri con le loro costanti:



Il sistema dei bilanci di massa è quindi:

$$\begin{cases} C_M = [\text{Cu}] + [\text{CuL}] + [\text{CuLH}] \\ C_L = [\text{HL}] + [\text{H}_2\text{L}] + [\text{ML}] + [\text{MLH}] \end{cases}$$

Le misure sperimentali permettono di valutare l'andamento dell'assorbanza in funzione del pH. Poiché l'assorbanza è una grandezza additiva e le uniche specie che assorbono a 296 nm sono quelle di $[\text{CuLH}]^{3+}$ e $[\text{CuL}]^{2+}$, quella rilevata sperimentalmente può essere espressa come:

$$A(296\text{nm}) = A_{\text{ML}} + A_{\text{MLH}} = \varepsilon_{\text{MLH}} \cdot C_{\text{MLH}} + \varepsilon_{\text{ML}} \cdot C_{\text{ML}}$$

in cui il cammino ottico viene omissso in quanto unitario (1 cm), e gli indici ML MLH rappresentano rispettivamente i complessi $[\text{CuL}]^{2+}$ e $[\text{CuLH}]^{3+}$.

Per facilitare i calcoli si definiscono alcuni parametri:

$$[\text{H}] = h$$

$$[\text{ML}] = x$$

$$[\text{MLH}] = y$$

Riarrangiando le formule e adottando le opportune sostituzioni è possibile ottenere le seguenti espressioni:

$$K = \frac{x \cdot h}{y}$$

$$\beta_1 = \frac{y \left(1 + \frac{h}{K_a}\right)}{\left(C_M - \frac{Ky}{h} - y\right)^2}$$

Il cui sviluppo porta a:

$$\beta_1 C_M^2 + \beta_1 \frac{K^2 y^2}{h^2} + \beta_1 y^2 - 2\beta_1 C_M K \frac{y}{h} - 2\beta_1 C_M y + 2\beta_1 \frac{Ky^2}{h} - y - \frac{yh}{K_a} = 0$$

Utilizzando la formula di risoluzione dell'equazioni di secondo grado, scrivendo la x in funzione della y è possibile scrivere l'equazione dell'assorbanza come:

$$A(296 \text{ nm}) = \varepsilon_{MLH} \cdot y + \varepsilon_{ML} \cdot x = \varepsilon_{MLH} \cdot \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} + \varepsilon_{ML} \cdot \frac{K}{h} \cdot \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

Dove

- $a = \beta_1 \cdot \frac{K^2}{h^2} + \beta_1 + \frac{2\beta_1 K}{h}$
- $b = 2C_M \beta_1 \frac{K}{h} - 2\beta_1 C_M - 1 - \frac{h}{K_a}$
- $c = \beta_1 C_M^2$

Conoscendo il valore della pK_a (pari a 5.028), delle concentrazioni di metallo e legante ($C_M = C_L = 0.1 \text{ mM}$) e disponendo dei dati sperimentali è possibile eseguire il *fitting* ottimizzando K , β_1 , ε_{MLH} e ε_{ML} . Il *fitting* ottenuto è mostrato in **Figura A.1**.

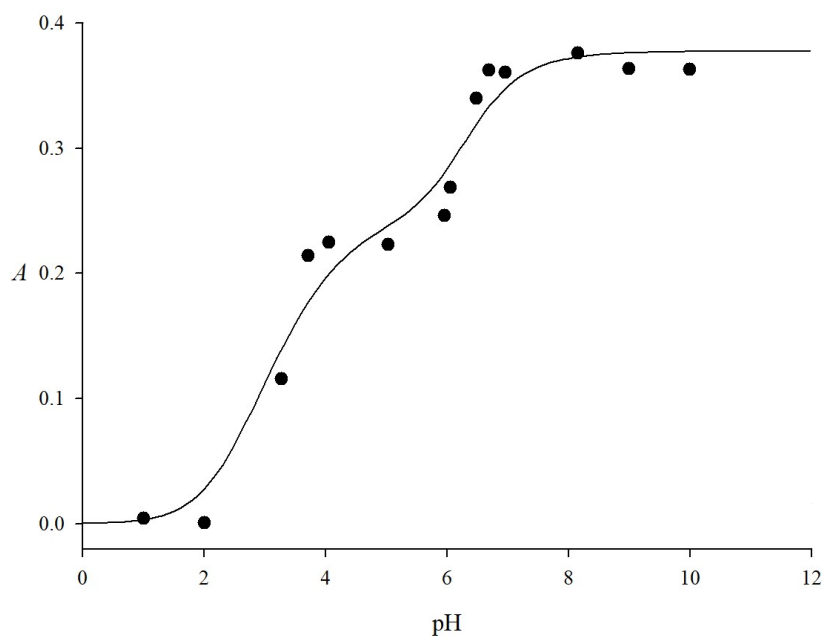


Figura A.1 Andamento dell'assorbanza a 296 nm in funzione del pH e relativa curva di fitting per il sistema Cu^{2+} -TACN-Bu. ($C_L = C_M = 0.1 \text{ mM}$).

BIBLIOGRAFIA

- [1] Frey K.A., Royal H.D., Di Carli M.F., Dillehay GL, Gordon L, Mankoff DA, O'Malley J., Ramanna L., Rohren E., Segall G.M., Shulkin B.L., Wallis J.W., Ziessman H.A.; *J. Nucl Med.*; **2011**, 52 (6), 994–997.
- [2] Neves M., Kling A., Oliveira A.; *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **2015**, 266 (3), 377–384.
- [3] Lewis J.S., Windhorst A.D., Zeglis B.M., *Radiopharmaceutical Chemistry*. Springer, **2019**.
- [4] Glasser O., *Wilhelm Conrad Rontgen and the Early History of the Roentgen Rays*, Norman Publishing, **1993**.
- [5] Giroud F., *Marie Curie: Il primo Nobel di nome donna*, Rizzoli, **1982**.
- [6] Vértés A., Nagy S., Klencsar Z., Lovas R.G., Rosch F., *Handbook of Nuclear Chemistry*, Second Edi. Springer, **2011**.
- [7] Van Grieken R., De Bruin M., *Nomenclature for radioanalytical chemistry*, **1994**, 66 (12), 2513–2526.
- [8] Bailey D.L., Humm J.L., Todd-Pokropek A., Van Aswegen A.; *Nuclear Medicine Physics: A Handbook for Teachers and Students. International Atomic Energy Agency*, Vienna, **2014**.
- [9] Lieser K.H., *Nuclear and Radiochemistry: fundamental and application*, Wiley, **2008**.
- [10] Kocher, D C. *Radioactive decay data tables*. United States: N. p., **1981**.
- [11] Ku A., Facca V.J.; Cai Z., Reilly R.M., *EJNMMI Radiopharmaceutical and Chemistry*, **2019**, 27 (4), 1-36.
- [12] Kostelnik T.I., Orvig C.; *Chem. Rev.*, **2019**, 119 (2), 902–956.
- [13] Boros E., Marquez B. V., Ikotun O.F., Lapi S.E., Ferreira C.L.; *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, pp 47–79, **2014**.
- [14] Strosberg J., El-Haddad G., Wolin E., Hendifar A., Yao J., Chasen B., Mitra E., Kunz P.L., Kulke M.H., Jacene H., Bushnell D., O'Dorisio T. M., Baum R.P., Kulkarni H.R., Caplin M., Lebtahi R., Hobday T., Delpassand E., Van Cutsem E., Benson A., Srirajaskanthan R., Pavel M., Mora J., Berlin J., Grande E., Reed N.,

- Seregni E., Öberg K., Lopera Sierra M., Santoro P., Thevenet T., Erion J.L., Ruzsniowski P., Kwekkeboom D., Krenning E.; *New England Journal of Medicine*, **2017**, 376, 125-136.
- [15] Nikitaki Z., Nikolov V., Mavragani I.V., Mladenovb E., Mangelisa A., Laskaratoua D.A., Fragkoulisa G.I., Hellwegc C.E., Martind O.A., Emfietzogloug D., Hatzih V.I., Terzoudih G.I., Iliakisb G., Georgakilas A.G.; *Free Radical Resarch*, **2016**, 50, 64-78.
- [16] Okoye N.C., Baumeister J.E., Najafi Khosroshahi F., Hennkens H.M., Jurisson, S.S.; *Radiochimica Acta*, **2019**, 107 (9-11), 1087-1120.
- [17] Chen J., Cheng Z., Hoffman T.J., Jurisson S.S., Quinn T.P; *Cancer Resarch*, **2000**, 60, 5649-5658.
- [18] Garcia Borge M.J., *Nuclear Physics for Medicine*, **2014**, 24 (2), 3-4.
- [19] Wagner J.G.; *Pharraac. Ther.*, **1981**, 12, 537-562.
- [20] Prince E.W., Orvig C.; *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 260-290.
- [21] Price E.W., Orvig C.; *The Chemistry of Molecular Imaging*, Wiley, **2015**
- [22] Bruke B.P., Seemann J., Archibald S.J., *Advances in Inorganic Chemistry*, **2016**, 68 (7), 301-339.
- [23] Nedrow J.R., Anderson C.J.; *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, **2011**, 1-11.
- [24] Boros E., Marquez B.V., IkotunO.F., Lapi S.E., Ferreira C.L.; *Ligand Design in Medicinal Inorganic Chemistry*, **2014**, 3, 47-79.
- [25] Ramogida C.F., Orvig C.; *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 4720-4739.
- [26] Shukla S., Mishra A.P., *Journal of Chemistry*, **2013**, 2013, 1-6.
- [27] Srivastava S.C., Mausner L.F.; *Therapeutic Nuclear Medicine*, **2013**, 11-50.
- [28] Volkert W.A., Goekeler W.F., Ehrhardt G.J., Ketring A.R.; *Journal of Nuclear Medicine*, **1991**, 32, 174-185.
- [29] Haberkorn U., Giesel F., Morgenstern F., Kratochwil C.; *The Journal of Nuclear Medicine*, **2017**, 58 (7), 1017-1018.
- [30] Rösch F., Herzog H., Qaim S.M.; *Pharmaceutical*, **2017**, 10, 56.
- [31] Carbo-Bague I., Ramogida C F; *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, **2011**, 1-34.

- [32] Krijger G.C., Ponsard B., Harfensteller M., Wolterbeek H.T., Nijssen J.W.F.; *Trends in Biotechnology*, **2013**, 31 (7), 390-396.
- [33] De Goeij J., Bonardi M.; *J Radioanal Nucl Chem.*, **2005**, 263, 13–18.
- [34] Ballan M., Vettorato E., Morselli L., Tosato M., Nardella S., Borgna F., Corradetti S., Monetti A., Lunardon M., Zenoni A., Di Marco V., Realdon N., Andrighetto A.; *Applied Radiation and Isotopes*, **2021**, 175, 1-12.
- [35] Andrighetto A., Corradetti S., Ballan M., Borgna F., Manzolaro M., Scarpa D., Prete G.; *Il nuovo cimento*, **2015**, 38 (6), 1-4.
- [36] Ballan M., Tosato M., Verona M., Caeran M., Borgna F., Vettorato E., Di Marco V.... & Andrighetto A.; *Applied Radiation and Isotopes*, **2020**, 164, 1-11.
- [37] Pretea G., Andrighetto A., Manzolaro M., Corradetti S., Scarpa D., Rossignoli M., Monetti A., Lollo M., Calderolla M., Vasquez J., Zanella S.; *EPJ Web of Conferences*, **2014**, 66, 11030.
- [38] Andrighetto A., Tosato M., Ballan M., Corradetti S., Borgna F., Di Marco V., Marzaro G., Realdon N.; *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **2019**, 322 (1), 73-77.
- [39] Borgna F., Ballan M., Favaretto C., Verona M., Tosato M., Caeran M., Corradetti S., Andrighetto A., Di Marco V., Marzaro G., Realdon N.; *Molecules*, **2018**, 23 (10), 2437.
- [40] Borgna F., Ballan M., Corradetti S., Vettorato E., Monetti A., Rossignoli M., Manzolaro M., Scarpa D., Mazzia U., Realdon N., Andrighetto A.; *Applied Radiation and Isotopes*, **2017**, 127, 214-226.
- [41] Hermanne A., Takács S., Tárkányi F., Bolbos R.; *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, **2004**, B 217, 193–201.
- [42] Alberto R., Angst D., Nef W., Iftimia M., Hasler P., Kaden T.A., Butz T., Troger W., Ctortocka B.; *Development of macrocyclic thio crowns and cages for the in vivo stabilisation of Ag-111*, **1997**.
- [43] Chattopadhyay S., Vimalnath K.V., Saha S., Korde A., Sarma H.D., Pal S., Das M.K.; *Applied Radiation and Isotopes*, **2008**, 66 (3), 334-339.
- [44] Mastren T., Radchenko V., Engle J.W., Weidner J.W., Owens A., Wyant L.E., Copping R., Brugh M., Nortier F.M., Birnbaum E.R., John K.D., Fassbender M.E.; *Analytica chimica acta*, **2018**, 998, 75-82.

- [45] Tosato M., Nardella S., Badocco D., Pastore P., Andrighetto A., Realdon N., Di Marco V.; *Applied Radiation and Isotopes*, **2020**, *164*, 109263.
- [46] Tosato M., Asti M., Dalla Tiezza M., Orian L., Häussinger D., Vogel R., Koster U., Jensen M., Andrighetto A., Pastore P., Di Marco V.; *Inorganic chemistry*, **2020**, *59* (15), 10907-10919.
- [47] Spiess P.B., Arnaud-Neu, Schwing Weill M.J.; *Helv. Chim. Acta*, **1980**, *63* (8), 2287-2294.
- [48] Alberto R., Nef W., Smith A., Kaden T.A., Neuburger M., Zehnder M., Frey A., Abram U., Schubiger, P.A.; *Inorganic chemistry*, **1996**, *35* (11), 3420-3427.
- [49] Craig A.S., Katakya R., Parker D., Adams H., Bailey N., Schneider H.; *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1989**, *24*, 1870-1872.
- [50] Riesen P.C., Kaden T.A.; *Helv. Chim. Acta*, **1995**, *78*, 1325-1333.
- [51] Williams H.A., Robinson S., Julyan P., Zweit J., Hastings D.; *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, **2005**, *32* (12), 1473-1480.
- [52] Müller C., van der Meulen N.P., Benešová M., Schibli R.; *Journal of Nuclear Medicine*, **2017**, *58* (Supplement 2), 91S-96S.
- [53] Abbas K., Kozempel J., Bonardi M., Groppi F., Alfarano A., Holzwarth U., Simonelli F., Hofman H., Horstmann W. Menapace E., Leseticky L., Gibson N.; *Applied radiation and isotopes*, **2006**, *64* (9), 1001-1005.
- [54] Anderson C.J., Ferdani R.; *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, **2009**, *24* (4), 379-393.
- [55] Stoll T., Kastleiner S., Shubin Y., Coenen H., Qaim, S.; *Radiochimica Acta*, **2002**, *90* (6), 309-313.
- [56] Smith N.A., Bowers D L., Ehst D.A.; *Applied Radiation and Isotopes*, **2012**, *70* (10), 2377-2383.
- [57] Tosato M., Dalla Tiezza M., May N.V., Isse A.A., Nardella S., Orian L., Verona M., Vaccarin C., Alker A., Macke H., Pastore P., Di Marco, V.; Radiopharmaceuticals. *Inorganic Chemistry*, **2021**, *60* (15), 11530-11547.
- [58] Sun X., Wuest M., Kovacs Z., Sherry D.A., Motekaitis R., Wang Z., Martell A.E., Welch M.J., Anderson, C.J.; *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **2003**, *8* (1), 217-225.

- [59] Boswell C.A., Sun X., Niu W., Weisman G.R., Wong E.H., Rheingold A.L., Anderson C.J.; *Journal of medicinal chemistry*, **2004**, 47 (6), 1465-1474.
- [60] Tosato M., Verona M., Doro R., Dalla Tiezza M., Orian L., Andrighetto A., Pastore P., Marzaro G, Di Marco, V.; *New Journal of Chemistry*, **2020**, 44 (20), 8337-8350.
- [61] Franchi S.; “*Studio della formazione di complessi di Ag(I) e Cd(II) con derivati solforati di poliazacicloalcani (progetto ISOLPHARM)*”, Tesi di Laurea, Università di Padova, **2021**
- [62] Di Marco V., “*Studio della formazione di complessi tra alluminio e molecole di interesse ambientale, biologico e farmaceutico*”, Tesi di dottorato, Università di Padova, **1998**
- [63] Atkins P., De Paula J., *Chimica Fisica*, quinta edizione, Zanichelli, **2012**
- [64] Abramovitz M., Stegun I.A.; *Handbook of mathematical functions*, New York, Dover, **1965**
- [65] Housecroft C.E., Sharpe A.G.; *Inorganic chemistry*, Fourth Edi. Pearson, **2012**
- [66] Kessler H., Gehrke M., Griesinger C.; *Angew. Chemie Int. Ed. English*, **1988**, 27 (4), 490–536.
- [67] Bunton C.A., Shiner V.J.J.; *J. Amer. Chem. Soc.*, **1961**, 83, 42–47.
- [68] Savelli F., Bruno O., Azzolina O., Boido A., Borassi A., Brullo C., Casapullo S., Collina S., Maffei Facino R., Mazzei M., Merello L., Orioli M., Pizza C., Raggio R., Tasso B.; *Analisi chimico-farmaceutica: elementi di analisi qualitativa e metodi applicati ai farmaci della European pharmacopoeia*, Piccin, **2005**
- [69] Elgrishi N., Rountree K.J., McCarthy, B.D., Rountree E.S.; Eisenhart T.T., Dempsey J.L.; *J. Chem. Educ.*, **2018**, 95, 197-206.
- [70] Kissinger P.T.; Heineman W.R.; *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60 (9), 704.
- [71] Bard A. J.; Faulkner L. R. *Electrochemicals Methods: Fundamentals and Applications*, seconda edizione, John Wiley and Sons, **2001**
- [72] Bianchi A., Micheloni M., Paoletti P.; *Coordination Chemistry Reviews*, **1991**, 110, 17-113.
- [73] Maccà C.; *CnS*, **1995**, 17, 86–88.
- [74] Butler J.N.; *Carbon dioxide equilibria and their applications*. Routledge, **2019**

- [75] Tosato M., Pelosato M., Franchi S., Isse A.A., May N., Zanoni G., Mancin F., Pastore P., Badocco D., Asti M., Di Marco, V; *New Journal of Chemistry*, **2022**
- [76] Fregona D.; “Chimica Bioinorganica”, Corso di laurea magistrale in Chimica, **2021**.
- [77] Dearling J.L., Voss S. D., Dunning P., Snay, E., Fahey F., Smith S.V., Huston J.S., Meares C.F., Treves S.T., Packard A.B.; *Nuclear Medicine and Biology*, **2011**, 38 (1), 29-38.
- [78] Sharma A.K., Schultz J.W., Prior J.T., Rath N. P., Mirica L. M.; *Inorg. Chem.*, **2017**, 56, 13811.