



Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

Caratterizzazione rilassometrica NMR multinucleare
di nuovi complessi di Cu(II) con AAZTA e suoi
derivati

Relatore: Prof. Mauro Botta

Correlatori: Prof. Fabio Carniato, Dott. Marco Ricci

Candidata: Gabriella Marchese

Anno accademico 2025/2026

Indice

Capitolo 1.	Il rame	1
1.1	Chimica di coordinazione del rame	1
1.2	Il ruolo del rame in ambito biologico	4
1.3	Complessi di rame in terapia medica	8
1.4	Complessi di rame in diagnostica medica	11
1.5	Bibliografia	13
Capitolo 2.	Agenti di contrasto per MRI: alternative al gadolinio	17
2.1	Problematiche correlate all'impiego del gadolinio	17
2.2	Manganese	20
2.3	Ferro	23
2.4	Rame	26
2.5	Bibliografia	29
Capitolo 3.	Tecniche utilizzate	33
3.1	Spettroscopia NMR	33
3.1.1	Rilassometria	33
3.1.1.1	Rilassometro a campo variabile	41
3.1.1.2	Rilassometro a ciclo di campo veloce	42
3.1.2	Metodo Evans	45
3.1.3	Spettroscopia ^{17}O NMR a temperatura variabile (^{17}O VT-NMR)	47
3.2	HPLC-MS	49
3.3	Spettroscopia UV-visibile	50
3.4	DLS	50
3.5	Potenziale zeta	51
3.6	Bibliografia	52
Capitolo 4.	Obiettivi del lavoro	55
4.1	Bibliografia	56

Capitolo 5.	Sistemi molecolari e nanoparticellari a base di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$	57
5.1	$[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$	57
5.1.1	Caratterizzazione del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$	59
5.2	CuAAZ3A-Glu	65
5.2.1	Caratterizzazione del complesso CuAA3A-Glu	67
5.3	Ch-CuAAZTA1	73
5.3.1	Caratterizzazione del Ch-CuAAZTA1	75
5.4	Ch-CuAAZTA1/2	77
5.4.1	Caratterizzazione del Ch-CuAAZTA1/2	78
5.5	Bibliografia	83
Capitolo 6.	Multimeri a base di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$	85
6.1	Caratterizzazione dei complessi $(\text{CuAAZ3A})_{\text{tren}}$, $(\text{CuAAZ3A})_2\text{tren}$ e $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$	90
6.2	Bibliografia	95
Capitolo 7.	Conclusioni	97

Capitolo 1. Il rame

1.1 Chimica di coordinazione del rame

Il rame, elemento con numero atomico 29 e massa atomica 63.546 u.m.a., è il penultimo metallo del primo periodo dei metalli di transizione. Presenta due isotopi stabili: il ^{63}Cu e il ^{65}Cu , con abbondanze rispettive di 69,174% e 30,826%. Gli altri isotopi del rame sono instabili e altamente radioattivi [1]. Come gli altri elementi del gruppo 11, a cui appartiene, presenta orbitali d completi (configurazione elettronica di valenza $3d^{10}4s^1$) ed è poco reattivo. Per questo, si trova in natura anche allo stato nativo, ma la maggior parte è ricavata da minerali, soprattutto dalla calcopirite, CuFeS_2 . Il rame presenta numeri di ossidazione +1, +2 e, più raramente, +3 e +4. Lo stato di ossidazione +2 è il più stabile, mentre il rame(I) ha una forte tendenza a disproporzionare, dando Cu^{2+} e Cu^0 [2].

Lo ione Cu^{2+} , che possiede configurazione elettronica d^9 , forma una grande varietà di complessi. Il rame(II) è un acido di Lewis, cioè è in grado di accettare coppie di elettroni da una base di Lewis. Secondo la teoria degli acidi e delle basi “hard” e “soft” introdotta da R.G. Pearson, il rame è un acido soft che assume caratteristiche borderline quando si trova sottoforma di ione Cu^{2+} , per questo è complessato da basi tendenzialmente soft, siano esse monodentate, lineari polidentate o macrocicliche. Può formare complessi con alogenuri, che includono $[\text{CuCl}_3]^-$, $[\text{CuCl}_4]^{2-}$ e $[\text{CuCl}_5]^{3-}$, specie che hanno geometria variabile, fortemente dipendente dai contro-ioni presenti. Ad esempio, $[\text{Ph}_4\text{P}][\text{CuCl}_3]$ allo stato solido contiene dei dimeri, mentre $\text{K}[\text{CuCl}_3]$ contiene catene di ottaedri distorti [3]. Cu^{2+} forma comunemente complessi contenenti N e O come atomi donatori, con numeri di coordinazione 4, 5 e 6. La geometria è ampiamente variabile: può essere ottaedrica, tetraedrica, planare quadrata, trigonale bipyramidale o piramidale a base quadrata [2].

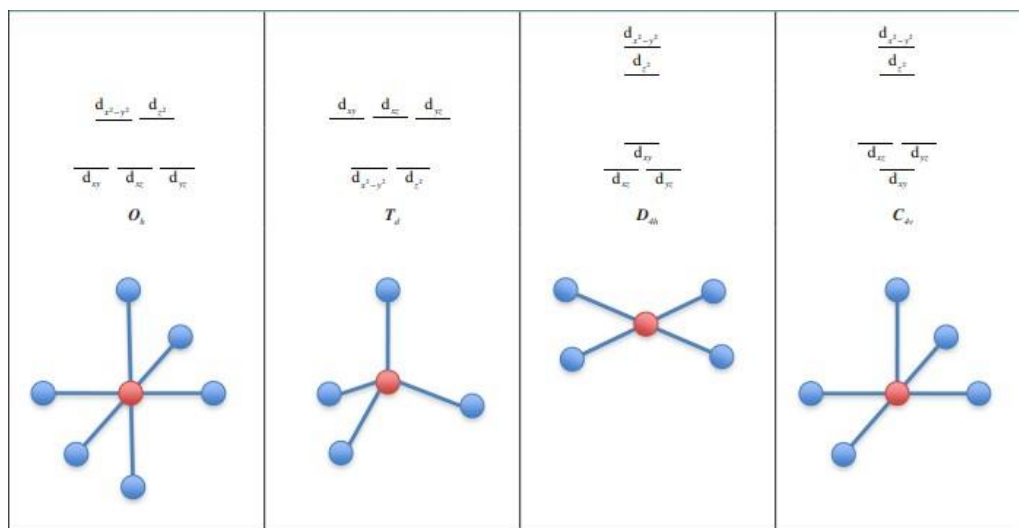
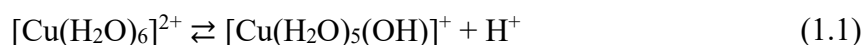


Figura 1.1 Geometrie di complessi di Cu(II) con modelli teorici e configurazioni elettroniche [4].

In soluzione acquosa avviene la formazione dell'acquoione esacoordinato $[\text{Cu}(\text{OH}_2)_6]^{2+}$. L'acquoione può successivamente dare dissociazione acida secondo la reazione:



Il valore della pK_a di questa reazione è 7.3. Intorno a $\text{pH} = 7$, la reazione di idrolisi continua, portando alla formazione dell'idrossido rameico $\text{Cu}(\text{OH})_2$, sale insolubile dal colore blu intenso. A valori di pH superiori a 12, quest'ultimo può essere nuovamente disciolto, a causa della formazione di diversi idrossocomplessi di Cu(II).

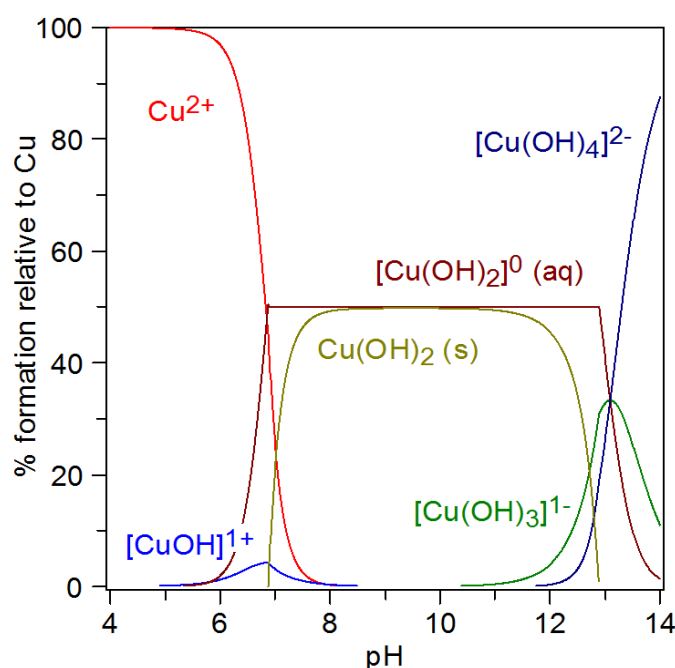


Figura 1.2 Distribuzione delle specie ioniche di Cu(II) in soluzione acquosa a differenti pH [5].

Nei complessi del Cu^{2+} si osserva sovente l'effetto di distorsione tetragonale o effetto Jahn-Teller: una molecola non lineare che possiede uno stato elettronico fondamentale degenere, ed è occupata asimmetricamente, subisce una distorsione geometrica al fine di stabilizzarsi e rimuovere la degenerazione. Un esempio di distorsione di Jahn-Teller si osserva nell'acquoione di rame (II): il composto è esaidrato con geometria ottaedrica, ma la distanza delle due molecole di H_2O assiali è maggiore di quella delle quattro molecole di H_2O equatoriali [6].

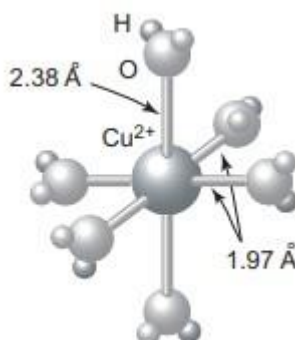


Figura 1.3 Distorsione di Jahn-Teller per $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ con distanze medie delle molecole coordinanti di H_2O [1].

In soluzione acquosa l'effetto Jahn-Teller è un effetto dinamico, cioè le distanze tra le molecole d'acqua e lo ione metallico variano nel tempo: l'asse di distorsione, in cui la distanza di legame Cu-O è maggiore, può essere uno qualsiasi dei tre assi di legame disponibili. Questo fenomeno, definito "inversione Jahn-Teller", possiede un tempo di semivita τ (il tempo che intercorre nell'inversione di due diversi assi di distorsione) di 1.6×10^{-11} s ed un'energia di attivazione di 5.0 kJ mol^{-1} a 298 K.

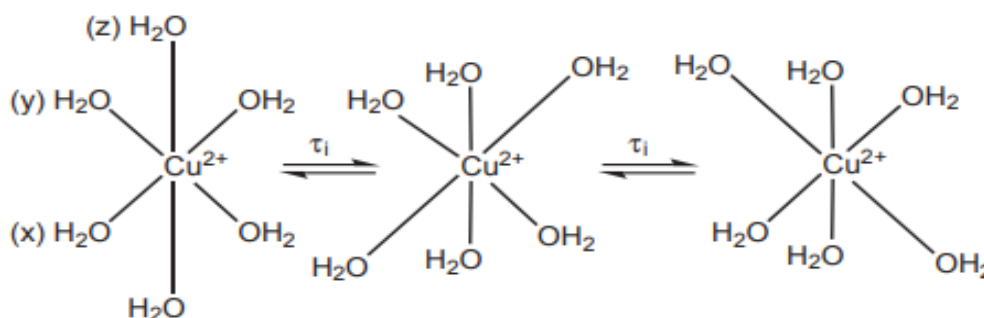


Figura 1.4 Effetto Jahn-Teller dinamico per l'acquoione di rame (II) [7].

La geometria molecolare dell'acquoione di rame(II) è ancora oggetto di studio. Secondo alcuni studi, il complesso ottaedrico potrebbe essere destabilizzato dall'effetto Jahn-Teller al

punto da perdere una delle molecole d'acqua di coordinazione: la distanza delle molecole di acqua sarebbe tale che una delle molecole assiali non riuscirebbe a coordinare il rame. Nella forma pentacoordinata, l'acquaione subirebbe una rapida interconversione tra una struttura piramidale a base quadrata e una bipyramide trigonale, senza una preferenza tra le due [8].

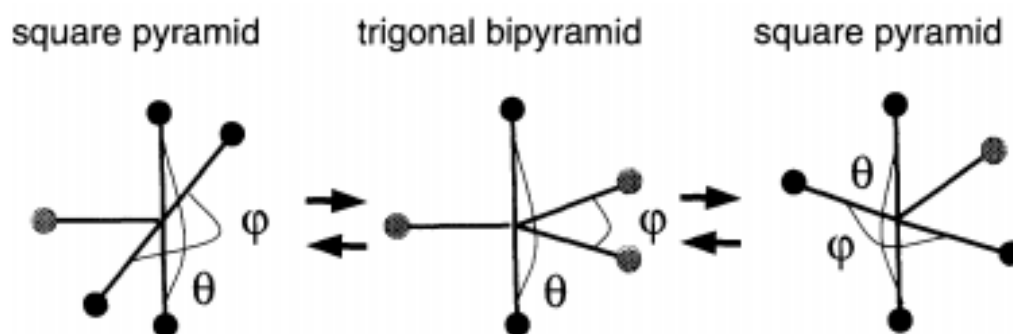


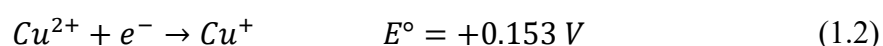
Figura 1.5 Struttura e interconversione del $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ [8].

Si pensa che anche la geometria planare quadrata, molto comune nei complessi di rame (II), possa essere considerata come una distorsione tetragonale di una geometria ottaedrica, in cui i due leganti assiali sono talmente distanti da non interagire direttamente con lo ione metallico.

1.2 Il ruolo del rame in ambito biologico

Il rame è un oligoelemento essenziale per gli organismi viventi. Prende parte a vari processi metabolici, tra cui la fosforilazione ossidativa, la detossificazione dei radicali liberi, la sintesi e denaturazione dei neurotrasmettitori, la sintesi del tessuto connettivo e il metabolismo del ferro. È presente nel corpo umano in quantità relativamente elevate (circa 110 mg di rame in un adulto di 70 kg) [9].

L'utilità biologica del rame è dovuta al basso potenziale di riduzione tra le specie rame(II) e rame(I):



dove E° è il potenziale di riduzione in soluzione acquosa, a 298.15 K, 1 atm e con tutte le specie ad una concentrazione di 1.000 mol/L [10]. Il basso potenziale redox consente al rame di passare facilmente da un numero di ossidazione all'altro, agendo da catalizzatore in reazioni di ossidoriduzione. Nell'uomo si trova, come cofattore, in un gran numero di enzimi, tra cui: la citocromo c ossidasi, l'ultimo enzima della catena respiratoria coinvolta

nella fosforilazione ossidativa; la superossido dismutasi, che catalizza l'inattivazione dei radicali superossido, proteggendo le cellule dall'ossidazione; la lisil ossidasi, essenziale per la formazione del collagene e delle fibre elastiche; diverse monoossigenasi che partecipano alla sintesi di ormoni. Svolge inoltre funzioni non enzimatiche nell'angiogenesi e nella mielinizzazione dei nervi e ha un ruolo essenziale nello sviluppo del cervello, nella riproduzione, nell'espressione dei geni e nella crescita [11].

La chimica di coordinazione del rame a livello biologico si basa principalmente su tre leganti, i residui istidina, cisteina e metionina. L'amminoacido istidina possiede un gruppo funzionale imidazolo, che contiene due atomi di azoto, entrambi protonabili, con pK_a di ≈ 6 e 14, valori che vengono modificati dall'ambiente della proteina e dalla coordinazione del metallo. La mancanza del primo protone rende la molecola neutra, mentre la mancanza del secondo genera un legante anionico. Con due atomi di azoto, l'imidazolo può legare due ioni contemporaneamente. La cisteina contiene un gruppo tiolico, il cui protone può essere rimosso ($pK_a \approx 8.5$) generando un legante anionico, che può legare due ioni metallici. La metionina, infine, contiene un gruppo tioetere, il cui atomo di zolfo si comporta da legante neutro. Quest'ultimo è un legante più idrofobo degli altri [12].

Lo ione Cu^+ è un acido soft, mentre Cu^{2+} è "borderline": per questo sono preferiti leganti contenenti atomi soft o "borderline", rispetto a leganti con gruppi idrossilici, carbossilici o amminici primari. I gruppi contenenti S hanno maggiore affinità per il rame nello stato di ossidazione I, mentre l'istidina è in grado di legarli efficacemente entrambi.

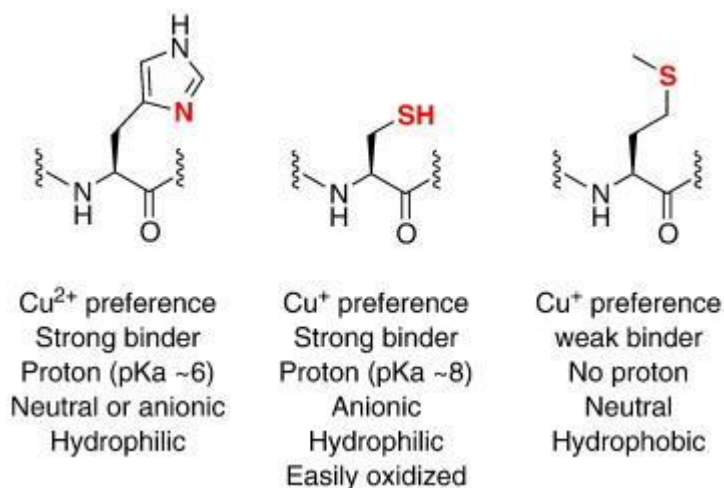


Figura 1.6 Residui di istidina, cisteina e metionina e loro proprietà chimiche [12].

Le proteine contenenti rame possono essere divise in due classi: gli enzimi che contengono il rame per svolgere una specifica funzione e le proteine che legano il rame per trasportarlo. Le prime legano il metallo in siti ad alta affinità e alto numero di coordinazione (4-5), per evitare la perdita del metallo durante il ciclo redox. Le seconde legano il metallo in modo più labile, o con siti a bassa affinità (e numero di coordinazione ≈ 4) o con minor numero di coordinazione (2-3), al fine di poterlo rilasciare. La sfera di coordinazione ha influenza anche sul potenziale redox della coppia $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$: in un caso è fondamentale che l'ossidazione sia favorita, nell'altro la proteina ha il ruolo di evitare il ciclo redox [12].

Nell'enzima Cu, Zn superossido dismutasi (Cu, Zn SOD) il rame è legato da quattro residui di istidina in una geometria planare quadrata distorta. Una delle direzioni assiali del Cu è accessibile al solvente [13]. Nell'enzima citocromo c ossidasi, il rame si trova in due centri, Cu_A e Cu_B . Cu_A è un centro binucleare, in cui due atomi di rame sono tenuti insieme da due residui di cisteina. Il primo è coordinato anche da un'istidina e da una metionina, mentre il secondo è coordinato da un'istidina e dall'ossigeno carbonilico di un residuo di glutammato; entrambi hanno un assetto tetraedrico. Nel centro Cu_B , invece, si trova un atomo di Cu legato da tre residui di istidina con geometria piramidale trigonale. Dalla parte opposta a quella in cui si trovano i tre leganti, il rame del Cu_B viene probabilmente usato come sito di legame per l'ossigeno coinvolto nel trasferimento elettronico [14]. Nelle ATPasi di tipo P, uno dei tipi di proteine deputate al trasporto del rame, il sito di legame è costituito da tre atomi di zolfo, due appartenenti a residui di cisteina e uno appartenente ad un residuo di metionina [15].

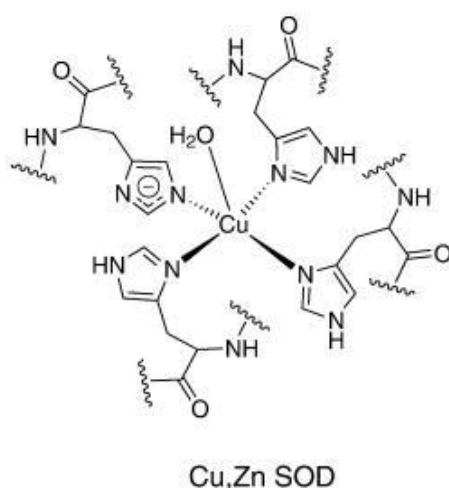


Figura 1.7 Struttura della sfera di coordinazione del rame nell'enzima Cu, Zn superossido dismutasi [12].

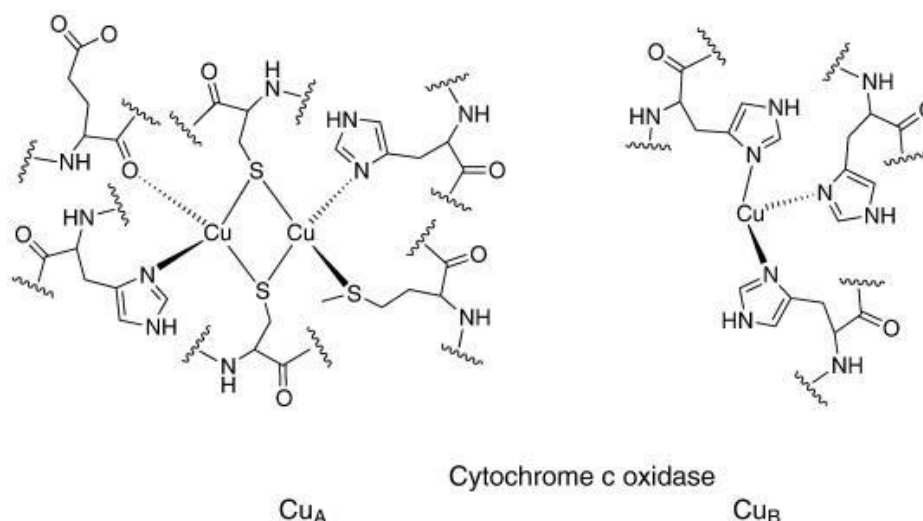


Figura 1.8 Struttura dei centri Cu_A e Cu_B nell'enzima citocromo c ossidasi [12].

Il rame viene assunto attraverso la dieta: si trova soprattutto nel cioccolato, nel fegato di animali, nei crostacei, nei molluschi, nelle verdure a foglia verde e nella frutta secca. Un'altra fonte di rame può essere l'acqua del rubinetto, a causa dell'utilizzo del rame nelle tubature [11]. Non si conosce con esattezza il fabbisogno di rame e l'organismo ha buone capacità di autoregolazione, ma le dosi di assunzione consigliate sono di 1.6 mg al giorno per un uomo adulto e di 1.3 mg al giorno per una donna adulta, mentre il limite da non superare è stato fissato a 5 mg al giorno [16].

I meccanismi del trasporto e dell'omeostasi del rame non sono completamente noti. Viene assorbito principalmente nell'intestino tenue: viene pompato all'interno degli enterociti, le cellule epiteliali dell'intestino, grazie a proteine di membrana che svolgono il ruolo di trasportatori di cationi. Successivamente viene trasportato attraverso il citoplasma dalle metallotioneine, le quali svolgono un ruolo fondamentale nel proteggere la cellula dai danni ossidativi che il rame libero causerebbe. Si pensa che il rame passi dagli enterociti al circolo sanguigno grazie all'azione della proteina ATP7A. Quando gli ioni rame entrano nel sangue portale, che li conduce dall'intestino al fegato, vengono legati da proteine e, in misura minore, da amminoacidi, peptidi e acidi grassi. La proteina più importante nel trasporto del rame verso il fegato è l'albumina, grazie alla sequenza Asp-Ala(Thr)-His all'estremità ammino-terminale. Gli ioni Cu(II) legati all'albumina vengono ridotti dall'ascorbato a ioni Cu(I), ma sono riossidati dall'ossigeno molecolare presente nel sangue e arrivano al fegato come Cu(II). Sulla membrana degli epatociti, Cu²⁺ è nuovamente ridotto a Cu⁺: questo abbassa la stabilità dei complessi, liberando il rame e consentendo il suo ingresso nelle cellule. Il metallo viene legato dagli chaperoni e può essere inserito negli enzimi che lo

richiedono come cofattore. Il rame in eccesso viene espulso grazie ad un'altra ATPasi, l'ATP7B. Si ritiene che il principale trasportatore del rame verso i tessuti periferici sia la ceruloplasmina. Nell'apparato di Golgi delle cellule epatiche il rame viene legato alla ceruloplasmina sotto forma di Cu(II) e il complesso così formato viene inserito in vescicole che attraversando la membrana lo rilasciano nel sangue [11].

L'omeostasi del rame nel corpo umano è governata dalle due proteine ATP7A e ATP7B. L'ATP7A trasporta il rame nel trans-Golgi network per l'incorporazione del metallo negli enzimi e media la fuoriuscita del rame dalle cellule. L'ATP7B ha funzioni simili e si trova principalmente nel fegato, dove si occupa sia dell'espulsione del rame tramite la ceruloplasmina, sia dell'escrezione nella bile del rame in eccesso (che viene poi espulso principalmente attraverso le feci). La carenza di una di queste proteine causa gravi problemi all'organismo. La malattia di Wilson consiste in un difetto al gene ATP7B, che ha come conseguenze accumulo del rame nei tessuti, danni ossidativi causati dal rame, epatociti rigonfi, epatite e, infine, cirrosi. Si osservano anche gravi conseguenze sul sistema nervoso, ma la malattia di Wilson, se diagnosticata in tempo, può essere trattata, per mezzo di agenti chelanti, diete povere di rame e integrazione di zinco (il quale compete con il rame, riducendone l'assorbimento). La malattia di Menkes è invece collegata ad un difetto del gene ATP7A: in questo caso l'assorbimento e l'escrezione del Cu da parte del fegato non sono compromessi, ma l'assorbimento del rame nel tratto gastrointestinale è scarso, così come l'escrezione e i movimenti intracellulari nei tessuti periferici. Lo scarso assorbimento del rame da parte dell'organismo porta ad una carenza nel sistema nervoso, che si riflette in danni cerebrali e morte durante l'infanzia [17].

1.3 Complessi di rame in terapia medica

Tra gli agenti chelanti usati come farmaci contro la malattia di Wilson ci sono la penicillamina, la trietilenetetrammina e il tetratiomolibdato [11]. La penicillamina si trova, nel range di pH 6.0-7.4 (dal pH intestinale al pH del plasma umano), prevalentemente nella forma zwitterionica $\text{CH}_2\text{SH}-\text{CHNH}_3^+-\text{COO}^-$. La chelazione del rame in eccesso avviene grazie alla reazione mostrata nella figura 1.10, che porta alla formazione di un complesso rosso-violetto a valenza mista [18].

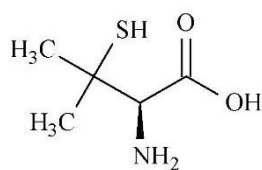


Figura 1.9 Struttura della penicillamina.

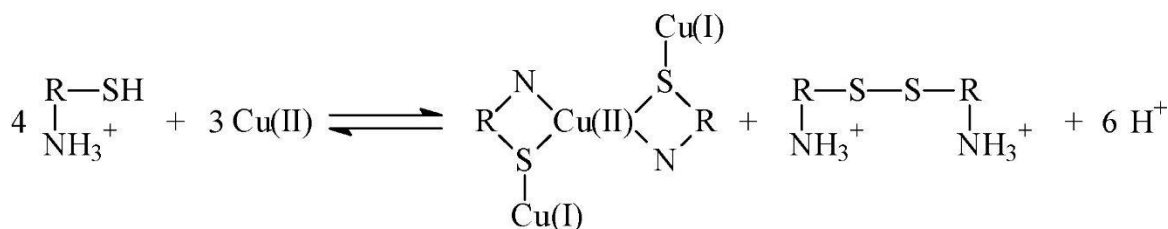


Figura 1.10 Reazione della penicillamina con il rame.

La trietilenetetrammina dicloridrato, nota anche come trientina o trien, fu introdotta per trattare i pazienti intolleranti alla penicillamina. Si tratta di un forte chelante per il Cu^{2+} ; lega anche altri metalli presenti nel corpo umano, come Zn^{2+} e Fe^{2+} , ma con costanti di stabilità minori [19].

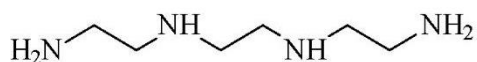


Figura 1.11 Struttura della trien.

Il terzo agente chelante, il tetratiomolibdato, fu introdotto per i pazienti intolleranti agli altri due farmaci. Forma complessi di rame misti con proteine, che vengono metabolizzati nel fegato ed escreti nella bile.

Esistono molti complessi di rame sintetici che possiedono attività biologica e hanno, quindi, potenziali applicazioni in medicina. Vari complessi di rame(II) sono riportati in letteratura come agenti antitumorali, in grado di ridurre le dimensioni del tumore e ritardare le metastasi. Alcuni esempi sono costituiti dai derivati del piridil-2-carbossamidrazone [20], figura 1.12, e dai complessi della 6-(3-clorobenzilammino)purina [21], figura 1.13. Altri complessi di Cu(II) , tra cui alcuni complessi con la ciprofloxacina [22], sono stati descritti come sostanze dall'azione antibatterica (figura 1.14).

Questi complessi contengono solitamente immine o leganti aromatici con N, S o O come atomi donatori. Non è chiaro quali siano i meccanismi attraverso cui si esplica la citotossicità di questi composti: secondo alcuni ricercatori agiscono tramite reazioni redox che generano specie reattive dell'ossigeno (ROS) in grado di danneggiare e distruggere le cellule [23], secondo altri operano interagendo con gli enzimi e portando all'arresto del ciclo cellulare e all'apoptosi (morte cellulare) [24].

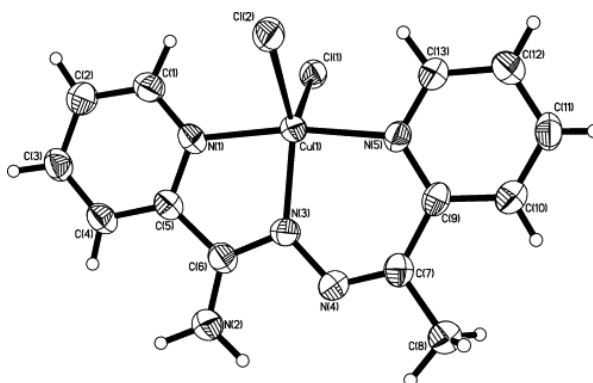


Figura 1.12 Struttura molecolare del complesso $[\text{Cu}(\text{apc})\text{Cl}_2]$ ricavata dalla diffrazione di raggi X [20];
apc=2-acetilpiridina-piridina-2-carbossamidrazone.

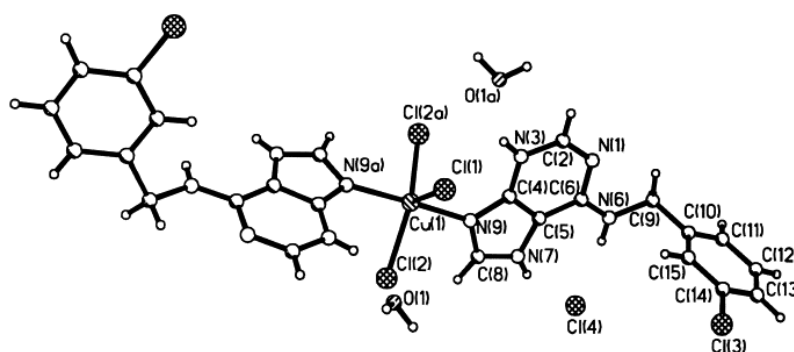


Figura 1.13 Struttura molecolare del complesso $[\text{Cu}(\text{H}^+\text{L}_2)_2\text{Cl}_3]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ricavata dalla diffrazione di raggi X [21]; HL_2 = 6-(3-clorobenzilammino)purina.

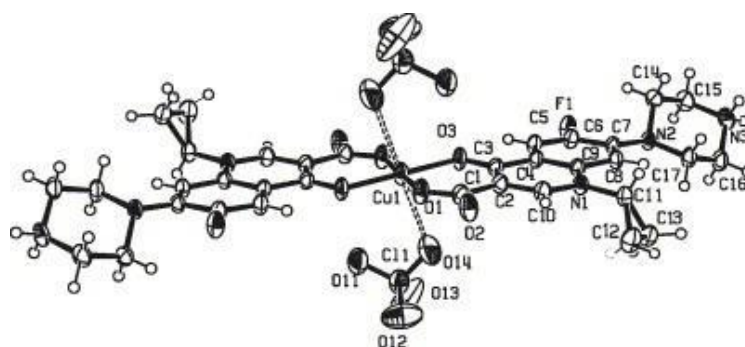


Figura 1.14 Struttura molecolare del complesso $[\text{Cu}(\text{HCp})_2(\text{ClO}_4)_2] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ricavata dalla diffrazione di raggi X [22]; HCp=ciprofloxacina o acido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-diidro-4-osso-7-(1-piperazinil)-3-chinolincarbossilico.

1.4 Complessi di rame in diagnostica medica

Anche nella diagnostica medica i complessi di rame hanno potenziali applicazioni; in particolare, alcuni studi si stanno concentrando sul loro utilizzo come sonde nella PET (Tomografia a Emissione di Positroni). La PET è una tecnica di imaging molecolare che si basa sull'emissione di un positrone (particella con la stessa massa dell'elettrone, ma carica opposta) da parte di un nucleo instabile. Il positrone si combina in breve tempo con un elettrone: le due particelle si annichilano emettendo una coppia di fotoni, la cui rilevazione permette di ottenere informazioni sui tessuti del paziente [25]. Il radionuclide più usato è ^{18}F , che ha un tempo di dimezzamento di 109.7 minuti. Incorporato nel fluorodeossiglucosio (FDG), permette di seguire il metabolismo. Un altro nuclide utilizzato è ^{11}C , che ha un tempo di dimezzamento di 20.4 minuti. I brevi tempi di dimezzamento impongono di realizzare la manipolazione sintetica (entrambi i nuclidi devono essere legati covalentemente alla molecola sonda) e il trasporto nel più breve tempo possibile e impediscono di utilizzare le sonde in luoghi lontani dal sito di produzione. La rapida incorporazione di un metallo in un complesso costituisce un'alternativa attraente [26].

Il rame possiede diversi isotopi emettitori di positroni: ^{60}Cu , ^{61}Cu , ^{62}Cu , ^{64}Cu . I loro tempi di dimezzamento vanno da 9.6 minuti (^{62}Cu) a 13 ore (^{64}Cu) [27]. Per essere somministrato al paziente, il metallo deve essere inserito in un complesso. Il legante può essere progettato in modo che ci sia una distribuzione preferenziale in alcune zone del corpo umano o l'intero complesso può essere legato ad un vettore in grado di interagire con un target molecolare specifico. Sono stati proposti vari leganti aciclici polidentati e macrociclici. Tra i leganti aciclici, particolare interesse hanno destato i ligandi a base di bis(tiosemicarbazoni), che legano il rame per mezzo di due atomi di azoto e due atomi di zolfo, dando un complesso

stabile e neutro, che può diffondere nelle cellule. Il potenziale di riduzione Cu(II)/Cu(I) viene influenzato dai sostituenti sullo scheletro diiminico (R^1 e R^2 nella figura 1.15), i quali possono quindi essere variati per rendere il complesso più o meno resistente alla riduzione in ambiente cellulare. I sostituenti sui gruppi amminici terminali sono invece meno influenti sul potenziale e possono essere sfruttati per la coniugazione di vettori [26]. A questa famiglia appartengono i complessi $^{60/62/64}\text{Cu}$ -ATSM (diacetyl-bis(N^4 -methylthiosemicarbazone)), già utilizzati in studi clinici [28].

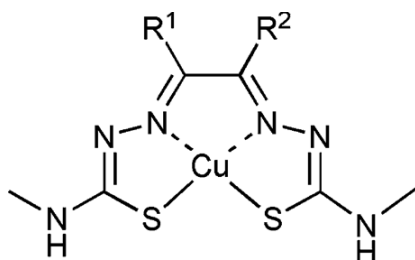


Figura 1.15 Struttura dei complessi di bis(tiosemicarbazonato) di rame(II).

Tra i leganti ciclici che presentano caratteristiche promettenti sono riportati alcuni derivati del NOTA (acido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacetico): C-NOTA e 3p-C-NOTA, esadentati, e 3p-C-NE3TA, eptadentato. In tutti i casi, i leganti hanno come gruppi donatori atomi di N e gruppi carbossilici, e possiedono una catena alchilica a cui è legato il gruppo para-nitro-fenile, utile per la coniugazione ad una biomolecola. I complessi di questi leganti con ^{64}Cu presentano rapida cinetica di formazione e buona stabilità in vitro e in vivo. Complessi di ^{64}Cu con derivati del DOTA (acido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacetico), come C-DOTA (ottadentato) e 3p-C-DE4TA (nonadentato) presentano invece più scarsa stabilità in vivo [29].

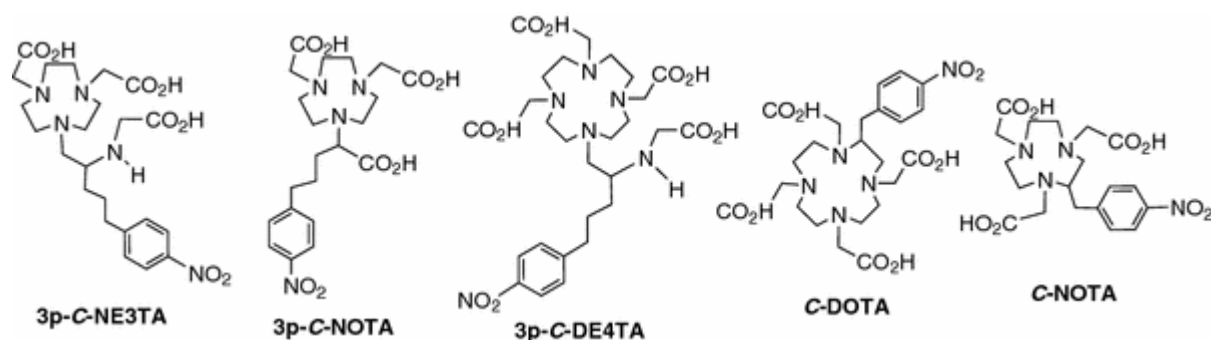


Figura 1.16 Leganti studiati nell'articolo [29].

L'MRI (Magnetic Resonance Imaging) è un'altra tecnica diagnostica in cui i complessi di rame potrebbero essere impiegati. Come sarà approfondito nel capitolo seguente, questo

ambito è sempre stato dominato dai complessi di gadolinio, ma recenti studi hanno mostrato le potenzialità del rame [30].

1.5 Bibliografia

- [1] F. Albarède, «The Stable Isotope Geochemistry of Copper and Zinc», *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, vol. 55, fasc. 1, pp. 409–427, gen. 2004, doi: 10.2138/gsrmg.55.1.409.
- [2] C. E. Housecroft e A. G. Sharpe, *Inorganic chemistry*, 5^a ed. Pearson, 2018.
- [3] R. M. Clay, P. Murray-Rust, e J. Murray-Rust, «Crystal structure of tris(trimethylammonium) catena-tri- μ -chlorocuprate(1⁻) tetrachlorocuprate(2⁻)», *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, vol. 2, fasc. 6, pp. 595–599, gen. 1973, doi: 10.1039/DT9730000595.
- [4] I. Bertini, C. Luchinat, e F. Mani, *Chimica Inorganica*. 2017.
- [5] [Online]. Disponibile su: <https://Chemistry.Stackexchange.Com/Questions/52132/>
- [6] D. H. Powell, L. Helm, e A. E. Merbach, «¹⁷O nuclear magnetic resonance in aqueous solutions of Cu²⁺: The combined effect of Jahn–Teller inversion and solvent exchange on relaxation rates», *J. Chem. Phys.*, vol. 95, fasc. 12, pp. 9258–9265, dic. 1991, doi: 10.1063/1.461206.
- [7] S. F. Lincoln, D. T. Richens, e A. G. Sykes, «Metal Aqua Ions», in *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Elsevier, 2003, pp. 515–555.
- [8] A. Pasquarello *et al.*, «First Solvation Shell of the Cu(II) Aqua Ion: Evidence for Fivefold Coordination», *Science*, vol. 291, fasc. 5505, pp. 856–859, feb. 2001, doi: 10.1126/science.291.5505.856.
- [9] M. C. Linder, *Biochemistry of Copper*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [10] W. M. Haynes, *CRC Handbook Of Chemistry And Physics*, 97th Edition. 2016.
- [11] G. Crisponi, V. M. Nurchi, D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, e G. Faa, «Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology», *Coordination Chemistry Reviews*, vol. 254, fasc. 7, pp. 876–889, apr. 2010, doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.018.
- [12] J. T. Rubino e K. J. Franz, «Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function», *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 107, fasc. 1, pp. 129–143, feb. 2012, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024.
- [13] J. Richardson, K. A. Thomas, B. H. Rubin, e D. C. Richardson, «Crystal structure of bovine Cu,Zn superoxide dismutase at 3 Å resolution: chain tracing and metal

- ligands.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 72, fasc. 4, pp. 1349–1353, apr. 1975, doi: 10.1073/pnas.72.4.1349.
- [14] T. Tsukihara *et al.*, «Structures of Metal Sites of Oxidized Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å», *Science*, vol. 269, fasc. 5227, pp. 1069–1074, ago. 1995, doi: 10.1126/science.7652554.
- [15] Z. Guo *et al.*, «Diverse roles of the metal binding domains and transport mechanism of copper transporting P-type ATPases», *Nat Commun*, vol. 15, fasc. 1, p. 2690, mar. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-47001-4.
- [16] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), «Scientific Opinion on Dietary Reference Values for copper», *EFSA Journal*, vol. 13, fasc. 10, p. 4253, 2015, doi: 10.2903/j.efsa.2015.4253.
- [17] I. Iakovidis, I. Delimaris, e S. M. Piperakis, «Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach», *Molecular Biology International*, vol. 2011, fasc. 1, p. 594529, 2011, doi: 10.4061/2011/594529.
- [18] Y. Sugiura e H. Tanaka, «Studies on the Sulfur-containing Chelating Agents. XXV. Chelate Formation of Penicillamine and Its Related Compounds with Copper (II)», *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 18, fasc. 2, pp. 368–373, 1970, doi: 10.1248/cpb.18.368.
- [19] L. Sacconi, P. Paoletti, e M. Ciampolini, «Thermochemical studies. Part VI. Heats and entropies of reaction of transition-metal ions with triethylenetetramine», *Journal of the Chemical Society*, 1961.
- [20] N. H. Gokhale, S. S. Padhye, S. B. Padhye, C. E. Anson, e A. K. Powell, «Copper complexes of carboxamidrazone derivatives as anticancer agents. 3. Synthesis, characterization and crystal structure of [Cu(appc)Cl₂], (appc=N1-(2-acetylpyridine)pyridine-2-carboxamidrazone)», *Inorganica Chimica Acta*, vol. 319, fasc. 1, pp. 90–94, lug. 2001, doi: 10.1016/S0020-1693(01)00446-7.
- [21] Z. Trávníček *et al.*, «Preparation, physicochemical properties and biological activity of copper(II) complexes with 6-(2-chlorobenzylamino)purine (HL₁) or 6-(3-chlorobenzylamino)purine (HL₂). The single-crystal X-ray structure of [Cu(H⁺L₂)₂Cl₃]Cl·2H₂O», *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 84, fasc. 1, pp. 23–32, mar. 2001, doi: 10.1016/S0162-0134(00)00218-X.
- [22] N. Jiménez-Garrido *et al.*, «Antibacterial studies, DNA oxidative cleavage, and crystal structures of Cu(II) and Co(II) complexes with two quinolone family members,

- ciprofloxacin and enoxacin», *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 99, fasc. 3, pp. 677–689, mar. 2005, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2004.11.016.
- [23] Nidhi, Sushma, A. Singh, e T. S. Chundawat, «Copper and Zinc Complexes as Anti-Breast Cancer Agents: Their Role, Mechanisms, and Biological Activities», *ChemistrySelect*, vol. 11, fasc. 26, p. e73810, 2026, doi: 10.1002/slct.73810.
- [24] K. G. Daniel, P. Gupta, R. H. Harbach, W. C. Guida, e Q. P. Dou, «Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells», *Biochemical Pharmacology*, vol. 67, fasc. 6, pp. 1139–1151, mar. 2004, doi: 10.1016/j.bcp.2003.10.031.
- [25] S. Basu, T. C. Kwee, S. Surti, E. A. Akin, D. Yoo, e A. Alavi, «Fundamentals of PET and PET/CT imaging», *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1228, fasc. 1, pp. 1–18, 2011, doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06077.x.
- [26] P. S. Donnelly, «The role of coordination chemistry in the development of copper and rhenium radiopharmaceuticals», *Dalton Trans.*, vol. 40, fasc. 5, pp. 999–1010, feb. 2011, doi: 10.1039/c0dt01075h.
- [27] P. J. Blower, J. S. Lewis, e J. Zweit, «Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine», *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 23, fasc. 8, pp. 957–980, nov. 1996, doi: 10.1016/S0969-8051(96)00130-8.
- [28] M. P. S. Dunphy e J. S. Lewis, «Radiopharmaceuticals in Preclinical and Clinical Development for Monitoring of Therapy with PET», *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 50, fasc. Suppl 1, pp. 106S-121S, mag. 2009, doi: 10.2967/jnumed.108.057281.
- [29] N. Wu *et al.*, «Promising bifunctional chelators for copper 64-PET imaging: practical ⁶⁴Cu radiolabeling and high in vitro and in vivo complex stability», *J Biol Inorg Chem*, vol. 21, fasc. 2, pp. 177–184, apr. 2016, doi: 10.1007/s00775-015-1318-7.
- [30] A. Shah *et al.*, «Design of the elusive proteinaceous oxygen donor copper site suggests a promising future for copper for MRI contrast agents», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 120, fasc. 27, p. e2219036120, lug. 2023, doi: 10.1073/pnas.2219036120.

Capitolo 2. Agenti di contrasto per MRI: alternative al gadolinio

L'MRI (Magnetic Resonance Imaging) è una modalità di acquisizione di immagini a scopo diagnostico che sfrutta l'NMR (Nuclear Magnetic Resonance). Le immagini formate sono rappresentazioni spaziali di proprietà dei protoni delle molecole d'acqua che si trovano nei tessuti, quali la densità protonica, il tempo di rilassamento longitudinale o spin-reticolo (T_1), o il tempo di rilassamento trasversale o spin-spin (T_2). I diversi tessuti possiedono proprietà diverse e appaiono più o meno scuri nell'immagine. L'utilizzo di sostanze paramagnetiche (dette agenti di contrasto), che diminuiscono il tempo di rilassamento longitudinale, consente di ottenere un maggior contrasto nelle immagini ponderate in T_1 , facilitando la diagnosi delle malattie [1]. L'efficacia di un agente di contrasto si misura tramite la rilassività, i cui valori vengono riportati in funzione del campo magnetico nei cosiddetti profili di dispersione ^1H NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion). La definizione di rilassività, i parametri da cui dipende e il modo in cui si misura sono trattati nel Capitolo 3.

2.1 Problematiche correlate all'impiego del gadolinio

Tutti gli agenti di contrasto paramagnetici approvati per utilizzo clinico sono, ad oggi, a base di gadolinio. Il metallo, utilizzato sotto forma di ione Gd^{3+} , viene chelato e utilizzato sotto forma di complessi con elevate costanti di stabilità termodinamiche, per impedire il manifestarsi della sua tossicità come ione libero. Lo ione Gd^{3+} libero, infatti, ha dimensioni simili a quelle dello ione Ca^{2+} e può competere con esso causando danni in molti processi biologici [2]. La scelta di questo metallo appartenente ai lantanidi deriva dalla sua speciale efficacia nel ridurre i tempi di rilassamento dei nuclei di ^1H dell'acqua, cioè dalla sua alta rilassività, dovuta all'alto stato di spin ($S = 7/2$, possiede infatti sette elettroni spaiati distribuiti isotropicamente negli orbitali f) e ai lunghi tempi di rilassamento elettronico ($1.0 \times 10^{-9} - 2.5 \times 10^{-9}\text{s}$ per l'acquoione) [3]. A partire dagli anni '80 del secolo scorso, vari complessi di gadolinio sono stati introdotti in ambito clinico (figura 2.1).

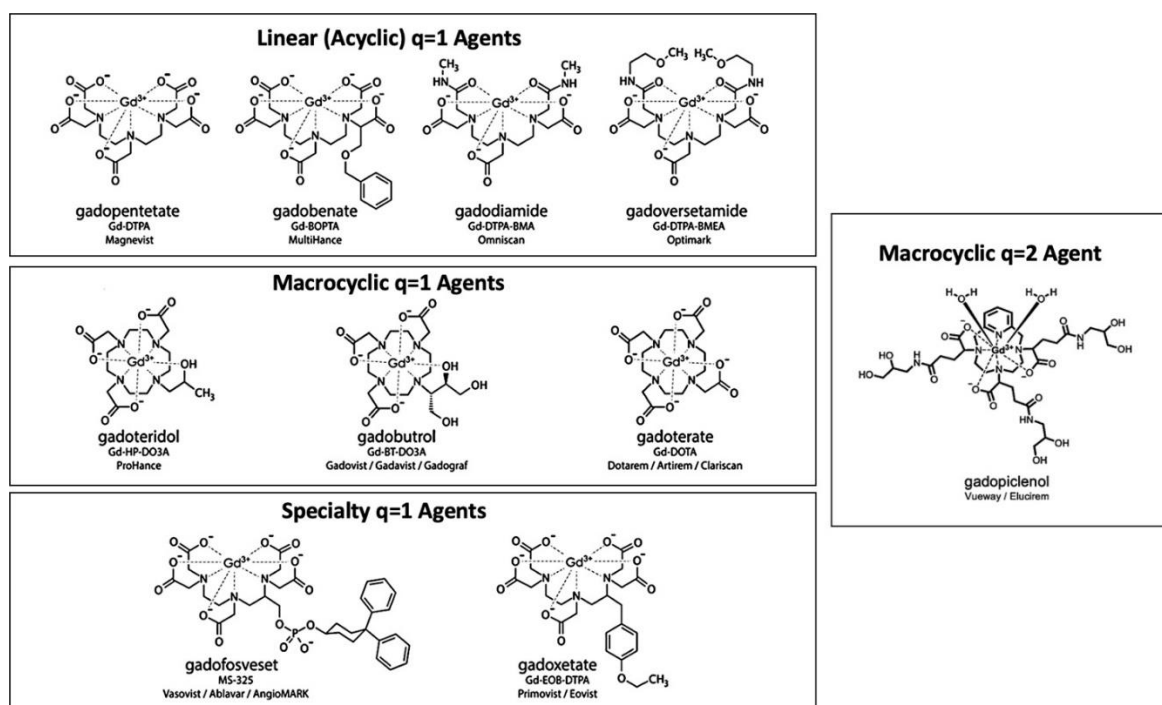


Figura 2.1 Complessi di gadolinio che nel corso degli anni sono stati approvati per l'utilizzo sui pazienti. q rappresenta il numero di molecole d'acqua legate allo ione metallico [4].

Nel corso degli anni sono sorte alcune preoccupazioni legate alla tossicità degli agenti di contrasto a base di gadolinio. Nel 1997 venne osservata per la prima volta [5], in pazienti con insufficienza renale, che venivano sottoposti a dialisi, l'insorgenza di una malattia, in seguito definita fibrosi sistemica nefrogenica (NFS), che causa l'ispessimento e l'indurimento della pelle, in particolare negli arti. Nei casi più gravi l'NFS porta a progressiva immobilità e, raramente, a fibrosi multi-organo e alla morte. La causa dell'NFS fu individuata, qualche anno più tardi, nella somministrazione di agenti di contrasto contenenti gadolinio, che nei pazienti con insufficienza renale permangono a lungo all'interno del corpo, con aumento della probabilità di dissociazione, soprattutto per i complessi lineari, che hanno un'inerzia cinetica minore dei complessi macrociclici. Non si conosce con esattezza il meccanismo dell'NSF, ma si pensa che sia innescata dalla liberazione di gadolinio dal complesso tramite transmetallazione [2]. Questo portò l'EMA (European Medicines Agency) a sconsigliare l'utilizzo, sui pazienti con gravi problemi ai reni, di alcuni mezzi di contrasto considerati ad alto rischio. Questi comprendono complessi lineari, quali OptiMark, Omniscan e Magnevist, che presentano minore stabilità rispetto ai complessi macrociclici [6].

Più recentemente, l'osservazione di un'anomala intensità del segnale nelle immagini del cervello di pazienti che avevano ricevuto nella loro vita numerose somministrazioni di agenti di contrasto ha portato a scoprire l'accumulo di gadolinio nei tessuti cerebrali [7]. L'accumulo può avvenire sotto forma di complesso intatto o sotto forma di sali insolubili formatisi a seguito di transmetallazione [2]. Anche in altri tessuti, in particolare nelle ossa, si osserva deposizione di gadolinio [8]. Finora non sono state osservate conseguenze negative nei pazienti con deposizione di gadolinio nei tessuti, tuttavia l'EMA ha deciso di sospendere l'utilizzo di alcuni complessi lineari (Optimark e Omniscan) e di imporre restrizioni all'utilizzo di altri (Magnevist e MultiHance) [9].

Altre problematiche legate all'utilizzo del gadolinio sono di natura ambientale ed economica. Dal 1988, anno in cui fu approvato il primo agente di contrasto, ad oggi, il numero di somministrazioni annuali è aumentato notevolmente [10]. I complessi di gadolinio somministrati per via endovenosa vengono eliminati dal corpo umano attraverso le vie urinarie: di conseguenza, ogni anno vengono rilasciate nelle acque decine di tonnellate di gadolinio [11]. Si tratta di un elemento presente in natura, ma diversi studi hanno rilevato la presenza di concentrazioni anomale di gadolinio nelle acque dolci, correlabili all'utilizzo di questo metallo nell'MRI. Alcuni hanno espresso preoccupazioni per la possibile dissociazione dei complessi con rilascio di Gd^{3+} [11]; secondo altri, i complessi rimangono intatti e anche se ingeriti bevendo acqua contaminata non vengono assorbiti dal corpo [4]. Le concentrazioni che si trovano nelle acque sono, in ogni caso, basse rispetto al limite di tossicità, ma continueranno ad aumentare.

Il gadolinio è uno degli elementi delle terre rare e, come accade per molti altri di questi elementi, tutto il gadolinio utilizzato in Europa proviene dalla Cina, che ne è il principale produttore a livello mondiale: questo rende l'Europa totalmente dipendente da un altro paese per quanto riguarda la produzione di agenti di contrasto [12]. Inoltre, la disponibilità di gadolinio suscita preoccupazioni all'interno della Cina stessa [13]. Vi sono, infine, preoccupazioni legate all'impatto ambientale dell'estrazione del gadolinio e degli altri elementi delle terre rare [14].

Tutte queste problematiche hanno fatto sì che, negli ultimi anni, una parte della ricerca in questo settore si sia orientata allo studio di complessi paramagnetici con metalli alternativi. In particolare, l'attenzione è rivolta ad alcuni elementi di transizione della prima serie. Si tratta di metalli più abbondanti sulla Terra e più facilmente reperibili del gadolinio. Inoltre,

sono elementi naturalmente presenti nel corpo umano, il quale possiede quindi meccanismi per gestire, entro certi limiti, eccessi di questi ioni liberi: complessi di questi metalli dovrebbero quindi presentare ridotti rischi di tossicità. Esiste un grande svantaggio: nessuno ione dei metalli di transizione possiede sette elettroni spaiati ed è tanto paramagnetico quanto il Gd^{3+} . Tuttavia, il momento magnetico è solo uno dei parametri che influenzano l'efficacia degli agenti di contrasto. Altri parametri, come la velocità di scambio delle molecole d'acqua, i tempi di rilassamento elettronici e la distanza metallo-acqua, sono facilmente modificabili nei complessi dei metalli di transizione cambiando numero e tipo di leganti [3].

2.2 Manganese

Uno dei metalli più studiati come sostituto per il gadolinio è il manganese. Lo ione Mn^{2+} , che ha configurazione elettronica $[Ar]3d^5$, può formare complessi ad alto spin con cinque elettroni spaiati, che possiedono alto momento magnetico, lunghi tempi di rilassamento elettronici ($5 \times 10^{-8} - 1.5 \times 10^{-7} s$ per l'acquoione [3]) e scambio delle molecole d'acqua abbastanza veloce. Lo ione Mn^{2+} presenta solitamente numero di coordinazione 6 o 7. Il profilo NMRD dell'acquoione ottaedrico $[Mn(H_2O)_6]^{2+}$ mostra due dispersioni [15], una dovuta al meccanismo di rilassamento dipolare, l'altra al meccanismo scalare, a differenza di quanto si osserva nei complessi di gadolinio, che agisce solo tramite il meccanismo dipolare. Negli altri complessi di Mn^{2+} , invece, il contributo scalare si osserva raramente. La rilassività dei complessi di manganese è leggermente inferiore a quella di complessi di gadolinio strutturalmente simili, ma aumentando il peso molecolare dei complessi può essere aumentata così da superare la rilassività dei complessi attualmente disponibili in commercio. In generale, raggiungere una buona stabilità termodinamica e una buona inerzia cinetica è più difficile con il manganese, anche a causa del minor numero di coordinazione [16].

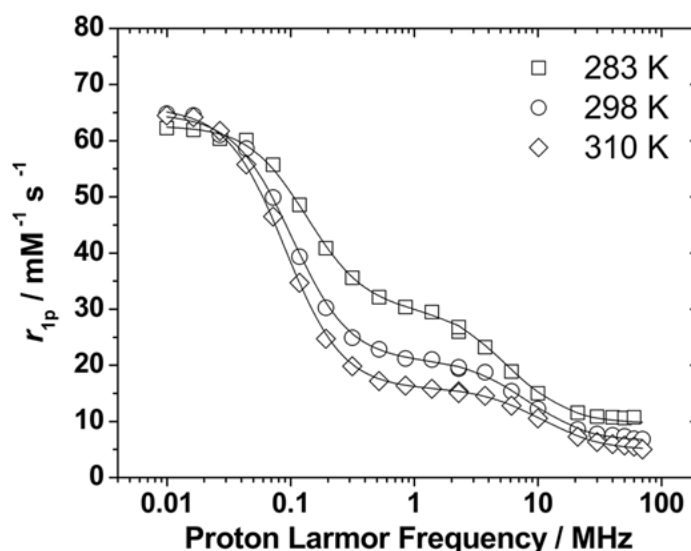


Figura 2.2 Profili ^1H NMRD registrati a differenti temperature per $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ a pH 1.7 [15].

Un complesso di manganese, il Mn-DPDP, detto anche mangafodipir o Teslascan (figura 2.3), è stato approvato per utilizzo clinico. Ha una geometria ottaedrica distorta, in cui il manganese è coordinato da un legante lineare tramite due atomi di ossigeno carbossilici, due atomi di ossigeno fenolici e due atomi di azoto amminici terziari [17]; è un complesso con $q = 0$, cioè la sua sfera di coordinazione interna non comprende molecole d'acqua. Si tratta di un agente di contrasto specifico per il fegato, che funziona rilasciando ioni Mn^{2+} , che si accumulano nel fegato e producono il contrasto [16]. Nel 2012, tuttavia, è stato ritirato dal commercio e non viene più utilizzato [18]. Nel corso degli anni è stata esplorata una grande varietà di complessi lineari, macrociclici e biciclici. Alcuni studi hanno mostrato la possibilità di realizzare complessi di manganese inerti, che non si dissociano *in vivo* e che mostrano prestazioni paragonabili a quelle degli agenti di contrasto a base di Gd^{3+} . Gale, Caravan e collaboratori hanno sintetizzato il complesso $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ (figura 2.4), in cui il manganese è chelato da un legante lineare derivato dall'EDTA, nel quale l'etilene è sostituito da un cicloesile e un braccio acetico è sostituito da uno picolinico, per avere maggiore rigidità, che porta a maggiore inerzia cinetica. Il manganese presenta in questo caso una coordinazione a 7, in cui tre posizioni sono occupate da atomi di ossigeno, tre da atomi di azoto e la settima da una molecola d'acqua. Il complesso $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$, testato *in vivo*, genera un ottimo contrasto e viene eliminato in modo efficiente per via renale ed epatobiliare [19], [20]. $[\text{Mn}(\text{PyC3A})]^-$ è considerato un agente di contrasto promettente e sta venendo testato in studi clinici.

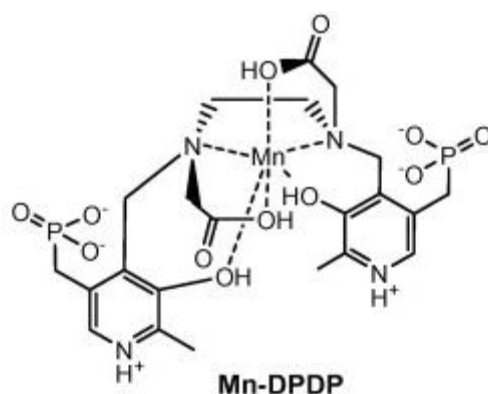


Figura 2.3 Struttura del mangafodipir.

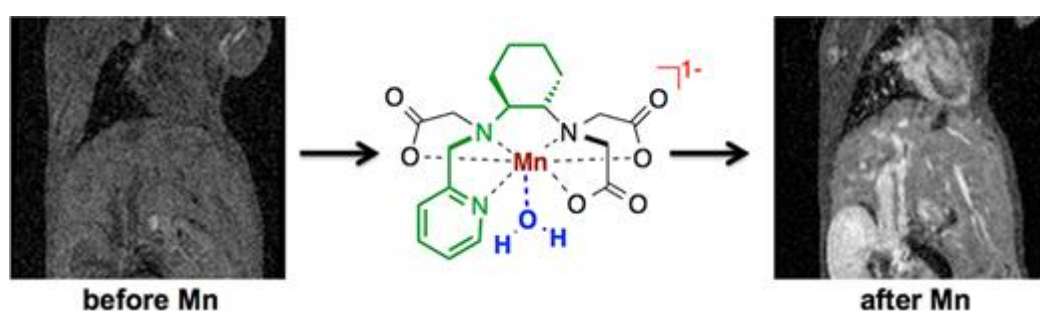


Figura 2.4 Struttura del [Mn(PyC3A)]⁻ e immagini prima e dopo l'iniezione di tale mezzo di contrasto [19].

Un altro esempio di complessi di Mn promettenti è costituito dai complessi con le bispidine. Si tratta di leganti amminici biciclici, con una struttura altamente rigida e preorganizzata, che possono essere funzionalizzati in vari modi per creare una cavità adatta al metallo che si vuole chelare. L'inerzia raggiunta con un complesso di questo tipo è estremamente elevata, con l'assenza totale di dissociazione dopo 140 giorni in presenza di Zn^{2+} . Anche la rilassività misurata e i risultati dei test *in vivo* mostrano risultati promettenti [21].

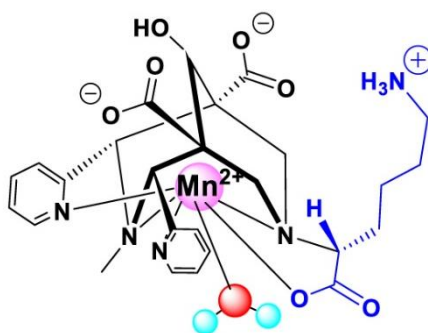


Figura 2.5 Complesso di manganese con legante a base di bispidina [21].

2.3 Ferro

I complessi ad alto spin dello ione Fe^{3+} , che ha la stessa configurazione elettronica e lo stesso numero di coordinazione del Mn^{2+} , sono altri potenziali candidati alla sostituzione degli attuali mezzi di contrasto a base di gadolinio. Il ferro ha una tossicità minore di quella del manganese, poiché è un elemento normalmente presente nel corpo umano in quantità elevate (tra i 3 e i 5 g [22]). Il rilassamento dei nuclei di ^1H indotto dai complessi di Fe(III) dipende in modo significativo, oltre che da τ_R (tempo di correlazione legato alla mobilità delle molecole in soluzione acquosa), dal tempo di rilassamento elettronico T_{1e} , che è sufficientemente corto ($4 \times 10^{-10} - 1.4 \times 10^{-9}\text{s}$ per l'acquione [3]) da essere paragonabile al τ_R in tutto l'intervallo di frequenze normalmente usato nelle misure, diversamente da quanto accade per i complessi di Gd(III) e Mn(II) (figura 2.6). Questo si riflette nella diversa forma dei profili NMRD: mentre complessi a basso peso molecolare di gadolinio e manganese hanno valori di rilassività decrescenti al crescere del campo magnetico, i profili del ferro mostrano un minimo tra 50 e 70 MHz e poi una risalita, con un massimo intorno a 300 MHz (figura 2.7).

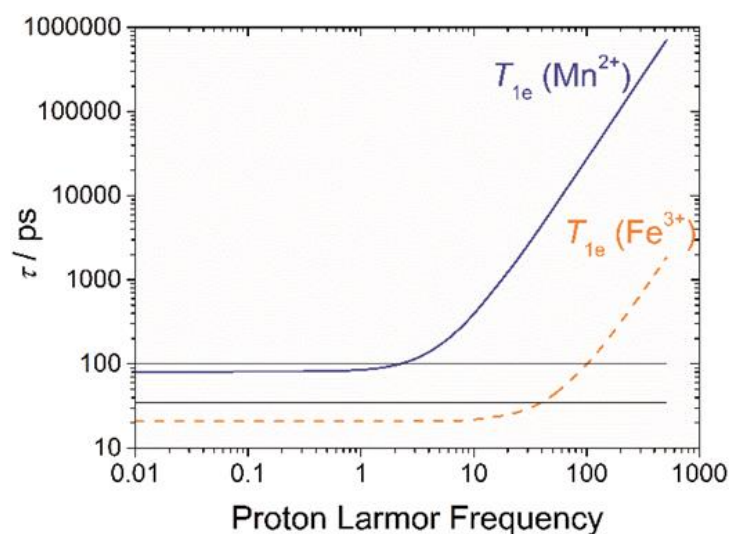


Figura 2.6 Valori di T_{1e} calcolati con i parametri ottenuti dai dati rilassometrici dei complessi di EDTA con Mn(II) e Fe(III) . Le linee orizzontali delimitano l'intervallo di Valori di τ_R tipici di piccoli complessi (tra 35 e 100 ps) [23].

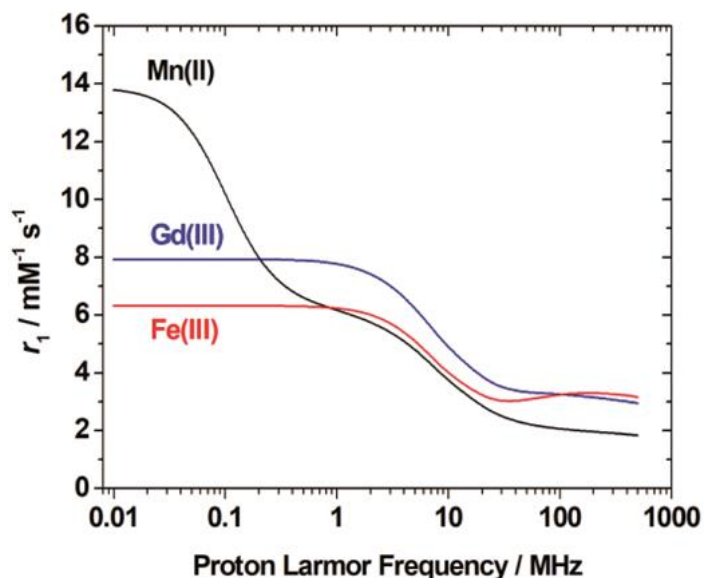


Figura 2.7 Profili ^1H NMRD simulati per complessi con $q = 1$ di Fe(III), Mn(II) e Gd(III) usando i parametri determinati per i corrispondenti acquoioni [23].

Il raggiungimento di un'elevata stabilità e di un'elevata inerzia cinetica è cruciale per applicazioni *in vivo*, perché si presentano sia il rischio di transmetallazione, sia il rischio che il legante sia sostituito da proteine trasportatrici del ferro, che presentano alta affinità per il ferro e normalmente sono saturate solo in piccola percentuale. Il ferro(III) ha, inoltre, la possibilità di essere ridotto a Fe(II) da agenti riducenti presenti nel plasma, come l'acido ascorbico. Questo può essere utile per alcune particolari applicazioni, ma solitamente è da evitare. Il ferro(II), infatti, può reagire con H_2O_2 (reazione di Fenton), donandogli un elettrone e generando specie radicaliche che causano danni ossidativi alle cellule. Bisogna quindi progettare il complesso in modo che, in condizioni fisiologiche, il potenziale della coppia $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ sia minore di -0.2 V, valore al di sotto del quale si evita la riduzione da parte dell'acido ascorbico [23]. Nessun complesso di ferro è, fino ad oggi, stato approvato, ma alcuni complessi hanno mostrato proprietà promettenti. Ad esempio, Snyder e altri [24] hanno sintetizzato alcuni complessi di Fe(III) macrociclici basati sul TACN (triazaciclonoanano). Il migliore di questi, riportato nella figura 2.8 come Fe(L1), ha una rilassività misurata in siero paragonabile a quella del Gd(DTPA), generata dall'interazione con una molecola di acqua di sfera interna o, più probabilmente, con molecole di seconda sfera. Testato *in vivo* sui topi, il complesso è stato ben tollerato ed è stato eliminato in 24 h per via renale ed epatobiliare, generando un ottimo contrasto soprattutto nei reni.

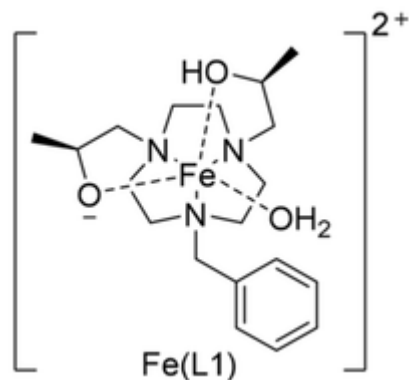


Figura 2.8 Struttura del complesso Fe(L1) preparato da Snyder e altri [24].

Bales e altri [25] hanno studiato complessi di Fe(III) con leganti derivati dall'HBED (N,N'-bis(2-hydroxyphenyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic acid). Il Fe-HBED, complesso di partenza, è un complesso coordinativamente saturo, in cui il ferro è chelato da quattro atomi di ossigeno e due di azoto e ha una buona inerzia dal punto di vista redox. La modifica del legante permette di migliorare la rilassività e modificare la biodistribuzione, mantenendo l'inerzia del complesso di partenza.

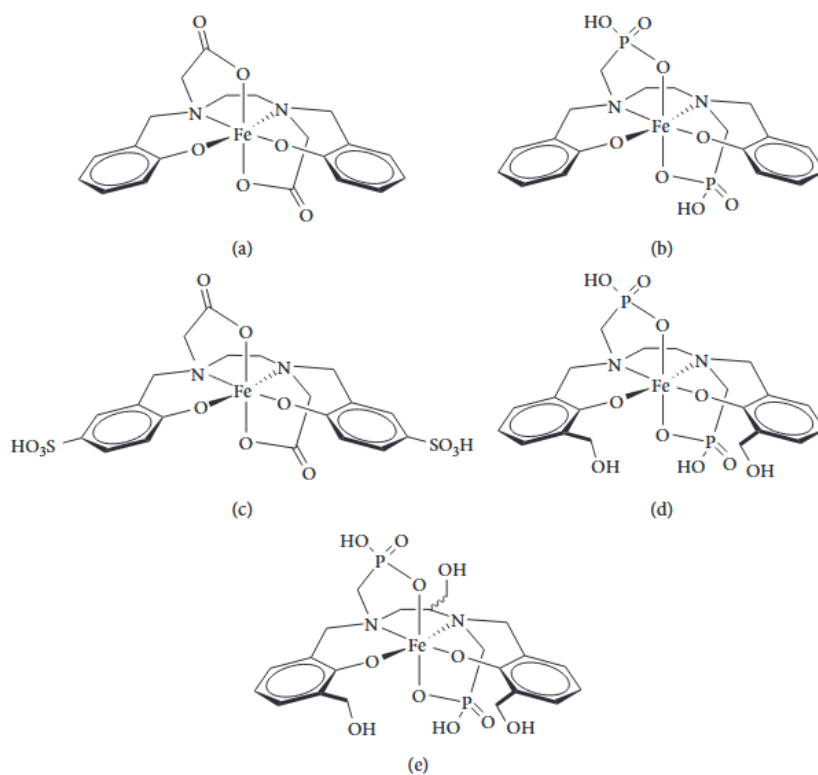


Figura 2.9 Fe-HBED (a) e suoi derivati (b-e) preparati da Bales e altri [25].

2.4 Rame

Il rame può formare complessi paramagnetici nello stato Cu^{2+} . Si tratta di una specie che, avendo configurazione elettronica d^9 , possiede un solo elettrone spaiato ($S = 1/2$) e ha un momento magnetico molto minore rispetto agli ioni Gd^{3+} , Mn^{2+} e Fe^{3+} . Di conseguenza, i valori di rilassività attesi per complessi di Cu^{2+} sono molto bassi e gli esempi di complessi di Cu per applicazioni in MRI presenti in letteratura sono pochi.

Zhang e altri [26] riportano la sintesi del complesso $\text{CuL}\cdot\text{H}_2\text{O}$, dove L = acido dietilenetriammino- N,N',N'' -triacetilisoniazide N,N'' -bisacetico. La rilassività di tale complesso, misurata a 80 MHz e 35°C , è $1.59 \text{ mmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

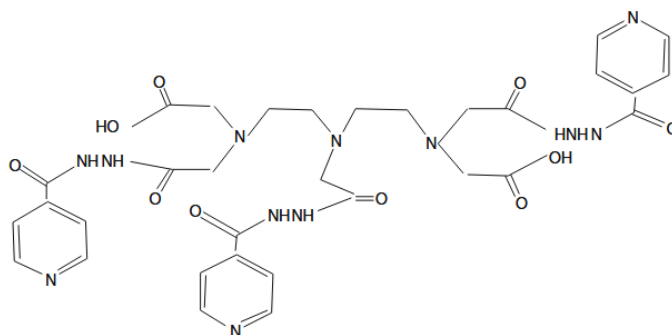


Figura 2.10 Acido dietilenetriammino- N,N',N'' -triacetilisoniazide N,N'' -bisacetico [26].

Dunbar e altri [27] hanno riportato la preparazione di tre serie di complessi. La prima (figura 2.11a) è composta da macrocicli con tioeteri e ammine secondarie, in cui le catene alchiliche che uniscono gli atomi donatori sono variate per generare un anello a 14, 15 o 16 termini. In questi complessi il rame si trova sul piano del macrociclo e molti di essi cristallizzano con una molecola di solvente (MeCN o H_2O) coordinata al rame in posizione assiale. I complessi della seconda serie (figura 2.11b) sono macrocicli contenenti ammine terziarie. I bracci X, che includono un atomo donatore all'estremità, sono stati inseriti per aumentare la denticità, e quindi la stabilità, del complesso. Il terzo tipo (figura 2.11c) contiene invece dei gruppi elettronattrattori (arile e $-\text{NO}_2$), con l'obiettivo di stabilizzare il rame(I), nell'ottica della preparazione di un sistema con proprietà redox. I complessi della seconda serie si sono rivelati più stabili di quelli della prima: in presenza di albumina del siero bovino, il rame viene rimosso dai complessi con ammine secondarie, ma non da quelli che contengono i gruppi X. L'analisi cristallografica del complesso $[\text{Cu(II)}\text{S}_{\text{pr}}\text{N}_{\text{en}}(-(\text{CH}_2)_3\text{OH})_2]^{2+}$, della seconda serie, mostra che i due gruppi alcolici giacciono sopra al piano dell'anello e uno di essi coordina il rame, che si trova in una struttura piramidale a base quadrata distorta. La

coordinazione a 5 anziché a 4 aumenta la stabilità, ma impedisce l'accesso all'acqua, causando, in quasi tutti i casi, una diminuzione della relassività.

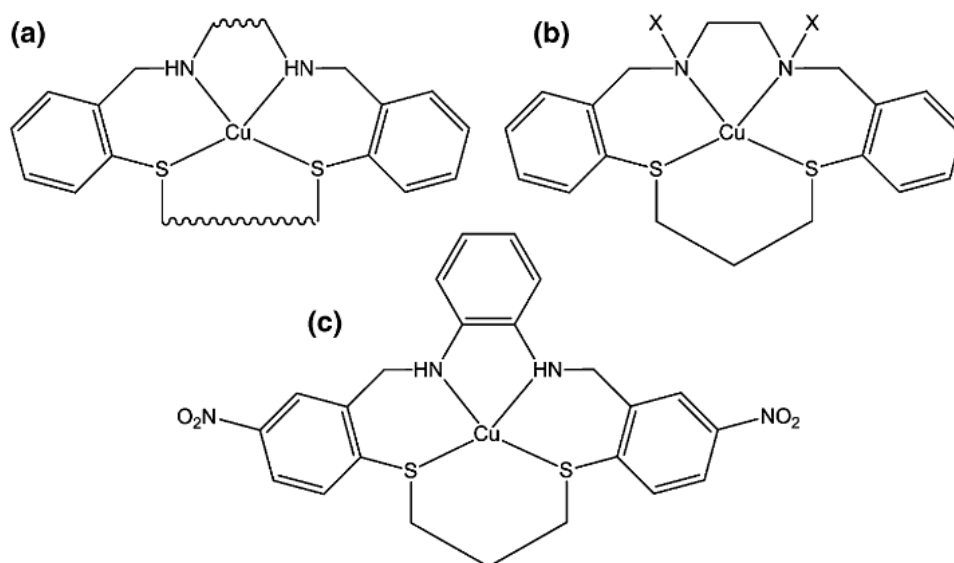


Figura 2.11 **a)** Complessi con ammine secondarie, dove le catene polimetileniche tra gli atomi di azoto e zolfo sono etilene (en) o propilene (pr), portando a quattro complessi diversi: $[\text{Cu(II)S}_{\text{en}}\text{N}_{\text{en}}]^{2+}$, $[\text{Cu(II)S}_{\text{en}}\text{N}_{\text{pr}}]^{2+}$, $[\text{Cu(II)S}_{\text{pr}}\text{N}_{\text{en}}]^{2+}$ e $[\text{Cu(II)S}_{\text{pr}}\text{N}_{\text{pr}}]^{2+}$. **b)** Complessi con ammine terziarie $[\text{Cu(II)S}_{\text{pr}}\text{N}_{\text{en}}(\text{X})_2]^{2+}$, dove $\text{X} = -(\text{CH}_2)_2\text{OH}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{OH}$, $-\text{CH}_2\text{COOH}$ o $-(\text{CH}_2)_2\text{SPh}$. **c)** $[\text{Cu(II)S}_{\text{pr}}\text{N}_{\text{phen}}\text{R}]^{2+}$, complesso in cui sono stati aggiunti gruppi elettronattrattori (arile, $-\text{NO}_2$) [27].

I bassi valori di relassività in confronto a quelli del gadolinio non hanno incoraggiato la ricerca in questo ambito. Alcune pubblicazioni riportano lo studio di sistemi per MRI in cui il rame è presente in combinazione con un altro metallo, quale Gd [28], [29] o Fe [30]. Tuttavia, in un studio recente [31], è stato mostrato che anche con il solo rame è possibile ottenere relassività molto elevate. È stato preparato un complesso di rame (nominato $\text{Cu}(\text{MB1-2})_3$) basato su una struttura proteica artificiale: tre catene peptidiche con una struttura ad α -elica, disposte in modo parallelo, racchiudono un sito di legame per il Cu^{2+} in cui i donatori sono esclusivamente atomi di O; la sfera di coordinazione include probabilmente anche dell'acqua. I valori di relassività misurati sono del tutto paragonabili a quelli ottenuti con un sistema simile a base di gadolinio. Tale struttura presenta, tuttavia, una bassa affinità del rame per il sito di legame e quindi non è sufficientemente stabile per applicazioni *in vivo*.

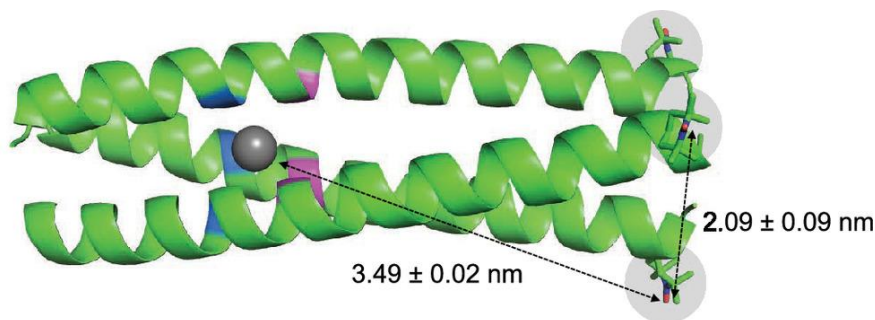


Figura 2.12 Modello computazionale del complesso $\text{Cu}(\text{MB1-2})_3$ [31].

Come per i complessi di ferro, anche per quelli di rame la stabilità in ambiente biologico è messa a rischio anche dagli agenti riducenti: il rame può essere facilmente ridotto da Cu^{2+} a Cu^+ . A meno che non si voglia avere agenti di contrasto redox attivi, è quindi necessario esercitare un accurato controllo sul potenziale di riduzione [32].

Esperimenti effettuati su piccoli complessi di rame, $[\text{Cu}(\text{TREN})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{TACN})]^{2+}$ [32], mostrano in alcuni casi una doppia dispersione nel profilo NMRD, cioè nel caso del rame anche il meccanismo di rilassamento scalare, oltre a quello dipolare, può essere significativo. Un'altra caratteristica che distingue i complessi di rame da quelli di gadolinio (nel caso in cui $\tau_R \approx 1 - 10 \text{ ns}$), e che invece li accomuna a quelli di ferro, è la significativa influenza del tempo di rilassamento elettronico: per questo anche l'esplorazione di nuove geometrie dei complessi può portare ad ottenere valori di relassività migliori.

La tabella 2.1 riporta alcuni valori di relassività di complessi a base di Cu riportati in letteratura, confrontati con uno dei noti complessi di gadolinio. I valori sono molto inferiori a quelli del gadolinio, ad eccezione del complesso peptidico nominato sopra, che ha valori del tutto paragonabili a quelli del suo analogo a base di Gd, riportato anch'esso nella tabella.

Complesso	$r_1 \text{ (s}^{-1} \text{ mM}^{-1}\text{)}$	ref.
Gd-DTPA	4.73 (a 9.4 T)	[27]
$[\text{Cu}(\text{TREN})]^{2+}$	0.17 (a 1.4 T)	[32]
$[\text{Cu}(\text{TACN})]^{2+}$	0.22 (a 1.4 T)	[32]
$[\text{Cu}(\text{II})\text{S}_{\text{pr}}\text{N}_{\text{en}}(-(\text{CH}_2)_2\text{OH})_2]^{2+}$	0.42 ± 0.02 (a 9.4 T)	[27]
CuL	1.59 (a 1.9 T, 308 K)	[26]
$\text{Cu}(\text{MB1-2})_3$	14.2 ± 0.2 (a 1.4 T) 1.3 ± 0.3 (a 7 T)	[31]
$\text{Gd}(\text{MB1-2})_3$	15.3 ± 0.6 (a 1.4 T) 5.4 ± 0.1 (a 7 T)	[31]

Tabella 2.1 Valori di relassività dei complessi di rame trovati in letteratura.

Molti parametri possono essere variati per migliorare la rilassività: il tempo di correlazione rotazionale, il tempo di rilassamento elettronico, il numero di idratazione, il tempo di residenza delle molecole d'acqua. La correlazione di ciascuno di questi con la rilassività, tuttavia, non è ancora stata studiata in modo approfondito [32].

2.5 Bibliografia

- [1] L. Helm *et al.*, «Gadolinium-based Contrast Agents», in *Contrast Agents for MRI: Experimental Methods*, V. C. Pierre e M. J. Allen, A c. di, The Royal Society of Chemistry, 2017, p. 0. doi: 10.1039/9781788010146-00121.
- [2] L. Pasquini *et al.*, «Gadolinium-Based Contrast Agent-Related Toxicities», *CNS Drugs*, vol. 32, fasc. 3, pp. 229–240, mar. 2018, doi: 10.1007/s40263-018-0500-1.
- [3] E. Salvadori *et al.*, «From electron spin to relaxivity: a multidisciplinary perspective on first-row transition metal-based MRI probes», *Chem. Sci.*, vol. 16, fasc. 44, pp. 20631–20646, 2025, doi: 10.1039/D5SC05827A.
- [4] R. E. Lenkinski e N. M. Rofsky, «Contrast Media–driven Anthropogenic Gadolinium: Knowns and Unknowns», *Radiology*, vol. 311, fasc. 1, p. e240020, apr. 2024, doi: 10.1148/radiol.240020.
- [5] S. E. Cowper, H. S. Robin, S. M. Steinberg, L. D. Su, S. Gupta, e P. E. LeBoit, «Scleromyxoedema-like cutaneous diseases in renal-dialysis patients», *The Lancet*, vol. 356, fasc. 9234, pp. 1000–1001, set. 2000, doi: 10.1016/S0140-6736(00)02694-5.
- [6] «European Medicines Agency makes recommendations to minimise risk of nephrogenic systemic fibrosis with gadolinium-containing contrast agents | European Medicines Agency (EMA)». Consultato: 18 agosto 2026. [Online]. Disponibile su: <https://www.ema.europa.eu/en/news/european-medicines-agency-makes-recommendations-minimise-risk-nephrogenic-systemic-fibrosis-gadolinium-containing-contrast-agents-0>
- [7] T. Kanda, K. Ishii, H. Kawaguchi, K. Kitajima, e D. Takenaka, «High Signal Intensity in the Dentate Nucleus and Globus Pallidus on Unenhanced T₁-weighted MR Images: Relationship with Increasing Cumulative Dose of a Gadolinium-based Contrast Material», *Radiology*, vol. 270, fasc. 3, pp. 834–841, mar. 2014, doi: 10.1148/radiol.13131669.
- [8] N. Murata *et al.*, «Macrocyclic and Other Non-Group 1 Gadolinium Contrast Agents Deposit Low Levels of Gadolinium in Brain and Bone Tissue: Preliminary Results

- From 9 Patients With Normal Renal Function», *Invest Radiol*, vol. 51, fasc. 7, pp. 447–453, lug. 2016, doi: 10.1097/RLI.0000000000000252.
- [9] «EMA’s final opinion confirms restrictions on use of linear gadolinium agents in body scans | European Medicines Agency (EMA)». Consultato: 18 agosto 2026. [Online]. Disponibile su: <https://www.ema.europa.eu/en/news/emas-final-opinion-confirms-restrictions-use-linear-gadolinium-agents-body-scans>
- [10] J. Wahsner, E. M. Gale, A. Rodríguez-Rodríguez, e P. Caravan, «Chemistry of MRI Contrast Agents: Current Challenges and New Frontiers», *Chem Rev*, vol. 119, fasc. 2, pp. 957–1057, gen. 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00363.
- [11] R. Brünjes e T. Hofmann, «Anthropogenic gadolinium in freshwater and drinking water systems», *Water Research*, vol. 182, p. 115966, set. 2020, doi: 10.1016/j.watres.2020.115966.
- [12] Directorate-General for Internal Market, Industry, Entrepreneurship and SMEs (European Commission), Grohol, Milan, e Veeh, Constanze, *Study on the critical raw materials for the EU 2023: final report*. Publications Office of the European Union, 2023. Consultato: 20 agosto 2026. [Online]. Disponibile su: <https://data.europa.eu/doi/10.2873/725585>
- [13] S. Zhao, P. Wang, W. Chen, L. Wang, Q.-C. Wang, e W.-Q. Chen, «Supply and demand conflicts of critical heavy rare earth element: Lessons from gadolinium», *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 199, p. 107254, dic. 2023, doi: 10.1016/j.resconrec.2023.107254.
- [14] D. Talan e Q. Huang, «A review of environmental aspect of rare earth element extraction processes and solution purification techniques», *Minerals Engineering*, vol. 179, p. 107430, mar. 2022, doi: 10.1016/j.mineng.2022.107430.
- [15] D. Esteban-Gómez, C. Cassino, M. Botta, e C. Platas-Iglesias, « ^{17}O and ^1H relaxometric and DFT study of hyperfine coupling constants in $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ », *RSC Adv.*, vol. 4, fasc. 14, pp. 7094–7103, feb. 2014, doi: 10.1039/c3ra45721d.
- [16] M. Botta, F. Carniato, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, e L. Tei, «Mn(II) Compounds as an Alternative to Gd-Based MRI Probes», *Future Medicinal Chemistry*, vol. 11, fasc. 12, pp. 1461–1483, giu. 2019, doi: 10.4155/fmc-2018-0608.
- [17] B. Tirkkonen *et al.*, «Physicochemical characterisation of mangafodipir trisodium», *Acta Radiol*, vol. 38, fasc. 5, pp. 780–789, set. 1997, doi: 10.1080/02841859709172411.

- [18] «Teslascan | European Medicines Agency (EMA)». Consultato: 27 agosto 2026. [Online]. Disponibile su: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/teslascan>
- [19] E. M. Gale, I. P. Atanasova, F. Blasi, I. Ay, e P. Caravan, «A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast», *Journal American Chemical Society*, vol. 137, fasc. 49, pp. 15548–15557, nov. 2015, doi: 10.1021/jacs.5b10748.
- [20] E. M. Gale, H.-Y. Wey, I. Ramsay, Y.-F. Yen, D. E. Sosnovik, e P. Caravan, «A manganese-based alternative to gadolinium: Contrast-enhanced MR angiography, excretion, pharmacokinetics, and metabolism», *Radiology*, vol. 286, fasc. 3, pp. 865–872, 2018, doi: 10.1148/radiol.2017170977.
- [21] D. Ndiaye e É. Tóth, «Stable and inert manganese complexes for magnetic resonance imaging», *Comptes Rendus. Chimie*, vol. 27, fasc. S2, pp. 161–177, lug. 2024, doi: 10.5802/crchim.284.
- [22] G. J. Anderson e D. M. Frazer, «Current understanding of iron homeostasis», *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 106, pp. 1559S-1566S, dic. 2017, doi: 10.3945/ajcn.117.155804.
- [23] Z. Baranyai *et al.*, «Defining the conditions for the development of the emerging class of FeIII-based MRI contrast agents», *Chem. Sci.*, vol. 12, fasc. 33, pp. 11138–11145, set. 2021, doi: 10.1039/d1sc02200h.
- [24] E. M. Snyder *et al.*, «A Class of FeIII Macrocyclic Complexes with Alcohol Donor Groups as Effective T₁ MRI Contrast Agents», *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 59, fasc. 6, pp. 2414–2419, 2020, doi: 10.1002/anie.201912273.
- [25] B. C. Bales *et al.*, «Fe-HBED Analogs: A Promising Class of Iron-Chelate Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging», *Contrast Media & Molecular Imaging*, vol. 2019, fasc. 1, p. 8356931, 2019, doi: 10.1155/2019/8356931.
- [26] D.-W. Zhang, Z.-Y. Yang, S.-P. Zhang, e R.-D. Yang, «Synthesis, Characterization and Relaxation Properties of Four Non-ion Transition Metal Manganese(II), Cobalt(II), Nickel(II) and Copper (II) Complexes with Derivatives from Diethylene Triamine Pentaacetic Acid and Isoniazid», *Transition Met Chem*, vol. 31, fasc. 3, pp. 333–336, apr. 2006, doi: 10.1007/s11243-005-6411-2.
- [27] L. Dunbar *et al.*, «Copper complexes as a source of redox active MRI contrast agents», *Biometals*, vol. 28, fasc. 5, pp. 903–912, ott. 2015, doi: 10.1007/s10534-015-9875-3.
- [28] B. A. Bony, J. S. Baeck, Y. Chang, J. E. Bae, K. S. Chae, e G. H. Lee, «A Highly Efficient New T₁ MRI Contrast Agent with r₂/r₁ ≈ 1.0: Mixed Cu(II)/Gd(III) Oxide

- Nanoparticle», *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 36, fasc. 4, pp. 1203–1208, 2015, doi: 10.1002/bkcs.10230.
- [29] J. Liu, L. Li, R. Zhang, e Z. P. Xu, «The adjacent effect between Gd(III) and Cu(II) in layered double hydroxide nanoparticles synergistically enhances T₁-weighted magnetic resonance imaging contrast», *Nanoscale Horiz.*, vol. 8, fasc. 2, pp. 279–290, feb. 2023, doi: 10.1039/d2nh00478j.
- [30] H. Emadi e H. Mobarak, «Synthesis and characterization of copper ferrite nanoparticles and its application as MRI contrast agent», *Lett. Appl. NanoBioSci.*, vol. 8, fasc. 1, pp. 541–544, 2019, doi: 10.33263/LIANBS81.541544.
- [31] A. Shah *et al.*, «Design of the elusive proteinaceous oxygen donor copper site suggests a promising future for copper for MRI contrast agents», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 120, fasc. 27, p. e2219036120, lug. 2023, doi: 10.1073/pnas.2219036120.
- [32] M. C. Pagliero *et al.*, «Investigating Cu(II) Complexes for MRI: A Comprehensive Approach Using EPR, Relaxometry, and Computational Modeling», *Inorg. Chem.*, vol. 65, fasc. 10, pp. 5639–5652, mar. 2026, doi: 10.1021/acs.inorgchem.5c05926.

Capitolo 3. Tecniche utilizzate

3.1 Spettroscopia NMR

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) sfrutta l'interazione tra la componente magnetica delle onde radio e il momento magnetico dei nuclei sottoposti all'azione di un campo magnetico esterno. Il campo magnetico orienta i momenti magnetici generando un vettore magnetizzazione parallelo al campo (per convenzione orientato lungo l'asse z). Durante l'esperimento NMR più semplice, viene inviato sul campione un impulso di onde radio che eccita i nuclei inducendo la riorientazione del vettore magnetizzazione parallelamente al piano x-y. Dopo l'eccitazione, il sistema ritorna all'equilibrio e questo processo è caratterizzato da due tempi di rilassamento, T_1 e T_2 . Il tempo di rilassamento longitudinale o spin-reticolo T_1 descrive la crescita della componente z della magnetizzazione, mentre il tempo di rilassamento trasversale o spin-spin T_2 descrive il decadimento della magnetizzazione sul piano x-y. Il segnale raccolto sul piano x-y, il cosiddetto FID (Free Induction Decay), viene sottoposto alla trasformata di Fourier per ottenere uno spettro NMR, dal quale si possono ricavare molteplici informazioni [1].

In questo lavoro di tesi la spettroscopia NMR è stata applicata ai nuclei ^1H , per la caratterizzazione rilassometrica e per le misure BMS, e ai nuclei ^{17}O . Per la caratterizzazione rilassometrica si è impiegata spettroscopia NMR a bassa risoluzione, in cui si registra un solo segnale, attribuibile ai protoni dell'acqua, che costituisce la maggior parte del campione; per le altre misure si è invece utilizzato uno spettrometro ad alta risoluzione, che distingue i segnali dei vari nuclei, che a causa del diverso intorno chimico risuonano a frequenze diverse.

3.1.1 Rilassometria

La rilassometria è la misura della velocità di rilassamento di una specie in funzione del campo magnetico applicato. Le velocità di rilassamento longitudinale e trasversale sono definite, rispettivamente, come:

$$R_1 = \frac{1}{T_1} \quad (3.1)$$

e

$$R_2 = \frac{1}{T_2} \quad (3.2)$$

In presenza di sostanze paramagnetiche, come gli agenti di contrasto, il rilassamento dei nuclei viene accelerato grazie ai campi magnetici fluttuanti prodotti dagli spin degli elettroni spaiati. L'interazione nucleo-elettrone può essere descritta da una funzione di correlazione $C(t)$, che decade esponenzialmente col tempo:

$$C(t) \propto e^{-\frac{t}{\tau_c}} \quad (3.3)$$

τ_c è il tempo di correlazione. La trasformata di Fourier della funzione di correlazione restituisce una lorentziana nel dominio delle frequenze:

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (3.4)$$

Tale funzione è detta densità spettrale e fornisce l'intensità disponibile ad ogni frequenza per il rilassamento. Per $|\omega| \tau_c = 1$ si ha un punto di flesso; si dice che in quel punto la funzione subisce una dispersione. La velocità di rilassamento, che è proporzionale alla densità spettrale, viene riportata in funzione della frequenza (solitamente riportata in scala logaritmica): tale grafico viene detto profilo NMRD (Nuclear Magnetic Relaxation Dispersion) [2].

Un nucleo rilassa attraverso vari meccanismi. Il contributo dovuto agli elettroni spaiati viene messo in evidenza scrivendo la velocità osservata come somma di due termini:

$$R_{i,obs} = R_{i,d} + R_{i,p} \quad i = 1, 2 \quad (3.5)$$

dove $R_{i,d}$ è il contributo diamagnetico, cioè la velocità misurata in assenza di specie paramagnetiche, e $R_{i,p}$ è il contributo paramagnetico. Nel caso di soluzioni paramagnetiche diluite, il termine $R_{i,p}$ è proporzionale alla concentrazione delle specie paramagnetiche, qui indicate genericamente con M:

$$R_{i,p} = r_i [M] \quad i = 1, 2 \quad (3.6)$$

Il coefficiente di proporzionalità r_i è detto relassività. Essa rappresenta l'aumento della velocità di rilassamento, solitamente dei nuclei ^1H dell'acqua, in presenza di una concentrazione 1 mM della sostanza paramagnetica e si misura in $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$. La relassività viene usata come misura dell'efficacia di un agente di contrasto.

Poiché il campo magnetico prodotto da uno spin elettronico diminuisce con la distanza dallo ione paramagnetico, non tutte le molecole d'acqua sperimentano un aumento nella velocità di rilassamento. Le molecole maggiormente influenzate sono quelle direttamente a contatto con lo ione paramagnetico, che vengono dette molecole d'acqua di sfera interna (IS, inner-sphere). L'aumento della velocità di rilassamento viene trasmesso alle molecole del bulk tramite scambio chimico. Anche le molecole al di fuori della sfera di coordinazione, ma in vicinanza delle specie paramagnetiche, subiscono un aumento, ma in misura minore. Queste ultime vengono dette molecole d'acqua di sfera esterna (OS, outer-sphere). $R_{i,p}$ viene comunemente divisa in due contributi, uno per ciascuna sfera, e lo stesso accade per r_i :

$$R_{i,p} = R_{i,p}^{IS} + R_{i,p}^{OS} \quad i = 1, 2 \quad (3.7)$$

$$r_i = r_i^{IS} + r_i^{OS} \quad i = 1, 2 \quad (3.8)$$

Le molecole d'acqua di sfera esterna vengono spesso divise in due gruppi: il primo, definito seconda sfera (SS), include le molecole che formano legami a idrogeno con il legante o con l'acqua di sfera interna; il secondo comprende le molecole che diffondono liberamente intorno al complesso [1].

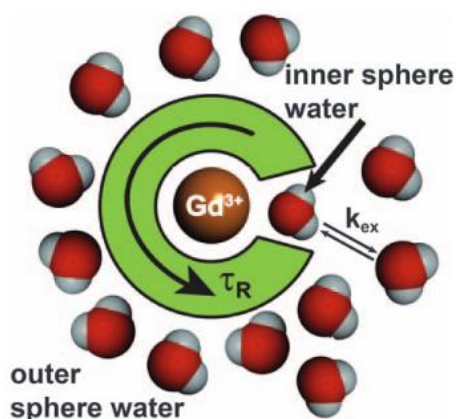


Figura 3.1 Rappresentazione schematica della sfera interna ed esterna in un complesso di gadolinio [1].

Il contributo di sfera interna è descritto per il rilassamento longitudinale dall'equazione di Luz e Meiboom e per il rilassamento trasversale dall'equazione di Swift e Connick:

$$R_{1,p}^{IS} = \frac{cq}{55.56} \frac{1}{T_{1M} + \tau_M} \quad (3.9)$$

$$R_{2,p}^{IS} = \frac{cq}{55.56} \frac{1}{\tau_M} \frac{\frac{1}{T_{2M}} \left(\frac{1}{T_{2M}} + \frac{1}{\tau_M} \right) + \Delta\omega_M^2}{\left(\frac{1}{T_{2M}} + \frac{1}{\tau_M} \right)^2 + \Delta\omega_M^2} \quad (3.10)$$

dove c è la concentrazione molale (mol kg^{-1}) dello ione paramagnetico, q è il numero di idratazione, cioè il numero di molecole d'acqua di sfera interna, τ_M è il tempo di residenza di una molecola d'acqua di sfera interna, T_{1M} e T_{2M} sono i tempi di rilassamento protonici longitudinale e trasversale dell'acqua di sfera interna, $\Delta\omega_M$ è la differenza tra i chemical shift di ^1H dell'acqua legata e dell'acqua di bulk (in assenza di scambio chimico).

Il rilassamento dell'acqua direttamente legata viene descritto dal modello Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM), secondo cui la velocità di rilassamento di uno spin nucleare in una molecola con un centro paramagnetico è data da:

$$R_{iM} = \frac{1}{T_{iM}} = \frac{1}{T_i^{DD}} + \frac{1}{T_i^{SC}} + \frac{1}{T_i^{Cu}} \quad i = 1, 2 \quad (3.11)$$

cioè è la somma di tre contributi dovuti a tre diversi meccanismi di rilassamento generati dall'interazione dello spin nucleare con lo spin elettronico. Il primo è il meccanismo di rilassamento dovuto all'accoppiamento dipolo-dipolo, che avviene attraverso lo spazio. Il secondo è il meccanismo di accoppiamento scalare, che avviene tramite interazioni di contatto. Il terzo è il meccanismo di Curie, dovuto all'accoppiamento dipolare dello spin nucleare con il momento magnetico elettronico indotto, che risulta dalla differenza di popolazione tra i livelli di spin elettronico.

Prendendo in considerazione il rilassamento longitudinale, il contributo del meccanismo dipolare è descritto dall'equazione di Solomon, che nel caso di sistemi con un solo elettrone spaiato, come lo ione Cu^{2+} ($S = 1/2$), è:

$$R_{1M}^{DD} = \frac{1}{10} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\hbar^2 \gamma_I^2 \gamma_S^2}{r^6} \left[\frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} \right] \quad (3.12)$$

L'equazione può essere generalizzata per sistemi con $S > 1/2$:

$$R_{1M}^{DD} = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\gamma_I^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r^6} \left[\frac{\tau_c}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_c^2} \right] \quad (3.13)$$

In queste equazioni:

μ_0 è la permeabilità magnetica del vuoto;

γ_I e γ_S sono i rapporti giromagnetici del nucleo e dell'elettrone;

g_e è il fattore g dell'elettrone;

μ_B è il magnetone di Bohr dell'elettrone;

ω_I e ω_S sono le frequenze di transizione dello spin nucleare e dello spin elettronico, legate al campo magnetico dalle equazioni $|\omega_I| = \gamma_I B_0$ e $|\omega_S| = \gamma_S B_0$;

r è la distanza tra il nucleo e l'elettrone;

τ_c è il tempo di correlazione.

Quest'ultimo comprende a sua volta tre contributi:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_S} + \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} \quad (3.14)$$

τ_S è il tempo di correlazione del rilassamento elettronico, τ_R il tempo di correlazione rotazionale, τ_M , come già visto, è il tempo di correlazione dello scambio chimico. Poiché nell'equazione (3.14) compaiono i reciproci dei tempi di correlazione, hanno un peso maggiore i tempi di correlazione più brevi.

Quando τ_S è predominante, τ_c può essere dipendente dal campo magnetico. Questo avviene nei sistemi con $S > 1/2$, nei quali il rilassamento elettronico avviene principalmente tramite il meccanismo di modulazione dello ZFS (zero field splitting): la deformazione del poliedro di coordinazione a causa di collisioni con le molecole del solvente genera uno ZFS (cioè una separazione dei livelli di spin elettronico) transiente che causa rilassamento. In questo caso il rilassamento elettronico può essere descritto da equazioni simili a quelle per il rilassamento nucleare, con la distinzione tra i tempi di rilassamento longitudinale T_{1e} e trasversale T_{2e} ,

che variano al variare del campo magnetico. Nel caso del rame Cu^{2+} , che ha $S = 1/2$, il rilassamento elettronico avviene tramite altri meccanismi (Raman, anisotropia dei tensori g e A , effetto Jahn-Teller dinamico) e τ_S è indipendente dal campo magnetico. Per il rame, i tempi di rilassamento sono lunghi (nell'ordine di 10^{-9}), a causa dell'ampia separazione tra i livelli di spin elettronico.

Il termine dovuto al meccanismo di accoppiamento scalare è invece descritto dall'equazione di Bloembergen, che per sistemi con $S = 1/2$ è:

$$R_{1M}^{SC} = \frac{1}{2} \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 \frac{\tau_c}{1 + (\omega_S - \omega_I)^2 \tau_c^2} \quad (3.15)$$

dove A è la costante di accoppiamento scalare, espressa in joule, ma spesso riportata in rad s^{-1} nella forma $A/\hbar$. In questo caso il tempo di correlazione è dato da:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_S} + \frac{1}{\tau_M} \quad (3.16)$$

cioè comprende solo il tempo di rilassamento elettronico e il tempo di scambio, poiché l'interazione di contatto non può essere alterata dalla rotazione delle molecole.

Invece per sistemi con $S > 1/2$ vale:

$$R_{1M}^{SC} = \frac{2}{3} S(S+1) \left(\frac{A}{\hbar} \right)^2 \frac{T_{2e}}{1 + \omega_S^2 T_{2e}^2} \quad (3.17)$$

Infine il meccanismo di Curie è descritto dalla seguente equazione:

$$R_{1M}^{Cu} = \frac{2}{5} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \frac{\omega_I^2 g_e^4 \mu_B^4 S^2 (S+1)^2}{(3k_B T)^2 r^6} \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} \quad (3.18)$$

Il tempo di correlazione è qui determinato solo da τ_R e da τ_M :

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} \quad (3.19)$$

Tra i tre meccanismi, quello che domina il rilassamento nella maggior parte dei sistemi di interesse chimico è l'accoppiamento dipolare [2].

Oltre che dal campo magnetico, la velocità di rilassamento dipende dalla temperatura, poiché i tempi di correlazione variano al variare della temperatura. τ_R viene descritto in modo approssimativo tramite l'equazione di Debye-Stokes:

$$\tau_R = \frac{4\pi\eta r_{eff}^3}{3k_B T} = \frac{\eta M}{d N_A k_B T} \quad (3.20)$$

dove η è la viscosità del solvente, r_{eff} è il raggio del complesso considerato come una sfera, M è la massa molare del complesso, d la densità del complesso, N_A è il numero di Avogadro. Questa equazione mette in evidenza anche la proporzionalità diretta tra τ_R e M : all'aumentare della massa molare del complesso, la sua rotazione rallenta, cioè τ_R si allunga.

In alternativa, per descrivere la dipendenza di τ_R dalla temperatura, si usa l'equazione di Arrhenius:

$$\tau_R = \tau_R^{298.15} e^{-\frac{E_R}{R}(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T})} \quad (3.21)$$

$\frac{1}{\tau_M}$, che è la costante cinetica di scambio k_{ex} , segue l'equazione di Eyring:

$$\frac{1}{\tau_M} = k_{ex} = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S_M}{R} - \frac{\Delta H_M}{RT}} = \frac{k_{ex}^{298.15} T}{298.15} e^{\frac{\Delta H_M}{R}(\frac{1}{298.15} - \frac{1}{T})} \quad (3.22)$$

Quindi i valori di τ_R e τ_M diminuiscono al crescere della temperatura. Questo causa una diminuzione del tempo di correlazione, da cui deriva una diminuzione di R_{1M} (e, quindi, della rilassività) nella zona prima della dispersione e un suo aumento nella zona dopo la dispersione. τ_M , tuttavia, compare anche al denominatore dell'equazione (3.9), per cui se τ_M è molto grande (scambio lento) si ha un effetto opposto, cioè la rilassività diminuisce al diminuire della temperatura: in questo caso è lo scambio il fattore che limita la rilassività.

Per quanto riguarda la seconda sfera, l'incremento della velocità di rilassamento può essere descritto con un'equazione analoga alla (3.9):

$$R_{1,p}^{SS} = \frac{c q_{SS}}{55.56} \frac{1}{T_{1M}^{SS} + \tau_M^{SS}} \quad (3.23)$$

in cui q_{SS} è il numero di molecole d'acqua di seconda sfera, T_{1M}^{SS} il loro tempo di rilassamento, normalmente descritto usando solo il meccanismo dipolare, τ_M^{SS} il tempo di

residenza delle molecole d'acqua nella seconda sfera. A causa delle deboli interazioni con il centro paramagnetico, le molecole di seconda sfera hanno tempi di residenza brevi, per cui τ_M^{SS} è spesso il contributo dominante nel tempo di correlazione.

Il rilassamento delle molecole di sfera esterna che diffondono liberamente viene invece trattato con equazioni sviluppate da Ayant, Freed e altri:

$$R_{1,p}^{OS} = \frac{32\pi}{405} \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{N_A[M]}{dD} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) [J_1^{OS}(\omega_1) + 7J_2^{OS}(\omega_S)] \quad (3.24)$$

$$J_k^{OS}(\omega) = Re \left\{ \frac{1 + \frac{z}{4}}{1 + z + \frac{4z^2}{9} + \frac{z^3}{9}} \right\}$$

$$z = \sqrt{i\omega\tau + \tau_D/T_{ke}} \quad \tau_D = \frac{d^2}{D} \quad k = 1, 2$$

d è la più breve distanza di approccio tra lo spin nucleare e lo spin elettronico, D è il coefficiente di diffusione per la diffusione traslazionale relativa, $[M]$ è la concentrazione molare dello ione paramagnetico, τ_D è il tempo di correlazione per la diffusione traslazionale relativa [1].

Per ottenere i profili NMRD dei complessi studiati in questo lavoro, la velocità di rilassamento R_1 è stata misurata per diversi valori di campo magnetico, in un intervallo di frequenze tra 0.01 MHz e 500 MHz. Nota la concentrazione della specie paramagnetica, è stata ricavata r_1 usando la relazione:

$$r_1 = \frac{R_{1,obs} - R_{1,d}}{[M]} \quad (3.25)$$

dove $R_{1,d} = 0.546 \text{ s}^{-1}$ a 283 K, 0.38 s^{-1} a 298 K, 0.28 s^{-1} a 310 K. Nei profili è stata riportata r_1 in funzione della frequenza. Sui profili NMRD è stata eseguita un'operazione di fitting, che insieme al fitting operato sui risultati delle analisi ^{17}O NMR ha permesso di ricavare numerosi parametri relativi al complesso: τ_S , τ_R , τ_M , E_R , ΔH_M , $A_H/\hbar$, $A_O/\hbar$, r , q .

Le velocità di rilassamento sono state misurate usando due strumenti diversi, poiché un singolo strumento non è in grado di misurare in tutto l'intervallo di campi magnetici.

3.1.1.1 Rilassometro a campo variabile

Lo strumento consente di effettuare misurazioni della velocità di rilassamento dei nuclei ^1H dell'acqua a frequenze tra 20 e 120 MHz (0.5 - 3 T). È dotato di un magnete superconduttore HTS-110 (prodotto da SCOTT Technology in associazione con Stelar srl Italia), che opera senza l'utilizzo di liquidi criogenici. Il profilo ^1H NMRD viene acquisito manualmente punto per punto: si imposta il campo magnetico desiderato cambiando l'intensità della corrente che circola nel magnete, quindi si misura la velocità di rilassamento longitudinale utilizzando la sequenza di "inversion recovery".

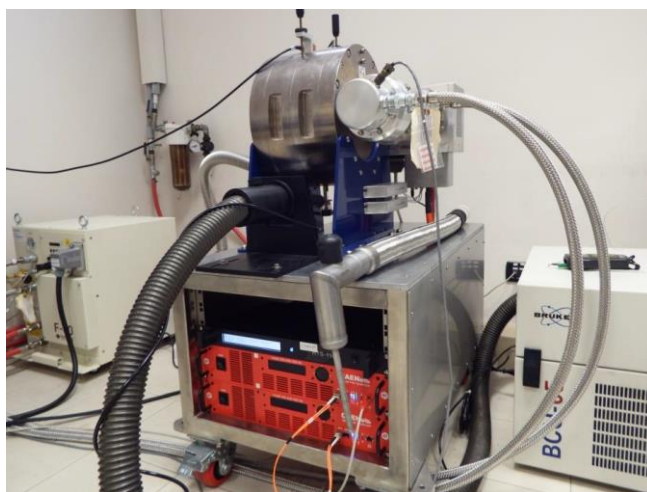


Figura 3.2 Rilassometro a campo variabile con magnete superconduttore HTS-110 da 3 T dell'infrastruttura PRISMA dell'Università del Piemonte Orientale.

La sequenza dell'esperimento di inversion recovery prevede, in ordine: un impulso a 180° , che ha l'effetto di portare la magnetizzazione sull'asse -z; un tempo di attesa τ_i , durante il quale avviene un parziale rilassamento; un impulso a 90° , che porta sul piano x-y la componente z; l'acquisizione del segnale. La sequenza viene ripetuta per 10-20 diversi valori di τ_i .

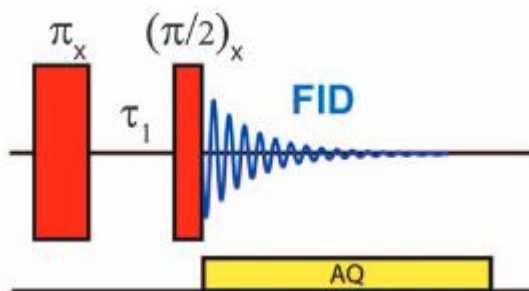


Figura 3.3 Schema dell'esperimento di inversion recovery [1].

Ad ogni acquisizione si rileva la componente z: per bassi valori di τ è negativa, in quanto il tempo lasciato al sistema per rilassare è poco e la magnetizzazione si trova ancora lungo -z; al crescere di τ , la magnetizzazione diventa meno negativa, per poi annullarsi e iniziare a crescere lungo +z, verso il valore di equilibrio $M_z(\infty)$. La crescita della magnetizzazione lungo l'asse z dopo un impulso a 180° è descritta dalla seguente equazione:

$$M_z(\tau) = M_z(\infty)[1 - 2e^{-\frac{\tau}{T_1}}] \quad (3.26)$$

La magnetizzazione M_z al tempo τ è proporzionale all'integrale o all'altezza della riga nello spettro NMR, perciò si riportano in un grafico gli integrali o le altezze delle linee ottenute in funzione di τ ed effettuando un fitting della curva si ottengono i parametri $M_z(\infty)$ e $1/T_1$.

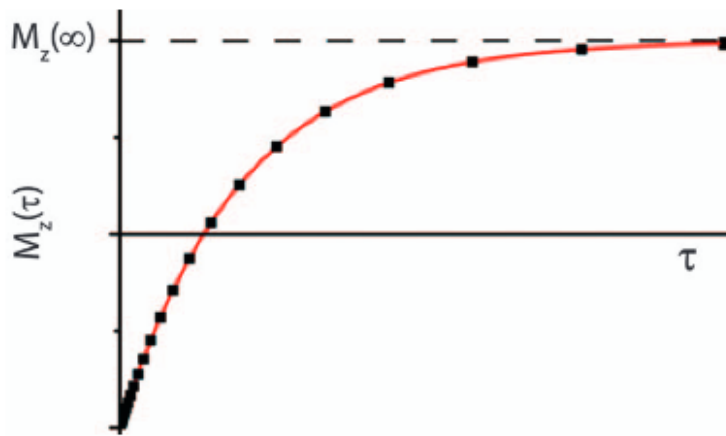


Figura 3.4 Magnetizzazione M_z in funzione di τ , descritta dall'equazione (3.26) [1].

3.1.1.2 Rilassometro a ciclo di campo veloce

Il rilassometro a ciclo di campo veloce (Fast Field Cycling, FFC) viene usato per le misurazioni a bassi campi magnetici, ai quali la magnetizzazione è troppo debole per poter essere misurata direttamente. A basse frequenze corrispondono infatti piccoli *gap* energetici, che causano piccole differenze di popolazione tra gli stati di spin e, quindi, un vettore magnetizzazione risultante piccolo. Lo strumento utilizzato è un rilassometro Stellar SMARtracer che opera tra 0.01 MHz e 12 MHz.



Figura 3.5 Rilassometro Stellar SMARtracer dell'infrastruttura PRISMA dell'Università del Piemonte Orientale.

Vengono utilizzate due diverse sequenze a seconda dell'intensità del campo magnetico di misura: la sequenza pre-polarizzata (PP) per bassi valori di campo magnetico (0.01 – 4 MHz) e la sequenza non polarizzata (NP) per campi più alti (≥ 4 MHz).

Sequenza PP

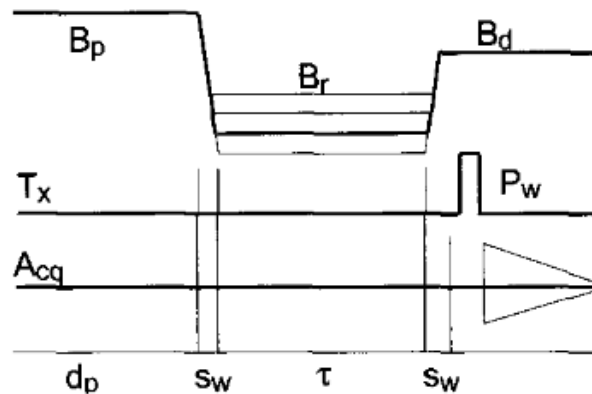


Figura 3.6 Schema della sequenza pre-polarizzata [3].

Inizialmente si applica al campione il campo magnetico di polarizzazione (B_p , fisso a 9 MHz) e lo si mantiene per un certo tempo (polarization time) pari ad almeno 5 volte il valore di T_1 del campione a quel campo. In questo modo si genera una forte magnetizzazione M_z . Il campo viene quindi portato molto rapidamente (in un tempo detto switch time 1) al campo di rilassamento (B_r), corrispondente alla frequenza di misura. Questo valore viene mantenuto per un tempo variabile τ , durante il quale la magnetizzazione decade esponenzialmente verso il suo valore di equilibrio, con un valore di T_1 relativo a quel campo. Il campo viene di nuovo cambiato rapidamente (switch time 2) per raggiungere il campo di rilevazione (B_d , fisso a

7.2 MHz). Appena raggiunti i 7.2 MHz, si applica un impulso a 90° per portare M_z sull'asse y e si registra il FID. Infine si spegne il campo, si lascia che il sistema rilassi completamente e si ripete la procedura per un certo numero di volte (di solito 16 in totale) variando ogni volta il tempo τ . L'intensità del segnale dipende dal campo di rilassamento e dal valore di τ . Minore è τ , maggiore è l'intensità del segnale, perché la magnetizzazione ha meno tempo per decadere verso il suo valore di equilibrio.

Questa procedura permette di aumentare la differenza di popolazione tra i livelli di spin, ottenendo un segnale sufficientemente elevato anche a campi bassi. Utilizzare sempre lo stesso campo di acquisizione, inoltre, rende possibile l'automatizzazione della procedura, in quanto è richiesto un unico rivelatore.

Sequenza NP

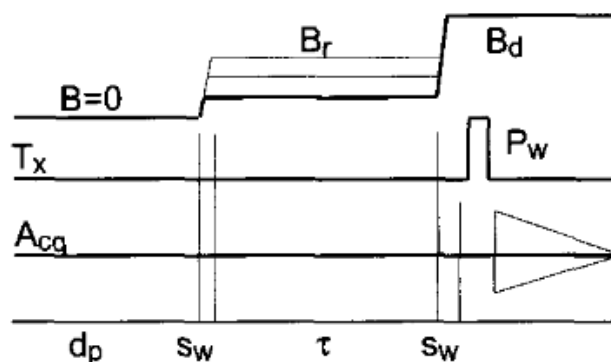


Figura 3.7 Schema della sequenza non polarizzata [3].

La sequenza non polarizzata è simile alla sequenza PP, ma non prevede la fase di pre-polarizzazione. A campi superiori a 4 MHz, infatti, il valore di magnetizzazione è tale da generare un buon rapporto segnale/rumore anche senza l'applicazione del campo a 9 MHz.

L'esperimento inizia quindi con il raggiungimento (in un breve tempo switch time 1) del valore del campo di rilassamento, che viene mantenuto per un tempo τ , durante il quale la magnetizzazione sale verso il suo valore di equilibrio a quel campo. Nello switch time 2 il campo viene portato al valore di rilevazione (7.2 MHz), poi viene applicato un impulso a 90° e si acquisisce il segnale. Anche in questo caso, il campo viene spento e la procedura ripetuta per 16 diversi valori di τ .

3.1.2 Metodo Evans

Uno ione paramagnetico è in grado di causare uno shift (Δ) nella frequenza di risonanza dei nuclei degli atomi con cui interagisce. Lo shift totale viene espresso come somma di quattro contributi:

$$\Delta = \Delta_d + \Delta_c + \Delta_p + \Delta_\chi \quad (3.27)$$

dove Δ_d è lo shift diamagnetico, che si verifica solo per gli atomi direttamente coordinati allo ione paramagnetico, ma nella spettroscopia ^1H -NMR è solitamente trascurabile; Δ_c è lo shift di contatto, che dipende dalla delocalizzazione della densità degli elettroni spaiati ed è particolarmente rilevante per gli atomi direttamente legati allo ione metallico; Δ_p è il termine dipolare o di pseudocontatto, che dipende dalla vicinanza spaziale allo ione; Δ_χ è lo shift legato alla variazione della suscettività magnetica di bulk (Bulk Magnetic Susceptibility, BMS) e interessa allo stesso modo tutti gli atomi presenti in soluzione. Quest'ultimo termine è legato alla concentrazione della specie paramagnetica dall'equazione:

$$\Delta_\chi = \frac{4\pi c s}{T} \left(\frac{\mu_{eff}}{2.84} \right)^2 \times 10^3 \quad (3.28)$$

dove Δ_χ è espresso in ppm, c è la concentrazione della specie paramagnetica in soluzione in mol L^{-1} , s è un parametro legato alla forma del tubo NMR e alla sua posizione rispetto al campo magnetico ($s = 1/3$ per un tubo cilindrico parallelo al campo magnetico), T è la temperatura in K, μ_{eff} è il momento magnetico efficace espresso in magnetoni di Bohr. Se si aggiunge ad una soluzione acquosa di una specie paramagnetica una sostanza che non ha interazioni chimiche con il complesso (ad esempio l'alcol *t*-butilico), l'unica variazione nella sua frequenza di risonanza sarà dovuta al contributo BMS. Questo viene sfruttato nel metodo Evans per la misura della concentrazione di una specie paramagnetica in soluzione: lo shift Δ_χ viene misurato con uno spettrometro NMR e tramite l'equazione (3.28) si ricava la concentrazione del complesso, noto il suo momento magnetico. In alternativa, nota la concentrazione, si può sfruttare l'equazione per ricavare il momento magnetico.

Sperimentalmente, si è utilizzato un tubo NMR da 3 mm, in cui sono stati inseriti:

- 188 μL di soluzione del complesso paramagnetico
- 22 μL di D_2O con il 10% in volume di alcol *t*-butilico
- 10 μL di H_2O milli-Q.

È stato misurato il chemical shift dei gruppi $-CH_3$ dell'alcol *t*-butilico in tale soluzione e in una soluzione analoga priva della specie paramagnetica, per ricavare la differenza $\Delta\chi$.

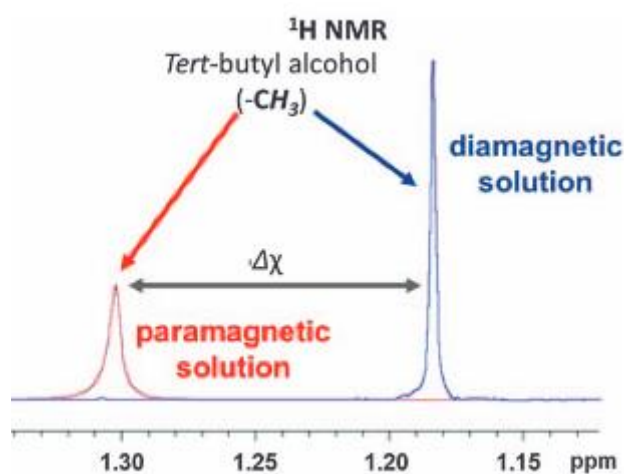


Figura 3.8 Rappresentazione grafica dello shift BMS [1].

Lo strumento utilizzato è un Bruker 500 Ultrashield Plus con magnete da 11.74 T (corrispondente, per il protone, ad una frequenza di 500 MHz).



Figura 3.9 Spettrometro NMR Bruker 500 Ultrashield Plus dell'infrastruttura PRISMA dell'Università del Piemonte Orientale.

3.1.3 Spettroscopia ^{17}O NMR a temperatura variabile (^{17}O VT-NMR)

La spettroscopia NMR è una tecnica in grado di dare informazioni sui processi dinamici che avvengono in soluzione, perché un processo di scambio influenza sia la frequenza sia la velocità di rilassamento, che sono correlate, rispettivamente, al chemical shift e alla larghezza dei segnali NMR. Per questo, osservando i segnali degli atomi di ossigeno dell'acqua, si può studiare lo scambio delle molecole d'acqua di sfera interna in un complesso paramagnetico. La differenza tra la frequenza di risonanza dell' ^{17}O nella soluzione paramagnetica e la sua frequenza in una soluzione diamagnetica è legata alla velocità di scambio $\frac{1}{\tau_M}$ dall'equazione:

$$\Delta\omega_p = \omega_p - \omega_d = \frac{p_M}{\tau_M^2} \frac{\Delta\omega_M}{\left(R_{2M} + \frac{1}{\tau_M}\right)^2 + (\Delta\omega_M)^2} + \Delta\omega^{OS} \quad (3.29)$$

dove $p_M = \frac{cq}{55.56}$ è la frazione molare dell'acqua di sfera interna, $\Delta\omega_M$ è la differenza di chemical shift tra una molecola d'acqua legata al centro paramagnetico e una non legata (equazione (3.30)), R_{2M} è la velocità di rilassamento trasversale dell' ^{17}O dell'acqua legata e $\Delta\omega^{OS}$ è il contributo di sfera esterna.

$$\Delta\omega_M = \frac{g_L \mu_B S(S+1) B A}{3k_B T} \frac{1}{\hbar} \quad (3.30)$$

L'aumento della velocità di rilassamento è invece dato, come già visto nelle equazioni (3.7) e (3.10), da:

$$R_{2,p} = R_{2,obs} - R_{2,d} = \frac{p_M}{\tau_M} \frac{R_{2M}^2 + R_{2M} \frac{1}{\tau_M} + (\Delta\omega_M)^2}{\left(R_{2M} + \frac{1}{\tau_M}\right)^2 + (\Delta\omega_M)^2} + R_2^{OS} \quad (3.31)$$

Se $\Delta\omega_M$ è piccolo, l'equazione (3.31) si riduce a:

$$R_{2,p} = \frac{p_M}{T_{2M} + \tau_M} \quad (3.32)$$

Aumentando la temperatura, τ_M diminuisce (eq. (3.22)), mentre T_{2M} solitamente aumenta, quindi l'andamento di $R_{2,p}$ al variare della temperatura dipende dal termine che domina tra

i due. In caso di scambio veloce, τ_M è trascurabile e l'aumento di T_{2M} fa diminuire $R_{2,p}$ quando la temperatura cresce. In caso di scambio lento, la diminuzione di τ_M fa sì che $R_{2,p}$ aumenti con la temperatura. Spesso si osserva un massimo nella curva di $R_{2,p}$ in funzione di T , che indica il passaggio da una regione di scambio lento ad una regione di scambio veloce. In corrispondenza del massimo si osserva un punto di flesso nel grafico di $\Delta\omega_p$ in funzione della temperatura.

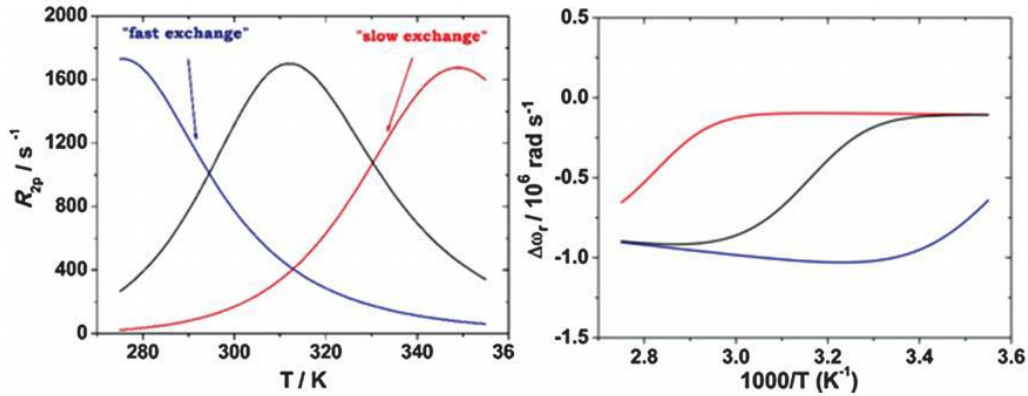


Figura 3.10 Dipendenza dalla temperatura della velocità di rilassamento trasversale ^{17}O (sinistra) e del chemical shift ridotto (destra) per un complesso di gadolinio. Le curve blu rappresentano una situazione di scambio veloce, le curve rosse una situazione di scambio lento, le curve nere una situazione intermedia [1].

I dati sperimentali vengono solitamente riportati come $\ln \frac{1}{T_{2r}}$ e $\Delta\omega_r$ in funzione di $1000/T$. $\frac{1}{T_{2r}}$ e $\Delta\omega_r$ sono la velocità di rilassamento trasversale ridotta e il chemical shift ridotto, definiti nel seguente modo:

$$\frac{1}{T_{2r}} = R_{2r} = \frac{R_{2,p}}{p_M} \quad (3.33)$$

$$\Delta\omega_r = \frac{\Delta\omega_p}{p_M} \quad (3.34)$$

I campioni per le misure ^{17}O NMR sono stati preparati inserendo un tubo da 3 mm:

- 188 μL di soluzione del complesso paramagnetico
- 22 μL di D_2O con il 10% in volume di alcol *t*-butilico
- 10 μL di H_2O marcata con ^{17}O al 40%.

Sono stati registrati gli spettri ^{17}O NMR e ^1H NMR a diverse temperature, nell'intervallo 275-350 K, sia del campione contenente il complesso sia di un riferimento diamagnetico. Anche in questo caso si è utilizzato lo strumento Bruker 500 Ultrashield Plus a 11.74 T. Il valore di $\Delta\omega_r$ è stato calcolato, per ogni temperatura, con la formula:

$$\Delta\omega_r = \frac{1}{p_M} (\Delta_{17\text{O}} - \Delta_{1\text{H}}) \times \omega_{17\text{O}}^0 \times 2\pi \quad (3.35)$$

dove $\Delta_{17\text{O}}$ è la differenza tra i chemical shift dell' ^{17}O dell'acqua misurati in soluzione paramagnetica e diamagnetica, $\Delta_{1\text{H}}$ è la differenza tra i chemical shift dell' ^1H dell'alcol *t*-butilico misurati in soluzione paramagnetica e diamagnetica, $\omega_{17\text{O}}^0$ è la frequenza di Larmor dell' ^{17}O (67.8 MHz a 11.74 T). $\Delta_{1\text{H}}$ viene sottratto per eliminare il contributo dovuto alla suscettività magnetica. La velocità di rilassamento trasversale ridotta è stata invece calcolata misurando le larghezze di riga:

$$\frac{1}{T_{2r}} = \frac{FWHM_p - FWHM_d}{p_M} \times \pi \quad (3.36)$$

$FWHM_p$ e $FWHM_d$ sono le larghezze a metà altezza del picco dell' ^{17}O dell'acqua nello spettro del campione paramagnetico e del riferimento diamagnetico.

Questa procedura sperimentale consente di eseguire contemporaneamente anche la misura della concentrazione con il metodo Evans.

3.2 HPLC-MS

Per verificare la riuscita delle reazioni e per separare i vari prodotti di reazione è stata utilizzata la cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa (HPLC-MS). Lo spettrometro di massa opera convertendo le molecole di analita in ioni e analizzando gli ioni e i loro frammenti sulla base del loro rapporto massa su carica (m/z). Il metodo di ionizzazione utilizzato è l'Electrospray Ionisation (ESI), un metodo "soft", che produce poca frammentazione degli analiti. Il campione liquido che esce dalla colonna cromatografica viene pompato attraverso un capillare metallico mantenuto ad un potenziale di 3-5 kV e viene nebulizzato sulla punta del capillare per formare un fine spray di gocce cariche. Le gocce vengono fatte evaporare rapidamente per mezzo di calore e azoto e la carica elettrica delle gocce si trasferisce sugli analiti. Gli analiti carichi a questo punto vengono introdotti nell'alto vuoto dello spettrometro di massa. Lo strumento può essere impostato in modo da

rilevare gli ioni positivi o gli ioni negativi. Le molecole con un singolo gruppo funzionale in grado di supportare una carica elettrica diventano ioni carichi singolarmente: si potrà osservare $[M+H]^+$ se si rilevano gli ioni positivi, $[M-H]^-$ se si rilevano gli ioni negativi. In presenza di sali si può osservare anche l'aggiunta di un catione o di un anione: $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+formiato]^-$, $[M+acetato]^-$. Molecole con più gruppi funzionali possono generare ioni con carica multipla: $[M+2H]^{2+}$, $[M+3H]^{3+}$ e così via. L'acquisizione di cariche multiple è un vantaggio nel caso degli analiti ad alta massa molecolare che, con una singola carica, avrebbero un m/z troppo alto per essere rilevati dal detector [4].

3.3 Spettroscopia UV-visibile

La spettroscopia UV-visibile di assorbimento si basa sull'assorbimento da parte del campione di radiazioni ultraviolette e luce visibile (lunghezza d'onda compresa tra circa 200 e circa 800 nm). Le energie di queste radiazioni corrispondono alle differenze di energia tra gli stati elettronici degli atomi e delle molecole, per cui la radiazione inviata sul campione promuove una transizione da uno stato elettronico ad un altro.

La spettroscopia UV-visibile è una tecnica molto utile nella caratterizzazione dei complessi di coordinazione: gli spettri possono fornire informazioni sullo ione metallico, sui leganti, sulla geometria e sullo stato elettronico del metallo. Permettono inoltre di rilevare cambi nella coordinazione e quindi di seguire reazioni, processi di complessazione, decomplessazione e riarrangiamento. Le informazioni principali sono ricavate da transizioni centrate sullo ione metallico, transizioni $d-d$ nel caso dei metalli di transizione. Si tratta di transizioni formalmente proibite per momento di dipolo per motivi di simmetria, per cui le corrispondenti bande presentano basse intensità, ma sono comunque rilevabili con qualsiasi spettrometro UV-visibile. Tali transizioni sono spesso responsabili dei colori dei complessi. In uno spettro UV-visibile si possono osservare inoltre bande ad alta intensità dovute a transizioni a trasferimento di carica (da legante a metallo o viceversa) [5].

3.4 DLS

La tecnica di diffusione dinamica della luce (Dynamic Light Scattering, DLS) serve a misurare la dimensione di piccole particelle in un liquido sfruttando la loro interazione con la luce. Nelle analisi DLS viene inviato sul campione un raggio laser e viene misurata l'intensità della luce diffusa dalle particelle a vari angoli in istanti di tempo successivi. A causa del moto browniano delle particelle, l'intensità della luce diffusa ad un determinato

angolo oscilla nel tempo e si può definire per essa una funzione di correlazione. Poiché le particelle più piccole sono più soggette a forze casuali, la loro intensità fluttua più rapidamente e le loro funzioni di correlazione decadono più rapidamente rispetto a quanto avviene per le particelle più grandi. Dalla velocità di decadimento (Γ) della funzione di correlazione è quindi possibile risalire, tramite l'equazione di Stokes-Einstein, al diametro idrodinamico delle particelle (R_H) [6]:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta\langle\Gamma\rangle} q^2 \quad (3.37)$$

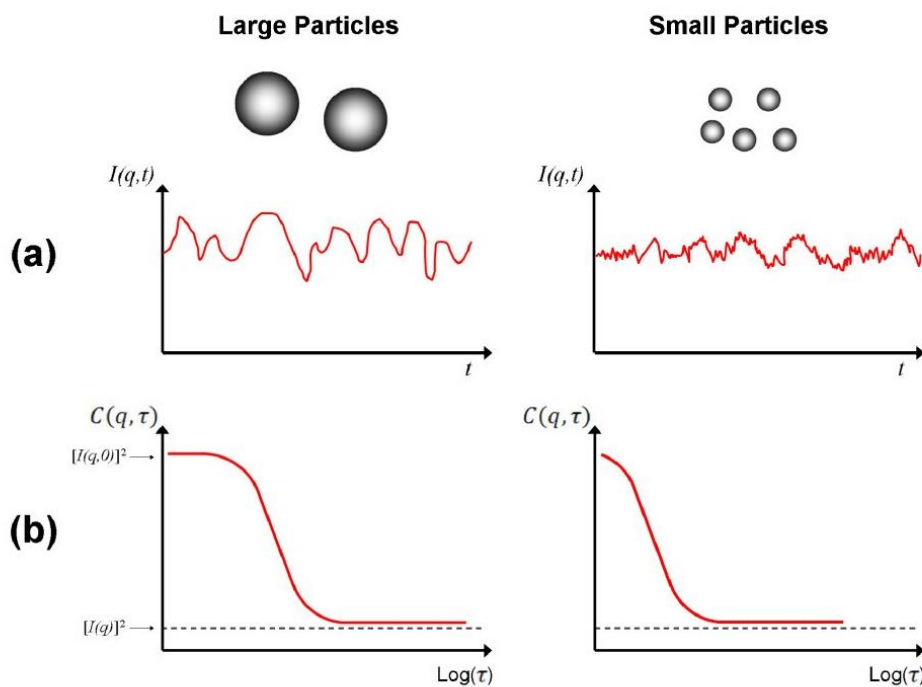


Figura 3.11 Illustrazione schematica dell'intensità misurata (a) per particelle grandi e piccole e delle corrispondenti funzioni di autocorrelazione (b) nel dynamic light scattering [6].

3.5 Potenziale zeta

Intorno ad una particella carica in una soluzione si possono identificare due strati: il primo è lo strato di Stern, fisso rispetto alla superficie della particella e formato da cariche di segno opposto, il secondo è uno strato mobile, detto strato diffuso. Il potenziale zeta (ζ) o potenziale elettrocinetico viene definito come il potenziale sulla superficie che separa la particella in movimento dal liquido circostante, che corrisponde alla superficie esterna dello strato di Stern. Il potenziale zeta viene comunemente misurato per mezzo dell'elettroforesi, cioè analizzando il movimento delle particelle sospese in un mezzo ionico acquoso quando una

differenza di potenziale viene applicata tra due elettrodi immersi nel liquido. Il metodo più utilizzato per calcolare la mobilità elettroforetica (data dalla velocità delle particelle U divisa per l'intensità del campo elettrico E e misurata in $\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$) è l'Electrophoretic Light Scattering (ELS). Per calcolare ζ (V) si può usare l'equazione di Henry:

$$\frac{U}{E} = \frac{2\epsilon\zeta F(ka)}{3\eta} \quad (3.38)$$

dove ϵ è la permittività dielettrica del solvente ($\text{kg m V}^{-2} \text{s}^{-2}$), η è la viscosità ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$) e $F(ka)$ è la funzione di Henry, che è adimensionale e assume un valore tra 1 e 1.5, dipendentemente dal rapporto dimensione della particella / lunghezza di Debye.

Il potenziale zeta dipende da vari fattori, come il pH, la forza ionica, la temperatura e la concentrazione. Per la buona riuscita dell'esperimento elettroforetico è bene utilizzare sospensioni molto diluite.

Se il potenziale zeta è negativo, l'aggiunta di una base rende ancora più negativa la carica delle particelle e abbassa il potenziale zeta. Al contrario, l'aggiunta di acido porta alla neutralizzazione della carica e, successivamente, ad un sistema carico positivamente. Il valore di pH a cui la carica superficiale è nulla viene detto punto isoelettrico. La determinazione del potenziale zeta e del punto isoelettrico di un materiale è importante per avere informazioni sulla sua stabilità: particelle che, ad un dato pH, hanno un potenziale molto positivo o molto negativo si respingeranno e formeranno una sospensione stabile, mentre particelle con potenziale basso o nullo tenderanno ad aggregare [7], [8].

3.6 Bibliografia

- [1] L. Helm *et al.*, «Gadolinium-based Contrast Agents», in *Contrast Agents for MRI: Experimental Methods*, V. C. Pierre e M. J. Allen, A c. di, The Royal Society of Chemistry, 2017, p. 0. doi: 10.1039/9781788010146-00121.
- [2] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, e E. Ravera, *NMR of Paramagnetic Molecules: Applications to Metallobiomolecules and Models*. Elsevier, 2016.
- [3] E. Anoardo, G. Galli, e G. Ferrante, «Fast-field-cycling NMR: Applications and instrumentation», *Appl. Magn. Reson.*, vol. 20, fasc. 3, pp. 365–404, apr. 2001, doi: 10.1007/BF03162287.
- [4] J. J. Pitt, «Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry», *Clin Biochem Rev*, vol. 30, fasc. 1, pp. 19–34, feb. 2009.

- [5] G. E. Tranter, «Inorganic Chemistry Applications of UV-Visible Absorption and Circular Dichroism Spectroscopy», in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier, 2010, pp. 1045–1047. doi: 10.1016/B978-0-12-374413-5.00059-2.
- [6] J. Lim, S. P. Yeap, H. X. Che, e S. C. Low, «Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering», *Nanoscale Res Lett*, vol. 8, fasc. 1, p. 381, set. 2013, doi: 10.1186/1556-276X-8-381.
- [7] A. Serrano-Lotina, R. Portela, P. Baeza, V. Alcolea-Rodriguez, M. Villarroel, e P. Ávila, «Zeta potential as a tool for functional materials development», *Catalysis Today*, vol. 423, p. 113862, nov. 2023, doi: 10.1016/j.cattod.2022.08.004.
- [8] C. N. Lunardi, A. J. Gomes, F. S. Rocha, J. De Tommaso, e G. S. Patience, «Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential», *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 99, fasc. 3, pp. 627–639, 2021, doi: 10.1002/cjce.23914.

Capitolo 4. Obiettivi del lavoro

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati alcuni complessi di Cu(II) basati sul legante AAZTA. Come spiegato nei capitoli precedenti, il Cu è un potenziale candidato al ruolo di agente di contrasto nell'imaging di risonanza magnetica. Sebbene i complessi di Cu disponibili attualmente non abbiano prestazioni pari a quelle degli agenti di contrasto a base di gadolinio, manganese o ferro, è stato dimostrato che, in particolari sistemi, anche i derivati a base di Cu(II) possono presentare valori di rilassività molto alti. Per questo è necessario studiare diversi complessi di rame per capire come i vari parametri legati alla struttura molecolare ed elettronica influenzino la rilassività. Questi studi potrebbero essere utili per realizzare complessi o nanosistemi a base di metalli di transizione con alta rilassività, alta stabilità e buona tollerabilità *in vivo*, per sostituire i complessi a base di gadolinio attualmente utilizzati. Il primo complesso sintetizzato in questo lavoro è il $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, realizzato con un legante, l'AAZTA, che è presente nella letteratura e forma complessi ad elevata stabilità con vari metalli, tra cui il rame [1], [2], [3]. La presenza di gruppi carbossilici liberi rende questo complesso funzionalizzabile in vari modi: questi gruppi sono stati sfruttati nelle reazioni con gruppi amminici per produrre derivati del $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$. Inizialmente è stato sintetizzato un complesso ottenuto dalla reazione con una molecola di glucosammina, in seguito il $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ è stato legato al chitosano, per ottenere dei nanogel. Altri sistemi sono stati preparati combinando il $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ con l'ammina tren (tris(2-amminoetil)ammina), che possiede tre gruppi amminici primari in grado di reagire. Da questa reazione sono state ottenute e isolate piccole quantità dei tre diversi prodotti: tren con una molecola di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, con due molecole di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ e con tre molecole di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ legate.

Tutti i complessi sintetizzati sono stati caratterizzati con un approccio multitecnica. Per verificare la formazione del prodotto desiderato è stata utilizzata l'HPLC accoppiata a spettrometro di massa. Le proprietà rilassometriche sono state studiate tramite la misura della velocità di rilassamento longitudinale (R_1) dei nuclei ^1H , in funzione del campo magnetico applicato, della temperatura e del pH, e la misura della velocità di rilassamento trasversale (R_2) e della variazione di chemical shift ($\Delta\omega$) in funzione della temperatura del nucleo ^{17}O dell'acqua in assenza e in presenza dello ione paramagnetico. Si sono utilizzate inoltre la spettroscopia UV-visibile e, per i nanogel, le analisi DLS e del potenziale zeta.

4.1 Bibliografia

- [1] S. Aime *et al.*, «[Gd-AAZTA]⁻: A New Structural Entry for an Improved Generation of MRI Contrast Agents», *Inorg. Chem.*, vol. 43, fasc. 24, pp. 7588–7590, nov. 2004, doi: 10.1021/ic0489692.
- [2] Z. Baranyai, F. Uggeri, G. B. Giovenzana, A. Bényei, E. Brücher, e S. Aime, «Equilibrium and Kinetic Properties of the Lanthanoids(III) and Various Divalent Metal Complexes of the Heptadentate Ligand AAZTA», *Chemistry – A European Journal*, vol. 15, fasc. 7, pp. 1696–1705, 2009, doi: 10.1002/chem.200801803.
- [3] Z. Baranyai *et al.*, «Equilibrium, Kinetic and Structural Studies of AAZTA Complexes with Ga³⁺, In³⁺ and Cu²⁺», *European Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 2013, fasc. 1, pp. 147–162, 2013, doi: 10.1002/ejic.201201108.

Capitolo 5. Sistemi molecolari e nanoparticellari a base di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$

Il complesso di rame con cui si è scelto di iniziare questo lavoro è il $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, costituito da uno ione Cu^{2+} e dal legante eptadentato AAZTA (6-[bis(idrossicarbonilmetil)ammino]-1,4-bis(idrossicarbonilmetil)-6-metilperidro-1,4-diazepina)). La scelta di questo legante è dovuta alla sua particolare caratteristica di possedere sette atomi donatori, ma impiegarne solo cinque nella chelazione del rame, consentendo allo ione metallico di legare anche una molecola d'acqua. La presenza di almeno una molecola d'acqua di sfera interna è fondamentale, soprattutto nel caso del rame, per avere un efficace rilassamento delle molecole d'acqua. Un'altra ragione che ha portato a concentrarsi su questo complesso è la sua elevata stabilità. Il complesso è stato impiegato in questo lavoro per preparare degli ulteriori sistemi a base di Cu(II), cercando di sfruttare l'aumento di peso molecolare per ottenere un aumento della rilassività. Sono stati sintetizzati dei nanogel legando il complesso al chitosano, basandosi su lavori presenti in letteratura, nei quali sono stati prodotti dei nanogel ad altissima rilassività a base di chitosano e complessi paramagnetici di lantanidi o di manganese [4], [5]. Come passaggio intermedio, è stato studiato un complesso prodotto legando il $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ ad una molecola di glucosammina, monomero del chitosano.

5.1 $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$

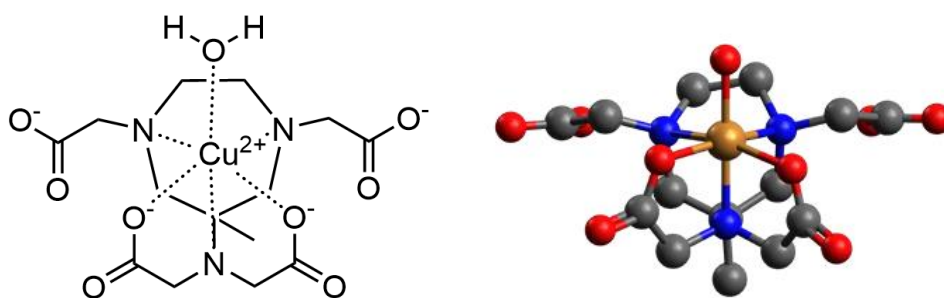


Figura 5.1 Formula di struttura e struttura ball-and-stick del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$.

La struttura del $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, ricavata tramite diffrazione di raggi X del complesso in forma cristallina, è riportata in letteratura [1] e rivela una geometria ottaedrica distorta. Lo ione Cu^{2+} è coordinato in posizione equatoriale da un atomo di N dell'anello, dall'atomo di N del gruppo imminodiacetato, da un atomo di O carbossilico e dall'atomo di O di una

molecola d'acqua. Le posizioni assiali sono occupate dall'altro atomo di N dell'anello e da un altro O carbossilico. I due gruppi carbossilici legati agli atomi di N dell'anello rimangono liberi. In letteratura è riportata anche l'ipotesi che la molecola d'acqua venga sostituita da un carbossilato quando il legante è completamente deprotonato. Il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ presenta elevata stabilità: la costante ($\log K$) riportata è 22.27 [1].

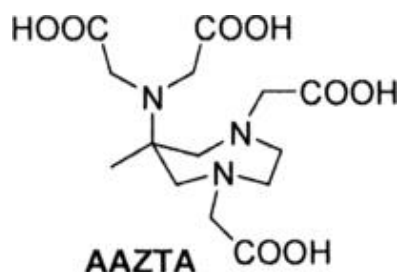


Figura 5.2 Il legante AAZTA.

Per preparare il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, 54 mg (0.15 mmol) di AAZTA sono stati sciolti in 5 mL di acqua milli-Q, portando il pH da 2.4 a 4.4 tramite l'aggiunta di NaOH 1 M. Parallelamente, è stata preparata una soluzione acquosa equimolare di $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Quest'ultima è stata aggiunta goccia a goccia alla prima soluzione, sotto agitazione e a temperatura ambiente. Durante l'aggiunta si è osservato un immediato cambiamento del colore, dovuto alla formazione del complesso di coordinazione del Cu^{2+} . Il pH della risultante soluzione è stato portato a circa 4.2 per favorire il completamento della chelazione del Cu^{2+} , ed è stata lasciata in agitazione per 24 ore. Il giorno successivo, il pH è stato portato a 10.2, utilizzando NaOH 0.5 M, per favorire la precipitazione dello ione $\text{Cu}(\text{II})$ libero in eccesso, sotto forma di idrossido. Dopo 4 ore, la sospensione è stata filtrata tramite un filtro per siringa 0.2 μm e neutralizzata con HCl diluito.



Figura 5.3 Foto della soluzione di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ preparata in laboratorio.

5.1.1 Caratterizzazione del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$

La concentrazione di Cu^{2+} della soluzione preparata è stata determinata per mineralizzazione del complesso con acido nitrico e misurazione del valore di R_1 a 32 MHz e 298 K. Il valore della concentrazione di Cu^{2+} equivale a 12.8 mM ed è stato calcolato usando la seguente equazione:

$$[\text{Cu}^{2+}] = \frac{R_1 - R_d}{r_1}$$

in cui R_1 è il valore misurato tramite inversion recovery, R_d è la velocità di rilassamento diamagnetica, misurata precedentemente per una soluzione contenente H_2O e HNO_3 nelle stesse proporzioni, r_1 è la relassività del Cu^{2+} come acquoione, anch'essa misurata precedentemente.

In seguito, tramite il metodo Evans (descritto nel capitolo 3, sezione 3.1.2), è stato determinato il momento magnetico effettivo μ_{eff} , che corrisponde a 1.87 B.M.

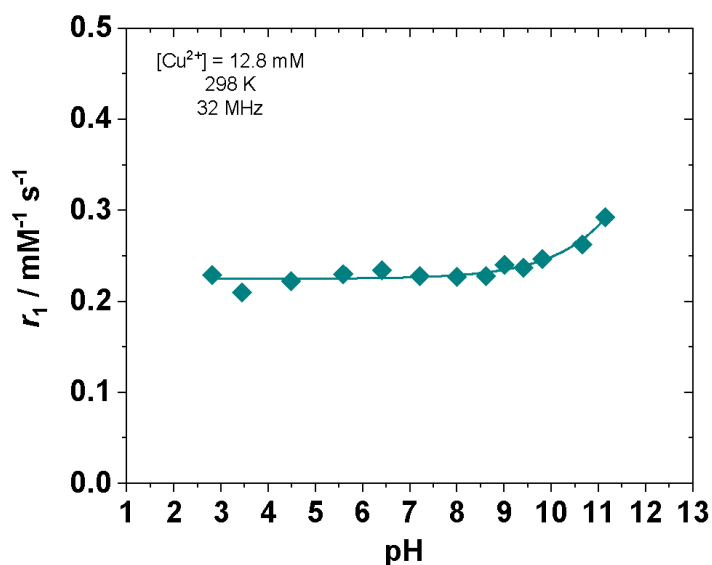


Figura 5.4 Dipendenza dal pH del valore di r_1 per il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$.

Per valutare la stabilità del complesso al variare del pH, sono state effettuate misure rilassometriche ad una frequenza di Larmor del protone di 32 MHz e ad una temperatura di 298 K. Nell'intervallo di pH 2-9 il valore di relassività è costante: questo suggerisce una buona stabilità del sistema nell'intervallo esplorato, con assenza di fenomeni di decomplessazione o alterazione di idratazione. Il valore di relassività misurato (0.23 mM^{-1}

s^{-1} a pH 7, 32 MHz e 298 K) è compatibile con un complesso di rame con $q = 1$, per cui si può concludere che la molecola d'acqua non abbandona la sfera di coordinazione. A partire da pH 9 si osserva un aumento progressivo della rilassività, che potrebbe suggerire una graduale deprotonazione dell'acqua coordinata [1], con conseguente attivazione di uno scambio prototropico del protone catalizzato dall'ambiente basico, fenomeno osservato anche per altri composti di Cu^{2+} ($[Cu(TACN)]^{2+}$) [2].

La stabilità del complesso al variare del pH è stata studiata anche tramite spettroscopia UV-visibile, tecnica che può fornire informazioni complementari a quelle rilassometriche.

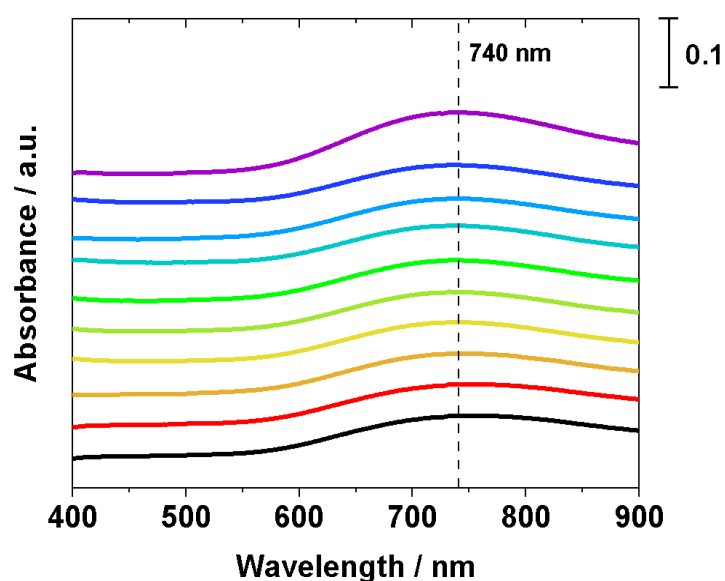


Figura 5.5 Spettri UV-VIS del complesso $[Cu(AAZTA)]^{2-}$ (400-900 nm), registrati in funzione del pH (da nero, pH 3, a viola, pH 12, per ogni unità di pH). La concentrazione di Cu^{2+} è 0.64 mM.

Una soluzione diluita del complesso è stata utilizzata per registrare gli spettri UV-VIS a diversi valori di pH, per valutare eventuali cambiamenti nella lunghezza d'onda o nell'intensità di assorbimento, che possono dare informazioni su cambiamenti nella coordinazione del metallo. In tutti gli spettri si osserva una banda di assorbimento a circa 740 nm, attribuibile alle transizioni $d-d$ del Cu^{2+} , in linea con gli spettri UV-VIS di composti simili a base di Cu^{2+} . Non si osservano differenze significative nell'intervallo di pH esplorato, suggerendo l'assenza di variazioni nella coordinazione dello ione metallico in queste condizioni.

Utilizzando una soluzione di complesso a pH neutro, sono stati registrati i profili ^1H NMRD in funzione della frequenza di Larmor del protone. I profili ^1H NMRD consentono di avere informazioni qualitative sui meccanismi di rilassamento e sulla dinamica di scambio. La loro analisi quantitativa, che si esegue tramite fitting dei profili con le equazioni della velocità di rilassamento presentate nel capitolo 3, permette di ottenere i valori di alcuni parametri legati alla struttura e alla dinamica del complesso, dai quali dipende la rilassività.

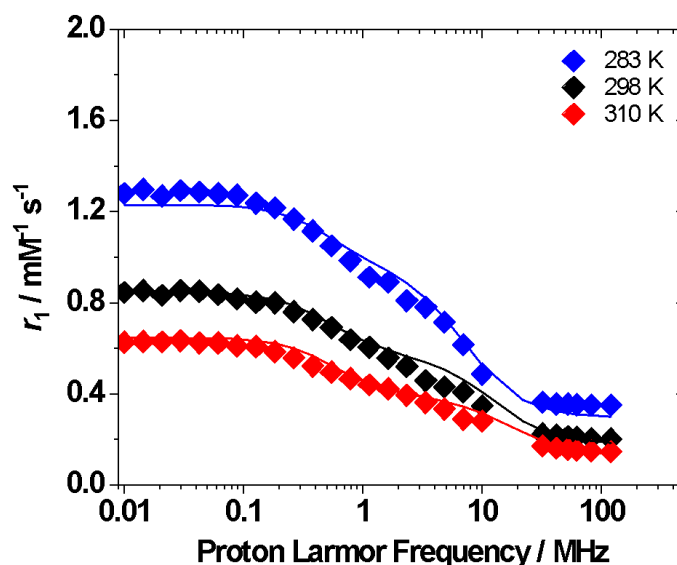


Figura 5.6 Profili ^1H NMRD del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ registrati a tre differenti temperature (283 K, 298 K e 310 K). La concentrazione di Cu^{2+} è 12.8 mM.

Le misurazioni sono state effettuate nell'intervallo 0.01-120 MHz, a tre diverse temperature, 283 K, 298 K e 310 K. I dati raccolti mostrano una inversa dipendenza del valore di rilassività dalla temperatura, che suggerisce una dinamica di scambio delle molecole d'acqua non limitante il valore di r_1 . Nei profili si può osservare la presenza di due dispersioni: la prima centrata a 0.5 MHz circa ed una seconda a 5 MHz. Questo suggerisce che il rilassamento per il sistema studiato risulta essere la somma di due distinti contributi: un contributo scalare, responsabile della dispersione osservata a bassi campi magnetici applicati, la cui presenza è ragionevole considerando la relativa vicinanza della molecola d'acqua di sfera interna allo ione metallico, ed un contributo dovuto al meccanismo dipolare, solito dei composti paramagnetici in soluzione.

Per avere ulteriori informazioni sull'acqua coordinata al complesso è stata impiegata la spettroscopia ^{17}O NMR a temperatura variabile (descritta nel capitolo 3), registrando spettri del campione tra 275 e 350 K.

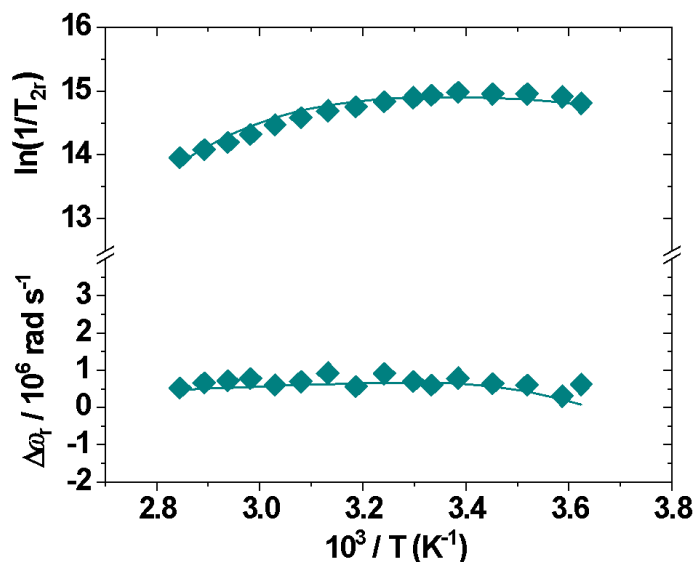


Figura 5.7 Velocità di rilassamento trasversale ^{17}O NMR e chemical shift in funzione della temperatura misurati per $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ a pH 7.4 e 11.7 T. La concentrazione di Cu^{2+} è 10.09 mM.

I dati ^{17}O VT-NMR mostrano una curva della velocità di rilassamento trasversale che cresce con l'inverso della temperatura e presenta un massimo centrato intorno a 290 K: questo suggerisce una dinamica di scambio veloce delle molecole d'acqua. La curva di $\Delta\omega_r$ in funzione della temperatura risulta invece abbastanza piatta.

Eseguendo il fitting contemporaneo dei profili ^1H NMRD e ^{17}O NMR sono stati ricavati i parametri riportati nella tabella 5.1, dove τ_S è il tempo di rilassamento elettronico, τ_R è il tempo di correlazione rotazionale, E_R è la barriera energetica associata alla rotazione, τ_M è il tempo di residenza dell'acqua di sfera interna, ΔH_M è l'entalpia associata allo scambio dell'acqua, $A_O/\hbar$ e $A_H/\hbar$ sono le costanti di accoppiamento scalare tra gli elettroni spaiati del metallo e i nuclei di ossigeno e di idrogeno dell'acqua, r è la distanza tra il metallo e l'idrogeno dell'acqua di sfera interna, q è il numero di idratazione e σ è la distanza tra il metallo e l'idrogeno delle molecole d'acqua di sfera esterna.

Parametro	CuAAZTA
$^{298}r_1 / \text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1} (1.5 \text{ T})$	0.21
τ_S / ns	0.50
τ_R / ps	19
$E_R / \text{kJ mol}^{-1}$	22
$^{298}\tau_M / \text{ns}$	12
$\Delta H_M / \text{kJ mol}^{-1}$	60.0
$A_O / \hbar / 10^8 \text{ rad s}^{-1}$	1.6
$A_H / \hbar / 10^6 \text{ rad s}^{-1}$	7.4
$r / \text{\AA}$	2.50*
q	1*
$a / \text{\AA}$	3.6*

Tabella 5.1 Parametri ottenuti dall'analisi dei profili ^1H NMRD e ^{17}O NMR (* Fissati durante le analisi).

Confrontando i valori con quelli ottenuti dalle analisi su complessi riportati in letteratura (tabella 5.2), si può notare che il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ presenta un tempo di rilassamento elettronico paragonabile quello dei complessi riportati in letteratura. Il tempo di correlazione rotazionale, invece, è maggiore e questo è giustificato dal maggiore peso molecolare, che rallenta la rotazione del complesso. Per quanto riguarda lo scambio delle molecole d'acqua, si può affermare che il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ presenta uno scambio veloce, anche se non veloce quanto quello del $[\text{Cu}(\text{TACN})]^{2+}$. Il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ ha una relassività comparabile con quella del $[\text{Cu}(\text{TACN})]^{2+}$, sebbene possieda una sola molecola d'acqua di sfera interna, mentre il $[\text{Cu}(\text{TACN})]^{2+}$ ne possiede due.

Parametro	[Cu(TACN)] ²⁺	[Cu(TREN)] ²⁺
²⁹⁸ <i>r</i> ₁ /mM ⁻¹ s ⁻¹ (1.5 T)	0.22	0.17
<i>τ</i> _S / ns	0.98	0.54
<i>τ</i> _R / ps	10.6	10
<i>E</i> _R /kJ mol ⁻¹	20.2	18.1
²⁹⁸ <i>τ</i> _M / ns	0.075	253
<i>ΔH</i> _M / kJ mol ⁻¹	9.0	40.0
<i>A</i> _O /ħ /10 ⁸ rad s ⁻¹	2.82	2.0
<i>A</i> _H /ħ /10 ⁶ rad s ⁻¹	8.3	3.8
<i>r</i> / Å	2.56	2.48
<i>q</i>	2	1
<i>a</i> / Å	3.6	3.6

Tabella 5.2 Parametri ottenuti dall'analisi dei profili ¹H NMRD e ¹⁷O NMR.

Il complesso [Cu(AAZTA)]²⁻ mostra una buona stabilità in un ampio intervallo di pH e una relassività paragonabile a quella di altri complessi di Cu ma molto inferiore a quella degli agenti di contrasto utilizzati in ambito clinico. Per questo si è deciso di utilizzarlo come punto di partenza per creare altri sistemi che avessero la stessa stabilità ma una maggiore relassività. I due gruppi carbossilici dell'AAZTA che nel complesso [Cu(AAZTA)]²⁻ non sono coordinanti sono stati sfruttati per legare all'AAZTA nuove porzioni molecolari senza alterare la coordinazione del metallo. Il primo complesso sintetizzato è il CuAAZ3A-Glu.

5.2 CuAAZ3A-Glu

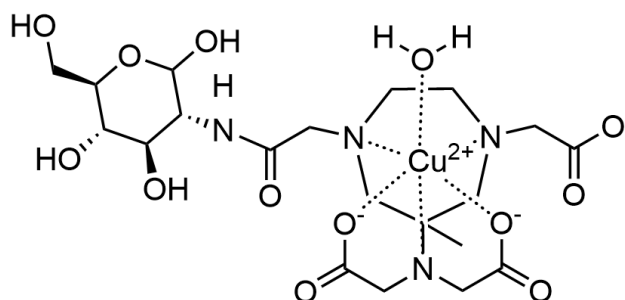


Figura 5.8 Struttura del complesso CuAAZ3A-Glu.

Il complesso CuAAZ3A-Glu è stato ottenuto dal complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ tramite reazione di una molecola di glucosammina con uno dei gruppi carbossilici dell'AAZTA non impegnati nella coordinazione dello ione metallico. La glucosammina è un amminozucchero presente nel corpo umano, costituito da una molecola di glucosio in cui il gruppo ossidrilico in posizione 2 è sostituito da un gruppo amminico. Viene solitamente estratta dalla chitina, polisaccaride che compone l'esoscheletro dei crostacei. Il complesso CuAAZ3A-Glu è stato sintetizzato con l'obiettivo di studiare l'effetto dell'aumento del peso molecolare del complesso sul tempo di correlazione rotazionale e, quindi, sulla rilassività. Questa reazione è stata utile inoltre per sperimentare la reattività del complesso con un amminomonosaccaride, in vista della successiva reazione con il chitosano, amminopolisaccaride composto da monomeri di glucosammina. Per formare il legame ammidico sono stati utilizzati come attivatori l'HOBt (1*H*-1,2,3-Benzotriazol-1-ol) e l'EDC (3-{[(Ethyylimino)methylidene]amino}-*N,N*-dimethylpropan-1-amine). È stata seguita la seguente procedura di sintesi.

20 mg (0.045 mmol) di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ sono stati sciolti in 5 mL di acqua insieme a 39 mg (0.18 mmol) di glucosammina. La soluzione, a pH 5.95, è stata messa in agitazione. Sono stati aggiunti 12 mg (0.081 mmol) di HOBt e, dopo che questo si è sciolto completamente, 87 mg (0.453 mmol) di EDC. La soluzione, inizialmente azzurra, è stata lasciata in agitazione per 3 giorni e ha assunto una colorazione verde.

Un'analisi HPLC-MS della soluzione ha mostrato numerosi picchi. È stata individuata la presenza del prodotto desiderato, del complesso di partenza e, in misura molto minore, del prodotto della reazione di entrambi i carbossilici liberi dell'AAZTA con molecole di glucosammina.

Il complesso CuAAZ3A-Glu è stato separato dalla miscela di reazione tramite HPLC-MS, effettuata con una colonna Atlantis® C18 con le seguenti impostazioni:

Tempo (min)	Flusso (mL/min)	% A	% B
0.00	17.00	100.0	0.0
2.00	17.00	100.0	0.0
6.00	17.00	69.2	30.8
8.00	17.00	0.0	100.0
10.00	17.00	0.0	100.0
13.00	17.00	100.0	0.0

Tabella 5.3 Parametri relativi alla separazione con HPLC. **A** = H₂O + 0.1 % acido formico; **B** = ACN.

La raccolta è stata effettuata tra 2.50 e 3.60 min, zona in cui sono stati individuati i picchi che presentano il pattern isotopico del Cu e che corrispondono a rapporti massa su carica compatibili con derivati ionizzati del complesso CuAAZ3A-Glu, che ha una massa molecolare di 582 u.m.a.:

ESI/MS m/z: [M-OH+H]⁺ calcd for C₂₀H₃₁CuN₄O₁₁ 566.13, found 566.20

ESI/MS m/z: [M+2H]⁺ calcd for C₂₀H₃₃CuN₄O₁₂ 584.14, found 584.31

ESI/MS m/z: [M+H+Na]⁺ calcd for C₂₀H₃₂CuN₄NaO₁₂ 606.12, found 605.91

Il picco principale si trova a 566.20 ed è attribuibile alla specie ottenuta dal prodotto tramite perdita di un gruppo ossidrilico e acquisto di uno ione H⁺. Altri due picchi significativi si trovano a 584.31 e 605.91 e sono attribuibili, rispettivamente, al complesso con aggiunta di due protoni e al complesso con aggiunta di un protone e di uno ione sodio. Il prodotto possiede, infatti, una carica negativa (vedi figura 5.8), per cui per essere osservato nella modalità ESI⁺ deve acquisire almeno due cariche positive.

Le frazioni raccolte sono state unite, la soluzione è stata portata a secco e poi il complesso è stato nuovamente sciolto in H₂O e portato a pH neutro. Tramite il metodo Evans si è misurata la concentrazione di Cu²⁺, ottenendo un valore di 9.25 mM.

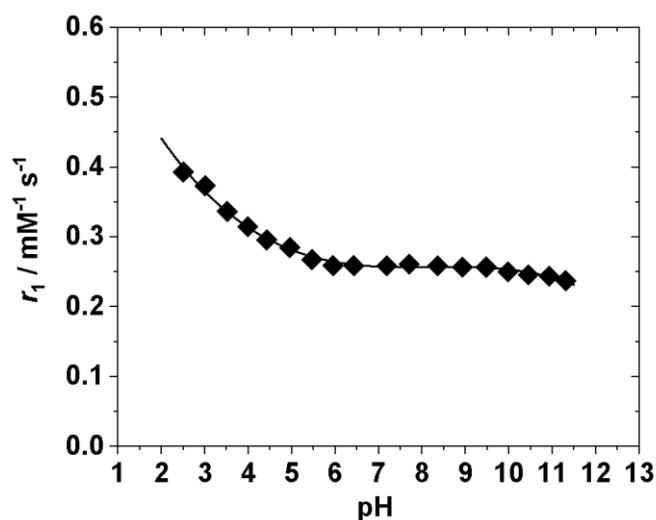


Figura 5.11 Dipendenza dal pH del valore di r_1 per il complesso CuAAZ3A-Glu a 32 MHz e 298 K. La concentrazione di Cu^{2+} è 4.63 mM.

I valori di rilassività misurati in funzione del pH mostrano stabilità nell'intervallo 6-9.5. Portando a pH basici la soluzione contenente il complesso, si osserva una leggera diminuzione del valore di rilassività. Diminuendo il pH verso valori acidi si osserva invece un marcato aumento della rilassività: questo potrebbe essere spiegato da una parziale demetallazione del complesso, con rilascio del Cu^{2+} , che in forma di acquoione presenta rilassività molto più elevata. Confrontando gli andamenti della rilassività in funzione del pH del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ e del suo derivato, si nota che presentano andamenti molto diversi e che il complesso CuAAZ3A-Glu ha una rilassività leggermente superiore, ma si dimostra stabile in un intervallo di pH più ristretto.

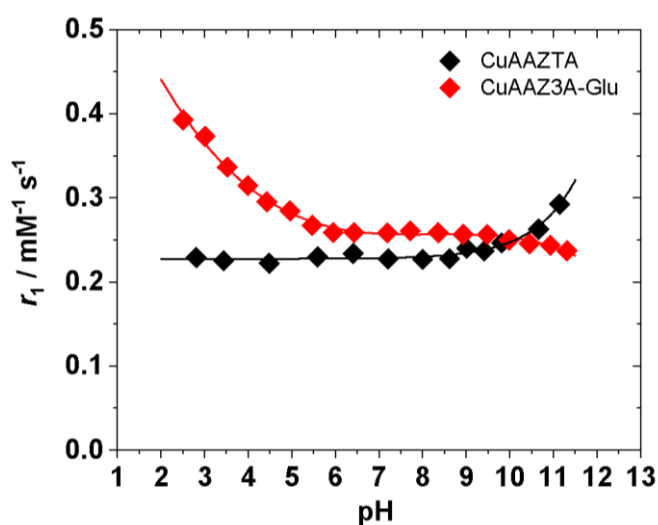


Figura 5.12 Dipendenza dal pH del valore di r_1 per i complessi $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ e CuAAZ3A-Glu a 32 MHz e 298 K.

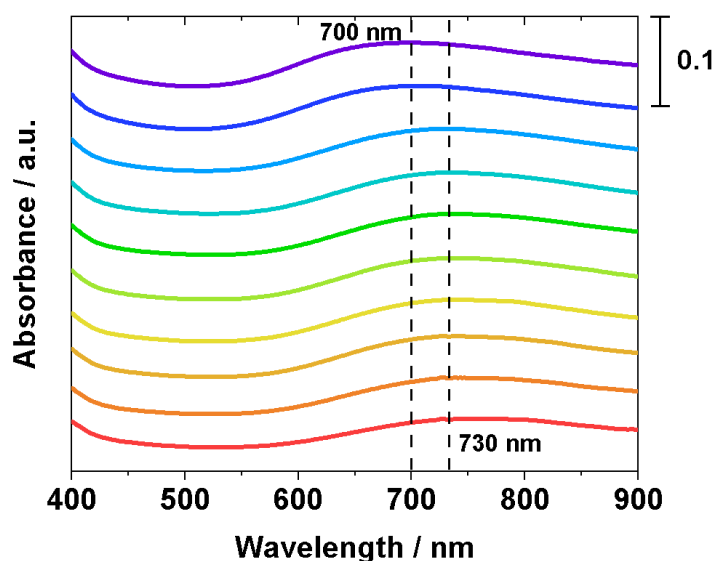


Figura 5.13 Spettri UV-VIS del complesso CuAAZ3A-Glu (400-900 nm), registrati in funzione del pH (da rosso, pH 2, a viola, pH 11, per ogni unità di pH). La concentrazione di Cu^{2+} è 0.46 mM.

Negli spettri UV-VIS registrati a diversi valori di pH, si osserva una banda di assorbimento attribuibile alle transizioni $d-d$ del Cu^{2+} : a valori di pH tra 2 e 9 il massimo si trova a circa 730 nm, mentre a pH 10-11 il massimo si sposta a circa 700 nm. Al diminuire del pH si osserva una progressiva riduzione del valore di assorbanza a 730 nm, che potrebbe suggerire una parziale demetallazione, in accordo con quanto osservato nelle misure rilassometriche.

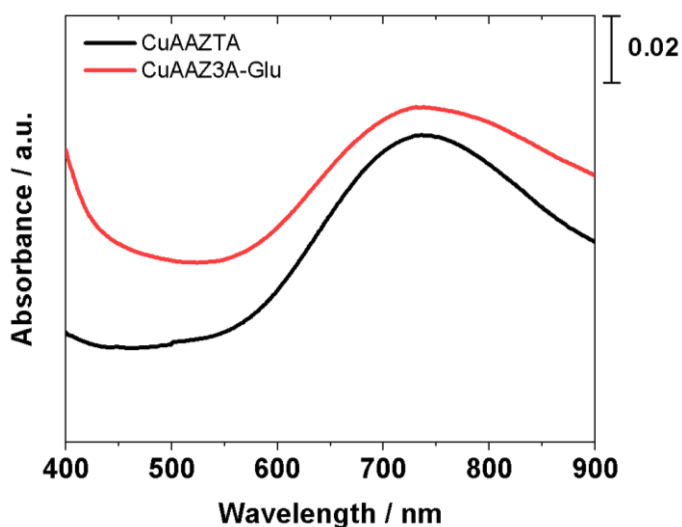
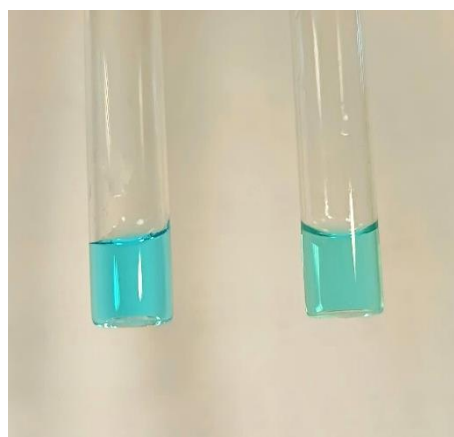


Figura 5.14 A sinistra: spettri UV-VIS (400-900 nm) a pH 7 dei complessi $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ e CuAAZ3A-Glu. A destra: confronto tra le soluzioni di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ (a sinistra) e di CuAAZ3A-Glu (a destra).

Lo spettro a pH neutro presenta un massimo quasi coincidente con quello del complesso di partenza $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$. Si osserva, tuttavia, una lieve differenza nella forma dello spettro e si nota un diverso colore della soluzione acquosa del complesso.

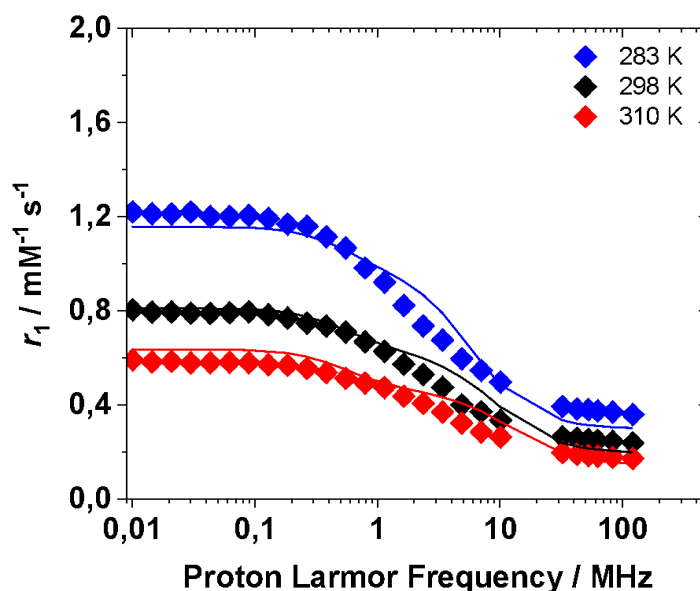


Figura 5.15 Profili ^1H NMRD del complesso CuAAZ3A-Glu registrati a tre differenti temperature (283 K, 298 K e 310 K). La concentrazione di Cu^{2+} utilizzata è 9.25 mM.

Usando una soluzione di complesso a pH neutro, sono stati registrati i profili ^1H NMRD in funzione della frequenza di Larmor del protone, tra 0.01 e 120 MHz, alle temperature di 283, 298 e 310 K.

Anche in questo caso, i dati raccolti mostrano una inversa dipendenza del valore di rilassività dalla temperatura, che suggerisce una dinamica di scambio delle molecole d'acqua non limitante il valore di r_1 . Nei profili si osservano due dispersioni, anche se più difficilmente distinguibili rispetto al caso precedente. La prima si trova intorno a 1 MHz ed è attribuibile al meccanismo di rilassamento scalare, mentre la seconda si trova intorno a 10 MHz e si può attribuire al meccanismo di rilassamento dipolare.

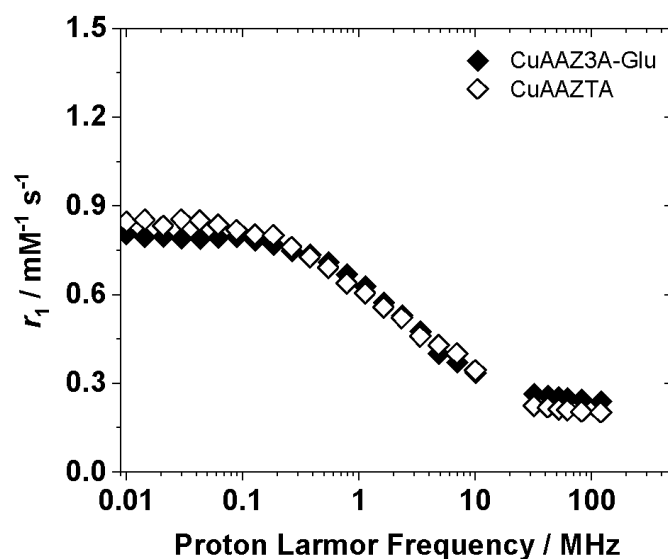


Figura 5.16 Profili ^1H NMRD dei due complessi registrati a 298 K.

Confrontando i profili dei due complessi a 298 K, si osserva che a basse frequenze il complesso CuAAZ3A-Glu mostra una rilassività inferiore a quella del $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, nella parte centrale i due profili si sovrappongono e ad alte frequenze CuAAZ3A-Glu mostra una rilassività maggiore.

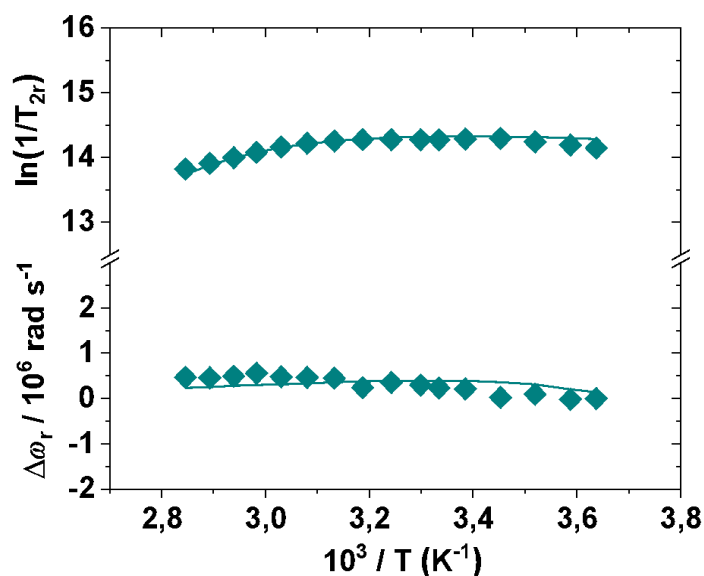


Figura 5.17 Velocità di rilassamento trasversale ^{17}O NMR e chemical shift in funzione della temperatura misurati per CuAAZ3A-Glu a pH 7 e 11.7 T. La concentrazione di Cu^{2+} è 7.90 mM.

Infine è stata effettuata l'analisi ^{17}O VT-NMR. I dati raccolti mostrano una curva della velocità di rilassamento trasversale dell'ossigeno centrata intorno a 300 K, suggerendo anche in questo caso uno scambio veloce delle molecole d'acqua.

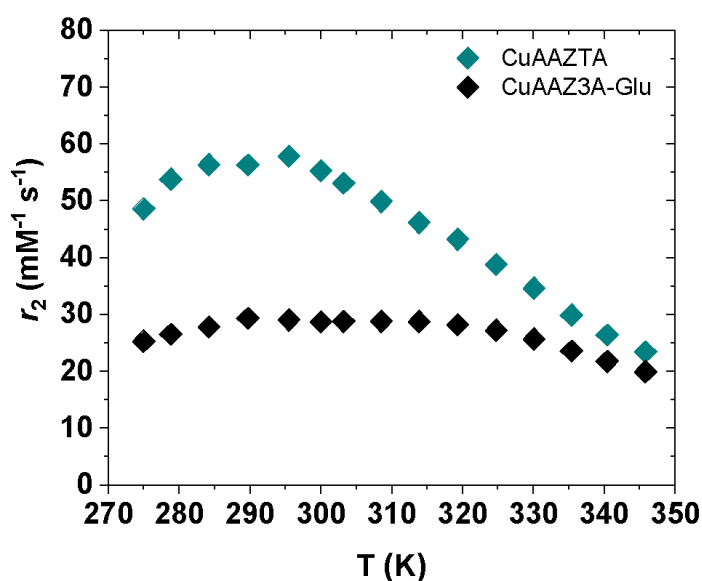


Figura 5.18 Valori di r_2 ^{17}O NMR in funzione della temperatura per i complessi CuAAZTA e CuAAZ3A-Glu.

Confrontando i valori di r_2 dei due complessi si nota che il complesso CuAAZ3A-Glu presenta, rispetto a $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, valori molto minori e una curva più allargata: questo suggerisce un allontanamento della molecola d'acqua coordinata dallo ione Cu^{2+} .

Anche in questo caso è stato eseguito il fitting contemporaneo dei profili ^1H NMRD e ^{17}O NMR per ricavare i parametri relativi alla struttura e alla dinamica del complesso. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 5.4, in cui sono posti a confronto con quelli ricavati per il complesso precedente. La distanza del metallo dall'atomo di ossigeno dell'acqua è stata fissata a 2.6 Å, mentre nel caso precedente era 2.5 Å, poiché l'analisi ^{17}O NMR mostra un allontanamento della molecola d'acqua. Si può notare che il complesso CuAAZ3A-Glu presenta, come atteso, un tempo di correlazione rotazionale (τ_R) maggiore, 28 ps invece dei 19 ps calcolati per $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$. Questo cambiamento del tempo di correlazione porta ad un aumento nella rilassività a 1.5 T (62 MHz), che, da 0.21 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$, passa a 0.25 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$. L'aumento è però minore di quanto ci si aspettasse: questo è attribuibile all'allontanamento dell'acqua, che rende meno efficace la sua interazione con l'elettrone spaiato del complesso e quindi il suo rilassamento.

Parametro	CuAAZTA	CuAAZ3A-Glu
$^{298}r_1 / \text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1} (1.5 \text{ T})$	0.21	0.25
τ_S / ns	0.50	0.48
τ_R / ps	19	28
$E_R / \text{kJ mol}^{-1}$	22	24
$^{298}\tau_M / \text{ns}$	12	16
$\Delta H_M / \text{kJ mol}^{-1}$	60.0	53.5
$A_O / \hbar / 10^8 \text{ rad s}^{-1}$	1.6	1.2
$A_H / \hbar / 10^6 \text{ rad s}^{-1}$	7.4	6.3
$r / \text{\AA}$	2.50*	2.6*
q	1*	1*
$a / \text{\AA}$	3.6*	3.6*

Tabella 5.4 Parametri ottenuti dall'analisi dei profili ^1H NMRD e ^{17}O NMR (* Fissati durante le analisi).

5.3 Ch-CuAAZTA1

Successivamente, come anticipato, il complesso è stato legato ad un polimero per creare un sistema paramagnetico a peso molecolare notevolmente più elevato rispetto ai complessi precedenti, con l'obiettivo di ottenere un incremento nella rilassività.

Il nanogel Ch-CuAAZTA1 è stato preparato tramite reazione del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ con catene di chitosano di massa molare 5000 g/mol. Il chitosano è un amminopolisaccaride costituito da unità di glucosammina unite da legami β -(1 $\rightarrow$ 4). Viene ottenuto, tramite deacetilazione, dalla chitina estratta dall'esoscheletro dei crostacei e presenta una serie di buone proprietà. È ampiamente disponibile, in quanto la chitina è il polimero più abbondante in natura dopo la cellulosa. È un polimero idrofilo e solubile in acqua a pH acido grazie alla protonazione dei gruppi amminici, è non tossico, biocompatibile e biodegradabile. È l'unico polimero cationico pseudonaturale [3].

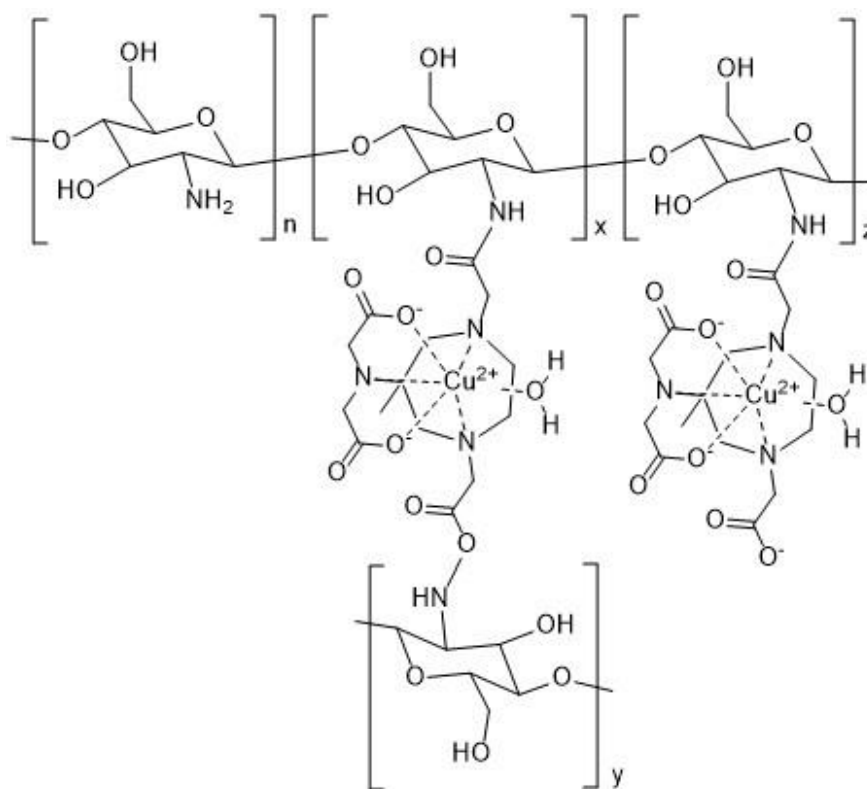


Figura 5.19 Struttura ipotizzata per i sistemi chitosano/[Cu(AAZTA)]²⁻.

In lavori precedenti il chitosano è stato utilizzato con successo per produrre nanogel in cui le catene polimeriche sono legate da complessi metallici a base di lantanidi o di manganese. Tali sistemi presentano relassività notevoli: i valori riportati sono maggiori di un ordine di grandezza rispetto a quelli dei complessi liberi [4], [5]. La figura 5.19 mostra la probabile struttura del nanogel, in cui il complesso di rame è legato al gruppo amminico del chitosano con un solo gruppo carbossilico, mentre l'altro rimane libero e mantiene la carica negativa, oppure con entrambi i gruppi carbossilici, legando così tra di loro due catene polimeriche.

20 mg (0.125 mmol di unità ripetenti) di chitosano ($M_n = 5000$ g/mol) sono stati sciolti in 10 mL di H₂O. Sono stati aggiunti 28 mg (0.063 mmol) di CuAAZTA, 8 mg (0.063 mmol) di HOBt e, dopo che quest'ultimo si è sciolto completamente, 60 mg (0.313 mmol) di EDC. La soluzione, di colore azzurro e limpida, è stata portata a pH 6 ed è stata lasciata in agitazione. Dopo circa un'ora la soluzione è diventata opaca e dopo circa due ore è iniziata la formazione di un precipitato di colore azzurro. Dopo 24 h il prodotto è stato dializzato (MWCO = 1kD) in acqua milli-Q (600 mL per due volte) per 24 h.

Il prodotto finale si presenta come una miscela eterogenea. Tramite agitazione le particelle vengono portate in sospensione, ma precipitano dopo qualche minuto.



Figura 5.20 Miscela di reazione all'inizio della sintesi (sinistra) e alla fine della sintesi (destra).

5.3.1 Caratterizzazione del Ch-CuAAZTA1

La concentrazione di Cu^{2+} è stata misurata tramite mineralizzazione di una piccola parte del campione con acido nitrico e misura del valore di R_1 a 0.1 MHz. Il valore ricavato è 3.54 mM.

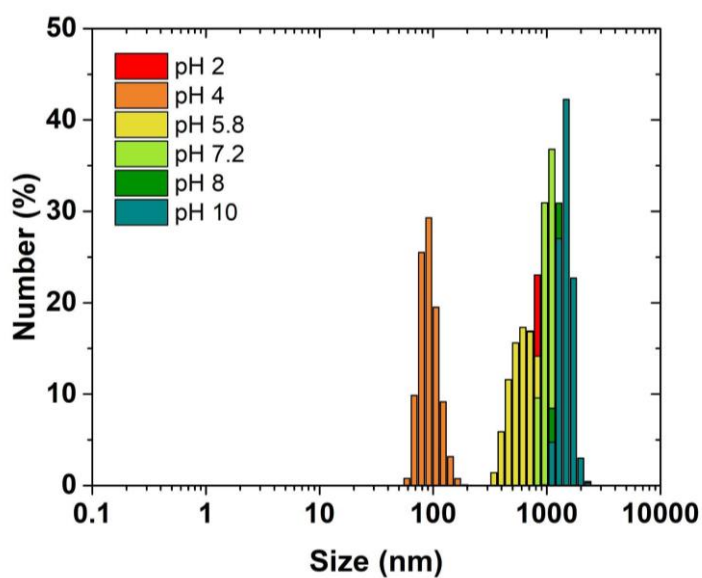


Figura 5.21 Distribuzioni delle dimensioni delle particelle di Ch-CuAAZTA1 a diversi pH.

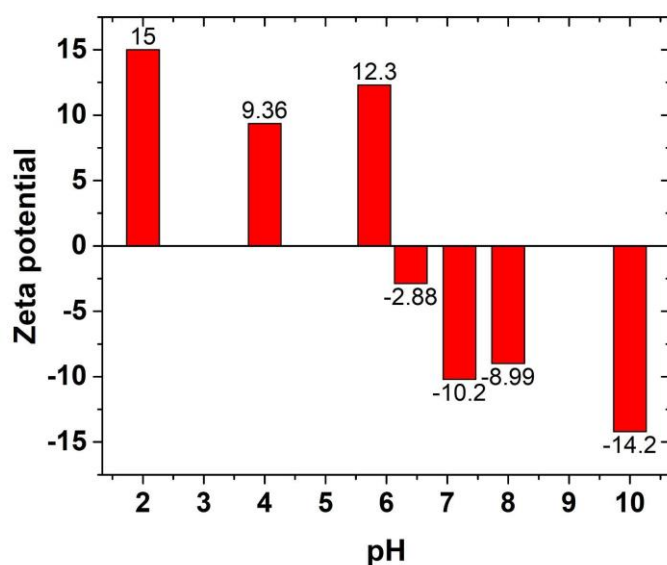


Figura 5.22 Potenziale zeta del sistema Ch-CuAAZTA1 in funzione del pH.

Sono state effettuate sul campione Ch-CuAAZTA1 analisi DLS e misurazioni del potenziale zeta a diversi pH, per valutare la dimensione delle particelle e la loro carica superficiale e avere informazioni sulla stabilità del sistema al variare del pH. Le particelle mostrano dimensioni abbastanza grandi, di circa 1000 nm, come confermato anche dalla torbidità della soluzione. Le misure del potenziale zeta suggeriscono la presenza di un punto isoelettrico ad un valore di pH intorno a 6, al quale si osserva precipitazione in misura maggiore rispetto a quanto avviene agli altri valori di pH.

pH	Dimensione (nm)	Potenziale Zeta (mV)
2	917 ± 217	15.0 ± 12.5
4	93 ± 19	9.36 ± 18.0
5.8	687 ± 212	12.3 ± 8.97
6.4	flocculazione	-2.88 ± 13.4
7.2	1080 ± 157.9	-10.2 ± 12.5
8	1451 ± 211.6	-8.99 ± 16.0
10	1482 ± 199.5	-14.2 ± 5.95

Tabella 5.5 Dati ottenuti dalle analisi DLS e dalle misure del potenziale zeta sul campione Ch-CuAAZTA1.

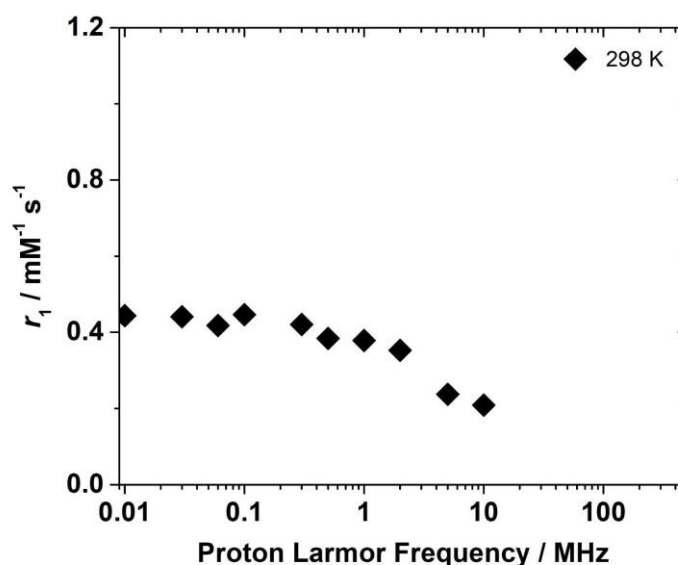


Figura 5.23 Profilo ^1H NMRD del sistema Ch-CuAAZTA1 registrato a 298 K. La concentrazione di Cu^{2+} è 3.54 mM.

È stato fatto un tentativo di caratterizzazione rilassometrica, registrando un profilo ^1H NMRD a 298 K e pH neutro, tra 0.01 e 10 MHz. La rilassività osservata è minore di quella dei complessi $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ e CuAAZ3A-Glu, contrariamente a quanto ci si aspettava. L'esperimento è stato complicato dall'instabilità della sospensione, che doveva essere agitata prima di ogni misurazione e probabilmente precipitava prima che la misurazione fosse conclusa, alterando così i risultati.

Il nanogel Ch-CuAAZTA1 non presenta proprietà soddisfacenti: la tendenza delle particelle ad aggregarsi e precipitare, soprattutto a pH 6, non lontano dal pH fisiologico, lo rende inadeguato al ruolo di agente di contrasto.

5.4 Ch-CuAAZTA1/2

Si è deciso di provare a realizzare un altro nanogel ripetendo la procedura di sintesi del Ch-CuAAZTA1, ma dimezzando le quantità di complesso e di attivatori. La reazione di un minor numero di gruppi amminici del chitosano avrebbe portato ad un sistema meno reticolato, quindi con particelle di minori dimensioni, e a una diversa carica delle particelle, con modifica del punto isoelettrico.

20 mg (0.125 mmol di unità ripetenti) di chitosano ($M_n = 5000 \text{ g/mol}$) sono stati sciolti in 10 mL di H_2O . Sono stati aggiunti 14 mg (0.031 mmol) di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, 4 mg (0.031

mmol) di HOBt e, dopo che quest'ultimo si è sciolto completamente, 30 mg (0.156 mmol) di EDC. La soluzione, di colore azzurro e limpida, è stata portata a pH 6 ed è stata lasciata in agitazione. La soluzione è rimasta quasi completamente limpida e non si è osservata la formazione di precipitato. Dopo 24 h il prodotto è stato dializzato (MWCO = 1kD) in acqua milli-Q (600 mL per due volte) per 36 h.

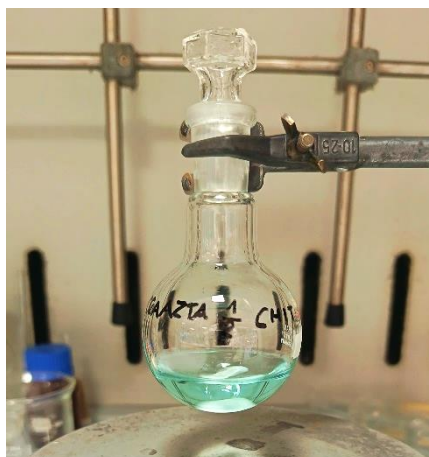


Figura 5.24 Nanogel Ch-CuAAZTA1/2 durante la sintesi.

5.4.1 Caratterizzazione del Ch-CuAAZTA1/2

Come nel caso precedente, la concentrazione di Cu^{2+} è stata misurata tramite mineralizzazione con acido nitrico e misura del valore di R_1 a 0.1 MHz. Il valore ricavato è 2.56 mM.

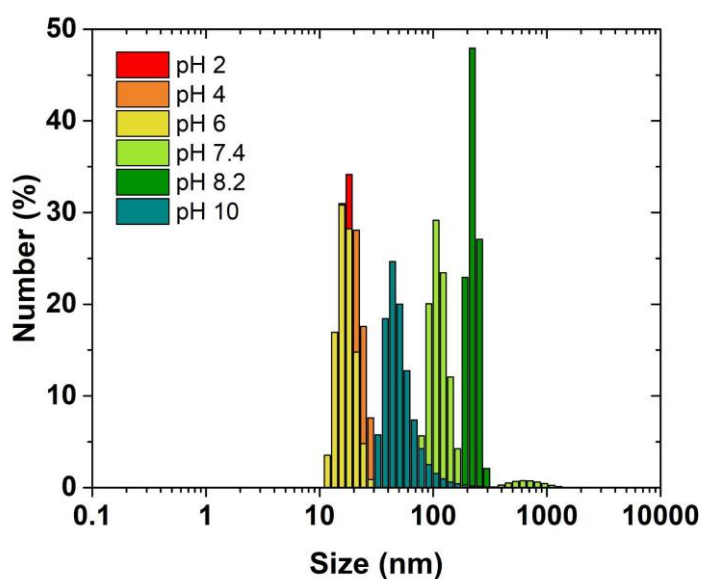


Figura 5.25 Distribuzioni delle dimensioni delle particelle di Ch-CuAAZTA1/2 a diversi pH.

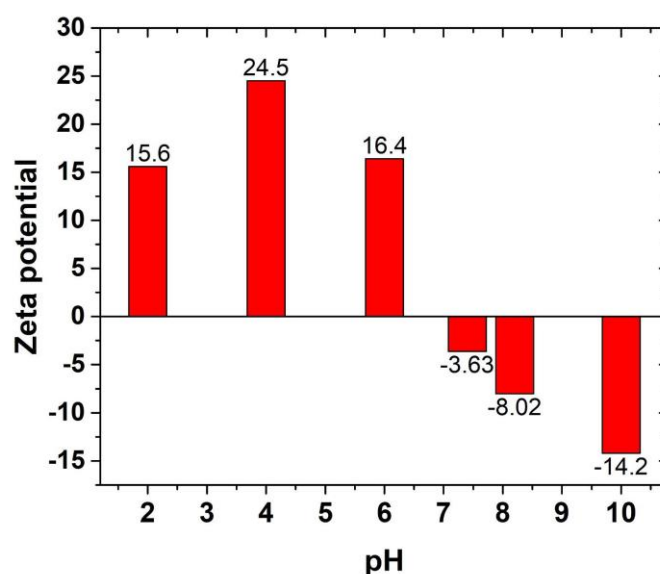


Figura 5.26 Potenziale zeta del sistema Ch-CuAAZTA1/2 in funzione del pH.

Anche sul nanogel Ch-CuAAZTA1/2 sono state effettuate le analisi DLS e del potenziale zeta a diversi pH. In questo caso le particelle presentano dimensioni nell'ordine delle decine di nanometri, tranne nell'intervallo di pH tra 7 e 8. I valori di potenziale mostrano la presenza di un punto isoelettrico ad un pH intorno a 7, al quale si osservano l'intorbidimento della soluzione e la formazione di precipitato.

pH	Dimensione (nm)	Potenziale Zeta (mV)
2	17.83 ± 2.87	15.6
4	20.78 ± 4.24	24.5
6	17.21 ± 3.18	16.4
7.4	113.2 ± 22.14	-3.63
8.2	224.3 ± 25.2	-8.02
10	54.16 ± 25.73	-14.2

Tabella 5.6 Dati ottenuti dalle analisi DLS e dalle misure del potenziale zeta sul campione Ch-CuAAZTA1/2.

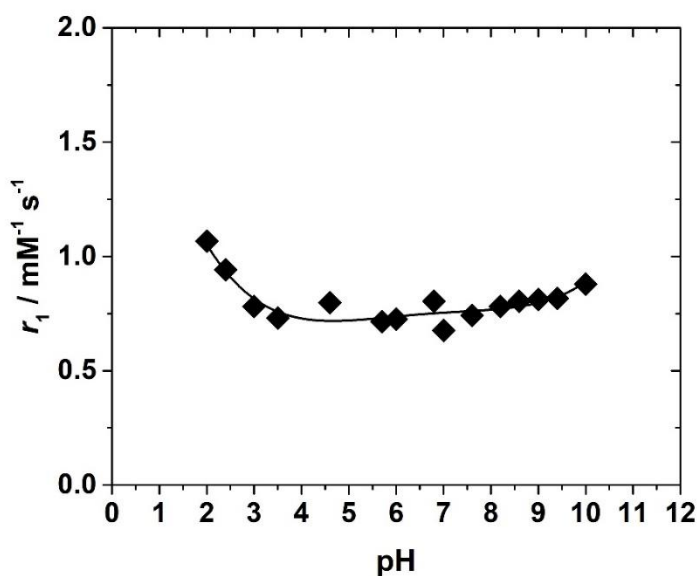


Figura 5.27 Dipendenza dal pH del valore di r_1 per il sistema Ch-CuAAZTA1/2 a 0.1 MHz e 298 K. La concentrazione di Cu^{2+} è 2.56 mM.

È stata misurata la rilassività del nanogel a pH variabile, a 0.1 MHz e 298 K, per testare la sua stabilità. Partendo da pH 6, all'aumentare del pH si osserva un leggero incremento della rilassività, con un abbassamento intorno a 7, dove si verifica la precipitazione. Abbassando il pH sotto il valore di 3 si registra un aumento di rilassività, che potrebbe essere dovuto ad una parziale demetallazione del complesso. Complessivamente, l'andamento della rilassività al variare del pH ricalca abbastanza quello del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ (figura 5.28).

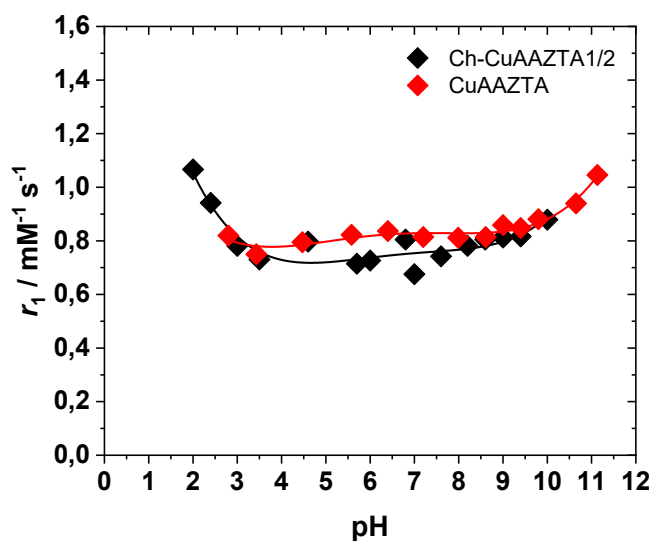


Figura 5.28 Dipendenza dal pH del valore di r_1 per i sistemi $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ e Ch-CuAAZTA1/2 a 0.1 MHz e 298 K.

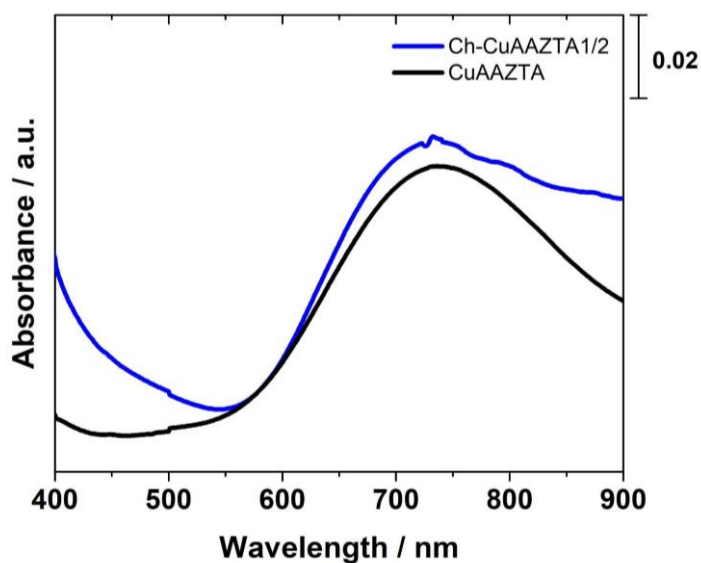


Figura 5.29 Spettri UV-VIS (400-900 nm) del nanogel Ch-CuAAZTA1/2 (pH = 6) e del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ (pH = 7).

È stato registrato uno spettro UV-VIS del nanogel Ch-CuAAZTA1/2, utilizzando una soluzione a pH 6, poiché, come appena osservato, a pH 7, trovandosi in corrispondenza del suo punto isoelettrico, il nanogel non è stabile. Lo spettro presenta un massimo a circa 730 nm, attribuibile alle transizioni *d-d* dello ione $\text{Cu}(\text{II})$, in accordo con quanto osservato per il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ e per i suoi derivati. Si può dedurre che anche la reazione con il chitosano non apporti significativi cambiamenti alla sfera di coordinazione del Cu^{2+} .

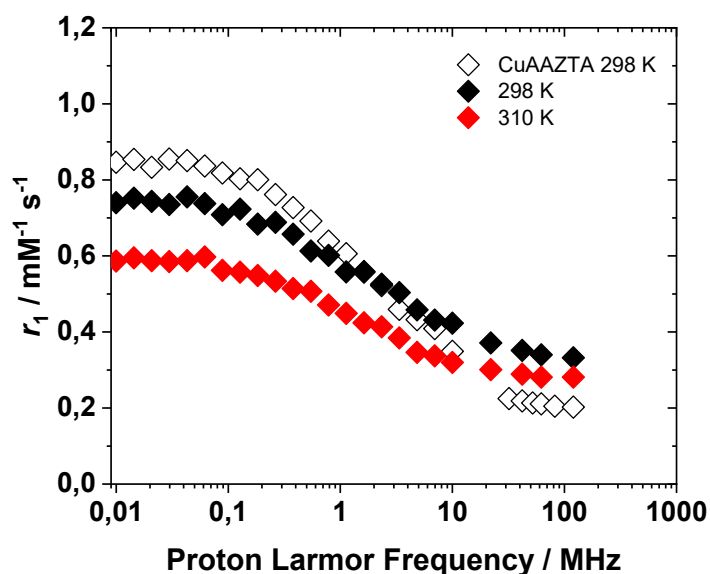


Figura 5.30 Profili ^1H NMRD del nanogel Ch-CuAAZTA1/2 registrati a pH 6 a 298 K e a 310 K (la concentrazione di Cu^{2+} è 2.56 mM) e di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ a 298 K.

Sono stati registrati i profili ^1H NMRD a due diverse temperature (298 K e 310 K) tra 0.01 e 120 MHz. Anche in questo caso si è utilizzata una soluzione a pH 6. I profili mostrano una singola dispersione e, come accadeva per i complessi precedenti, la rilassività diminuisce all'aumentare della temperatura. A bassi campi (tra 0.01 e 2 MHz), i valori di rilassività del nanogel sono minori di quelli del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$. Ad alti campi (tra 2 e 120 MHz) si registra invece un aumento della rilassività rispetto al $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, come mostrato anche nell'istogramma (figura 5.31). L'incremento, tuttavia, è molto minore di quello che si sperava di ottenere sulla base dei dati riportati in letteratura per i nanogel con complessi di lantanidi e di manganese.

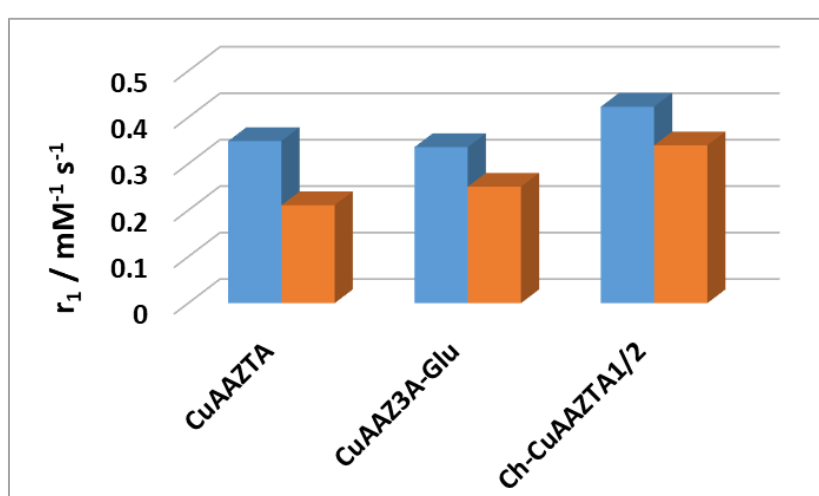


Figura 5.31 Valori di rilassività per ione Cu^{2+} a 10 MHz (blu) e a 60 MHz (arancione) e 298 K.

La modifica del rapporto tra la quantità di complesso e la quantità di chitosano ha portato ad un nanogel che rimane maggiormente sospeso in confronto a quello precedente e ad una modifica del punto isoelettrico. Tuttavia, per il nanogel Ch-CuAAZTA1/2 il punto isoelettrico si trova a $\text{pH} = 7$: questa caratteristica lo rende del tutto inadatto ad applicazioni *in vivo*. Ulteriori modifiche nella sintesi potrebbero spostare il punto isoelettrico e rendere il nanogel stabile nell'intervallo di pH fisiologici. In ogni caso, i profili NMRD non mostrano significativi miglioramenti nella rilassività rispetto al singolo complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$: questo suggerisce che nel caso del $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ la reazione con il chitosano per la produzione di nanogel non è una strategia efficace.

5.5 Bibliografia

- [1] Z. Baranyai *et al.*, «Equilibrium, Kinetic and Structural Studies of AAZTA Complexes with Ga^{3+} , In^{3+} and Cu^{2+} », *European Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 2013, fasc. 1, pp. 147–162, 2013, doi: 10.1002/ejic.201201108.
- [2] M. C. Pagliero *et al.*, «Investigating Cu(II) Complexes for MRI: A Comprehensive Approach Using EPR, Relaxometry, and Computational Modeling», *Inorg. Chem.*, vol. 65, fasc. 10, pp. 5639–5652, mar. 2026, doi: 10.1021/acs.inorgchem.5c05926.
- [3] M. Rinaudo, «Chitin and chitosan: Properties and applications», *Progress in Polymer Science*, vol. 31, fasc. 7, pp. 603–632, lug. 2006, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
- [4] F. Carniato *et al.*, «Novel Nanogels Loaded with Mn(II) Chelates as Effective and Biologically Stable MRI Probes», *Small*, vol. 19, fasc. 42, p. 2302868, 2023, doi: 10.1002/smll.202302868.
- [5] M. Ricci, F. Carniato, L. Tei, S. Camorali, G. Ferrauto, e M. Botta, «Chitosan-Based Nanogels Containing Ln^{3+} Chelates ($\text{Ln}=\text{Gd}, \text{Dy}$) as T_1 and T_2 MRI Probes», *European Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 27, fasc. 8, p. e202300675, 2024, doi: 10.1002/ejic.202300675.

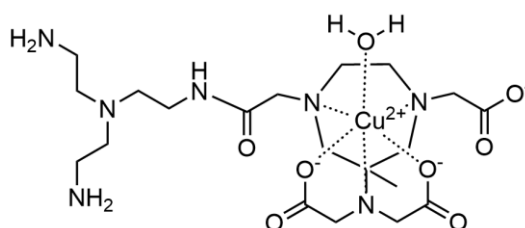
Capitolo 6. Multimeri a base di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$

Nel campo della ricerca sugli agenti di contrasto per MRI, riscuotono un discreto interesse la progettazione e la sintesi di multimeri, cioè di sistemi in cui più complessi paramagnetici sono legati ad un'unità molecolare. L'utilità dei multimeri risiede nella possibilità di creare all'interno dei tessuti alte concentrazioni locali di agenti di contrasto utilizzandone una quantità limitata. Per indirizzare l'agente a concentrarsi dove necessario, si possono legare al sistema appropriati vettori di targeting [1].

Per questo, si è deciso di sperimentare anche la sintesi di multimeri con il complesso di Cu(II) studiato in questo lavoro di tesi. Il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ è stato fatto reagire con l'ammina trifunzionale tren (tris(2-amminoetil)ammina), nel tentativo di legare un complesso a ciascuno dei tre gruppi funzionali e produrre una molecola ad alta relassività, per la presenza di tre ioni paramagnetici nella stessa molecola.

1.3 mg (0.009 mmol) di tren sono stati sciolti in 10 mL di acqua. La soluzione è stata portata a pH = 6.55, quindi sono stati aggiunti 20 mg (0.045 mmol) di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, 6 mg (0.045 mmol) di HOBt e, dopo che quest'ultimo si è sciolto completamente, 43 mg (0.225 mmol) di EDC. La soluzione è stata lasciata in agitazione. L'andamento della reazione è stato monitorato tramite HPLC-MS ogni 24 h circa e sono state effettuate aggiunte delle stesse quantità di attivatori (HOBt e EDC) per sei volte, per spingere la reazione verso i prodotti, che inizialmente erano molto scarsi. In totale sono stati utilizzati 42 mg di HOBt e 301 mg di EDC. Il colore azzurro della soluzione è diventato gradualmente più tendente al verde.

Tramite HPLC-MS sono stati individuati, tra le molecole presenti, i prodotti della reazione del tren con una, due e tre molecole di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ e si è deciso di isolarli e caratterizzarli tutti e tre. I complessi, indicati con i nomi $(\text{CuAAZ3A})\text{tren}$, $(\text{CuAAZ3A})_2\text{tren}$ e $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$, sono riportati nelle figure 6.1, 6.2 e 6.3.



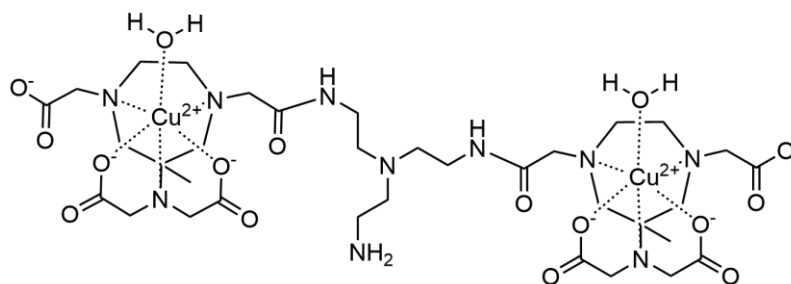


Figura 6.2 Struttura del complesso (CuAAZ3A)₂tren.

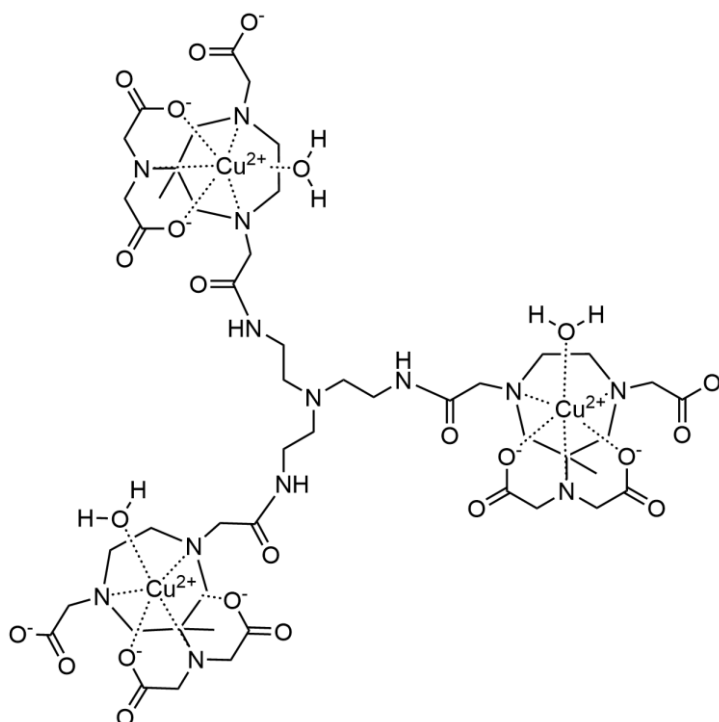


Figura 6.3 Struttura del complesso (CuAAZ3A)₃tren.

I tre complessi sono stati separati con una colonna Atlantis ® C18 con le seguenti impostazioni:

Tempo (min)	Flusso (mL/min)	% A	% B
0.00	17.00	100.0	0.0
2.00	17.00	100.0	0.0
6.00	17.00	69.2	30.8
8.00	17.00	0.0	100.0
10.00	17.00	0.0	100.0
13.00	17.00	100.0	0.0

Tabella 6.1 Parametri relativi alla separazione con HPLC. **A** = H₂O + 0.1 % acido formico; **B** = ACN.

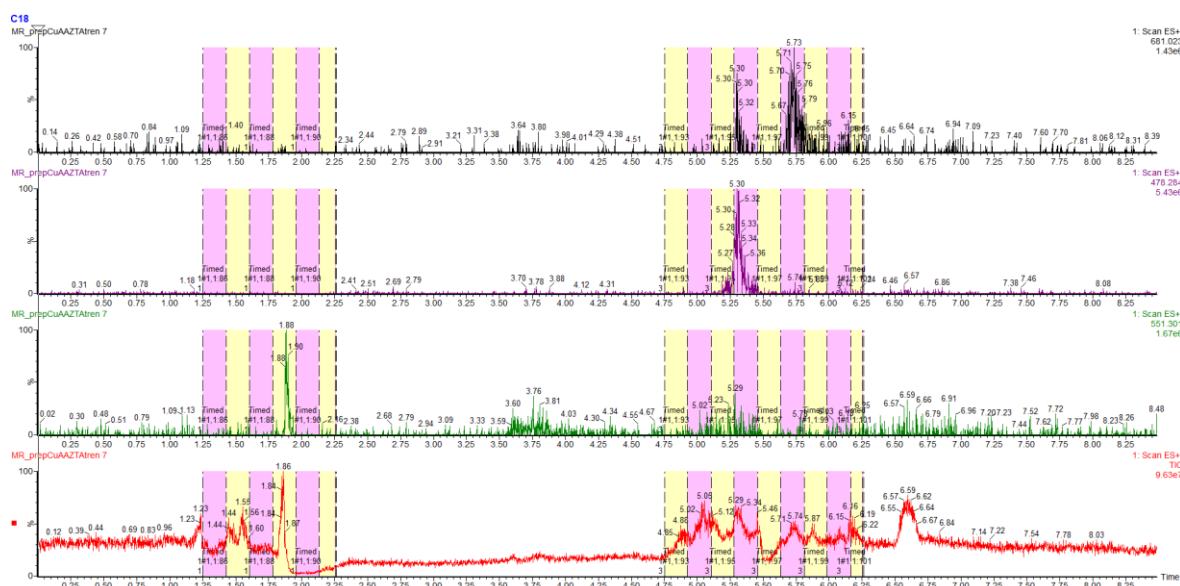


Figura 6.4 Cromatogrammi della separazione HPLC-MS. In basso il cromatogramma TIC, sopra i cromatogrammi in cui viene mostrato un singolo m/z (a partire dal basso: (CuAAZ3A)tren, (CuAAZ3A)₂tren, (CuAAZ3A)₃tren).

Le frazioni raccolte sono: tra 1.75 e 2 min circa (in cui sono stati individuati i picchi attribuibili al (CuAAZ3A)tren), tra 5.25 e 5.50 min circa (in cui è stato individuato il (CuAAZ3A)₂tren), tra 5.60 e 5.80 min circa (in cui è stato individuato il (CuAAZ3A)₃tren).

Per il primo prodotto sono stati trovati i seguenti picchi, che presentano il pattern isotopico di una molecola contenente un atomo di Cu:

ESI/MS m/z: $[M+3H]^{2+}$ calcd for $C_{20}H_{39}CuN_7O_7$ 276.11, found 276.13

ESI/MS m/z: $[M+2H]^+$ calcd for $C_{20}H_{38}CuN_7O_7$ 551.21, found 551.20

ESI/MS m/z: $[M+H+Na]^+$ calcd for $C_{20}H_{37}CuN_7NaO_7$ 573.19, found 573.31

ESI/MS m/z: $[M+2Na]^+$ calcd for $C_{20}H_{36}CuN_7Na_2O_7$ 595.18, found 595.31

Il prodotto (CuAAZ3A)tren ha una massa molecolare di circa 549 u.m.a. e ha carica -1. I picchi più intensi si trovano a valori di m/z di circa 276 e 551 e corrispondono al prodotto con aggiunta di tre protoni e di due protoni. Si osservano inoltre picchi a circa 573 e 595, attribuibili alla specie che ha acquistato un protone e uno ione sodio e alla specie che ha acquistato due ioni sodio (figura 6.5).



Figura 6.5 Spettro di massa della frazione contenente il (CuAAZ3A)tren.

Per il secondo prodotto sono stati trovati i seguenti picchi, il cui pattern isotopico è compatibile con specie che contengono due atomi di Cu:

ESI/MS m/z: $[M+4H]^{2+}$ calcd for $C_{34}H_{58}Cu_2N_{10}O_{14}$ 478.13, found 478.08

ESI/MS m/z: $[M+3H+Na]^{2+}$ calcd for $C_{34}H_{57}Cu_2N_{10}NaO_{14}$ 489.12, found 489.09

ESI/MS m/z: $[M+2H+2Na]^{2+}$ calcd for $C_{34}H_{56}Cu_2N_{10}Na_2O_{14}$ 500.12, found 500.39

ESI/MS m/z: $[M+H+3Na]^{2+}$ calcd for $C_{34}H_{55}Cu_2N_{10}Na_3O_{14}$ 511.11, found 511.09

La specie $(CuAAZ3A)_2tren$ ha massa di circa 952 u.m.a. e doppia carica negativa. Il picco di maggiore intensità è quello a 478, che corrisponde al complesso con aggiunta di quattro protoni. Si osservano poi picchi a 489, 500 e 511, corrispondenti a specie in cui, rispetto al caso precedente, il sodio sostituisce uno, due o tre protoni (figura 6.6).

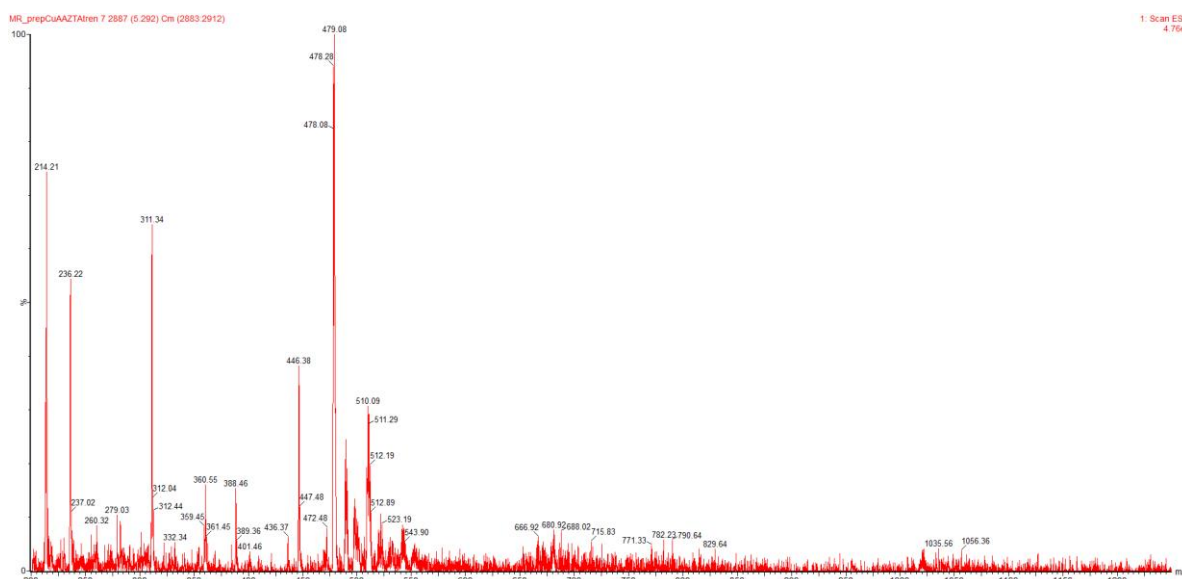


Figura 6.6 Spettro di massa della frazione contenente il $(\text{CuAAZ3A})_2\text{tren}$.

Infine, per il prodotto $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$, sono stati individuati i seguenti picchi, che hanno il pattern isotopico di specie contenenti tre atomi di Cu:

ESI/MS m/z: $[\text{M}+5\text{H}]^{2+}$ calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{77}\text{Cu}_3\text{N}_{13}\text{O}_{21}$ 681.16, found 681.22

ESI/MS m/z: $[\text{M}+4\text{H}+\text{Na}]^{2+}$ calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{Cu}_3\text{N}_{13}\text{NaO}_{21}$ 692.15, found 692.22

ESI/MS m/z: $[\text{M}+3\text{H}+2\text{Na}]^{2+}$ calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{75}\text{Cu}_3\text{N}_{13}\text{Na}_2\text{O}_{21}$ 703.14, found 703.23

ESI/MS m/z: $[\text{M}+2\text{H}+3\text{Na}]^{2+}$ calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{Cu}_3\text{N}_{13}\text{Na}_3\text{O}_{21}$ 714.13, found 714.13

Il complesso $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$ ha una massa di circa 1355 u.m.a. e carica -3. La sua presenza è denotata principalmente dal picco a 681, attribuibile alla specie che ha acquistato cinque protoni. Nelle specie individuate a 692, 703 e 714, si trovano ioni Na^+ al posto di uno, due o tre protoni (figura 6.7).

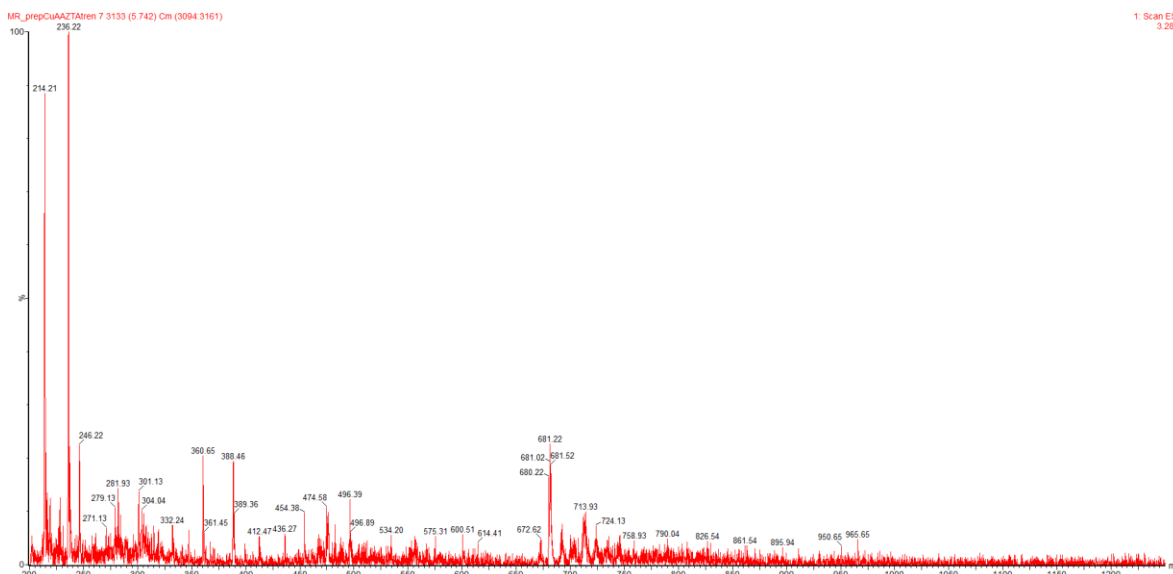


Figura 6.7 Spettro di massa della frazione contenente il $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$.

Gli spettri mostrano che in tutte le frazioni raccolte sono presenti numerose impurezze. Tali picchi, tuttavia, non hanno un pattern compatibile con specie a base di Cu, per cui sono presumibilmente specie diamagnetiche, che non influenzano le proprietà rilassometriche del campione.

Le soluzioni contenenti i tre complessi sono state portate a secco, poi i complessi sono stati nuovamente sciolti in acqua e il pH è stato portato a 7. Le concentrazioni di Cu^{2+} nelle nuove soluzioni sono state determinate tramite mineralizzazione dei complessi con acido nitrico e misura del valore di R_1 a 0.1 MHz e 298 K, con il calcolo illustrato nel capitolo precedente.

6.1 Caratterizzazione dei complessi $(\text{CuAAZ3A})\text{tren}$, $(\text{CuAAZ3A})_2\text{tren}$ e $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$

Tutti e tre i complessi sono stati caratterizzati tramite rilassometria: sono stati registrati i profili ^1H NMRD dei tre complessi a pH 7, nell'intervallo di frequenze tra 0.01 e 500 MHz, alle temperature di 298 e 310 K.

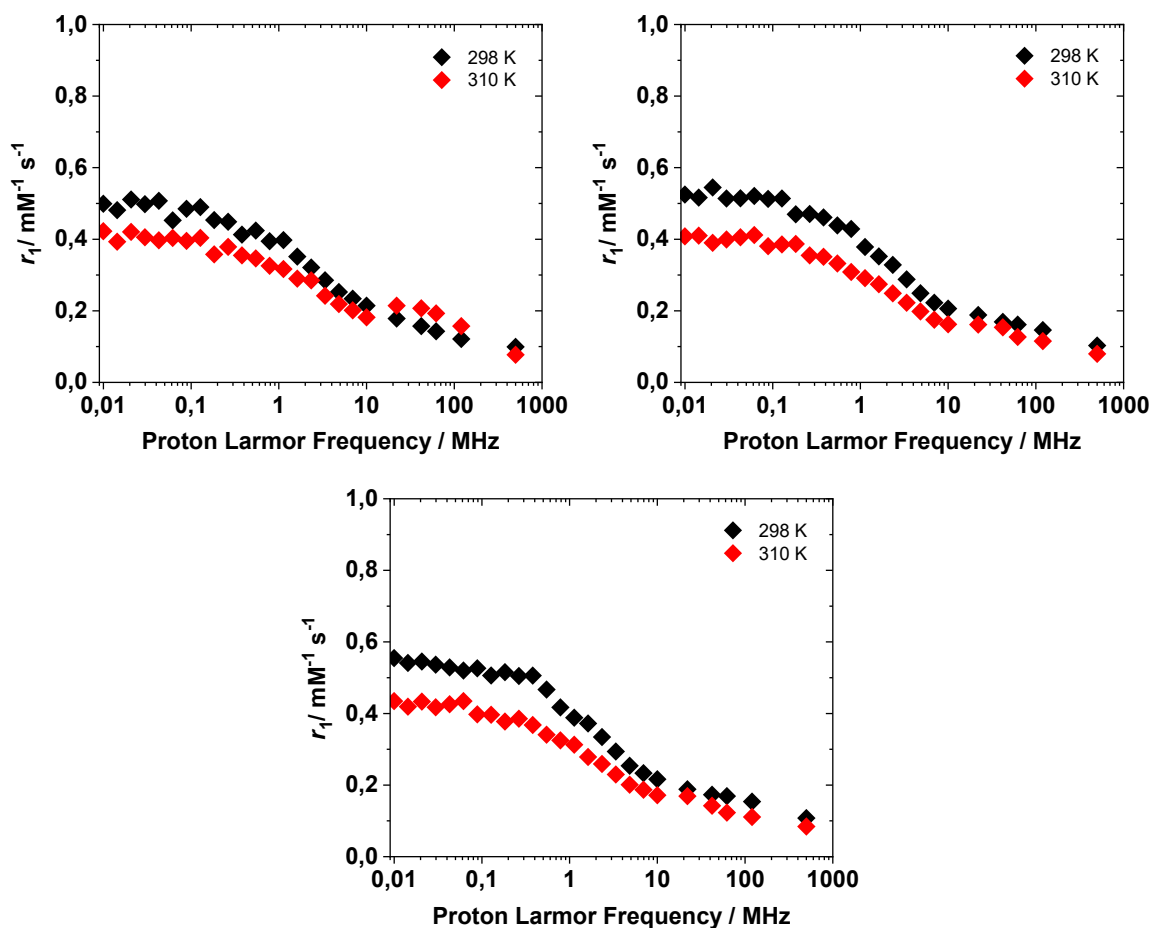


Figura 6.8 In alto a sinistra: profili ^1H NMRD del complesso (CuAAZ3A) a 298 K e 310 K; $[\text{Cu}^{2+}] = 1.4 \text{ mM}$. In alto a destra: profili ^1H NMRD del complesso (CuAAZ3A)₂ a 298 K e 310 K; $[\text{Cu}^{2+}] = 2.6 \text{ mM}$. In basso: profili ^1H NMRD del complesso (CuAAZ3A)₃ a 298 K e 310 K; $[\text{Cu}^{2+}] = 2.6 \text{ mM}$.

In tutti e tre i casi la relassività diminuisce all'aumentare della temperatura, come osservato anche per il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ e per i suoi derivati CuAAZ3A-Glu e Ch-CuAAZTA1/2. È difficile distinguere nei profili il contributo scalare e quello dipolare per lo scattering probabilmente dovuto alla bassa concentrazione dei complessi. Il confronto tra i vari profili ottenuti mostra che i tre complessi presentano relassività molto simili tra di loro, nonostante le diverse dimensioni molecolari. In particolare, i profili ^1H NMRD a 298 K risultano quasi coincidenti (figura 6.9).

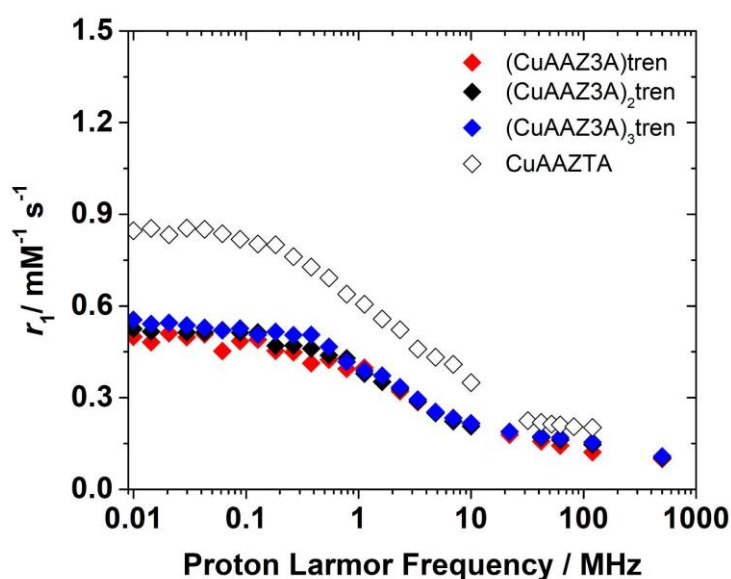


Figura 6.9 Confronto tra i profili ^1H NMRD dei complessi $(\text{CuAAZ3A})\text{tren}$, $(\text{CuAAZ3A})_2\text{tren}$, $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$ e $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ registrati a 298 K.

Si osserva una diminuzione di relassività rispetto al complesso di partenza $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$. L'inatteso calo nella relassività quando il $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ viene legato al tren può essere dovuto ad una alterazione della coordinazione del Cu^{2+} , ipotesi indagata con le analisi successive. Si riscontra un aumento di relassività se si considera la concentrazione dei complessi anziché degli ioni metallici: i complessi $(\text{CuAAZ3A})_2\text{tren}$ e $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$, che contengono, rispettivamente, due e tre ioni Cu^{2+} , presentano relassività per molecola doppia e tripla rispetto al $(\text{CuAAZ3A})\text{tren}$ e superiore a quella del $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$.

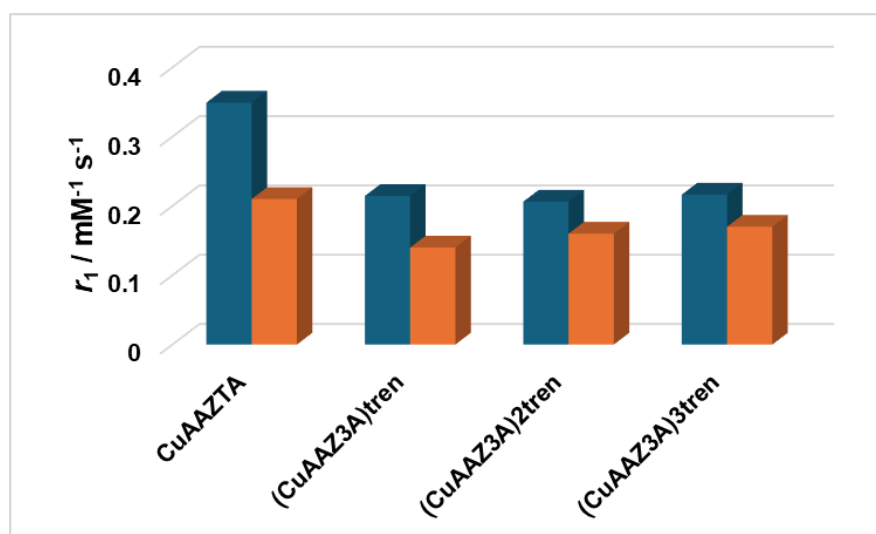


Figura 6.10 Valori di relassività per ione Cu^{2+} a 10 MHz (blu) e a 60 MHz (arancione) e 298 K.

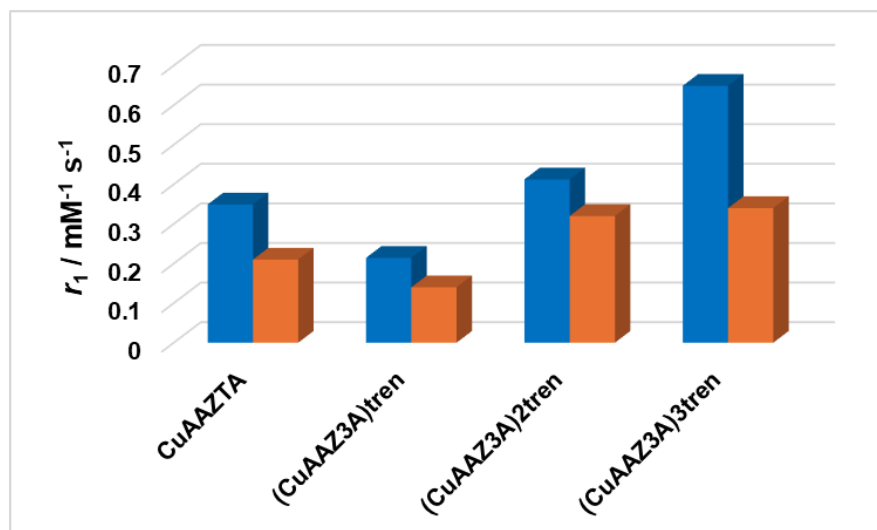


Figura 6.11 Valori di rilassività per molecola a 10 MHz (blu) e a 60 MHz (arancione) e 298 K.

Visto il comportamento molto simile dei tre complessi, le analisi successive sono state effettuate solo su uno dei tre. È stato scelto il complesso (CuAAZ3A)₃tren, perché era quello disponibile in quantità maggiore.

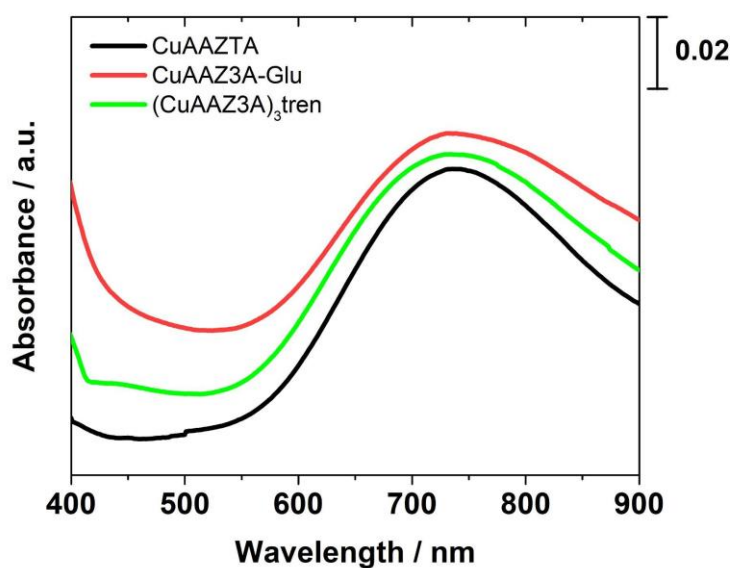


Figura 6.12 Spettri UV-VIS (400-900 nm) a pH 7 dei complessi CuAAZTA, CuAAZ3A-Glu e (CuAAZ3A)₃tren.

È stato registrato uno spettro UV-VIS a pH 7, in cui si osserva un massimo a circa 730 nm, attribuibile alle transizioni *d-d* dello ione Cu(II), in accordo con quanto osservato per i complessi CuAAZTA e CuAAZ3A-Glu. La spettroscopia UV-visibile non mostra, quindi, significative variazioni nella coordinazione del metallo.

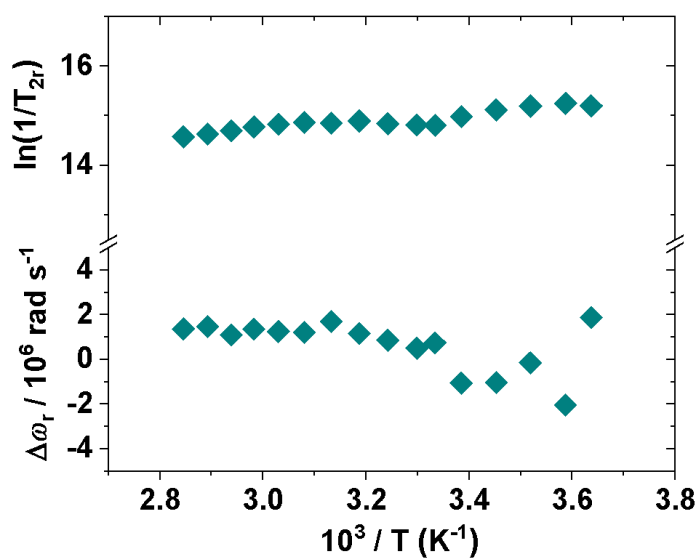


Figura 6.13 Velocità di rilassamento trasversale ^{17}O NMR e chemical shift in funzione della temperatura misurati per $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$ a pH 7 e 11.7 T. La concentrazione di Cu^{2+} è 2.2 mM.

È stata effettuata l'analisi ^{17}O NMR a temperatura variabile del complesso $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$. I risultati dell'analisi non sono ottimali poiché il campione aveva una bassa concentrazione e quindi non era facilmente misurabile tramite ^{17}O NMR.

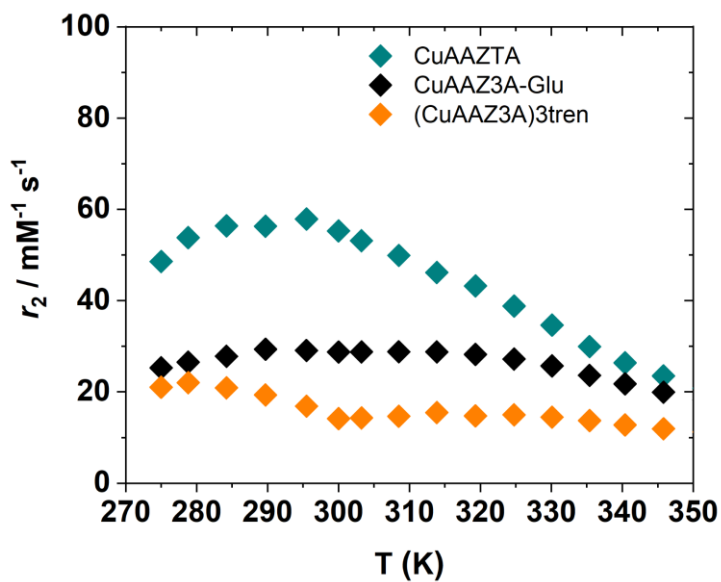


Figura 6.14 Valori di r_2 per ^{17}O in funzione della temperatura per i complessi CuAAZTA, CuAAZ3A-Glu e $(\text{CuAAZ3A})_3\text{tren}$.

Si può comunque notare che la curva della rilassività trasversale di ^{17}O è ancora più bassa di quella del complesso CuAAZ3A-Glu: l'acqua di sfera interna di questi complessi è molto lontana o assente e questo spiega la diminuzione di rilassività osservata nelle misure ^1H NMR.

In conclusione, i multimeri a base di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ sintetizzati mostrano una rilassività per molecola superiore a quella del singolo complesso di $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, ma minore di quella attesa, a causa di un allontanamento della molecola d'acqua, similmente a quanto accaduto nel caso della reazione con la glucosammina, ma in maniera ancora maggiore.

6.2 Bibliografia

- [1] G. Gugliotta, M. Botta, e L. Tei, «AAZTA-based bifunctional chelating agents for the synthesis of multimeric/dendrimeric MRI contrast agents», *Org. Biomol. Chem.*, vol. 8, fasc. 20, pp. 4569–4574, ott. 2010, doi: 10.1039/c0ob00096e.

Capitolo 7. Conclusioni

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati e caratterizzati alcuni complessi di Cu(II), con l'obiettivo di sviluppare nuove sonde MRI alternative ai chelati di Gd(III), attualmente impiegati in clinica. È stato sintetizzato il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$, complesso con elevata costante di stabilità, che, come mostrato dalle misure di rilassività e dalla spettroscopia UV-visibile, è stabile in un ampio intervallo di pH. La rilassività di tale complesso è $0.21 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 1.5 T e 298 K. I profili ^1H NMRD hanno mostrato che il $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ favorisce il rilassamento dei protoni dell'acqua mediante due meccanismi: dipolare e scalare. Dai profili registrati a diverse temperature, inoltre, si è potuto capire che lo scambio delle molecole d'acqua legate al complesso non è il fattore che limita la rilassività, per cui si può modulare il valore di τ_R , ed eventualmente di τ_S , per aumentare la rilassività. Per tentare di raggiungere questo obiettivo sono stati sintetizzati altri sistemi a partire da $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$. Il complesso CuAAZ3A-Glu è stato ottenuto dalla reazione del $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ con una molecola di glucosammina. Tale complesso mostra un valore di rilassività di $0.25 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 1.5 T e 298 K. Il lieve aumento rispetto al complesso di partenza è attribuito ad una riduzione delle dinamiche rotazionali del complesso in soluzione acquosa. Tuttavia questo incremento della rilassività è limitato dall'aumento della distanza della molecola d'acqua di sfera interna dal centro metallico. Sono stati preparati due nanogel legando il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ al chitosano: Ch-CuAAZTA1 e Ch-CuAAZTA1/2. Il primo si è rivelato una sospensione instabile, con tendenza all'aggregazione soprattutto intorno a pH 6, dove si trova il punto isoelettrico. Modificando i rapporti dei reagenti è stato ottenuto il secondo nanogel. Questo si è rivelato più stabile, ma presenta un punto isoelettrico a pH 7, in corrispondenza del quale precipita. La sua rilassività, misurata a pH 6, è di $0.34 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a 1.5 T e 298 K, valore minore di quello atteso per un sistema con massa molecolare molto maggiore di quella del $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$. Infine, il complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ è stato sfruttato nella preparazione di multimeri, legandolo al tren (tris(2-amminoetil)ammina). Sono state isolate e caratterizzate le specie in cui si è legato al tren un complesso, due complessi e tre complessi. Il sistema con tre complessi presenta un'elevata rilassività per molecola, ma la rilassività per ione Cu^{2+} è minore di quella del complesso $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ a causa dell'allontanamento dell'acqua dal centro paramagnetico. In conclusione, si è visto che tutti i derivati del $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ hanno valori di rilassività minori di quelli sperati a causa di una variazione della distanza dell'acqua di sfera interna. I complessi di rame sono

comunemente soggetti a distorsione e questo rende più facilmente modificabile la distanza dell'acqua dal metallo. Nel caso particolare, si è visto che non è possibile far reagire i gruppi laterali del $[\text{Cu}(\text{AAZTA})]^{2-}$ senza distorcere la sfera di coordinazione del metallo. Questo lavoro ha permesso di aumentare le conoscenze sui complessi di rame e sui parametri molecolari e dinamici che governano la loro relassività e sarà utile per studi futuri su nuovi complessi di rame.

Ringraziamenti

Ringrazio il prof. Mauro Botta, il prof. Fabio Carniato e il dott. Marco Ricci per avermi guidata e assistita con competenza ed entusiasmo durante tutto il lavoro sperimentale e di scrittura della tesi.

Ringrazio inoltre tutte le persone che in questi cinque anni di università hanno contribuito al mio percorso.