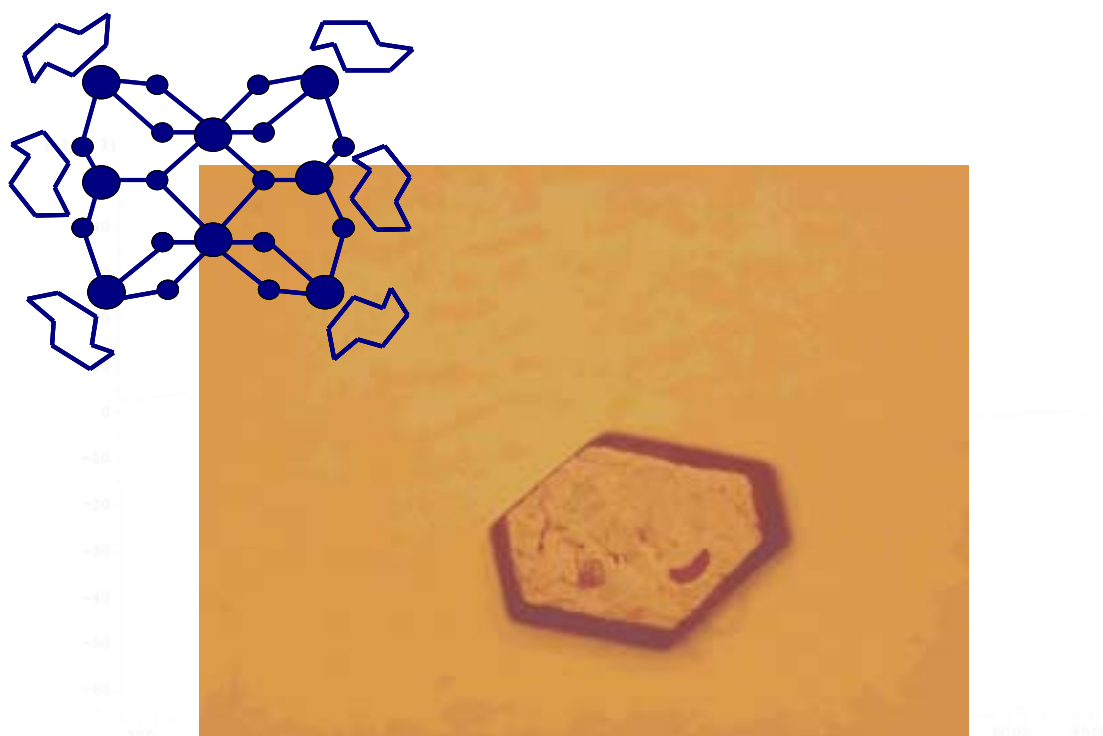


Estudi del complex molecular  
 $\{[(C_6N_3H_{12})_6Fe_8(\mu_3-O)_2(\mu_2-OH)_{12}]Br_7(H_2O)\}Br \cdot 8H_2O$   
com a agent de contrast  
en ressonància magnètica d'imatge



Elisenda Rodríguez Vargas  
Tesi doctoral



**ANNA ROIG SERRA i ELIES MOLINS GRAU**, Científic titular i Professor d'investigació del CSIC de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona.

CERTIFIQUEN

Que Elisenda Rodríguez Vargas, Llicenciada en Ciències Químiques, ha dut a terme sota la seva direcció el treball que porta per títol "Estudi del complex molecular  $\{(C_6N_3H_{12})_6Fe_8(\mu_3-O)_2(\mu_2-OH)_{12}Br_7(H_2O)\}Br \cdot 8H_2O$  com a agent de contrast en ressonància magnètica d'imatge", i queda recollit en aquesta memòria per optar al grau de Doctor en Química.

I perquè així consti, signen el present certificat.

Dra. Anna Roig Serra

Prof. Elies Molins Grau

Bellaterra 4 d'abril de 2005.

*Als de casa i a l'Oliver*

## Resum

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat l'estudi del complex  $\{[(C_6N_3H_{12})_6Fe_8(\mu_3-O)_2(\mu_2-OH)_{12}]Br_7(H_2O)\}Br \cdot 8H_2O$ , anomenat  $Fe_8$ , com a agent de contrast en ressonància magnètica d'imatge, RMI. La funció d'un agent de contrast és de disminuir els temps de relaxació,  $T_1$  i  $T_2$ , dels nuclis d'H-1 de les molècules d'aigua veïnes a la substància a fi d'adquirir imatges millor contrastades. L'avaluació del  $Fe_8$  en una solució tampó fosfatada, PBS, demostra que el  $Fe_8$  es comporta com agent de contrast  $T_1$ , és a dir, com a complexos d'ions paramagnètics tipus Gd. Les imatges potenciades en  $T_1$  de solucions de  $Fe_8$  en PBS corroboren la capacitat relaxomètrica del  $Fe_8$ . Un altre requisit dels agents de contrast és el de no presentar efectes tòxics. L'estudi de la toxicitat del  $Fe_8$  en una línia cel·lular de glioma de rata ha evidenciat l'existència de  $Fe^{3+}$  lliures que a partir de la reacció de Fenton, poden generar radicals oxidatius.

La caracterització del  $Fe_8$  en solució aquosa mitjançant tècniques espectroscòpiques i magnètiques evidencia el trencament de la molècula en solució. En la caracterització del  $Fe_8$  en PBS també cal concloure que existeix en un trencament de la molècula, però en aquest cas, els grups fosfats presents en el PBS interaccionen amb la molècula de tal forma que molt ràpidament es forma un producte,  $Fe_{8(fos)}$ , estable amb el temps, el qual presenta diferents característiques relaxomètriques depenent de la concentració de fosfats en el medi. No s'han pogut elucidar les espècies resultants de la interacció entre el Fe i els grups fosfats en solució, però, a partir de la caracterització del sistema es pensa en partícules de mida nanomètrica constituïdes d'ions Fe(III) coordinats a l'amina,  $C_6N_3H_{12}$ , i units entre ells mitjançant ponts fosfat. Aquestes nanopartícules creixen moderadament en mida a mesura que augmenta la concentració de fosfat en el medi.

L'avaluació de les solucions  $Fe_{8(fos)}$ ,  $Fe_8$  en una solució aquosa amb una certa concentració de  $K_2HPO_4$ , com a agents de contrast, resulta en un augment de la capacitat relaxomètrica a mesura que augmenta la concentració de fosfats en el medi. Aquest fet sembla que es deu, en primer lloc, a la gran avidesa per les molècules d'aigua per part dels grups fosfats i, en segon lloc, a l'augment de la mida de partícula amb la concentració de fosfat. Les solucions  $Fe_{8(fos)}$  no presenten efectes tòxics en una línia cel·lular de glioma de rata ni en ratolins. Les imatges  $T_1$  de solucions  $Fe_{8(fos)}$  obtingudes en ratolins sans mostren un augment específic del contrast amb una dosi sis cops inferior a l'administrada actualment.

## Agraïments

Aquesta tesi ha estat realitzada a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona-CSIC al departament de Cristal·lografia i Difracció de Raigs X i Química de l'Estat Sòlid, sota la direcció del doctor Elies Molins i la doctora Anna Roig. El treball realitzat ha estat possible gràcies a la concessió d'una beca predoctoral associada a projecte d'una durada de quatre anys. Les estades a l'estranger han estat finançades per una beca BE2002 de la Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya, en el cas de l'estada a Itàlia, i per una beca Mariana Bueno ESTOOO346 del Consell Superior d'Investigacions Científiques, en el cas de l'estada a Polònia. L'últim mig any de tesi la Direcció General de Recerca de la Generalitat de Catalunya ens va concedir un projecte d'intercanvi amb la universitat de Torí Aire-2003-5.

En primer lloc vull agrair al Dr. Elies Molins, codirector d'aquesta tesi, la possibilitat de dur a terme la tesi doctoral en el seu grup. Vull agrair-li l'oportunitat de donar-me aquest tema de tesi tan interdisciplinari que m'ha permès adquirir nous coneixements en diferents branques de la ciència. Vull agrair a la Dra. Anna Roig, codirectora d'aquesta tesi, la possibilitat d'accedir a ser un membre actiu d'aquest treball i oferir-me el seu suport tant en l'àmbit científic com personal durant la realització d'aquesta tesi.

Agraeixo al Dr. Jaume Casabó el fet d'haver acceptat ser tutor d'aquesta Tesi Doctoral.

A la gent que esmentaré en endavant vull agrair-los l'orientació i la formació científica que m'han ofert de forma incondicional al llarg del desenvolupament d'aquesta tesi,

Al doctor Carles Arús, cap del grup d'Aplicacions Biomèdiques de l'Espectroscòpia de Ressonància Magnètica Nuclear (GABRMN) del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, que ha estat una persones claus en el desenvolupament d'aquest treball des del primer dia. Als integrants del seu grup, la María Rosa Quintero i en Rui Simoes per introduir-me a la tècnica de la RMN i per realitzar els estudis in vivo, respectivament. Al doctor Miquel Cabañas, que també forma part del grup del Dr. Arús i tècnic del Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la UAB per l'enregistrament les imatges in vitro així com per l'ajuda en els aspectes tècnics de l'RMN.

Al doctor Sebastián Cerdán, director de l'Institut de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, a la Dra. Ballesteros i a la Dra. Pilar López-Larrubia de la Sección de Síntesi Orgànica e Imagen Molecular por Resonancia Magnética, Instituto Universitario de Investigación, UNED, per poder prendre les mesures relaxomètriques a 1.41 T.

A la doctora Coral Sanfeliu, de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, per ensenyar-me a treballar en cultiu cel·lulars, així com l'assessorament científic i personal donat al llarg d'aquest treball.

Al doctor Silvio Aime del Departament de Química IFM, a la Universitat de Torí, en primer lloc per permetre'm gaudir de les instal·lacions del laboratori LIMA al Bioindustry Park del Canavese durant un any, així com pels seus consells científics. Als integrants del seu grup, Dra. Elisa Battistini i Dr. Erik Bruno, pels lligands orgànics estudiats en aquest treball i per resoldre'm els dubtes de RMN, respectivament.

A la doctora Anna Slawska, de l'Institut de Física de l'Acadèmia de Ciències de Polònia, pel seu assessorament en el camp del magnetisme. A Nataliya Nedelko per la realització de les mesures magnètiques.

També vull donar les gràcies a totes les persones que se m'han ofert en moments puntuals de la tesi,

Al doctor Ignasi Mata de la Línia Espanyola de l'European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble per la resolució de l'estructura cristal·lina del nou polimorf del Fe<sub>8</sub>.

Al doctor Benjamín Martínez i al doctor Lluís Balcells de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona per les mesures magnètiques realitzades a l'inici d'aquest treball així com per ajudar-me a resoldre els meus dubtes en el camp del magnetisme.

A la doctora Núria Clos, de la Universitat de Barcelona, per les mesures de ressonància paramagnètica electrònica.

A la doctora María Luisa, García de la Universitat de Barcelona, per l'ús de l'osmòmetre.

Al doctor Robert Muller, del Departament de Química Orgànica de la Universitat de Mons-Hainut, Bèlgica, en primer lloc acceptar-me en el seu laboratori –on finalment no vaig anar– i en segon lloc pels consells científics que em va donar

en diverses ocasions. A la Dra. Sophie Laurent, integrant del seu grup, per les mesures de espectroscòpia de masses Maldi-Tof.

A Vega Lloveras, estudiant de doctorat a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona, per les mesures realitzades d'espectroscòpia ultraviolada-visible.

Al doctor Eliano Diana, de la Universitat de Torí, per les mesures preses al seu laboratori d'espectroscòpia infraroja i Raman.

Al doctor Alexander Wisniewski, de l'Acadèmia de Ciències de Polònia, per les mesures de magnetització realitzades al PPMS.

A Martí Gich, estudiant de doctorat a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona, per les mesures Mössbauer.

A Judith Oro, tècnic especialitzat de l'Institut de Ciència de Materials, per les imatges de microscòpia electrònica de transmissió efectuades.

La correcció lingüística de la tesi doctoral, a càrrec de Josep Maria Nin, ha estat possible gràcies a l'ajut concedit per la Comissió de Política Lingüística de la Universitat Autònoma de Barcelona i la col·laboració del Gabinet de Llengua Catalana de la UAB.

Als integrants del meu grup, el Lluís, la Magda, l'Ignasi, el Martí, la Joana, l'Elena, la Mònica, el Raül i la Laura, per ajudar-me en tantes ocasions.

I, finalment, vull agrair a totes aquelles persones, família i amics, que han compartit amb mi les bones estones i els moments difícils durant la realització d'aquesta tesi.

## Context de la tesi

Em vaig incorporar en el si del grup de recerca del Prof. Elies Molins, de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC) al maig del 2000. Simultàniament em trobava finalitzant un màster experimental en el grup de Models en Bioinorgànica al Departament de Química Inorgànica de la Universitat de Barcelona, sota la direcció de la Dra. Montse Corbella. L'objectiu del màster era modelar el comportament de catalases de Mn. Els productes obtinguts van ser caracteritzats per tècniques espectroscòpiques i magnètiques, i les seves propietats catalítiques van ser avaluades davant del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Així vaig establir el primer contacte amb el camp del magnetisme molecular i va ser aquesta la raó de la meua incorporació al grup del Prof. Elies Molins.

Les activitats del grup s'engloben dins del laboratori de Cristal·lografia i Difracció de Raigs X en el qual també es treballa en la síntesi d'aerogels i en l'espectroscòpia Mössbauer. La meua tasca inicial al grup va consistir a sintetitzar aerogels amb partícules d'òxid de ferro. Aquesta tasca cal emmarcar-la dins del projecte europeu Nano Free-Rotor Magnets for Electronic Components (Programa CRAFT-BRITE EURAM, projecte: BES2-2806). L'objectiu d'aquest projecte, per part del nostre grup, era sintetitzar un material compostat format per una matriu porosa i partícules magnètiques monodomini en el seu interior sense lligam químic important entre ambdós components. Així, durant el primer mig any vaig iniciar-me en la tècnica sol-gel i em vaig familiaritzar amb noves tècniques de caracterització com la difracció de raigs X en pols, la microscòpia d'escombratge, l'espectroscòpia Mössbauer i tècniques de caracterització magnètica.

A causa del meu interès en el camp de la bioquímica (estic cursant la llicenciatura de bioquímica a la Universitat Autònoma de Barcelona), la meua tesi es va orientar cap a l'estudi d'una possible aplicació mèdica d'un material ja estudiat en el grup dins d'un altre context. Els complexos de Gd(III) actualment s'utilitzen com a agents de contrast en la ressonància magnètica d'imatge (RMI) ja que presenten un alt moment magnètic. L'RMI es basa en l'obtenció d'imatges tomogràfiques del cos humà en qualsevol direcció de l'espai que siguin fàcilment interpretables. En aquests últims anys, l'ús hospitalari de la tècnica ha experimentat un ascens vertiginós i en l'actualitat s'ha convertit en imprescindible per a moltes patologies, especialment del sistema nerviós i del sistema musculoesquelètic. Avui en dia, els complexos de Gd(III) són els agents de



contrast de diagnosi en RMI per obtenir imatges millor contrastades. Un altre tipus d'agents de contrast són els òxids de Fe(III).

Com que el grup tenia experiència prèvia en la caracterització magnètica de partícules nanomètriques d'òxids de Fe(III) vam decidir estudiar compostos de Fe(III) com a agents de contrast. Es va fer una cerca bibliogràfica i es va trobar que gairebé tots els agents de contrast es basaven en òxids de Fe(III). Els òxids de Fe(III) presenten la problemàtica que les partícules s'agreguen sota un camp magnètic i per tant s'han de dispersar, també presenten una considerable dispersió de la mida de partícula.

Actualment també hi ha un gran interès en el camp del magnetisme molecular perquè alguns compostos moleculars es comporten com imants moleculars a baixa temperatura. Aquests compostos moleculars estan formats per metalls units entre si per elements no metàl·lics que faciliten l'acoblament magnètic. Aquests tipus de compostos presenten els avantatges següents:

- Són sistemes polimetàl·lics acoblats entre si magnèticament i creen un alt moment magnètic.
- Són sistemes moleculars i, a diferència dels òxids de ferro (III), no es dona agregació sota un camp magnètic a temperatura ambient i la mida de partícula és homogènia.

El complex escollit va ser el  $\{[(C_6N_3H_{12})_6Fe_8(\mu_3-O)_2(\mu_2-OH)_{12}]Br_7(H_2O)\}Br \cdot 8H_2O$ ,  $Fe_8$  sintetitzat prèviament pel Prof. Wieghardt, a fi d'avaluar-lo com a agent de contrast per les raons següents:

- És un sistema amb 8 nuclis de Fe(III) acoblats entre si, per tant, el moment magnètic resultant en el cas del  $Fe_8$  és més gran que el que presenta un compost mononuclear
- El  $Fe_8$  presenta una mida intermèdia entre els complexos mononuclears i els òxids de Fe(III)
- El ferro és un element ja present en el cos, i no ho és el gadolini
- El grup estava familiaritzat amb el  $Fe_8$

La tesi s'ha estructurat en sis capítols i dos annexos. Els continguts de cadascun d'aquests sis capítols es descriuen breument a continuació:

- i) El primer capítol introdueix la tècnica de la ressonància magnètica. També s'hi inclou una introducció als tipus d'agents de contrast i als seus mecanismes d'acció. Finalment s'hi exposen els objectius d'aquest treball de tesi.
- ii) En el segon capítol es troba descrita la síntesi del compost  $\text{Fe}_8$ , així com la caracterització del sistema.
- iii) El tercer capítol descriu l'avaluació del  $\text{Fe}_8$  com a agent de contrast in vitro. També s'hi inclouen mesures de toxicitat desenvolupades en una línia cel·lular.
- iv) El quart capítol es basa en una àmplia caracterització magnètica i espectroscòpica del sistema  $\text{Fe}_8$  en solució.
- v) En el cinquè capítol s'avalua el sistema del  $\text{Fe}_8$  en solució fosfatada com a agent de contrast in vitro, així com les mesures preliminars in vivo d'aquest nou sistema.
- vi) El darrer capítol conté les conclusions de la tesi.

L'annex 1 inclou una descripció a totes les tècniques de caracterització instrumentals en aquest treball i les estratègies utilitzades per cristal·litzar solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ .

L'annex 2 inclou les condicions experimentals de mesura, resolució i afinament de l'estructura cristal·lina resolta d'un nou polimorf del  $\text{Fe}_8$ .

L'annex 3 inclou un resum de la tesi en llengua anglesa.

## Continguts

<b>Resum</b> .....	i
<b>Agraïments</b> .....	iii
<b>Context de la tesi</b> .....	vii
<b>Continguts</b> .....	xi
<b>Abreviacions i símbols</b> .....	xv
<b>1.-Introducció i objectius de la tesi</b> .....	1
1.1.-Introducció a la ressonància magnètica.....	2
1.2.-Seqüències de polsos clàssiques.....	8
1.2.1.-Imatges potenciades en densitat D.....	8
1.2.2.-Imatges potenciades en $T_1$ .....	9
1.2.3.-Imatges potenciades en $T_2$ .....	11
1.3.-Obtenció d'imatges.....	14
1.3.1.-Seqüència spin-eco: SE.....	15
1.3.2.-Selecció del pla tomogràfic.....	16
1.3.3.-Reconstruir la imatge.....	17
1.4.-Altres tècniques tomogràfiques.....	18
1.5.-Agents de contrast.....	20
1.5.1.-Classificació dels agents de contrast.....	21
1.5.2.-Mecanismes d'acció dels agents de contrast.....	25
1.6.-Objectius de la tesi.....	31
Bibliografia del capítol 1.....	33
<b>2.-Síntesi i caracterització del <math>Fe_8</math></b> .....	37
2.1.-Síntesi del $Fe_8$ .....	38
2.2.-Caracterització del $Fe_8$ .....	39
2.2.1.-Difracció de raigs X.....	39
2.2.2.-Espectroscòpia d'infraroig (IR) i Raman.....	43
2.2.3.-Mesures magnètiques.....	45
2.2.4.-Espectroscòpia Mössbauer.....	46
Bibliografia del capítol 2.....	48
<b>3.-Avaluació del <math>Fe_8</math> com a agent de contrast en PBS</b> .....	49
3.1.-Mesura del $T_1$ i $T_2$ .....	50

3.1.1.-Materials i mètodes.....	50
3.1.2.-Resultats.....	51
3.2.-Obtenció d'imatges.....	55
3.2.1.-Materials i mètodes.....	55
3.2.2.-Resultats.....	56
3.3.-Estudis de toxicitat.....	57
3.3.1.-Materials i mètodes.....	57
3.3.2.-Resultats.....	60
3.4.-Conclusions.....	67
Bibliografia del capítol 3.....	69
<b>4.-Estudi del comportament del Fe<sub>8</sub> en solució.....</b>	<b>71</b>
4.1.-Caracterització del Fe <sub>8</sub> en solució aquosa.....	72
4.1.1.-Mesures espectroscòpiques.....	73
4.1.2.-Mesures magnètiques.....	76
4.2.-Caracterització del Fe <sub>8</sub> en solucions fosfatades.....	81
4.2.1.-Mesures espectroscòpiques.....	83
4.2.2.-Mesures magnètiques.....	89
4.2.3.-Aspectes cinètics sobre la descomposició del Fe <sub>8</sub> en solució.....	94
4.3.-Conclusions.....	96
Bibliografia del capítol 4.....	100
<b>5.-Avaluació de les solucions Fe<sub>8</sub>(fos) com agents de contrast.....</b>	<b>103</b>
5.1.-Mesura del T <sub>1</sub> i T <sub>2</sub> .....	104
5.1.1.-Materials i mètodes.....	104
5.1.2.-Resultats.....	105
5.1.3.-Avaluació dels precursors del Fe <sub>8</sub> com agents de contrast.....	113
5.1.4.-Discussió dels resultats.....	116
5.2.-Estudis de toxicitat.....	120
5.2.1.-Materials i mètodes.....	120
5.2.2.-Resultats.....	121
5.3.-Obtenció d'imatges.....	125
5.3.1.-Materials i mètodes.....	125
5.3.2.-Resultats.....	126
5.4.-Estudis in vivo.....	128
5.4.1.-Estudis de toxicitat.....	129
5.4.1.1.-Materials i mètodes.....	129
5.4.1.2.-Resultats.....	129

---

5.4.2.-Obtenció d'imatges.....	131
5.4.2.1.-Materials i mètodes.....	131
5.4.2.2.-Resultats.....	132
5.5.-Conclusions.....	136
Bibliografia del capítol 5.....	139
<b>6.-Conclusions</b> .....	<b>141</b>
6.1.-Conclusions.....	142
6.2.-Perspectives de futur.....	145
<b>7.-Annexos</b> .....	<b>147</b>
7.1.-Annex 1: Descripció de les tècniques instrumentals utilitzades en aquest treball.....	148
7.1.1.-Ressonància magnètica nuclear.....	148
7.1.2.-Espectroscòpia ultravioleta-visible (UV-Vis).....	150
7.1.3.-Espectroscòpia d'infraroig i Raman.....	151
7.1.4.-Magnetometria SQUID i VSM.....	152
7.1.5.-Espectroscòpia Mössbauer.....	156
7.1.6.-Difracció de raigs X.....	158
7.1.7.-Altres tècniques.....	159
7.1.8.-Estratègies utilitzades per cristal·litzar solucions Fe <sub>8(fos)</sub> .....	160
7.2.-Annex 2: Condicions experimentals de mesura, resolució i afinament del nou polimorf de Fe <sub>8</sub> .....	161
7.3.-Annex 3: Resum de la tesi en llengua anglesa.....	164
Bibliografia del capítol 7.....	175

<b>Abreviacions</b>	<b>Nom</b>
bifosfat	àcid 2-aminoacetilbifosfònic
Cpmg	seqüència Carr-Purcell-Meiboom-Gill
DCFA-DA	2'7'-diclorofluoresceïndiacetat
DOTA	àcid 1,4,7,10-tetraazaciclododecà-N,N',N'',N'''-tetraacètic
DRX	difracció de raigs X
DTPA	àcid dietiltriainapentaacètic
ECF	extracel·lular
EDTA	àcid dietilendiaminatetraacètic
FDA	diacetat de fluoresceïna
Fe <sub>8</sub>	$\{[(C_6N_3H_{12})_6Fe_8(\mu_3-O)_2(\mu_2-OH)_{12}]Br_7(H_2O)\}Br \cdot 8H_2O$
Fe <sub>8(aq)</sub>	Fe <sub>8</sub> en solució aquosa
Fe <sub>8(fos)</sub>	Fe <sub>8</sub> en solució fosfatada
<sup>18</sup> FGD	2-[ <sup>18</sup> F]-2-desoxi-D-glucosa
FID	free induction decay
HEPES	àcid N-[2-hidroximetil]piperazina-N'-[2-età-sulfonic]
GRE	seqüència gradient-eco
ir	seqüència d'inversió-recuperació
IR	Infraroig
IS	esfera interna
LDH	lactat deshidrogenasa
MTT	bromur de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5difenil-tetraaza
NMRD	<i>nuclear magnetic resonance dispersion</i>

OS	esfera externa
PBS	solució tampó fosfatada
PET	emissió de positrons
PI	iodur de propidi
RME	ressonància magnètica d'espectroscòpia
RMI	ressonància magnètica d'imatge
RMN	ressonància magnètica nuclear
RPE	ressonància paramagnètica electrònica
SE	seqüència spin-eco
SPIO	partícules superparamagnètiques d'òxid de ferro (III)
SR(IR)	seqüència de saturació-repetició
Tacn	1,4,7-triazaciclonoà, (C <sub>6</sub> N <sub>3</sub> H <sub>12</sub> )
TC	tomografia axial computada
TEM	microscopia de transmissió electrònica
TETA	àcid 1,4,7,10-tetraazacicotetradecà-N,N',N'',N'''-tetraacètic
USPIO	partícules ultra-superparamagnètiques d'òxid de ferro (III)
UV-Vis	ultraviolat-visible

<b>Símbol</b>	<b>Definició</b>
A	radi de l'esfera
$B_0$	camp magnètic
$B_1$	camp magnètic rotatori
BW	amplitud de banda característica
c	concentració de l'agent de contrast
D	densitat de nuclis
$D_H, D_P$	coeficients de difusió de l'aigua i de l'element paramagnètic
$\gamma$	constant giromagnètica
FOV	camp de visió
$I_c, I_0$	intensitats de les imatges en presència i en absència d'agent de contrast, respectivament
$\Delta I E$	percentatge d'augment de la intensitat
LC <sub>50</sub>	concentració que provoca el 50% de mort cel·lular
M, $M_0$	magnetització del vòxel i magnetització del vòxel amb el sentit i direcció del $B_0$ respectivament
$M_z, M_{xy}$	projecció de la magnetització sobre l'eix z i sobre l'eix xy respectivament
$\mu$	moment dipolar magnètic nuclear
$\mu_B$	magnetons de Bohr
NEX	nombre d'excitacions
$\theta$	constant de Curie
Q	nombre de molècules d'aigua coordinades al metall
S	nombre quàntic d'spin nuclear
<b>s</b>	moment angular d'spin
$T_1$	temps de relaxació longitudinal



$T_2, T_2^*$	temps de relaxació transversal. $T_2$ no considera les heterogeneïtats de $B_0$
TE	temps d'eco
TI	temps d'inversió
TR	temps de repetició
$\tau_c, \tau_M, \tau_R,$ $\tau_S$	temps de correlació, de residència de les molècules d'aigua al metall, de rotació de l'agent de contrast i de relaxació d'spin electrònic
$\omega$	freqüència de precessió o de ressonància

# **1 | Introducció i objectius de la tesi**

---

---

## **1.1 Introducció a la ressonància magnètica**

## **1.2 Seqüències de polsos clàssiques**

## **1.3 Obtenció d'imatges**

## **1.4 Altres tècniques tomogràfiques**

## **1.5 Agents de contrast**

## **1.6 Objectius de la tesi**

La ressonància magnètica d'imatge (RMI) és una tècnica d'imatge utilitzada per obtenir imatges tomogràfiques en qualsevol regió de l'espai, fàcilment interpretables i que no utilitza radiacions ionitzants. L'RMI es basa en els principis físics de la ressonància magnètica nuclear (RMN). Aquest capítol consisteix en una introducció als principis de l'RMN. A continuació es fa una breu descripció de les seqüències utilitzades en aquest treball per obtenir imatges. Després es descriu la funció d'un agent de contrast així com els mecanismes d'actuació, amb diferents exemples i finalment, s'exposen els objectius d'aquesta tesi.

## 1.1 Introducció a la ressonància magnètica

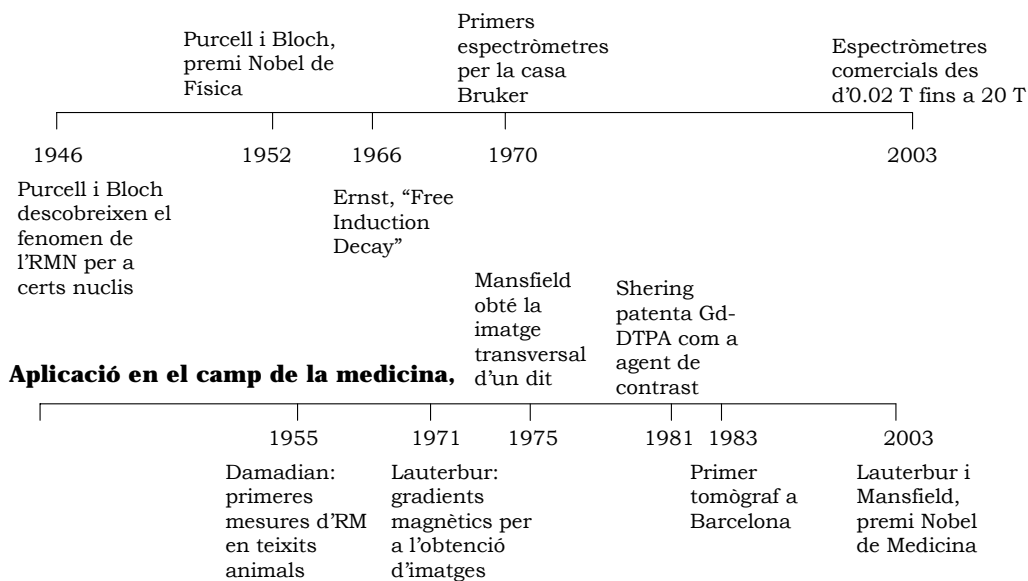
La **ressonància magnètica nuclear (RMN)** és un fenomen físic pel qual nuclis atòmics amb un nombre senar de protons ( $Z$ ) i/o un nombre senar de neutrons ( $N$ ) poden absorbir selectivament energia de radiofreqüència en ser col·locats sota un camp magnètic,  $\mathbf{B}_0$ . Un cop els nuclis han absorbit l'energia de radiofreqüència (fenomen de ressonància), retornen l'excés energètic mitjançant l'alliberament d'ones de radiofreqüències (fenomen de relaxació). Aquest alliberament energètic induïx un senyal elèctric en una antena receptora amb la qual es pot obtenir una imatge (RMI), fer una anàlisi espectromètrica (RME) o una combinació entre aquestes dues (imatges espectromètriques).

Tot i que es poden estudiar molts nuclis per RMN, actualment només alguns tenen utilitat clínica. En l'RMI, el més important és el protó, H-1, per la seva abundància en els teixits biològics; és en el que es basen les imatges utilitzades actualment de rutina clínica. El senyal de relaxació detectat prové dels nuclis

d'H-1 del teixit, però es troba influït per molts paràmetres, uns d'externs (com per exemple el valor del camp magnètic,  $B_0$ ) i altres de propis del teixit (com per exemple el tipus de molècula en què es troba el nucli d'H-1). Això explica que el senyal detectat aportí molta informació.

L'RMN ha experimentat un ascens vertiginós en els últims anys, tal com es pot veure a la figura 1.1,

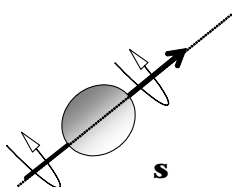
**Principis físics,**



**Figura 1.1** Història de l'RM; s'hi destaquen els principals avenços teòrics i tècnics i les seves repercussions en les aplicacions mèdiques

**Teoria de la ressonància magnètica nuclear**

Els nuclis tenen un moment angular d'spin. Aquesta magnitud és vectorial i la denotem com a  $\mathbf{s}$ . Aquest moment es pot caracteritzar a partir d'un nombre quàntic d'spin nuclear, S (vegeu la figura 1.2).



**Figura 1.2** Representació esquemàtica d'un nucli d'H-1

Els nuclis, en girar i presentar una massa i una càrrega positiva  $q$  tenen un moment dipolar magnètic conegut com a moment dipolar magnètic nuclear, que es representa pel vector  $\boldsymbol{\mu}$  orientat sobre l'eix de gir. El moment magnètic s'orienta al llarg de l'spin i és proporcional al moment angular d'spin, d'aquesta forma,

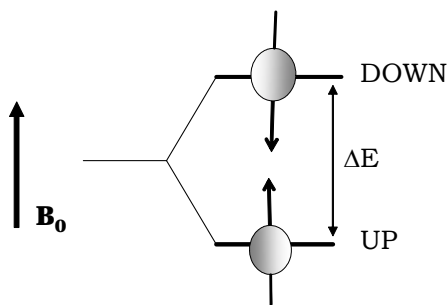
$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \cdot \mathbf{S} \quad (\text{eq. 1.1})$$

on  $\gamma$  és la relació giromagnètica nuclear que depèn del quocient càrrega/massa del nucli. Les relacions giromagnètiques pels quatre elements d'interès es troben a la segona columna de la taula 1.1.

**Taula 1.1** Propietats magnètiques dels quatre nuclis d'interès

Nucli	$\gamma$ ( $10^4 \text{ rad}\cdot\text{G}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ )	Abundància isotòpica, (%)
H-1	2.674	99.98
C-13	0.672	1.11
P-31	1.083	100.00
F-19	2.517	100.00

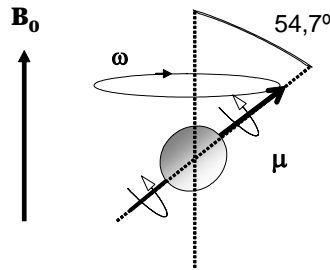
En presència d'un camp magnètic,  $\mathbf{B}_0$ , els nuclis atòmics presenten la propietat natural d'absorbir energia de radiofreqüència, a una freqüència determinada. Des del punt de vista energètic, per als nuclis H-1 són dos els possibles estats energètics (figura 1.3). A cada estat energètic li correspon una orientació de  $\boldsymbol{\mu}$  respecte al  $\mathbf{B}_0$ , per la qual cosa existeixen dues projeccions possibles respecte a la direcció del camp magnètic: una en la direcció de  $\mathbf{B}_0$  *up* i l'altra en la direcció contrària *down*.



**Figura 1.3** Nivells d'energia per al nucli H-1 en presència de  $B_0$

En mecànica quàntica no és viable una orientació paral·lela del moment magnètic amb el camp magnètic perquè els estats energètics es troben quantitzats, de manera que el moment magnètic fa un moviment gir al voltant de

la direcció del camp magnètic mantenint un angle de  $54.7^\circ$  (vegeu la figura 1.4). Aquest moviment s'anomena moviment de precessió de  $\mu$  al voltant de  $\mathbf{B}_0$ .



**Figura 1.4** Moviment de precessió del vector  $\mu$  al voltant de  $\mathbf{B}_0$

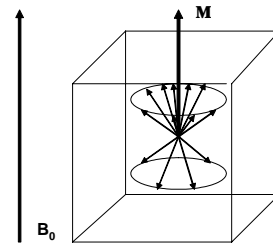
El moviment de precessió té associada una freqüència característica, la freqüència de precessió o de ressonància,  $\omega$ , que és proporcional al camp magnètic percebut pel nucli seguint l'anomenada llei fonamental de la ressonància magnètica o llei de Larmor:

$$\omega = \gamma \cdot \mathbf{B}_0 \quad (\text{eq. 1.2})$$

Els nuclis d'hidrogen d'un element de volum (**vòxel**) tenen, en absència d'un camp magnètic, els spins orientats a l'atzar. En presència de  $\mathbf{B}_0$ , en ser possibles dos estats energètics, els nuclis es reparteixen segons una distribució de Boltzman en equilibri tèrmic. En conseqüència, existiran més nuclis en la posició menys energètica *up*. La relació entre els nuclis *up* i *down* ve donada per l'expressió següent:

$$\frac{N_{\text{up}}}{N_{\text{down}}} = \exp \left( \frac{-\Delta E}{kT} \right) \quad (\text{eq. 1.3})$$

Tal com es mostra a la figura 1.5, el vector resultant de la suma vectorial dels moments magnètics, s'anomena magnetització del vòxel ( $\mathbf{M}$ ). El vector  $\mathbf{M}$  té el sentit i la direcció del camp magnètic. Denotarem com a  $\mathbf{M}_0$  quan el vector magnetització té el sentit i la direcció del camp magnètic.



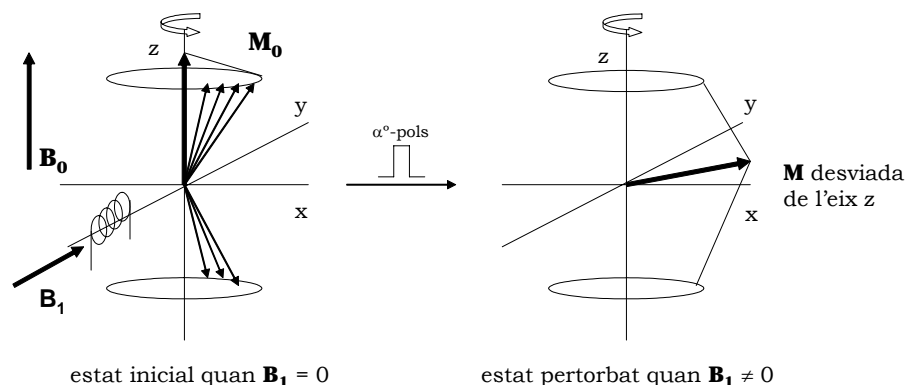
**Figura 1.5** Magnetització d'un element de volum

### El procés d'absorció en NMR

Inicialment tindrem el vòxel sota un camp magnètic extern,  $\mathbf{B}_0$ ; per tant  $\mathbf{M} = \mathbf{M}_0$  si ara es col·loca una antena emissora amb la direcció de màxima emissió cap al

vòxel sobre el pla transversal i es va canviant la freqüència d'emissió, quan s'emeti la freqüència exacta de la freqüència del moviment de precessió, els nuclis són capaços d'absorbir energia, és a dir, d'entrar en **ressonància**. Des del punt de vista quàntic un estat *up* passaria a l'estat *down* en absorbir selectivament un valor energètic exactament igual a la diferència dels nivells energètics que li imposa el valor del camp magnètic  $\mathbf{B}_0$ . Quan els nuclis del vòxel entren en ressonància, la magnetització  $\mathbf{M}$  gira respecte de la seva posició d'equilibri, on la separació respecte a la posició d'equilibri es determina per l'angle  $\alpha^\circ$  (vegeu la figura 1.6). El moviment de la magnetització es deu al fet que l'ona de radiofreqüència emesa crea una força que l'obliga a desplaçar-se de la posició d'equilibri. L'aplicació d'una radiació de radiofreqüència s'expressa com a RF o com l'aplicació d'un camp magnètic rotatori,  $\mathbf{B}_1$ , sobre el pla perpendicular a  $\mathbf{B}_0$ . El valor de  $\alpha^\circ$  depèn de la potència i el temps de l'emissió de la radiofreqüència. Es parla doncs d'un pols de  $90^\circ$  quan el vector magnetització es desplaça sobre el pla  $xy$ .

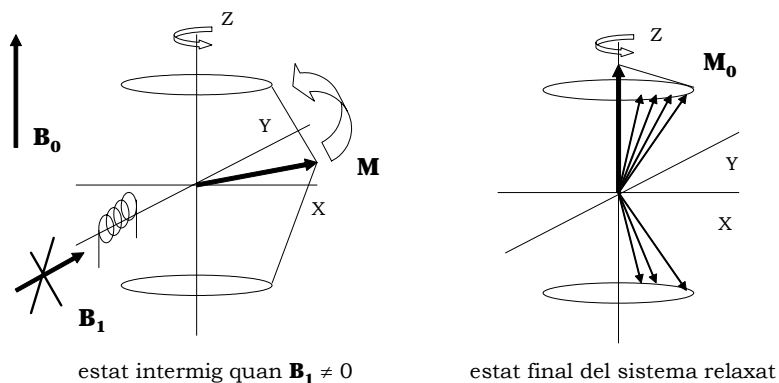
$$\alpha^\circ = \gamma \cdot |\mathbf{B}_1| \cdot \tau \quad (\text{eq. 1.4})$$



**Figura 1.6** Representació gràfica de l'excitació nuclear per un pols de radiofreqüència

### La relaxació nuclear

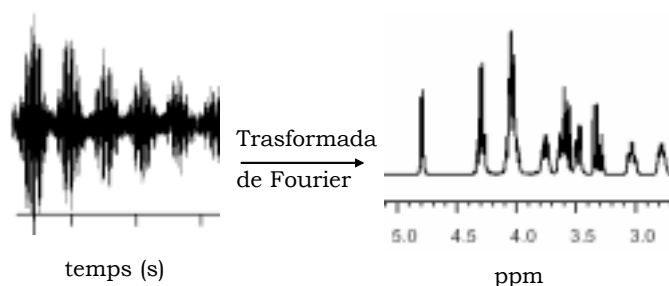
Un cop es deixa d'aplicar el pols de radiofreqüència, la magnetització torna a la seva posició inicial mitjançant un procés d'alliberació energètica, anomenat **relaxació**; és a dir, la magnetització,  $\mathbf{M}$ , torna a recuperar el seu valor inicial  $\mathbf{M}_0$ . La relaxació es produeix quan els nuclis desprenen l'excés energètic que han absorbit en entrar en ressonància. La relaxació acaba quan la proporció de nuclis del vòxel entre els estats energètics *up/down* coincideix amb la distribució de Boltzmann inicial (figura 1.7).



**Figura 1.7** Representació gràfica de la relaxació energètica

La relaxació energètica dels nuclis no és un procés espontani sinó que necessita canals que siguin capaços d'absorbir l'excés d'energia alliberat pels nuclis. Aquesta energia alliberada pels nuclis té el mateix ordre de magnitud que aquella que utilitzen les molècules en els seus moviments brownians, per tant durant la relaxació nuclear es dona un traspàs d'energia des dels nuclis fins als canals circumdants, és a dir, l'alliberació energètica es veurà molt influïda pel medi histoquímic on es trobin els nuclis. Els canals de l'entorn nuclear susceptibles d'intercanviar energia amb els nuclis reben el nom de **xarxa, plasma o medi**.

El retorn a la posició d'equilibri de la magnetització dóna lloc a unes alteracions del camp magnètic que poden ser detectades mitjançant una antena receptora ja que les variacions de camp magnètic indueixen un senyal elèctric, el qual es farà servir per obtenir les imatges en RM. Després d'enviar un pols de radiofreqüència, la relaxació de la magnetització indueix un senyal elèctric en l'antena receptora coneguda per **FID** (free induction decay), un senyal sinusoidal esmorteït, que es converteix, per una transformació de Fourier, en un senyal de domini de freqüència (figura 1.8).



**Figura 1.8** Conversió del senyal elèctric detectat en un senyal de domini de freqüència mitjançant una transformada de Fourier

Estudiant el senyal de relaxació podem obtenir informació sobre la densitat dels nuclis d' $^1\text{H}$  existents en el vòxel, **D**, i també informació relacionada sobre el

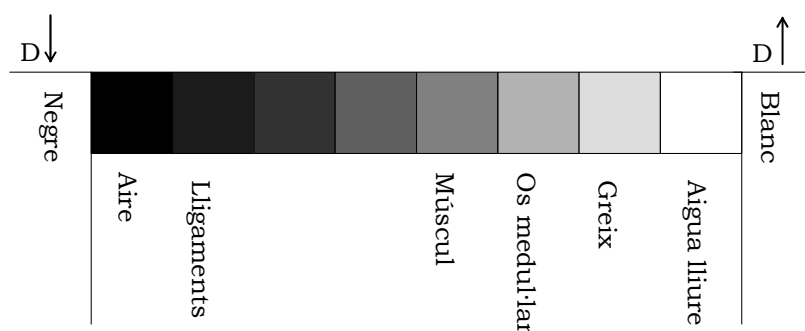


medi avaluant els paràmetres anomenats  $T_1$ ,  $T_2$  i  $T_2^*$ , que s'obtingran estudiant la relaxació nuclear en l'eix longitudinal i en el pla transversal, respectivament. Les imatges d'RM es construeixen a partir d'aquests paràmetres. Això no obstant, es pot fer prevaler un paràmetre enfront d'un altre mitjançant la programació de seqüències de polsos adequades.

## 1.2 Seqüències de polsos clàssiques

### 1.2.1 Imatges potenciades en densitat (D)

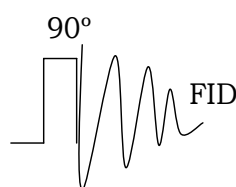
El valor de la magnetització és proporcional a la densitat de nuclis d'H-1 que conté el vòxel, D. Després d'enviar un pols de  $90^\circ$ , el valor inicial del senyal recollit a l'antena receptora serà proporcional a la densitat de nuclis d'H-1. A la figura 1.9 es pot veure l'escala de grisos en una imatge estàndard potenciada en D. A aquells teixits amb un valor de densitat d'H-1 més alt, com per exemple el teixit gras se'ls assigna un contrast més intens (més cap al blanc).



**Figura 1.9** Escala de grisos en una imatge potenciada en D

### Seqüència de pols: saturació-recuperació

Per obtenir una imatge potenciada en D, el procediment clàssic consisteix en enviar polsos de  $90^\circ$  separats un temps de repetició (TR) suficientment llarg per tal que la magnetització assolixi el seu valor inicial,  $M_0$ , entre pols i pols. Després de cada pols de  $90^\circ$  l'amplitud inicial de la FID és proporcional a la D de nuclis del vòxel que han entrat en ressonància. Aquesta seqüència de polsos de  $90^\circ$  separats per un TR rep el nom de seqüència saturació-recuperació i s'indica per  $SR_{(TR)}$  (vegeu la figura 1.10).

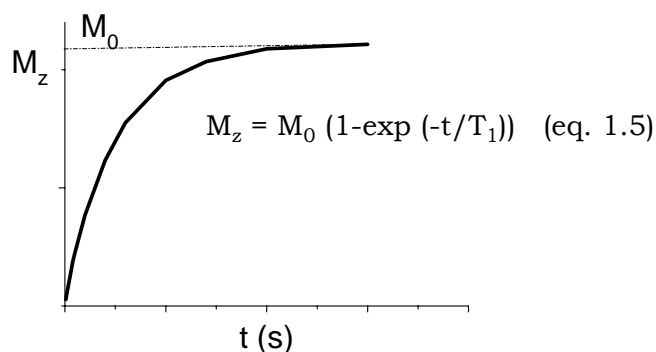


**Figura 1.10**  
Seqüència saturació-recuperació per obtenir una imatge potenciada en D

### 1.2.2 Imatges potenciades en $T_1$

Durant la relaxació els nuclis d'H-1 van alliberant el seu excés energètic. Un cop finalitzada la relaxació, el vector magnetització recuperarà el seu valor inicial alineant-se amb el camp magnètic. Si estudiem després d'un pols d'RF, les variacions en el temps de la projecció sobre l'eix longitudinal ( $M_z$ ) del vector magnetització **M (relaxació longitudinal)**, direm que el procés de relaxació haurà acabat quan el valor de la projecció sigui idèntic al valor inicial  $M_0$ . Per tant, l'estudi de la relaxació longitudinal ens dóna idea de la rapidesa amb què es recupera l'estat inicial.

La relaxació longitudinal té la forma d'una exponencial creixent regulada per una constant de temps expressada en mil·lisegons anomenada  **$T_1$**  (vegeu la figura 1.11 i equació 1.5). El  $T_1$  rep el nom de **temps de relaxació spin-xarxa** o **temps de relaxació longitudinal** i es defineix com el temps necessari per tal de que la magnetització recuperi un 63 % del seu valor. A mesura que  $T_1$  és més petit, s'assoleix l'estat d'equilibri més ràpidament, és a dir, la relaxació dels nuclis d'H-1 és més ràpida. L'equació 1.5 descriu el procés de relaxació longitudinal.

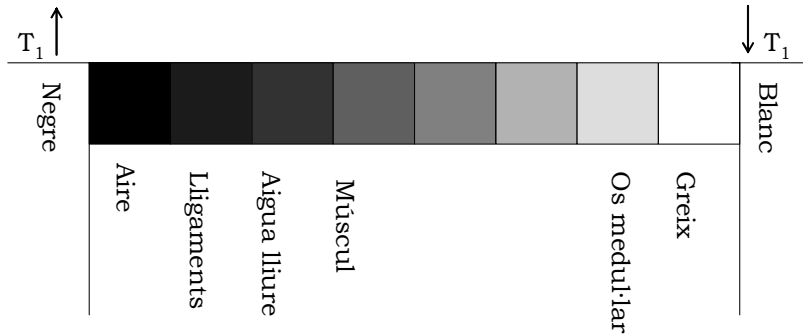


**Figura 1.11** Relaxació exponencial de la component de la magnetització

Des del punt de vista biofísic l'alliberació energètica és un intercanvi energètic del nucli d'H-1 amb la xarxa; per tant, el valor de  $T_1$  depèn fortament del tipus i la mobilitat de les molècules amb les quals l'H-1 interacciona. Els valors de  $T_1$  també són dependents del camp magnètic principal, ja que aquest imposa la banda de freqüència de treball. Els valors de  $T_1$  augmenten amb el valor del camp magnètic.

A la figura 1.12 es pot veure que les molècules com els lípids presenten  $T_1$  curts perquè poden alliberar fàcilment l'excés energètic; en canvi, l'aigua lliure, com que les molècules presenten una mobilitat alta, les freqüències de fluctuació

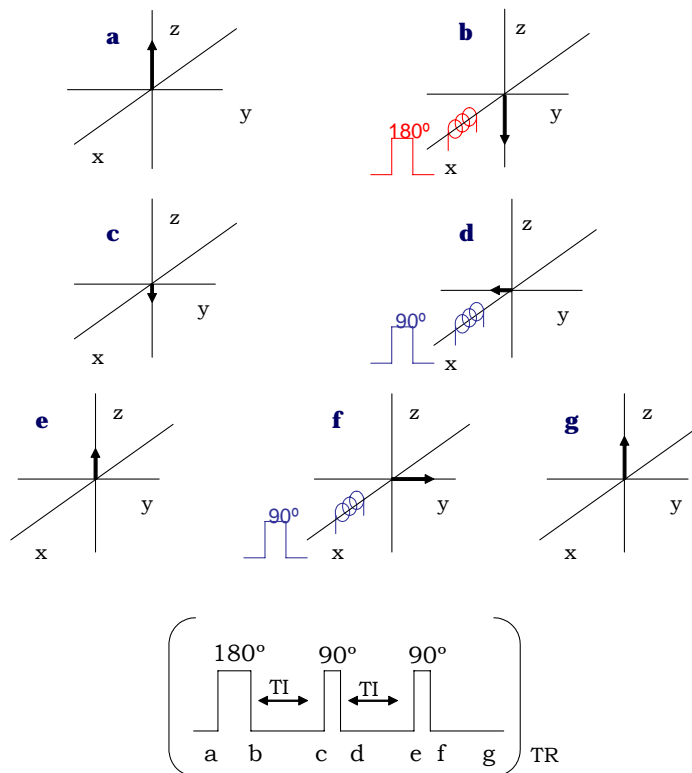
també augmenten i es distribueixen en un interval de temps tan ampli que la probabilitat que es doni la transició spin-xarxa disminueix.



**Figura 1.12** Escala de grisos en una imatge potenciada en  $T_1$ .

### Seqüència de pols: inversió-recuperació

Una de les seqüències més utilitzades per obtenir imatges potenciades en  $T_1$  és l'anomenada inversió-recuperació (ir) (vegeu la figura 1.13).



**Figura 1.13** Seqüència inversió-recuperació:  $180^\circ - \tau - 90^\circ - \text{FID}$

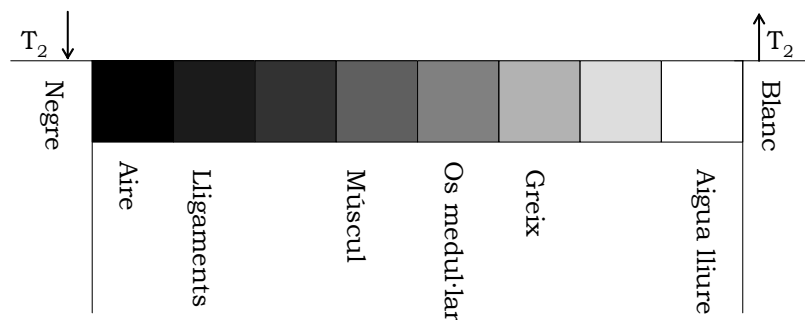
La seqüència IR consisteix en un pols de 180° (figura 1.13 b) i després de deixar relaxar durant un cert temps d'inversió (TI) (figura 1.13 c) s'envia un pols de 90° per llegir l'estat de la magnetització; s'obté una FID sobre el pla x,y de la bobina (l'antena receptora sempre té la direcció de màxima captació sobre el pla transversal) (figura 1.13 d). A continuació es deixa relaxar durant un cert temps TI (figura 1.13 e) i es torna a llegir la magnetització en el pla x,y (figura 1.13 f). La seqüència es repeteix amb un temps de repetició (TR) i s'envia un nou pols de 180°. El TR ha de ser prou gran perquè la magnetització hagi assolit el seu valor inicial  $M_0$  ( $TR > 5 \cdot T_1$ ).

En el cas d'obtenir el T1 a partir de la seqüència ir l'equació que s'ha d'utilitzar és la següent:

$$M_z = M_0 2(1 - \exp(-t/T_1)) \quad (\text{eq. 1.6})$$

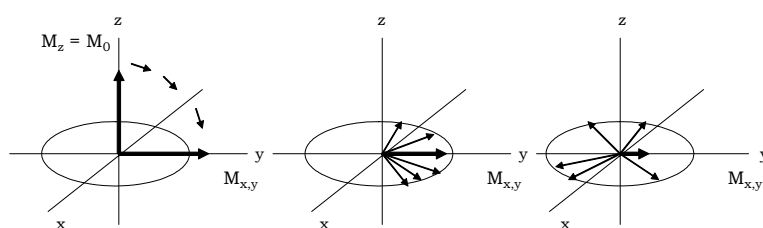
### 1.2.3 Imatges potenciades en $T_2$

Durant la relaxació, cada nucli allibera el seu excés energètic a una freqüència que depèn del camp magnètic que percep localment, tal com s'expressa en l'equació de Larmor (eq. 1.2). El valor del camp magnètic percebut per cada nucli està modificat pel seu entorn bioquímic en què es troba per raó de totes les càrregues elèctriques en moviment al voltant seu. Aquesta influència de l'entorn bioquímic es coneix com **interacció spin-spin**. Si els nuclis d'H-1 d'un vòxel estiguessin totalment aïllats (interacció spin-spin nul·la) i el camp magnètic extern creat per un imant fos perfectament idèntic a tot el vòxel, tots els nuclis d'H-1 alliberarien la seva energia a la mateixa freqüència i el procés de relaxació seria molt sincrònic o coherent. Pel contrari, si la interacció spin-spin és no nul·la, cada nucli alliberarà l'energia absorbida a freqüències diferents i s'originaria una relaxació asincrònica o incoherent. Per tant, el sincronisme en la relaxació del vòxel depèn tant de les heterogeneïtats del camp magnètic extern, com de la composició i estructura molecular en el vòxel. Per exemple, en l'aigua lliure, a causa de la mobilitat de les molècules, la variació magnètica local és pràcticament nul·la, amb la qual cosa la interacció spin-spin serà pràcticament nul·la; en canvi, com es pot veure a la figura 1.14, en aquells teixits on l'aigua es troba lligada, els nuclis percebran camps magnètics diferents en funció de les diverses estructures bioquímiques dels seus voltants la qual cosa implicarà una gran incoherència (una interacció spin-spin alta) i, en conseqüència, una disminució de  $T_2$ . Destacar que en aquest cas, les imatges hipointenses, és a dir negres, presenten un  $T_2$  curt i en canvi, les imatges hiperintenses, és a dir blanques, presentaven un  $T_1$  curt.



**Figura 1.14** Escala de grisos en una imatge potenciada en  $T_2$

El sincronisme en la relaxació nuclear del vòxel s'observa estudiant la **relaxació transversal  $M_{xy}$** , on  $M_{xy}$  és la component d' $\mathbf{M}$  en el pla  $xy$ . Després d'un pols de  $90^\circ$  on la component  $M_z$  serà nul·la per raó que  $M_{xy}$  serà màxima, els spins del nuclis que emeten a freqüències més elevades precessen a freqüències més elevades i, per consegüent, les projeccions sobre el pla transversal dels seus spins s'avancen respecte d'aquells que emeten a freqüències més baixes (vegeu la figura 1.15). Això origina que en el pla transversal s'assoleixi ràpidament l'orientació a l'atzar. Al contrari, si dintre del vòxel la relaxació és molt coherent, tots els nuclis alliberen l'energia a freqüències molt similars, cosa que origina un gran sincronisme i molt poc desfasament. En conseqüència, es trigarà molt que els spins assoleixin l'orientació a l'atzar i, per tant, el vector magnetització es verticalitzi.

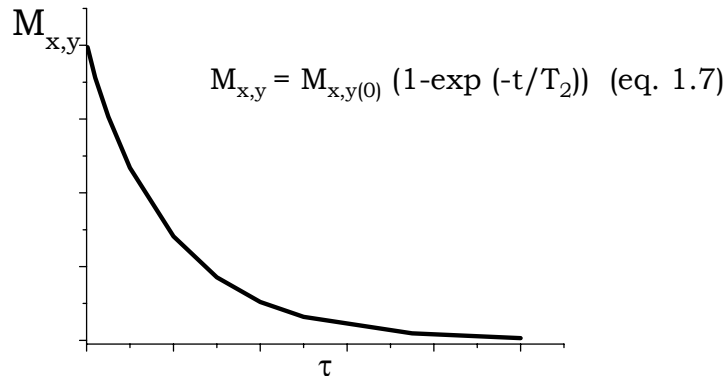


**Figura 1.15**  
Disminució de l' $M_{xy}$   
després d'un pols de  
 $90^\circ$  a causa de les  
interaccions spin-  
spin i les  
heterogeneïtats del  
camp magnètic

Tal com es pot veure a la figura 1.16, el decreixement exponencial de la magnetització transversal es troba regulat pel paràmetre  $T_2^*$ , on s'engloben tots els factors que influeixen sobre l'asincronisme dels nuclis o  $T_2$  si no es considera la influència de les heterogeneïtats del camp magnètic extern. Per tant,  $T_2$  ens indica l'asincronisme dels nuclis del vòxel durant la relaxació per les influències spin-spin aleatòries que depenen de la composició i estructuració pròpies del teixit. Si suposem un camp extern perfectament homogeni i un teixit sense variacions magnètiques locals fixes, el  $T_2$  coincideix amb el  $T_2^*$ . En general, el  $T_2^*$

sempre és menor que el  $T_2$  ja que quan es tenen en compte totes les causes que poden produir asincronisme la relaxació és més incoherent.

La constant  $T_2$  rep el nom de temps de **relaxació spin-spin** o **temps de relaxació transversal** ja que ve determinat per la projecció de la relaxació sobre el pla x,y. Una corba que decreix ràpidament implica un valor de  $T_2$  baix, i això indica un gran asincronisme en la relaxació (alta interacció spin-spin).



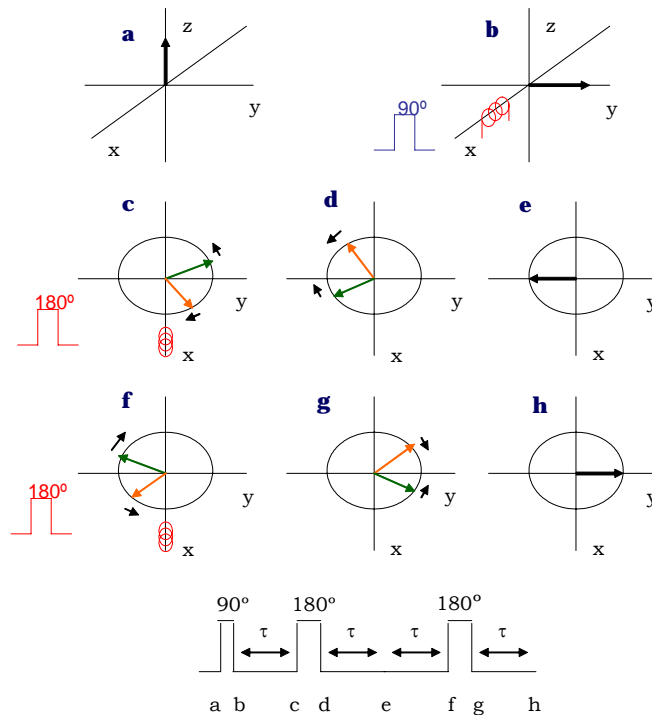
**Figura 1.16** Relaxació exponencial de la component transversal de la magnetització

### Seqüència de pols: Carr-Purcell-Meiboom-Gill (cpmg)

Amb la finalitat de conèixer el valor de  $T_2$  es va fer servir la seqüència Carr-Purcell-Meiboom-Gill (cpmg), que es basa en la seqüència clàssica spin-eco (comentada més endavant).

A la figura 1.17 es pot veure un resum de la seqüència cpmg. En enviar el pols inicial de  $90^\circ$  la magnetització  $M_0$  del vòxel es desplaça sobre el pla transversal i els spins es troben en fase (figura 1.17 a-b). Immediatament després, a causa de l'efecte spin-spin i les heterogeneïtats del camp magnètic, cada nucli comença la relaxació a una freqüència pròpia i, per tant, al cap d'un temps aquests nuclis presentaran un desfasament i, en conseqüència, la magnetització inicial  $M_{x,y}$  haurà disminuït (figura 1.17 c). Si després d'un temps enviem un pols de  $180^\circ$  de manera que s'inverteix la posició dels spins respecte del camp magnètic, els spins que s'havien endarrerit, en invertir la seva posició, queden ara avançats en el mateix angle de desfasament i el mateix passa amb els spins que s'havien avançat, ara queden endarrerits (figura 1.17 d). Si aleshores deixem transcórrer un temps, els spins nuclears es trobarien en fase (figura 1.17 e). Això seria cert si les causes que originen el desfasament actuessin sempre de la mateixa forma, però les interaccions spin-spin no es corregeixen amb un pols de  $180^\circ$  i, per tant, després d'un cert temps els spins presenten un cert desfasament i la magnetització,  $M_{x,y}$  ha disminuït respecte al valor inicial en un factor que depèn

de  $T_2$ , és a dir, un valor corregit de les heterogeneïtats magnètiques fixes (figura 1.17 f-g). L'avantatge de la seqüència cpmg respecte d'altres és que permet corregir les heterogeneïtats del camp magnètic amb els successius polsos de  $180^\circ$ .



**Figura 1.17** Seqüència Carr-Purcell-Meiboom-Gill

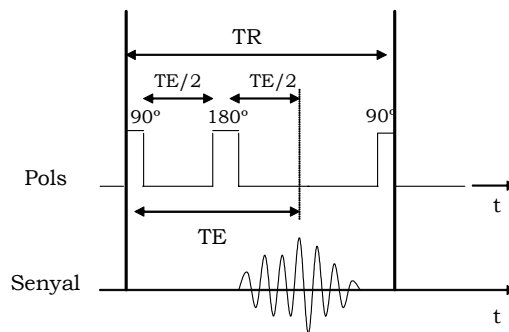
Finalment destacar que el valor de  $T_2$  per un determinat vòxel és inferior al valor de  $T_1$  i que, per un mateix valor de camp magnètic extern, els valors de  $T_2^*$  són sempre inferiors als valors de  $T_2$ .

### 1.3 Obtenció d'imatges

El disseny de les seqüències de polsos és un dels objectius fonamentals en l'avenç de l'RM. A part d'obtenir potenciacions diferents sobre un mateix pla tomogràfic, el seu interès rau en la possibilitat d'aconseguir temps d'exploració més curts. Les dues seqüències clàssiques són la seqüència spin-eco (SE) i la seqüència gradient-eco (GRE). En aquest treball només s'explicarà la seqüència SE, que és la seqüència amb la qual s'han obtingut les imatges d'aquest treball.

### 1.3.1 Seqüència spin-eco: SE

La seqüència spin-eco consisteix a enviar un primer pols de 90° que excita els nuclis del vòxel. Després de deixar relaxar els nuclis un cert temps (TE/2), on TE és anomenat temps d'eco, durant el qual els spins es desfasaran, s'envia un pols de 180° de manera que inverteix la posició dels spins respecte al camp magnètic. Després d'un nou interval TE/2 es mesura el senyal. Al cap d'un temps TR es torna a repetir el procés (vegeu la figura 1.18).



**Figura 1.18.** Esquema de la seqüència SE

La potenciació de la imatge ( $S_{SE}$ ) està regulada per TE i TR,

$$S_{SE} \propto [1 - \exp(-TR/T_1)] \cdot \exp(-TE/T_2) \quad (\text{eq. 1.8})$$

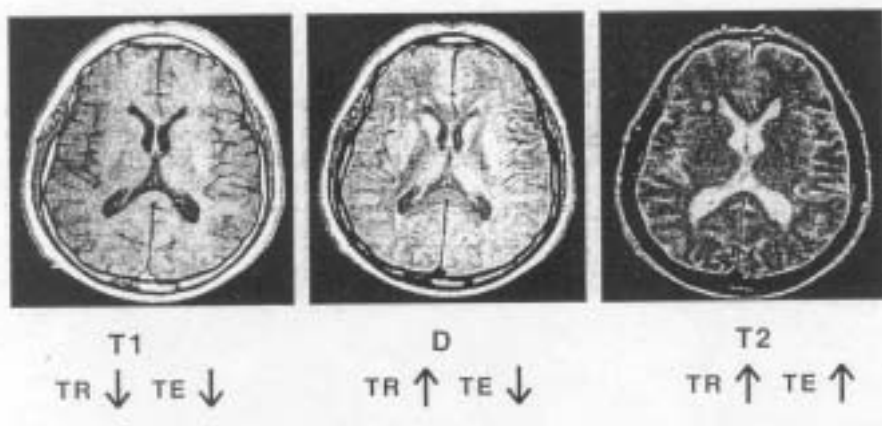
Depenent dels valors de TE i de TR tindrem imatges potenciades en  $T_1$ ,  $T_2$  o en D (vegeu la taula 1.2)

**Taula 1.2.** Regla general per a l'obtenció d'imatges potenciades en  $T_1$ ,  $T_2$  o densitat (D)

	TE curt	TE llarg
TR curt	Imatge potenciada en $T_1$	Contrast mixt
TR llarg	Imatge potenciada en D	Imatge potenciada en $T_2$

A la figura 1.19 es mostra sobre un mateix pla tomogràfic les tres potenciacions bàsiques, D,  $T_1$  i  $T_2$ , obtingudes variant els paràmetres TE i TR en la seqüència clàssica SE. El camp utilitzat és de 1.5 T.

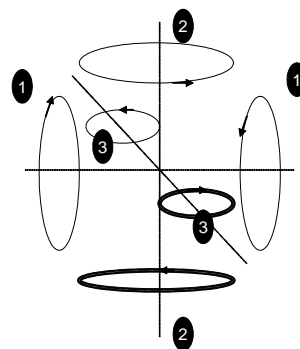




**Figura 1.19** Tres imatges de les tres potències clàssiques sobre un mateix pla tomogràfic a un camp 1.5 T

### 1.3.2 Selecció del pla tomogràfic

Un dels grans avantatges que aporta l'RM com a mètode d'imatge és la possibilitat d'obtenir una imatge tomogràfica en qualsevol direcció de l'espai. Si el camp magnètic fos uniforme dintre del vòxel tots els nuclis absorbirien l'energia de radiofreqüència a la mateixa freqüència. Per aconseguir una excitació selectiva per plans s'ha d'instaurar una variació uniforme del camp magnètic segons la direcció perpendicular



**Figura 1.20** Bobines de gradient

als plans escollits, cosa que constitueix un **gradient magnètic** en aquella direcció. Els gradients magnètics es creen mitjançant bobines amb corrents continus en sentit contrari (figura 1.20). Mitjançant tres parells de bobines que creen els gradients magnètics en totes tres direccions de l'espai, s'obtenen tomografies d'obtenció directa en les direccions més adequades per al diagnòstic. En seleccionar una determinada orientació del pla tomogràfic, l'ordinador enviarà al conjunt de bobines les intensitats de corrent adequades per crear un gradient magnètic perpendicular a l'orientació dissenyada. En cada punt el valor del camp magnètic és la suma vectorial del camp principal més els creats pels tres parells de bobines. Els gradients magnètics de selecció del pla tomogràfic només s'activen durant l'excitació ( $G_z$ ); un cop comença el procés de relaxació es treuen. En aquest cas es parla de pols de gradient.

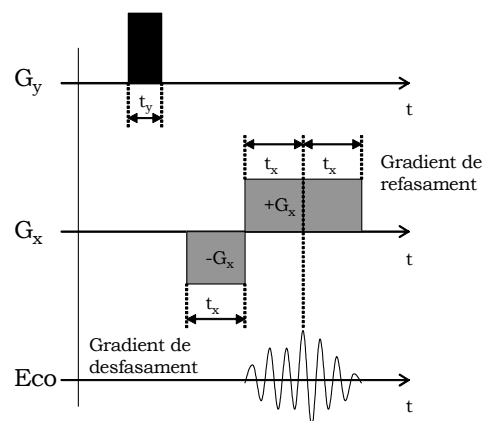
L'establiment d'un gradient magnètic implica que en l'espai ocupat pel vòxel existeixi una variació de freqüències. Per tant, cada vòxel vindrà determinat per un interval de freqüències centrat al voltant d'una freqüència mitjana. Quan s'envia el pols excitador aquest porta implícita una amplitud de banda al voltant de la freqüència principal, que pren tot l'interval del vòxel.

### 1.3.3 Reconstruir la imatge

Un cop s'ha dut a terme l'excitació selectiva del pla, comença la relaxació dels nuclis. Durant la relaxació, l'antena receptora monitora un senyal elèctric que, convenientment analitzat, permetrà obtenir la imatge. L'antena capta senyals de relaxació procedents dels nuclis del pla. A fi de reconstruir la imatge és precís un mètode que permeti individualitzar el senyal que prové de cada vòxel. Això s'aconsegueix mitjançant un sistema de gradients magnètics perpendiculars aplicats sobre el pla tomogràfic durant la relaxació que establiran una identificació espacial de la situació dels nuclis en el pla mitjançant una codificació per freqüències i per fases de tal manera que efectuant una anàlisi matemàtica (anàlisi de Fourier) del senyal recollit en l'antena receptora puguem identificar el senyal individual que correspongui a cada vòxel del pla tomogràfic.

#### La reconstrucció per doble anàlisi de Fourier

La reconstrucció de la imatge es basa en dos gradients perpendiculars: l'un,  $G_y$  que codificarà en fase, i l'altre,  $G_x$ , que codificarà en freqüències (vegeu la figura 1.21), és a dir, el desfasament originat per  $G_y$  permet identificar files. Aquest gradient rep el nom de gradient de codificació de fases. Ara cal identificar dintre de cada fila els diferents vòxels. Per dur a terme això s'utilitza un gradient  $G_x$  perpendicular a l'anterior, que s'anomena gradient de codificació de freqüències. Per tant, dintre de cada fila cada nucli es relaxarà a una freqüència diferent en funció de la columna que ocupi. Però, amb la finalitat que no s'alteri el desfasament creat per  $G_y$ , el gradient  $G_x$  és un gradient bipolar



**Figura 1.21** Diagrama temporal de la intervenció dels gradients  $G_y$  i  $G_x$

$(-G_x, +G_x)$ . Per reconstruir la imatge es mantenen els mateixos valors per a  $G_x$  i es va variant  $G_y$ .

El conjunt de dades emmagatzemades s'anomena **espai K**. A partir de les dades de l'espai K mitjançant una transformació de Fourier sensible a l'amplitud, freqüència i fase, es reconstrueix sobre una escala de grisos el valor del senyal del píxel corresponent.

### **Digitalització del senyal**

El senyal recollit per l'antena receptora és un senyal analògic de radiofreqüència que s'ha de transformar (digitalitzar) en valors discrets per poder emmagatzemar-la (conversió analògica/digital). Abans de fer la digitalització, com que és un senyal de l'ordre dels microvolts s'ha de passar per un preamplificador i un cop se li ha restat el senyal de referència corresponent a la freqüència nominal de treball ja es pot digitalitzar. El receptor presentarà una amplitud de banda característica (BW) que indicarà quines freqüències seran admeses, és a dir, el valor de BW delimita el rang de freqüències, que equival a fixar el camp de visió o FOV. El FOV queda fixat pel gradient i la BW.

Cal tenir en compte que, a part del senyal, S, hi ha la component del soroll, R, la qual a mesura que la BW sigui més gran major serà el soroll, tal com indica la relació següent:

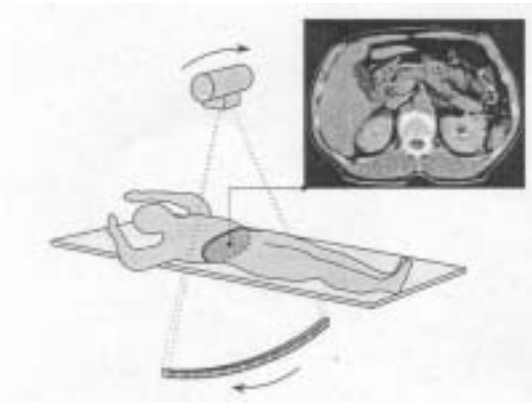
$$S/R \propto 1 / \sqrt{BW} \quad (\text{eq. 1.9})$$

## **1.4 Altres tècniques tomogràfiques**

Altres tècniques tomogràfiques de diagnosi que s'utilitzen actualment són la tomografia axial computada (TC) i l'emissió de positrons (PET).

La **tomografia axial computada** va ser descrita i posada en pràctica pel Dr. Godfrey Hounsfield el 1972, el qual va advertir que els raigs X que passaven a través del cos humà contenen informació de tots els constituents del cos en el camí travessat pel feix de raigs, que, tot i estar present, no es recollia en l'estudi convencional amb plaques radiogràfiques<sup>6</sup>. La TC s'obté mitjançant el moviment combinat del tub de raigs X cap a un costat mentre la placa radiogràfica es mou cap al costat contrari; d'aquesta manera una superfície plana de l'anatomia humana és perfectament visible i les àrees per sobre i per sota queden

esborrades. En algunes patologies, com l'hepàtica, calen substàncies de contrast iodades, per tant, aquelles persones amb insuficiència renal no podran sotmetre's a aquesta prova ja que aquests contrastes són nefrotòxics. Recentment s'ha desenvolupat la tomografia espiral computada que consisteix en un moviment lineal del pacient a través de l'escàner alhora que el tub de raigs X gira 360°, formant una espiral al voltant del pacient. Aquesta tècnica permet adquirir més ràpidament les dades en comparació amb la TC, i es pot optimitzar la detecció de lesions al fetge (figura 1.22).



**Figura 1.22** Esquema de l'obtenció d'una TC

### **Avantatges i desavantatges de la RMI en comparació amb el TC**

A la llista següent s'enumeren els avantatges i desavantatges de la RMI, on queda justificat que la RMI és una bona alternativa a les altres tècniques existents fins ara:

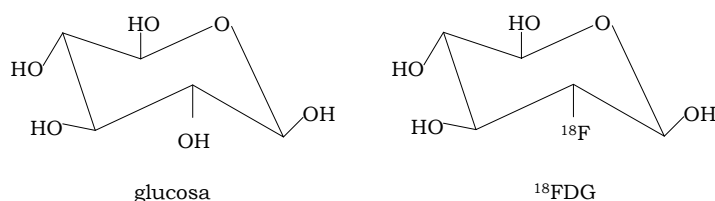
**Taula 1.3** Avantatges i desavantatges de la RMI vs TC

Avantatges	Desavantatges
No utilitza radiacions ionitzants, ni substàncies de contrast nefrotòxiques	No pot ser utilitzada per gent amb marcapassos o amb implantacions metàl·liques
La informació obtinguda té més interès diagnòstic	El preu d'un escàner RM és car
Millor contrast en les imatges	No es poden visualitzar els ossos
Fins ara, no s'ha descrit cap efecte nociu per al cos humà	Té millor resolució espacial

La tomografia per **emissió de positrons (PET)** es basa en l'obtenció d'imatges tomogràfiques de la distribució tridimensional de radiofàrmacs de vida mitjana ultracurta que, després de la seva administració als pacients, s'incorporen a les cèl·lules tumorals; això possibilita la seva detecció externa. A diferència de la RMI i la TC, les imatges obtingudes per la tècnica PET permeten obtenir imatges i quantificar els paràmetres metabòlics i fisiopatològics<sup>7</sup>. Una característica

fonamental de la cèl·lula tumoral és que en general requereix un major aportament de nutrients en comparació a les cèl·lules normals. Els radioisòtops utilitzats en PET són els següents: C-11 ( $t_{1/2} = 20.3$  minuts), O-15 ( $t_{1/2} = 2.03$  minuts), F-18 ( $t_{1/2} = 109.8$  minuts), Br-75 ( $t_{1/2} = 98.0$  minuts), entre parèntesis s'indica el temps de vida mitjana. El radiofàrmac més utilitzat en PET per les aplicacions oncològiques és un anàleg de la glucosa, en el qual s'ha substituït el grup hidroxil del C-2 per un àtom de  $^{18}\text{F}$ , anomenat, 2-[ $^{18}\text{F}$ ]-2-desoxi-D-glucosa ( $^{18}\text{FDG}$ ) (vegeu la figura 1.23). El radiofàrmac  $^{18}\text{FDG}$  permet obtenir imatges i quantificar un dels paràmetres més interessants en la cèl·lula tumoral com és el metabolisme glicolític.

Un cop s'ha administrat per via intravenosa, l' $^{18}\text{FDG}$  es distribueix pel sistema circulatori i s'incorpora a les cèl·lules tumorals pels mateixos mecanismes de transport que la glucosa.



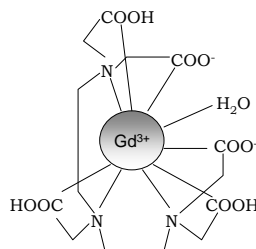
**Figura 1.23** Estructura química de la glucosa i del radiofàrmac  $^{18}\text{FDG}$

## 1.5 Agents de contrast

Els avenços en les noves substàncies de contrast han redefinit les aplicacions de l'RM han fet que sigui més sensible i més específica. Actualment en més del 35% de les exploracions clíniques de RM s'administren prèviament agents de contrast. A diferència d'altres substàncies de contrast, com les iodades, els agents de contrast per RM es caracteritzen perquè no es visualitzen directament en la imatge però sí que promouen canvis en la velocitat de relaxació dels nuclis veïns i s'obtenen imatges millor contrastades. **La funció d'un agent de contrast consisteix a afavorir la relaxació energètica dels nuclis d'H-1 (disminuint el  $T_1$ ) i augmentar l'asincronisme en la relaxació dels nuclis d'H-1 del vòxel (disminuint el  $T_2$ ).**

L'any 1948 Bloch *et al.*<sup>8</sup> demostraven que l'ús de les sals de nitrat de ferro (III) augmentava la velocitat de relaxació dels nuclis d'H-1 de les aigües. El 1978 Lauterbur, Mendoca-Dias i Rudin<sup>9</sup> demostraven la capacitat de les sals de Mn(II) per visualitzar malalties cardíaques. El primer estudi en humans el va dur a

terme Young *et al.*<sup>10</sup> administrant FeCl<sub>3</sub> per visualitzar el tracte gastrointestinal. Però va ser a l'any 1981 quan Shering va patentar l'ús del complex Gd(III) dietiltriainapentaacetat, [Gd(DTPA)(H<sub>2</sub>O)<sup>2-</sup>] (vegeu la figura 1.24), Magnevist®, com a agent de contrast<sup>11</sup> i el 1984 Carr. *et al.*<sup>12</sup> injectava el compost a pacients a fi de visualitzar-hi tumors cerebrals. Fins al 2003 l'agent de contrast Magnevist® s'havia administrat en més de 40 milions d'exploracions.



**Figura 1.24** Esquema de l'agent de contrast Gd-DTPA

**Els requeriments generals que han de complir les substàncies per esdevenir agents de contrast són,**

- Eficiència a l'hora d'augmentar la velocitat de relaxació dels protons de l'aigua (canvis entre el 10–20% del temps de relaxació ja són detectables).
- Fóra ideal que un agent de contrast fos selectiu per a un determinat teixit, si no és així, s'ha d'acumular en més proporció en el teixit d'estudi.
- La substància ha de ser estable, no tòxica i no ha d'acumular-se en el cos humà.

**1.5.1 Classificació dels agents de contrast**

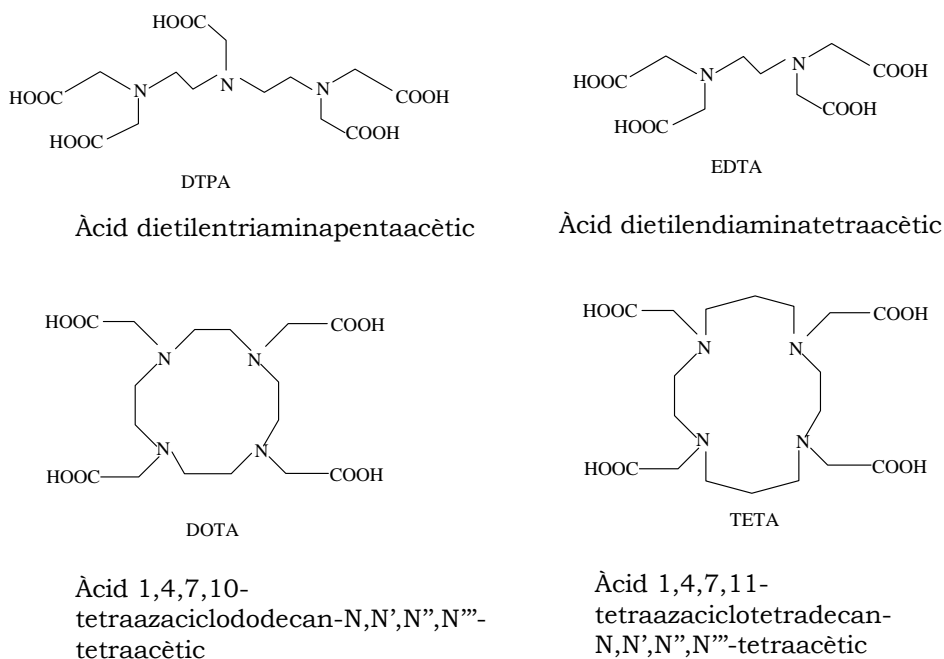
Els agents de contrast es poden classificar segons el seu comportament magnètic, biodistribució, i segons si disminueixen el temps de relaxació T<sub>1</sub> o T<sub>2</sub>.

**Taula 1.4** Classificació dels agents de contrast

Propietats magnètiques	Paramagnètic	Superparamagnètic	
Biodistribució	Extracel·lular (ECF)	Intravascular ( <i>blood pool</i> )	Teixit específic
Contrast imatge			

## Agents de contrast paramagnètics

Els ions metàl·lics amb un o més electrons desaparellats en presència d'un camp magnètic presenten un moment magnètic permanent. En solució aquosa, es dona una interacció magnètica dipolar entre el moment magnètic del compost paramagnètic i el moment magnètic dels nuclis d'H-1 de les aigües veïnes i disminueix el  $T_1$  (agent de contrast positius) i el  $T_2$  (agents de contrast negatius) dels protons de les aigües. El gadolini ( $Gd^{3+}$ ), el manganès ( $Mn^{2+}$ ) o el ferro ( $Fe^{3+}$ ) són exemples d'ions paramagnètics que s'utilitzen en RM. La teoria de relaxació dels nuclis d'H-1 en presència de complexos paramagnètics ha estat molt estudiada i serà breument esmentada a l'apartat següent. Els metalls paramagnètics no es poden utilitzar en la seva forma iònica perquè presenten toxicitat i una no desitjable biodistribució. Per tant, s'administren en forma de quelats, és a dir, el metall es troba coordinat per un o més lligands, de manera que el seu ús no sigui tòxic (vegeu la figura 1.24).



**Figura 1.25** Exemples d'alguns lligands utilitzats per quelar ions paramagnètics en RM

## Agents de contrast ferromagnètic i superparamagnètics

En presència d'un camp magnètic les partícules d'òxids de ferro (III) de mida sub-micromètrica presenten un moment magnètic permanent superior al moment magnètic dels agents de contrast paramagnètics. A causa de la presència d'aquest moment magnètic es crea en els teixits una gran

heterogeneïtat magnètica i l'aigua que difon a través d'aquestes heterogeneïtats experimenta un ràpid i irreversible desfasament (asincronisme entre els nuclis d' $^1\text{H}$ ), amb la qual cosa el  $T_2$  es redueix considerablement (agents de contrast negatius). Les partícules d'òxid de ferro amb una mida entre 5–200 nm presenten un comportament superparamagnètic. Els òxids de ferro es divideixen en dos grups depenent de la mida de partícula: si el diàmetre és més gran de 50 nm, reben el nom de partícules superparamagnètiques d'òxid de ferro (SPIO), mentre que si el diàmetre és més petit de 50 nm reben el nom d'ultraSPIO, USPIO. En aquests moments s'està estudiant una nova generació d'USPIO on les partícules tenen una mida mitjana inferior als 10 nm, que també afecten el  $T_1$ <sup>13-17</sup>. El problema d'aquest tipus de compostos és que les partícules presenten agregació en presència d'un camp magnètic extern, es dona una falta d'homogeneïtat de la mida de partícula i també pot succeir que en el sistema coexisteixin diferents fases d'òxids de Fe (III).

### **Agents de contrast extracel·lulars, ECF**

Els agents de contrast que es troben en l'espai extracel·lular s'anomenen ECF (*extracellular fluid agents*) o inespecífics. La presència de la barrera hematoencefàlica fa que no es doni una extravasació de l'agent de contrast a l'interior del cervell. Moltes neuropatologies es caracteritzen per una alteració de la permeabilitat de la barrera i, per tant, l'agent de contrast pot entrar dins del cervell i acumular-se en aquestes regions<sup>18-20</sup>. Aquests agents de contrast redueixen el  $T_1$  de la sang. Es basen en agents de contrast de Gd.

### **Agents de contrast *pool* sanguinis**

Els agents *pool* sanguinis o agents intravasculars pertanyen a una nova classe d'agents de contrast d'RM. Aquests agents de contrast es basen en complexos de Gd que es troben units a macromolècules d'origen biològic (ex. albúmina) i d'origen químic (ex. polímer); per tant, com que presenten una mida més gran difonen poc a través de les parets capil·lars. Aquests agents de contrast poden circular en sang durant llargs períodes de temps (diverses hores) i permeten obtenir angiogrames-RM i mesures quantitatives del volum, flux, permeabilitat.

El primer agent en aquesta classe va ser l'MS-325, complex de GdDTPA amb l'albúmina<sup>21</sup>. La indústria farmacèutica Bracco, a Milà, va desenvolupar un altre complex de Gd coordinat amb albúmina, B22956/1<sup>22</sup>. En el cas de complexos de Gd coordinats amb matrius polimèriques cal destacar el complex dissenyat per Guerbet, P-792<sup>23</sup>. Es basa en un complex de Gd(III)-DTPA unit a dendrímers



amb un pes molecular de 5500 Da. Actualment també s'han descrit l'aplicació de les USPIO com a agents de contrast de pool sanguini degut a que a diferència de les partícules SPIO que són captades ràpidament pels macròfags, les USPIO poden romandre més temps en sang i incrementen la velocitat de relaxació<sup>25,26</sup>.

### Agents de teixit específic

Un agent de contrast de teixit específic és aquell que serà captat per un tipus particular de cèl·lules i, per tant, només contrastarà aquells òrgans on es trobin aquestes cèl·lules (vegeu la taula 1.5)<sup>26</sup>.

**Taula 1.5** Exemples d'agent de contrast de teixit específic

Teixit	metalls quelats	partícules Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Fetge	MnDPDP	SPIO
	GdBOPTA	USPIO
Nodes limfàtics	GaddofluorineM	USPIO
Plaques ateroscleròtiques	GaddofluorineM	USPIO

Una nova generació d'agents de contrast s'està estudiant a fi de reconèixer específicament molècules que es troben involucrades en patologies i per tant d'obtenir més informació sobre els mecanismes responsables del desenvolupament de les malalties<sup>27</sup>. L'estratègia utilitzada es basa en la conjugació dels agents de contrast amb biomarcadors, com anticossos o pèptids petits. Els primers agents de contrast conjugats consistien en la interacció entre l'agent de contrast (en general Gd-DTPA) i un anticòs. L'inconvenient d'aquest tipus d'agents és la baixa sensibilitat obtinguda degut a la baixa concentració dels receptors en les cèl·lules específiques. Un mètode utilitat per tal d'augmentar la intensitat del senyal és la conjugació de múltiples centres metàl·lics per anticòs, com per exemple la conjugació del Gd amb avidina i biotina<sup>28,29</sup>. Una alternativa per tal d'augmentar el senyal és l'ús de nanopartícules de perfluorocarbó de mida aproximada 300 nm que poden incorporar fins a 90.000 nuclis de Gd<sup>3+</sup> a la superfície per partícula, aconseguint valors de relaxivitat molt alts. Una aplicació és la conjugació d'aquestes nanopartícules a  $\alpha_v\beta_3$ -integrines per tal d'estudiar les plaques ateroscleròtiques<sup>30</sup>. Una alternativa a l'ús de les nanopartícules de Gd són les microesferes de partícules SPIO<sup>31</sup>.

Fins ara s'ha descrit agents de contrast que al ser administrats es conjugaven a un tipus de cèl·lules específiques, en aquests moments s'està desenvolupant la possibilitat de conjuguar els agents de contrast a cèl·lules mare i un cop conjugades trasplantar-les a l'organisme. Tot i que hi ha treballs amb  $Gd^{3+}$  la gran majoria d'estudis s'han portat a terme amb les partícules d'òxid de ferro<sup>32,33</sup>.

### 1.5.2 Mecanisme d'acció dels agents de contrast

Els agents de contrast actuen com a catalitzadors, és a dir, augmenten la velocitat de relaxació dels protons de l'aigua i disminueixen els temps de relaxació  $T_1$  i  $T_2$ .

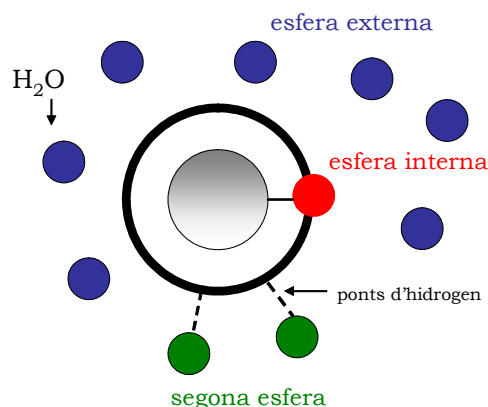
L'efecte final sobre el senyal RM d'un vòxel un cop introduïda una substància de contrast, dependrà bàsicament dels factors següents:

- L'agent de contrast: moment magnètic, concentració, estructura i mida.
- El teixit: situació del vòxel respecte l'àrea d'influència de l'element de contrast, mobilitat i concentració de l'aigua, compartimentalització.
- La tècnica: seqüència, temps de mesura.

Hi ha tres **mecanismes d'interacció** entre els protons de l'aigua i l'agent de contrast:

1. Esfera interna: el metall té una molècula d'aigua directament coordinada que pot bescanviar-se amb l'aigua del teixit
2. Segona esfera: el metall no té cap molècula d'aigua coordinada directament però té lligands que poden formar ponts d'hidrogen amb les molècules d'aigua del teixit
3. Esfera externa: interacció entre el metall i aquelles molècules d'aigua que difonen al voltant seu sense interaccionar-hi.

A la Figura 1.26 es poden trobar esquematitzats els tres tipus d'interacció.



**Figura 1.26** Tipus d'interacció de les molècules d'aigua amb el metall: la interacció d'esfera interna es dona amb les aigües coordinades directament al metall (molècules d'aigua en vermell); la interacció de segona esfera es dona amb les aigües interactuant amb el metall per ponts d'hidrogen (molècules d'aigua en verd); la interacció d'esfera externa es basa en la interacció de les molècules d'aigua que difonen al voltant del metall (molècules d'aigua en blau)

### Agents de contrast $T_1$

La teoria general de la relaxació nuclear en presència de substàncies paramagnètiques va ser desenvolupada pels grups de Bloembergen, Solomon i altres<sup>34</sup>. El desenvolupament d'aquestes equacions s'ha basat en els metalls següents:  $Gd^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ . Un compost paramagnètic incrementa la velocitat de relaxació,  $1/T_1$  i  $1/T_2$  dels protons de les molècules d'aigua. La velocitat de relaxació observada,  $1/T_{i,obs}$ , serà la suma de la component diamagnètica ( $1/T_{i,d}$ ), corresponent a la relaxació dels protons en absència de les partícules paramagnètiques de l'agent de contrast i la relaxació dels nuclis d'H-1 en presència del compost paramagnètic ( $1/T_{i,p}$ ), segons:

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + \frac{1}{T_{i,p}}, \text{ on } i = 1, 2 \quad (\text{eq. 1.10})$$

En absència d'interaccions solut-solut, el terme paramagnètic  $1/T_{i,p}$  és proporcional a la concentració del compost paramagnètic; la concentració es dona en mmol/l. Segons l'equació 1.11 en la zona lineal resultant de la representació del terme  $1/T_{i,obs}$  vs la concentració de l'espècie paramagnètica dona una recta on el pendent rep el nom de **relaxivitat,  $r_i$**  on  $i = 1, 2$ .

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,d}} + r_i[P], \text{ on } i = 1, 2 \quad (\text{eq. 1.11})$$

La relaxivitat,  $r_i$  es refereix a l'eficiència de la substància paramagnètica d'augmentar la velocitat de relaxació dels protons  $i$ , per tant, la seva eficiència com a agent de contrast.

El valor de  $r_1$  es troba influït bàsicament per l'accessibilitat dels nuclis d'H-1 del medi a les capes electròniques més externes de l'agent de contrast, per tant l'estructura química de l'agent de contrast hi juga un paper rellevant.

El valor de  $r_2$  es troba influït per les variacions locals de camp magnètic que indueix la substància de contrast per la qual cosa depèn bàsicament del moment magnètic  $\mu$  de l'agent de contrast. La introducció d'una substància de contrast implica una heterogeneïtat magnètica afegida sobre el vòxel  $i$ , per tant, un major desfasament  $i$ , per consegüent un augment en  $r_2$ .

### Mecanisme de la relaxació deguda a l'esfera interna

La relaxació paramagnètica dels protons de l'aigua es basa en una interacció dipolar entre els spins nuclears i el camp magnètic local fluctuant causat pels electrons desaparellats del metall. La component  $1/T_{i,p}$  és la suma de dues contribucions: la contribució deguda a l'esfera interna (IS), i la contribució deguda a l'esfera externa (OS),

$$\left( \frac{1}{T_{i,p}} \right) = \left( \frac{1}{T_{i,p}} \right)^{IS} + \left( \frac{1}{T_{i,p}} \right)^{OS} \quad (\text{eq. 1.12})$$

L'equació que descriu el mecanisme de relaxació dels protons de l'aigua en presència d'un metall que té una aigua coordinada és la següent:

$$\left( \frac{1}{T_1} \right)_{IS} = \frac{c \cdot q}{55.5(\tau_M + T_{1M})} \quad (\text{eq. 1.13})$$

on  $q$  és el nombre de molècules d'aigua coordinades a l'ió metàl·lic,  $c$  és la concentració del metall,  $T_{1M}$  és el temps de relaxació dels protons de l'aigua coordinada i el  $\tau_M$  és el temps de residència de l'aigua coordinada al metall.

El valor d' $1/T_{1M}$  el defineix l'equació de Solomon-Bloembergen. L'equació presenta dos termes: la component dipolar (a través de l'espai) i la component escalar (a través dels enllaços).

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{B}{r^6} \left( \frac{7\tau_c}{(1+\omega_s^2\tau_c^2)} + \frac{3\tau_c}{(1+\omega_I^2\tau_c^2)} \right) + \frac{2S(S+1)A^2}{3\hbar^2} \left( \frac{\tau_s}{(1+\omega_s^2\tau_s^2)} \right) \quad (\text{eq. 1.14})$$

Terme dipolar Terme escalar

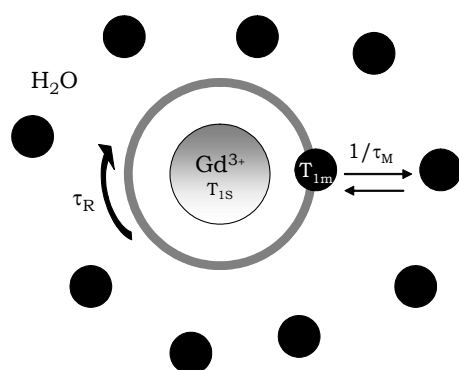
$$\text{on } B = (2/15)\gamma_I^2 g^2 \mathbf{s}(\mathbf{s}+1)\mu^2 \quad (\text{eq. 1.15})$$

on  $\gamma_I$  és la constant giromagnètica per al nucli d'H-1,  $g$  és el factor electrònic,  $\mathbf{s}$  és el moment d'spin fonamental del metall,  $\mu$  és el moment magnètic,  $r$  és la distància entre el metall i l'H-1 de l'aigua coordinada,  $\omega_S$  i  $\omega_I$  són les freqüències de precessió del nucli i l'electró respectivament. El quocient  $A/\hbar$  és la constant d'acoblament nuclear hiperfi.

Així com la interacció escalar es troba modulada per la relaxació d'spin electrònica,  $\tau_S$  i pel temps de residència de l'aigua coordinada al metall  $\tau_M$ , els mecanismes de relaxació dipolar es troben modulats pel temps de correlació  $\tau_C$ ,

$$\frac{1}{\tau_C} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{T_{1S}} \quad (\text{eq. 1.16})$$

on  $\tau_R$  és el temps rotacional del metall,  $T_{1S}$  és el temps de relaxació longitudinal electrònica de l'ió metàl·lic.



**Figura 1.27** Representació esquemàtica d'un complex quelat de Gd(III) que interacciona amb les molècules d'aigua per un mecanisme d'esfera interna;  $\tau_R$  és el temps de rotació;  $T_{1M}$  és el temps de relaxació longitudinal del nucli d'H-1 de l'aigua coordinada directament al metall;  $\tau_M$  és el temps de residència de les molècules d'aigua a l'esfera interna del complex.

### Optimització de la relaxivitat

A la figura 1.27 es poden veure els diferents paràmetres que més influència tenen sobre la relaxivitat. A continuació es descriuen diferents estratègies per optimitzar aquests paràmetres i augmentar l'eficiència dels agents de contrast. L'estudi se centra bàsicament en el Gd(III), Mn(II) i Fe(III).

1. Distància entre els H-1 i el metall,  $\mathbf{r}$  ( $r \downarrow \rightarrow \downarrow T_1$ )

L'augment del quocient  $1/r^6$  incrementa els valors de  $r_1$  perquè la interacció dipolar entre els nuclis serà més forta.

2. Temps electrònic de relaxació,  $\mathbf{T_{1S}}$  ( $T_{1S} \uparrow \rightarrow \downarrow T_1$ )

El fet que els metalls més estudiats com a agents de contrast siguin el  $Gd^{3+}$  ( $[Xe]4f^7$ ), el  $Fe^{3+}$  ( $[Ar]3d^5$ ) i el  $Mn^{2+}$  ( $[Ar]3d^5$ ) es deu al fet que presenten alts moments magnètics i que tots tres ions tenen una configuració electrònica estable (capa semiplena) i per tant els mecanismes de relaxació electrònica no són eficients en comparació amb altres configuracions. En general, quan augmenta el  $T_{1S}$  augmenta l' $r_1$  (sempre limitat per  $\tau_M\tau_R$ ).

3. Nombre de molècules d'aigua coordinades al metall,  $q$  ( $q \uparrow \rightarrow \downarrow T_1$ )

Tal com mostra l'equació 1.13 la  $r_1$  augmenta de forma proporcional al nombre de molècules d'aigua coordinades directament al metall. A la taula 1.6 es pot veure com canvien els valors de  $r_1$  depenent del valor de  $q$ . L'ió  $Gd^{3+}$  en aigua té 8 molècules d'aigua coordinades directament, per tant, un valor de  $r_1$  alt, però és altament tòxic.

**Taula 1.6** Relaxivitat longitudinal a 20 MHz i a 37°C, en funció del valor de  $q^3$

Complex	$q$ $r_1$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )		$q$ $r_1$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )		$q$ $r_1$ ( $mM^{-1}s^{-1}$ )	
	Fe(III)		Gd(III)		Mn(II)	
<b>Ió aquós</b>	6	8	8 o 9	9	6	7.4
<b>EDTA</b>	1	1.9	2 o 3	5.4	1	2.9
<b>DTPA</b>	0	0.9	1	4.1	0	1.3

4. Temps de rotació,  $\tau_R$  ( $\tau_R \downarrow \rightarrow \downarrow T_1$ )

Per als metalls que presentin valors alts de  $T_{1S}$ , les variacions en el  $\tau_R$  seran importants (equació 1.14). Hi ha dues formes bàsiques per reduir el temps de rotació dels metalls: 1) distribució de l'agent de contrast en un medi on la viscositat sigui elevada; 2) coordinació covalent del complex metàl·lic a una molècula gran, per exemple a una proteïna. Es defineix  $\tau_R$ ,

$$\tau_R = 4\pi a^3 \eta / 3kT \quad (\text{eq 1.17})$$

on  $a$  és el radi de la molècula esfèrica,  $\eta$  és la viscositat del medi,  $k$  és la constant de Boltzmann i  $T$  és la temperatura.

5. Temps de residència de les molècules d'aigua coordinades,  $\tau_M$

( $\tau_M \downarrow \rightarrow \downarrow T_1$ )

El  $\tau_M$  és un dels termes més important a l'hora d'optimitzar la relaxivitat, ja que modula l'eficiència d'intercanvi químic des de l'esfera interna a les altres

molècules d'aigua (equació 1.16) i contribueix al valor del temps de correlació, paràmetre que defineix la interacció dipolar. L'intercanvi de l'aigua coordinada es pot donar per dues vies:

- A pH neutre la velocitat d'intercanvi es basa en les molècules d'aigua, és a dir, cada protó intercanvia amb la resta de molècules d'aigua.
- A pH àcid o bàsic, la velocitat d'intercanvi es veu incrementada a causa de la catàlisi àcida i bàsica, respectivament, ja que les constants d'intercanvi són més altes en pH àcid i bàsic.

### Mecanisme de la relaxació per raó de l'esfera externa

La relaxació d'esfera externa es refereix a aquelles molècules d'aigua no coordinades al metall (figura 1.24). Les equacions que descriuen aquest mecanisme són les següents,

$$\frac{1}{T_1} = \frac{C\Pi N_s \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 \mathbf{s}(\mathbf{s}+1)}{r^3 \tau_D^2} [7I(\omega_S \tau_D T_{1S}) + 3I(\omega_I \tau_D T_{1S})] \quad (\text{eq. 1.18})$$

$$\text{on } \tau_D = r^2/3(D_H + D_P) \quad (\text{eq. 1.19})$$

on C és una constant, N<sub>s</sub> és el nombre de metalls per cm<sup>3</sup>, r és la distància mínima entre l'H-1 i el metall i D<sub>H</sub> i D<sub>P</sub> són els coeficients de difusió de l'aigua i de l'element paramagnètic, respectivament. Els coeficients de difusió poden ser estimats utilitzant el model d'una esfera rígida en un medi amb viscositat η, on a és el radi de l'esfera,

$$D = kT / 6\Pi a \eta \quad (\text{eq. 1.20})$$

En el cas de l'ió aquós Gd<sup>3+</sup> la contribució d'esfera externa només representa el 10% de la relaxivitat total; en canvi, en el cas dels complexos quelats de Gd<sup>3+</sup> la contribució deguda a l'esfera externa augmenta considerablement.

Destacar que aquells agents de contrast que interaccionen amb les molècules d'aigua per un mecanisme de segona esfera, els valors de T<sub>1</sub> obtinguts es podran tractar amb les equacions descrites per un mecanisme d'esfera interna sempre que es compleixi que τ<sub>M</sub> > τ<sub>D</sub><sup>3,35</sup>.

## 1.6 Objectius de la tesi

Tal com s'ha pogut veure en aquesta secció, els agents de contrast utilitzats fins ara es basen principalment en complexos mononuclears de Gd(III) i són agents de contrast de tipus paramagnètic o en òxids de ferro(III), agents de contrast de tipus superparamagnètics. Aquest treball pretén estudiar un altre tipus d'agents de contrast, els **complexos moleculars polimetàl·lics** de Fe(III).

**L'objectiu d'aquesta tesi ha estat el d'avaluar el compost  $\{[(C_6N_3H_{12})_6Fe_8(\mu_3-O)_2(\mu_2-OH)_{12}]Br_7(H_2O)\}Br \cdot 8H_2O$ ,  $Fe_8$ , com a agent de contrast en RMI.** El  $Fe_8$  va ser sintetitzat per primera vegada en el grup del Prof. Wiegardt l'any 1984. El  $Fe_8$  està format per 8 nuclis de  $Fe^{3+}$  acoblats magnèticament entre si, per tant, en comparació amb un sistema mononuclear de Gd(III), el moment magnètic resultant serà més gran. La mida de partícula és completament homogènia perquè es tracta d'un compost molecular a diferència dels sistemes particulats d'òxids de Fe (III).

Els passos que s'han dut a terme per desenvolupar aquesta tasca han estat els següents:

1. Síntesi i caracterització del  $Fe_8$ : el  $Fe_8$  ha estat sintetitzat segons la bibliografia. La caracterització s'ha basat en la difracció de raigs X de pols i monocristall i en mesures magnètiques.
2. Avaluació del  $Fe_8$  com a agent de contrast:
  - Mesura dels temps de relaxació  $T_1$  i  $T_2$  dels nuclis d'H-1 d'una solució aquosa tamponada de fosfats, PBS en presència de  $Fe_8$ . Els resultats mostren que el  $Fe_8$  es comporta com un agent de contrast tipus  $T_1$ .
  - Obtenció d'imatges potenciades en  $T_1$ .
  - Estabilitat del  $Fe_8$  en PBS. Les mesures de  $T_1$  i  $T_2$  amb el temps suggerien l'estabilitat del compost en PBS.
  - Estudi de la toxicitat del  $Fe_8$  en una línia cel·lular. Els resultats evidenciaven una certa toxicitat deguda en part a l'existència de  $Fe^{3+}$  lliure.
3. Caracterització del comportament del  $Fe_8$  en solució aquosa i en PBS. El  $Fe_8$  no és estable en solució aquosa i en PBS interacciona amb els fosfats.



4. Avaluació de les solucions  $Fe_{8(fos)}$  com a agents de contrast:
  - Mesura dels temps de relaxació  $T_1$  i  $T_2$ . Influència de la concentració de fosfats.
  - Obtenció d'imatges potenciades en  $T_1$ .
  - Estudi de la toxicitat del sistema  $Fe_8$  en solució fosfatada en una línia cel·lular: la presència de fosfats elimina completament la toxicitat.
  - Estudis preliminars in vivo.
  
5. Conclusions dels resultats obtinguts, així com l'establiment de futures línies de treball

## Bibliografia del capítol 1

Aquest capítol ha estat elaborat basant-se, principalment en les fonts bibliogràfiques següents <sup>1-5</sup>,

- 1 Gili Planas J. 20° Curso de Introducción Biofísica a la Resonancia Magnética. Institut de Diagnòstic per la Imatge (IDI). Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. **2004**
- 2 Merbach A. E., Tóth É., Helm T. Relaxivity of Gadolinium (III) Complexes: Theory and Mechanism. In: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Resonance Imaging*. Merbach A., Tóth E., (eds). Chichester: Wiley-VCH Verlag, **2001**, 46-119.
- 3 Lauffer R. B. Paramagnetic Metal Complexes as Water Proton Relaxation for NMR Imaging: Theory and Design. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 901-922.
- 4 Tweedle M. F., Kumar K. Magnetic Resonance Imaging (MRI) Contrast Agents. In: *Metallopharmaceuticals II*. Clarke M. J., Sadler P. J., (eds). Hardcover **1999**, 1-43.
- 5 Wood M. L., Wehrli F. W. Principles of Magnetic Resonance Imaging. In: *Magnetic Resonance Imaging*. Stark D. D., Bradley W. G. (eds). St. Louis: Mosby, **1991**, 1-42.
- 6 Michael G. X-Ray computed tomography. *Physics Education*. **2001**, 422-451.
- 7 Gámez C., Cabrera A., Sopena R., Velloso M. J. La tomografía por emisión de positrones (PET) en oncología (Parte I). *Rev. Esp. Med. Nuclear*. **2002**, 41-60.
- 8 Bloch F., Hansen W. W., Packard M. The Nuclear Induction Experiment. *Phys. Rev.* **1948**, *70*, 474-485.
- 9 Lauterbur P.C., Mendoca-Dias M. H., Rudin A. M. *Frontiers of Biological Energetics* Dutton P. L., Leigh L. S., Scarpa A., (eds). Academic: New York. **1978**, 752.
- 10 Young I. R., Clarke G. J., Gales D. R. Enhancement of relaxation rate with paramagnetic contrast agents in NMR imaging. *Comput. Tomogr.* **1981**, *5*, 534-537.
- 11 Patent 3,302,410 A. G. Schering. Magnevist. Berlin, Germany. July 1984
- 12 Carr D. H., Brown J., Bydder G. M. Intravenous chelated gadolinium as a contrast agent in NMR imaging of cerebral tumours. *Lancet*. **1984**, *1*, 478.
- 13 Bulte J., Kraitchman D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed.* **2004**, *17*, 484-499.
- 14 Coroiu I. Relaxivities of different superparamagnetic particles for application in NMR tomography. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *201*, 449-452.

- 15 Canet E., Revel D., Forrat R., Baldy-Porcher C., De Lorgeril M., Sebbag L., Vallee J., Didier D., Amiel M. Superparamagnetic iron oxide particles and positive enhancement for myocardial perfusion studies assessed by subsecond T<sub>1</sub>-weighted MRI. *Magn. Reson. Imaging* **1993**, *11*, 1139-1145.
- 16 Josephson L., Lewis J., Jacobs P., Hahn P. F., Stark D. D. The effects of iron oxides on proton relaxivity *Magn. Reson. Imaging* **1998**, *6*, 647-653.
- 17 Colet J. M., Piérart C., Seghi F., Gabric I., Muller R. N. Intravascular and intracellular hepatic relaxivities of superparamagnetic particles: An isolated and perfused organ pharmacokinetics study. *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 199-205.
- 18 Aime S., Botta M., Geninatti Crich S., Giovenzana G., Pagliarin R., Sisti M., Terreno E. NMR relaxometric studies of Gd(III) complexes with heptadentate macrocyclic ligands. *Magnetic Resonance in Chemistry.* **1998**, *36*, 200-208.
- 19 Zhang S., Wu K., Sherry A. D. A novel pH-sensitive MRI contrast agent. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 21, 3192-3194.
- 20 Caravan P., Ellison J. J., McMurry T. J., Lauffer R. B. Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293-2352.
- 21 Va Wagoner M., Worah D. First human experience with the non-ionic magnetic resonance imaging enhancement agent. *Invest. Radiol.* **1993**, *28*, 44-48.
- 22 Lauffer R. B., Parmelee D. J., Quellet H. S. Et al. MS-325: a small-molecule vascular imaging agent for magnetic resonance imaging. *Acad. Radiol.* **1996**, *3*, 356-8.
- 23 Cavagna F. M., Lorusso V., Anelli P. L., Maggioni F., de Haen C. Preclinical profile and clinical potential of gadocoletic acid trisodium salt (B22956/1), a new intravascular contrast medium for MRI. *Acad. Radiol.* **2002**, *2 (9)*, 491-4.
- 24 Corot C., Port M., Rousseaux O., et al. P792: a rapid clearance blood pool agent for magnetic resonance imaging: preliminary results. *Magma.* **2001**, *37 (4)*, 161-6.
- 25 McLachlan S. J., Morris M. R., Lucas M. A., et al. Phase I clinical evaluation of a new iron oxide MR contrast agent. *J. Magn. Res. Imaging.* **1994**, *4(3)*, 301-7.
- 26 Weinmann H-J., Ebert W., Misselwitz B., Schmitt-Willich H. Tissue-specific MR contrast agents. *European Journal of Radiology.* **2003**, *46*, 33-44.
- 27 Morawski A. M., Lanza G. A., Wickline S. A. Targeted contrast agent for magnetic resonance imaging and ultrasound. *Current Opinion in Biotechnology.* **2005**, *16*, 89-92.
- 28 Geninatti Crich S., Barge A., Battistini E., Cabella C., Coluccia S., Longo D., Mainero V., Tarone G., Aime S. Magnetic resonance imaging visualization of

- targeted cells by the internalization of supramolecular adducts formed between avidin and biotinylated Gd<sup>3+</sup> chelates. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 78-86.
- <sup>29</sup> Laurent S., Vander Elst L., Yanjun F., Muller R. N. Synthesis and Physicochemical Characterization of Gd-DTPA-B(sLex)A, a New MRI Contrast Agent Targeted to Inflammation. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 99-103.
- <sup>30</sup> Artemov D., Mori N., Okollie B., Bhujwala Z. MR molecular imaging of the Her-2/neu receptor in breast cancer cells using targeted iron oxide nanoparticles. *Magnetic Resonance in Medicine.* **2003**, *49*, 403-408.
- <sup>31</sup> Winter et al. Molecular imaging of angiogenesis in early-stage atherosclerosis with  $\alpha_v\beta_3$ -integrin-targeted nanoparticles. *Circulation.* **2003**, *4*, 2270-2274.
- <sup>32</sup> Bulte et al. MR microscopy of magnetically labeled neurospheres transplanted into the Lewis EAE rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine.* **2003**, *50*, 201-205.
- <sup>33</sup> Geninatti S., Biancone L., Cantaluppi V., Duò D., Esposito G., Russo S., Camussi G., Aime S. Improved route for the visualization of stem cells labeled with a Gd-/Eu-chelate as dual (MRI and Fluorescence) Agent. *Magnetic Resonance in Medicine.* **2004**, *51*, 938-944.
- <sup>34</sup> Bloembergen N., Purcell E. M., Pound R. V. Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Physical Review.* **1948**, *73* (7), 679-712.
- <sup>35</sup> Botta M. Second coordination sphere water molecules and relaxivity of gadolinium (III) complexes: implications for MRI contrast agents. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 399-407.

## **2 | Síntesi i caracterització del Fe<sub>8</sub>**

---

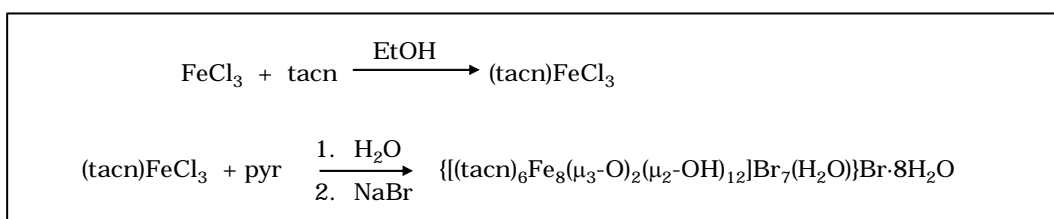
---

### **2.1 Síntesi del Fe<sub>8</sub>**

### **2.2 Caracterització del Fe<sub>8</sub>**

## 2.1 Síntesi del Fe<sub>8</sub>

La síntesi del complex  $\{[(\text{tacn})_6\text{Fe}_8(\mu_3\text{-O})_2(\mu_2\text{-OH})_{12}]\text{Br}_7(\text{H}_2\text{O})\}\text{Br}\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , Fe<sub>8</sub>, on tacn = 1,4,7- triazaciclonaonà, descrita per primera vegada l'any 1984 per Wiegart *et al.*<sup>1</sup>, es basa en dues etapes tal com es veu a la figura 2.1. La primera etapa consisteix en la formació del complex precursor (tacn)FeCl<sub>3</sub> i la segona etapa en l'obtenció del Fe<sub>8</sub>.



**Figura 2.1** Esquema de la síntesi del Fe<sub>8</sub>

### Síntesi del precursor (tacn)FeCl<sub>3</sub>

Es prepara una solució de 3.5 g de FeCl<sub>3</sub> en 100 ml d'etanol. A continuació i amb agitació contínua s'hi afegeixen 12 ml d'una solució etanòlica 1 M de tacn i aleshores precipita el complex (tacn)FeCl<sub>3</sub> de color groc. El producte és filtrat i rentat amb etanol successives vegades i es deixa assecar a l'aire<sup>2</sup>.

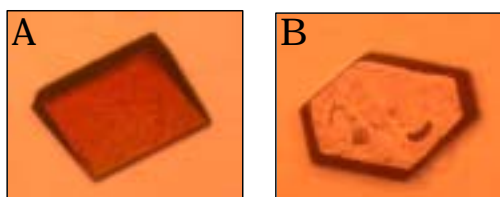
Rendiment = 85.7%. Anàlisi elemental calculada per a FeC<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub> (P. m. = 291.51 g·mol<sup>-1</sup>): C, 24.70; H, 5.14; N, 14.40%. Trobada: C, 24.34; H, 5.26; N, 13.93%.

### Síntesi del Fe<sub>8</sub>

Es prepara una solució de 0.25 g de (tacn)FeCl<sub>3</sub> en 10 ml d'aigua i lentament, sota agitació contínua s'afegeixen 2 ml de piridina dissolts prèviament en 10 ml d'aigua. La solució inicialment groguenca es va tornant verdosa. Al cap de 15 minuts s'hi afegeixen 5 g de NaBr. Es manté l'agitació durant una hora més i es filtra la solució. Al cap de 24 hores, aproximadament, apareixen cristalls de color vermell-marró de dues geometries diferents: els uns amb geometria rectangular i els altres amb geometria hexagonal (vegeu la figura 2.2).

Rendiment = 50%. Anàlisi elemental calculada per a Fe<sub>8</sub>C<sub>36</sub>H<sub>120</sub>N<sub>18</sub>O<sub>23</sub>Br<sub>8</sub> (P. m. = 2246.46 g·mol<sup>-1</sup>): C, 19.24; H, 5.20; N, 11.22; Br, 28.48%. Trobada: C, 19.20; H, 5.19; N, 10.99; Br, 28.35%.

Els cristalls amb geometria rectangular són estables a l'aire i, com es veurà a l'apartat següent corresponen a l'estructura de Fe<sub>8</sub> descrita per Wieghardt<sup>1</sup>, mentre que els cristalls amb geometria hexagonal corresponen a un nou polimorf del Fe<sub>8</sub>, on l'estructura cristal·lina ha estat resolta en el nostre grup pel Dr. Mata, i no són estables a l'aire.



**Figura 2.2** Cristalls obtinguts en la síntesi del Fe<sub>8</sub>; l'estructura cristal·lina del cristall A correspon a la descrita per Wieghardt; l'estructura cristal·lina del cristall B correspon a un nou polimorf del Fe<sub>8</sub>

## 2.2 Caracterització del Fe<sub>8</sub>

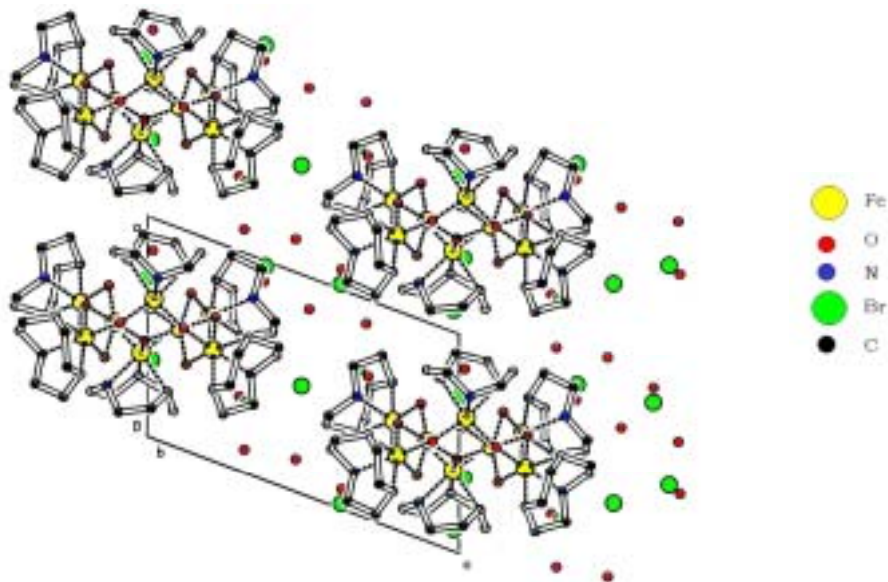
En endavant s'exposen els resultats obtinguts en la caracterització del Fe<sub>8</sub> en aquest treball. Les característiques instrumentals així com una petita introducció a les tècniques de caracterització emprades es poden trobar a l'annex 1. Les tècniques de caracterització més importants han estat: difracció de raigs X en monocristall i pols, espectroscòpia d'infraroig i Raman, mesures de magnetisme i espectroscòpia Mössbauer.

### 2.2.1 Difracció de raigs X

#### Difracció de raigs X en monocristall

L'estructura cristal·lina del nou polimorf per al complex  $\{[(\text{tacn})_6\text{Fe}_8(\mu_3\text{-O})_2(\mu_2\text{-OH})_{12}]\text{Br}_7(\text{H}_2\text{O})\}\text{Br}\cdot 8\text{H}_2\text{O}$  està representada a la figura 2.3. A l'annex 2 es troben les condicions experimentals de mesura, resolució i afinament. Igual que l'estructura descrita per Wieghardt<sup>1</sup>, en el nou polimorf també hi ha un clúster de  $[(\text{tacn})_6\text{Fe}_8(\mu_3\text{-O})_2(\mu_2\text{-OH})_{12}]^{8+}$  per cel·la unitat. Totes dues estructures presenten la mateixa conformació del clúster Fe<sub>8</sub>, però es diferencien en la distribució dels anions Br<sup>-</sup> i les molècules d'aigua. La distribució en l'estructura

descrita per Wieghardt és no centrosimètrica mentre que en el cas del nou polimorf l'estructura és centrosimètrica i hi ha la meitat del clúster per a cada unitat asimètrica.



**Figura 2.3** Vista de l'estructura  $[(\text{tacn})_6\text{Fe}_8(\mu_3\text{-O})_2(\mu_2\text{-OH})_{12}]\cdot 8\text{Br}\cdot 10\text{H}_2\text{O}$  al llarg de l'eix b

En el cas del nou polimorf, a la fi de complir el balanç de càrrega, quatre anions de Br<sup>-</sup> han de ser-hi presents per compensar la càrrega positiva de la unitat asimètrica. Com que hi ha desordre en les posicions aniòniques, els quatre àtoms de Br<sup>-</sup> apareixen distribuïts en vuit llocs amb el següent rang d'ocupació: des de 0.20 fins 0.85. Els bromurs en cinc d'aquests vuit llocs formen ponts d'hidrogen amb els àtoms d'oxigen dels ponts  $\mu_2$ -hidroxo, on les distàncies O...Br es troben entre 3.101 i 3.306 (vegeu la taula 2.1). La suma dels factors d'ocupació d'aquests llocs és 2.81, és a dir, cada clúster es troba unit per ponts d'hidrogen amb 5.62 àtoms de Br<sup>-</sup> de mitjana. Els àtoms restants de Br<sup>-</sup>, juntament amb les altres molècules d'aigua, emplen l'espai entre els clústers, i formen una xarxa complexa de ponts d'hidrogen, la qual uneix els clústers i dona cohesió al cristall.

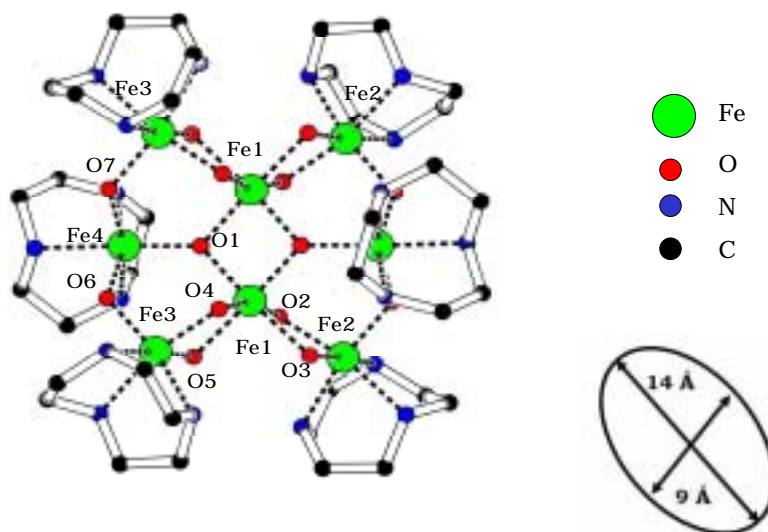
A l'estructura cristal·lina descrita per Wieghardt, hi ha set Br<sup>-</sup> i una molècula d'aigua que estableixen ponts d'hidrogen amb cada clúster, mentre que al nou polimorf no hi ha ponts d'hidrogen entre el solvent aquós i el clúster. A més, el nou polimorf presenta dues molècules més d'aigua per cada cel·la unitat i juntament amb el desordre de les posicions atòmiques dels Br<sup>-</sup>, fa que el volum de la cel·la sigui més gran ( $V = 2162.8 \text{ \AA}^3$ ) que en la descrita per Wieghardt ( $V = 1956 \text{ \AA}^3$ ).



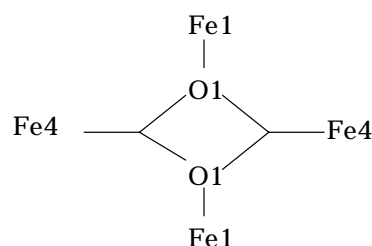
**Taula 2.1** Dades cristal·logràfiques del nou polimorf del Fe<sub>8</sub> i del Fe<sub>8</sub> tipus Wieghardt

	Fe <sub>8</sub> nou polimorf	Fe <sub>8</sub> tipus Wieghardt
Sistema cristal·lí	Triclínic	Triclínic
Grup espacial	P-1	P1
Cel·la unitat	a = 13.257(2) Å	a = 10.522(7) Å
	b = 13.564(1) Å	b = 14.05(1) Å
	c = 15.076(2) Å	c = 15.00(1) Å
	α = 114.77(1)°	α = 89.90(6)°
	β = 108.14(1)°	β = 109.65(5)°
	γ = 101.43(1)°	γ = 109.27(6)°
Volum (Å <sup>3</sup> )	2162.8(6)	1953

A la figura 2.4 es pot veure el diagrama ORTEP del clúster [(tacn)<sub>6</sub>Fe<sub>8</sub>(μ<sub>3</sub>-O)<sub>2</sub>(μ<sub>2</sub>-OH)<sub>12</sub>]<sup>8+</sup>. El clúster de Fe<sub>8</sub> és idèntic en ambdues estructures. El centre del clúster està format per dos àtoms centrals de Fe (Fe1 i Fe1 (-X, -Y, -Z+1)) enllaçats entre si per dos ponts μ<sub>3</sub>-oxo (O1). La molècula té una forma d'elipsoide de revolució de 14 Å l'eix llarg i 9 Å l'eix curt.

**Figura 2.4** Estructura cristal·lina del clúster [(tacn)<sub>6</sub>Fe<sub>8</sub>(μ<sub>3</sub>-O)<sub>2</sub>(μ<sub>2</sub>-OH)<sub>12</sub>]<sup>8+</sup>

Els oxígens O1 es troben coordinats a dos altres ions Fe (Fe4 i Fe4(-X, -Y, -Z+1)), i originen una conformació que es coneix com a *papallona* (vegeu la figura 2.5). Els quatre àtoms de Fe restants es troben units al Fe1 i al Fe4 per dos i un pont  $\mu_2$ -hidroxo, respectivament.



**Figura 2.5** Representació esquemàtica de l'estructura papallona

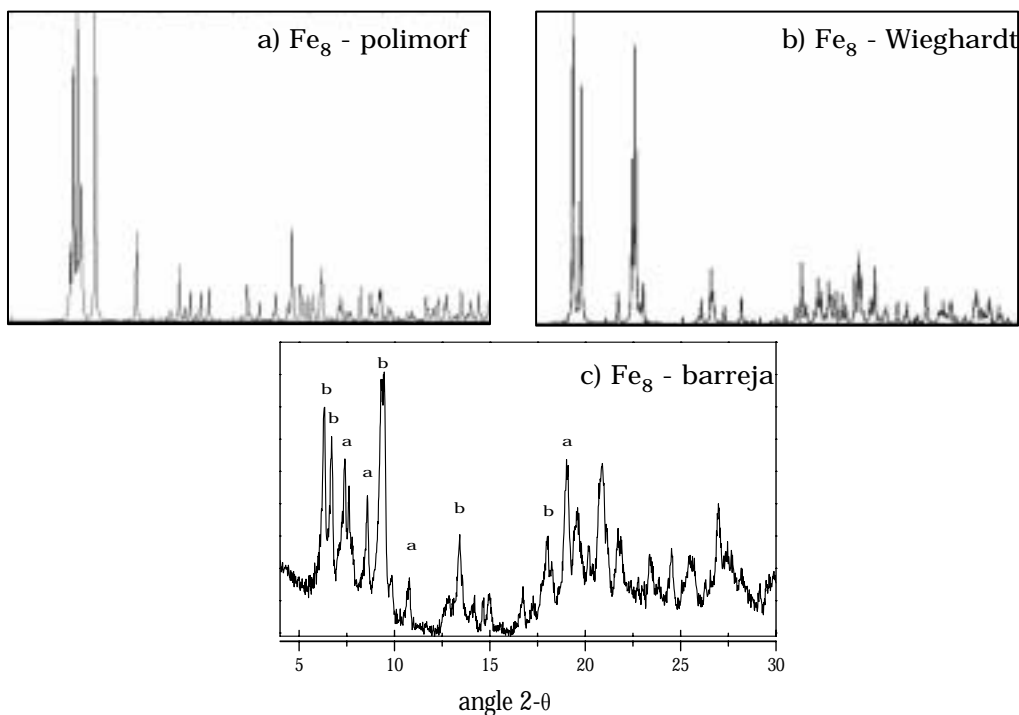
Com es pot veure a la taula 2.2, la distància més curta entre àtoms de Fe correspon als dos àtoms centrals, Fe1...Fe1 i la més llarga a Fe1...Fe4. Sis amines es troben coordinades als sis àtoms de Fe externs.

**Taula 2.2** Distàncies Fe...Fe en el clúster [(tacn)<sub>6</sub>Fe<sub>8</sub>( $\mu_3$ -O)<sub>2</sub>( $\mu_2$ -OH)<sub>12</sub>]<sup>8+</sup> i distàncies Br...O en els ponts d'hidrogen entre els anions Br<sup>-</sup> i el clúster

Àtoms	Distància (Å)	Àtoms	Distància(Å)
Fe1...Fe1(-X,-Y,-Z+1)	2.919(1)	Br1...O5	3.143(3)
Fe1...Fe2	3.062(1)	Br2...O6	3.270(3)
Fe1...Fe3	3.061(1)	Br2...O7	3.306(3)
Fe1...Fe4	3.462(1)	Br3...O3(-X+1,-Y+1,-Z+1)	3.245(3)
Fe2...Fe4(-X,-Y,-Z+1)	3.554(1)	Br6...O2	3.106(12)
Fe3...Fe4	3.559(1)	Br6...O4(-X,-Y,-Z+1)	3.101(13)
		Br8...O2	3.267(6)
		Br8...O4(-X,-Y,-Z+1)	3.295(5)

## Difracció de raigs X en pols

A partir de les dades cristal·logràfiques obtingudes de les estructures cristal·lines del Fe<sub>8</sub>, estructura Wiegardt i polimorf, es van generar els respectius difractogrames en pols, a fi d'identificar els productes policristal·lins obtinguts en les diferents síntesis. Els productes obtinguts generalment eren barreja de totes dues estructures. A la figura 2.6 a) i b), es mostren els dos difractogrames de raigs X simulats per les estructures cristal·lines i el difractograma d'un producte policristal·lí de Fe<sub>8</sub>. S'hi pot veure com les bandes del difractograma c) són suma de les bandes dels diagrames en pols de les respectives estructures cristal·lines.

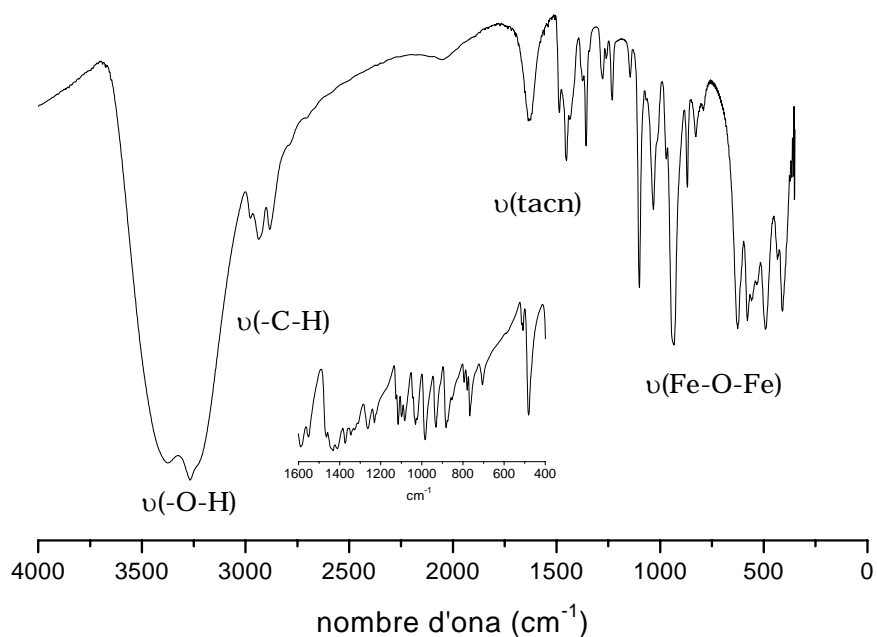


**Figura 2.6** Difractogrames de raigs X en pols; a) difractograma simulat per l'estructura cristal·lina de  $\text{Fe}_8$  polimorf, b) difractograma simulat per l'estructura cristal·lina de  $\text{Fe}_8$  tipus Wiegardt i c) difractograma de  $\text{Fe}_8$  tipus barreja

### 2.2.2 Espectroscòpia d'infraroig (IR) i Raman

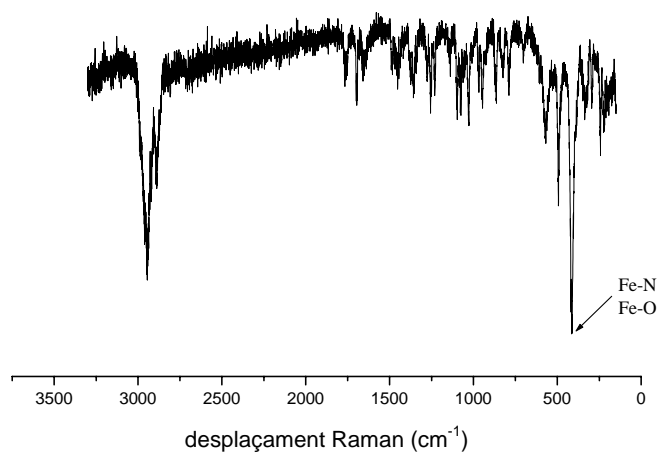
Els grups de vibració Fe-O-Fe han estat molt caracteritzats espectroscòpicament a causa que es troben presents en molts sistemes biològics<sup>3,4</sup>, com per exemple en la ferritina i es troben en la regió entre 800–400  $\text{cm}^{-1}$ . Segons la bibliografia<sup>4</sup>, en els sistemes dinuclears de Fe(III) l'estirament simètric Fe-O-Fe cau en el rang 540–340  $\text{cm}^{-1}$ , mentre que l'estirament asimètric cau entre 885–725  $\text{cm}^{-1}$ . També han estat estudiats els modes de vibració Fe-O-Fe en complexos amb unitats papallona<sup>5-7</sup>. En aquest cas s'ha assignat que l'estirament asimètric Fe-O-Fe cau al voltant de 750  $\text{cm}^{-1}$ .

A la figura 2.7 es pot veure l'espectre infraroig del  $\text{Fe}_8$  i com a figura inserida l'espectre de l'amina lliure. Les bandes presents a nombres d'ona superiors corresponen als modes de vibració de l'amina, així com als modes de les molècules d'aigua presents.



**Figura 2.7** Espectre IR del Fe<sub>8</sub> enregistrat en el rang de nombre d'ones 400-4000 cm<sup>-1</sup>. Com a figura inserida es troba l'espectre IR de l'amina lliure

També s'ha enregistrat l'espectre Raman del Fe<sub>8</sub> (vegeu la figura 2.8). North *et al.*<sup>8</sup> van fer un estudi sobre els modes de vibració del Fe<sub>8</sub>, on l'assignació de les bandes es va fer per comparació amb complexos models. Igual que en l'espectre infraroig, les bandes que apareixen per sobre de 800 cm<sup>-1</sup> corresponen a vibracions de l'amina. Segons el treball de North *et al.*, el pic a 417 cm<sup>-1</sup> correspon tant al mode de vibració Fe-N, com al de Fe-O.

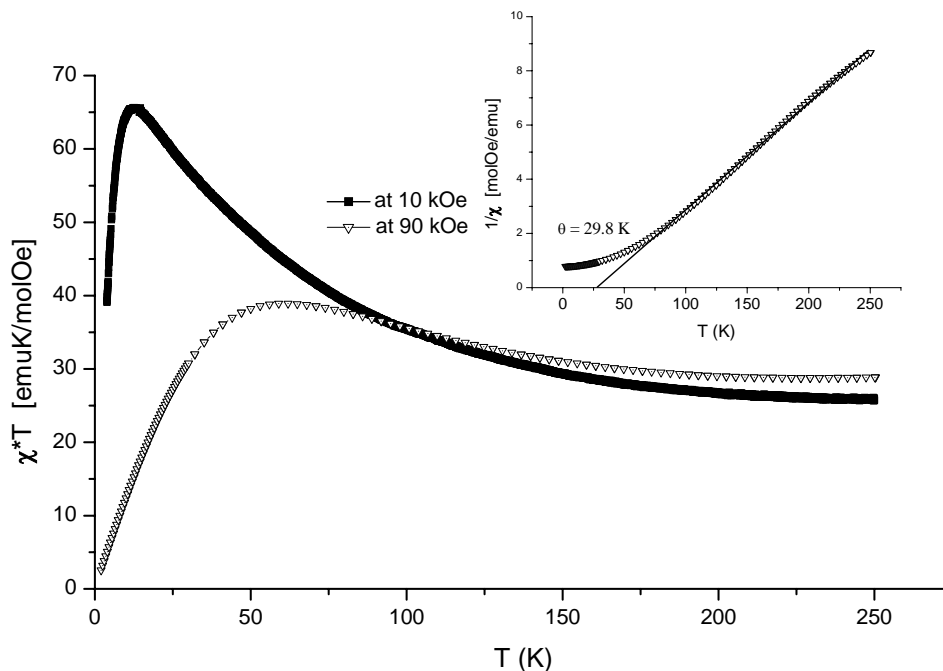


**Figura 2.8** Espectre Raman del Fe<sub>8</sub>

### 2.2.3 Mesures magnètiques

La química molecular ha aportat un nou tipus de clústers amb propietats magnètiques tan peculiars que han donat lloc a un nou camp del magnetisme, el magnetisme molecular<sup>9,10</sup>. El Fe<sub>8</sub> és una de les molècules més estudiades del magnetisme molecular. Una de les característiques que la fa més atractiva és que es comporta com un imant molecular a baixes temperatures i, a més, presenta efecte túnel del moment magnètic a temperatures ultrabaixes<sup>11,12</sup>. Per aquest motiu la caracterització del Fe<sub>8</sub> s'ha basat principalment en mesures magnètiques a molt baixa temperatura.

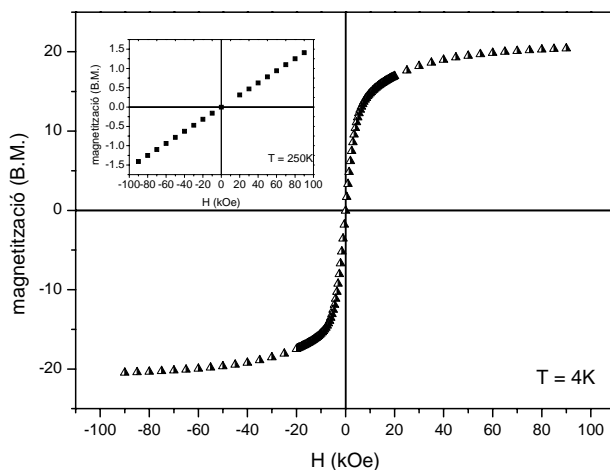
En aquest treball s'han dut a terme mesures de susceptibilitat i magnetització de pols policristal·lina de Fe<sub>8</sub>, semblants a les publicades per Gatteschi *et al.*<sup>13</sup>. A la figura 2.9 es mostra el comportament de la susceptibilitat amb la temperatura a 90 kOe i 10 kOe. El valor de  $\chi_{\text{mol}}T$  es manté constant entre 250-150 K, llavors augmenta en disminuir la temperatura fins a assolir un valor màxim i a continuació decreix ràpidament, la qual cosa evidencia que l'acoblament entre els àtoms de Fe(III) és ferrimagnètic. S'ha vist a la bibliografia que, en general, els compostos de Fe(III) amb estructura papallona presenten acoblaments antiferromagnètics<sup>5</sup>.



**Figura 2.9** Dependència de la susceptibilitat amb la temperatura a 90 kOe i 10 kOe, a la figura inserida es troba representat l'invers de la susceptibilitat respecte a la temperatura a 90 kOe

El fet que el valor de  $\chi_{\text{mol}}T$  decreixi a baixes temperatures es deu a l'efecte del desdoblament a camp nul (ZFS) i/o a interaccions intermoleculares que acostumen a ser antiferromagnètiques. El valor màxim de  $\chi_{\text{mol}}T$  depèn del camp magnètic de mesura a causa dels efectes de saturació que es donen en treballar a camps més elevats, per a 10 kOe a 12.5 K,  $\chi_{\text{mol}}T = 65.53 \text{ emumol}^{-1}\text{K}Oe^{-1}$ , i per a 90 kOe a 62 K,  $\chi_{\text{mol}}T = 38.91 \text{ emumol}^{-1}\text{K}Oe^{-1}$ .

A partir de la representació de la inversa de la susceptibilitat respecte a la temperatura enregistrat a 90 kOe es pot veure que el Fe<sub>8</sub> és un ferrimagnet (vegeu la figura inserida a la figura 2.10). Per a  $T > 100 \text{ K}$  el Fe<sub>8</sub> obeeix la llei de Curie Weiss. El valor de la constant de Curie-Weiss té signe positiu (acoblament ferrimagnètic) i val 29.8 K. A la figura 2.10 es pot veure la dependència de la magnetització amb el camp magnètic a 4 i a 250 K.



**Figura 2.10** Comportament de la magnetització davant el camp magnètic a 4 K i a 250 K

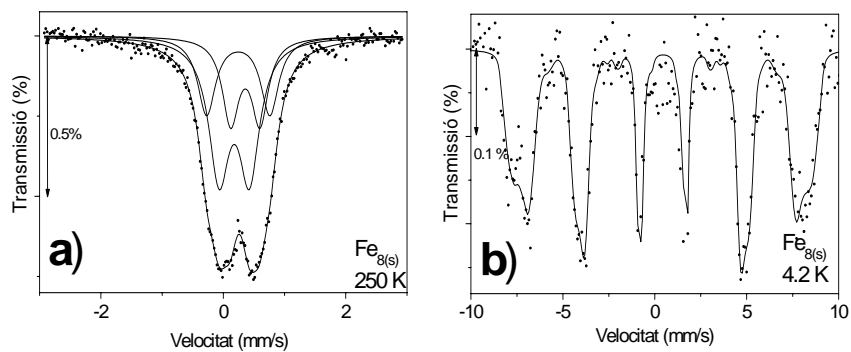
El valor de la magnetització de saturació és de  $20 \mu_B$  a 4 K, cosa que equival a dir que el Fe<sub>8</sub> presenta un valor d'spin fonamental de 10.

En canvi a 250 K la magnetització és lineal respecte del camp magnètic aplicat, és a dir el Fe<sub>8</sub> presenta un comportament paramagnètic a causa del caràcter superparamagnètic del compost a altes temperatures.

### 2.2.4 Espectroscòpia Mössbauer

A la figura 2.11 es poden veure, respectivament, els espectres Mössbauer enregistrats a 4 K i 250 K. L'espectre enregistrat a 250 K consisteix en un doblet

ample i quasi simètric que pot ser fitat utilitzant tres subespectres adscrits en els tres entorns diferents dels Fe a la molècula, típic d'un comportament paramagnètic o superparamagnètic. En el cas de l'espectre a 4 K es pot veure un sextet ample corresponent a la superposició de tres sextets de cadascun dels entorns del Fe. Aquest espectre es troba completament resolt la qual cosa indica que tots els spins es troben congelats en un estat col·lectiu.



**Figura 2.11** Espectres Mössbauers del Fe<sub>8</sub> a) a 250 K i b) a 4 K.

## Bibliografia del capítol 2

- 1 Wiegardt K., Pohl K., Jibril I., Huttner G. Hydrolysis Products of the Monomeric Amine Complex (C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>)FeCl<sub>3</sub>: The Structure of the Octameric Iron (III) Cation of  $\{[(C_6H_{15}N_3)_6Fe_8(\mu_3-O)_2(\mu_2-OH)_{12}]Br_7(H_2O)\}Br \cdot 8H_2O$ . *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *1*, 77-78.
- 2 Wiegardt K., Pohl K., Gebert W.  $[(C_6H_{15}N_3)_2Fe_2(\mu-O)(\mu-CH_3CO_2)_2]^{2+}$ , ein zweikerniger Eisen(III)-Komplex vom Strukturtyp des Metazidohämerythrins. *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 739.
- 3 Lippard S. J. Oxo-Bridged Polyiron Centers in Biology and Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 344-361.
- 4 Kurtz D. M. Oxo- and Hydroxo-Bridged Diiron Complexes: A Chemical Perspective on a Biological Unit. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 585-606.
- 5 McCusker J. K., Vincent J. B., Schmitt E. A., Mino M. L., Shin K., Coggin D. K., Hagen P. M., Huffman J. C., Christou G., Hendrickson D. N. Molecular Spin Frustration in the [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>8+</sup> Core: Synthesis, Structure, and Magnetochemistry of [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CR)<sub>7</sub>(bpy)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>) (R = Me, Ph) *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3012-3021.
- 6 Gorun S. M., Lippard S. J. Synthesis, Structure, and Characterization of the Tetranuclear Iron (III) Oxo Complex [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>(BICOH)<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CPh)<sub>4</sub>]Cl<sub>2</sub>. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 149-156.
- 7 Armstrong W. H., Roth M. E., Lippard S. J. Tetranuclear Iron-Oxo Complexes. Synthesis, Structure, and Properties of Species Containing the Nonplanar [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>8+</sup> Core and Seven Bridging Carboxylate Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6318-6326.
- 8 North J. M., Dalal N. S. Raman and infrared modes of the single molecule magnet Fe<sub>8</sub>Br<sub>8</sub> and analogs. *Journal of Applied Physics.* **2003**, *93*, 10, 7092-7094.
- 9 Caneschi A., Gatteschi D., Sangregorio C., Sessoli R., Sorace L., Cornia A., Novak M. A., Paulsen C., Wernsdorfer W. The molecular approach to nanoscale magnetism. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* **1999**, *200*, 182-201.
- 10 Kahn O. Molecular Magnetism. WILEY-VCH, **1993**.
- 11 Friedman J. R., Sarachik M. P., Tejada J., Ziolo R. Macroscopic Measurement of Resonant Magnetization Tunneling in High-Spin Molecules. *Physical Review Letters.* **1996**, *76*, 3830-3833.
- 12 Del Barco E., Vernier N., Hernandez J. M., Tejada J., Chudnovsky E. M., Molins E., Bellessa G. Quantum coherence in Fe<sub>8</sub> molecular nanomagnets. *Europhysics Letters.* **1999**, *(47):6*, 722-728.
- 13 Delfs C., Gatteschi D., Pardi L., Sessoli R., Wiegardt K., Hanke D. Magnetic Properties of an Octanuclear Iron (III) Cation. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3099-3103.



## **3 | Avaluació del Fe<sub>8</sub> com a agent de contrast en PBS**

---

### **3.1 Mesura del T<sub>1</sub> i del T<sub>2</sub>**

### **3.2 Obtenció d'imatges**

### **3.3 Estudis de toxicitat**

### **3.4 Conclusions**

El tercer capítol descriu l'avaluació del Fe<sub>8</sub> com a agent de contrast. Aquest estudi consisteix a obtenir els valors  $r_1$  i  $r_2$  per poder-lo comparar amb els agents de contrast descrits a la bibliografia, en l'obtenció d'imatges potenciades en  $T_1$  o en  $T_2$  segons el seu comportament i, finalment, estudiar la toxicitat del compost in vitro per tenir un marge de seguretat en futurs estudis in vivo. Els resultats d'aquest capítol s'han publicat en primer lloc com a patent i després com article<sup>1,2</sup>.

### **3.1 Mesura dels temps de relaxació: $T_1$ i $T_2$**

Amb la finalitat d'avaluar la capacitat de la molècula de Fe<sub>8</sub> com a agent de contrast s'han mesurat els temps de relaxació,  $T_1$  i  $T_2$  dels nuclis d'H-1 en presència del compost metàl·lic. Les solucions s'han preparat a partir d'una solució aquosa tamponada de fosfats, PBS, perquè tampona a pH fisiològic. Per comparar els resultats obtinguts també s'han mesurat els valors de  $T_1$  i  $T_2$  pel complex Gd-DTPA.

#### **3.1.1 Materials i mètodes**

La síntesi del Fe<sub>8</sub> es va dur a terme tal com s'explica al capítol 2. El Gd-DTPA és un producte comercial de Sigma-Aldrich. El rang de concentracions estudiat per al Fe<sub>8</sub> ha estat entre  $4.46 \cdot 10^{-3}$  mM i  $8.91 \cdot 10^{-1}$  mM i, en el cas del Gd-DTPA, entre  $3.7 \cdot 10^{-3}$  mM i  $9.13 \cdot 10^{-1}$  mM. Segons la bibliografia, si la dosi administrada d'un agent de contrast extravascular és de 0.1 mmol/kg, la concentració en sang serà de  $5 \cdot 10^{-3}$  mM, si tenim en compte una persona de 75 kg i un volum extracel·lular de  $15 \text{ dm}^3$  <sup>3</sup>.

La composició del PBS és la següent: 0.14 M de NaCl,  $2.68 \cdot 10^{-3}$  M de KCl, 0.01 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,  $1.76 \cdot 10^{-3}$  M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Un cop preparades les diferents solucions de Fe<sub>8</sub> i Gd-DTPA en PBS es va ajustar el pH. En el cas del Fe<sub>8</sub> era lleugerament bàsic i es va acidificar amb HNO<sub>3</sub> 1M o més concentrat per no fer variar el volum total. En el cas del Gd-DTPA, el pH resultant era al voltant de 6 i, per tant, es va basificar amb KOH.

Normalment la caracterització dels agents de contrast es fa a camps magnètics clínics entre 0.24 i 1.5 T. Actualment es comencen a fer estudis amb animals

amb camps magnètics entre 3–7 T. En aquest treball les mesures de relaxació s'han fet a dos camps magnètics diferents: a 9.4 T i a 1.4 T.

Les mesures de relaxació a 9.4 T es van prendre en un espectròmetre Bruker ARX-400 NMR (vegeu l'annex 1). Tal com es va explicar a la pàgina 9 del capítol 1, la seqüència utilitzada per mesurar el T<sub>1</sub> era la seqüència inversió–recuperació (180°<sub>x</sub>-τ-90°<sub>x</sub>-τ-180°<sub>x</sub>-adquisició) i per a T<sub>2</sub> la seqüència cpmg (90°<sub>x</sub>-[τ-180°<sub>y</sub>-τ]<sub>n</sub>-adquisició). La temperatura ha estat de 298 K i el senyal del lock es va fer amb cloroform deuterat. Els paràmetres d'adquisició van ser els següents: temps de domini de 2048 punts, amplada de finestra de 1602.56 Hz, pols de radiofreqüència de 90° amb una duració entre 13 i 19 μs, i un temps de repetició de 31 s. El temps d'inversió ha variat entre 0.05 i 15 s, en el cas de l'estudi del T<sub>1</sub>. En l'estudi del T<sub>2</sub> el nombre de cicles (*n*) ha variat entre 2 i 1000. El nombre d'escombratges per a totes dues seqüències ha estat de 8. Els espectres han estat processats amb el programa XWIN-NMR, versió 3.1.b.16 (Bruker Española, S A, Madrid). Les constants dels temps de relaxació es van obtenir mitjançant l'ajust de l'equació 1.6 en el cas del T<sub>1</sub>, i en el cas del T<sub>2</sub>, de l'equació 1.7.

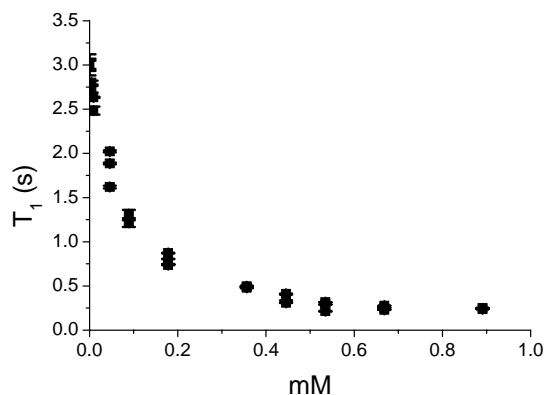
A causa que les mostres que cal mesurar són solucions aquoses i, per tant, molt concentrades en nuclis d'H-1, l'efecte de la **radiation damping**<sup>4,5</sup> hi era present. La **radiation damping** s'origina en mostres on el magnetisme nuclear és més gran que el corrent induït a la bobina, la qual cosa afecta el B<sub>1</sub>, per tant, també afecta l'aplicació correcta dels polsos de radiofreqüència i això dificulta l'obtenció del T<sub>1</sub> pel mètode d'inversió–recuperació. A fi d'evitar el fenomen s'ha de treballar amb menys volum de mostra. Es va procedir a dipositar la mostra en tubs capil·lars d'1.5 mm i aquests dins de tubs d'RMN de 5 mm amb cloroform deuterat i treballant lleugerament fora de la freqüència de ressonància de l'H-1 (on la freqüència de ressonància del nucli d'H-1 a 9.4 T és de 400.13 MHz).

Les mesures de relaxació a 1.41 T es van fer en un espectròmetre Minispec (vegeu l'annex 1) a 298 K i a 310 K. Aquest tipus d'instruments es caracteritzen perquè treballen a un camp magnètic fix, no cal afegir cap dissolvent de referència i el pols de 90° també es troba prefixat. Els valors de T<sub>1</sub> es van obtenir a partir de la seqüència d'inversió–recuperació i els valors de T<sub>2</sub>, a partir de la seqüència cpmg.

### 3.1.2 Resultats

Tal com es va comentar en el capítol 1, la funció d'un agent de contrast és disminuir el temps de relaxació dels nuclis d'H-1. A la figura 3.1 es pot veure la

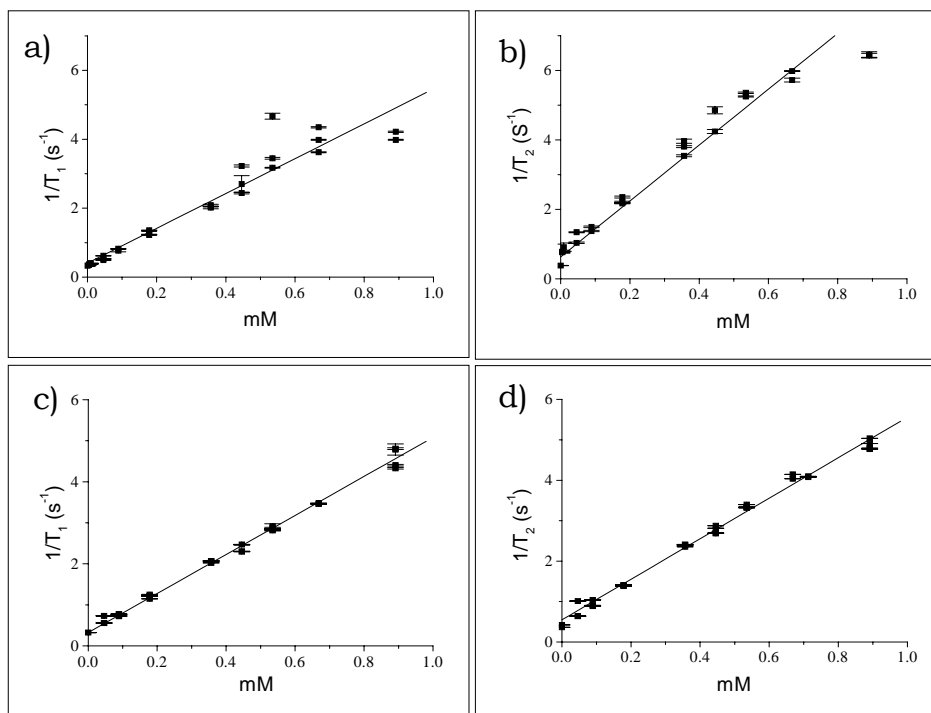
disminució del temps de relaxació longitudinal,  $T_1$ , en funció de la concentració de Fe<sub>8</sub> a 9.4 T i a 298 K.



**Figura 3.1** Disminució del  $T_1$  en funció de la concentració del Fe<sub>8</sub> a 9.4 T. Per cada concentració es van fer tres experiments independents. Cada punt correspon a un experiment.

A fi d'avaluar un agent de contrast es parla en termes de relaxivitat, on la relaxivitat,  $r_1$  o  $r_2$ , es calcula, en absència d'interaccions solut-solut, a partir del pendent de la recta obtinguda en representar l'invers del temps de relaxació en funció de la concentració de l'agent de contrast (eq. 1.11).

A la figura 3.2 es pot veure la disminució del  $T_1$  i  $T_2$  a 9.4 T i 1.41 T per al Fe<sub>8</sub> en PBS a 298 K:



**Figura 3.2** Resultats relaxomètrics obtinguts a 298 K. (a,b)  $1/T_1$  i  $1/T_2$  vs concentració de Fe<sub>8</sub> a 9.4 T; (c,d)  $1/T_1$  i  $1/T_2$  vs concentració de Fe<sub>8</sub> a 1.41 T. Per cada concentració es van fer tres experiments independents. Cada punt correspon a un experiment.

A la taula 3.1 es poden veure les  $r_1$  i  $r_2$  obtingudes per al Fe<sub>8</sub> i per al Gd-DTPA a 9.4 T i a 1.41 T. En el cas del Fe<sub>8</sub>, els valors de relaxivitat obtinguts es refereixen a la molècula de Fe<sub>8</sub>. També hi figuren els quocients  $r_2/r_1$  que estableixen una altra classificació dels agents de contrast segons el seu valor; quan el valor de  $r_2/r_1$  es troba entre 1 i 2 es diu que l'agent de contrast és de tipus paramagnètic (exemple: Gd-DTPA); quan  $r_2/r_1$  es troba entre 2 i 25 l'agent de contrast és de tipus superparamagnètic (exemple: partícules d'òxid de ferro (III), USPIO) i quan  $r_2/r_1$  és més gran de 25 l'agent de contrast és de tipus ferromagnètic (exemple: partícules d'òxid de ferro)<sup>6</sup>.

Tal com es pot veure a la taula 3.1 el Fe<sub>8</sub> presenta un comportament similar al Gd-DTPA, és a dir, com a agent de contrast tipus I.

**Taula 3.1** Valors de relaxivitat,  $r_1$  i  $r_2$  en mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> obtinguts a 298 K

Agent de contrast	Camp magnètic	T (K)	$r_1$	$r_2$	$r_1/r_2$
Fe <sub>8</sub>	9.4 T	298	5.10 ± 0.30	8.04 ± 0.12	<b>1.58</b>
Gd-DTPA	9.4 T	298	3.71 ± 0.22	4.44 ± 0.73	<b>1.20</b>
Fe <sub>8</sub>	1.41 T	298	4.76 ± 0.07	5.01 ± 0.08	<b>1.05</b>
Gd-DTPA	1.41 T	298	4.29 ± 0.01	4.89 ± 0.02	<b>1.14</b>

### Efecte de la temperatura en T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>

A la taula 3.2 es comparen els temps de relaxació obtinguts a 1.41 T a dues temperatures, a 298 K i a 310 K (la temperatura dels fluids sanguini és de 37°C). Les relaxivitats disminueixen amb la temperatura.

**Taula 3.2** Efectes de la temperatura en  $r_1$  i  $r_2$

T (K)	$r_1$	$r_2$
298	4.76 ± 0.07	5.01 ± 0.08
310	3.91 ± 0.05	4.49 ± 0.11

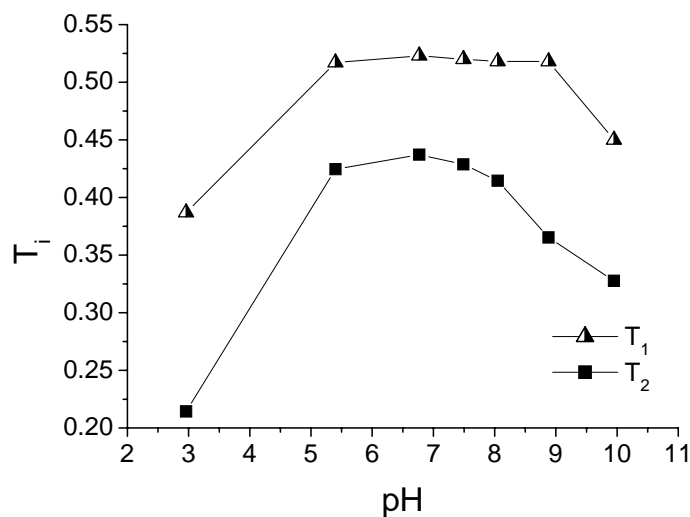
La relaxació longitudinal es troba afectada per la mobilitat de la xarxa. En sòlids cristal·lins i en líquids viscosos, on les mobilitats són baixes, T<sub>1</sub> és gran. En augmentar la mobilitat, per exemple augmentant la temperatura, augmenten les freqüències de vibració i de rotació, i també la probabilitat que existeixi una fluctuació magnètica de la magnitud apropiada a fi que es doni una transició de

relaxació; com a conseqüència d'això,  $T_1$  disminueix. D'altra banda, quan la mobilitat és alta, les freqüències de fluctuació també augmenten i es distribueixen en un interval tan ampli que la probabilitat que es doni una transició spin-xarxa disminueix de nou.

En el cas del temps de relaxació transversal,  $T_2$ , en una xarxa on hi hagi mobilitat, per exemple a causa de l'augment de la temperatura, aquests camps locals tendeixen a anul·lar-se pels moviments ràpids i aleatoris dels nuclis que els produeixen i, per tant, disminueixen les heterogeneïtats del camp magnètic, alhora que augmenta el  $T_2$ .

### Efecte del pH en $T_1$ i $T_2$

S'ha estudiat com varien els temps de relaxació,  $T_1$  i  $T_2$ , en funció del pH d'una solució 0.45 mM de Fe<sub>8</sub> a 1.41 T i a 310 K (vegeu la figura 3.3). Els valors per al  $T_1$  com per al  $T_2$  disminueixen a pH àcids i a pH bàsics. S'ha trobat, per molts agents de contrast, que l'intercanvi protònic es troba accelerat en medi bàsic i en medi àcid perquè els ions H<sup>+</sup> o OH<sup>-</sup> catalitzen els processos i, per tant, disminueixen el  $T_1$  i  $T_2$  de forma més efectiva que a pH neutre<sup>7</sup>.

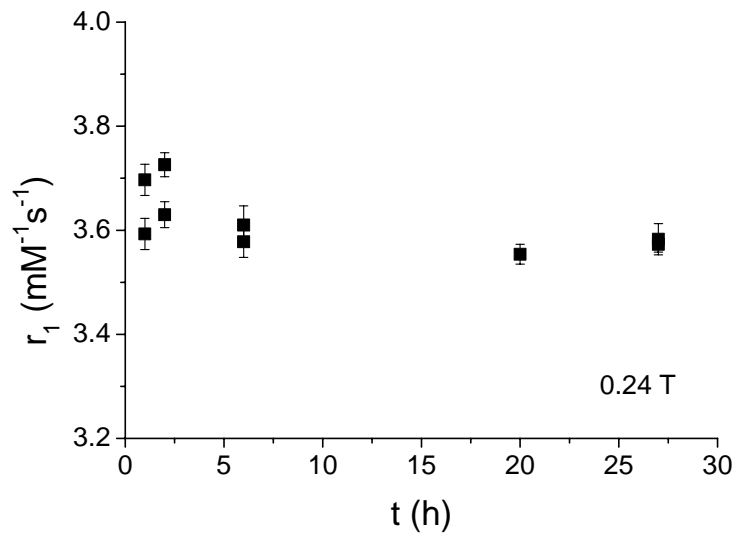


**Figura 3.3** Influència de pH en els temps de relaxació

### Estabilitat de la mesura $T_1$ amb el temps

A la figura 3.4 es pot veure l'estabilitat d'una mesura de  $T_1$  d'una solució de Fe<sub>8</sub> 0.5 mM a pH neutre a un camp magnètic de 0.24 T i a temperatura ambient. La

mesura és constant amb el temps, per tant, ens dóna certa seguretat de l'estabilitat de complex de Fe<sub>8</sub> en PBS.



**Figura 3.4** Estabilitat de la mesura de  $r_1$  amb el temps d'una solució de Fe<sub>8</sub> 0.5 mM. Aquesta mesura s'ha realitzat en un relaxòmetre Spinmaster FFC a un camp magnètic d'0.24 T (vegeu l'annex 1).

## 3.2 Obtenció d'imatges

En aquest apartat es descriuen les imatges obtingudes de nuclis d'H-1 de solucions de PBS en presència de Fe<sub>8</sub> i Gd-DTPA. Tal com s'ha vist a l'apartat anterior, el Fe<sub>8</sub> es comporta com un agent T<sub>1</sub>, per tant, les imatges obtingudes són potenciades en T<sub>1</sub>.

### 3.2.1 Materials i mètodes

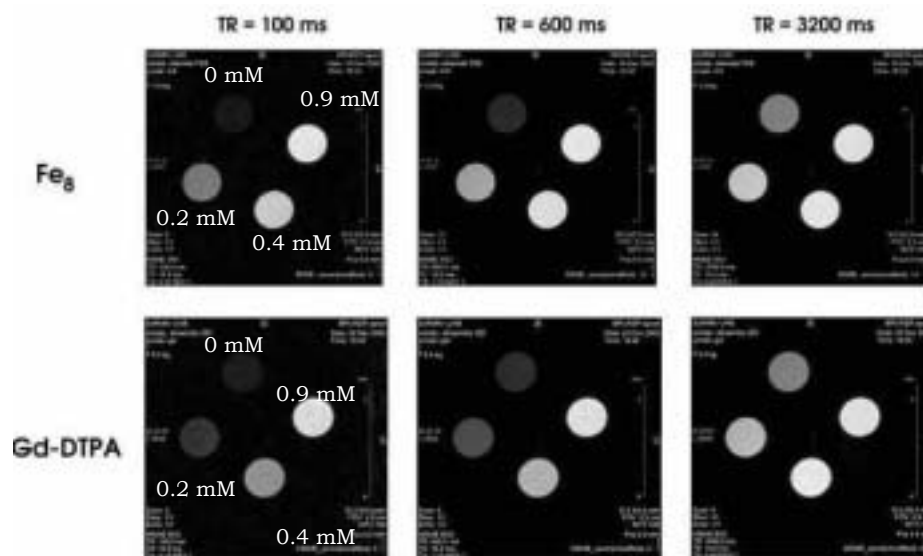
Les imatges d'RMI s'han pres en un espectròmetre Bruker AMX-400-WB equipat amb un accessori de mini-imatge i utilitzant el programari XWinNMR versió 2.6 i Paravision versió 2.1 (Bruker Espanyola, S A, Espanya) (vegeu l'annex 1). Les imatges potenciades en T<sub>1</sub> es van obtenir utilitzant la seqüència de pols spin-eco, SE, on el temps TE es manté constant amb un valor de 10.9 ms, mentre que per al temps TR s'han pres nou punts entre 15000 i 50 ms. Altres paràmetres: mida de la matriu de 128×128; camp de visió (FOV) de 25×25 mm<sup>2</sup>; gruix de 2 mm; nombre d'excitacions (NEX) d'1; amplada de finestra de 50 kHz; pols d'excitació, sinc3, 3500 μs. El percentatge d'augment de la intensitat ( $\Delta IE$ ) per a una concentració donada d'agent de contrast es calcula a partir de l'equació següent:

$$\Delta IE = (\hat{I}_c - \hat{I}_0) / \hat{I}_0 * 100 \quad (\text{eq. 3.1})$$

on  $\bar{I}_c$  i  $\bar{I}_0$  són les intensitats de les imatges obtingudes en presència d'agent de contrast i en absència, respectivament.

### 3.2.2 Resultats

La figura 3.5 compara la capacitat del Fe<sub>8</sub> i del Gd-DTPA de relaxar els protons d'una solució PBS a partir d'una imatge potenciada en T<sub>1</sub> a 9.4 T. Les imatges corresponen a temps de repetició de 100, 600 i 3200 ms. Les concentracions del Fe<sub>8</sub> i del Gd-DTPA que s'han mesurat són 0.2, 0.4 i 0.9 mM.

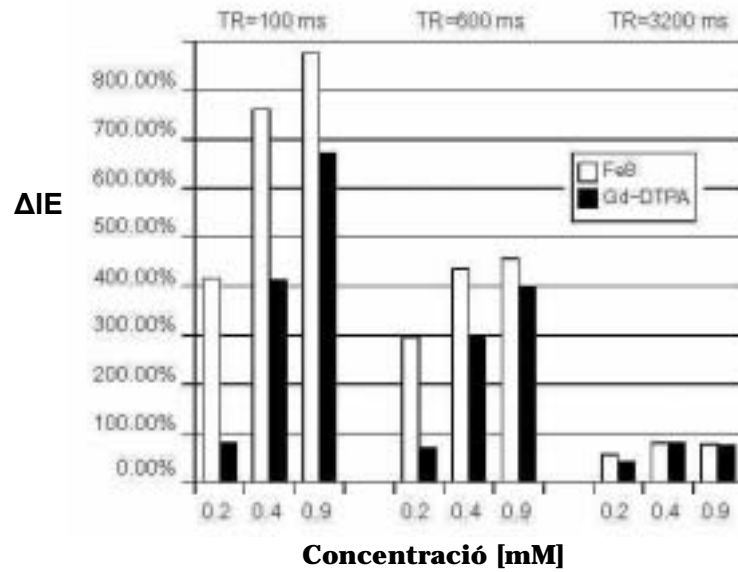


**Figura 3.5** Imatges potenciades en T<sub>1</sub> del Fe<sub>8</sub> i del Gd-DTPA a 9.4 T.

Com es pot veure, tots dos complexos augmenten la brillantor de les imatges en comparació al PBS, és a dir, sense agent de contrast. Com que les imatges han estat escalades, el comportament de tots dos agents de contrast es pot comparar i resulta que si comparem dos tubs a la mateixa concentració, el Fe<sub>8</sub> causa més brillantor.

A la figura 3.6 s'ha representat el percentatge de l'augment de la intensitat per cada agent de contrast respecte al PBS, al qual s'ha assignat un 0%  $\Delta I E$ . Tal com s'hi pot veure, el Fe<sub>8</sub> presenta un augment de la intensitat més gran per la mateixa concentració que el Gd-DTPA.





**Figura 3.6** Intensitats ( $\Delta IE$ ) obtingudes en les imatges potenciades en T<sub>1</sub> per al Fe<sub>8</sub> i per al Gd-DTPA

Com es pot veure a la figura 3.6 el quocient  $\Delta IE_{Fe8}/\Delta IE_{Gd-DTPA}$  disminueix a mesura que augmenta la concentració de l'agent de contrast, per exemple  $\Delta IE_{Fe8}/\Delta IE_{Gd-DTPA}$  era de 5.23 a la concentració de 0.2 mM i de 1.30 per a la concentració de 0.9 mM (TR = 100 ms). També cal destacar que el quocient augmenta en treballar amb TR més petits, per exemple  $\Delta IE_{Fe8}/\Delta IE_{Gd-DTPA}$  era de 5.23 per un TR = 100 ms, mentre que era d'1.38 per a un TR = 3200 ([Concentració] = 0.2 mM).

### 3.3 Estudis de toxicitat

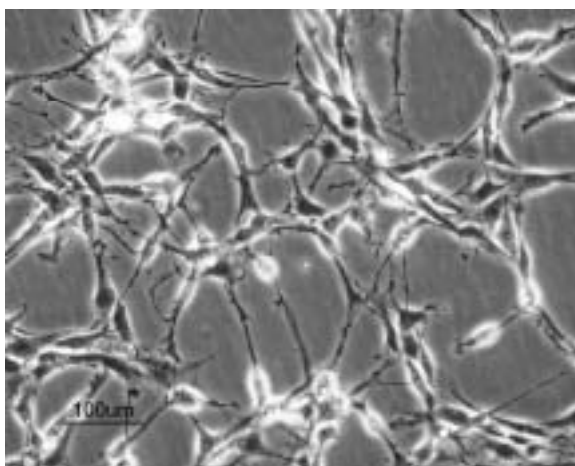
Una de les característiques que ha de presentar un agent de contrast és nul·la toxicitat in vivo. Per avaluar els possibles efectes tòxics d'aquestes complexos s'han de fer estudis 'in vitro' de toxicitat abans dels estudis in vivo.

En aquest treball s'han fet estudis de toxicitat en cultius cel·lulars amb diferents concentracions de Fe<sub>8</sub>. També s'ha avaluat la toxicitat del Gd-DTPA per poder comparar ambdós compostos.

#### 3.3.1 Materials i mètodes

Els estudis de toxicitat s'han fet en una línia cel·lular tumoral de glioma de rata, anomenada C6, procedents de la Col·lecció Europea de Cultius Cel·lulars (ECACC) (vegeu la figura 3.7). El sèrum fetal boví, el medi de cultiu F12 Ham, la solució de tripsina EDTA, Triton-X, el kit de lactat deshidrogenasa (LDH), el

reactiu 3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), el reactiu Neutral Red, el reactiu diacetat de fluoresceïna (FDA), la solució de gentamicina, el reactiu 2'7'-diclorofluoresceïndiacetat (DCFH-DA) i el reactiu deferoxamida són de la casa Sigma. El reactiu iodur de propidi (PI) era de Molecular Probs. El kit de Fluoresceïn era de Promega. Les plaques de cultiu eren de Nunc. El medi de cultiu era F12 Ham amb un 10% de sèrum fetal boví, 50 µM de gentamicina (antibiòtic) i 2 mM d'L-glutamina. Les cèl·lules van créixer en flascons cel·lulars i eren subcultivades cada tres o quatre dies.



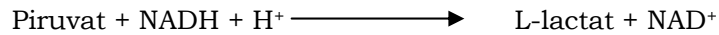
**Figura 3.7** Imatge d'un cultiu de la línia C6

A continuació s'expliquen amb detall els mètodes que s'han utilitzat per estudiar els efectes tòxics del Fe<sub>8</sub> i del Gd-DTPA.

**Assaig FDA/PI.** Aquest assaig es basa en la capacitat que té el reactiu fluorescent FDA per marcar les cèl·lules vives (color verd) i el reactiu PI per marcar les cèl·lules mortes (color vermell). Quan la cèl·lula és morta la membrana es troba debilitada i el reactiu PI pot entrar dins de la cèl·lula i es coordina amb el DNA, cosa que provoca un augment de la seva fluorescència. En canvi, el reactiu FDA penetra en la cèl·lula viva, les esterases intracel·lulars el trenquen i provoquen un augment de la fluorescència. Les cèl·lules tractades amb els agents de contrast en plaques de 12 pous van ser primerament rentades amb PBS i a continuació es van incubar amb 1.5 µg/ml de FDA i 0.6 µg/ml durant cinc minuts, a continuació es van prendre fotos amb un microscopi de fluorescència<sup>8</sup>. Amb el programa AnalySIS (Soft Imaging System GmbH, Alemanya) es va procedir a fer el comptatge de les cèl·lules. Es van comptar més de cent cèl·lules per cada un dels tres camps de cada pou. El nombre de cèl·lules vives es troba expressat com a percentatge del nombre de cèl·lules totals.

**Assaig LDH.** L'alliberament per part de la cèl·lula de l'enzim citoplasmàtic lactat deshidrogenasa, LDH, està relacionat amb la seva mortalitat, ja que quan la

cèl·lula mor es trenca la membrana cel·lular i l'enzim és alliberat. L'LDH catalitza la interconversió de lactat a piruvat segons la reacció:



Durant la reducció de piruvat una quantitat equimolar de NADH és oxidat a NAD<sup>+</sup>. L'oxidació de NADH resulta en la disminució d'absorbància a 340 nm. Per tant, la disminució de l'absorbància a 340 nm és directament proporcional a l'activitat de la lactat deshidrogenasa a la mostra i, per consegüent, al percentatge de mortalitat<sup>9</sup>. Amb la finalitat d'estudiar aquesta reacció s'ha utilitzat un kit amb el NADH i el piruvat com a reactius. S'ha mesurat l'alliberament de l'enzim LDH tant del medi com de les cèl·lules. En primer lloc es va prendre el medi de cultiu de les cèl·lules tractades en plaques de 12 pous per mesurar l'activitat enzimàtica basal. Llavors les cèl·lules es van tractar amb una solució de 0.1% de tritó X-100 en PBS; a continuació es van sonicar en un ultrasons i després de centrifugar, se'n va prendre el sobrenedant<sup>8</sup>. L'alliberament de la LDH s'expressa de la manera següent:

$$\%LDH = [\text{LDHmedi}/(\text{LDHmedi} + \text{LDHcèl·lules})]*100 \quad (\text{eq. 3.2})$$

**Assaig MTT.** Les cèl·lules vives redueixen la sal de tetrazoli (MTT) i s'obtenen cristalls de formazan blau fosc insolubles en aigua; per tant, aquesta mesura està relacionada amb el percentatge de cèl·lules vives. Les cèl·lules tractades en plaques de 96 pous es van incubar amb 0.5 mg/ml d'MTT durant dues hores. Llavors, es va afegir un solució tamponada de lisi que solubilitza els cristalls de formazan formats. Les plaques es van tapar amb parafilm i es van incubar a 310K durant una nit. A continuació es va mesurar la densitat òptica a 570 nm, on la longitud d'ona de referència és de 630 nm<sup>10</sup>. Els valors van ser expressats prenent com l'activitat dels controls del 100 %.

**Assaig neutral red:** Les cèl·lules vives poden acumular el reactiu neutral red i el reactiu acumulat pot ser mesurat espectrofotomètricament a 540 nm; per tant, la quantitat de neutral red està relacionada amb el percentatge de les cèl·lules vives. Les cèl·lules tractades en plaques de 96 pous es van incubar amb una solució de 50 µg/ml del reactiu. Les plaques es van incubar a 310 K durant dues hores. Llavors les cèl·lules es van rentar amb PBS i s'hi van afegir 200 µl d'un tampó solubilitzador, i se'n va mesurar la densitat òptica<sup>11</sup>. El percentatge del neutral red es va expressar respecte al control.

### **3.3.2 Resultats**

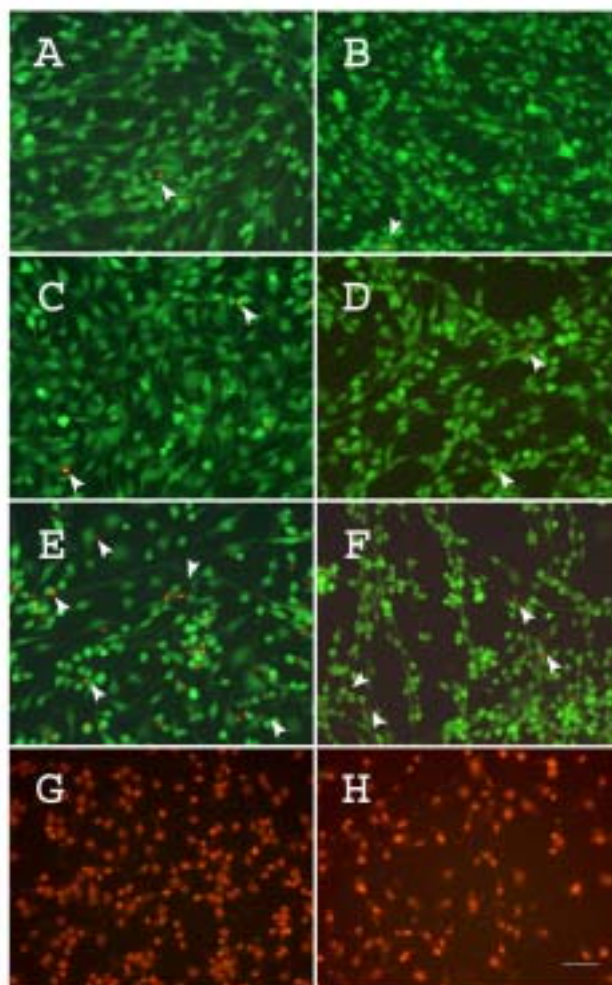
Tots els experiments de toxicitat s'han dut a terme en condicions de creixement a confluència, és a dir, les cèl·lules ocupen un volum considerable del pou de la placa. Un cop es tenen les cèl·lules a confluència, s'extreu el medi de cultiu i es tracta amb diferents concentracions dels agents de contrast, dissolts prèviament en medi de cultiu. En aquest treball, a part d'estudiar la toxicitat del Fe<sub>8</sub> també s'han fet els experiments paral·lels amb el Gd-DTPA.

L'interval de concentracions utilitzat per al Fe<sub>8</sub> és de 0.25 mM fins a 1.5 mM (perquè a concentracions més grans d'1.5 mM s'hi observaven precipitats). En el cas del Gd-DTPA és de 2.5 mM fins a 50 mM. En el cas de les solucions preparades amb Fe<sub>8</sub> el pH era neutre, mentre que per al Gd-DTPA el pH s'ha hagut d'ajustar a pH = 6.5–7, ja que a altes concentracions de Gd-DTPA el pH era àcid.

La mesura que permet tenir una idea sobre la toxicitat d'un compost in vitro i poder comparar-la és el paràmetre LC<sub>50</sub>, és a dir el valor de la concentració de l'agent de contrast que provoca el 50% de mort cel·lular. Com es veurà al llarg d'aquest apartat, per poder calcular l'LC<sub>50</sub> els temps d'incubació dels agents de contrast en els cultius cel·lulars han estat de tres dies perquè ni el Fe<sub>8</sub> ni el Gd-DTPA presentaven un 100% de mortalitat a temps d'incubació més petits. També s'ha estudiat la toxicitat del Fe<sub>8</sub> a 24 i 48 hores.

#### **Experiments a temps d'incubació de tres dies**

Amb la finalitat d'avaluar l'LC<sub>50</sub> s'han fet quatre assaigs: assaig FDA/PI, assaig LDH, assaig MTT i assaig neutral red. A la figura 3.8 es pot veure l'assaig FDA/PI per a les concentracions de Fe<sub>8</sub> següents: 0.25, 1.15 i 1.5 mM i per a les concentracions de Gd-DTPA següents: 2.5, 30 i 50 mM. Es pot veure que a mesura que augmenta la concentració de l'agent de contrast, augmenta el nombre de cèl·lules mortes, cèl·lules color vermell, fins que a una concentració d'1.5 mM de Fe<sub>8</sub> i de 50 mM de Gd-DTPA el % de mortalitat és de 100.



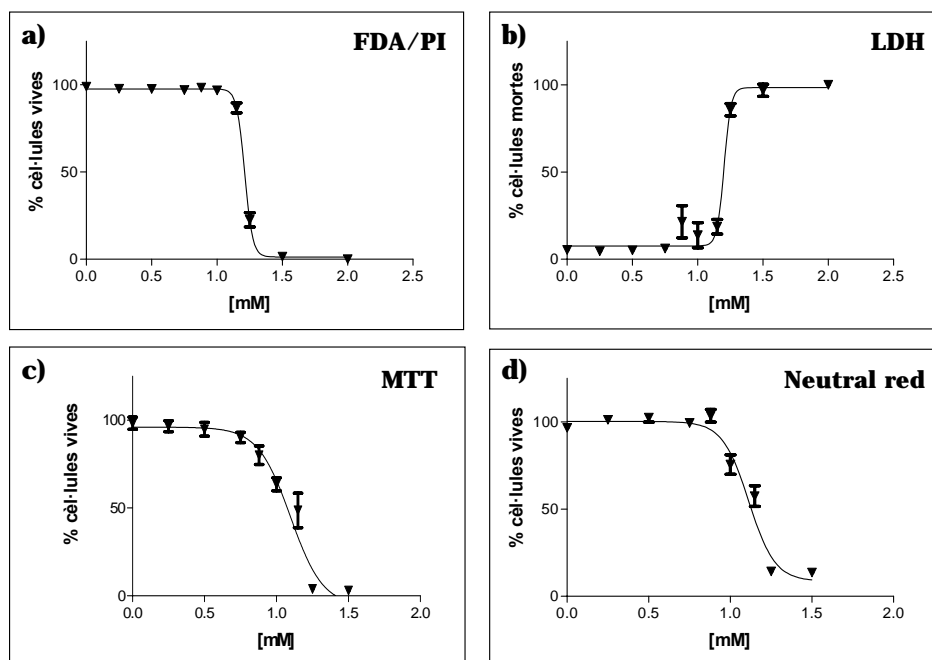
**Figura 3.8** Assaig FDA (cèl·lules vives, color verd)/PI (cèl·lules mortes, color vermell). On A i B són els controls; C: 0.25 mM Fe<sub>8</sub>; D: 2.5 mM Gd-DTPA; E: 1.15 mM Fe<sub>8</sub>; F: 30 mM Gd-DTPA; G: 1.5 mM Fe<sub>8</sub>; H: 50 mM Gd-DTPA

A la figura 3.9 es mostren els valors experimentals obtinguts pels quatre assaigs en referència al Fe<sub>8</sub>. Els valors experimentals s'han ajustat amb l'equació d'una sigmoide variable de doble resposta:

$$y = x_1 + (x_2 - x_1) / (1 + 10^{((\log EC_{50} - x)n)}) \quad (\text{eq. 3.3})$$

on  $x$  és la concentració,  $y$  és la resposta i  $n$  és el coeficient d'Hill.

A la taula 3.3 es poden veure les LC<sub>50</sub> obtingudes pels diferents mètodes. Els valors obtinguts pels diferents mètodes són molt similars. En el cas del Gd-DTPA no s'han pogut dur a terme els assaigs de l'LDH i de l'MTT, ja que per sobre de 10 mM causaven interferències.



**Figura 3.9** Corbes de viabilitat i mortalitat d'un cultiu cel·lular C6 en presència de Fe<sub>8</sub> durant 72 hores d'incubació a 310 K. On a) assaig FDA/PI; b) assaig LDH; c) assaig MTT; d) assaig neutral red

**Taula 3.3** Valors d'LC<sub>50</sub> obtinguts després del tractament amb l'agent de contrast durant 72 hores a 310 K

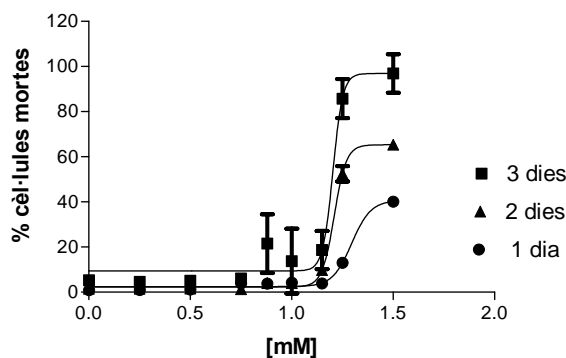
Assaigs	LC <sub>50</sub>	
	Fe <sub>8</sub> (mM)	Gd-DTPA (mM)
FDA / PI	1.09 ± 0.024	31.58 ± 0.009
LDH	1.20 ± 0.007	no determinat
MTT	1.09 ± 0.024	no determinat
Neutral red	1.11 ± 0.014	30.43 ± 0.005

Tal com es pot veure a la taula 3.3, en el cas del Fe<sub>8</sub> l'LC<sub>50</sub> té un valor aproximat d'1.1 mM; en canvi, en el cas del Gd-DTPA és de 30.7 mM. Cal tenir en compte que s'han dut a terme incubacions de 72 hores a fi de calcular l'LC<sub>50</sub>, perquè el 100% de mortalitat no es donava per temps d'incubació més curts. A continuació es mostren els resultats obtinguts a temps d'incubació més curts.

### Experiments a un i dos dies:

Com s'ha comentat anteriorment, per avaluar el valor LC<sub>50</sub> s'han dut a terme incubacions a 72 hores, però el temps de permanència d'un agent de contrast in vivo és aproximadament de menys de dues hores; per tant, també s'han estudiat els efectes tòxics del Fe<sub>8</sub> a temps d'incubació més petits.

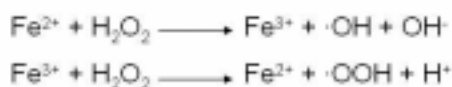
Quan es tracta un cultiu cel·lular amb Fe<sub>8</sub> durant una hora no hi ha mort cel·lular apreciable. A continuació es presenten els resultats obtinguts per a tres cultius tractats amb Fe<sub>8</sub> 1mM i incubats durant diferents períodes: 1, 2 i 3 dies (vegeu la figura 3.10). L'estudi s'ha dut a terme per als quatre assaigs, però aquí només es presenten els resultats obtinguts en l'assaig LDH. Els resultats d'aquest apartat mostren certa toxicitat del compost Fe<sub>8</sub> a partir d'una concentració d'1 mM i temps d'incubació de més de dos dies.



**Figura 3.10** Assaig LDH en tres cultius cel·lulars amb tres períodes d'incubació diferents: 1, 2 i 3 dies

Tot i que l'interval de concentracions mèdiques per diagnosi acostuma a ser més baix, així com els temps d'incubació, es va intentar esbrinar la causa de la toxicitat per part del Fe<sub>8</sub>. Primerament es va estudiar la possible existència d'ions Fe<sup>3+</sup> lliures que provocarien l'existència de peròxids; després, per raó que és un compost amb una càrrega positiva gran, es van fer mesures d'osmosi. Finalment, es va procedir a veure si la mort era de tipus necròtica o de tipus apoptòtica.

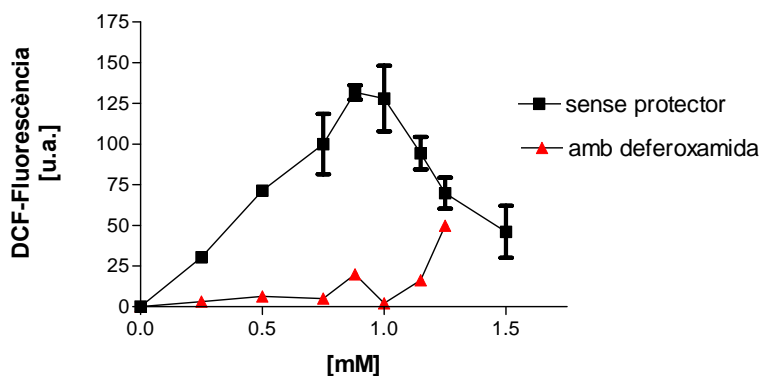
**Estudi de l'activitat oxidativa intracel·lular:** la presència d'ions de Fe intracel·lulars pot generar l'aparició de peròxids que poden danyar la cèl·lula, segons la reacció de Fenton (vegeu la figura 3.11).



**Figura 3.11** Esquema de la reacció de Fenton

La presència d'aquests peròxids es pot detectar amb el reactiu, DCFH-DA, una molècula no fluorescent que pot entrar lliurement dintre de la cèl·lula. Les estereases intracel·lulars trenquen els grups DA, i els grups DCFH, sensibles a l'oxidació per compostos oxidatius, emeten fluorescència quan passen a DCF. S'hi va afegir una solució salina d'HEPES de 10  $\mu\text{M}$  de DCFH-DA a un cultiu cel·lular en plaques de 96 pous i es van incubar durant 20 minuts a 310 K. A continuació es va canviar el medi per medi fresc i es va mesurar la fluorescència basal a dues longituds d'ona, a 485 nm d'excitació i a 530 nm d'emissió. A continuació es va canviar el medi per les solucions dels agents de contrast i es van incubar a 310 K durant una hora. Finalment, es va mesurar la fluorescència en presència de les cèl·lules tractades i es va restar la fluorescència basal. Els resultats s'ha expressat en unitats arbitràries<sup>12</sup>. Com a patró es van utilitzar 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$ .

A la figura 3.12 es pot veure que la fluorescència deguda a un increment de l'activitat oxidativa intracel·lular per part dels grups DCF augmenta amb la concentració fins a un valor màxim de  $146 \pm 20.1$  u.a. corresponent a la concentració d'1 mM. Després disminueix. La fluorescència generada en presència de 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  era de  $182 \pm 6.75$  u.a. Els resultats, doncs, evidencien que la molècula de  $\text{Fe}_8$  genera peròxids; a fi de corroborar que la toxicitat del  $\text{Fe}_8$  era deguda a l'activitat oxidativa intracel·lular es va repetir la mesura però en presència d'un quelant de Fe(III), la deferoxamida. A la figura 3.12 es veu que la fluorescència ha disminuït notablement en presència de la deferoxamida. Finalment, es va fer un tractament de  $\text{Fe}_8$  1.15 mM amb 1 mM de deferoxamida i es va estudiar per l'assaig MTT si la toxicitat disminuïa. Els resultats són els següents:  $\text{Fe}_8$  1.15 mM, 6.96%;  $\text{Fe}_8$  1.15 mM amb 1 mM de deferoxamida, 17% (on el percentatge correspon al percentatge de cèl·lules vives).



**Figura 3.12** Estudi de l'activitat intracel·lular en presència en funció de la concentració de  $\text{Fe}_8$ . En els estudis sense protector cada concentració correspon a tres experiments independents; cada punt correspon a un experiment. En els estudis amb deferoxamida, cada punt correspon a un experiment



Per tant, es pot veure que la toxicitat sí que disminueix en presència de deferoxamida, però no es pot assegurar que sigui l'única causa de la toxicitat del Fe<sub>8</sub>, ja que un valor del 17% és molt baix.

**Mesures d'osmolaritat.** Els valors d'osmolaritat del Fe<sub>8</sub> i del Gd-DTPA es van mesurar en medi de cultiu F12 Ham en un osmòmetre Fiske One-Ten fent servir el mètode del punt congelat.

**Taula 3.4** Valors d'osmolaritat en funció de la concentració dels agent de contrast

Agent de contrast	Concentració	Osmolaritat (mOsm/kg)
Fe <sub>8</sub>	0.25	320.1 ± 4.2
Fe <sub>8</sub>	0.5	322.5 ± 0.7
Fe <sub>8</sub>	1	313.5 ± 3.8
Fe <sub>8</sub>	1.25	315.5 ± 2.1
Fe <sub>8</sub>	1.5	325.5 ± 5.0
Gd-DTPA	5	305.5 ± 5.0
Cap	--	318.0 ± 2.6

Tal com es pot observar a la taula 3.4, els valors d'osmolaritat obtinguts a les diferents solucions de Fe<sub>8</sub> són molt similars i també similars respecte del valor d'osmolaritat obtingut pel medi de cultiu; per tant, sembla que els efectes tòxics del Fe<sub>8</sub> no siguin causa d'un xoc osmòtic.

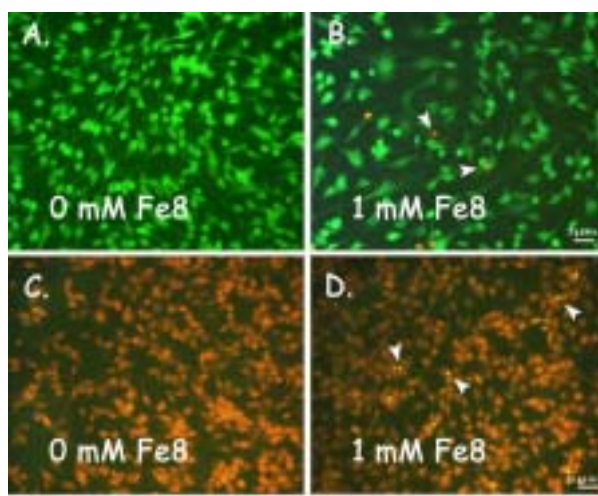
**Detecció de l'apoptosi.** Amb la mort neuronal, les cèl·lules nervioses poden mostrar una aparença necròtica o apoptòtica. Necrosi i apoptosi són termes que defineixen, mitjançant criteris morfològics, l'aspecte que presenta una cèl·lula després de la seva mort. El terme **necrosi** es refereix a una mort cel·lular causada per un dany sever en el qual la cèl·lula queda ràpidament incapacitada per mantenir l'homeòstasi. Durant el procés necròtic, la membrana plasmàtica perd la seva capacitat per regular la pressió osmòtica a causa de la qual les cèl·lules i els orgànuls intracel·lulars s'inflen i es trenquen i, finalment, la cèl·lula es lisa abocant el seu contingut a l'espai extracel·lular; d'aquesta manera es provoca una resposta inflamatòria. La necrosi, in vivo, s'associa freqüentment a una extensa lesió tissular i a una resposta inflamatòria significativa.

El terme **apoptosi** fa referència a una mort cel·lular discreta i subtil, en contraposició a la necrosi. L'apoptosi és un procés controlat mitjançant el qual la cèl·lula activa una sèrie de mecanismes que desencadenen en la seva pròpia autodestrucció d'una forma discreta, programada i seqüencial. Els canvis més

característics observats en una cèl·lula són la formació de protuberàncies en la membrana plasmàtica, la reducció de la mida cel·lular, la condensació de la cromatina, la degradació del DNA, la desintegració de la membrana nuclear i la fragmentació de la cèl·lula en els anomenats cossos apoptòtics en els quals diferents components cel·lulars es troben envoltats i segellats per una membrana plasmàtica, la qual no permet que surti res a l'exterior<sup>13</sup>.

Amb la finalitat de conèixer si en el nostre cas el tipus de mort és apoptòtica s'ha fet servir un kit de detecció apoptòtica per fluorescència (Tunel). Aquest mètode està dissenyat per detectar específicament i quantificar les cèl·lules apoptòtiques entre un cultiu cel·lular. Aquest sistema no és radioactiu i mesura la fragmentació nuclear del DNA a través de l'actuació d'endonucleases endògenes, una important característica de la mort apoptòtica. El DNA de les cèl·lules apoptòtiques és fragmentat entre 180–200 parells de bases, el mètode consisteix en la incorporació del fragment fluorescent-12-dUTP a l'extrem 3'-OH dels fragments de DNA utilitzant l'enzim deoxinucleotid terminal transferasa (TdT), el qual forma una cadena polimèrica a partir del principi del tunel assaig. Després es podrà veure pel microscopi de fluorescència.

A la figura 3.13 s'observen quatre imatges corresponents al control i a un tractament de Fe<sub>8</sub> 1 mM d'un dia a 310 K. Les imatges a) i b) corresponen a l'assaig FDA / PI, on els resultats són coherents amb els obtinguts anteriorment, i les imatges c) i d) corresponen a l'assaig Tunel. A la imatge d) es veu que hi ha cèl·lules que han donat positiu; per tant, el seu mecanisme de mort és de tipus apoptòtic. Si es comparen les imatges b) i d) es pot concloure que el % de mort cel·lular és molt semblant i que, per tant, sembla que el mecanisme de toxicitat causat pel Fe<sub>8</sub> és de tipus apoptòtic.



**Figura 3.13** Imatges de cèl·lules tractades durant 24 hores; a), b) assaig FDA; c), d) detecció apoptòtica per efecte Tunel, on les fletxes assenyalen mort cel·lular apoptòtica

### 3.4 Conclusions

Bàsicament, el disseny de nous agents de contrast es basa en contrastos de Gd(III), perquè el Gd presenta un moment magnètic alt i un temps de relaxació electrònic molt llarg a causa de la seva configuració electrònica, la qual facilita la relaxació dels nuclis d'H-1 d'una manera molt eficient<sup>14</sup>. El Mn(II) i el Fe(III) també presenten un temps de relaxació electrònic llarg, així com un alt moment magnètic. La gran majoria d'agents de contrast de Fe(III) són agents de contrast tipus II<sup>6,15</sup>. Segons la bibliografia hi ha una família de compostos mononuclears de Fe(III) que han estat avaluats com a agents de contrast<sup>16,17</sup>, però fins ara no s'ha descrit cap compost polinuclear de Fe(III) com a agent de contrast. El complex Fe<sub>8</sub>, amb un mida aproximada d'1.5 nm, presenta els avantatges següents: presenta una mida intermèdia entre els complexos de Gd-DTPA (0.1 nm) i els agents de contrast tipus *pool* sanguinis (1 nm) i les partícules d'òxid de ferro (20 nm); a diferència de les partícules d'òxid de ferro, el fet de tractar-se d'un compost molecular fa que la mida de la partícula sigui homogènia; el fet de tenir vuit ions Fe(III) provoca que hi hagi molts centres de relaxació en una mateixa molècula.

Tal com es veia a la figura 2.1, el complex no presenta cap molècula d'aigua coordinada per la qual cosa cal pensar que el mecanisme de relaxació sigui d'esfera externa, a diferència del Gd-DTPA, que té una aigua coordinada i el mecanisme és d'esfera interna. Segons les mesures de relaxació fetes a 9.4 T i a 1.41 T es veu que el Fe<sub>8</sub> té un comportament molt similar al del Gd-DTPA, és a dir, fa d'agent de contrast tipus I. Aquest comportament es reafirma a l'enregistrar les imatges potenciades en T<sub>1</sub>. També cal destacar que les mesures de relaxació són estables amb el temps.

En aquest treball s'han desenvolupat mesures de toxicitat *in vitro* en una línia cel·lular de glioma de rata. Els resultats mostren un valor d'LC<sub>50</sub> més elevat per al Fe<sub>8</sub> que per al Gd-DTPA en un període d'incubació de 72 hores, però en períodes inferiors a 24 hores no es van detectar efectes tòxics per sota de la concentració d'1 mM. A fi de trobar una possible causa d'aquesta toxicitat es va estudiar la generació de radicals oxidatius. S'ha vist que realment hi ha un augment de l'activitat oxidativa intracel·lular a mesura que augmenta la concentració de Fe<sub>8</sub>. La generació de peròxids en presència d'ions metàl·lics es dona a partir de la reacció de Fenton, la qual cosa suposaria l'existència d'ions Fe<sup>3+</sup> lliures i per tant un trencament de la molècula en solució. Per intentar donar una explicació a aquests resultats es va decidir estudiar el comportament

del Fe<sub>8</sub> en solució a partir de mesures espectroscòpiques i magnètiques, que es comentaran en el capítol següent.

### Bibliografia del capítol 3

- <sup>1</sup> PCT/ESO 3/00190. Molins E., Roig A., Rodríguez E. Complejos polimetálicos como agentes de contraste para su uso en resonancia magnética nuclear. Consejo de Investigaciones Científicas. Abril. **2003**.
- <sup>2</sup> Rodríguez E., Roig A., Molins E., Arús C., Quintero M.R., Cabañas M., Cerdán S., López-Larrubia P., Sanfeliu C. In vitro characterisation of an Fe<sub>8</sub> cluster as potential MRI contrast agent. *NMR Biomed.* **2005**, *18*, 1-8.
- <sup>3</sup> Rinck P. A., Muller R. N. Field strength and dose dependence of contrast enhancement by gadolinium-based MR contrast agent. *Eur. Radiol.* **1999**, *9*, 998-1004.
- <sup>4</sup> Chen J., Mao X., Ye Ch. Intensity Jumping and Beating in Inversion-Recovery Experiments of Water Due to Radiation Damping. *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 490-494.
- <sup>5</sup> Mao X., Guo J., Ye Ch. Radiation damping effects on spin-lattice relaxation time measurements. *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *222*, 417-421.
- <sup>6</sup> Josephson L., Lewis J., Jacobs P., Hahn P. F., Stark D. D. The effects of iron oxides on proton relaxivity. *Magn. Reson. Imag.* **1988**, *6*, 647-653.
- <sup>7</sup> Merbach A. E., Tóth E., Helm T. Relaxivity of Gadolinium (III) Complexes: Theory and Mechanism. In: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Resonance Imaging*. Merbach A., Tóth E., (eds). Chichester: Willey-VCH Verlag, **2001**, 46-119.
- <sup>8</sup> Keihoff G., Wolf G. Comparison of double fluorescence staining and LDH-test for monitoring cell viability in vitro. *Neuroreport.* **1993**, *5*, 129-132.
- <sup>9</sup> Bergmeyer H. U., Bernt E., Hess B. Lactate dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer H. U., (ed). New York: Academic Press, **1965**, 736-743.
- <sup>10</sup> Hansen M B., Nielsen S. E., Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.* **1989**, *119*, 203-210.
- <sup>11</sup> Babich H., Borenfreund E. Cytotoxic effects of food additives and pharmaceuticals on cells culture as determined with the neutral red assay. *J. Pharm. Sci.* **1990**, *79*, 592-594.
- <sup>12</sup> LeBel C. P., Ali S. F., Mckee M., Bondy S.C. Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1990**, *104*, 17-24.
- <sup>13</sup> Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* **1995**, *267*, 1445.

- <sup>14</sup> Aime S., Frullano L., Geninatti S. Compartmentalization of a gadolinium on proton relaxivity *Magn. Reson. Imaging* **1998**, *6*, 647-653.
- <sup>15</sup> Colet J. M., Piérart C., Seghi F., Gabric I., Muller R. N. Intravascular and intracellular hepatic relaxivities of superparamagnetic particles: An isolated and perfused organ pharmacokinetics study. *J. Magn. Reson.* **1998**, *134*, 199-205.
- <sup>16</sup> Chen J. W., Belford R. L., Clarkson R. B. Second-Sphere and Outer-Sphere Proton Relaxation of Paramagnetic Complexes: From EPR to NMRD. *J. Phys. Chem. A.* **1998**, *102*, 2117-2130.
- <sup>17</sup> Richardson N., Davies J. A., Radüchel B. Iron(III)-based contrast agents for magnetic resonance imaging. *Polyhedron.* **1999**, *18*, 2457-2482.

## **4 | Estudi del comportament del Fe<sub>8</sub> en solució**

---

### **4.1 Caracterització del Fe<sub>8</sub> en solució aquosa**

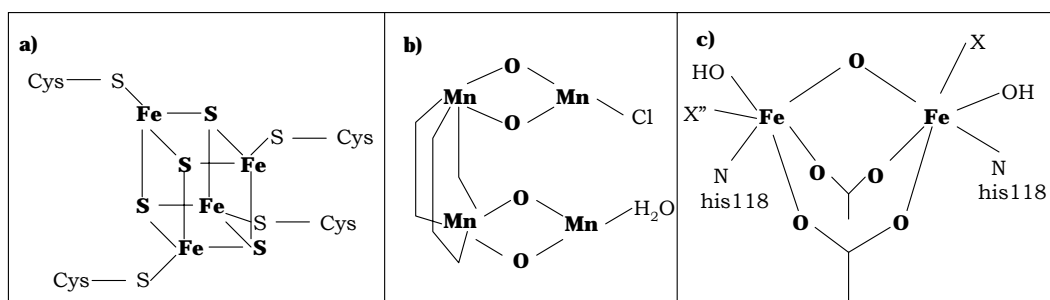
### **4.2 Caracterització del Fe<sub>8</sub> en solucions fosfatades**

### **4.3 Conclusions**

Tal com es va comentar en el tercer capítol, es va sospitar de l'existència d'ions Fe<sup>3+</sup> lliures en estudiar l'activitat intracel·lular oxidativa com a possible causa de toxicitat del Fe<sub>8</sub>, ja que, segons la reacció de Fenton, la presència d'ions Fe<sup>3+</sup> pot generar l'aparició de peròxids que poden danyar la cèl·lula. Aquest resultat evidenciava un trencament de la molècula de Fe<sub>8</sub> en solució. El quart capítol descriu l'estudi del comportament de la molècula de Fe<sub>8</sub> en solució fent servir tècniques espectroscòpiques i magnètiques. La primera part d'aquest capítol consisteix en una extensa caracterització del Fe<sub>8</sub> en solució aquosa, atès que és l'únic solvent on el Fe<sub>8</sub> és soluble. La segona part del capítol descriu la caracterització del sistema en la solució tampó fosfatada PBS, degut al paper actiu dels grups fosfats presents en el PBS, en la interacció amb el Fe<sub>8</sub>. En aquest capítol no es farà la descripció dels fonaments de les tècniques emprades, ja que a l'annex 1 es fa una breu descripció de cada tècnica instrumental.

## 4.1 Caracterització del Fe<sub>8</sub> en solució aquosa

En bioinorgànica els sistemes polinuclears metàl·lics han estat molt estudiats perquè molts d'aquests compostos es poden utilitzar com a models de centres actius presents en sistemes biològics, com per exemple: el complex de valència mixta Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> present en les ferredoxines<sup>1</sup>, els compostos polinuclears de Mn en el fotosistema II<sup>2</sup> o les partícules d'òxid de ferro (III) presents en la ferritina<sup>3</sup>, que és el magatzem biològic de ferro (vegeu la figura 4.1).



**Figura 4.1** Esquema de tres sistemes polinuclears metàl·lics presents en sistemes biològics; a) Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> en la ferredoxina; b) complex S<sub>0</sub> del fotosistema II; c) enzim ribonucleasa reductasa

També hi ha una gran família d'enzims en els quals l'estructura dels seus centres actius s'ha vist que es basa en compostos dinuclears de Fe(III) units entre ells per ponts oxo, com per exemple l'enzim ribonucleasa<sup>4</sup> (vegeu la figura 4.1 c)). A fi de modelar el comportament d'aquests enzims s'han sintetitzat molt compostos basats en estructures di- i polinuclears de Fe(III) units entre ells per



ponts oxo- i/o hidroxoo-. Aquests compostos han estat caracteritzats mitjançant tècniques espectroscòpiques i magnètiques. La gran majoria d'aquests compostos presenten una alta estabilitat en solució aquosa per raó de la forta estabilitat de l'enllaç Fe-O-Fe<sup>5</sup>.

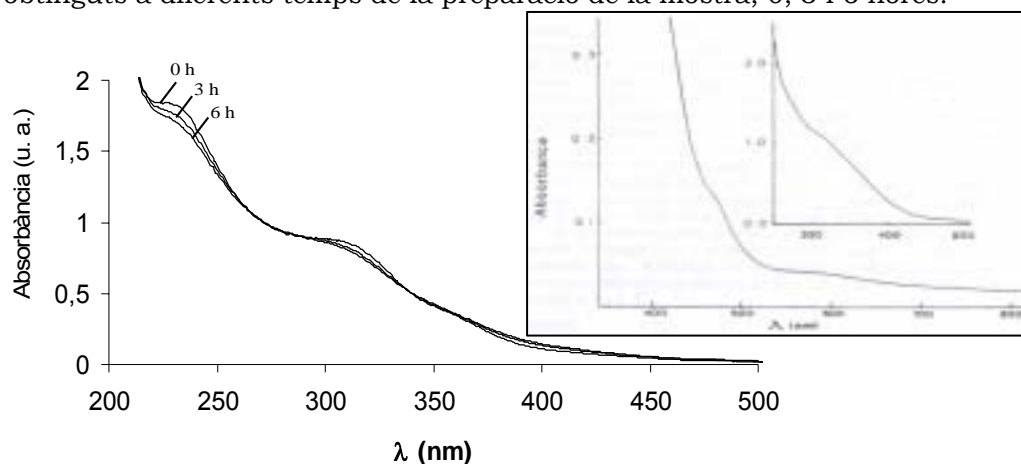
En el cas de la molècula de Fe<sub>8</sub> l'extensa caracterització que s'ha dut a terme fins ara s'ha centrat en l'estudi de les propietats magnètiques a ultra baixa temperatura perquè la molècula de Fe<sub>8</sub> presenta efecte túnel del moment magnètic<sup>6</sup>, però només un treball molt recent sobre el comportament de la molècula de Fe<sub>8</sub> en aigua ha estat publicat<sup>7</sup>. Un dels problemes a l'hora de fer mesures en solució és que el senyal obtingut és de baixa intensitat ja que el compost està diluït. En el cas del Fe<sub>8</sub> aquest problema s'accentua més perquè el Fe<sub>8</sub> és un compost poc soluble en solució aquosa i insoluble en la resta de solvents.

D'aquí en endavant s'exposaran els resultats obtinguts de les mesures del Fe<sub>8</sub> en solució aquosa, Fe<sub>8(aq)</sub> i, per tal de poder comparar els resultats paral·lelament s'ha mesurat el Fe<sub>8</sub> en pols microcristal·lina, Fe<sub>8(s)</sub>.

#### 4.1.1 Mesures espectroscòpiques

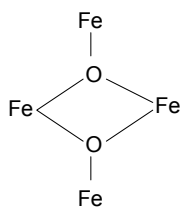
##### Espectroscòpia ultraviolat-visible (UV-Vis)

S'han mesurat els espectres UV-Vis de les solucions Fe<sub>8(aq)</sub> en un espectròmetre Varian Cary E. Les solucions Fe<sub>8(aq)</sub> s'han fet dissolent 2 mg de Fe<sub>8</sub> en 1 ml d'aigua, que equival a una concentració d'1 mM i s'ha obtingut una solució transparent de color marró. A la figura 4.2 es poden veure els espectres UV-Vis obtinguts a diferents temps de la preparació de la mostra, 0, 3 i 6 hores.



**Figura 4.2** Espectre UV-Vis del Fe<sub>8(aq)</sub> a 298 K. Els espectres es van enregistrar cada tres hores. La figura inserida correspon a l'espectre UV-Vis pel compost [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>(BICOH)<sub>2</sub>(BICO)<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CPh)<sub>4</sub>]Cl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O·2·CH<sub>3</sub>CN, on BICOH = bis(*N*-metilimidazol-2-il)carbinol, extret de la referència 8.

Tots tres espectres presenten tres bandes molt dèbils a 230 nm, 300 nm i 410 nm. Altres compostos que contenen la unitat Fe-O-Fe presenten intenses bandes en la regió de l'UV, 320-380 nm, i bandes de menys intensitat en la regió del visible, 430-550 nm<sup>9</sup>. Fent una cerca bibliogràfica es va trobar que compostos tipus papallona<sup>8,10,11</sup>, és a dir, amb la unitat {Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>}<sup>8+</sup>, present també en la molècula del Fe<sub>8</sub> (vegeu la figura 4.3), com per exemple el complex [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>(BICOH)<sub>2</sub>(BICO)<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CPh)<sub>4</sub>]Cl<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O·2·CH<sub>3</sub>CN, on BICOH = bis(*N*-metilimidazol-2-il)carbinol, presenten espectres UV molt semblants a l'obtingut pel Fe<sub>8(aq)</sub> (vegeu la figura inserida 4.2).



**Figura 4.3** Esquema de l'estructura papallona present en molts compostos de Fe(III)

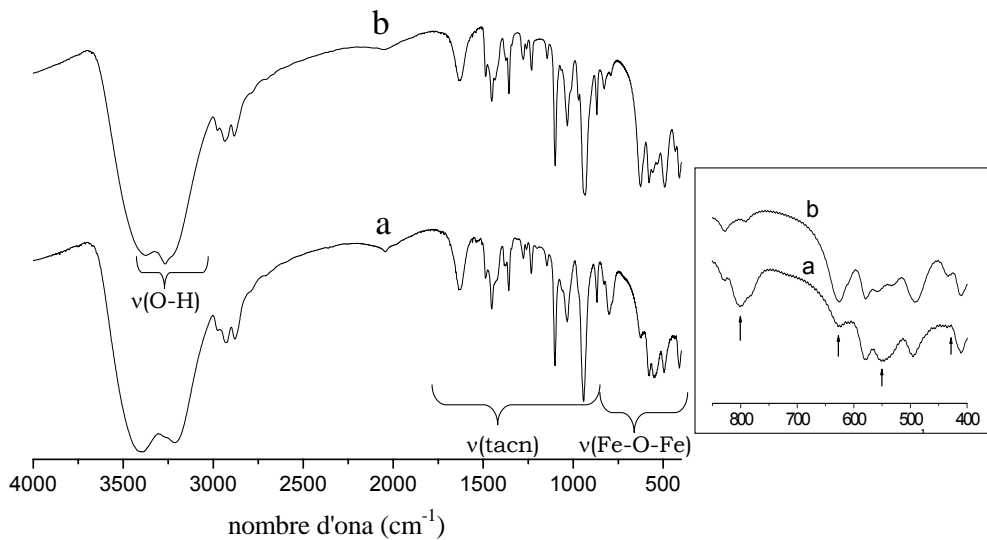
Però tal com es pot veure a la figura 4.2 quan l'espectre, per la mateixa mostra de Fe<sub>8(aq)</sub>, s'enregistra en iguals condicions però en diferents períodes de temps, cada 3 hores, es veu que hi ha una disminució de les intensitats de les bandes. Cal destacar que no es va observar cap precipitat, ni cap canvi en el color de la solució durant el temps de mesura. D'aquesta mesura haurem de concloure que l'espectre UV-Vis és semblant a espectres de compostos estructuralment similars, però l'evolució temporal del senyal indica la inestabilitat del compost en solució.

### Espectroscòpia d'infraroig (IR)

Els espectres d'infraroig (4000–400 cm<sup>-1</sup>) s'han enregistrat en un espectròmetre Perkin Elmer en pastilles de KBr. Per mesurar les solucions Fe<sub>8(aq)</sub> es van dissoldre 2 mg de Fe<sub>8</sub> en 1 ml d'aigua i la solució es va liofilitzar, és a dir, primerament es congela la solució i després s'elimina el gel per sublimació, fins a obtenir una pols de color verd.

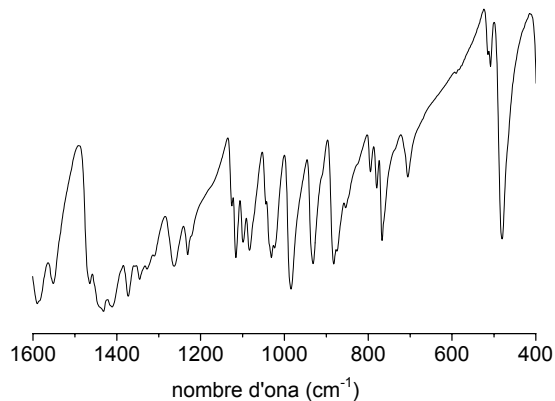
A la figura 4.4 es poden veure els espectres del Fe<sub>8(aq)</sub> liofilitzat i el del Fe<sub>8(s)</sub>. A freqüències més grans de 800 cm<sup>-1</sup> no s'observen grans diferències entre els dos espectres, excepte a la regió entre 3000-3500 cm<sup>-1</sup>, regió on es troben les vibracions O-H. On sí que s'observen importants diferències entre tots dos espectres és per sota de 800 cm<sup>-1</sup>, regió on són presents les vibracions Fe-O-Fe. A la figura inserida 4.4 es pot veure aquesta regió més ampliada, s'han assenyalat les diferències entre tots dos espectres amb una fletxa. Es pot veure

que hi ha bandes, respecte a l'espectre del  $\text{Fe}_{8(s)}$  que han desaparegut i altres que han aparegut en l'espectre del  $\text{Fe}_{8(aq)}$ . Per als compostos papallona, l'estirament simètric (Fe-O-Fe) es dóna entre 540 i 340  $\text{cm}^{-1}$ , i l'estirament asimètric es dóna entre 885 i 725  $\text{cm}^{-1}$ . Per tant, les bandes que s'han modificat són les corresponents a l'enllaç Fe-O-Fe<sup>9</sup>.



**Figura 4.4** Espectres d'IR: a)  $\text{Fe}_{8(aq)}$  i b)  $\text{Fe}_{8(s)}$ . Les fletxes assenyalen les diferències entre tots dos espectres

A la figura 4.5 es presenta l'espectre infraroig de l'amina tacn lliure. Si es compara amb l'espectre del  $\text{Fe}_{8(s)}$  es pot veure que les bandes degudes a les vibracions de l'amina es troben majoritàriament a partir de 800  $\text{cm}^{-1}$ , la qual cosa indica que en l'espectre del  $\text{Fe}_{8(aq)}$  l'amina s'hi troba present. En conclusió, no s'observen grans diferències entre els dos espectres d'IR, i les diferències es concentren a la regió de baixes freqüències, a la regió on són presents les vibracions Fe-O-Fe.



**Figura 4.5** Espectre d'IR de l'amina tacn

Spool *et al.*<sup>12</sup> van estudiar la integritat del compost dinuclear [Fe<sub>2</sub>O(O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(tacn)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> en solució aquosa fent servir espectroscòpia d'infraroig. Igual que en el nostre estudi, van liofilitzar la solució del compost dinuclear dissolt en aigua i van enregistrar l'espectre IR, després van comparar-lo amb l'espectre IR del compost dinuclear sòlid i no van observar grans diferències entre dos espectres; això els va suggerir que el compost era estable. Però es van adonar que després d'una nit, la solució es feia tèrbola i precipitava un compost, no identificable, d'on van concloure la descomposició del compost dinuclear en solució. En el nostre cas la solució no es va enterbolir ni es va observar cap precipitat, tot i així es va decidir de fer un estudi més profund per poder extreure'n conclusions. Com que una part important de la caracterització del Fe<sub>8</sub> en pols s'havia basat en l'estudi de les seves propietats magnètiques es van portar a terme mesures magnètiques en solució; com que les interaccions intermoleculares entre unitats de Fe<sub>8</sub> dins del cristall són negligibles, les mesures magnètiques obtingudes per Fe<sub>8(aq)</sub> podran ser comparables amb aquelles obtingudes pel Fe<sub>8(s)</sub><sup>13</sup>.

### 4.1.2 Mesures magnètiques

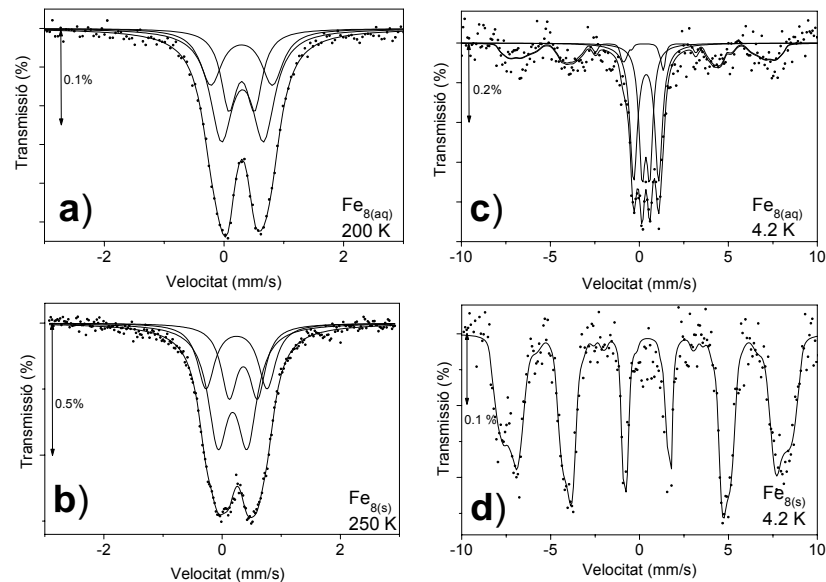
#### Espectroscòpia Mössbauer

Els espectres Mössbauer de les mostres Fe<sub>8(s)</sub> i Fe<sub>8(aq)</sub> es van enregistrar a 200 i 4.2 K amb un espectròmetre convencional de transmissió utilitzant una font de <sup>57</sup>Co en una matriu Rh.

Per tal d'obtenir un senyal prou intens al Mössbauer es va preparar Fe<sub>8</sub> a partir de <sup>57</sup>Fe (vegeu l'annex 1). La mostra de Fe<sub>8(aq)</sub> es va preparar a partir d'una solució de 10 mg de <sup>57</sup>Fe<sub>8</sub> en 1 ml d'aigua. Aquesta solució és cinc vegades més concentrada de ferro que les utilitzades en les altres tècniques espectroscòpiques per tenir senyal suficient.

A la figura 4.6 s'hi poden veure els espectres enregistrats per totes dues mostres. Els espectres i els paràmetres hiperfins pel Fe<sub>8(s)</sub> són molt similars als publicats en treballs anteriors<sup>13</sup> (Figura 4.6 b i d). Els espectres s'ajusten fent servir tres subespectres corresponents als tres entorns diferenciats dels àtoms de Fe<sup>3+</sup> amb una relació d'àrees 1:1:2 (dos àtoms en la posició Fe<sup>3+1</sup>, dos àtoms en la posició Fe<sup>3+4</sup>, quatre àtoms en la posició Fe<sup>3+2</sup>, Fe<sup>3+3</sup>), (vegeu la figura 2.4). L'espectre de la mostra Fe<sub>8(aq)</sub> a 200 K (figura 4.6 a) consisteix en un doblet ample, gairebé simètric que també potser ajustat a tres subespectres. Si es comparen els espectres per al Fe<sub>8(aq)</sub> a 200 K i per al Fe<sub>8(s)</sub> a 250 K (figura 4.6 b) no s'observen

grans diferències, però els paràmetres hiperfins d'aquets tres subespectres són molt diferents entre ambdues mostres. A 4 K és on les diferències entre els espectres del Fe<sub>8(s)</sub> i del Fe<sub>8(aq)</sub> són més notables; l'espectre Fe<sub>8(aq)</sub> pot ser ajustat amb tres subespectres; dos doblets simètrics i un sextet que representa al voltant del 30% de l'àrea total de l'espectre. El sextet que s'observa en el Fe<sub>8(aq)</sub> té uns paràmetres hiperfins que són compatibles amb una espècie polimèrica poc cristal·lina semblant al gel de Fe(OH)<sub>3</sub>·0.9H<sub>2</sub>O<sup>14</sup>. Això apuntaria que hi haguessin partícules nanomètriques d'aquesta fase suspeses col·loïdalment. Al contrari, l'espectre corresponent al Fe<sub>8(s)</sub> mostra només un sextet de bandes amples cosa que indica que tots els spins es troben congelats en un estat col·lectiu; no hi ha cap component paramagnètic perquè no s'observa cap doblet o singlet en l'espectre. El sextet es pot ajustar fent servir tres subespectres corresponents als tres entorns diferents dels àtoms de Fe en la molècula de Fe<sub>8</sub>.



**Figura 4.6** Espectres Mössbauer per al Fe<sub>8(aq)</sub> i per al Fe<sub>8(s)</sub>; a) i c) corresponen al Fe<sub>8(aq)</sub> a 200 K i a 4.2 K respectivament; b) i d) corresponen al Fe<sub>8(s)</sub> a 200 K i a 4.2 K respectivament

En conclusió, els resultats obtinguts a partir de l'espectroscòpia Mössbauer del Fe<sub>8(aq)</sub> suggereixen l'existència de diferents entorns per als ions Fe: (i) espècies iòniques de Fe<sup>3+</sup> paramagnètiques i (ii) partícules col·loïdals d'hidroxid de ferro (III) on el moment magnètic resultant es trobaria congelat en un estat col·lectiu i, per tant, s'observarà un sextet a l'espectre Mössbauer.

### Mètode Evans

En molts treballs, a fi d'estudiar la integritat de la unitat Fe-O-Fe en solució aquosa, s'utilitza el mètode Evans<sup>15</sup>. El mètode Evans es basa en la capacitat que té un compost paramagnètic per modificar el senyal d'RMN dels nuclis

presentes en la solució. En un tub d'RMN de 5 mm s'introdueix el compost paramagnètic dissolt en aigua deuterada; dintre del tub s'introdueix un capil·lar també amb aigua deuterada. A continuació s'hi afegeix un 5% de tert-BuOH a totes dues solucions. Si ara s'enregistra l'espectre d'RMN d'H-1 s'observaran dos senyals deguts al tert-BuOH, un senyal que prové del capil·lar i l'altre del tert-BuOH que està en contacte amb el compost paramagnètic (vegeu la figura 4.7).

La diferència entre tots dos senyals, expressada en ppm, serà proporcional a la susceptibilitat magnètica,  $\chi_g$  del compost paramagnètic segons la relació següent:

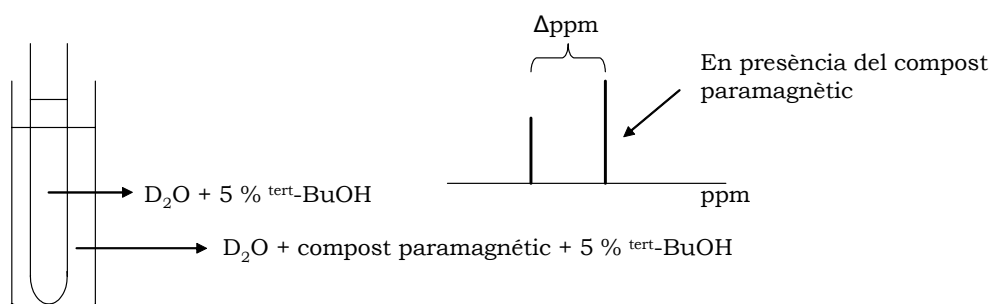
$$\chi_g = \frac{3}{4\pi c} \Delta\text{ppm} \quad (\text{eq. 4.1})$$

on  $c$  és la concentració del compost paramagnètic en g/ml;  $\Delta\text{ppm}$  és la diferència entre tots dos senyals.

La relació entre la susceptibilitat i el moment magnètic és la següent:

$$\mu = 2.84(\chi_{\text{mol}}IT)^{1/2} \quad (\text{eq. 4.2})$$

Aleshores, coneixent la concentració del compost es pot calcular el valor de la susceptibilitat magnètica i comparar-lo amb el valor de susceptibilitat obtinguda amb una balança magnètica per a una mostra en pols. Quan els dos valors de susceptibilitat magnètica són iguals es confirmaria la integritat de la molècula en solució<sup>5</sup>. Alternativament el mètode es fa servir per conèixer la concentració d'entitats paramagnètiques mononuclears en solució a partir dels  $\mu$  per als diferents metalls.



**Figura 4.7** Esquema del mètode Evans

En el nostre cas, es va estudiar l'estabilitat del Fe<sub>8</sub> fent servir el mètode Evans, per això es va preparar una dissolució de 5 mg de Fe<sub>8</sub> en 1 ml d'aigua deuterada. A continuació es va introduir el capil·lar amb D<sub>2</sub>O i a totes dues solucions es va afegir un 5% de tert-BuOH. Finalment es va enregistrar l'espectre d'H-1 a 7.05T i

a temperatura ambient i es van observar dos senyals separats  $\Delta\text{ppm} = 0.49$  ppm: com que la concentració del Fe<sub>8</sub> en el tub era de 5 mg/ml es va calcular una susceptibilitat magnètica pel Fe<sub>8(aq)</sub> de  **$2.9 \cdot 10^{-5}$  emu/g** a T = 300 K. D'una altra banda es va mesurar la susceptibilitat magnètica per al Fe<sub>8(s)</sub> en un magnetòmetre PPMS, va resultar un valor de  **$2.3 \cdot 10^{-5}$  emu/gOe** a una temperatura de T = 250 K. Tal com es pot veure els dos valors obtinguts no són massa diferents, però hi ha una diferència suficient per fer-nos reconsiderar l'adequació del mètode Evans com un bon mètode per estudiar sistemes amb més d'un àtom metàl·lic ja que el valor de susceptibilitat magnètica obtingut a temperatura ambient pel mètode Evans és un valor que no indica el tipus d'acoblament entre els àtoms de Fe(III) i, per tant una reorganització en la molècula de Fe<sub>8</sub> també donaria el mateix valor.

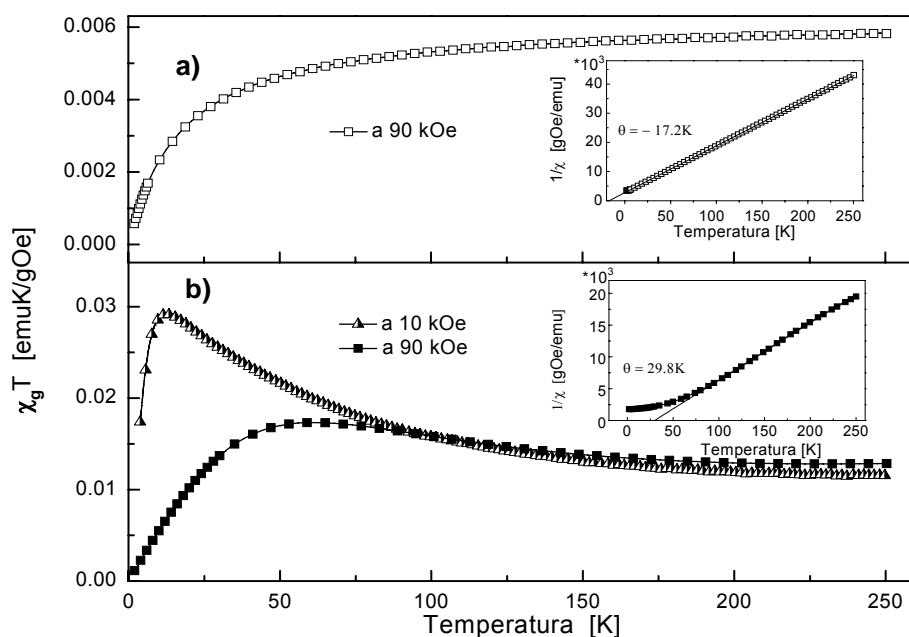
### Mesures magnètiques

Les mesures magnètiques per al Fe<sub>8(aq)</sub> i per al Fe<sub>8(s)</sub> es van obtenir en un magnetòmetre de vibració, VSM (Oxford Instruments Ltd.) i en un magnetòmetre PPMS (Quantum Design). La mostra en solució, Fe<sub>8(aq)</sub>, es va preparar dissolent 10 mg de Fe<sub>8</sub> en 1 ml d'aigua, la mateixa concentració utilitzada en l'espectroscòpia Mössbauer. Les dades magnètiques obtingudes s'han expressat en emu per gram de Fe<sub>8</sub> i la component diamagnètica deguda a l'aigua i al contenidor ha estat corregida (vegeu l'annex 1).

A la figura 4.8 es pot veure la dependència del producte de la susceptibilitat-temperatura,  $\chi_g T$ , amb la temperatura per al Fe<sub>8(aq)</sub> (figura 4.8 a) i per al Fe<sub>8(s)</sub> (figura 4.8 b) a 90 kOe i a 10 kOe. Va caldre treballar a camps magnètics elevats a causa del poc senyal magnètic obtingut en el cas del Fe<sub>8(aq)</sub>. En el cas del Fe<sub>8(s)</sub> també s'ha mesurat la dependència de  $\chi_g T$  amb T a 10 kOe, ja que el compost sòlid té un valor de susceptibilitat alt a camps baixos.

Tal com es pot observar el comportament de la susceptibilitat magnètica amb la temperatura és diferent per al Fe<sub>8(aq)</sub> i per al Fe<sub>8(s)</sub>. Per al Fe<sub>8(aq)</sub> el valor de  $\chi_g T$  es manté constant amb un valor de  $\sim 0.006$  emuK/gOe fins a 100 K i a continuació disminueix amb la temperatura; per tant, es tracta d'un acoblament antiferromagnètic entre els ions de Fe. Aquest comportament també es veu a partir de la representació de la inversa de la susceptibilitat amb la temperatura (vegeu la figura inserida 4.8 a), on el Fe<sub>8(aq)</sub> segueix la llei de Curie-Weiss, amb una constant de Curie-Weiss,  $\theta$ , igual a  $-17.2$  K i un moment magnètic de  $10.6 \pm 0.5 \mu_B$ . En canvi, la dependència de  $\chi_g T$  amb la temperatura per al Fe<sub>8(s)</sub> consisteix en un valor constant a altes temperatures, llavors  $\chi_g T$  augmenta en

disminuir la temperatura fins a arribar a un màxim i a continuació el valor de  $\chi_g T$  disminueix ràpidament. El valor màxim de  $\chi_g T$  depèn del camp magnètic aplicat; així, quan el valor del camp magnètic és de 90 kOe,  $\chi_g T = 0.0175 \text{ emug}^1\text{KOe}^{-1}$  a 62 K, mentre que quan el camp magnètic és de 10 kOe,  $\chi_g T = 0.029 \text{ emug}^{-1}\text{KOe}^{-1}$ . El pic és més pronunciat i amb un valor de  $\chi_g T$  més elevat quan el camp magnètic és de 10 kOe pels efectes de saturació per efecte del camp magnètic elevat. Els resultats obtinguts a un camp magnètic de 10 kOe per al Fe<sub>8(s)</sub> són molt similars a aquells obtinguts per Delfs *et al.*<sup>16</sup>. La corba obtinguda per al Fe<sub>8(s)</sub> indica un acoblament ferrimagnètic entre els ions de Fe(III), resultat que també es veu a partir de la representació de la inversa de la susceptibilitat amb la temperatura, on es compleix la llei de Curie-Weiss amb una  $\theta = 29.8 \text{ K}$  i un moment magnètic de  $13.5 \pm 0.5 \mu_B$ . Per tant, queda palès que el comportament de la susceptibilitat amb la temperatura és molt diferent entre el Fe<sub>8(s)</sub> i el Fe<sub>8(aq)</sub>.

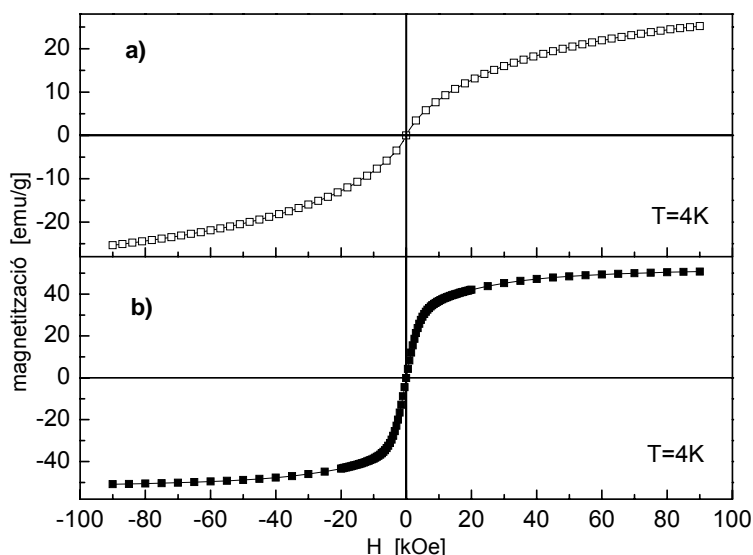


**Figura 4.8** Dependència de la susceptibilitat,  $\chi_g T$ , amb la temperatura mesurada a 90 kOe, per a: a) Fe<sub>8(aq)</sub> i b) Fe<sub>8(s)</sub> mesurat també a 10 kOe. Com a figures inserides es troben representats l'invers de la susceptibilitat respecte a la temperatura a 90 kOe.

Les corbes de magnetització per al Fe<sub>8(aq)</sub> i per al Fe<sub>8(s)</sub> també són molt diferents entre si, com es pot veure a les figures 4.9 (a) i (b) respectivament, enregistrats a 4 K.



En el cas del Fe<sub>8(aq)</sub> el comportament de la magnetització no s'ajusta a la funció de Langevin i no es dona saturació de la magnetització ni a camps magnètics alts; això suggereix la coexistència de diferents espècies en solució. En canvi, per al Fe<sub>8(s)</sub> la magnetització satura fàcilment i s'obté un valor de magnetització de saturació de 20 μ<sub>B</sub>, que correspon a un estat fonamental de S = 10.



**Figura 4.9** Corbes de magnetització a 4 K a) per Fe<sub>8(aq)</sub> i b) per Fe<sub>8(s)</sub>

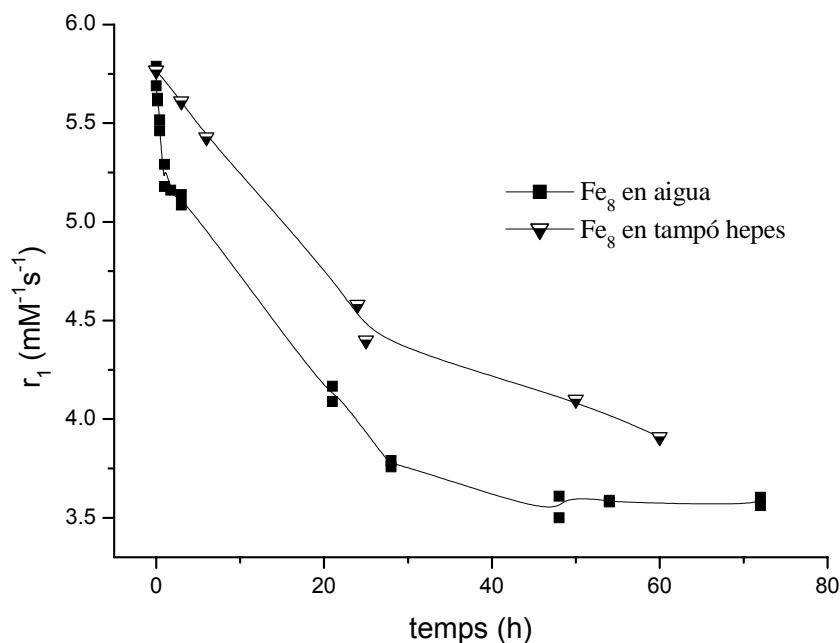
Per tant, a partir d'aquestes mesures magnètiques s'arriba a la conclusió, igual que a partir dels resultats obtinguts en l'espectroscòpia Mössbauer, que **la molècula de Fe<sub>8</sub> no és estable en solució aquosa.**

## 4.2 Caracterització del Fe<sub>8</sub> en solucions fosfatades

En veure que la molècula de Fe<sub>8</sub> no era estable en solució aquosa, ens vam qüestionar per què les mesures relaxomètriques del Fe<sub>8</sub> en PBS eren estables (vegeu el capítol 3 pàgina 55). La composició de la solució de PBS, tal com es va comentar en el capítol 3 era: 0.14 M de NaCl, 2.68·10<sup>-3</sup> M de KCl, 0.01 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76·10<sup>-3</sup> M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Així que, igual que per al PBS, es va mesurar el valor de r<sub>1</sub> en funció del temps en aigua d'una solució de 2 mg de Fe<sub>8</sub> en 1ml d'aigua, on el pH de la solució es va ajustar a pH neutre, en un camp magnètic de 0.24 T i a 298 K. Tal com es pot veure a la figura 4.10, el valor de r<sub>1</sub> disminueix amb el temps quan el medi és l'aigua. També es va estudiar l'estabilitat de la mesura r<sub>1</sub> en el tampó HEPES (N-

[2-hidroxiètil]piperazina-N'-[2-età-sulfoní acid]), per a una solució de 2 mg de Fe<sub>8</sub> en 1 ml de tampó HEPES (pH ajustat a pH neutre). I, com es pot veure a la figura 4.10, el valor de  $r_1$  també disminueix amb el temps.



**Figura 4.10** Dependència de la mesura  $r_1$  per al Fe<sub>8</sub> amb el temps en diferents medis, a 0.24 T i 298K.

També es va mesurar l'estabilitat de  $r_1$  en un sèrum fetal boví on, a diferència dels altres dos medis, el valor de  $r_1$  era estable amb el temps, amb un valor de  $r_1 = 3.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . La composició del sèrum consisteix principalment en albúmina (29 g/l), calci (145 mg/l), clorur (110 mg/l) i fòsfor (97 mg/l); per tant, això sembla que indica que és la presència de l'anió fòsfor el que podria estabilitzar la mesura de  $r_1$  amb el temps.

El catió  $[\text{Fe}_8(\mu\text{-O})_2(\mu\text{-OH})_{12}(\text{tacn})_6]^{8+}$  és altament carregat; per tant, en solució es trobarà envoltat d'anions; els anions presents en el PBS són els clorurs i els fosfats. Els anions clorurs tenen un comportament químic anàleg als anions bromurs, presents en l'estructura inicial; per tant, és previsible que no afectin la molècula de Fe<sub>8</sub> en solució. En canvi, els fosfats són uns anions que presenten una avidesa molt gran cap al Fe. Es va repetir la mesura de relaxació,  $r_1$  en presència del Fe<sub>8</sub>, 2 mg/ml, però no en PBS, sinó en una solució amb 0.01 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, és a dir, en presència només d'anions fosfats (mesures realitzades a 0.24 T). La mesura de  $r_1$  torna a ser estable amb el temps, però el més sorprenent va ser que el valor de  $r_1$  era més alt:

$$r_1 (\text{PBS}) = 4.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ i } r_1 (0.01 \text{ M de K}_2\text{HPO}_4) = 6.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}.$$

Per tant, els anions fosfats interaccionaven amb el Fe<sub>8</sub> en solució, però, de quina forma?, es mantenia l'estructura del Fe<sub>8</sub> en solució amb la presència dels grups fosfats? per què augmentava el valor de  $r_1$ ? En aquest apartat del quart capítol es descriuran les mesures realitzades per conèixer la interacció dels anions fosfats amb la molècula de Fe<sub>8</sub> i en el capítol cinc es descriuran els efectes dels fosfats en les propietats relaxomètriques.

Igual que en l'apartat anterior es van dur a terme mesures espectroscòpiques i mesures magnètiques en solució i es van comparar amb aquelles obtingudes per al Fe<sub>8(s)</sub>. Les mesures en solució, tal com es descriurà d'aquí endavant es van preparar a partir del Fe<sub>8</sub> dissolt en una solució aquosa amb una concentració determinada de fosfats, i s'anomenaran Fe<sub>8(fos)</sub> i Fe<sub>8<sup>cl</sup>(fos)</sub> quan calgui diferenciar la concentració de fosfats.

### 4.2.1 Mesures espectroscòpiques

#### Espectroscòpia ultraviolat-visible (UV-Vis)

Tal com s'ha comentat prèviament, la concentració de fosfats semblava afectar les propietats relaxomètriques del Fe<sub>8</sub>. A fi de caracteritzar aquest sistema es van dur a terme mesures espectroscòpiques de diferents solucions Fe<sub>8(fos)</sub>. Quan es van preparar les solucions fosfatades en presència d'una concentració fixa de Fe<sub>8</sub> de 2 mg/ml, ens vam adonar que el color de la solució, inicialment groc, s'anava tornant incolor a mesura que la concentració de fosfats augmentava, és a dir, que semblava que els anions fosfats interaccionaven amb la molècula de Fe<sub>8</sub> i, per tant, canviaven les propietats espectroscòpiques de la molècula. A la figura 4.11 es pot veure una imatge de cinc solucions amb la mateixa concentració de Fe<sub>8</sub> però amb diferents concentracions de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

[K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ]	0 M	0.01 M	0.1M	0.5 M	1 M
[Fe <sub>8</sub> ]	2 mg/ml	2 mg/ml	2 mg/ml	2 mg/ml	2 mg/ml

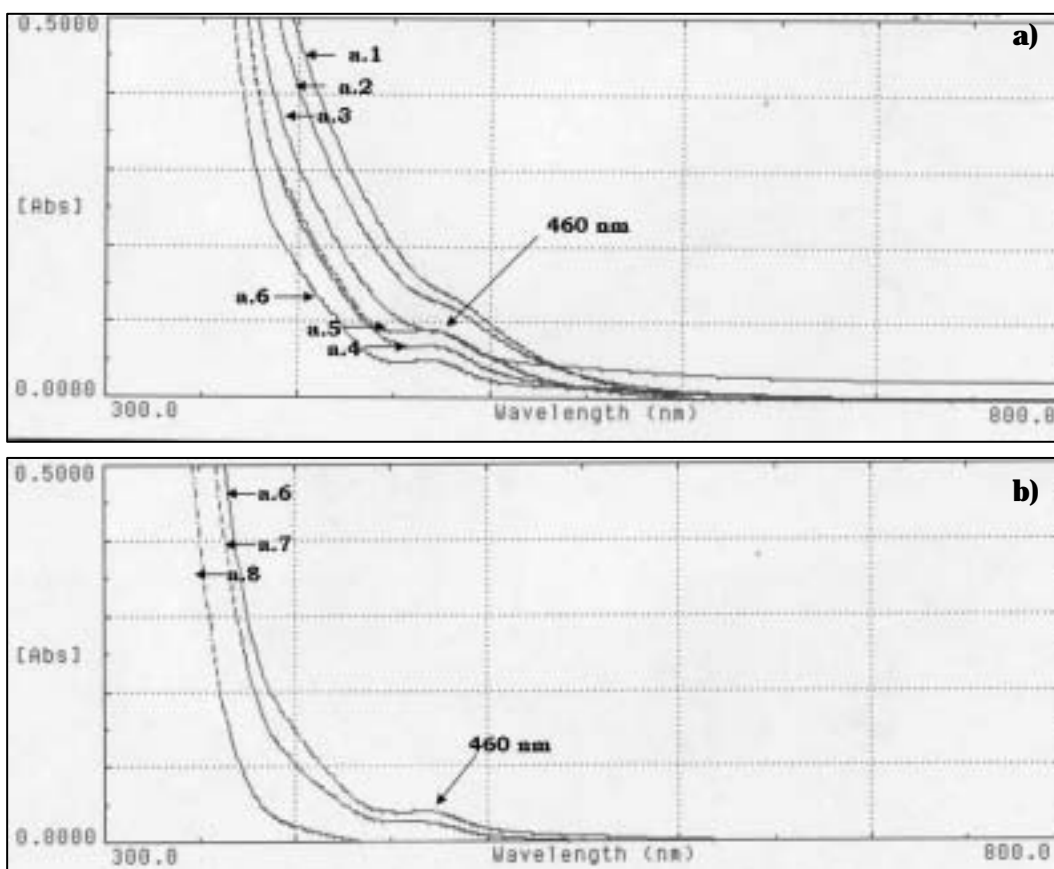


**Figura 4.11** Imatge de solucions de Fe<sub>8</sub> amb diferents concentracions de fosfat

La solució més fosca correspon a una solució on no s'ha afegit fosfat, en canvi, es pot observar que a mesura que augmentem la concentració de fosfat en el medi les solucions es tornen incolores.

Els espectres UV-Vis de les diferents solucions de  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  s'han mesurat en un espectròmetre Varian Cary E. Les solucions de  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  s'han preparat a partir de la dissolució de 2 mg de  $\text{Fe}_8$  en 1 ml d'aigua amb les concentracions de fosfats següents: 0 M; 0.001 M; 0.002 M; 0.004 M; 0.008 M; 0.01 M; 0.10 M; 0.5 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Cal destacar que per a cap concentració no s'ha observat cap precipitat ni cap enterboliment de les solucions. A la figura 4.12 (a, b) es poden veure els espectres UV-Vis resultants.

A l'espectre UV-Vis 4.12 a) s'hi troben representades les concentracions de 0 M a 0.01 M.

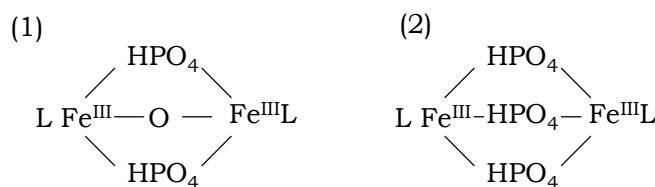


**Figura 4.12** Espectres UV-Visible enregistrats d'una solució de  $\text{Fe}_8$  2 mg/ml amb diferents concentracions de fosfats, on a) a.1 = 0, a.2 = 0.001, a.3 = 0.002, a.4 = 0.004, a.5 = 0.008, a.6 = 0.01 i b) a.6 = 0.01 a.7 = 0.1 i a.8 = 0.5 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

Els espectres a.1, a.2 i a.3, corresponents a les concentracions 0, 0.001 i 0.002 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  respectivament, són bastant semblants entre ells; en canvi els espectres a.4, a.5 i a.6, corresponents a les concentracions 0.004, 0.008 i 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  respectivament, també són semblants entre ells, però es diferencien amb els anteriors en la formació, molt feble d'una banda a 460 nm. La figura 4.12 b) mostra els espectres a.6, a.7 i a.8, corresponents a les

concentracions 0.01, 0.1 i 0.5 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> respectivament, on els espectres a.6 i a.7 són semblants entre ells, però diferents de l'espectre a.8. Cal destacar que els espectres de les solucions fosfatades, per a una concentració més gran de 0.008 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> no variaven amb el temps a diferència dels espectres UV-Vis de les solucions Fe<sub>8(aq)</sub> on sí que s'observaven diferències amb el temps (figura 4.2).

A la literatura es troben descrits alguns exemples de complexos formats per unitats Fe-O-Fe amb lligands ponts  $\mu$ -fosfats, exemple: [Fe<sub>2</sub>O{O<sub>2</sub>P(OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>(HBpz<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] on (HBpz<sub>3</sub>)<sup>-</sup> és el lligand hidrottris(1-pirazolil)borat<sup>17</sup>. Els espectres UV d'aquestes espècies es caracteritzen per presentar bandes en el rang ultraviolat, que són bandes degudes a transicions de transferència de càrrega del lligand al metall, i per presentar bandes en el rang de visible degudes a transicions d-d. S'ha assignat la banda entre 300-400 cm<sup>-1</sup> a la banda de transferència del grup oxo. Les bandes que es donen en el rang del visible es deuen a transicions d-d que a vegades són intenses perquè els àtoms de Fe(III) es troben acoblats antiferromagnèticament. En un altre treball comparen el diferent comportament espectroscòpic entre les espècies, [L<sub>2</sub>Fe<sub>2</sub>O(HPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O (1) i [L<sub>2</sub>Fe(HPO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (2) on L = 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclonoà<sup>18</sup> (vegeu la figura 4.13). Igual que l'exemple anterior, l'espècie (1) presenta, bandes en el rang 300–480 nm degudes a transicions de transferència de càrrega i bandes en el rang 500–1200 nm degudes a les transicions d-d.



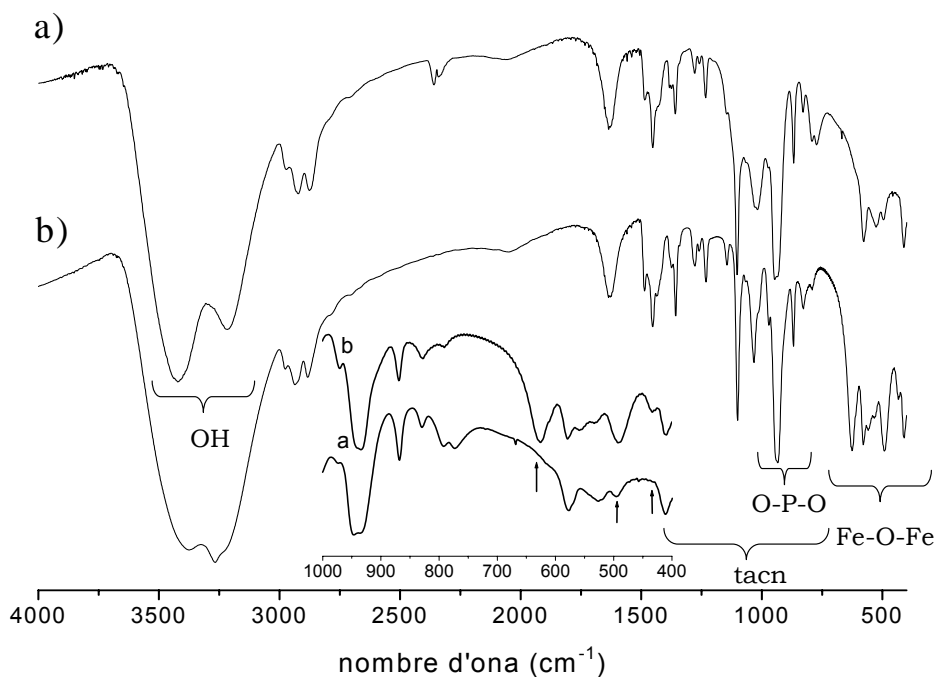
**Figura 4.13** Esquema del complexos [L<sub>2</sub>Fe<sub>2</sub>O(HPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O (1) i [L<sub>2</sub>Fe(HPO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (2) on L = 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclonoà

En canvi, el compost (2) no presenta cap banda entre 500–1200 nm; és a dir, que no es donen transicions d-d, perquè els lligands PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> originen un acoblament antiferromagnètic molt més feble entre els ions Fe(III) que el lligand oxo i, per tant, la intensitat de les transicions d-d decreix notablement en comparació amb les transicions d-d en complexos amb ponts oxo presents. Els lligands fosfats no són tan bon lligands de superintercanvi com els lligands oxo, que originen acoblaments antiferromagnètics forts entre metalls. També cal destacar que així com les solucions del complex (1) són de color verd, les solucions del complex (2) són incolores.

Per tant, en el nostre cas, sembla que, a mesura que s'augmenta la concentració de fosfat, aquests van desplaçant els lligands oxo- i hidroxò- i, per tant, disminueixen les bandes en el rang visible, i afecten les propietats magnètiques com veurem més endavant.

### Espectroscòpia d'infraroig (IR)

De la mateixa manera que per al Fe<sub>8(aq)</sub>, els espectres d'infraroig (4000-400 cm<sup>-1</sup>) s'han enregistrat en un espectròmetre Perkin Elmer amb pastilles de KBr. La solució Fe<sub>8</sub><sup>[0.01M]<sub>(fos)</sub></sup> preparada a partir de 2 mg de Fe<sub>8</sub> en 1 ml d'aigua on la concentració de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> era de 0.01 M es va liofilitzar, i va produir un producte de color marró clar. A la Figura 4.14 es pot veure l'espectre obtingut per la solució Fe<sub>8</sub><sup>[0.01M]<sub>(fos)</sub></sup> liofilitzada (a). A la mateixa figura es troba l'espectre obtingut pel Fe<sub>8(s)</sub> (b). A fi d'observar les diferències a freqüències baixes s'ha ampliat aquest rang de freqüències que es pot veure en figura inserida.



**Figura 4.14** Espectres IR del a) pols liofilitzada d'una solució Fe<sub>8</sub><sup>[0.01M]<sub>(fos)</sub></sup> i b) Fe<sub>8(s)</sub> enregistrats en el rang de nombre d'ones 400-4000 cm<sup>-1</sup>.

De la mateixa manera que quan abans es comparaven els espectres entre el Fe<sub>8(s)</sub> i el Fe<sub>8(aq)</sub> i no hi havia grans diferències, en aquest cas tampoc no s'observen grans diferències entre tots dos espectres, sí en el rang de nombre

d'ones més baixes, però en general no són molt diferents i sembla que l'amina taçn continua coordinada.

Cal destacar que si els lligands fosfats fossin coordinats al complex de Fe<sub>8</sub>, s'hauria de veure la banda de l'estirament O-P-O entre 1100-900 cm<sup>-1</sup> en l'espectre Fe<sub>8</sub><sup>[0.01M]<sub>(fos)</sub></sup> i, tal com es pot veure a la figura inserida 4.14, s'observa una banda a 950 cm<sup>-1</sup>, que també és present en l'espectre del Fe<sub>8(s)</sub>; per tant, no es pot assegurar que els lligands fosfats estiguin coordinats a la molècula.

L'espectre IR de la solució Fe<sub>8</sub><sup>[0.01M]<sub>(fos)</sub></sup> correspon a una concentració de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> de 10 mM, és a dir, la concentració de fosfats present a la solució tampó PBS. Es va intentar liofilitzar una mostra amb una concentració de fosfat més alta a fi de poder comparar les diferències entre els espectres, però com que els fosfats són altament higroscòpics, no es va aconseguir una pols per al procés de liofilització.

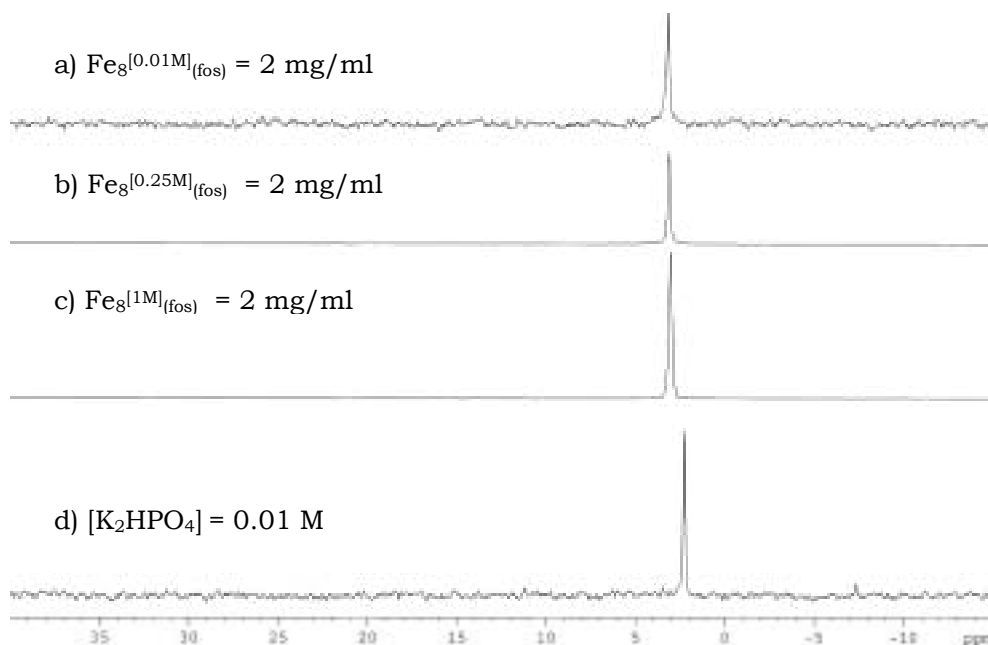
### **Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear**

Tal com s'ha comentat a l'inici en aquest apartat l'objectiu era conèixer quin tipus d'interacció es dona entre els ions fosfats i la molècula de Fe<sub>8</sub>. El nucli de fòsfor té un nombre senar de protons; per tant, pot absorbir selectivament energia de radiofreqüència en presència d'un camp magnètic. Es van enregistrar els espectres de <sup>31</sup>P de solucions aquoses amb diferents concentracions de fosfat i amb una concentració fixa de Fe<sub>8</sub> de 2 mg/ml.

A la figura 4.15 es poden veure els espectres de <sup>31</sup>P enregistrats en un espectròmetre Bruker a 7.05 T i a 298 K. Es van enregistrar quatre espectres corresponents a les següents concentracions de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0.01 M (a); 0.25 M (b); 1 M (c); 0.01 M (d), on el (d) correspon a l'espectre de la sal fosfatada en aigua sense Fe<sub>8</sub>. El senyal de <sup>31</sup>P quan no hi ha Fe<sub>8</sub> en el medi es troba a 2.5 ppm. Es pot veure aquest senyal a 2.5 ppm, present en tots els espectres, creix en intensitat a mesura que la concentració de fosfats en el medi augmenta (espectres (a), (b) i (c)). Per a concentracions de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> inferiors a 0.008 M no s'observa el senyal de <sup>31</sup>P, la qual cosa suggereix que els grups fosfats presents en solució es troben interaccionant directament o molt pròxims als àtoms de Fe(III), ja que el Fe(III), com a element paramagnètic, fa que el nucli de <sup>31</sup>P relaxi tan ràpidament que no s'observi cap senyal. En canvi, a mesura que la concentració de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> augmenta, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 0.01 M apareix un senyal a 2.5 ppm, posició que correspon al senyal del grup (HPO<sub>4</sub>)<sup>2-</sup> lliure.

És a dir, per a una concentració donada de Fe<sub>8</sub> de 2 mg/ml, que equivaldria a una concentració 0.001 M de Fe<sub>8</sub>, no s'observa senyal de <sup>31</sup>P fins que la

concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  sigui més gran que, 0.008 M, això indica que cada molècula de  $\text{Fe}_8$  i, per tant, 8 àtoms de  $\text{Fe(III)}$ , interaccionen amb 8 molècules de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , és a dir, la relació d'interacció seria: **1 àtom de  $\text{Fe(III)}$  : 1 molècula de  $\text{HPO}_4^{2-}$** .



**Figura 4.15** Espectres de  $^{31}\text{P}$  a 298 K i a 7.05 T

En cap moment no es va observar un eixamplament de banda que hagués significat un equilibri dinàmic entre els fosfats que es troben interaccionant amb els ions  $\text{Fe(III)}$  i els anions fosfats lliures en la solució. Per tant sembla que aquells anions fosfats que hi arriben primer interaccionen de forma molt estable amb els ions  $\text{Fe(III)}$  i no es bescanvien amb els grups fosfats lliures.

Fins ara hem observat que els anions fosfats tenen un paper molt actiu en les solucions aquoses de  $\text{Fe}_8$  i també sembla que els anions fosfats interaccionen amb els àtoms de  $\text{Fe(III)}$  i que aquesta interacció depèn de la concentració de fosfats, però el que no hem avaluat fins ara és si el clúster  $\text{Fe}_8$  es manté en solució. A fi de veure-ho, tal com vam fer per a les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  s'han mesurat les propietats magnètiques i s'han comparat els resultats amb aquells obtinguts per al  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$ .

Les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  s'han preparat a partir d'una solució de 10 mg/ml de  $\text{Fe}_8$  en dues solucions aquoses, una amb una concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  de 0.05 M,  $\text{Fe}_{8[0.05\text{M}]_{\text{fos}}}$  i l'altra amb una concentració d'1 M,  $\text{Fe}_{8[1\text{M}]_{\text{fos}}}$ . Tal com s'ha comentat abans, la concentració de la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en el PBS era de 0.01 M, com



ara s'ha preparat una solució cinc cop més concentrada en Fe<sub>8</sub> a fi d'obtenir un senyal prou sensible també s'ha tingut en compte aquest factor de 5 a l'hora de preparar les solucions fosfatades (respecte a la solució 1 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> no va ser viable la preparació d'una solució 5 M degut a la insolubilitat de la sal).

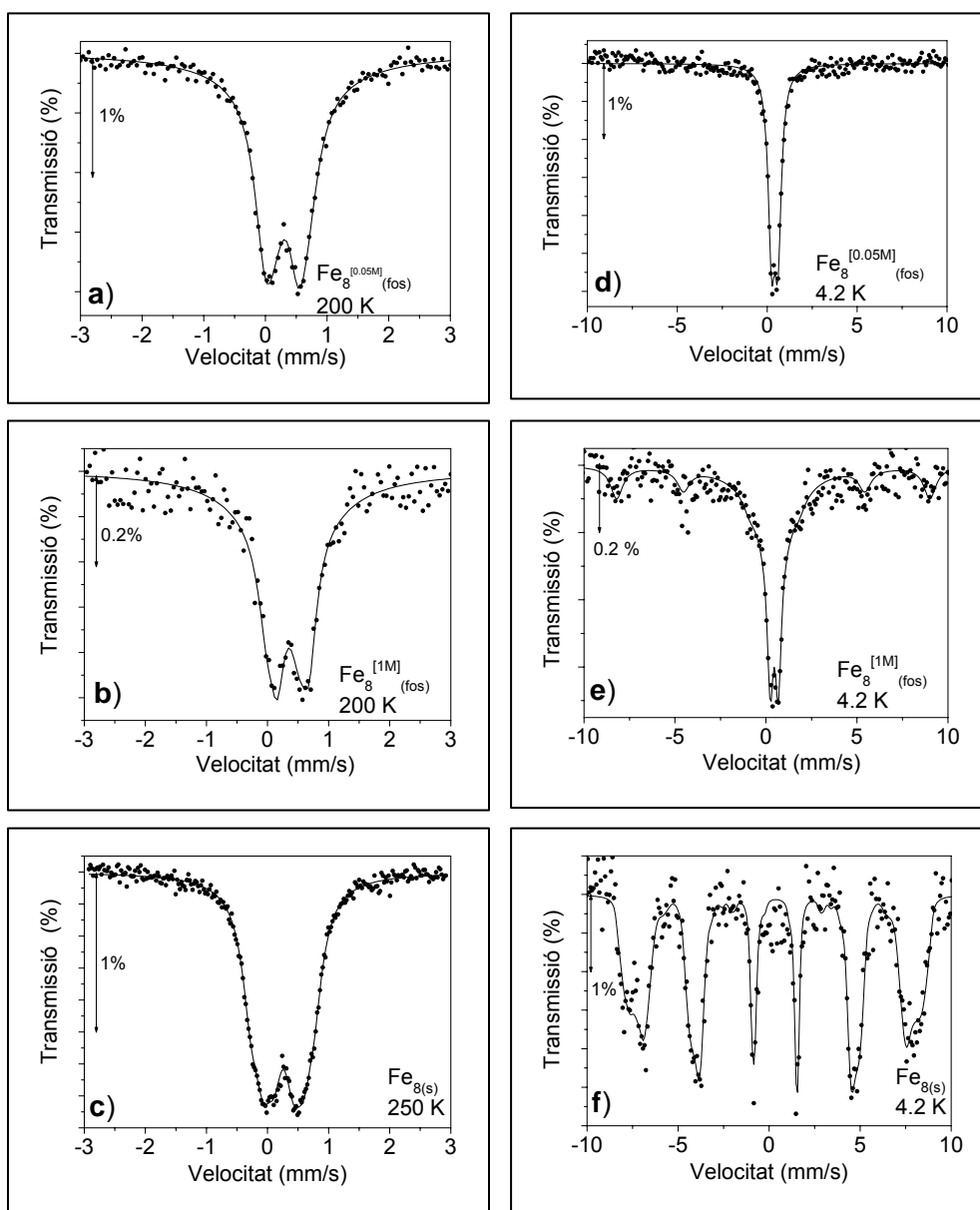
## 4.2.2 Mesures magnètiques

### Espectroscòpia Mössbauer

Els espectres Mössbauer de les mostres Fe<sub>8(s)</sub>, Fe<sub>8<sup>[0.05M]</sup>(fos)</sub> i Fe<sub>8<sup>[1M]</sup>(fos)</sub> es van enregistrar a 200 i 4.2 K amb un espectròmetre convencional de transmissió utilitzant una font de <sup>57</sup>Co en una matriu Rh.

Les dues solucions de Fe<sub>8(fos)</sub> es van preparar a partir d'una solució de 10 mg de <sup>57</sup>Fe<sub>8</sub> en 1 ml de solució fosfatada amb una concentració de 0.05 M i 1 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> respectivament.

Els espectres enregistrats a 200 i a 4.2 K per totes tres mostres es poden veure a la figura 4.16. Els espectres a 200 K de totes tres mostres, mostren un comportament paramagnètic, però tal com passava per al Fe<sub>8(aq)</sub> els paràmetres hiperfins del Fe<sub>8<sup>[0.05M]</sup>(fos)</sub> i del Fe<sub>8<sup>[1M]</sup>(fos)</sub> són molt diferents dels del Fe<sub>8(s)</sub>. Els espectres de totes dues solucions fosfatades són molt semblants entre ells. En canvi, a la temperatura de 4.2 K els tres espectres obtinguts són molt diferents entre ells; la mostra menys concentrada en fosfats, Fe<sub>8<sup>[0.05M]</sup>(fos)</sub>, segueix mostrant un doblet que evidencia un comportament paramagnètic o superparamagnètic; en canvi, en l'espectre de la mostra concentrada en fosfats, Fe<sub>8<sup>[1M]</sup>(fos)</sub>, es pot observar que hi ha un 25% de l'àrea total que està ordenada magnèticament. Una possible explicació a aquest ordenament seria la formació de partícules del tipus col·loidal, amb una estructura similar a la ferritina (FeOOH)<sub>8</sub>(FeOH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), de mida de partícula prou petita (2-4 nm) perquè encara una fracció (~ 75%) de les espècies experimenti relaxació superparamagnètica a 4.2 K<sup>19,20</sup>. Caldria disminuir la temperatura per tal d'observar si totes les espècies estan magnèticament bloquejades.

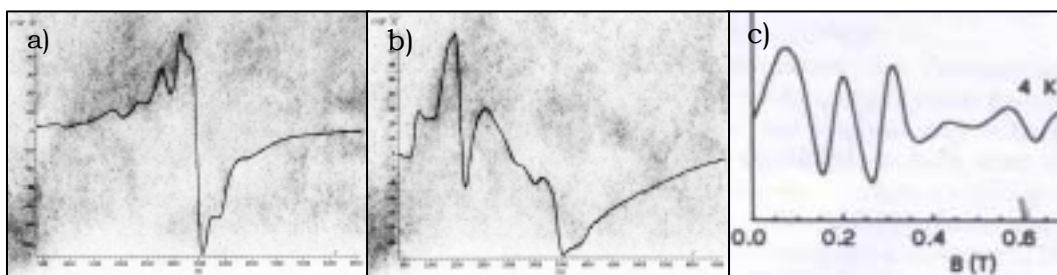


**Figura 4.16** Espectres Mössbauer per al Fe<sub>8</sub>[0.05M]<sub>(fos)</sub>: (a) a 200 K i (d) a 4.2 K; per al Fe<sub>8</sub>[1M]<sub>(fos)</sub>: (b) a 200 K i (e) a 4.2 K i per al Fe<sub>8</sub>(s): (c) a 250 K i (f) a 4.2 K

### Espectroscòpia de ressonància paramagnètica electrònica (RPE)

S'han enregistrat els espectres RPE per a les dues solucions Fe<sub>8</sub>[0.05M]<sub>(fos)</sub> i Fe<sub>8</sub>[2M]<sub>(fos)</sub> en la banda X a 4.2 K. Totes dues solucions s'han preparat a partir de la dissolució de 10 mg/ml de Fe<sub>8</sub> en una solució aquosa amb concentracions aquoses de 0.05 i 2 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, respectivament. A la figura 4.17 es troben representats els espectres obtinguts per les dues solucions de Fe<sub>8</sub>(fos) on a)

correspon a la solució  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i b) correspon a la solució  $\text{Fe}_8^{[2\text{M}]_{(\text{fos})}}$ , i c) correspon al  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  (espectre extret de la bibliografia)<sup>15</sup>.



**Figura 4.17** Espectre RPE mesurats de dues solucions de  $\text{Fe}_8$  10 mg/ml a 4 K, on a)  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ , b)  $\text{Fe}_8^{[2\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i c) espectre del  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  extret de la referència 14

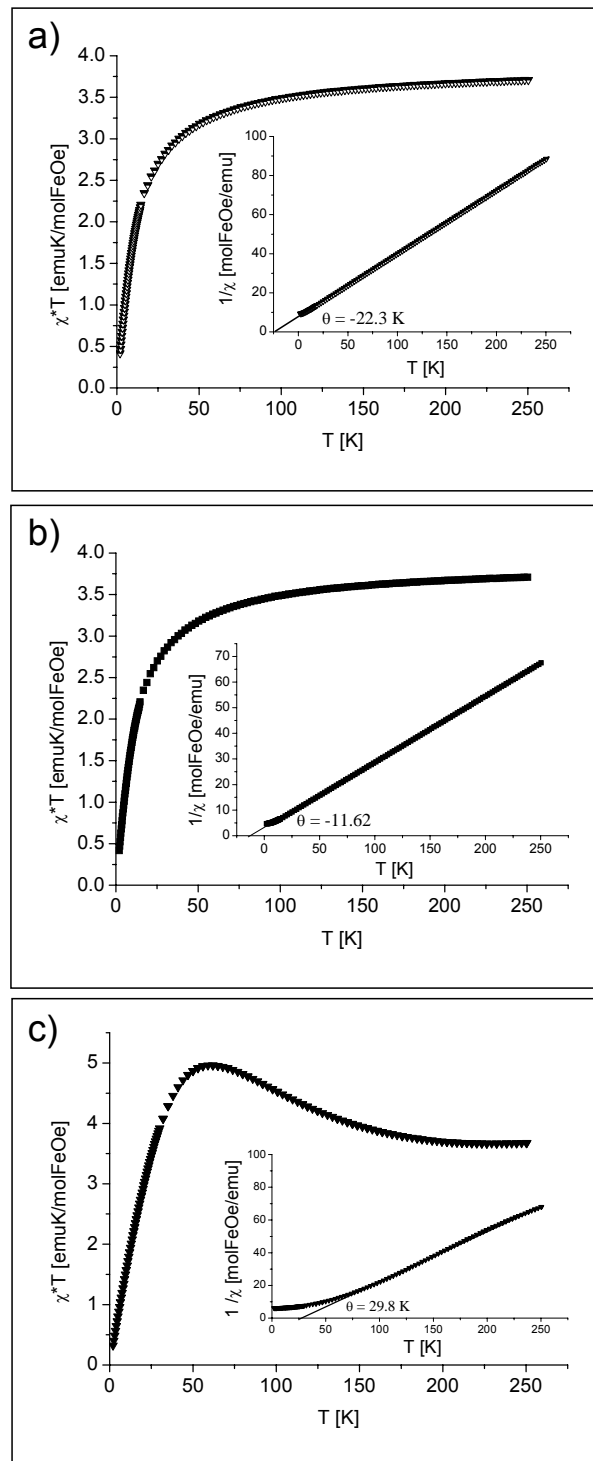
Tal com es pot veure, els tres espectres són molt diferents entre ells. L'espectre a) corresponent a la solució  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ , presenta una banda centrada a  $g \sim 2$ , mentre que en l'espectre b) corresponent a la solució  $\text{Fe}_8^{[2\text{M}]_{(\text{fos})}}$ , apareixen bandes a camps magnètics més baixos i, finalment, l'espectre c), corresponent a un espectre de pols policristal·lina de  $\text{Fe}_8$ , mostra set bandes, on les quatre primeres situades a camp magnètics baixos presenten una intensitat més alta.

A partir de les mesures d'RPE no es pot obtenir més informació: caldria conèixer l'estructura que roman en solució en presència dels anions fosfats a fi de poder raonar els resultats espectroscòpics. El que sí que es pot afirmar a partir de les mesures de Mössbauer i d'RPE, és que **la molècula de  $\text{Fe}_8$  no és estable en solució fosfatada** i que el compost que es forma és diferent segons la concentració d'anions fosfats en el medi i diferent del compost que es forma en solució aquosa.

### Mesures magnètiques

Les mesures magnètiques per a les dues solucions  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i per al  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  es van obtenir en un magnetòmetre de vibració, VSM (Oxford Instruments Ltd.) i en un magnetòmetre PPMS (Quantum Design). Les solucions,  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$ , es van preparar dissolent 10 mg de  $\text{Fe}_8$  en 1 ml d'aigua amb una concentració prèvia de 0.05 i 1 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , respectivament. En aquest cas les dades magnètiques obtingudes s'han expressat en emu per mol de Fe. Igual que per les mesures magnètiques del  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$ , en aquest cas la component diamagnètica també ha estat corregida (vegeu l'annex 1).

A la figura 4.18 es pot veure la dependència del producte de la susceptibilitat-temperatura,  $\chi_{\text{mol}}T$ , amb la temperatura per al  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$  (figura 4.18 a), per al  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  (figura 4.18 b) i per al  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  (figura 4.18 c) a 90 kOe.



**Figura 4.18** Dependència de la susceptibilitat,  $\chi_{mol}T$ , amb la temperatura mesurada a 90 kOe, per: a)  $Fe_8^{[0.05M]_{(fos)}}$ , b)  $Fe_8^{[1M]_{(fos)}}$  i c)  $Fe_8^{(s)}$ . Com a figures inserides es troben representats l'invers de la susceptibilitat respecte a la temperatura a 90 kOe.

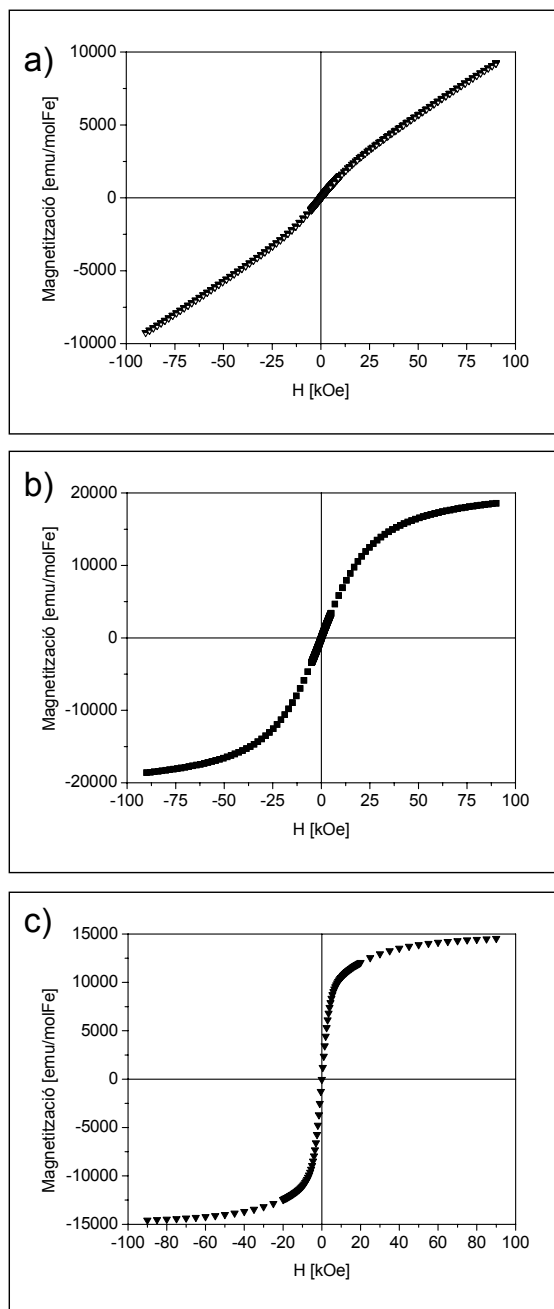
Tal com es pot veure a la figura 4.18 per a totes dues solucions  $Fe_8^{(fos)}$  es dona un acoblament antiferromagnètic entre els àtoms de Fe(III), perquè el valor de

$\chi_{\text{mol}}T$  es manté constant fins a una temperatura de 75 K i després disminueix gradualment amb la temperatura. Aquest resultat coincideix amb el signe de la constant de Curie-Weiss,  $\theta$ , que s'obté a partir de la representació de la inversa de la susceptibilitat enfront de la temperatura, que en el cas de la solució  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ,  $\theta = -22.3$  K i en el cas de la solució  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ,  $\theta = -11.6$  K.

Si es comparen aquests resultats amb aquells obtinguts per al  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  de la mateixa manera que s'ha comentat en la pàgina 80, es veu que el  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  presenta un acoblament ferrimagnètic entre els ions de Fe(III) (figura 4.18 c), on es compleix la llei de Curie-Weiss amb una  $\theta = 29.8$  K i un moment magnètic de  $13.5 \pm 0.5 \mu_{\text{B}}$ . Per tant, queda palès que el comportament de la susceptibilitat amb la temperatura és molt diferent entre les solucions  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ,  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i el  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$ .

També s'han mesurat les corbes de magnetització a 4 K per al  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ,  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i per al  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  que també són molt diferents entre elles, com es pot veure a la figura 4.19 (a), (b) i (c) respectivament. En el cas de la solució  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$  la magnetització no se satura ni a camps alts i els valors experimentals no es poden ajustar a una funció de Langevin, suggerint l'existència de més d'una espècie en solució. En canvi, per a la solució  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  la magnetització presenta saturació i els valors experimentals es poden ajustar a la funció de Langevin, on s'obté un moment magnètic de  $5.96 \mu_{\text{B}}$  que correspon a un estat fonamental de  $S = 5/2$ , és a dir, el moment magnètic que presentaria un ió Fe(III). El valor de saturació de la magnetització obtingut per la solució  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  coincideix amb aquell que presentaria una mostra amb mateixa la concentració de Fe on els Fe(III) no estiguessin acoblats magnèticament (vegeu l'annex 1). En canvi, en el cas del  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  es dóna saturació de la magnetització però el moment resultant és igual a  $20 \mu_{\text{B}}$ , que correspon a un estat fonamental de  $S = 10$ .

Les conclusions que es poden extreure a partir de les mesures magnètiques són: (1) la molècula de Fe<sub>8</sub> en solució fosfatada no és estable i l'espècie en solució depèn de la concentració de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (2) a partir de l'estudi de la variació de la susceptibilitat amb la temperatura es pot veure que totes dues solucions presenten comportament paramagnètic i a baixes temperatures hi ha un desviament de la llei de Curie evidenciant acoblaments de tipus antiferromagnètic, (3) segons les mesures de magnetització vs el camp magnètic a baixa temperatura la solució concentrada en fosfat,  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  satura a valors alts de camp magnètic resultant en un moment magnètic de  $5.96 \mu_{\text{B}}$  i els ions Fe(III) no es troben acoblats magnèticament entre ells, potser per l'existència de grups fosfats entre ells i (4) en la solució més diluïda en fosfats,  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ , sembla que existeixen més d'una espècie.



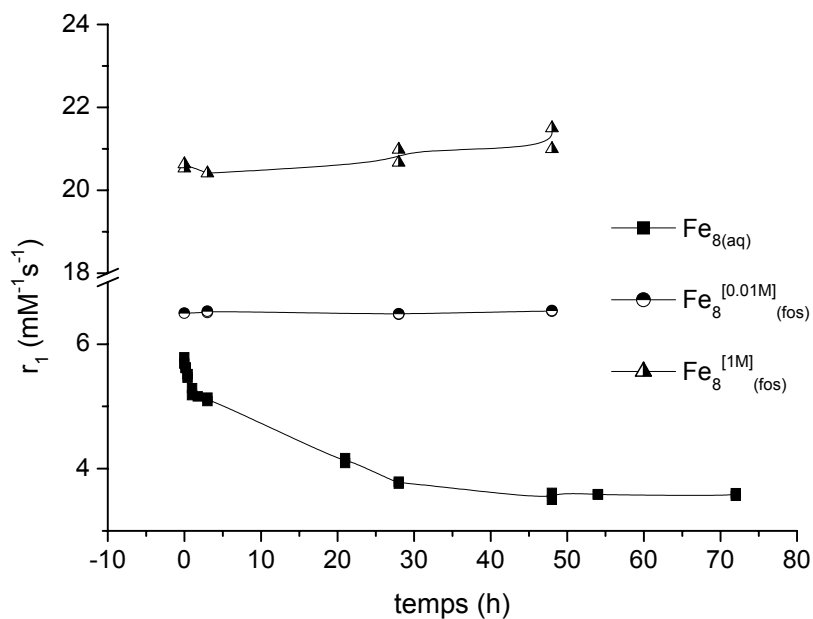
**Figura 4.19** Corbes de magnetització a 4 K per a: a)  $\text{Fe}_8^{[0.05M]}_{\text{fos}}$ , b)  $\text{Fe}_8^{[1M]}_{\text{fos}}$  i c)  $\text{Fe}_8^{(s)}$

### 4.2.3 Aspectes cinètics sobre la descomposició del $\text{Fe}_8$ en solució

A partir de l'estudi del comportament de la molècula de  $\text{Fe}_8$  dut a terme en solució en aquosa i en solucions fosfatades s'arriba a la conclusió que la

molècula de Fe<sub>8</sub> no és estable en cap d'aquestes solucions. A la figura 4.20 s'han representat les dependències temporals de la mesura  $r_1$  per al Fe<sub>8</sub> 2mg/ml en una solució aquosa, Fe<sub>8(aq)</sub> i en les solucions fosfatades Fe<sub>8</sub><sup>[0.01M]<sub>(fos)</sub> i Fe<sub>8</sub><sup>[1M]<sub>(fos)</sub></sup></sup>

Tal com es veu a la figura 4.20, la dependència temporal de la mesura de  $r_1$  en solució aquosa suggereix que el Fe<sub>8</sub> es va descomponent lentament fins arribar a un o més productes estables cap a les 40 hores, és a dir, el Fe<sub>8</sub> en aigua presenta una cinètica de descomposició lenta.



**Figura 4.20** Dependència de la mesura  $r_1$  per al Fe<sub>8</sub> en diferents medis amb el temps a 0.24 T i a 298K

En canvi, la dependència de la mesura de  $r_1$  per a la molècula de Fe<sub>8</sub> en les solucions fosfatades, Fe<sub>8</sub><sup>[0.01M]<sub>(fos)</sub> i Fe<sub>8</sub><sup>[1M]<sub>(fos)</sub> és constant amb el temps, però, com s'ha comentat prèviament a partir de les mesures magnètiques, s'ha vist que la molècula de Fe<sub>8</sub> no és estable en solucions fosfatades. Per tant, aquests resultats suggereixen que en solucions fosfatades el trencament del Fe<sub>8</sub> té lloc de forma tan ràpida que amb les tècniques experimentals que hem fet servir no podem observar la cinètica de descomposició, contràriament a com s'esdevé en solucions aquoses. És a dir, que les solucions Fe<sub>8(fos)</sub> presenten una cinètica de descomposició molt ràpida.</sup></sup>

### 4.3 Conclusions

En el capítol 3 es van descriure les propietats relaxomètriques del Fe<sub>8</sub> i es van fer estudis de toxicitat en una línia cel·lular. Els resultats de toxicitat suggerien que part de la toxicitat era deguda a l'existència d'ions Fe(III), és a dir, part de la molècula de Fe<sub>8</sub> s'havia descompost.

L'objectiu d'aquest capítol ha estat la caracterització de la molècula de Fe<sub>8</sub> en solució aquosa, ja que és el medi més senzill per dur a terme aquest estudi i perquè el Fe<sub>8</sub> presenta poca solubilitat en altres solvents. Els resultats mostren que **la molècula de Fe<sub>8</sub> no és estable en aigua i presenta una cinètica lenta de descomposició**. Però els productes de descomposició no han estat aïllats perquè no s'ha pogut obtenir cap cristall i és difícil suposar quins podrien ser els productes a partir de les mesures preses. Jerschow *et al.*<sup>7</sup> suggereixen que la molècula de Fe<sub>8</sub> no és estable en solució aquosa i a partir de les mesures d'RMN d'H-1 afirmen que en solució romanen alguns clústers intactes i que un possible producte de descomposició és el precursor mononuclear Fe(tacn)Cl<sub>3</sub>.

L'ió Fe<sup>3+</sup> és un àcid de Lewis fort que presenta més afinitat per l'àtom d'oxigen que no per l'àtom de nitrogen, per tant, semblaria que l'amina pogués haver estat desplaçada per molècules d'aigua, però a la bibliografia es troben descrits compostos de Fe(III) amb l'amina tacn coordinada que són estables en solució aquosa<sup>21,22</sup>. Per tant, sembla que l'amina es troba coordinada al Fe(III). Tot i això, es va decidir enregistrar l'espectre de RMN de <sup>13</sup>C d'una solució de Fe<sub>8</sub> en aigua per veure si hi havia amina lliure i es va observar un senyal situat a 43 ppm (amina lliure 45 ppm); per tant, semblaria que hi ha un percentatge d'amina lliure. A diferència dels resultats presentats pel Dr. Jerschow, partir de les mesures magnètiques, es pot concloure que en solució no romanen alguns clústers del Fe<sub>8</sub> sinó que sembla que existeixen ions Fe(III) coordinats entre ells per ponts oxo- o hidroxó- ja que s'observen acoblaments antiferromagnètics i que part dels Fe(III) es troben en suspensió col·loïdal en forma d'un gel poc cristal·lí d'hidròxids de Fe(III). La formació d'aquestes partícules col·loïdals podria explicar el perquè de la disminució del valor de  $r_1$  amb el temps, ja que s'ha vist que el valor de  $r_1$  per solucions aquoses de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> disminueix amb l'augment pH a causa de la formació d'espècies tipus Fe(OH)<sub>3</sub><sup>23</sup>.

Segons la bibliografia, Drüke *et al.*<sup>18</sup> van raonar que espècies dinuclears com per exemple, el compost [Fe<sub>2</sub>O(O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(tacn)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, no eren estables en solució aquosa a causa de la labilitat dels lligands carboxilat. Es va comprovar que aquesta labilitat depenia de l'amina present, perquè quan l'amina tacn: 1,4,7-triazaciclononà se substituïa per l'amina: 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclononà, el



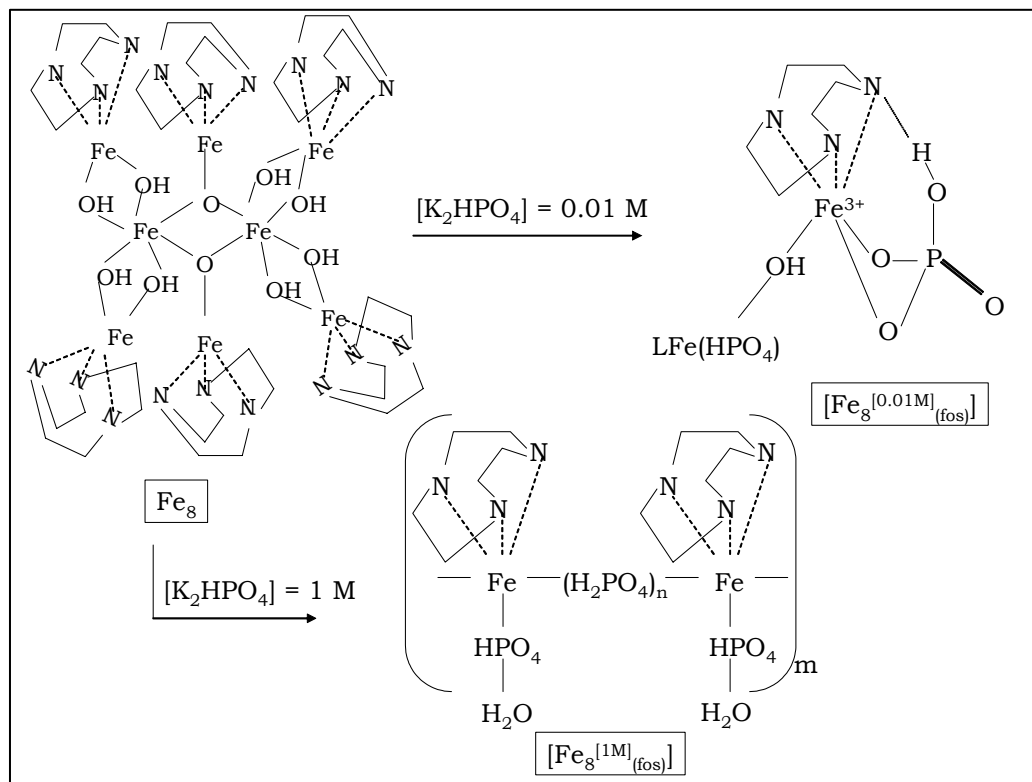
compost dinuclear era estable en solució aquosa. Per tant, l'amina metilada és un lligand que en presentar un factor estèric major estabilitza més aquestes espècies en solució. És a dir, sembla que en el nostre cas les molècules d'aigua podrien atacar els ponts hidroxó- i oxo- ja que l'amina no és prou gran perquè es produeixi un impediment estèric.

Tal com es va descriure en el capítol 3, l'avaluació del Fe<sub>8</sub> com a agent de contrast s'havia portat a terme en la solució tampó PBS, perquè tampona a pH fisiològic. Com que les mesures de  $r_1$  eren constants amb el temps quan es feia servir PBS, a diferència que en altres solvents, es va estudiar el comportament de la molècula de Fe<sub>8</sub> en solució fosfatada. Les conclusions d'aquest apartat són les següents:

1. **La molècula de Fe<sub>8</sub> no és estable en solució fosfatada**, però a diferència del Fe<sub>8</sub> en solució aquosa on la cinètica de descomposició és lenta, aquí la descomposició té lloc ràpidament i, per tant, la nova espècie és reorganitza ràpidament de tal manera que les mesures relaxomètriques obtingudes per la nova espècie són constants amb el temps.
2. La nova espècie que es forma en solució depèn de la concentració de fosfats que hi ha en el medi. En el cas del PBS, la concentració de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> és de 0.01 M, per aquesta concentració sembla que l'espècie en solució manté part de les unions  $\mu$ -O i  $\mu$ -OH inicials de l'estructura del Fe<sub>8</sub>, pel seu caràcter antiferromagnètic, però també ha incorporat lligands  $\mu$ -fosfat perquè per sota de 0.01 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> no s'observa cap senyal d'RMN en l'espectre de <sup>31</sup>P la qual cosa suggereix que els grups fosfats es troben coordinats a la molècula. Els resultats de <sup>31</sup>P indiquen que a baixes concentracions de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> cada àtom de Fe(III) interacciona amb una molècula de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (vegeu la figura 4.21). Per les mesures magnètiques suggereixen l'existència de més d'una espècie en solució.
3. En canvi, l'espècie que es forma a altes concentracions de fosfat, per exemple d'1 M, és diferent de la de concentracions de fosfat baixes. Com s'ha vist en la figura 4.11 a mesura que augmenta la concentració de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> la solució es torna incolora indicant la presència de grups fosfats a l'estructura. Les mesures magnètiques evidencien que els ions Fe(III) no estan acoblats magnèticament.
4. El percentatge ordenat magnèticament en la mesura Mössbauer a 4 K corresponent a la mostra Fe<sub>8</sub>[<sup>1M</sup>]<sub>(fos)</sub> suggereix la formació de

nanopartícules superparamagnètiques amb d'estequiometria tipus,  $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{tacn})(\text{HPO}_4)]_n$  i una mida inferior a 4 nm (vegeu la figura 4.21).

- S'ha intentat reiteradament obtenir cristalls de les diferents solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  però mai no s'ha obtingut un bon cristall indicant l'amorficitat de les espècies en solució (vegeu l'annex 7.1.8).



**Figura 4.21** Possible mecanisme de la descomposició del Fe<sub>8</sub> en solucions fosfatades

En el cas de les solucions fosfatades, sembla que l'amina s'hi troba coordinada, perquè, com es veurà en el capítol següent, si es prova de barrejar  $\text{FeCl}_3$  amb  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  cal que l'amina hi sigui present per tal de que no precipiti l'hidròxid de Fe(III). A la bibliografia<sup>22</sup> es troba descrita la reacció dels complexos dinuclears  $[\text{L}_2\text{Fe}_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-acetat})_2]$  i  $[\text{L}'_2\text{Fe}_2(\mu\text{-O})(\mu\text{-acetat})_2]$  on  $\text{L} = 1,4,7\text{-triazaciclonoanà}$  i  $\text{L}' = \text{N}, \text{N}', \text{N}''\text{-Trimetil-}1,4,7\text{-triazaciclonoanà}$ , amb els anions  $\text{N}_3^-$  i  $\text{NCS}^-$ . Tal com es pot veure a la figura 4.22 els productes resultats després d'afegir-hi un excés de sal presenten l'amina coordinada.



## Bibliografia del capítol 4

- <sup>1</sup> Blondin G. and Girerd J. J. Interplay of electron exchange and electron transfer in metal polynuclear complexes in proteins or chemicals models. *Chem. Rev.*, **1989**, *90*, 1359-1376.
- <sup>2</sup> Christou G. Manganese carboxylate chemistry and its biological relevance. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 328-335.
- <sup>3</sup> Taft K. L., Papaefthymiou G. C., Lippard S. J. Synthesis, Structure and Electronic Properties of a Mixed-Valent Dodecairon Oxo Complex, A model for the Biomineralization of Ferritin. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 1510-1515.
- <sup>4</sup> Lippard S. J. Oxo-Bridged Polyiron Centers in Biology and Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 344-361.
- <sup>5</sup> Kurtz D. M. Oxo- and Hydroxo-Bridged Diiron Complexes: A Chemical Perspective on a Biological Unit. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 585-606.
- <sup>6</sup> <sup>a</sup>Friedman J. R., Sarachik M. P., Tejada J, Ziolo R. Macroscopic Measurement of Resonant Magnetization Tunneling in High-Spin Molecules. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 3830-3833; <sup>b</sup>Sangregorio C., Ohm T., Paulsen C., Sessoli R., and Gatteschi D. Quantum Tunneling of the Magnetization in an Iron Cluster Nanomagnet. *Physical Review Letters.* **1997**, *(78) 24*, 4645-4648.
- <sup>7</sup> Isaacman S., Kumar R., del Barco E., Kent A. D., Canary J. W., Jerschow A. Critical Examination of Fe<sub>8</sub> as a Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging. *Accepted in Polyhedron.*
- <sup>8</sup> Gorun S. M., Lippard S. J. Synthesis, Structure, and Characterization of the Tetranuclear Iron (III) Oxo Complex [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>(BICOH)<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CPh)<sub>4</sub>]Cl<sub>2</sub>. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 149-156.
- <sup>9</sup> Sanders-Loehr J., Wheeler W. D., Shiemke A. K., Averill B. A., Loehr T. M. Electronic and Raman Spectroscopic Properties of Oxo-Bridged Dinuclear Iron Centers in Proteins and Model Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8084-8093.
- <sup>10</sup> McCusker J. K., Vincent J. B., Schmitt E. A., Mino M. L., Shin K., Coggin D. K., Hagen P. M., Huffman J. C., Christou G., Hendrickson D. N. Molecular Spin Frustration in the [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>8+</sup> Core: Synthesis, Structure, and Magnetochemistry of [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>(O<sub>2</sub>CR)<sub>7</sub>(bpy)<sub>2</sub>](ClO<sub>4</sub>) (R = Me, Ph) *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3012-3021.
- <sup>11</sup> Armstrong W. H., Roth M. E., Lippard S. J. Tetranuclear Iron-Oxo Complexes. Synthesis, Structure, and Properties of Species Containing the Nonplanar [Fe<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>8+</sup> Core and Seven Bridging Carboxylate Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6318-6326.

- <sup>12</sup> Spool A., Williams I. D., Lippard J. Electronic and Vibrational Spectroscopic Analysis of the (μ-Oxo)bis(μ-carboxylato)diiron(III) Core: A study of [Fe<sub>2</sub>O(O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(TACN)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 2156-2162.
- <sup>13</sup> Barra A. -L., Debrunner P., Gatteschi D., Schulz Ch. E., Sessoli R. Superparamagnetic-like behavior in an octanuclear iron cluster. *Europhys. Lett.* **1996**, *35(2)*, 133-138.
- <sup>14</sup> Coey J. M. D., Readman P. W. Earth Planet. *Sci. Lett.* **1973**, *21*, 45.
- <sup>15</sup> Evans D. F. The Determination of the Paramagnetic Susceptibility of Substances in Solution by Nuclear Magnetic Resonance. *J. Chem. Soc.* **1959**, 2003-2005.
- <sup>16</sup> Delfs C., Gatteschi D., Pardi L., Sessoli R., Wieghardt K., Hanke D. Magnetic Properties of an Octanuclear Iron (III) Cation. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 3099-3103.
- <sup>17</sup> Turowski P. N., Armstrong W. H., Roth M. E. and Lippard S. J. Phosphate Ester and Phosphinate Binding to the (μ-Oxo)diiron(III) Core: Synthesis and Characterization of [Fe<sub>2</sub>O{O<sub>2</sub>P(OC<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>(HBpz<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] and [Fe<sub>2</sub>O{O<sub>2</sub>P(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>]<sub>2</sub>(HBpz<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 681-690.
- <sup>18</sup> Drüeke S., Wieghardt K., Nuber B., Weiss J., Fleischhauer H-P., Gehring S. and Haase W. Model Compounds for the Oxidized Uteroferrin-Phosphate Complex. Syntheses, Crystal Structures, and Magnetic Properties of μ-Phosphato-, μ-Arsenato-, and μ-Chromato-Bridged Binuclear Iron (III) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8622-8631.
- <sup>19</sup> Suber L., Foglia S., Romero H., Montone A., Roig A., Casas Ll., Molins E., Fiorani D. Synthesis, morphological-structural characterization and magnetic properties of amorphous iron(III)-oxyhydroxy-phosphate nanoparticles. *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 2439-2447.
- <sup>20</sup> Frankel R. B., Papaefthymiou G. C., Watt G. D. Mössbauer Spectroscopy of Reduced Ferritin in *Mössbauer Spectroscopy Applied to Inorganic Chemistry*. Vol. 2. **1984**, 273-287.
- <sup>21</sup> Wieghardt K., Schmidt W., Herrmann W., Küppers H. Redox Potentials of Bis(1,4,7-triazacyclonane). Complexes of Some First Transition Series Metals (II,III). Preparation of Bis(1,4,7-triazacyclonane)nickel(III) perchlorate. *Inorg. Chem.* **1983**, *22*, 2953-2956.
- <sup>22</sup> Wieghardt K., Pohl K., Ventur D. Reactivity of the [Fe<sub>2</sub>(μ-O)(μ-acetato)<sub>2</sub>] Unit in Methemerythrin Model Compounds towards N<sub>3</sub><sup>-</sup> and NCS<sup>-</sup>. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1985**, *24*, 392-393
- <sup>23</sup> Koenig S. H., Baglin C. M., Brown R. D. Magnetic Field Dependence of Solvent Proton Relaxation in Aqueous Solutions of Fe<sup>3+</sup> Complexes. *Magnetic Resonance in Medicine.* **1985**, *2*, 283-288.

## **5 | Avaluació de les solucions $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ com a agents de contrast**

---

### **5.1 Mesura del $T_1$ i $T_2$**

### **5.2 Estudis de toxicitat**

### **5.3 Obtenció d'imatges**

### **5.4 Estudis in vivo**

### **5.5 Conclusions**

L'objectiu principal d'aquesta tesi era avaluar el  $\text{Fe}_8$  com a agent de contrast. En el capítol 3 es descriuen les propietats relaxomètriques del  $\text{Fe}_8$  en la solució tampó PBS i es va demostrar que el  $\text{Fe}_8$  actuava com un bon agent de contrast  $T_1$ , per un altre cantó els estudis de toxicitat suggerien l'existència d'ions  $\text{Fe(III)}$  lliures. Amb la finalitat d'evidenciar la possible descomposició del  $\text{Fe}_8$  en solució, en el capítol 4 es va caracteritzar el comportament del  $\text{Fe}_8$  en solució, on es va comprovar el següent: 1) la molècula de  $\text{Fe}_8$  no era estable en solució aquosa i 2) quan en la solució hi era present la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , els grups fosfats es coordinaven amb els ions  $\text{Fe(III)}$  i donaven un producte estable. En el quart capítol també s'havia vist que la nova espècie que es formava en solució depenia de la concentració de fosfats i que aquests influïen en les propietats relaxomètriques. Aquest cinquè capítol descriu l'avaluació de les solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  com a agents de contrast, és a dir, solucions aquoses de  $\text{Fe}_8$  amb una determinada concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Igual que en el capítol 3, s'han fet estudis de toxicitat en la línia cel·lular tumoral de glioma de rata C6 i s'ha avaluat a partir de les imatges potenciades en  $T_1$  la capacitat de les solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  com a agents de contrast. Finalment es descriuen els resultats preliminars obtinguts de ressonància magnètica d'imatge in vivo.

## **5.1 Mesura del $T_1$ i $T_2$**

Per avaluar la capacitat de les solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  com a agents de contrast s'han mesurat els temps de relaxació,  $T_1$  i  $T_2$ , dels nuclis d' $^1\text{H}$ -1 de solucions amb una concentració fixa de compost metàl·lic i variant la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

### **5.1.1 Materials i mètodes**

Per a una concentració de  $\text{Fe}_8$  d'1mM, 2 mg/ml, l'interval de concentracions de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  estudiat ha estat el següent: 0.01–1 M, que equival al quocient  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  : 10–1000. El pH de les solucions ha estat ajustat a pH neutre amb

KOH i  $\text{HNO}_3$ . Cal destacar que no s'ha observat cap precipitat ni cap enterboliment de les solucions.

Tal com es va comentar en el capítol 1 (pàgina 26), quan la disminució dels temps de relaxació és proporcional a la concentració d'agent de contrast, es defineix el terme de relaxivitat,  $r_i$ , com el pendent de la part lineal del terme  $1/T_i$  vs la concentració d'agent de contrast. En el capítol 3 els valors de relaxivitat van ser expressats com a mM de  $\text{Fe}_8$ ; en canvi, en aquest capítol els valors de relaxivitat obtinguts han estat expressats com a **mM de Fe** perquè en solució sabem que no es manté el clúster de  $\text{Fe}_8$ . D'aquesta manera, la unitat relaxadora no és, doncs, el clúster de  $\text{Fe}_8$ , sinó que suposem entitats independents formades per ions o complexos de  $\text{Fe}^{3+}$  units entre ells per ponts fosfat (vegeu la figura 4.21).

Les mesures de relaxació s'han dut a terme a dos camps diferents, a 0.24 T i a 7.05 T. Les mesures de relaxació  $T_1$  a 0.24 T es van fer en un relaxòmetre de la marca Stelar, que opera amb el següent rang de camp magnètic: 0.00024–0.24 T. Amb aquest tipus d'instruments no cal utilitzar dissolvents de referència. Els valors de  $T_1$  es van obtenir a partir de la seqüència d'inversió-recuperació.

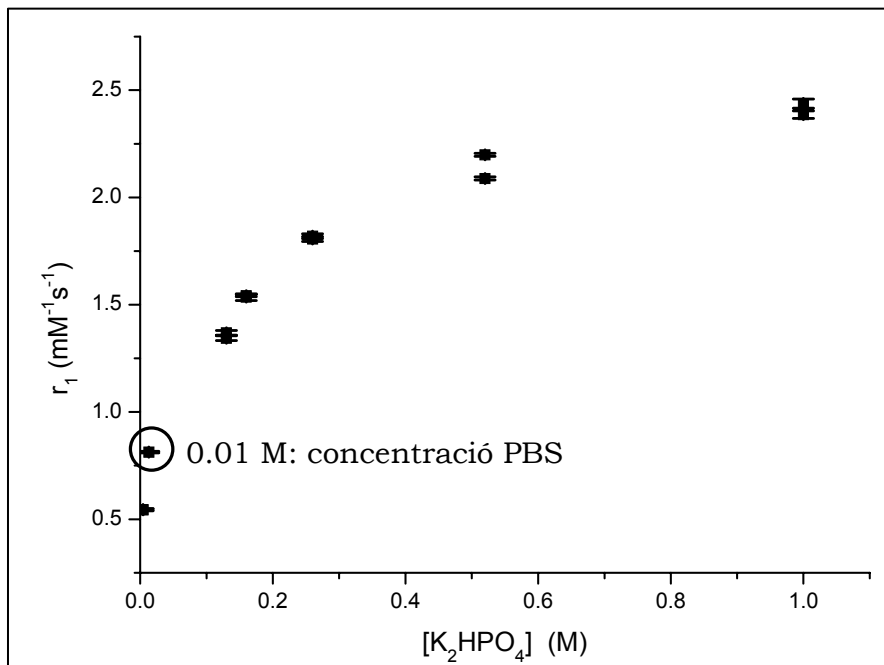
Les mesures de relaxació a 7.05 T es van prendre en un espectròmetre Bruker Avance300 on la seqüència utilitzada per mesurar el  $T_1$  va ser la seqüència d'inversió-recuperació i per al  $T_2$  la seqüència cpmg (seqüències descrites en el capítol 1). La temperatura ha estat de 298 K i el senyal del lock es va fer amb cloroform deuterat. Els paràmetres d'adquisició són els mateixos que els descrits en el capítol 3 (pàgina 55). Els espectres han estat processats amb el programa XWIN-NMR, versió 3.1.b.16. Les constants dels temps de relaxació es van obtenir mitjançant l'ajust de l'equació 1.6 en el cas del  $T_1$ , i en el cas del  $T_2$  de l'equació 1.7. Igual que en el capítol 3 per evitar el fenomen de la *radiation damping*<sup>1-2</sup> es va dipositar la mostra en tubs capil·lars d'1.5 mm i aquests dins de tubs de NMR d'5 mm amb cloroform deuterat.

### 5.1.2 Resultats

S'han mesurat els temps de relaxació  $T_1$  per a diferents solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$ , on la concentració de  $\text{Fe}_8$  per a totes les solucions ha estat d'1 mM, que equival a 2 mg de  $\text{Fe}_8/\text{ml}$ . Per a cada concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  s'ha mesurat el  $T_1$  corresponent i després s'ha expressat com a  $r_i$ , ja que  $r_i = (T_i)^{-1} \cdot [\text{Fe}_8]$ , on  $[\text{Fe}_8] = 1 \text{ mM}$ , encara que en aquest apartat s'ha expressat com a  $[\text{Fe}] = 8 \text{ mM}$ .



A la figura 5.1 es pot veure el comportament de la relaxivitat longitudinal en funció de la concentració de fosfat per a una concentració de  $\text{Fe}_8$  de 2 mg/ml a un camp magnètic de 0.24 T.

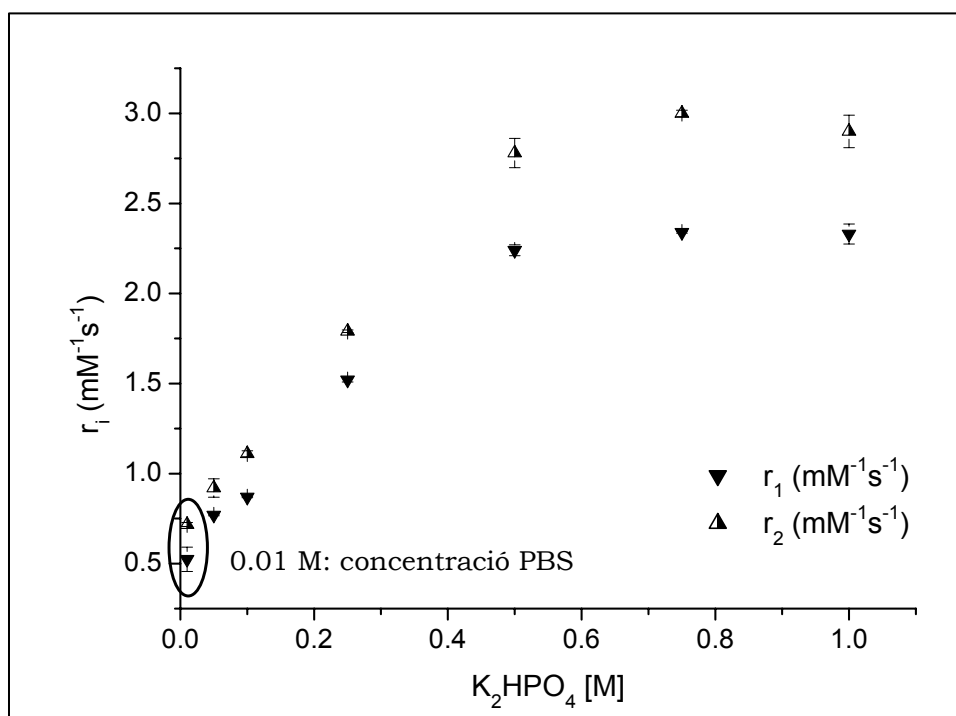


**Figura 5.1** Variació de la relaxivitat longitudinal d'una solució de  $\text{Fe}_8$  2 mg/ml amb la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 0.24 T i a 298 K. Cada concentració es va mesurar en dos experiments independents. Cada punt correspon a un experiment.

Tal com es pot observar a mesura que augmenta la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en el medi el valor de  $r_1$  augmenta considerablement, fins que a una concentració de 0.8–1 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $r_1$  assoleix el valor màxim de  $2.35 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ .

A la figura 5.2 es pot veure com varia la relaxivitat longitudinal i transversal d'una solució de  $\text{Fe}_8$  de 2 mg/ml amb la concentració de fosfat a 7.05 T i a 298 K, on igual que a camp magnètic de 0.24 T, tant els valors de  $r_1$  com els valors de  $r_2$  augmenten amb la concentració de fosfat.

En el capítol 3 es va trobar que en un camp magnètic de 9.4 T el valor de  $r_1$  de  $\text{Fe}_8$  en PBS era de  $5.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  per mM de  $\text{Fe}_8$ , és a dir, de  **$0.64 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  per mM de Fe** (on la concentració de la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en PBS és de 0.01 M). Per aquesta mateixa concentració de  $\text{Fe}_8$ , el valor obtingut de  $r_1$  per a un camp magnètic de 7.05 T d'una solució  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  és de  **$0.51 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  per mM de Fe**, és a dir tots dos valors de  $r_1$  són molt similars. En tots dos casos el valor de  $r_1$  es manté constant amb el temps, per tant, el fet que en el capítol 3 s'observés que la mesura de  $r_1$  d'una solució de  $\text{Fe}_8$  en PBS era estable amb el temps era exclusivament degut als fosfats de la sal fosfatada present en el PBS.



**Figura 5.2** Variació de les relaxivitats longitudinal i transversal d'una solució de  $\text{Fe}_8$  2 mg/ml amb la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a 7.05 T i a 298 K. Cada concentració es va mesurar en dos experiments independents. Cada punt correspon a la mitjana de tots dos experiments

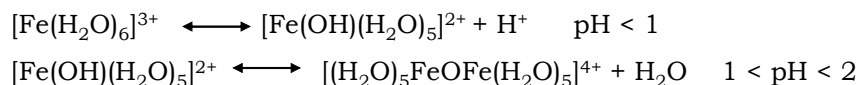
Tal com es va veure en el capítol 4 per a una concentració donada de  $\text{Fe}_8$  d'1 mM quan la concentració de la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  era inferior a 0.008–0.01 M els espectres UV-Vis variaven amb el temps, és a dir, les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  no eren estables amb el temps. Aquest resultat coincideix amb els resultats obtinguts en estudiar la dependència de la mesura de  $r_1$  amb el temps on s'ha vist que quan la concentració de fosfat és inferior a 0.008–0.01 M la mesura del valor de  $r_1$  no és estable amb el temps, és a dir, presenta un comportament molt similar a l'observat per a les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$ .

En endavant es descriuen les diferents mesures i els experiments portats a terme per esbrinar per què augmenta la relaxivitat longitudinal i transversal a mesura que augmenta la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  per a una concentració donada de  $\text{Fe}_8$ .

### Estudi del pH de les solucions $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$

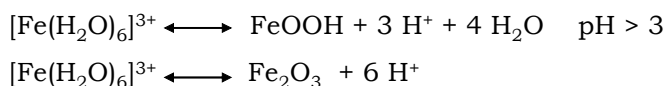
Es coneix que les sals de Fe(III) en solució aquosa produeixen solucions àcides i que per a valors de pH molt àcids predomina l'ió hexaaquo<sup>3</sup> (vegeu la figura 5.3).

A mesura que augmenta el pH cap a valors d'1-2, la solució inicialment lila pren un color groguenc ja que els ions Fe(III) s'hidrolitzen en aigua.



**Figura 5.3** Reaccions d'hidròlisi del Fe(III) en solució aquosa

L'addició d'una base o el tractament tèrmic augmenta el pH i resulta en espècies condensades fins que la solució pren un color vermellós a causa de la precipitació de l'hidròxid de ferro (III) <sup>4</sup>.

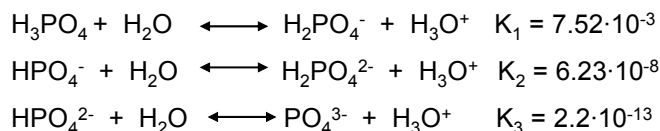


**Figura 5.4** Reaccions d'hidròlisi del Fe(III) en solució aquosa

Quan a una solució aquosa s'afegeixen 2 mg/ml de Fe<sub>8</sub>, el pH de la solució resultant és 5; tal com s'ha vist al capítol 4, la molècula de Fe<sub>8</sub> no és estable en solució aquosa i les mesures de toxicitat suggereixen l'existència d'ions Fe(III) amb posicions lliures que podrien hidrolitzar-se en aigua i formar espècies col·loïdals tipus gel Fe(OH)<sub>3</sub>·0.9H<sub>2</sub>O.

El pH d'una solució tamponadora de PBS (0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0.0017 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) és de 7.4; en presència d'una concentració de Fe<sub>8</sub> de 2 mg/ml el pH de la solució resultant augmenta fins a 10.52, és a dir, el PBS no és prou tamponador per mantenir el pH de la solució a pH neutre.

Els equilibris relacionats amb l'ió HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en solució aquosa són els següents (vegeu la figura 5.5):



**Figura 5.5** Reaccions d'equilibri dels grups HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en solució aquosa

A la taula 5.1 es pot veure com varia el pH de solucions de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> quan en el medi s'afegeixen 2 mg/ml de Fe<sub>8</sub>.

**Taula 5.1** Variació del pH de solucions fosfatades en presència de  $\text{Fe}_8$ 

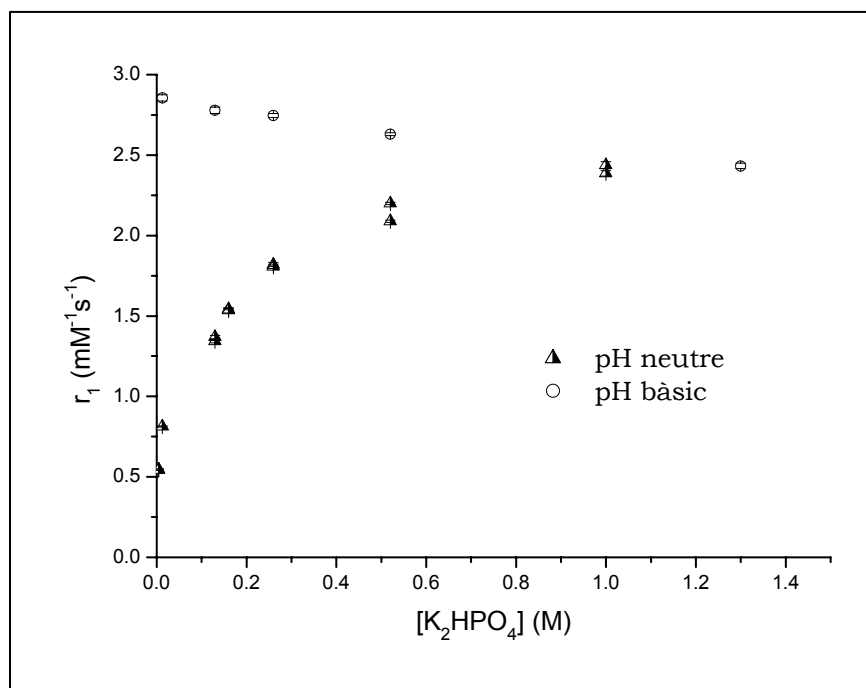
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (mM)	pH	pH + 2 mg/ml de $\text{Fe}_8$
0.001	8.33	6.40 ↓
0.002	8.46	6.90 ↓
0.008	8.63	9.03 ↑
0.01	8.90	10.03 ↑
0.05	9.04	8.43 ↓
0.1	9.10	7.64 ↓
0.5	9.14	7.66 ↓
1	9.3	7.5 ↓

Es pot veure, doncs, que, segons la relació entre la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i la concentració de  $\text{Fe}_8$ , el pH de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  varia. Inicialment el pH de les solucions de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  és bàsic. Aleshores, per a una concentració donada de  $\text{Fe}_8$  tenim que:

- 1) per a concentracions de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  inferiors a 0.008 M, el pH de la solució resultant és inferior al pH de les solucions de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , és a dir, que sembla que les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  presenten un comportament similar al  $\text{Fe}_8$  en solució aquosa (cal recordar que el pH d'una solució  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  era de 5)
- 2) quan el rang de concentracions de fosfat és entre 0.008 M i 0.01 M el pH de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  és superior al pH de les solucions inicials
- 3) per a concentracions superiors a 0.05 M el pH de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  comença a disminuir fins a pH neutre.

Si es considera el model en què els lligands fosfats es troben coordinats als ions de  $\text{Fe}(\text{III})$ , la interacció entre els grups fosfats i els àtoms metàl·lics dependrà del valor del pH. A la figura 5.6 es troba representat la dependència del valor de  $r_1$  d'una solució 2 mg/ml de  $\text{Fe}_8$  vs la concentració de fosfat, a un valor de pH de 12, i a pH neutre, mesurat a un camp magnètic de 0.24 T.

A pH bàsic, el valor de relaxivitat assoleix un valor màxim de  $2.75 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , que es manté més o menys constant en tot el rang de concentracions de fosfat estudiades. Tal com es va comentar en el capítol 3, a pH extrems la relaxivitat augmenta perquè l'intercanvi protònic es troba accelerat. En aquest cas, el fet que per a tot l'interval de concentracions de fosfat s'assoleix el mateix valor de  $r_1$  suggereix l'existència d'un mateix producte que presenta les mateixes propietats relaxomètriques. Cal destacar que en cap moment no es va observar un enterboliment de la solució ni cap precipitat.



**Figura 5.6** Estudi de la dependència del valor de  $r_1$  d'una solució de  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  2 mg/ml amb la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  a pH neutre i a pH bàsic (0.24 T).

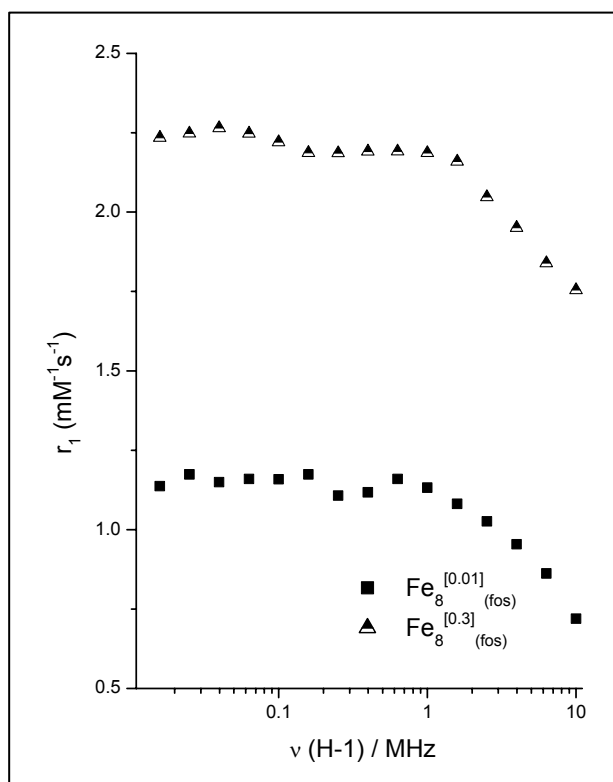
### NMRD profiles

L'estudi del comportament del paràmetre  $1/T_1$  en funció de la variació del camp magnètic s'anomena nuclear magnetic relaxation dispersion (NMRD) *profile*. La dependència de la relaxivitat dels nuclis d' $^1\text{H}$  amb el camp magnètic es troba determinada pels següents paràmetres:  $\tau_R$ ,  $\tau_M$ ,  $\tau_s$ ,  $q$  i  $r$ , tal com es va veure en les equacions de Solomon-Bloembergen (eq. 1.14).

En aquest treball, els NMRD perfils es van realitzar en un relaxòmetre Spinmaster FFC, fast field cycling, Stellar, que opera amb el següent rang de camp magnètic: 0.00024 – 0.24 T. A la Figura 5.6 es poden veure els NMRD *profiles* obtinguts per les següents solucions:  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i per  $\text{Fe}_8^{[0.3\text{M}]_{(\text{fos})}}$ .

El valor de  $r_1$  per totes dues concentracions es comporta de forma similar: a mesura que disminueix el camp magnètic augmenta el valor de  $r_1$ , comportament típic per solucions de complexos paramagnètics.

Tot i que a partir dels espectres NMRD profiles no es pot treure gaire informació addicional, ja que no es coneix l'estructura en solució, el que sí sembla és que es tracta de solucions de partícules para o superparamagnètiques de  $\text{Fe}^{3+}$ , resultat que està d'acord amb les mesures magnètiques de les solucions de  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ .



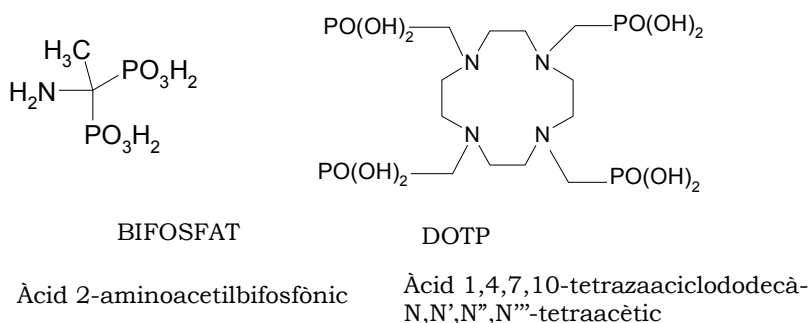
**Figura 5.7** NMRD *profiles* per les solucions fosfatades següents:  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]}$  i  $\text{Fe}_8^{[0.3\text{M}]}$  a 0.24 T.

Les conclusions que es poden extreure d'aquest estudi són que els fosfats interaccionen amb la molècula de  $\text{Fe}_8$ , determinant el producte en solució i que aquest depèn de la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . El producte que roman en solució relaxa de forma més eficient quan augmenta la concentració de sal fosfatada en solució i el mecanisme de relaxació dels nuclis d'H-1 sembla que correspon al dels agents de contrast paramagnètics,  $T_1$ . Per tal de que la mesura de  $r_1$  sigui estable la relació  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  ha de ser superior a **10**, i  $r_1$  assoleix el valor màxim quan la relació és igual a **1000**. Quan el pH de les solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  és bàsic el producte que roman en solució sembla ser el mateix però per raó de la complexitat de la química de l'ió  $\text{Fe}(\text{III})$  en solució no hem pogut extreure més conclusions.

### Interacció del $\text{Fe}_8$ amb altres lligands fosfat

Fins ara s'ha estudiat la interacció del  $\text{Fe}_8$  amb els anions  $\text{HPO}_4^{2-}$ . L'objectiu d'aquest apartat és l'estudi de la interacció de la molècula de  $\text{Fe}_8$  amb altres lligands orgànics fosfatats (sintetitzats en el grup del Prof. Aime de la Universitat de Torí) per comprovar si era possible aconseguir valors de relaxivitat més alts. A la figura 5.6 s'han representat esquemàticament els lligands, es tracta del

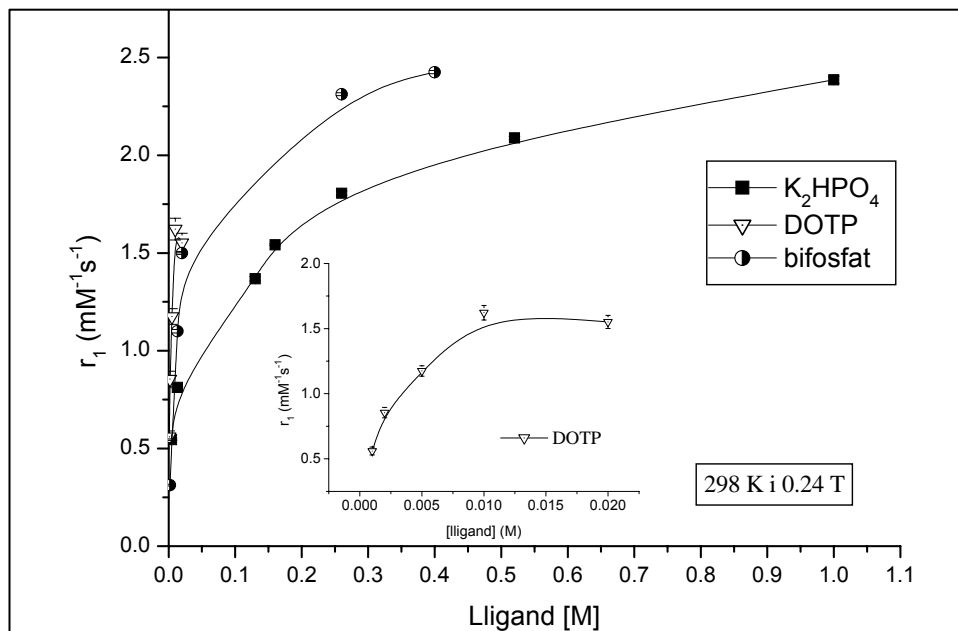
ligand DOTP, que té quatre grups fosfat, i el ligand bifosfat, amb dos grups fosfats.



**Figura 5.8** Dibuix esquemàtic dels lligands bifosfat i DOTP

Les solucions que calia estudiar es van preparar com les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ : 2 mg/ml de  $\text{Fe}_8$  en solució aquosa amb diferents concentracions dels lligands, on en aquest cas l'interval de concentracions de lligand estudiat ha estat inferior a l'estudiat per a la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , ja que s'ha tingut en compte el nombre de grups fosfats presents en l'estructura que podran interaccionar amb els centres metàl·lics; per al DOTP de: 0.002–0.02 M i per al bifosfat de: 0.004–0.4M.

A la figura 5.7 es compara el comportament dels lligands: bisfosfat, DOTP i fosfat.



**Figura 5.9** Comportament del valor de  $r_1$  d'una solució  $\text{Fe}_8$  2 mg/ml en funció de l'augment de concentració per als lligands bifosfat, DOTP i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . La figura inserida correspon al lligand DOTP. Per a cada concentració es van fer dos experiments independents. Cada punt correspon a la mitjana de tots dos experiments.

Es pot apreciar que el lligand DOTP que presenta quatre grups fosfats disponibles, la interacció amb els ions Fe(III) és molt forta i s'arriba a un valor de saturació molt més ràpid. En el cas del lligand bisfosfat, el comportament és intermediari entre el DOTP i els grups fosfats. En tots els casos les mesures eren estables amb el temps i no es va observar cap enterboliment de la solució. El pH de les solucions s'ha portat a pH neutre amb KOH i HNO<sub>3</sub> concentrat.

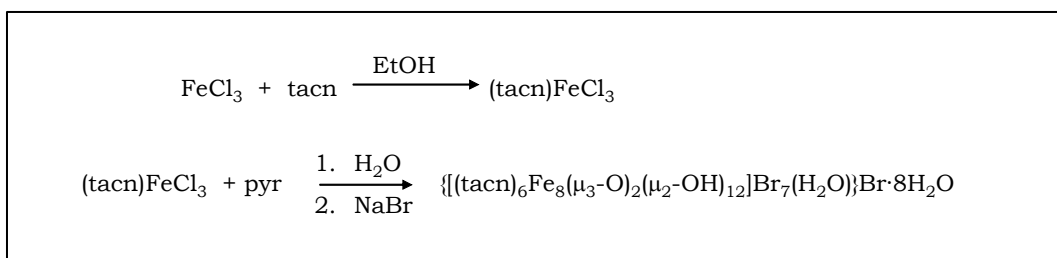
En resum, la molècula de Fe<sub>8</sub> en solució presenta una gran avidesa per als anions fosfat i la interacció és més forta a mesura que el lligand amb el que interacciona presenta més grups fosfats.

### 5.1.3 Avaluació dels precursors del Fe<sub>8</sub> com a agents de contrast

El Fe<sub>8</sub> en solució degut a la interacció amb grups fosfats permet obtenir un compost estable, el qual presenta unes propietats relaxomètriques que són sensibles a la concentració de fosfat. A fi d'intentar identificar els possibles productes de descomposició de la molècula de Fe<sub>8</sub> en solució es va decidir d'estudiar el comportament relaxomètric dels precursors del Fe<sub>8</sub>.

En un treball, encara no publicat, el Dr. Jerschow<sup>5</sup> afirma que a partir de mesures d'RMN d'H-1 part de la molècula de Fe<sub>8</sub> es descompon en solució aquosa en el seu precursor, la sal mononucluear (tacn)FeCl<sub>3</sub>.

La síntesi del Fe<sub>8</sub>, descrita en el capítol 2 d'aquest treball, es pot veure en l'esquema següent:



**Figura 5.10** Esquema de la síntesi de Fe<sub>8</sub>



**Avaluació dels precursors  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , tacn i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  com a agents de contrast**

L'objectiu d'aquest apartat era avaluar el comportament dels precursors del  $\text{Fe}_8$  directament com a agents de contrast, és a dir, la mescla dels ions  $\text{Fe}(\text{III})$  i l'amina tacn en solucions fosfatades. Com a precursor dels ions  $\text{Fe}(\text{III})$  es va utilitzar la sal  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  ja que com es pot veure a la figura 5.10 el contraanió de la sal de  $\text{Fe}(\text{III})$  no intervé en la reacció. Es van fer tres estudis amb tres estequiometries diferents:

**Prova 1:** 8 Fe: 6 tacn (estequiometria present en el  $\text{Fe}_8$ )

**Prova 2:** 8 Fe: 8 tacn (estequiometria 1:1)

**Prova 3:** 8 Fe: 16 tacn (estequiometria 1:2)

La preparació de les solucions va ser la mateixa a totes tres proves: primerament es va dissoldre el nitrat de Fe i l'amina en una solució aquosa, i a continuació es va afegir en sòlid la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . La preparació de les solucions s'ha de fer en aquest ordre perquè si l'amina tacn no hi és present, precipita l'hidròxid de Fe. El pH de totes les solucions es va portar a pH neutre. Els valors de  $r_1$  obtinguts a un camp magnètic de 0.24 T es poden veure a les taules 5.2, 5.3 i 5.4, per a les diferents proves, on les  $r_1$  han estat expressades en mM de Fe. A la taula 5.5 es troben els resultats obtinguts per a solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  amb la mateixa concentració de Fe que a totes tres proves.

**Taula 5.2** Valors de  $r_1$  per a les solucions de la prova 1 a 0.24 T i a 298 K

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (M)	0.01	0.1	0.2	0.8	1
$r_1$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	0.58	0.9	1.25	2.23	1.73
					2.3*

\* mesura al cap d'una hora

**Taula 5.3** Valors de  $r_1$  per a les solucions de la prova 2 a 0.24 T i a 298 K

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (M)	0.01	0.1	0.2	0.8	1
$r_1$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	0.74	1.1	1.34	1.35	1.41
				1.58*	1.49*
				1.81**	1.96**
					2.31***

\* mesura al cap d'una hora; \*\* mesura al cap de 24 hores; \*\*\* mesura al cap de 48 hores

**Taula 5.4** Valors de  $r_1$  per a les solucions de la prova 3 a 0.24 T i a 298 K

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (M)	0.01	0.1	0.2	0.8	1
$r_1$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	0.69	0.96	1.11	1.23	1.5
				1.35*	1.57*
				1.4**	1.39**

\* mesura al cap d'una hora; \*\* mesura al cap de 24 hores; \*\*\* mesura al cap de 48 hores

**Taula 5.5** Valors de  $r_1$  per a solucions de  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  expressats per mM de Fe

$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (M)	0.01	0.1	0.2	0.8	1
$r_1$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	0.81	1.35	1.75	2.3	2.4

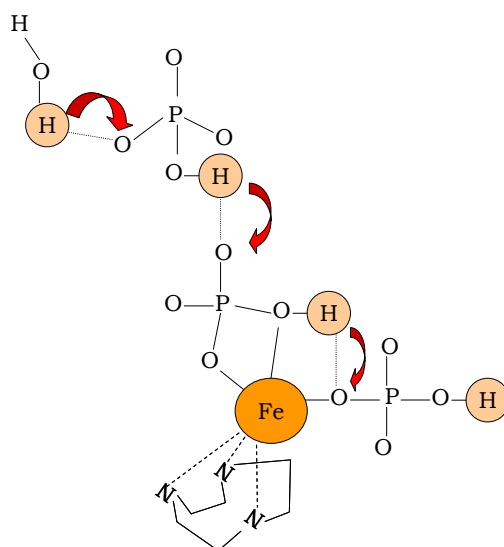
Sorprenentment, a partir dels resultats es pot comprovar que els valors de  $r_1$  obtinguts més similars a aquells que presenten les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  (vegeu la taula 5.5) són els corresponents a la prova 1, és a dir, quan la relació entre els ions de  $\text{Fe}(\text{III})$  i d'amina és la corresponent en la molècula de  $\text{Fe}_8$ . En la prova 1 es va observar que la solució corresponent a la concentració de fosfat d'1 M inicialment era groga amb un valor de  $r_1 = 1.73 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , però amb el temps la solució s'anava tornant incolora, i al cap d'una hora es va tornar a mesurar el valor de  $r_1$  i es va obtenir un valor constant amb el temps de  $2.3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ . En el cas de la prova 2 els valors de  $r_1$  augmentaven amb el temps; finalment, assolien uns valors de  $r_1$  similars a la prova 1. La prova 3, on la relació entre el Fe i la tacn era 1:2, tot i que variava el valor de  $r_1$  augmentava amb el temps, els valors de  $r_1$  no van assolir els valors obtinguts per a les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ .

Els resultats d'aquest apartat suggereixen que les solucions que es preparen a partir dels precursors,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  i tacn en medi fosfat presenten un comportament relaxomètric similar al comportament de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ , quan l'estequiometria entre els ions  $\text{Fe}(\text{III})$  i la tacn és la corresponent a la de la molècula de  $\text{Fe}_8$ , és a dir, 8:6, respectivament. Però, a diferència de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  on la formació del producte resultant de la interacció entre la molècula de  $\text{Fe}_8$  i els grups fosfats tenia lloc ràpidament i no era observable cap canvi fisicoquímic, en aquest cas, els canvis en les solucions dels precursors sí que han estat apreciables, la qual cosa suggereix una cinètica de formació del compost en solució més lenta.

### 5.1.4 Discussió dels resultats

Per què augmenten els valors de  $r_1$  i  $r_2$  amb la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  quan es manté constant la concentració de  $\text{Fe}_{8}$ ? Amb la finalitat de poder interpretar les dades correctament s'hauria de conèixer l'estructura cristal·lina del compost o compostos que existeixen en les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ . Com que no ha estat possible aïllar un cristall d'aquest compost, s'haurà de veure quins són els possibles paràmetres que poden influir en  $r_1$ . Segons les mesures magnètiques i la relació entre els valors de  $r_2/r_1$  obtinguda anteriorment, les solucions fosfatades presenten un comportament paramagnètic a temperatura ambient i per tant es comporten com agents de contrast  $T_1$ . No es tenen proves que evidencien quin és el tipus de mecanisme d'interacció entre les molècules d'aigua i els ions de  $\text{Fe(III)}$ . Tal com es va explicar en el capítol 1 els paràmetres que afecten la relaxivitat per un mecanisme d'esfera interna o segona esfera eren els següents:

- Molècules d'aigua coordinades directament al metall, q: segons la hipòtesi formulada de les noves espècies formades en solució de la interacció entre la molècula i els grups fosfats, no hi ha molècules d'aigua coordinades directament als ions  $\text{Fe(III)}$  (vegeu la figura 4.21). Els fosfats presenten una avidesa molt gran per les molècules d'aigua, per tant, podria ocórrer que els grups fosfats actuessin com a ponts entre els ions metàl·lics i les molècules d'aigua en equilibri dinàmic i, per tant, a mesura que augmenta la concentració de fosfats al voltant de l'ió  $\text{Fe(III)}$ , més molècules d'aigua serien accessibles als ions  $\text{Fe(III)}$  i, per consegüent, la  $r_1$  augmentaria (vegeu la figura 5.11).



**Figura 5.11** Possible mecanisme de relaxació dels nuclis de les aigües mitjançant els grups fosfat per un mecanisme de segona esfera

A la bibliografia es troba descrit que el complex fluoromethemoglobina, on l'ió  $\text{Fe(III)}$  no té cap molècula d'aigua coordinada directament, presenta una  $r_1$  més alta que la methemoglobina, que té una molècula d'aigua coordinada directament a un  $\text{Fe(III)}$ <sup>6,7</sup>. La molècula d'aigua en la methemoglobina s'intercanvia molt lentament amb el medi (presenta un  $\tau_M$  gran), així doncs, la  $r_1$  no és molt alta. En canvi, en la fluoromethemoglobina el  $\text{F}^-$  fa pont d'hidrogen amb les molècules d'aigua, situant-les a una distància tal que l'ió  $\text{Fe(III)}$  relaxa els nuclis d' $^1\text{H}$  de forma molt efectiva. Així doncs la fluoromethemoglobina relaxa de forma més eficient per un mecanisme de segona esfera que la methemoglobina que relaxa per un mecanisme d'esfera interna.

- Moment magnètic del metall,  $\mu$ : en el capítol 4 es van mesurar les propietats magnètiques per dues solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ :  $\text{Fe}_{8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}}$  i  $\text{Fe}_{8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}}$  respectivament, i es va observar que el comportament magnètic de totes dues solucions era molt diferent a baixa temperatura. A temperatura ambient però, totes dues solucions presenten un comportament paramagnètic o superparamagnètic similar, per tant, sembla que el diferent comportament magnètic no influeix en l'augment de relaxació.
- La mida de partícula,  $\tau_R$ : per a aquells complexos que relaxen per un mecanisme d'esfera interna o segona esfera, quan el complex augmenta en mida o interacciona amb una macromolècula de caire biològic o químic, augmenta el seu temps de rotació i s'incrementa la relaxivitat. A partir dels resultats obtinguts per l'espectroscòpia Mössbauer per dues solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ ,  $\text{Fe}_{8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}}$  i  $\text{Fe}_{8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}}$ , amb una relació  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  de 10 i 200 respectivament, es va veure que així com la mostra diluïda en fosfats presentava un comportament paramagnètic o superparamagnètic a 4 K, quan s'augmentava la concentració de fosfats s'observava un 25% de l'àrea total ordenada magnèticament. Es pensa que aquest és el paràmetre clau de l'augment de la relaxivitat, és a dir, que els lligands fosfats creen partícules col·loïdals amb una mida inferior a 5 nm amb una estequiometria tipus,  $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{HPO}_4)_n(\text{tacn})]_m$  que augmenten en mida a mesura que augmenta la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Caldria mesurar la solució  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  amb una relació 1:1000 per tal de comprovar si hi ha més ordenament magnètic. Els resultats preliminars de les mesures de transmissió electrònica de solucions diluïdes en fosfat, tal com es van comentar en el capítol 4, mostraven partícules de mida inferior a 25 nm d'aparença amorfa i altres de mida al voltant de la micra

que eren cristal·lines però corresponien a un tipus de fosfat de potassi. Respecte a la mostra més concentrada en fosfat, igual que la mostra anterior hi havien partícules de l'ordre de la micra d'aspecte cristal·lí. Aquestes partícules van ser analitzades posteriorment en un espectròmetre de dispersió de raigs X i no es va observar que l'ió Fe fos present, però cal recordar que la relació entre ions  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i ions Fe(III) és de 1000 : 8.

Com s'ha comentat en el capítol 1, l'ús de les partícules d'òxid de ferro com agents de contrast  $T_2$  es troba àmpliament descrit a la bibliografia. Aquest tipus de partícules afecten el  $T_2$  a causa de l'elevat moment magnètic que presenten, resultant en un augment de la deshomogeneïtat del camp magnètic que perceben els nuclis d'H-1 i per tant disminuint el  $T_2$ . Actualment s'han descrit partícules d'òxid de ferro (III) de mida nanomètrica que, tot i que afecten al  $T_2$  també disminueixen el  $T_1$ . El mecanisme de relaxació doncs, és diferent al descrit per els agents de contrast paramagnètics. Es tracta de les nanopartícules SPIO i USPIO; a la taula 5.6 es poden veure valors de  $r_1$  i  $r_2$  per aquest tipus de partícules<sup>8-11</sup>.

**Taula 5.6** Valors de  $r_1$  i  $r_2$  per partícules d'òxid de ferro (III)

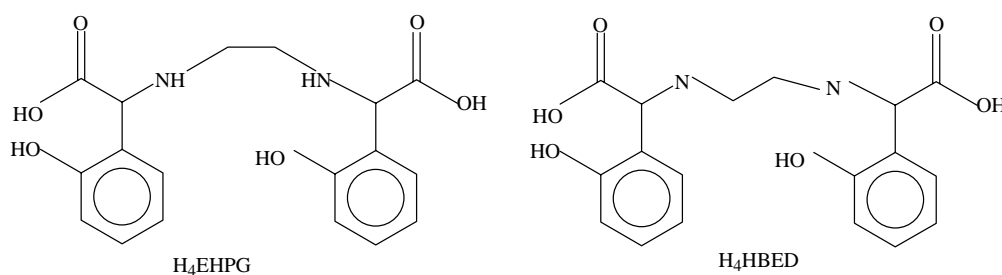
compost	mida (nm)	$r_1$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$r_2$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$r_2/r_1$	$B_0$ (T)
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	$1 \cdot 10^3$	0.21	8.86	42.2	1.4
SPIO (AMI-25)	5	22	100	4.5	0.5
USPIO (AMI-227)	4	23	53	2.3	0.5
$[\text{Fe}_8^{1\text{M}}]_{(\text{fos})}$	< 5	2.5	3	1.2	0.24

Tal com es pot veure a la taula 5.6 les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  presenten un comportament més similars als agents de contrast paramagnètics típics. Amb la finalitat de comparar l'eficiència com a agent de contrast d'aquest nou sistema, a la taula 5.7 es poden veure els valors de  $r_1$  per a compostos mononuclears de Fe(III) de segona esfera, és a dir, que no presenten cap molècula d'aigua coordinada directament al metall descrits a la bibliografia. Aquest tipus de compostos presenten el desavantatge que en no presentar una molècula d'aigua coordinada els valors de  $r_1$  són inferiors a aquells presentats per complexos on  $q \neq 0$ , però, en canvi, els compostos de Fe(III) amb una posició lliure poden coordinar substrats biològics o catalitzar processos biològics i, per tant, presenten un perill per ser administrats<sup>12</sup>. S'ha inclòs el complex  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$ , amb  $q = 1$  i dues solucions de  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  per comparar.

**Taula 5.7** Valors de  $r_1$  per compostos mononuclears de Fe(III)

Complex	$r_1$ ( $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	q	Camp magnètic (T)
$[\text{Fe}(\text{EHPG})]^-$	0.95	37	0	0.48
$[\text{Fe}(\text{HBED})]^-$	1.1	37	0	0.48
Fe-DTPA-dextran	5	37	0	0.24
$[\text{Fe}(\text{DOTA})]^-$	0.4	40	0	0.4
$\text{Fe}^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$	0.55	25	0	0.24
$\text{Fe}^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$	2.35	25	0	0.24
$[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$	2.5	37	1	0.48

Tal com es pot veure a la taula 5.7, en general, tots els compostos amb  $q = 0$  presenten un valor de  $r_1$  al voltant d'1  $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  o inferior, excepte el complex  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$  i el Fe-DTPA-dextran. El fet que el compost  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$  presenti un valor de relaxivitat més alt és deu al fet que té una molècula d'aigua coordinada directament al metall. El complex Fe-DTPA-dextran també presenta un valor de  $r_1$  alt perquè el complex Fe-DTPA s'ha coordinat al polímer dextran, augmenta la mida de partícula i, per tant, augmenta el temps de correlació rotacional,  $\tau_R$ , i incrementant el valor de  $r_1$ . A la figura 5.12 s'han representat esquemàticament els lligands  $\text{H}_4\text{EHPG}$  i  $\text{H}_4\text{HBED}$ , els lligands EDTA i DTPA es troben representats a la figura 1.25.

**Figura 5.12** Dibuix esquemàtic dels lligands  $\text{H}_4\text{EHPG}$ , etilenbis(2-hidroxi-fenilglicina) i  $\text{H}_4\text{HBED}$ , àcid  $\text{N},\text{N}'$ -bis(2-hidroxi-benzil)etilendiamina- $\text{N},\text{N}'$ -diacètic.

## 5.2 Estudis de toxicitat

En el capítol 3 es van avaluar els efectes tòxics de la molècula de  $\text{Fe}_8$ , i es va observar que l'existència d'ions  $\text{Fe(III)}$  lliures provocava una certa activitat oxidativa intracel·lular segons la reacció de Fenton. L'objectiu d'aquest apartat és l'estudi de la toxicitat de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ , que anteriorment s'han avaluat com a agents de contrast. Els estudis de toxicitat s'han dut a terme en la línia cel·lular tumoral de glioma de rata, C6, igual com es va fer en el capítol 3. El mètode que s'ha utilitzat per estudiar els efectes tòxics de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  ha estat l'assaig LDH<sup>13</sup>.

### 5.2.1 Materials i mètodes

Els reactius, així com l'explicació del fonament de l'assaig LDH, s'expliquen a la pàgina 57 del capítol 3. En primer lloc es va estudiar quins eren els efectes tòxics de la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en la línia C6. L'interval de concentracions estudiat va ser entre 0.001–0.75 M. Es van preparar les solucions en el medi de cultiu Ham's F-12, i el pH es va ajustar a pH neutre.

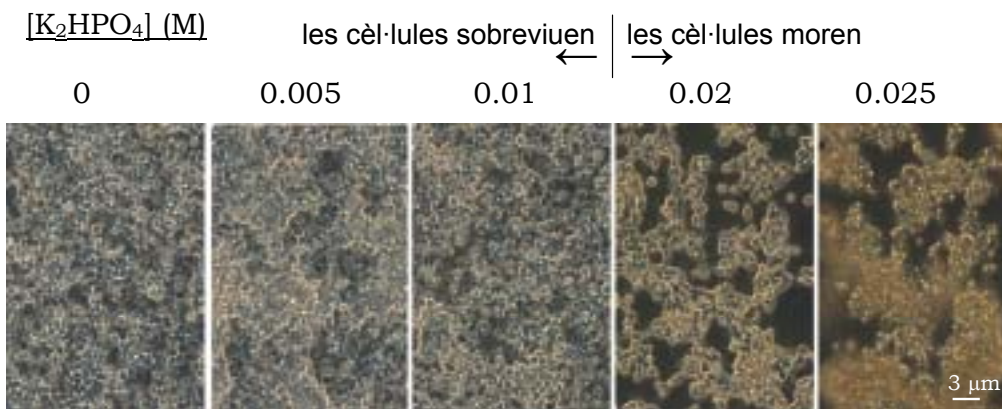
A continuació es van estudiar els efectes tòxics de solucions  $\text{Fe}_{8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}}$ ; és a dir, es va mantenir la concentració fixa de sal,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 0.01 \text{ M}$ , i es va variar la concentració de  $\text{Fe}_8$ , de 0.1 a 1.5 mM. Paral·lelament es van estudiar els efectes tòxics per aquest mateix rang de concentracions de  $\text{Fe}_8$  però sense afegir al medi  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , és a dir, es van repetir els experiments del capítol 3. Les solucions  $\text{Fe}_{8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i les solucions de  $\text{Fe}_8$  es van preparar en el medi de cultiu Ham's F-12. El pH de les solucions es va ajustar a pH neutre.

Un cop les cèl·lules havien crescut a confluència, es va extreure el medi i es va tractar amb les diferents solucions durant un període de 72 hores.

En aquest cas els resultats de l'assaig LDH s'han expressat com a increment d'unitats de densitat òptiques per minut,  $\Delta\text{OD}/\text{min}$ , és a dir, a partir del pendent de representar la disminució de l'absorbància a 340 nm per cada medi dels diferents pous per minut. No s'ha tingut en compte el valor de l'activitat de la LDH alliberada per les cèl·lules. Cal recordar que a mesura que augmenta l'activitat enzimàtica, augmenta el quocient  $\Delta\text{OD}/\text{min}$  i, per tant augmenta el percentatge de mortalitat.

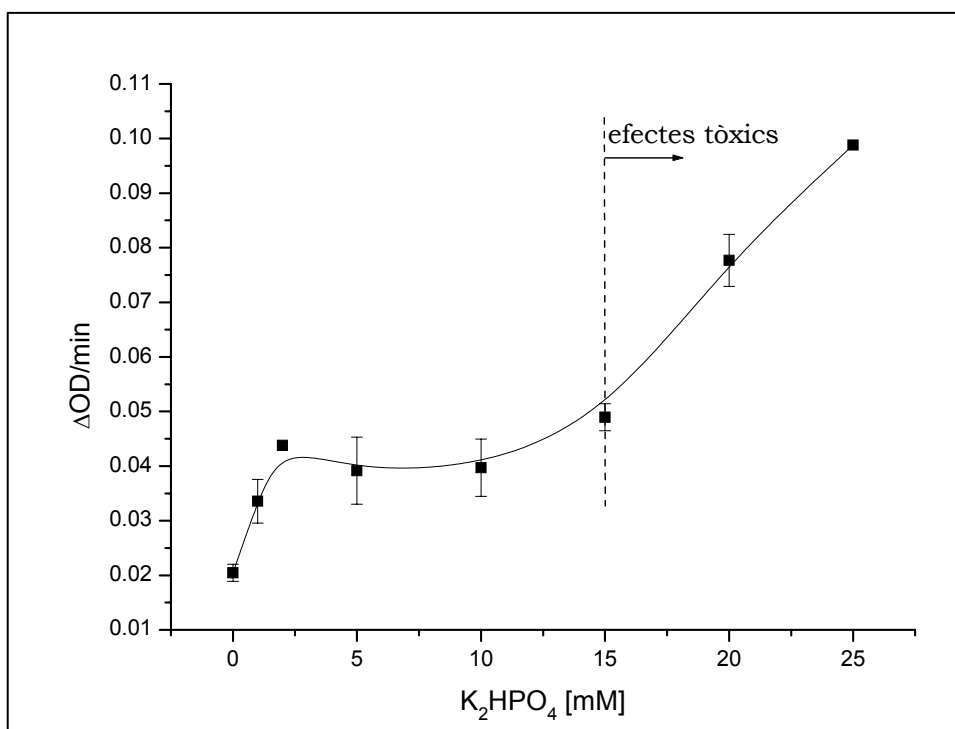
### 5.2.2 Resultats

En primer lloc es van estudiar els efectes tòxics de la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  en el següent interval de concentracions: 0.001–0.75 M per a un període de 72 hores. A la figura 5.13 es poden veure cinc fotografies corresponents a cinc cultius cel·lulars amb concentracions diferents de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , on a partir d'una concentració de 0.02 M les cèl·lules moren i es comencen a veure precipitats.



**Figura 5.13** Imatges de les cèl·lules tractades durant 72 hores amb concentracions creixent de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

A la figura 5.14 es pot veure que per a concentracions de fosfats superiors a 15 mM la toxicitat augmenta notablement.

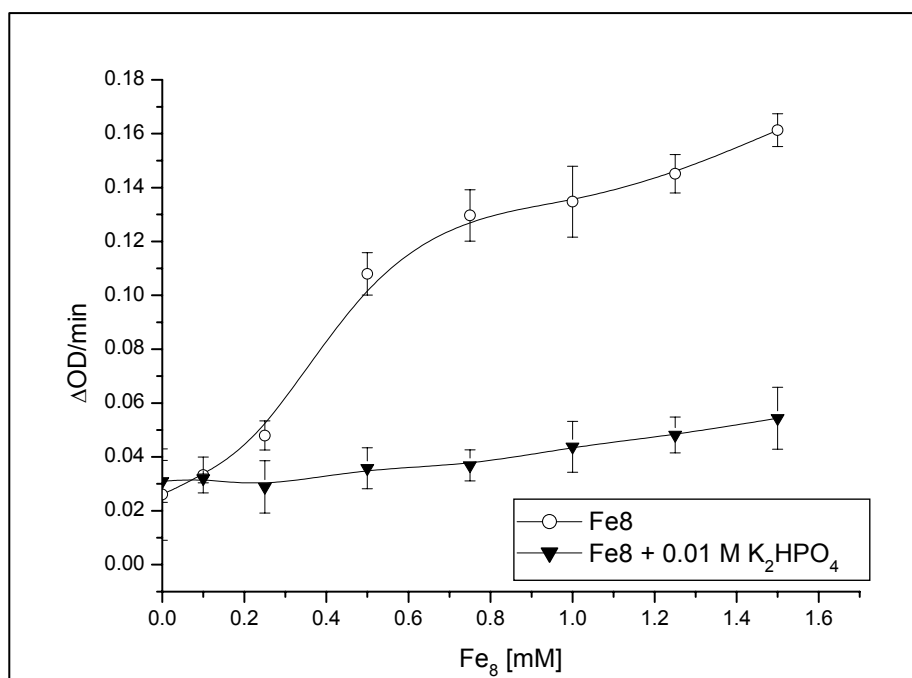


**Figura 5.14** Assaig LDH de cultius cel·lulars tractats amb diferents concentracions de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  durant 72 hores. Cada punt correspon a la mitjana de 4 determinacions de dos experiments independents



En endavant s'exposen els resultats obtinguts quan a les diferents solucions de  $\text{Fe}_8$  s'afegeix una concentració fixa de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  de 0.01 M, que, com s'ha vist a la gràfica 5.12, no és tòxica.

A la figura 5.15 es poden veure els valors experimentals obtinguts per l'assaig LDH en referència a solucions  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$ , és a dir, solucions amb diferent concentració de  $\text{Fe}_8$  on s'ha afegit 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . A cap concentració de  $\text{Fe}_8$  estudiada no s'ha observat cap efecte tòxic ja que el valor de l'activitat enzimàtica és igual per a tot el rang de  $[\text{Fe}_8]$  i igual al que presenta el control ( $[\text{Fe}_8] = 0$ ). A la mateixa gràfica també es troba representat el comportament de les solucions  $\text{Fe}_8$  sense l'addició de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i, en aquest cas, es pot veure que a mesura que augmenta la concentració de  $\text{Fe}_8$  augmenten els efectes tòxics (aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en el capítol 3).

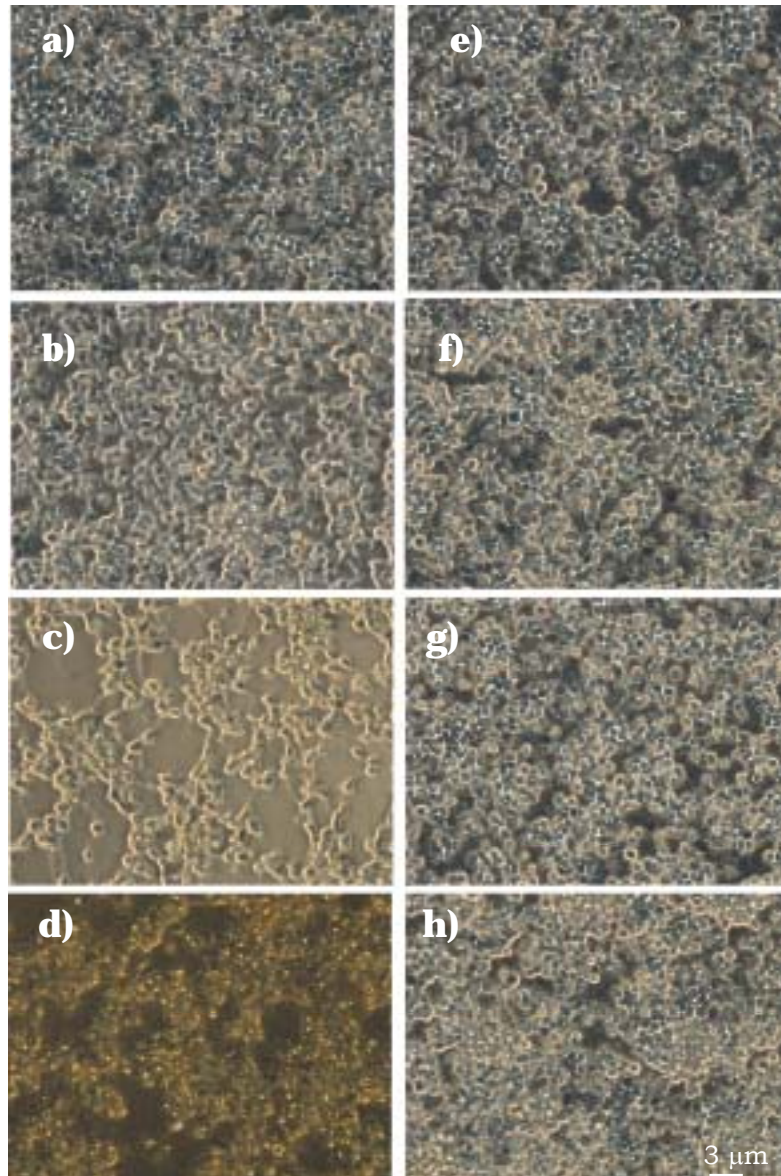


**Figura 5.15** Assaig LDH d'un cultiu cel·lular tractat amb diferents concentracions de  $\text{Fe}_8$  durant 72 hores. On a la meitat dels pous s'hi va afegir 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Cada punt correspon a la mitjana de 4 determinacions de dos experiments independents

A la figura 5.16 es poden veure les fotografies obtingudes en un microscopi invertit en contrast de fase d'un cultiu cel·lular tractat amb diferents concentracions de  $\text{Fe}_8$ , en absència (figura 5.14 a), b), c) i d)) i en presència de 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (figura 5.14 e), f), g) i h)).

Quan s'estudia la morfologia de les cèl·lules que han estat tractades amb  $\text{Fe}_8$  durant 72 hores es veu que es comencen a manifestar efectes tòxics a partir d'1

mM de  $\text{Fe}_8$ , tal com ja s'havia indicat en el capítol 3. En canvi, aquells cultius cel·lulars que han estat tractats amb solucions  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]}$ , és a dir, on també hi era present una certa concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , en aquest cas de 0.01 M, no s'observa cap canvi en la morfologia dels cultius cel·lulars respecte del control.



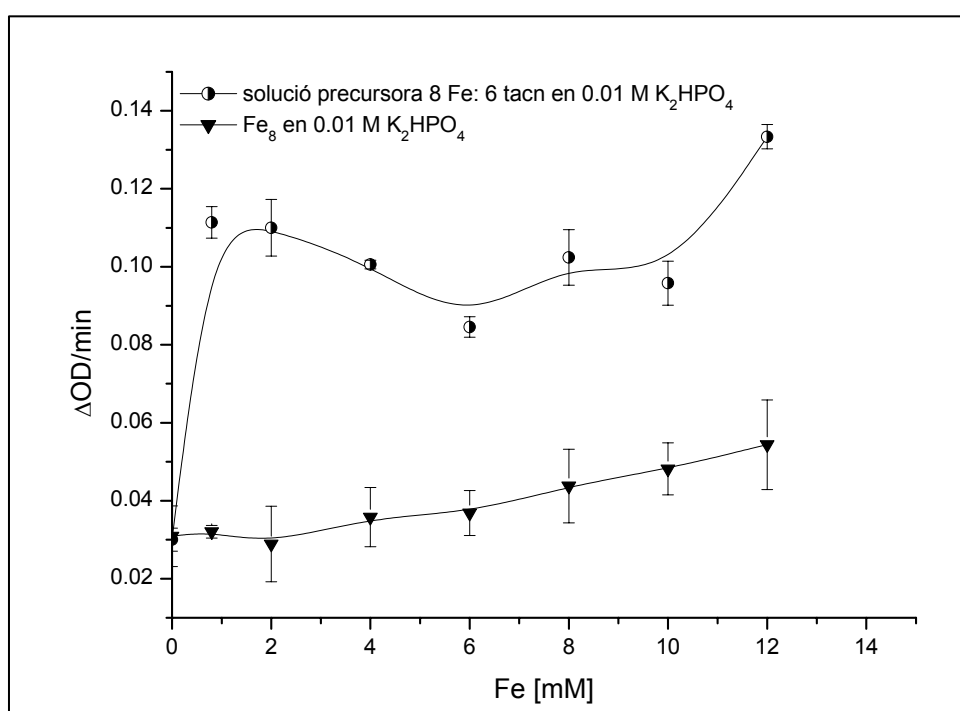
**Figura 5.16** Imatges obtingudes de cèl·lules tractades durant 72 hores amb: a) 0 mM de  $\text{Fe}_8$ ; b) 0.25 mM de  $\text{Fe}_8$ ; c) 1 mM de  $\text{Fe}_8$ ; d) 1.5 mM de  $\text{Fe}_8$ ; e) 0 mM de  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]}$ ; f) 0.25 mM de  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]}$ ; g) 1 mM de  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]}$ ; h) 1.5 mM de  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]}$

### **Avaluació de la toxicitat de la solució precursora**

En aquest apartat es mostren els resultats obtinguts en avaluar la toxicitat de la solució precursora corresponent a la prova 1, on l'estequiometria era de  $8 \text{Fe}^{3+} : 6 \text{tacn}$ , en una solució aquosa 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  durant un període de 72 hores.

El rang de concentracions estudiades de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  ha estat el següent: 0.8–12 mM, i per poder comparar els resultats amb les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ , s'ha multiplicat per vuit el rang de concentracions dels experiments anteriors. A continuació s'hi ha afegit l'amina corresponent a la relació estequiomètrica 8  $\text{Fe}^{3+}$ : 6 tacn i, finalment, s'ha afegit a totes les solucions 0.01 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Les solucions es van preparar en el medi de cultiu Ham's F-12 i, el pH es va ajustar a pH neutre.

A la figura 5.17 es poden veure els valors experimentals obtinguts per l'assaig LDH en referència a la prova 1 amb una concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  de 0.01 M. Totes les concentracions presenten efectes tòxics.



**Figura 5.17** Assaig LDH d'un cultiu cel·lular tractat amb diferents concentracions de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  durant 72 hores. A la meitat dels pous s'hi va afegir 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Cada punt correspon a la mitjana de dues determinacions d'un experiment

Les conclusions extreïdes dels estudis de toxicitat portats a terme en la línia cel·lular C6 glioma en aquest apartat són: 1) solucions aquoses de  $\text{Fe}_8$  no presenten efectes tòxics quan en el medi de cultiu és present una certa concentració de fosfats (> 0.01 M) evitant així l'existència d'ions  $\text{Fe}^{3+}$  lliures. Per tant, els grups fosfats anul·len els efectes tòxics de cultius cel·lulars tractats amb  $\text{Fe}_8$ , 2) la concentració de fosfat màxima que no presenta efectes tòxics és 0.015 M considerant un període d'incubació de 72 hores i 3) solucions aquoses de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  i tacn, amb la relació estequiomètrica 8:6 respectivament, presenten efectes tòxics per tot el rang de Fe estudiat, tot i que en el medi sigui present

0.01 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Aquests últims resultats cal prendre'ls amb un cert grau d'incertesa ja que només es va fer un experiment.

## 5.3 Obtenció d'imatges

En aquest apartat es descriuen les imatges potenciades en T-1 obtingudes de nuclis d'H-1 de solucions Fe<sub>8(fos)</sub>. L'objectiu d'aquest estudi era comprovar com augmenta el contrast en les imatges a mesura que augmenta la concentració de fosfats mantenint una concentració fixa de Fe<sub>8</sub>.

### 5.3.1 Materials i mètodes

Les imatges d'RM s'han pres en un espectròmetre Bruker AMX-400-WB equipat amb un accessori de mini-imatge i utilitzant el programari XWinNMR versió 2.6 i Paravision versió 2.1 (Bruker Espanyola, S A, Espanya). Les imatges potenciades en T<sub>1</sub> es van obtenir utilitzant la seqüència de pols spin-eco, SE, on el temps TE es manté constant amb un valor de 15 ms, mentre que per al TR s'han pres entre 15000 i 50 ms. Altres paràmetres: mida de la matriu de 128×128; camp de visió (FOV) de 25×25 mm<sup>2</sup>; gruix de 2 mm; nombre d'excitacions (NEX) d'1; amplada de finestra de 50 kHz; pols d'excitació, sinc3, 3500 μs. Tal com es va explicar al capítol 3, per calcular el percentatge d'augment de la intensitat (ΔIE) es calcula a partir de l'equació següent:

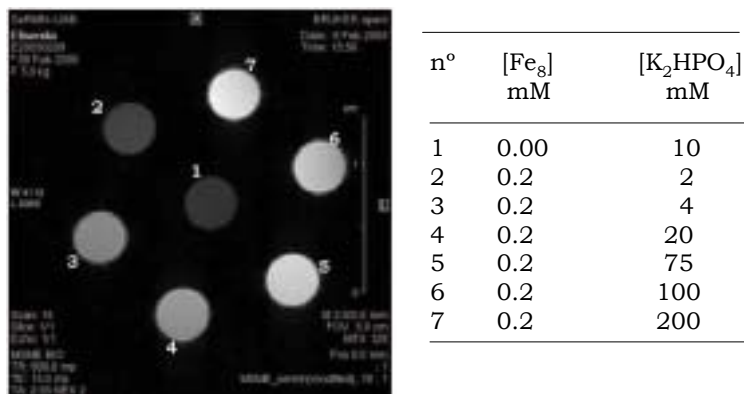
$$\Delta IE = (\hat{I}_c - \hat{I}_0) / \hat{I}_0 * 100 \quad (\text{eq. 5.1})$$

on  $\hat{I}_c$  i  $\hat{I}_0$  són les intensitats de les imatges obtingudes en presència d'agent de contrast i en absència, respectivament.

En el capítol 3 es van enregistrar les imatges potenciades en T<sub>1</sub> de les concentracions de Fe<sub>8</sub> següents: 0.2, 0.4 i 0.9 mM. En aquest apartat la concentració de Fe<sub>8</sub> s'ha fixat en 0.2 mM, la més baixa, i l'interval d'estudi de la sal K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ha estat entre 2 mM – 200 mM. El pH de les solucions resultants ha estat ajustat a pH neutre. Per tal de mostrar que els fosfats per si mateixos no presenten propietats relaxomètriques s'ha pres una solució 0.01 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> com a control.

### 5.3.2 Resultats

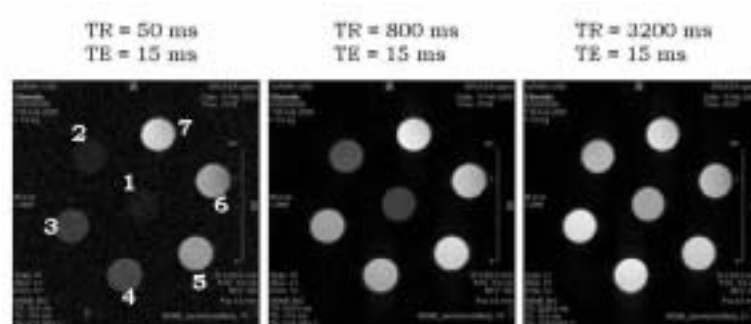
La figura 5.18 mostra l'augment de la intensitat del senyal a mida que augmenta la concentració de fosfat a partir d'una imatge potenciada en  $T_1$  amb un TR de 600 ms i un TE de 15 ms a 9.4 T.



**Figura 5.18** Imatge potenciada en  $T_1$  per concentracions creixents de fosfat a 9.4 T

Com es pot veure, per la solució nº2, 0.2 mM de  $\text{Fe}_8$  en 2 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , ja s'observa un lleuger augment de la brillantor respecte a la solució nº1, [ $\text{Fe}_8$ ] = 0 en 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . A mesura que augmenta la concentració de fosfat augmenta la intensitat de les imatges fins que, com es veurà en la figura 5.19, per una concentració de 200 mM s'arriba a un valor màxim de saturació, és a dir, quan la relació entre  $\text{Fe}_8$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  és 1:1000 (tal com s'havia vist en la figura 5.1).

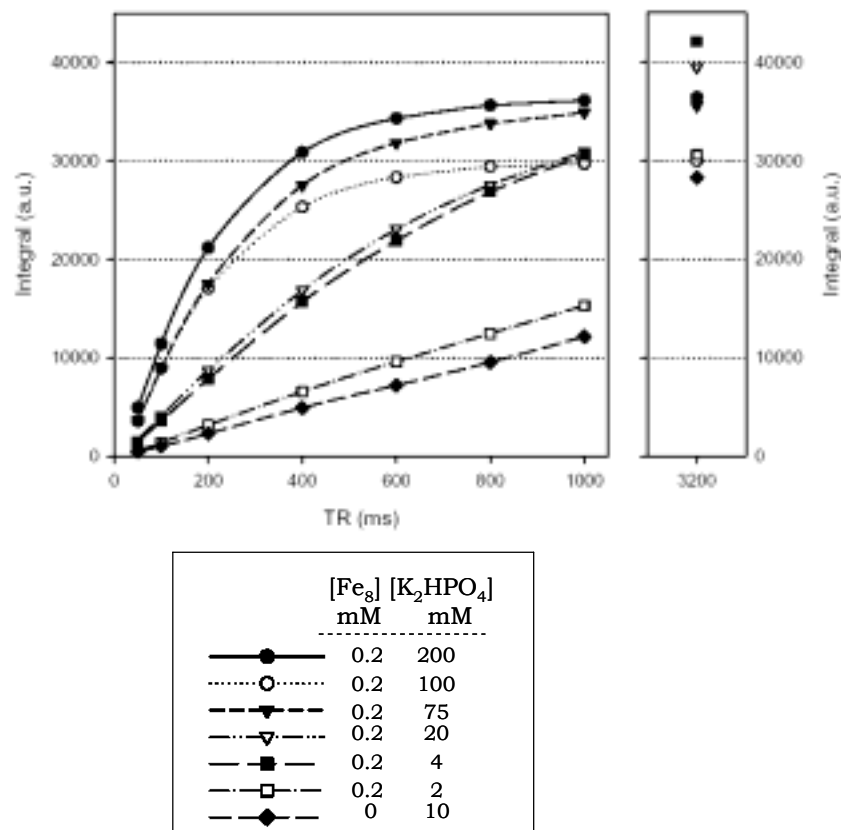
En la figura següent es pot veure com augmenta la saturació del senyal a mida que augmenta el TR per un valor fix de TE de 15 ms, és a dir, a valors de TR elevats disminueix el percentatge d'augment de la intensitat.



**Figura 5.19** Imatges potenciades en  $T_1$  amb valors diferents de TR a 9.4 T

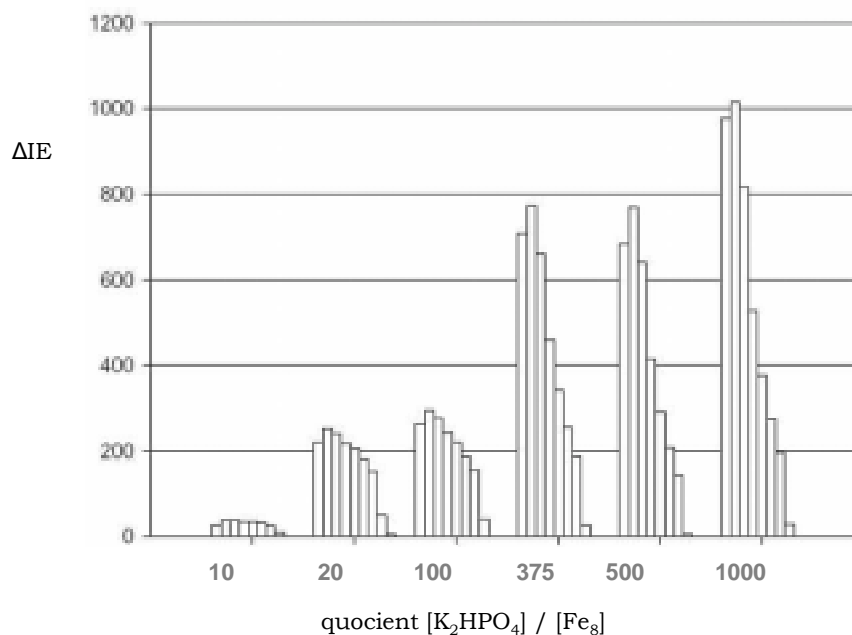
A la figura 5.20 s'ha representat el valor de la integral del senyal per cada concentració de fosfat respecte els diferents valors de TR utilitzats. A mesura

que augmenta la concentració de fosfat augmenta el valor de la integral, aquest augment es percep més per valors de TR inferiors a 800 ms, ja que per valors de TR superiors a 800 ms totes les concentracions han assolit el mateix valor màxim saturat. Notar que la solució n°3 presenta valors de les integrals superiors als esperats per tant potser hi hagut un error a l'hora de preparar la solució.



**Figura 5.20** Variació de la intensitat del senyal a mida que augmenta el TR per les diferents concentracions de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

Finalment, a la figura 5.21 s'ha representat el percentatge d'augment de la intensitat,  $\Delta I E$  respecte al quocient entre la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i la concentració de  $\text{Fe}_8$  per valors de TR creixents, entre 50 i 15000 ms; el valor de  $I_0$  correspon a la solució n°1,  $[\text{Fe}_8] = 0$ . Així doncs, es pot observar que a mesura que augmenta el quocient  $[\text{K}_2\text{HPO}_4]/[\text{Fe}_8]$  augmenta el valor de  $\Delta I E$ , però sempre limitat pels valors de TR ja que a mida que TR augmenta el valor de  $\Delta I E$  disminueix degut a la saturació del senyal.



**Figura 5.21** Intensitats ( $\Delta\text{IE}$ ) obtingudes en les imatges potenciades en  $T_1$  en funció del quocient entre la concentració de fosfat i la concentració de  $\text{Fe}_8$

Es pot concloure a partir de les imatges potenciades en  $T_1$  a 9.4 T de solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  que degut als fosfats present en el medi es pot aconseguir contrast per concentracions de l'ordre de 0.2 mM de  $\text{Fe}_8$  (1.6 mM de Fe), i que la brillantor de la imatge pot augmentar amb la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  mantenint la concentració del metall, el que significa que la dosi administrada de metall podrà ser inferior a les dosis administrades actualment. Destacar que per tal de que el senyal sigui estable amb el temps la relació entre  $[\text{K}_2\text{HPO}_4]/[\text{Fe}_8]$  en les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  ha de presentar un valor mínim de 10.

## 5.4 Estudis in vivo

Tal com es va comentar al capítol 1 els requeriments que ha de presentar una substància per esdevenir agent de contrast són: 1) disminuir els temps de relaxació dels nuclis d'H-1 de les molècules veïnes, 2) presentar selectivitat davant un determinat teixit i 3) no presentar efectes tòxics. Fins ara les mesures de caracterització relaxomètrica i els estudis de toxicitat han estat realitzats in vitro, en aquest apartat es descriuran estudis portats a terme in vivo. En primer lloc s'ha avaluat la toxicitat de solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  en ratolins i en segon lloc, les dosi prèviament estudiades per toxicitat s'han administrat a ratolins i s'han

enregistrat imatges de RM per tal de comprovar l'eficiència d'aquestes solucions com agents de contrast  $T_1$  in vivo.

### 5.4.1 Estudis de toxicitat

#### 5.4.1.1. Materials i mètodes

Els experiments que es descriuran en endavant s'han realitzat al servei de resonància magnètica nuclear sota la supervisió del Dr. Carles Arús.

Els estudis de toxicitat s'han fet en ratolins sans CD1 femelles de sis setmanes amb un pes aproximat de 25 g. S'ha avaluat la toxicitat de les tres solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  següents:

- solució 1:  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ;  $[\text{Fe}_8] = 1\text{mM}$  ;  $[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 10\text{mM}$
- solució 2:  $\text{Fe}_8^{[0.025\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ;  $[\text{Fe}_8] = 2.5\text{mM}$  ;  $[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 25\text{mM}$
- solució 3:  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ;  $[\text{Fe}_8] = 5\text{mM}$  ;  $[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 50\text{mM}$

A causa d'administrar dosi amb altes concentracions de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , per tal de no produir cap xoc osmòtic es van afegir 0.9 g de NaCl per cada 100 ml de solució. El pH es va ajustar a pH neutre.

Per a evitar moviments no desitjats a l'hora d'administrar les dosis, és necessari anestesiari als animals per via intraperitoneal. Com a anestèsic d'inducció es va emprar 100 mg/kg de la composició següent: ketamina 90 mg/kg, diazepam 5 mg/kg en sèrum fisiològic (0.9 g NaCl/100 ml de solució). Al cap d'uns 10 minuts aproximadament d'haver estat anestesiats, es van administrar 100  $\mu\text{l}$  de les respectives solucions per via intravenosa en cua. Durant tres dies es va dur a terme un seguiment del pes dels ratolins així com l'observació de la resposta a diferents tipus d'estímuls.

#### 5.4.1.2 Resultats

La solució 1, on la concentració de  $\text{Fe}_8$  era d'1 mM i 0.01 M en  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , va ser administrada per via intravenosa a tres animals. Al cap de 20 minuts d'haver estat anestesiats ja responien a estímuls i després de 45 minuts se situaven en posició prono i començaven a recuperar la mobilitat. S'ha seguit l'evolució dels pesos dels ratolins durant quatre dies i com es pot veure en la taula 5.8 els valors no van variar significativament, així com no es va observar cap símptoma anòmal per part dels animals.



**Taula 5.8** Evolució dels pesos de tres ratolins després de l'administració de la solució 1 (els pesos han estat expressats en g)

ratolí	previ a l'administració	al cap de			
		24 h	48 h	72 h	96 h
A	25	25	24.2	23.8	24.6
B	24.2	24.4	23	22.8	24.8
C	24.4	24.6	24.6	24.4	26

Respecte a la solució 2 on la concentració de Fe<sub>8</sub> era de 2.5 mM i 25 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, la dosi va ser administrada a dos animals, els animals es van recuperar amb normalitat i al cap d'una hora després d'haver estat anestesiats prenen la posició prono. També es va estudiar l'evolució del pes i no es van observar importants variacions. (vegeu la taula 5.9).

**Taula 5.9** Evolució dels pesos de dos ratolins després de l'administració de la solució 2 (els pesos han estat expressats en g)

ratolí	previ a l'administració	al cap de	
		24 h	72 h
A	25.4	25.2	26.4
B	25.7	24.6	24.4

Finalment la solució 3, amb una concentració de Fe<sub>8</sub> de 5 mM i 50 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, va ser administrada a tres ratolins. Els ratolins se situen en posició prono després d'una hora, però la recuperació total dels ratolins per aquesta dosi va ser més lenta; els animals no van variar de pes durant els tres dies estudiats (vegeu la taula 5.10).

**Taula 5.10** Evolució dels pesos de dos ratolins després de l'administració de la solució 2 (els pesos han estat expressats en g)

ratolí	previ a l'administració	al cap de	
		24 h	72 h
A	25.4	25.2	26.4
B	26.7	24.8	24.8
C	26.1	25	26.6

Es pot concloure que la solució 1, amb una concentració d'1mM de Fe<sub>8</sub> en 0.01 M de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> no va presentar efectes tòxics durant els tres dies de l'avaluació;

aquests resultats coincideixen amb els resultats obtinguts en els estudis realitzats en la línia cel·lular a l'apartat 5.2 d'aquest capítol. En canvi, segons els valors de l'assaig LDH realitzats in vitro en aquest mateix apartat, les concentracions superiors a 15 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  presentaven efectes tòxics a 72 hores i, s'ha comprovat que tant la solució 2,  $[\text{Fe}_8] = 2.5 \text{ mM}$  i  $[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 25 \text{ mM}$ , com la solució 3,  $[\text{Fe}_8] = 5 \text{ mM}$  i  $[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 50 \text{ mM}$ , no mostren efectes tòxics durant els tres dies d'avaluació, però cal tenir que en relació a la solució 3 la recuperació dels ratolins va ser més lenta. Cal destacar que en totes tres solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  la relació  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  ha estat de 10 per tal d'assegurar l'estabilitat del compost en solució.

## 5.4.2 Obtenció d'imatges

### 5.4.2.1 Materials i mètodes

S'han enregistrat imatges potenciades en  $T_1$  i en  $T_2$  per les següents solucions:

- solució 1:  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  on la concentració de  $\text{Fe}_8$  era de 1 mM
- solució 3:  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$  on la concentració de  $\text{Fe}_8$  era de 50 mM

En primer lloc els ratolins es van anestesiar amb la dosi descrita en l'apartat anterior. A continuació els ratolins van ser intubats amb un tub molt flexible d'1.00/0.85 mm de diàmetre, segons el procediment descrit a la bibliografia<sup>14,15</sup> i es van col·locar en el suport adaptat per tal d'enregistrar les imatges (vegeu l'annex 1). Durant l'enregistrament de les imatges, els ratolins van ser ventilats mecànicament amb isofurà com anestèsic 0.9–1.5% en oxigen a 0.5–2 l/min/kg, que es va administrar emprant el vaporitzador (Everest) i un ventilador per animals petits (volum tidal: 0.1–0.2 ml; breaths/min: 120). Per tal de protegir els ulls de l'animal durant el procediment s'addicionen en aquest moment gotes d'un gel líquid estèril amb carbòmer. El control de la temperatura de l'animal es porta a terme a través d'una sonda connectada per fibra òptica al visualitzador d'un termòmetre digital. La temperatura basal es mantindrà constant, 37°C, amb recirculació d'aigua termostatitzada dins d'un llit immobilitzador sobre on es troba l'animal.

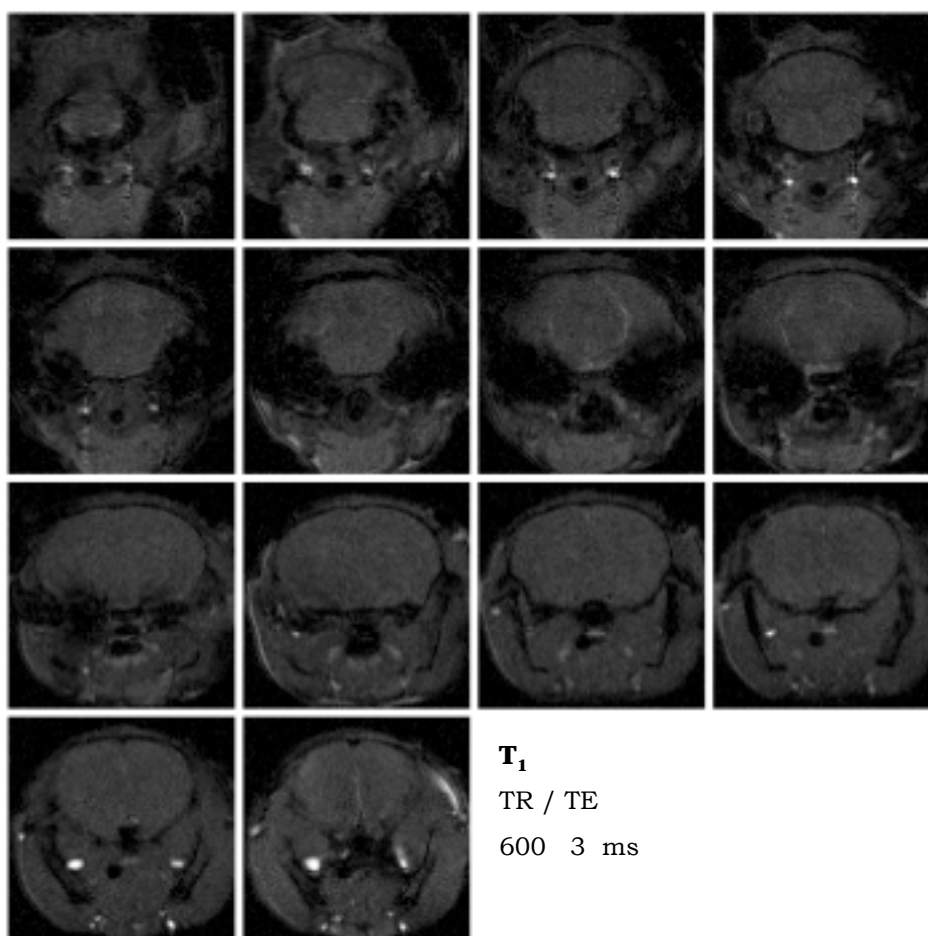
Les imatges d'RM s'han pres en un espectròmetre Bruker AMX-400-WB equipat amb un accessori de mini-imatge i utilitzant el programari XWinNMR versió 2.6 i Paravision versió 2.1 (Bruker Espanyola, S A, Espanya). Les imatges potenciades en  $T_1$  i  $T_2$  es van obtenir utilitzant la seqüència de pols spin-eco, SE. En el cas de les imatges potenciades en  $T_1$  el temps TE es manté constant amb un valor de 3

ms, mentre que per al temps TR s'ha pres un valor de 600 ms. En el cas de les imatges potenciades en  $T_2$  el temps TE té un valor de 60 ms i el temps TR de 2000 ms. Altres paràmetres: mida de la matriu de  $128 \times 128$ ; camp de visió (FOV) de  $25 \times 25 \text{ mm}^2$ ; gruix de 2 mm; nombre d'excitacions (NEX) de 2 (imatges  $T_1$ ) i de 4 (imatges  $T_2$ ); amplada de finestra de 50 kHz; pols d'excitació, sinc3,  $3500 \mu\text{s}$ .

Prèviament a l'administració de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  s'enregistren les imatges dels animals per poder comparar l'augment de contrast. Després es treu l'animal de l'espectròmetre i s'injecta per via intravenosa 100  $\mu\text{l}$  de la solució corresponent i s'adquireixen la segona tanda d'imatges.

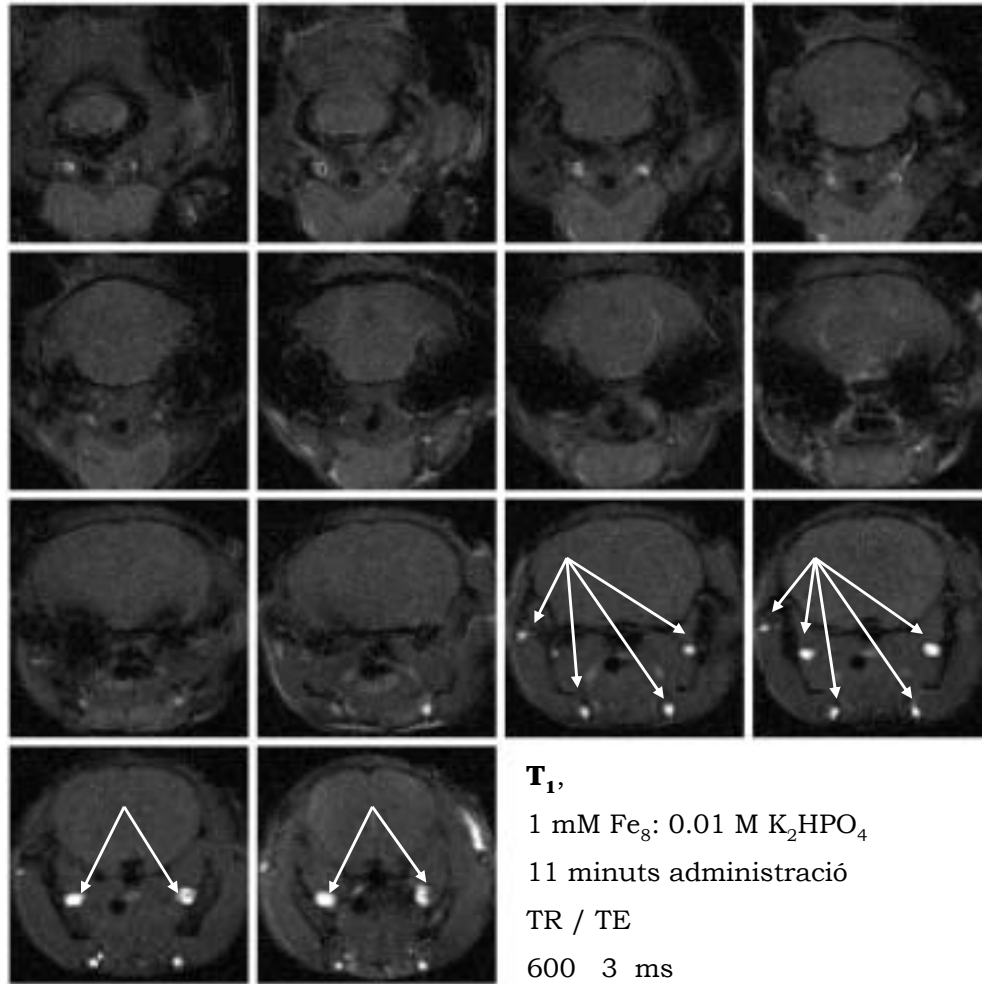
#### 5.4.2.2 Resultats

En endavant, es mostren les imatges potenciades en  $T_1$  i  $T_2$  abans i després de l'administració de 100  $\mu\text{l}$  de la solució 1, que equival a, 1 mM de  $\text{Fe}_8$  en 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . A la figura 5.22 es poden veure les imatges dels diferents talls coronals del cap potenciades en  $T_1$  a 9.4 T.



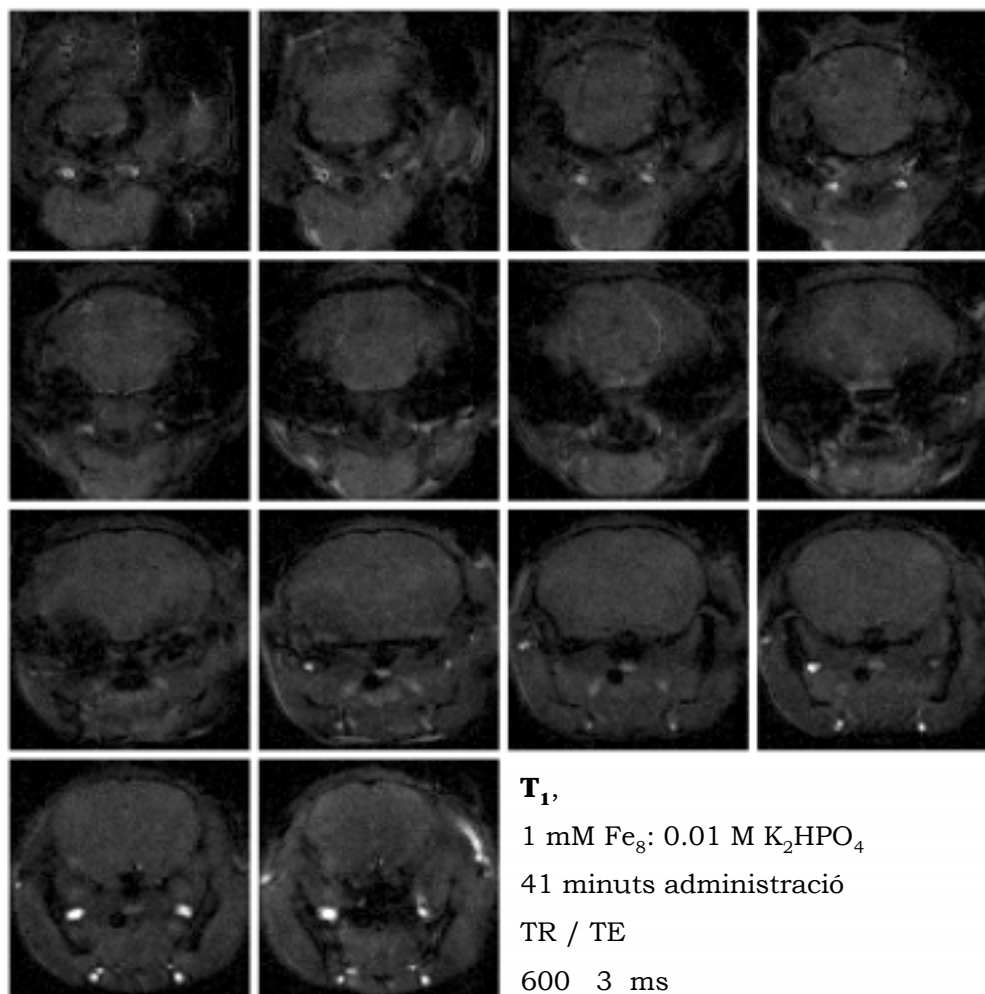
**Figura 5.22** Imatges coronals potenciades en  $T_1$  a 9.4 T sense agent de contrast

A continuació es va administrar la solució 1 per via intravenosa i es van enregistrar les imatges després d'11 minuts de l'administració. A la figura 5.23 es pot veure com els punts, marcats amb fletxes, hi ha l'augment de contrast.



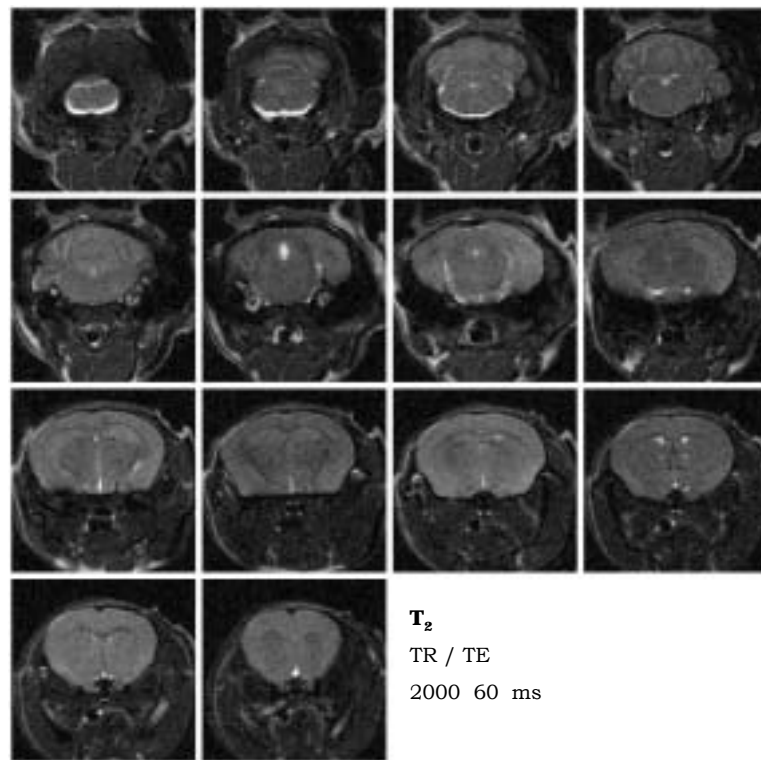
**Figura 5.23** Imatges coronals potenciades en  $T_1$  a 9.4 T després d'onze minuts d'haver administrat 100  $\mu\text{l}$  de la solució 1

A fi de comprovar si l'augment de la intensitat, només localitzat en determinades zones, disminuïa amb el temps es van tornar a enregistrar les imatge després de 41 minuts de l'administració i com es pot veure a la figura 5.24 la brillantor ha disminuït notablement.

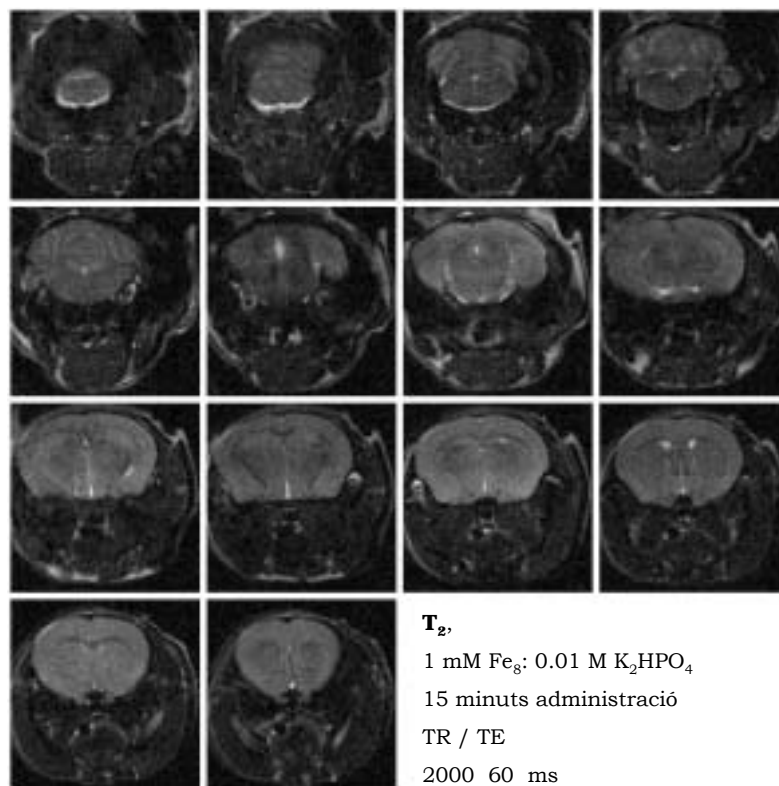


**Figura 5.24** Imatges coronals potenciades en  $T_1$  a 9.4 T després de 41 minuts d'haver administrat 100  $\mu\text{l}$  de la solució 1

Tot i que ja sabem amb prou certesa que les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  es comporten com agents de contrast  $T_1$ , també es van enregistrar imatges potenciades en  $T_2$ . En aquest cas s'hauria d'esperar un enfosquiment de la imatge allà on es trobés localitzat l'agent, perquè els agents de contrast  $T_2$  són agents negatius (veure capítol 1). A la figura 5.25 es mostra una imatge basada en  $T_2$  prèvia a l'administració. Un cop s'han administrat els 100  $\mu\text{l}$  de la solució 1 per via intravenosa es van enregistrar les imatges potenciades en  $T_2$  al cap de 15 minuts. A la figura 5.26 es pot veure que la solució no té cap efecte  $T_2$ .



**Figura 5.25** Imatges coronals potenciades en T<sub>2</sub> a 9.4 T



**Figura 5.26** Imatges coronals potenciades en T<sub>2</sub> a 9.4 T després de 15 minuts d'haver administrat 100  $\mu\text{l}$  de la solució 1

Els resultats anteriors són referits a la solució 1 que correspon a una concentració de  $\text{Fe}_8$  d'1mM i de 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Com s'ha administrat 100  $\mu\text{l}$  de la solució, s'estan administrant  $10^{-4}$  mols de  $\text{Fe}_8$ , és a dir,  $8 \cdot 10^{-4}$  mmols de  $\text{Fe}$ . Si el pes aproximat d'un ratolí és de 25 g, la dosi expressada per kg de ratolí seria de: 0.032 mmols de  $\text{Fe}/\text{kg}$ . La dosi que s'administra per via intravenosa de Gd-DTPA és de 0.2 mmols de Gd/kg<sup>16</sup>, és a dir, una dosi de metall 6 vegades superior que en la solució 1.

També es van enregistrar les imatges potenciades en  $T_1$  i  $T_2$  per la solució 3,  $[\text{Fe}_8] = 5 \text{ mM}$  i  $[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 50 \text{ mM}$ , mostrant un comportament molt similar a la solució 1 ja que només augmentava el contrast en els mateixos punts que la solució 1. Caldria quantificar el percentatge d'augment de la intensitat per les dues solucions per comprovar que la solució 3 presentarà un  $\Delta\text{IE}$  superior.

Les conclusions que es poden extreure a partir de les imatges obtingudes en ratolins després d'haver estat injectades les solucions 1 i 2, que prèviament havíem vist que no presentaven efectes tòxics, són 1) que les solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  són agents de contrast  $T_1$ , 2) s'observa contrast per una dosi sis cops inferior a l'administrada pel Gd-DTPA, 3) a diferència del Gd-DTPA que quan es administrat en ratolins sans s'observa un augment del contrast inespecífic per tota la zona que envolta al cervell, les solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  augmenten el contrast en zones molt específiques que sembla que corresponen a les glàndules salivals. La saliva produïda per aquestes glàndules està constituïda d'enzims encarregats de metabolitzar els aliments ingerits i també per diferents electròlits com el sodi, el potassi, el calci, el magnesi i **fosfat (5 mM)**, bicarbonat<sup>17</sup>. En conseqüència el fosfat present en la saliva podria interaccionar amb les solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  administrades i s'observaria un augment del contrast en el lloc de la interacció, 4) la imatge potenciada en  $T_1$  passats 41 minuts de l'administració mostra que el producte no s'acumula i 5) respecte a les imatges basades en  $T_2$  no s'han observat efectes d'augment de contrast.

## 5.5 Conclusions

Al llarg del capítol 5 es comprova que les solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$ , és a dir, solucions aquoses de  $\text{Fe}_8$  amb una certa concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , presenten propietats relaxomètriques molt interessants. Per a una concentració fixa de  $\text{Fe}_8$  a mesura que s'augmenta la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  augmenta el valor de la relaxivitat i s'assoleix un valor màxim quan la relació,  $[\text{Fe}_8]/[\text{K}_2\text{HPO}_4]$  és de 1/1000. També, i

a diferència de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$ , les mesures de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  són estables en el temps sempre que la relació  $[\text{Fe}_8]/[\text{K}_2\text{HPO}_4]$  sigui igual o superior a 10. El fet de no conèixer l'estructura del compost present en solució per a una concentració determinada de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  no ha permès de descriure un mecanisme de relaxació. Però les dades obtingudes en el capítol 4 i els estudis relaxomètrics duts a terme de solucions fosfatades dels precursors del  $\text{Fe}_8$ , indiquen que a causa de la gran avidesa dels fosfats per les molècules d'aigua es dona un mecanisme dinàmic entre els ions  $\text{Fe}(\text{III})$  i les molècules d'aigua que permet als centres metàl·lics relaxar els nuclis d' $^1\text{H}$  de forma molt més eficient. A més, a mesura que augmenta la concentració de fosfat es formen partícules col·loïdals de mida nm que fan que augmenti el valor de  $\tau_R$  i per tant augmenti la relaxivitat longitudinal.

Les imatges potenciades en  $T_1$  de solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  posen en evidència la influència dels fosfats en les propietats relaxomètriques en obtenir un augment del contrast a mida que augmenta la concentració de fosfat.

Els estudis de toxicitat que s'han dut a terme en la línia cel·lular de glioma de rata de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  suggereixen que els fosfats presents eviten l'alliberament d'ions  $\text{Fe}(\text{III})$ , evitant la generació de radicals oxidatius a partir de la reacció de Fenton i, per tant, no s'observen efectes tòxics per part de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  a diferència de quan en el medi no hi ha  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

Cal destacar que, igual que amb els grups fosfat de la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , la molècula de  $\text{Fe}_8$  presenta una gran avidesa per aquells lligands orgànics amb grups fosfats presents a l'estructura, com el lligand orgànic DOTP. A mesura que augmenten els grups fosfats presents en el lligand la interacció amb la molècula de  $\text{Fe}_8$  és més forta. Aquesta interacció permet obtenir un comportament del valor de  $r_1$  estable amb el temps.

Tal com s'ha vist a partir de l'avaluació dels precursors de la molècula de  $\text{Fe}_8$  com a agents de contrast, el sistema format per ions  $\text{Fe}(\text{III})/\text{tacn}/\text{K}_2\text{HPO}_4$  presenta les propietats relaxomètriques òptimes quan l'estequiometria de la mescla correspon a la de la molècula de  $\text{Fe}_8$ , és a dir, 8:6 respectivament. La presència de la tacn és necessària per evitar la precipitació de l'hidròxid de ferro(III). Però els estudis preliminars de toxicitat de solucions precursoras de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  i tacn, per aquesta estequiometria, amb una concentració present de 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , mostren que per tot el rang de concentracions de Fe existeixen efectes tòxics. És a dir, aquests resultats evidencien la necessitat de utilitzar el  $\text{Fe}_8$  com a precursor de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ , a fi que no es produeixin efectes tòxics.



Els estudis preliminars in vivo mostren que les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  no presenten efectes tòxics pel següent rang de concentracions: 1–5 mM de  $\text{Fe}_8$  en 10–50 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (la relació entre  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  s'ha mantingut amb un valor de 10). L'avaluació d'aquestes dosis com agents de contrast resulta en un augment de la intensitat en unes zones determinades que sembla que corresponen a glàndules salivals. Aquesta localització específica del senyal potser es deu a la concentració de fosfat en la saliva. La concentració de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  necessària per detectar canvis en les imatges potenciades en  $T_1$  és al voltant de sis vegades inferior a la concentració administrada actualment del Gd-DTPA; la intensitat de les imatges disminueix amb el temps, 45 minuts aproximadament després d'haver estat injectat, per tant no presenta acumulació. No s'ha observat efecte en les imatges potenciades en  $T_2$ .

## Bibliografia del capítol 5

- <sup>1</sup> Chen J., Mao X., Ye Ch. Intensity Jumping and Beating in Inversion-Recovery Experiments of Water Due to Radiation Damping. *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 490-494.
- <sup>2</sup> Mao X., Guo J., Ye Ch. Radiation damping effects on spin-lattice relaxation time measurements. *Chem. Phys. Lett.* **1994**, *222*, 417-421.
- <sup>3</sup> Cotton F. A., Wilkinson G., Murillo C. A., Bochmann M. *Advance Inorganic Chemistry. Sixth Edition.* John Willey & Sons, INC. **1999**.
- <sup>4</sup> Cornell R. M., Schwertmann U. *The iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses.* VCH Publishers, Nova York. **1996**.
- <sup>5</sup> Isaacman S., Kumar R., del Barco E., Kent A. D., Canary J. W., Jerschow A. Critical Examination of Fe<sub>8</sub> as a Contrast Agent for Magnetic Resonance Imaging. *Accepted in Polyhedron.*
- <sup>6</sup> <sup>a</sup>Koenig S. H., Brown R. D., Lindstrom T. R. Interactions of solvent with the heme region of methemoglobin and fluoro-methemoglobin. *Biophys. J.* **1981**, *34*, 397-408. <sup>b</sup>Koenig S. H., Baglin C. M., Brown R. D. Magnetic Field Dependence of Solvent Proton Relaxation in Aqueous Solutions of Fe<sup>3+</sup> Complexes. *Magnetic Resonance in Medicine.* **1985**, *2*, 283-288.
- <sup>7</sup> Aime S., Fasano M., Paoletti S., Cutruzzola F., Desideri A., Arnelli A., Ascenzi P. Structural determinants of fluoride and formate binding to hemoglobin and myoglobin: crystallographic and <sup>1</sup>H-NMR relaxometric study. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 482-488.
- <sup>8</sup> Josephson L., Lewis J., Jacobs P., Hahn P. F., Stark D. D. The effects of iron oxides on proton relaxivity *Magn. Reson. Imaging* **1998**, *6*, 647-653.
- <sup>9</sup> Muller R.N., Roch A., Colet J-M., Ouakssim A., Gillis P. Particulate Magnetic Contrast Agent. In: *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Resonance Imaging.* Merbach A., Tóth E., (eds). Chichester: Willey-VCH Verlag, **2001**, 417-436.
- <sup>10</sup> Coroiu I. Relaxivities of different superparamagnetic particles for application in NMR tomography. *J. Magn. Mag. Mat.* **1999**, *201*, 449-452.
- <sup>11</sup> Canet *et al.* Superparamagnetic iron oxide particles and positive enhancement for myocardial perfusion studies assessed by subsecond T<sub>1</sub>-weighted MRI. *Magn. Reson. Imaging.* **1993**, *11*, 1139-1145.
- <sup>12</sup> Richardson N., Davies J. A., Radüchel B. Iron(III)-based contrast agents for magnetic resonance imaging. *Polyhedron.* **1999**, *18*, 2457-2482.

- 13 Bergmeyer H. U., Bernt E., Hess B. Lactate dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer H. U., (ed). New York: Academic Press, **1965**, 736-743.
- 14 Catalapiedra A. G., Espinel J. L. Pequeños mamíferos:inmovilización química y anestesia inhalatoria. *Consulta de difusión veterinaria*. **1998**, 6, 52.
- 15 Brown R. H., Walters D. M., Greenberg R. S., Mitzner W. A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assesment for repeated studies in mice. *Am. Phys. Soc.* **1999**, 2362-2365.
- 16 Küsters B., de Waal R. M. W., Wesseling P., Verrijp K., Maass C., Heerschap A., Barentsz J. O., Sweep F., Ruiter D. J., Leenders W. P. J. Differential Effects of Vascular Endothelial Growth Factor A Isoforms in a Mouse Brain Metastasis Model of Human Melanoma. *Cancer Research*. **2003**, 63, 5408-5413.
- 17 Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid?. *J. Canad. Dental. Ass.* **2003**, 69, 11, 722-724.

## **6 | Conclusions**

---

### **6.1 Conclusions**

### **6.2 Perspectives de futur**

## 6.1 Conclusions

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat l'avaluació del compost  $\{[(C_6N_3H_{12})_6Fe_8(\mu_3-O)_2(\mu_2-OH)_{12}]Br_7(H_2O)\}Br \cdot 8H_2O$ ,  $Fe_8$ , com a agent potenciador de contrast d'imatges obtingudes per ressonància magnètica. Les conclusions extretes d'aquest treball són les següents:

- 1. Les propietats relaxomètriques quan es dissol  $Fe_8$  en la solució tampó fosfat, PBS, avaluades a un camp magnètic de 9.4 i 1.41 T indiquen que la solució resultant actua com un bon agent de contrast i presenta un comportament molt similar al de l'agent de contrast Gd-DTPA, és a dir, fa d'agent de contrast tipus I. Aquest comportament es reafirma en enregistrar imatges potenciades en  $T_1$ .**
2. Els resultats de les mesures de toxicitat in vitro en una línia cel·lular de glioma de rata mostren que per a concentracions inferiors a 1 mM de  $Fe_8$  no es detecten efectes tòxics en períodes inferiors a 24 hores. El valor de la  $LC_{50}$  trobada per al  $Fe_8$  en un període d'incubació de 72 hores és d'1.1 mM, valor molt inferior a l'obtingut per al Gd-DTPA,  $LC_{50} = 30.7$  mM. D'altra banda, estudis de l'activitat oxidativa intracel·lular suggereixen l'existència d'ions  $Fe^{3+}$  lliures i, per tant, apunten al trencament de la molècula en solució.
3. La caracterització de la molècula de  $Fe_8$ , mitjançant tècniques espectroscòpiques i magnètiques, en solució aquosa mostra que la molècula de  $Fe_8$  no és estable en aigua i que presenta una cinètica lenta de descomposició, s'observa, per exemple, que el valor de  $T_1$  d'una solució aquosa de  $Fe_8$  decreix en un 30% al cap de 20 hores. El fet que l'amina no presenti prou impediment estèric fa pensar que el procés de descomposició comença quan les molècules d'aigua ataquen els ponts oxo- i hidroxó- presents a la molècula de  $Fe_8$ .
4. Estudis del comportament de la molècula de  $Fe_8$  en solució fosfatada  $Fe_{8(fos)}$  (tipus PBS), mitjançant tècniques espectroscòpiques i magnètiques, mostren que la molècula no és estable en aquestes solucions, però, a diferència de la solució aquosa, on la cinètica de descomposició era lenta i per tant mesurable, aquí la descomposició del  $Fe_8$  té lloc ràpidament, segurament influenciada per l'avidesa dels fosfats presents en el PBS, pels ions  $Fe(III)$ . La nova espècie es reorganitza de tal manera que les mesures relaxomètriques obtingudes són constants amb

el temps sempre que la relació entre  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  sigui igual o superior a 10.

5. L'espècie que es forma en solució depèn de la concentració de fosfats que hi ha en el medi. En el cas del PBS, la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  és de 0.01M; per a aquesta concentració i per una concentració de  $\text{Fe}_8$  d'1 mM, sembla que l'espècie en solució manté unions  $\mu\text{-O}$  i  $\mu\text{-OH}$ , ja que té un comportament antiferromagnètic a baixa temperatura. L'espècie també té lligands  $\mu$ -fosfat perquè per sota de 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  no s'observa cap senyal de RMN en l'espectre de  $^{31}\text{P}$  suggerint que els grups fosfats es troben coordinats a la molècula. Els resultats de  $^{31}\text{P}$  indiquen que a baixes concentracions de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  cada àtom de  $\text{Fe(III)}$  interacciona amb una molècula de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Tant a partir de l'espectroscòpia Mössbauer com a partir de les mesures magnètiques s'ha observat per les solucions  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  un comportament paramagnètic (o superparamagnètic) a temperatura ambient.
6. En canvi, a mida que s'augmenta la concentració de fosfats en el medi, l'espècie que es forma serien partícules col·loïdals constituïdes per ions  $\text{Fe(III)}$  units per ponts  $\mu$ -fosfat i amb l'amina coordinada. L'espectroscòpia Mössbauer suggereix que la mida d'aquestes partícules, per una relació  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  de 200 és inferior a 5 nm.
- 7. Les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ , és a dir, solucions aquoses partint de  $\text{Fe}_8$  i una certa concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  presenten propietats relaxomètriques molt interessants. Per a una concentració fixa de  $\text{Fe}_8$ , a mesura que augmenta la concentració de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , augmenta el valor de la relaxivitat i s'assoleix un valor asimptòtic màxim quan la relació  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  és de 1000.**
8. En les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ , la interacció entre els ions  $\text{Fe(III)}$  i les molècules d'aigua seria d'esfera externa i de segona esfera. El model de relaxació dels nuclis d'H-1 que es proposa és el d'un intercanvi dinàmic entre les molècules d'aigua i els ions de  $\text{Fe(III)}$  gràcies als lligands fosfats, així com, un augment del temps de rotació del compost en solució a mida que augmenta la concentració de fosfat.
- 9. Els estudis de toxicitat que s'han dut a terme en la línia cel·lular de glioma de rata de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  suggereixen que els fosfats presents eviten l'alliberament d'ions  $\text{Fe(III)}$  i, per tant, no s'observen efectes tòxics en les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ .**

10. El sistema format per  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  i tacn, precursors de la molècula de  $\text{Fe}_8$ , en  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  presenta les propietats relaxomètriques òptimes quan l'estequiometria de la mescla correspon a la mateixa que en la molècula de  $\text{Fe}_8$ , però les proves preliminars de toxicitat mostren que per al mateix rang de concentracions de  $\text{Fe}(\text{III})$  estudiat que amb les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  existeixen efectes tòxics.

**11. Finalment, s'ha portat a terme l'avaluació de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  in vivo. Els experiments de toxicitat i l'obtenció d'imatges s'han fet en ratolins. Els estudis de toxicitat resulten en una nul·la toxicitat de les solucions de  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  mantenint la relació  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  de 10 per assegurar l'estabilitat temporal del producte en solució. La concentració màxima de  $\text{Fe}_8$  estudiada ha estat la de 5 mM, ja que la recuperació dels ratolins per aquesta concentració ha estat més lenta.**

**12. En les imatges potenciades en  $T_1$  de tall coronals del cap de ratolins, les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  augmenten la brillantor només en uns punts específics, a diferència del Gd-DTPA on l'augment de la intensitat és inespecífic. La dosi mínima administrada que contrasta és sis cops inferior a la que s'administra actualment de Gd-DTPA. Aquests zones semblen que corresponen a les glàndules salivals, i s'ha vist que la concentració de fosfat a la saliva és de 5 mM, el que evidenciaria la sensibilitat de les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  a la concentració de fosfat. Aquests resultats són de molta transcendència perquè significaria que les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  actuen com agents de contrast  $T_1$  específics en aquells teixits on hi hagi un augment de concentració de fosfat, és a dir en situacions d'hiperfosfatèmia. Finalment s'ha comprovat que les solucions  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  no s'acumulen en els teixits i no s'ha observat efecte  $T_2$ .**

## 6.2 Perspectives de futur

L'elecció de la molècula de  $Fe_8$  amb la finalitat d'avaluar-la com a agent de contrast es va comentar en el capítol 1 i es va basar en:

- 1) la molècula de  $Fe_8$  presentava una mida intermèdia entre els complexos mononuclears i les partícules d'òxids de ferro (III)
- 2) el fet de tractar-se d'un compost molecular evitava la problemàtica de la dispersió en la mida de partícula i la diferenciava dels sistemes particulats d'òxids de Fe(III)
- 3) una sola molècula presentava vuit centres metàl·lics, per tant, es poden amplificar les propietats relaxomètriques.

Un dels objectius més immediats seria estabilitzar la molècula de  $Fe_8$  en solució. Tal com es va comentar en el capítol 4 la possible explicació de la descomposició de la molècula de  $Fe_8$  en solució aquosa és el fet que l'amina tacn no presenta prou impediment estèric i per tant les molècules d'aigua poden atacar els ponts oxo- i hidrox- de la molècula. Segons la bibliografia, l'amina anàloga metilada, 1,4,7-trimetil-1,4,7-triazaciclonoà, protegiria més el clúster i d'aquesta manera s'evitaria la descomposició en solució. Així doncs, es podria dissenyar una estratègia de síntesi per obtenir el clúster de  $Fe_8$  amb l'amina tacn metilada.

Amb la vista al futur també seria interessant estudiar en profunditat la descomposició de la molècula de  $Fe_8$  en solució aquosa, és a dir, la identificació de l'espècie o les espècies que romanen en solució, així com un possible model de la seva cinètica. Hi ha un gran interès en l'estudi d'aquest tipus de compostos, Fe-O-Fe, pel seu ús com a models de sistemes biològics.

En el capítol quatre també s'ha caracteritzat el comportament de la molècula de  $Fe_8$  en solució fosfatada. La identificació de les espècies en solució fosfatada no ha estat possible ja que no s'ha obtingut un cristall prou bo per conèixer l'estructura cristal·lina. El fet de no conèixer l'estructura dels compostos presents en solució fosfatada no ha fet possible postular un mecanisme que expliqués les bones propietats relaxomètriques de les solucions  $Fe_{8(fos)}$ . Per tant, caldria elucidar els compostos que romanen en solució fosfatada amb la finalitat de conèixer realment el paper actiu dels fosfats.

Respecte a les possibles aplicacions clíniques de les solucions caldria veure si les partícules s'acumulen en algun altre teixit i enregistrar imatges en ratolins tumorals. Finalment caldria explorar amb més detall les possibles aplicacions



d'aquest sistema ja que permet visualitzar lesions on s'allibera fofat o compostos fosfatats.

## **7 | Annexos**

---

---

**7.1 Annex 1: descripció de les tècniques instrumentals utilitzades en aquest treball**

**7.2 Annex 2: condicions experimentals de mesura, resolució i afinament del nou polimorf de Fe<sub>8</sub>**

**7.3 Resum de la tesi en llengua anglesa**

## 7.1 Annex 1: descripció de les tècniques instrumentals utilitzades en aquest treball

Aquest apartat consisteix en una breu descripció de les tècniques instrumentals utilitzades en aquest treball.

### 7.1.1 Ressonància magnètica nuclear

Com s'ha comentat al llarg del capítol 1, el fenomen de la ressonància magnètica nuclear es basa en l'absorció selectiva d'energia de radiofreqüència, per part de certes partícules, quan són col·locades sota un camp magnètic B.

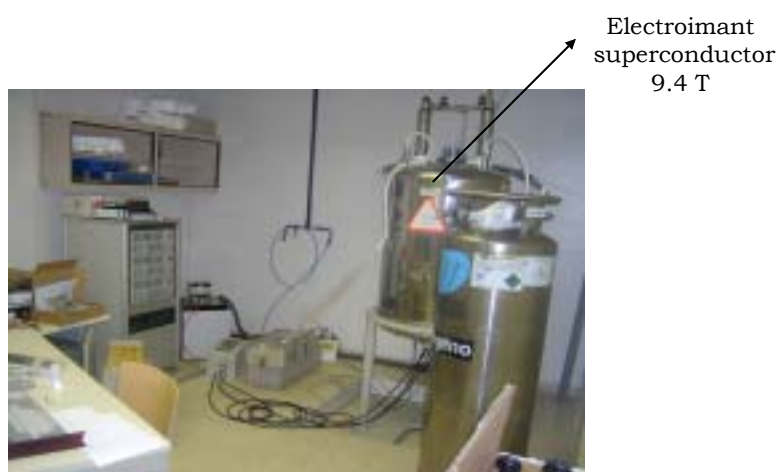
Els aparells de RM poden ser, segons la generació del camp magnètic, imants permanents, electroimants o híbrids<sup>1</sup>.

- Els **imants permanents** estan construïts amb materials ferromagnètics que presenten una imantació permanent, no precisen de sistemes de refrigeració ni gasten corrent elèctric. Tenen un pes molt elevat i poden assolir camps magnètics de 0.6 T.
- Els **electroimants** creen el camp magnètic mitjançant corrent elèctric. Segons el tipus de conductor poder ser resistius o superconductors. Els **electroimants superconductors** es basen en la propietat que presenten certs aliatges metàl·lics o materials ceràmics que, en ser refredats a temperatures molt baixes perden la seva resistència elèctrica. L'aliatge més utilitzat és el de titani-niobi (TiNb) en forma de fils dintre d'una matriu de Cu que s'enrotlla en forma de bobines i s'introdueix en una cambra cilíndrica plena d'heli líquid. Amb aquest tipus d'imants s'aconsegueixen camps magnètics molt elevats. En aquests equips és important el cost de les substàncies criogèniques.

En el primer capítol s'ha fet una extensa descripció dels principis físics de la ressonància magnètica nuclear. Les mesures dels temps de relaxació s'han dut a terme en un espectròmetre Bruker ARX-400 NMR. En canvi les imatges enregistrades s'han obtingut en un espectròmetre Bruker AMX-400-WB equipat amb un accessori de minimatge i utilitzant el programari XWinNMR versió 2.6 i Paravision versió 2.1 (Bruker Espanyola, S A, Espanya), tots dos espectròmetres es troben ubicats al Servei de Ressonància Magnètica Nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona (vegeu la figura 7.1). Les mesures dels temps de relaxació a 1.41 T s'han realitzat en un espectròmetre Minispec (Bruker

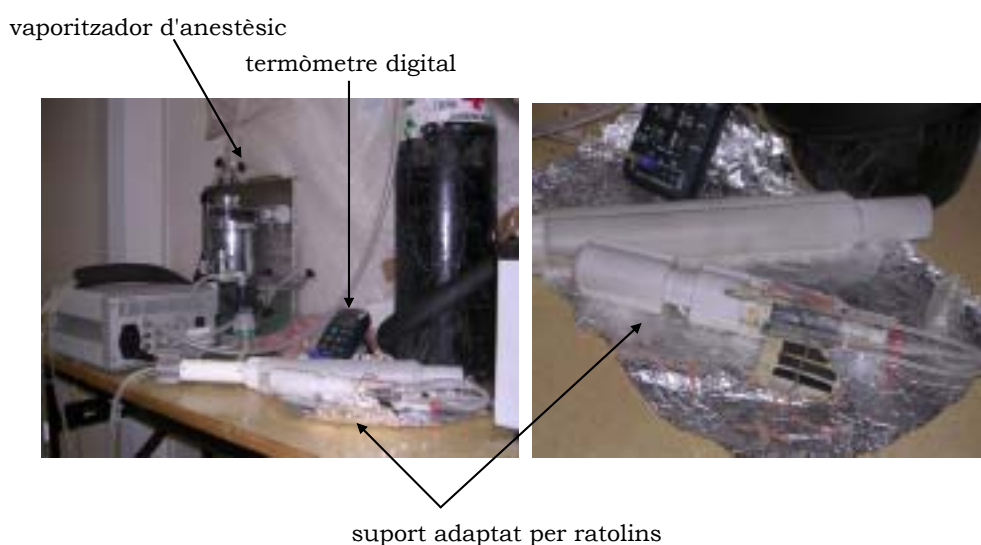
Española) situat al departament de química orgànica de la Universitat Nacional de Educación a Distancia.

Les mesures de relaxació  $T_1$  a 0.24 T es van prendre en un relaxòmetre Spinmaster FFC, fast field cycling, Stelar, que opera amb el rang de camp magnètic següent: 0.00024–0.24 T, situat al Bioindustry Park, Ivrea, Itàlia. I les mesures de relaxació  $T_1$  i  $T_2$  a 7.05 T es van realitzar en un espectròmetre Bruker Avance 300, situat al Bioindustry Park, Ivrea, Itàlia.



**Figura 7.1** Imatge de l'espectròmetre Bruker AMX-400-WB

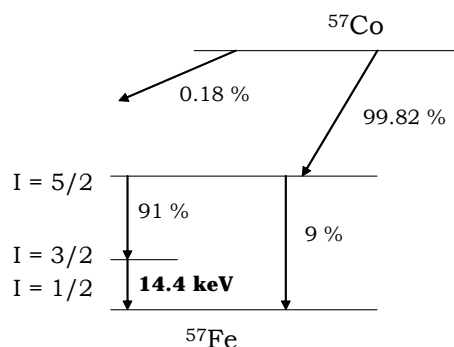
A la figura 7.2 es pot veure el muntatge necessari per enregistrar les imatges “in vivo” amb ratolins.



**Figura 7.2** Fotografies del suport per als ratolins i el vaporitzador de l'anestèsia per enregistrar imatges “in vivo”

### 7.1.2 Espectroscòpia ultravioleta-visible (UV-Vis)

L'espectroscòpia UV-Vis es basa en la capacitat que presenta una substància d'absorbir selectivament algunes bandes dins la zona de l'espectre electromagnètic corresponent a la llum ultraviolada (entre 200-400 nm) i llum visible (entre 400-800 nm)<sup>2</sup>. Quan un material absorbeix energia, absorbeix únicament certes longitud d'ona. La mesura experimental d'una dissolució es practica en aparells anomenats espectrofotòmetres, on els elements més significatius que el constitueixen es poden veure a la figura 7.3. Com a font de llum es poden utilitzar dos tipus de làmpades: una làmpada d'hidrogen o deuteri per a la regió ultraviolada i una làmpada de tungsté/halogen per a la regió del visible. Les làmpades no emeten llum monocromàtica, és a dir, radiació d'una única longitud d'ona; per tant, cal un monocromador que selecciona una única longitud d'ona. L'espectrofotòmetre disposa d'un compartiment amb dues cubetes diferents, la cubeta de referència on es col·loca el dissolvent en el qual s'ha dissolt la mostra i la cubeta on es col·loca la mostra que s'ha de mesurar. Les cubetes del visible poden ser de plàstic mentre que les de l'UV són de quars. Una vegada que la llum ha travessat la mostra i part de la radiació ha estat absorbida, cal un fotomultiplicador que amplifiqui i detecti la intensitat de la llum transmesa.



**Figura 7.3** Representació esquemàtica dels elements més significatius d'un espectrofotòmetre

L'espectrofotòmetre compara la intensitat del feix que passa a través de la mostra,  $I$ , amb la intensitat del feix que travessa la cubeta de referència,  $I_0$ . L'absorció pot ser representada com a transmitància,  $T$  ( $T = I/I_0$ ) o absorbència ( $A = \log I_0/I$ ). Quan no es dona absorció  $T = 1$  i  $A = 0$ . L'absorbència d'una mostra és proporcional a la concentració molar de la mostra segons la Llei de Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{eq. 7.1})$$

on  $\epsilon$  és el coeficient d'extinció molar que específic de cada substància;  $b$  és la llargada del pas òptic i  $c$  és la concentració de la substància en mol/dm<sup>3</sup>.

L'absorció de radiació UV o visible per part d'una substància sol estar relacionada amb l'excitació dels electrons de valència des d'un estat electrònic fonamental a un estat electrònic excitat. La longitud d'ona a la qual es dona aquesta excitació dependrà de la configuració electrònica de les molècules, per tant, és una característica molecular. Es produirà absorció d'una radiació electromagnètica per part d'un compost sempre que aquesta sigui una longitud d'ona tal que es compleixi  $\Delta E = h\nu$ , on  $\Delta E$  és la diferència entre dos nivells d'energia electrònics d'una molècula. Hi ha tres tipus de transicions:

1. Transicions on es troben implicats electrons  $\pi$ ,  $\sigma$  i  $n$
2. Transicions de transferència de càrrega.
3. Transicions on es troben implicats electrons  $d$  i  $f$ .

Els espectres UV-Vis d'aquest treball s'han mesurat en un espectrofotòmetre Varian Cary E situat a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona. En el cas del complexos polinuclears de Fe(III), la regió ( $\mu$ -oxo)diferro(III) es troba molt ben caracteritzada. Les transicions corresponents a aquesta regió es troben entre 300 i 400 nm<sup>3</sup>. La natura d'aquestes transicions és la transferència de càrrega del grup oxo a l'ió Fe.

### 7.1.3 Espectroscòpia infraroja i Raman

L'espectroscòpia infraroja (IR) és una tècnica que mesura la capacitat de la matèria d'absorbir radiació infraroja. L'absorció selectiva de radiació de determinades longituds d'ona es pot relacionar amb la presència de grups funcionals<sup>2</sup>. La tècnica s'utilitza generalment per a la identificació dels grups funcionals com a part de la caracterització de compostos orgànics.

La tècnica consisteix a enviar a la mostra radiacions de longitud d'ona de la regió infraroja (12500-30 cm<sup>-1</sup>) i observar la taxa d'absorció de radiació per part de la mostra en funció de la longitud d'ona. Generalment l'espectre mostra diversos pics d'absorció que són deguts a l'excitació dels diversos modes de vibració dels enllaços interatòmics del compost. En un sòlid molecular hi haurà bandes degudes a vibracions intramoleculares i intermoleculares.

En aquest treball els espectres IR del Fe<sub>8</sub> (regió 4000–400 cm<sup>-1</sup>) s'han registrat en pastilla KBr en un espectròmetre Perkin Elmer, situat a l'ICMAB, on s'han

pogut identificar els modes de vibració del grup orgànic tacn, així com la regió dels modes de vibració Fe-O-Fe<sup>3</sup>.

L'espectroscòpia Raman, igual que l'espectroscòpia infraroja és una tècnica que s'utilitza per analitzar les característiques vibracionals de molècules però, en l'espectroscòpia Raman la radiació que s'utilitza per excitar les molècules de la mostra prové de la regió visible. Els espectres es representen com la intensitat de la llum reemesa enfront a l'energia en cm<sup>-1</sup>, és a dir, que tot i que els resultats dels espectres Raman provenen de les vibracions moleculars a freqüències infraroges, l'espectre s'obté amb llum visible. Els espectres Raman es van enregistrar sota la supervisió del Prof. Eliano Diana en un espectròmetre FT-Raman Bruker RFS 100 equipat amb un làser Nd:YAG, situat a la Universitat del Piemont Oriental a Alessandria (Itàlia).

#### **7.1.4 Magnometria SQUID i VSM**

La majoria de les mesures magnètiques s'han portat a terme a l'Institute of Physics Polish Academy of Sciences, sota la supervisió de la Dra. Anna Slawaska. En aquest treball les mostres s'han mesurat en un magnetòmetre SQUID i en un magnetòmetre VSM.

El magnetòmetre SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*) és un aparell que permet detectar valors de magnetització extremament petits<sup>4</sup>. El seu component fonamental és un interferòmetre quàntic que està format per un anell superconductor amb una o dues unions Josephson acoblat inductivament a un circuit on es generen corrents a causa del moviment de la mostra al seu interior. A causa de les propietats dels materials superconductors (resistivitat nul·la i diamagnetisme perfecte), la quantitat de flux de camp magnètic que travessa un anell superconductor tendeix a romandre constant. Mitjançant les unions febles o Josephson (zones d'anell on el corrent crític és menor que a la resta de l'anell) és possible fer entrar flux dins de l'anell sense fer transitar tot l'anell. La quantitat de flux que hi pot entrar està quantitzada i cada cop que hi entra una unitat de flux (o fluxó) el corrent que circula per l'anell cau sobtadament. Mesurant les oscil·lacions del corrent que circula dins de l'anell es pot mesurar la quantitat de fluxons que han entrat i que són proporcionals a la magnetització de la mostra.

La mostra està situada i desplaçada a través d'un sistema de quatre espirals concèntriques configurades d'una forma determinada. El corrent induït en les espirals causat pel moviment de la mostra és transformat en flux magnètic sobre la unió Josephson de l'interferòmetre quàntic. El  $\text{Fe}_{8(s)}$  va ser caracteritzat magnèticament mitjançant un magnetòmetre SQUID (Quantum Design PPMS).

El magnetòmetre VSM (Vibration Sample Magnetometer), de manera similar a l'SQUID, és un dispositiu capaç de mesurar la magnetització de la mostra en funció d'un camp magnètic extern. Es tracta d'un mètode clàssic d'inducció magnètica que aprofita la llei de Faraday; aquesta llei estableix que les variacions de flux magnètic ( $d\Phi/dt$ ) a través de la superfície que tanca un circuit elèctric creen una diferència de potencial ( $\Delta V$ ) que genera un corrent que s'oposa a la variació del flux:

$$\Delta V = \frac{d\Phi}{dt} \quad (\text{eq. 7.2})$$

En el VSM la mostra se situa entre dues bobines sota l'acció d'un camp magnètic, la mostra es fa vibrar paral·lelament al camp a una freqüència d'uns 80 Hz, i es mesura la diferència d'inducció entre una regió amb mostra i sense mostra.

Es van fer dos tipus de mesures:

- Cicles d'histeresi: són mesures de la magnetització de la mostra en funció del camp magnètic extern aplicat. Aquestes mesures permeten, per exemple, fer una estimació del moment magnètic de saturació per unitat de ferro (III).
- Corbes de susceptibilitat: aquest tipus de mesures també són mesures de magnetització, però en aquest cas en funció de la temperatura i sota un camp extern fix. En aquest treball el camp aplicat ha estat de 90 kOe i de 10 kOe.

En aquest treball s'han mesurat mostres de pols policristal·lina de  $\text{Fe}_{8(s)}$ , mostres en solució aquosa,  $\text{Fe}_{8(aq)}$  i mostres en solució fosfatada  $\text{Fe}_{8^{(cl)}}_{(fos)}$ . Les mostres en solució presentaven una component diamagnètica significativa deguda al solvent i al portamostres. A continuació es mostra el tractament que es va fer a les dades preliminars per tal d'extreure'n la component diamagnètica i poder interpretar els resultats.

La magnetització de la solució de  $\text{Fe}_8$ ,  $\mathbf{M}$ , es pot expressar com:

$$\mathbf{M} = \mathbf{M}_d + \mathbf{M}_p \quad (\text{eq. 7.3})$$



on  $\mathbf{M}_d$  és la magnetització per raó de la component diamagnètica de la mostra i  $\mathbf{M}_p$  és la magnetització per la component paramagnètica de la mostra.

La variació lineal de la magnetització respecte al camp magnètic aplicat es coneix com a susceptibilitat. El comportament de la susceptibilitat, en la regió paramagnètica, respecte a la temperatura obeeix la Llei de Curie-Weiss segons:

$$\chi = \mathbf{M}_p / [m_p \cdot \mathbf{H}] = C / [T - \theta] \quad (\text{eq. 7.4})$$

$$\mathbf{M}_p = [C \cdot \mathbf{H} \cdot m_p] / [T - \theta] \quad (\text{eq. 7.5})$$

on  $m_p$  és la massa de la substància paramagnètica i  $\mathbf{H}$  és el camp magnètic aplicat.

Si substituïm l'expressió del  $\mathbf{M}_p$  en l'equació 7.3 resulta en:

$$\mathbf{M} = \mathbf{M}_d + [C \cdot \mathbf{H} \cdot m_p] / [T - \theta] \quad (\text{eq. 7.6})$$

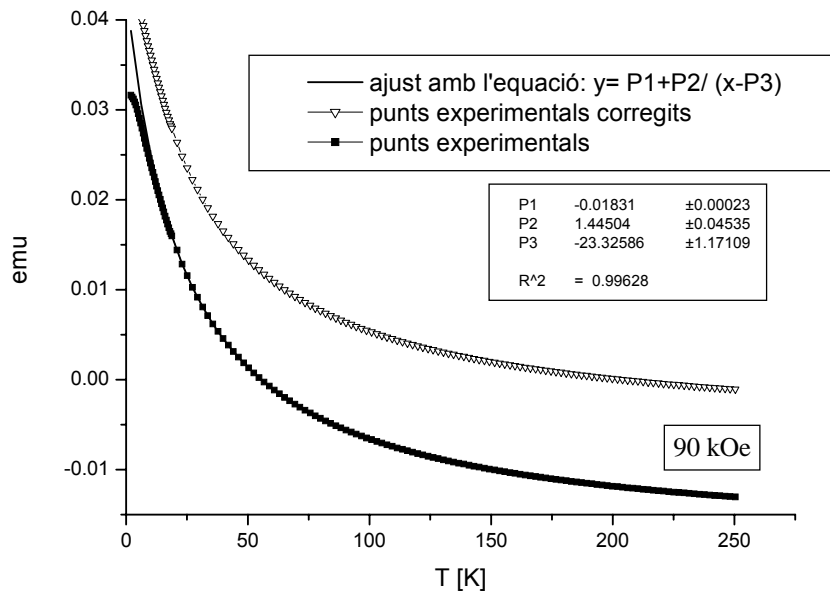
Com que  $\mathbf{M}_d$  no depèn de la temperatura, es pren l'equació següent per ajustar els punts experimentals:

$$y = P1 + P2 / [x - P3] \quad (\text{eq. 7.7})$$

on  $P1 = \mathbf{M}_d$ ;  $P2 = C \cdot \mathbf{H} \cdot m_p$ ;  $P3 = \theta$

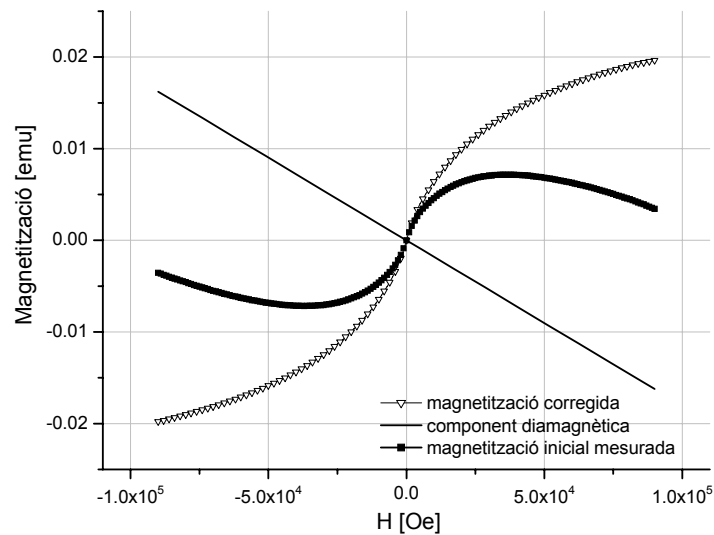
Un cop s'han ajustat els valors experimentals amb l'equació 7.7 s'obté el valor corresponent a la constant  $P1$ , és a dir  $\mathbf{M}_d$  (vegeu la figura 7.4). A continuació es resta la component  $\mathbf{M}_d$  de la  $\mathbf{M}$ , és a dir, es resta  $P1$  a  $\mathbf{M}$ ,

$$\mathbf{M}_{\text{corr}} = \mathbf{M} - \mathbf{M}_d = [C \cdot \mathbf{H} \cdot m_p] / [T - \theta] \quad (\text{eq. 7.8})$$



**Figura 7.4** Correcció de la component diamagnètica d'una corba de susceptibilitat

En el cas de les corbes d'histeresi, com la component diamagnètica és proporcional al camp magnètic aplicat i com es coneix el valor de P1 a 90 kOe es pot obtenir el valor de  $\mathbf{M}_d$  corresponent als diferents valors del camp magnètic aplicat. Un cop obtingut es resta a les dades experimentals inicials i s'obté la corba d'histeresi corregida (vegeu la figura 7.5)



**Figura 7.5** Correcció de la component diamagnètica en una corba d'histeresi

En el cas de les corbes d'histeresi, tal com s'ha comentat prèviament es pot conèixer el valor de la magnetització de saturació per unitat de ferro. Segons la Llei de Langevin, en la regió paramagnètica es compleix:

$$\mathbf{M} / \mathbf{M}_0 = \coth(a) - 1/a \quad (\text{eq. 7.9})$$

$$\text{on } a = \mu \cdot \mathbf{H} / K \cdot T \quad (\text{eq. 7.10})$$

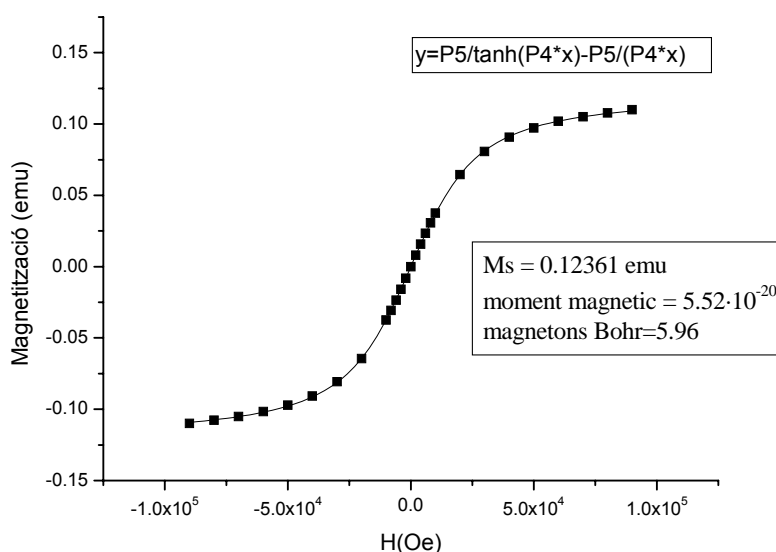
on  $\mu$  és el moment magnètic de la substància paramagnètica i  $K$  és la constant de Boltzmann.

Llavors la Llei de Langevin es pot reescriure de la forma següent:

$$y = [P5 / \tanh(P4 \cdot x)] - [P5 / (P4 \cdot x)] \quad (\text{eq. 7.11})$$

on  $P4 = \mu / K \cdot T$  i  $P5 = \mathbf{M}_{\text{saturació}}$

Tal com es pot veure a la figura 7.6, si es representa la magnetització vs el camp magnètic aplicat es pot obtenir el moment magnètic per unitat de Fe(III).



**Figura 7.6** Ajust d'una corba d'histerèsi a la Llei de Langevin

En aquest exemple s'obté un moment magnètic per àtom de Fe de  $5.52 \cdot 10^{-30}$  emu, que correspon a  $5.96 \mu_B$  (un ió  $Fe^{3+}$  presenta  $5.92 \mu_B$ ).

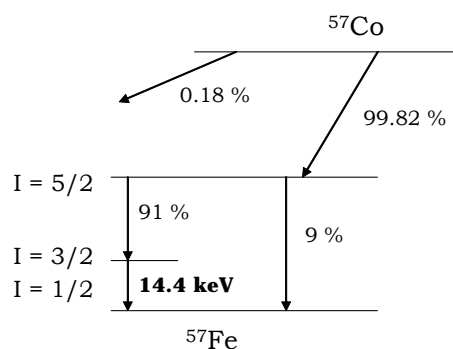
A partir dels mg de  $Fe_8$  presents en les solucions fosfatades es pot conèixer quin seria el moment magnètic efectiu si tots els ions Fe(III) no estiguessin acoblats magnèticament. Per exemple, la solució  $Fe_{8(fos)}$  té aproximadament  $5 \cdot 10^{-6}$  mols de Fe(III), que equivalen a  $3 \cdot 10^{18}$  àtoms de Fe(III). Un àtom de Fe(III) té un moment magnètic de  $5.92 \mu_B$ , per tant,  $3 \cdot 10^{18}$  àtoms de Fe(III) presentaran  $1.8 \cdot 10^{19} \mu_B$ , el que significa 0.16 emu. És a dir, la magnetització de saturació que presentarien  $5 \cdot 10^{-6}$  mols de Fe(III) seria de 0.16 emu, per tant, aquest valor es pot comparar amb els valors de magnetització obtinguts a 4 K per les diferents solucions.

### 7.1.5 Espectroscòpia Mössbauer

L'espectroscòpia Mössbauer és un mètode d'anàlisi que es fonamenta en l'efecte ressonant homònim<sup>5</sup>. De forma general, es podria dir que permet visualitzar les energies de transició nuclear de determinats nuclis (en particular de l'isòtop  $^{57}Fe$ ). El valor d'aquestes energies, així com el nombre de nivells existents està relacionat amb l'entorn cristal·loquímic i el règim d'interacció magnètic de l'àtom ressonant. La seva anàlisi permet deduir propietats estructurals, químiques i magnètiques de la mostra sota estudi.

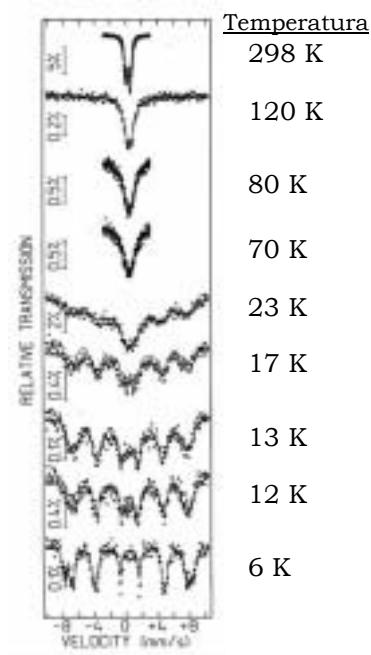
Tal com es pot veure a la figura 7.7, quan una font radioactiva de  $^{57}Co$  emet fotons  $\gamma$  una fracció de fotons és absorbida i excita els nuclis de  $^{57}Fe$  de la mostra (14.4 eV). La desexcitació dels nuclis de  $^{57}Fe$  es pot produir per reemissió

sense retrocés, transmissió de l'excitació als nivells electrònics, o bé per excitació fotònica. Els fotons reemesos sense retrocés també pateixen l'absorció normal tot i que una part d'ells contribuirà un altre cop a excitar nous nuclis de  $^{57}\text{Fe}$  i es produirà un efecte ressonant. La reemissió s'esdevé en totes les direccions i, per tant, la fracció de radiació mesurada pel detector presenta una intensitat inferior a la que es registraria si no hi hagués l'efecte ressonant. Aquesta absorció anòmala constitueix la detecció experimental de l'efecte Mössbauer i només es produeix si l'energia dels fotons emesos per la font radioactiva coincideix exactament amb l'energia d'alguna transició nuclear de tipus ( $I = 1/2 \rightarrow I = 3/2$ ) dels nuclis de ferro de la mostra. A fi de visualitzar aquesta absorció anòmala cal fer vibrar la font radioactiva aprofitant l'efecte Doppler, és a dir, desplaçar lleugerament l'energia dels fotons  $\gamma$  cap a valors superiors i inferiors respecte del valor de la transició nuclear.



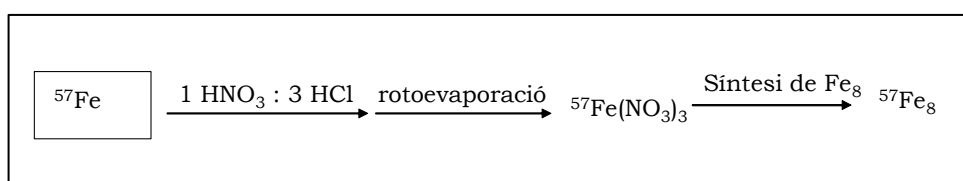
**Figura 7.7** Descomposició radioactiva de l'isòtop  $^{57}\text{Co}$ . En un 91% dels casos es produeix  $^{57}\text{Fe}$  d'spin nuclear 3/2.

Les mostres de  $\text{Fe}_8$  mesurats van ser analitzades a un mínim de dues temperatures (200 K i 4.2 K) amb un espectròmetre convencional amb geometria de transmissió, localitzat a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona. La molècula de  $\text{Fe}_{8(s)}$  presenta relaxació superparamagnètica a causa de l'anisotropia magnètica del clúster i de la seva mida. En relació les mesures Mössbauer, el fenomen s'evidencia com la transformació del doblet d'alta temperatura en un sextet a mesura que disminueix la temperatura. A la temperatura de bloqueig, l'espectre presenta una relació 1:1 entre el sextet característic de la fase magnètica i un doblet (o singlet) de naturalesa dinàmica (per raó de la relaxació superparamagnètica). En el cas del  $\text{Fe}_8$  la temperatura de bloqueig trobada per Mössbauer és 22 K (vegeu la figura 7.8).



**Figura 7.8** Variació del comportament magnètic en funció de la temperatura a partir de mesures Mössbauer

En aquest treball s'ha mesurat el  $\text{Fe}_8(\text{s})$  així com les solucions congelades de  $\text{Fe}_8(\text{aq})$  i de  $\text{Fe}_8(\text{fos})$ . Per tal d'augmentar la intensitat del senyal, les mostres en solució es van preparar a partir de  $^{57}\text{Fe}_8$ . El  $^{57}\text{Fe}_8$  es va preparar segons la síntesi descrita en el capítol 2. L'obtenció de  $^{57}\text{Fe}$  ha estat a partir d'una placa metàl·lica de  $^{57}\text{Fe}$ . La placa es va atacar amb aigua règia i després de rotoevaporar la solució se'n va obtenir la sal  $^{57}\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  (vegeu la figura 7.9).



**Figura 7.9** Esquema de l'obtenció del  $^{57}\text{Fe}_8$

### 7.1.6 Difracció de raigs X

La difracció de raigs X (XRD) és un mètode d'anàlisi de l'estructura cristal·lina dels sòlids. En aquest treball s'ha resolt l'estructura cristal·lina del nou polimorf de  $\text{Fe}_8$  en un difractòmetre Enraf-Nonius CAD4 utilitzant radiació monocromàtica Mo-K $\alpha$  ( $\lambda=0.71069 \text{ \AA}$ ), situat a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (a l'annex 2 es comenten les condicions experimentals de mesura).

La difracció de pols és una variant de la tècnica de difracció de raigs X, que generalment s'utilitza per identificar fases cristal·lines tot i que també pot emprar-se per determinar-ne. Les mostres de  $\text{Fe}_{8(s)}$  van ser analitzades mitjançant un difractòmetre Siemens D-5000 de l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona, es va utilitzar radiació X corresponent a la transició  $K_{\alpha}$  del coure ( $1.542 \text{ \AA}^{-1}$ ). En tots els casos va enregistrar-se la intensitat difractada en el rang d'angle  $2\theta$  de  $4^{\circ}$  a  $30^{\circ}$ .

### 7.1.7 Altres tècniques

En endavant se citen diverses tècniques que s'han fet servir puntualment al llarg del treball però els resultats obtinguts no s'han inclòs a la memòria escrita.

#### Microscòpia de transmissió electrònica

A fi de comprovar la influència de la concentració de fosfat en la mida de partícula, es van observar dues solucions  $\text{Fe}_{8(c)}^{[fos]}$ ,  $\text{Fe}_{8(0.01M)}^{[fos]}$  i  $\text{Fe}_{8(1M)}^{[fos]}$  per microscòpia de transmissió electrònica. Es va dipositar una gota de cada solució en reixetes de Cu. Les mesures es van prendre en un microscopi TEM JEOL 1210, sota la supervisió de Judith Oro, situat a l'Institut de Ciència de Materials. A fi de conèixer els elements presents en les diferents partícules es van observar les dues solucions amb un espectròmetre de dispersió de raigs X (XEDS), Link model QX2000 amb resolució 138 eV acoblat al microscopi de transmissió electrònica (Serveis Científicotècnics de la UB).

#### Mesures de conductivitat

Es van prendre mesures de conductivitat per observar si canviava la càrrega neta de les solucions de  $\text{Fe}_8$  a mesura que augmentava la concentració de fosfats. Les mesures de conductivitat es van portar a terme en un conductímetre Basic 30 Crison situat a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona.

#### Espectroscòpia de ressonància paramagnètica electrònica (RPE)

A fi de comprovar que l'espècie de les solucions  $\text{Fe}_{8(0.05M)}^{[fos]}$  i  $\text{Fe}_{8(2M)}^{[fos]}$  era diferent, es van enregistrar els espectres RPE en banda X (9.4 GHz) amb un espectròmetre Bruker ESP-300 a 4 K situat al Servei de Magnetoquímica de la Universitat de Barcelona, sota la supervisió de la Dra. Núria Clos.

#### Espectroscòpia d'ionització de masses electrospray (ESI-MS)

L'objectiu d'enregistrar els espectres de masses Maldi-Tof de dues solucions de  $\text{Fe}_8$  amb diferent concentració de fosfat era comprovar si l'espècie en solució era la mateixa. Les mesures es van prendre en un espectròmetre Q-tof 2

(Micromass, Manchester, UK) situat a la Universitat de Mons-Hainut, Mons (Bèlgica) sota la supervisió de la Dra. Laurent.

### **Espectroscòpia *photon correlation***

Aquesta tècnica mesura els moviments brownians i després els relaciona amb la mida de partícula. Es van mesurar dues solucions,  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  a fi d'observar la mida de partícula. Les mesures es van dur a terme en un espectròmetre Malvern 4800, sota la supervisió de la Dra. Mainero, situat al Bioindustry Park, Torí (Itàlia).

### **7.1.8 Estratègies utilitzades per cristal·litzar solucions $\text{Fe}_8(\text{fos})$**

A fi de conèixer quina era l'espècie estable que roman en les solucions  $\text{Fe}_8(\text{fos})$  es va intentar successives vegades de cristal·litzar les solucions fosfatades. A continuació i de forma molt breu es descriuran els diferents mètodes que es van portar a terme per obtenir cristalls. Cal destacar que el  $\text{Fe}_8$  només és soluble en aigua i gairebé soluble en metanol i que la sal  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  només és soluble en aigua.

#### **Evaporació**

Es va deixar evaporar lentament una solució aquosa d'1 mM  $\text{Fe}_8$  amb 0.01 M a temperatura ambient i se'n va obtenir una pols de color marró clar, el producte de la qual no va ser identificat.

#### **Difusió**

Es va preparar una solució aquosa 0.001 M de  $\text{Fe}_8$  en 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i es va col·locar sota una atmosfera saturada de DMSO. Al cap d'uns quants dies, el solvent orgànic s'havia evaporat però no es va obtenir cap cristall òptim. També es va provar amb acetonitril.

#### **Cristal·lització en capes**

Es van preparar 2 ml d'una solució aquosa 0.001 M de  $\text{Fe}_8$  en 0.01 M de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i a continuació es van afegir 2 ml de diclorometà. Finalment es van afegir 0.5 ml d'acetonitril amb ajuda d'una pipeta Pasteur per dipositar-lo al fons del tub. No es van obtenir cristalls.

#### **Síntesi hidrotermal**

A la bibliografia es troben treballs que descriuen la síntesi hidrotermal de fosfats de ferro utilitzant una amina orgànica com a plantilla<sup>6</sup>. En aquest treball es van fer diferents intents amb la finalitat d'obtenir cristalls seguint aquesta

estratègia. En primer lloc es van preparar 10 ml d'una solució de  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  i es van dipositar en un petit autoclau (250 ml). A continuació es va apujar la temperatura fins a  $180^\circ\text{C}$  i es va mantenir així durant dos dies. Finalment, es va abaixar la temperatura amb una rampa de  $10^\circ\text{C h}^{-1}$ . Es va obtenir una solució amb cristalls molt petits i amorfs.

## 7.2 Annex 2: condicions experimentals de mesura, resolució i afinament del nou polimorf de $\text{Fe}_8$

La resolució de l'estructura cristal·lina del nou polimorf de  $\text{Fe}_8$  l'ha dut a terme el Dr. Ignasi Mata en un difractòmetre Enraf-Nonius CAD4 utilitzant radiació monocromàtica Mo-K $\alpha$  ( $\lambda=0.71069 \text{ \AA}$ ) situat a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona. Els paràmetres de cel·la es van determinar a partir d'un afinament de mínims quadrats d'una sèrie de 15 reflexions cercades a l'atzar. Les intensitats es van mesurar a temperatura ambient utilitzant escombrats  $\omega$ - $2\theta$ . A continuació es mostren les condicions experimentals de mesura, resolució i afinament del nou polimorf de  $\text{Fe}_8$ . La correcció de Lorentz-polarització i la correcció d'absorció mitjançant el mètode psi-scan es van dur a terme amb el programa WinGX<sup>7</sup>. L'estructura va ser resolta per mètodes directes i afinada per mínims quadrats utilitzant el paquet de programes SHELX97<sup>8</sup>. Es van situar en posicions calculades tots els àtoms d'hidrogen que no pertanyien a molècules d'aigua.

**Taula 1.** Dades cristal·lines i de refinament per al  $\text{Fe}_8$

Empirical formula	C36 H104 Br8 Fe8 N18 O24
Formula weight	2259.45
Temperature	293(2) K
Wavelength	0.71073 $\text{\AA}$
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 13.257(2) $\text{\AA}$ $\alpha$ = 114.77(1) $^\circ$ . b = 13.564(1) $\text{\AA}$ $\beta$ = 108.14(1) $^\circ$ . c = 15.076(2) $\text{\AA}$ $\gamma$ = 101.43(1) $^\circ$ .
Volume	2162.8(6) $\text{\AA}^3$
Z	1
Density (calculated)	1.735 $\text{Mg/m}^3$
Absorption coefficient	5.064 $\text{mm}^{-1}$
F(000)	1126



Crystal size	0.47 x 0.40 x 0.40 mm <sup>3</sup>
Theta range for data collection	2.40 to 30.41°.
Index ranges	-18<=h<=0, -18<=k<=19, -20<=l<=21
Reflections collected	13602
Independent reflections	13085 [R(int) = 0.0292]
Completeness to theta = 30.41°	100.0 %
Absorption correction	Psi-scan
Max. and min transmission	0.2413 and 0.1421
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data / restraints / parameters	13085 / 54 / 498
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.076
Final R indices [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0576, wR2 = 0.1746
R indices (all data)	R1 = 0.1291, wR2 = 0.2014
Largest diff. peak and hole	2.111 and -1.289 e.Å <sup>-3</sup>

**Taula 2.** Coordenades atòmiques ( x 10<sup>4</sup>) i paràmetres de desplaçament isotròpic equivalent (Å<sup>2</sup>x 10<sup>3</sup>) per al Fe<sub>8</sub>. U(eq) es defineix com un terç de la traça del tensor ortogonal U<sup>ij</sup>.

	x	y	z	U(eq)
Fe(1)	737(1)	419(1)	4584(1)	21(1)
Fe(3)	643(1)	-1353(1)	2438(1)	24(1)
Fe(4)	-1998(1)	-1596(1)	2622(1)	23(1)
Fe(2)	2216(1)	3049(1)	5916(1)	27(1)
Br(1)	348(1)	1493(1)	1814(1)	72(1)
Br(2)	-2312(1)	-4990(1)	571(1)	81(1)
Br(3)	5316(1)	8894(1)	4869(1)	70(1)
Br(4)	3888(2)	7251(2)	5325(2)	87(1)
Br(5)	3923(2)	9119(4)	123(3)	108(1)
Br(6)	-1294(7)	2875(10)	5425(6)	91(3)
Br(7)	-11(2)	5050(2)	7566(2)	71(1)
Br(8)	-990(9)	3341(10)	5863(12)	128(4)
N(21)	3965(3)	4294(4)	6678(3)	39(1)
C(22)	4037(6)	5359(5)	7577(5)	64(2)
C(23)	3069(7)	5706(5)	7188(7)	82(3)

N(24)	1949(4)	4686(4)	6458(5)	56(1)
C(25)	1316(6)	4648(8)	5432(10)	96(3)
C(26)	1859(7)	4356(8)	4691(7)	85(3)
N(27)	2252(4)	3390(4)	4634(4)	50(1)
C(28)	3424(6)	3596(6)	4731(5)	64(2)
C(29)	4284(5)	4508(6)	5893(5)	54(2)
N(31)	463(4)	-1405(4)	928(3)	36(1)
C(32)	1568(5)	-890(6)	957(5)	53(1)
C(33)	2492(5)	-188(6)	2100(5)	60(2)
N(34)	2403(4)	-846(4)	2675(4)	44(1)
C(35)	2728(5)	-1875(7)	2280(5)	61(2)
C(36)	1891(6)	-2937(6)	2108(5)	57(2)
N(37)	689(4)	-3062(4)	1538(3)	38(1)
C(38)	326(6)	-3429(5)	366(4)	48(1)
C(39)	-189(5)	-2659(5)	62(4)	44(1)
N(41)	-3450(4)	-1247(4)	2845(3)	40(1)
C(42)	-3174(6)	10(6)	3229(6)	63(2)
C(43)	-2781(7)	330(7)	2515(7)	68(2)
N(44)	-2042(4)	-281(4)	2159(3)	38(1)
C(45)	-2441(6)	-867(6)	971(5)	56(2)
C(46)	-3476(6)	-1960(6)	364(5)	60(2)
N(47)	-3425(3)	-2646(4)	922(3)	42(1)
C(48)	-4576(5)	-2042(7)	1880(6)	63(2)
C(49)	-4496(5)	-3022(7)	1004(5)	66(2)
O(1)	-893(2)	-486(2)	4055(2)	22(1)
O(2)	599(2)	2001(3)	5006(2)	29(1)
O(3)	2432(2)	1582(3)	5306(2)	29(1)
O(4)	1158(2)	-991(3)	3939(2)	27(1)
O(5)	576(3)	172(3)	3108(2)	31(1)
O(6)	-1012(2)	-2133(3)	1917(2)	29(1)
O(7)	-2404(3)	-3029(3)	2745(2)	31(1)
O(1W)	2718(6)	2635(7)	1882(6)	98(2)
O(2W)	-3585(5)	-5161(4)	-1523(6)	171(5)
O(3W)	4637(8)	1863(8)	2149(8)	169(5)
O(4W)	2526(9)	4942(11)	2764(10)	163(4)
O(5W)	8764(11)	2828(18)	2046(10)	213(6)

## 7.3 Resum de la tesi en llengua anglesa

### 1. Outline of the thesis

Magnetic resonance imaging (MRI) was developed in 1970 after the initial discovery of NMR by Bloch and Purcell. Bloch also foresaw the use of paramagnetic contrast agents for NMR by adding ferrous ion to his solutions to reduce relaxation times. The first attempt at using a contrast agent in MRI was published by Lauterbur, Mendoca Diaz, and Rudin in 1978. They used  $Mn^{2+}$  complexes and demonstrated the most fundamental principle of the art: exogenous paramagnetic substances reduce the relaxation time sufficiently to be readily visualized in MR images of tissues. There are two fundamental ways in which these alterations can be made: the signal becomes more intense (brighter) or the signal can become less intense (darker). Both of these effects can be obtained with various types of MR contrast agents. Nearly all classes of MR contrast agents create their effect by changing the spin–lattice (longitudinal) relaxation time ( $T_1$ ) and/or the spin–spin (transversal) relaxation time ( $T_2$ ) of water protons. Specific pulse sequences can be employed in MR imaging that are predominantly sensitive to differences in  $T_1$ ,  $T_2$ , or proton density. Useful measures of the efficiencies of water–proton relaxation agents with respect to their effects on spin–lattice or spin–spin relaxation times are the relaxivities,  $r_1$  and  $r_2$ , respectively. Values of  $r_1$  and  $r_2$  are usually determined by measuring the relaxation rate of water protons in the presence of a relaxation agent at different concentrations. Over a limited range, the relaxation rate depends linearly on the concentration of the relaxation agent. The slope of the corresponding plot is the relaxivity, usually given in units of  $mM^{-1}s^{-1}$ . Relaxivities are dependent on both the magnetic field strength employed for the measurements and on the sample temperature.

Paramagnetic contrast agents operate predominantly on the spin–lattice relaxation time. Superparamagnets and ferromagnets, such as particulate iron oxides operate on spin–spin relaxation times. The paramagnetic metal ions which are reasonably stable in aqueous media and which possess the highest spin magnetic moments are  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  and  $Gd^{3+}$ . The simple salts are too toxic for human use. In order to reduce their toxicity and control their biodistribution, a variety of ligands have been used to complex paramagnetic ions.

Molecular parameters that influence relaxivity for a given paramagnet include the paramagnet–water proton distance, which may be strongly influenced by the

number of directly-bound (inner-sphere) water molecules, the water residence time near the paramagnet, the longitudinal electron-spin relaxation time of the paramagnet, and the rotational correlation time of the paramagnet unit.

**The aim of the thesis has been to study the molecule  $\{[(\text{tacn})_6\text{Fe}_8(\mu_3\text{-O})_2(\mu_2\text{-OH})_{12}]\text{Br}_7(\text{H}_2\text{O})\}\text{Br}\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , where tacn = 1,4,7-triazacyclononane, as a contrast agent for magnetic resonance imaging** (hereafter referred to as  $\text{Fe}_8$ ). The  $\text{Fe}_8$  molecule was chosen for the following reasons:

- It is a system with 8 Fe(III) nuclei magnetically coupled by oxo- and hydroxo-bridges, which present a higher magnetic moment than the moment of the mononuclear complex.
- The  $\text{Fe}_8$  molecule presents an intermediate, unique size, between the mononuclear complexes and the iron oxides.
- Unlike gadolinium, iron has a natural human biochemistry.
- Our group had previously studied its magnetic properties.

The structure of the thesis is the following:

1. Introduction to NMR techniques and objectives of the study.
2. Synthesis and characterization of solid  $\text{Fe}_8$ .
3. Evaluation of  $\text{Fe}_8$  as a contrast agent:
  - Relaxivities of  $\text{Fe}_8$  in PBS, phosphate solution buffer at 9.4 and 1.41 T.
  - Phantom studies with  $T_1$ -weighted MRI at 9.4 T.
  - Cytotoxicity studies of  $\text{Fe}_8$  in a C6 glioma cell line.
4. Characterization of  $\text{Fe}_8$  behaviour in aqueous and phosphate solutions by spectroscopic and magnetic studies.
5. Evaluation of  $\text{Fe}_8$  in phosphate solutions, hereafter referred to as  $\text{Fe}_{8(\text{phos})}$ , as contrast agents
  - Relaxivities of  $\text{Fe}_{8(\text{phos})}$  solutions at 0.24 and 7.1 T. Influence of the phosphate concentration on relaxivity values.
  - Phantom studies of  $\text{Fe}_{8(\text{phos})}$  solutions with  $T_1$ -weighted MRI at 9.4T.

- Cytotoxicity studies of Fe<sub>8(phos)</sub> solution in a C6 glioma cell line.
- Preliminary in vivo studies of Fe<sub>8(phos)</sub> solution.

6. Conclusions and future work.

## 2. Synthesis and characterization of Fe<sub>8</sub>

The synthesis of Fe<sub>8</sub> was first reported by Wieghardt (see Figure 2.1). Magnetic investigations were also reported since Fe<sub>8</sub> displays a high-spin ground state, S=10, resulting in magnetic order and quantum tunnelling of the magnetization at ultra-low temperatures. The crystal structure of [(tacn)<sub>6</sub>Fe<sub>8</sub>(μ<sub>3</sub>-O)<sub>2</sub>(μ<sub>2</sub>-OH)<sub>12</sub>]<sup>8+</sup> is shown in Figure 2.4. An octameric Fe<sup>3+</sup> is formed, in which six of the eight Fe<sup>3+</sup> atoms are bonded to an amine ligand. The iron ions are coupled by twelve hydroxo-bridges and by two oxo-bridges.

## 3. Evaluation of Fe<sub>8</sub> as a contrast agent

Relaxivities in the presence of Fe<sub>8</sub> were measured in a phosphate buffered saline solution (PBS) in a high and a low magnetic field, both at room temperature (25°C) and at body temperature (37°C) (see Figure 3.2). A parallel study was carried out with Gd-DTPA (Magnevist®) for comparison purposes. Composition of PBS is the following: NaCl 0.14 M, KCl 2.68·10<sup>-3</sup> M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76·10<sup>-3</sup> M. Table 3.1 summarises relaxivity values obtained, where r<sub>i</sub> values for Fe<sub>8</sub> are referred to the whole Fe<sub>8</sub> molecule. pH dependence of the relaxation times is shown in Figure 3.3; as a paramagnetic contrast, at high and low pH values, acid- and base-catalyzed proton exchange process are present. The stability of the T<sub>1</sub> relaxation time was assessed by repeating the T<sub>1</sub> measurement of one Fe<sub>8</sub> sample at several times (up to 100 hours) suggesting the integrity of the Fe<sub>8</sub> molecule in solution (see Figure 3.4). Figure 3.5 compares the relaxation effect of Fe<sub>8</sub> and Gd-DTPA on progressively saturated (T<sub>1</sub>-weighted) magnetic resonance images of a PBS model solution. We can conclude from measurements of relaxivities at 9.4 T and 1.4 T that Fe<sub>8</sub> has a significantly different r<sub>1</sub> value compared with Gd-DTPA, while r<sub>2</sub> only shows differences in a high field for the two CAs (*P* < 0.05), where r<sub>i</sub> values are referred to the whole molecule. **On the other hand, the ratio of r<sub>2</sub>/r<sub>1</sub> in Fe<sub>8</sub>, as in the case of Gd-DTPA, is between 1 and 2, indicating that Fe<sub>8</sub> acts as a T<sub>1</sub>-contrast agent.** As the eight iron atoms are coordinative saturated in the Fe<sub>8</sub> compound, as can be seen from its crystal structure (see Figure 2.4), the relaxation mechanism must be by an outer or second sphere relaxivity. As regarding toxicity tests, several assays (LDH leakage, neutral red, MTT, double staining with fluorescein

diacetate (FDA) and propidium iodide (PI)) have been performed in a C6 glioma cell line; it was observed that after 24 hours of exposure the concentration of 1 mM of  $\text{Fe}_8$  begins to become toxic, although 100% of mortality is not achieved until 72 hours of exposure at 1.5 mM (see Figure 3.10). At 72 hours  $\text{Fe}_8$  has a value of  $\text{LC}_{50}$  of 1.12 mM and Gd-DTPA of 30 mM (see Figure 3.8, 3.9 and Table 3.3). Using the TUNEL assay it was possible to check the mechanism of cell death, suggesting an apoptotic mechanism (see Figure 3.13). Generation of reactive oxygen species was determined using 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA). Mild oxidative effects caused by the presence of free iron ions does not seem to be a significant cause of cytotoxicity for  $\text{Fe}_8$ , neither was an osmotic-related mechanism involved in  $\text{Fe}_8$  cytotoxicity, as osmotic changes were not present (Figure 3.12 and Table 3.4). These results are reported by us in the NMR *Biomed.* 2005, 18, 1-8 journal.

#### **4. Characterization of $\text{Fe}_8$ behaviour in aqueous solution and in PBS by spectroscopic and magnetic studies**

Generation of reactive oxygen species observed by cytotoxicity suggests the existence of free iron ions, which implies decomposition of the  $\text{Fe}_8$  molecule. Characterization of the  $\text{Fe}_8$  molecule in solution was carried out in order to check the stability of the compound in solution. Spectroscopic and magnetic measurements were performed on the  $\text{Fe}_8$  in aqueous solution, hereafter referred to as  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$ . Water was chosen as the solvent, mainly due to low solubility in other solvents. For comparison purposes, the powder sample has also been characterized ( $\text{Fe}_{8(\text{s})}$ ). The UV-Vis spectra of  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  recorded at different times, are displayed in Figure 4.2. They consist of three main small bands at 230 nm, 300 nm and 410 nm. The UV-Vis spectrum of  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  is very similar to those obtained for other complexes containing the 'butterfly core' (see Figure 4.3), which could indicate that the 'butterfly core' remains stable in the solution (see Figure 4.2 inset). Nevertheless, when recording the spectra at three hourly intervals, 0, 3 and 6 hours, a slight diminution of the intensity of the bands is detected for increasing times, which seems to indicate the dissociation of the  $\text{Fe}_8$  complex in aqueous solution, although no precipitate was observed. Figure 4.4 shows the infrared spectra of  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  freeze-drying (spectrum a) and of  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  (spectrum b). Most of the peaks above  $800\text{ cm}^{-1}$  are due to vibrations of the organic ligands and in this region there is a strong similarity between the two spectra. However, between  $800\text{--}400\text{ cm}^{-1}$  there are some small differences. This region corresponds to Fe-O-Fe vibrations, we can therefore not conclude much about the stability of  $\text{Fe}_8$  in aqueous solution from spectroscopic measurements. To know more about

the aqueous behaviour of the  $\text{Fe}_8$  molecule, magnetic measurements have been performed. Considering that intermolecular interactions between  $\text{Fe}_8$  molecules are negligible, it is possible to compare the magnetic results obtained for the powder sample with those obtained for the aqueous solution. Mössbauer spectra of  $^{57}\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  and  $^{57}\text{Fe}_{8(\text{s})}$  samples were recorded at 200 and 4.2 K (see Figure 4.6). At 200 K both spectra are very similar, but differences can be seen at low temperature. Results at 4.2 K suggest the presence of several iron ion sites in the solution: (i) paramagnetic  $\text{Fe}^{3+}$  ion centres and (ii) iron hydroxide as colloidal particles of the gel-type  $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot 0.9\text{H}_2\text{O}$ . Room-temperature magnetic susceptibility of  $\text{Fe}_8$  in an aqueous solution was obtained from NMR measurements with the Evans method. However, when performing several measurements at different times, the obtained value of the magnetic moment has shown certain fluctuations, and more in-depth magnetic measurements were performed. Substantial differences between  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  are also seen in the dc magnetization results. The temperature dependence of  $\chi_g T$  for the  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  samples obtained in a field of 90 kOe are shown in Figure 4.8 (a) and (b), respectively. For the powdered sample the  $\chi_g T(T)$  curve measured in 10 kOe is also presented in Figure 4.8 (b). The  $\chi_g T(T)$  dependence of the  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  is indicative of the presence of ferrimagnetic interactions between the Fe ions, as is described in the literature. This is in direct contrast with the  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  sample, where the  $\chi_g T(T)$  curve suggests the presence of dominant antiferromagnetic coupling between Fe ions. The magnetization curves of  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  samples are also very different, as shown in Figure 4.9 (a) and (b) respectively. **From magnetic measurements we can conclude that the  $\text{Fe}_8$  molecule is not stable in aqueous solution.**

Why were relaxivity measurements of  $\text{Fe}_8$  in PBS time-stable (see Figure 3.4) as opposed to  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  solutions (see Figure 4.10)? We realized that phosphate groups present in PBS,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.01 M and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $1.76 \cdot 10^{-3}$  M, have an active role in the stability of the  $T_1$  measurements. We have thus tried to understand the nature of the interaction between phosphate groups and the  $\text{Fe}_8$  molecule. We prepared solutions with a given concentration of  $\text{Fe}_8$  and with a different concentration of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  salt; hereafter these solution will be referred to as  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  and  $\text{Fe}_8^{[\text{c}]_{(\text{fos})}}$  when we consider solutions with different concentrations of phosphate, where [c] is the  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  concentration. As we can see in Figure 4.11 maintaining  $\text{Fe}_8$  concentration and increasing phosphate concentration, the solutions become colourless. The UV-Vis spectra obtained from  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  solutions are very different (Figure 4.12). Oxo-bridged Fe(III) complexes exhibit intense absorption in the visible and near-UV region. It is worth remarking that when

oxo-bridges are replaced by phosphate-bridges, the initial bands present in the visible spectrum disappear due to low coupling between iron ions by phosphate bridge-like complexes in Figure 4.13 (1) and (2)). In conclusion, it seems that phosphate ligands are incorporated in the structure and that result in colourless solutions. Figure 4.14 shows the IR spectra of  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  freeze-drying (spectrum a) and of  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  (spectrum b); as for the  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  sample, no large differences between two spectra are observed. Moreover, because the region of O-P-O vibration coincides with amine vibration, we could not affirm the coordination of phosphate groups to iron ions. As phosphor nuclei are active to NMR,  $^{31}\text{P}$  spectra of different solutions of  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  were recorded (see Figure 4.15). The concentration of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  increases a narrow signal of  $^{31}\text{P}$  which grows in intensity and appears at 2.5 ppm (the position corresponding to free  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), but for  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  concentrations lower than 0.008 M, the signal was not observed, suggesting a strong interaction between phosphate groups and  $\text{Fe}^{3+}$  ions below 0.008 M. As the concentration of  $\text{Fe}_8$  was 2 mg/ml, equivalent to 1 mM, so  $[\text{Fe}^{3+}] = 8 \text{ mM}$ , we could conclude that the stoichiometric interaction is **1 atom Fe(III) : 1 molecule  $\text{K}_2\text{HPO}_4$** . In order to find out if the molecule of  $\text{Fe}_8$  was stable in phosphate solution we carried out magnetic measurements of  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  solutions:  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$  and  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  (these samples were prepared five times concentrated to obtain a good signal,  $[\text{Fe}_8] = 5 \text{ mM}$ ). Mössbauer spectra of  $^{57}\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ,  $^{57}\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  and  $^{57}\text{Fe}_{8(\text{s})}$  are displayed in Figure 4.16 (a), (b) and (c) respectively. The samples behave as paramagnetic or superparamagnetic at high temperature, but at 4.2 K there are big differences between the three spectra: the  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$  sample is paramagnetic or superparamagnetic; the  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  sample shows 25 % of the total area magnetically blocked which could correspond to the formation of colloidal particles of  $(\text{FeOOH})_8(\text{FeOH}_2\text{PO}_4)$  type with a size lower than 5 nm, in any case not large enough to observe the 100 % magnetically blocked iron moments. The sextet was only observed for high phosphate concentration sample,  $^{57}\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$ , ratio of  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  is 200, so we believe in an increment of the particle size when the  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  ratio is increased, compared with the less concentrated sample.

Magnetic measurements were also carried out on  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ,  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  and  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$  solutions (see Figure 4.18 respectively).  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  solutions present antiferromagnetic coupling as opposed to  $\text{Fe}_{8(\text{s})}$ , which behaves as a ferrimagnet. Magnetization versus field measurements at 4 K are plotted in Figure 4.19; it is worth noting that for  $\text{Fe}_8^{[1\text{M}]_{(\text{fos})}}$  sample magnetization saturates at 5.95  $\mu\text{B}$  (the magnetic moment of  $\text{Fe}^{3+}$  is 5.92  $\mu\text{B}$ ), suggesting the existence of Fe(III) ions that are not magnetically coupled in the high phosphate concentrated sample. From



magnetic measurements: **we can conclude that the  $\text{Fe}_8$  molecule is not stable in phosphate solution and the compound(s) formed in the phosphate solution depend(s) on the  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  concentration.** In Figure 4.20 the time-stability of the  $r_1$  value is shown for three samples:  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  and  $\text{Fe}_{8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}}$  and  $\text{Fe}_{8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}}$ . While phosphate solutions present a fast kinetic mechanism of decomposition and we are not able to observe any change, the  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  solution presents a slower kinetic decomposition and changes are observable during the  $T_1$  evaluation. A model of  $\text{Fe}_8$  decomposition in phosphate solution could possibly be the scheme plotted in Figure 4.21.  $^{13}\text{C}$  spectra of the  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  solutions have been recording and not signal was observed suggesting the amine coordination to paramagnetic center.

### 5. Evaluation of $\text{Fe}_8$ in phosphate solutions, hereafter referred to as $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ , as a contrast agent

In Figure 5.1 and 5.2 the dependence of  $r_1$  value on  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  concentration can be seen. **As the concentration of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  increases the  $r_1$  values increase reaching the maximum value of  $2.35 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  when the  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  ratio is 1000** (in these cases the  $r_1$  values have been referred to the Fe ion because the relaxometric unit is not the  $\text{Fe}_8$  molecule). It must be mentioned once again that in order to obtain a time-stable  $r_1$  measurement the  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  ratio must be higher than 8–10. Table 5.1 shows the pH dependence on phosphate concentration and on  $\text{Fe}_8$  addition, confirming the significant role of the phosphate groups (pH of  $\text{Fe}_{8(\text{aq})}$  1 mM is 5.4). For a pH value of 12, the  $r_1$  value reaches, for the whole range of phosphate concentrations, a similar value, thus suggesting the existence of the same species in solution (see Figure 5.6). In order to find out more about the relaxometric mechanism, NMRD profiles were recorded (see Figure 5.7). NMRD profiles indicate that both solutions behave as paramagnetic agents. This particular behaviour between phosphate groups and iron ions has also been observed for other phosphate ligands such as DOTP (see Figure 5.9).

We have also checked the relaxometric properties of  $\text{Fe}_8$  precursors: iron salt (III) and tacn, in phosphate solutions. Three different ratios between reagents were studied:

Experiment 1: 8 Fe : 6 tacn (ratio present in  $\text{Fe}_8$  molecule) (see Table 5.2)

Experiment 2: 8 Fe : 8 tacn (see Table 5.3)

Experiment 3: 8 Fe : 16 tacn (see Table 5.4)

In order to compare results, Table 5.5 summarizes the  $r_1$  values for different  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  solutions containing the same iron concentration as the precursor experiments. Nevertheless, when performing the  $r_1$  measurements for all experiments at 1, 24 and 48 hours, a significant increase of  $r_1$  and colour loss of the solution are observed. The kinetics of the reaction is slower for experiment 2 and experiment 3, so experiment 1 is that which behaves more similarly to the  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  solution.

What exactly is the relaxometric mechanism of H-1 nuclei? It is a well-known fact that fluoromethemoglobine relaxes more efficiently than methemoglobine, which has one water molecule coordinated directly to Fe(III). Because of the hydrogen bonding of the water molecule, fluoromethemoglobine iron produces high relaxivities values. Thus, one possible relaxometric model has been plotted in Figure 5.11, a dynamic mechanism between water molecules and iron ions through phosphate ligands indicating a second-sphere mechanism. Furthermore, we are suggesting the formation of  $([\text{Fe}(\text{OH})(\text{HPO}_4)_n(\text{tacn})]_m)$  type nanoparticles whose size increases as phosphate concentration increases, resulting in an increment of the  $\tau_R$  value and thus better relaxometric behaviour. However, more studies should be carried out to be certain about this model. If we compare the relaxometric properties of  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  solutions with iron oxide nanoparticles (see Table 5.6), we observe that the phosphate solutions behave more similarly to paramagnetic contrasts, such as the complexes plotted in Table 5.7.

Toxicity tests in a C6 glioma cell line were performed by LDH leakage after 72 hours of agent exposure; first we checked the toxicity effects of phosphate salt,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , which showed toxic effects for concentrations higher than 15 mM (see Figure 5.14). Subsequently,  $\text{Fe}_{8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  solutions were assayed; the range of concentrations of  $\text{Fe}_8$  studied was 0.25 mM – 1.5 mM, but 0.01 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  was added. **Results displayed in Figure 5.15 show no toxic effects for  $\text{Fe}_{8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$  solutions as opposed to  $\text{Fe}_8$  solutions, where phosphate salt was not added.** Moreover, we also studied the toxic effects of the precursor solution corresponding to experiment 1 (8 Fe(III) : 6 tacn) where 0.01 M of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  was added, and toxic effects were present for all the range of concentrations of Fe(III) studied (see Figure 5.17). Phantom images obtained at 9.4 T show an enhancement of the contrast when the phosphate concentration is increased (see Figure 5.18). Finally, we have carried out the preliminary toxicological and relaxometric studies in vivo by following the behaviour of three healthy CD1 mice after intravenously administering the following doses:

- solution 1:  $\text{Fe}_8^{[0.01\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ;  $[\text{Fe}_8] = 1\text{mM}$  ;  $[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 10\text{ mM}$
- solution 2:  $\text{Fe}_8^{[0.025\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ;  $[\text{Fe}_8] = 2.5\text{ mM}$  ;  $[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 25\text{ mM}$
- solution 3:  $\text{Fe}_8^{[0.05\text{M}]_{(\text{fos})}}$ ;  $[\text{Fe}_8] = 5\text{ mM}$  ;  $[\text{K}_2\text{HPO}_4] = 50\text{ mM}$

**No toxic effects were observed for any of the administered solutions**, apart from the fact that the recovery time for solution 3 was longer. Afterwards, we checked the relaxometric properties of solution 1 and if we compare Figure 5.22 and Figure 5.23 **a specific slight enhancement in contrast is observed**. The enhancement rapidly decreased, after 41 minutes, from injection (see Figure 5.24). No  $T_2$  effects were observed (Figure 5.26). A higher concentration of solution 3 was also injected and similar results were obtained.

## 6. Conclusions and future work

The aim of this thesis has been the evaluation of the molecular complex,  $\{[(\text{tacn})_6\text{Fe}_8(\mu_3\text{-O})_2(\mu_2\text{-OH})_{12}]\text{Br}_7(\text{H}_2\text{O})\}\text{Br}\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , where  $\text{tacn} = 1,4,7\text{-triazacyclononane}$ , as a contrast agent for magnetic resonance imaging. The main conclusions that we report are the following:

- 1. Relaxometric properties of  $\text{Fe}_8$  dissolved in the buffer solution PBS have been evaluated at 9.4 and 1.41 T indicating that the solution behaves similarly as Gd-DTPA, as a  $T_1$  contrast agent. Phantom studies corroborate these results.**
2. Cytotoxicity studies carried out in a C6 glioma cell line resulted in no toxic effects for lower concentrations than 1 mM after 24 h of exposure. At 72 hours  $\text{Fe}_8$  has an  $\text{LC}_{50}$  value of 1.12 mM and Gd-DTPA a value of 30 mM. Oxidative effects caused by the presence of free iron ions suggest the existence of free iron ions, and a decomposition of the  $\text{Fe}_8$  molecule.
3. Spectroscopic and magnetic measurements of  $\text{Fe}_8$  molecule in water solution evidence the lack of stability of the complex, indicating slow kinetic decomposition. A possible mechanism would be an attack on oxo- and hydroxo- bridges by water molecules since the amine,  $\text{tacn}$ , is not sterically demanding enough and does not provide stability to the molecule in solution.
4. Spectroscopic and magnetic measurements of the  $\text{Fe}_8$  molecule in phosphate solutions,  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$ , like PBS, show that the  $\text{Fe}_8$  molecule is not stable. As opposed to aqueous solutions, the kinetic decomposition for  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  is so fast that no changes could be observed with the techniques

we have used. Thus, phosphate groups have an important role in the stability of the new compound in solution. For a ratio of  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8] \geq 10$ , a compound existing in solution will be stable and its composition will depend on the concentration of the salt.

5. For a given concentration of  $\text{Fe}_8$  of 1 mM, when the concentration of  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  is 10 mM (like PBS solution) the compound in solution maintains some oxo- and hidroxo- bridges, but some phosphate groups are incorporated to the structure.  $^{31}\text{P}$  measurements suggest the interaction of 1 Fe atom with 1  $\text{HPO}_4^{2-}$  molecule. Magnetic measurements showed paramagnetic or superparamagnetic behaviour at room temperature.
6. When phosphate concentration increases, the compound remaining in solution seemed to be formed by colloidal particles of few nanometres formed by Fe(III) ions bridged by phosphate groups and are amine coordinated. From Mössbauer measurements for a  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  ratio of 200 the size of the particles was evaluated as  $< 5$  nm.
- 7.  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  solutions present very interesting relaxometric properties. For a given concentration of  $\text{Fe}_8$  when the phosphate salt increases, the  $r_1$  value increases, reaching the maximum value for a  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  ratio of 1000.**
8. The interaction between Fe(III) ions and water molecules must be second- or outer-sphere. We propose a relaxometric mechanism of H-1 nuclei based on a dynamic mechanism between water molecules and iron ions through phosphate bridges, and also by an increment of  $\tau_R$  due to an increase of the particle size.
9. Cytotoxicity studies of  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  performed in a C6 glioma cell line result in no toxic effects, suggesting that there are no free iron ions.
10. Evaluation of  $\text{Fe}_8$  precursors as contrast agents has resulted in similar relaxometric behaviour to  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  when the  $\text{Fe}^{3+}/\text{tacn}$  ratio is equal to the ratio present in the  $\text{Fe}_8$  molecule, but this system presents important toxic effects.
- 11. Finally, in vivo studies of  $\text{Fe}_{8(\text{fos})}$  solutions have been carried out in healthy mice. Maintaining a ratio between  $[\text{HPO}_4^{2-}]/[\text{Fe}_8]$  of 10 non toxic effects were observed for the following range studied: 1 mM - 5 mM of  $\text{Fe}_8$ .**

**12. T<sub>1</sub> images show an enhancement of contrast for a six times lower concentration, referred to Fe<sup>3+</sup>, than the dose administered of Gd-DTPA. The enhancement appears in specific parts of the head and could correspond to the saliva glands and as the concentration of phosphate in glands is known to be 5 mM, this indicates the ability of Fe<sub>8(fos)</sub> solutions to enhance T<sub>1</sub>-contrast in high-phosphate concentrate zones. Neither accumulation of the compound nor effects on T<sub>2</sub> were observed.**

As a future work, one of the immediate objectives would be the study of the stability of the Fe<sub>8</sub> molecule. One possibility would be to obtain the Fe<sub>8</sub> molecule with the methylated amine in order to prevent the attack of water molecules. Furthermore, it would be interesting to find out more about the decomposition mechanism of the Fe<sub>8</sub> molecule in aqueous solution, due to the great interest in this kind of complex as a model for biological systems. In addition, the elucidation of the compound in phosphate solution would be important for drawing the relaxometric mechanisms. Finally, more in vivo studies of Fe<sub>8(fos)</sub> should be carried out.

## Bibliografia del capítol 7

- <sup>1</sup> Gili Planas J. 20° Curso de Introducción Biofísica a la Resonancia Magnética. Institut de Diagnòstic per la Imatge (IDI). Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. **2004**
- <sup>2</sup> Rubinson K. A., Rubinson J. F. *Análisis Instrumental*. Isabel Capella (eds.) Person Educación, **2000**.
- <sup>3</sup> Kurtz D. M. Oxo- and Hydroxo-Bridged Diiron Complexes: A Chemical Perspective on a Biological Unit. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 585-606.
- <sup>4</sup> Cullity B. D. *Introduction to Magnetic Materials*. Morris Cohen (ed.). Addison-Wesley, **1972**.
- <sup>5</sup> Ll. Casas a *Aerogels nanocomposats un nou material. Micromössbauer, una nova eina de caracterització*. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, **2003**, 205pp (inèdit).
- <sup>6</sup> Lii K. and Huang Y.  $[\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{NH}]_3[\text{Fe}_8(\text{HPO}_4)_{12}(\text{PO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_6]$ : an organically templated iron phosphate with a pillared layer structure. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 2221-2225.
- <sup>7</sup> North A. C. T., Phillips D. C., Mathews F. S. A semi-empirical method of absorption correction. *Acta Cryst. A.* **1968**, *24*, 351-359.
- <sup>8</sup> Sheldrick G. M., *SHELX97 Programs for Crystal Structure Analysis* (Release 97-2.), Institut für Anorganische Chemie der Universität, Tammanstrasse 4, D-3400 Göttingen, Germany, **1998**.

*¿Pero es de verdad terrible el peso y maravillosa la levedad?*  
“La insoportable levedad del ser”  
Milan Kundera

