

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale  
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

## **Studio sperimentale e modellistico della cristallizzazione di farmaci e biofarmaci**



**Relatore/i**

Prof. Roberto Pisano

Dott.ssa Fiora Artusio

**Candidato**

Margherita Lipari

Marzo 2021



## Indice

1. Introduzione.....	1
1.1 Il processo di cristallizzazione .....	1
1.2 La sovrasaturazione come forza spingente .....	2
1.2.1 Il concetto di forza spingente .....	3
1.2.2 Modi per ottenere il grado di sovrasaturazione desiderato .....	5
1.2.2.1 Raffreddamento .....	5
1.2.2.2 Evaporazione di solvente .....	5
1.2.2.3 Aggiunta di antisolvente.....	5
1.3 Nucleazione: concetti base e teorie .....	6
1.3.1 Nucleazione omogenea ed eterogenea.....	6
1.3.2 Teorie sulla nucleazione: diversi approcci .....	7
1.4 Cristallizzazione in presenza di superfici .....	8
1.4.1 Caratteristiche del processo .....	8
1.4.2 Interazione tra superfici e soluzione.....	9
1.4.3 Tipologie di superfici impiegate .....	10
1.4.4 Principali parametri controllati.....	10
1.4.4.1 Polimorfismo .....	10
1.4.4.2 Velocità di nucleazione .....	11
1.4.4.3 Dimensione dei cristalli .....	11
1.5 Peculiarità della cristallizzazione di proteine .....	11
1.6 Obiettivo della tesi .....	12
2. Derivazione di un modello per la descrizione della cinetica della nucleazione di farmaci.....	15
2.1 Selezione dell'approccio teorico per la descrizione del processo.....	15
2.1.1 Ipotesi iniziali .....	15
2.1.2 Approccio proposto .....	15
2.2 Applicazione della CNT alla nucleazione omogenea .....	16
2.2.1 Concentrazione delle molecole.....	17
2.2.2 Fattore di Zeldovich e velocità di attaccamento .....	19
2.3 Nucleazione eterogenea su superficie piana e liscia .....	19

2.3.1 Il concetto di tensione interfacciale e bagnabilità .....	20
2.3.2 Derivazione del modello .....	21
2.4 Nucleazione all'interno dei pori .....	24
2.4.1 Ipotesi del modello matematico per la nucleazione all'interno di pori ..	24
2.4.2 Definizione e valutazione delle aree di contatto.....	25
2.4.3 Barriera energetica critica e velocità di nucleazione .....	27
2.4.4 Approfondimento del fenomeno di nucleazione in presenza di superfici porose .....	32
2.4.4.1 Nucleazione all'interno del poro .....	33
2.4.4.2 Nucleazione al di fuori del poro.....	34
3. Applicazione del modello ad un caso di studio.....	37
3.1 Cristallizzazione omogenea di aspirina.....	39
3.2 Cristallizzazione eterogenea di aspirina.....	42
3.2.1 Cristallizzazione in presenza di superfici .....	42
3.2.2 Cristallizzazione all'interno di pori di diversa geometria .....	44
4. Cristallizzazione di proteine in gel di agarosio .....	51
4.1 Descrizione della chimica del gel di agarosio.....	51
4.2 Applicazione del gel al processo di cristallizzazione .....	52
4.3 Materiali e metodi .....	53
4.4 Risultati .....	54
4.4.1 Andamento delle dimensioni dei cristalli in funzione della percentuale di gel .....	54
4.4.2 Rappresentazione grafica delle misure effettuate.....	57
4.4.3 Meccanismo di interazione tra gel di agarosio e proteina .....	59
5. Conclusioni.....	61
Lista dei simboli .....	63
Abbreviazioni .....	66
Bibliografia.....	67





# 1. Introduzione

## 1.1 Il processo di cristallizzazione

La cristallizzazione è un'operazione unitaria dell'ingegneria chimica, utilizzata per la produzione di una vasta gamma di materiali, soprattutto nell'ambito alimentare e farmaceutico. Lo scopo del processo può riguardare diversi aspetti: dalla separazione tra le fasi alla purificazione dei prodotti, o all'ottenimento di specifiche forme cristalline. Attraverso il processo di cristallizzazione, è possibile isolare una specie chimica di interesse a partire da una soluzione oppure ottenere un prodotto solido a partire dal suo precursore liquido. La separazione di una specie chimica da una soluzione può anche riguardare una miscela racemica. In questo caso, un composto chirale cristallizza in due forme, chiamate enantiomeri, che saranno una la forma speculare dell'altra, non sovrapponibili. Il processo di cristallizzazione viene utilizzato per la separazione di un enantiomero dall'altro, e si opera aggiungendo solventi o additivi che vadano a favorire la cristallizzazione della specie di interesse e inibire quella dell'altra specie [1]. Un altro esempio riguarda la cristallizzazione di proteine, nella quale si aggiungono dei sali in soluzione che rendono la proteina insolubile e la inducono a precipitare sottoforma di cristalli. Gran parte dei prodotti chimici come coloranti, esplosivi, materiali fotografici nei loro step di produzione contengono fasi di cristallizzazione e oltre il 90% dei farmaci esistenti contiene dei principi attivi allo stato solido cristallino [2].

Il cuore del processo consiste nell'aggregazione di atomi e molecole in modo da formare un reticolo, ovvero una struttura rigida e ben ordinata, capace di ridurre al minimo il proprio stato energetico. L'unità costituente il reticolo è la cella elementare, che si ripete nello spazio  $n$  volte dando origine a un cristallo con facce ben definite [3]. Non tutte le specie chimiche presentano un reticolo cristallino ben ordinato, in quanto possono essere presenti dei difetti, come la presenza di un atomo esterno in sostituzione o addizione al reticolo, la mancanza di un atomo nel reticolo o le dislocazioni. La conoscenza dello stato cristallino di un materiale permette di capirne le sue proprietà. Le specie chimiche possono presentare diverse forme cristalline, fenomeno noto come polimorfismo. La natura chimica dei polimorfi rimane invariata mentre le proprietà fisiche, come quelle ottiche, la durezza, la conducibilità e la densità, possono essere differenti. Le varie forme cristalline vengono identificate attraverso la tecnica di diffrazione a raggi X, che studia e misura gli effetti dell'interazione tra un fascio di raggi X e la materia cristallina. La diffrazione è una tecnica molto utilizzata, in quanto non invasiva e molto esaustiva per quanto riguarda la struttura e la disposizione spaziale degli atomi in un reticolo [4].

L'ottenimento delle diverse forme cristalline dipende dalle condizioni in cui si opera il processo. Le condizioni di processo che influiscono sulle varie forme polimorfiche sono la temperatura, la concentrazione dei componenti e la pressione all'interno del sistema. Infatti, a diverse condizioni di temperatura e pressione si hanno diverse distribuzioni degli atomi nel reticolo cristallino, e ciascuna struttura rappresenta la configurazione con minima energia tra tutte le possibili configurazioni. Dal punto di vista industriale, le specie chimiche che possono portare a polimorfismo costituiscono un problema, in quanto è difficile trovare le condizioni operative per ottenere la specifica forma cristallina desiderata [5]. È altresì possibile che una volta ottenuto il prodotto, a seguito di modifiche delle condizioni di conservazione del prodotto finito, come la temperatura, una forma cristallina metastabile esegua una transizione polimorfica trasformandosi nella forma cristallina più stabile. Un

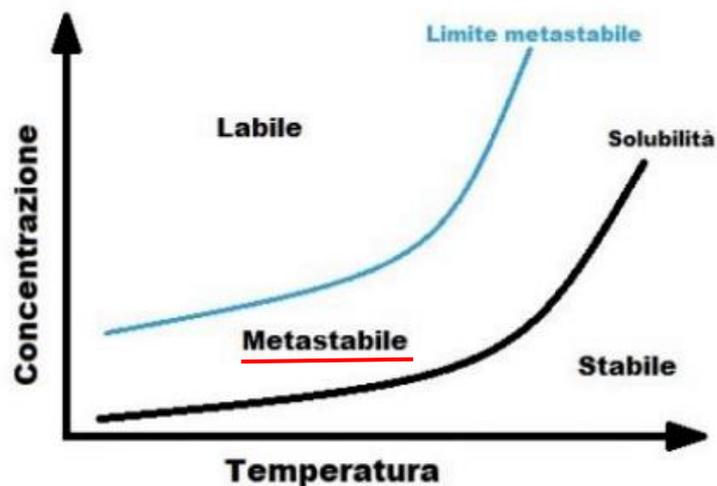
altro aspetto fondamentale per la riuscita del processo è la scelta del solvente da utilizzare in soluzione per le sue proprietà chimiche, la solubilità, e per la facilità nel maneggiarlo, per motivi di sicurezza. Negli anni, lo sviluppo industriale ha permesso il miglioramento delle tecniche di processo, del design delle apparecchiature e del controllo del processo. Questo si è tradotto in un migliore controllo delle caratteristiche del prodotto finale in termini di dimensione, forma, stabilità e solubilità dei cristalli [6]. Il controllo del processo di cristallizzazione è un aspetto cruciale in quanto piccole variazioni delle condizioni operative del processo, come la temperatura o la presenza di impurezze nel sistema, possono andare ad influire sulle caratteristiche del prodotto finale ottenuto.

L'applicazione della cristallizzazione in ambito farmaceutico ha lo scopo di controllare, come negli altri ambiti, la dimensione e la forma dei cristalli, e la purezza del prodotto. In ambito farmaceutico la cristallizzazione rappresenta uno step di produzione, in quanto permette di isolare il principio attivo dei farmaci. È fondamentale quindi non allontanarsi dalle condizioni ottimali del processo, in quanto ne risentirebbero purezza e qualità del farmaco [7,1]. Il processo di cristallizzazione, in questo campo, è fondamentale, poiché consente di evitare temperature elevate per separare gli intermedi di reazione o gli stereoisomeri e di avere una purezza del prodotto finale molto elevata. Il controllo della purezza ha maggiore importanza in questo campo, data la necessità di somministrare ai pazienti unicamente gli agenti terapeutici di interesse. Ha altrettanta importanza la distribuzione delle dimensioni dei cristalli in quanto impatta fortemente sulla dissoluzione *in vivo* di un farmaco, soprattutto se si tratta di una specie idrofobica e con solubilità limitata in soluzioni acquose [8].

## 1.2 La sovrasaturazione come forza spingente

Il fenomeno di cristallizzazione può avvenire all'interno di una soluzione o di un fuso, in questo ultimo caso si parla di cristallizzazione da fuso. In particolare, una soluzione è formata aggiungendo una quantità di soluto ad un solvente; esiste una quantità massima di soluto che è possibile aggiungere al solvente, per cui la soluzione si definisce satura. Una soluzione satura è una soluzione in cui è presente equilibrio termodinamico tra soluto e solvente, a determinate condizioni di temperatura e pressione. Aggiungendo ulteriore soluto ad una soluzione satura, la soluzione diventerà sovrasatura e si porterà a una condizione di non equilibrio, per cui l'eccesso di soluto tenderà a separarsi dalla soluzione costituendo una fase separata, in modo da riportare la soluzione alle condizioni di saturazione, e quindi di equilibrio.

La quantità di soluto necessaria per saturare una soluzione è chiamata solubilità. La solubilità è influenzata dalle condizioni operative, in particolar modo dalla temperatura e dalla tipologia di solvente impiegato. Per studiare la stabilità e la solubilità di una soluzione si usa la curva di solubilità, in cui si riporta la concentrazione in funzione della temperatura, come mostrato in Figura 1.1.

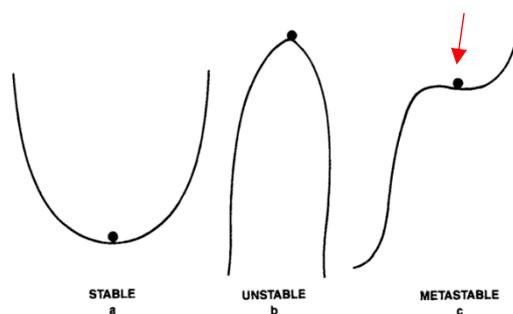


**Figura 1.1:** Curva di solubilità con regione di metastabilità. Figura tratta da [3] con modifiche.

La curva di solubilità divide il diagramma di fase in due regioni distinte di instabilità e stabilità a cui corrispondono rispettivamente soluzione sovrasatura e insatura. Il fenomeno di cristallizzazione avviene quando una soluzione è sovrasatura e maggiore è la sovrasaturazione, maggiore è la tendenza alla cristallizzazione.

### 1.2.1 Il concetto di forza spingente

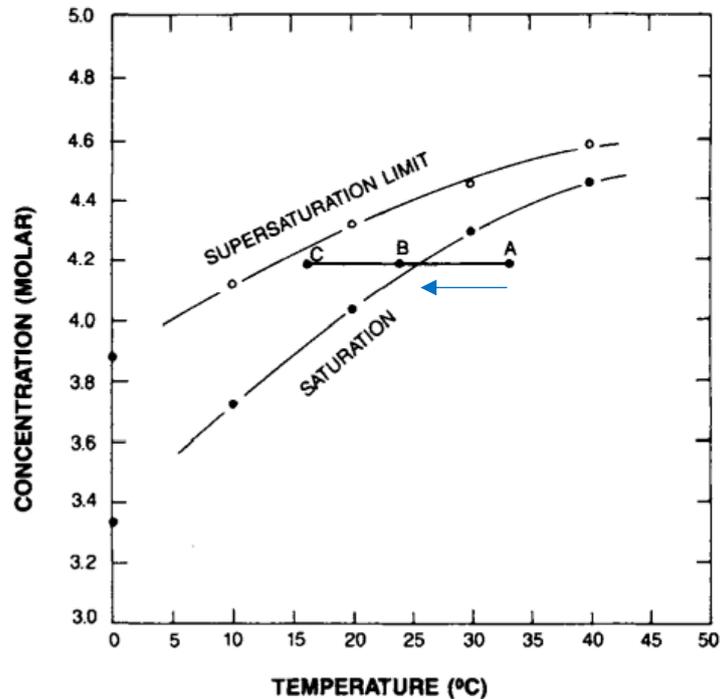
La forza spingente del processo di cristallizzazione è la sovrasaturazione. Quando una soluzione satura viene raffreddata, il sistema entra in una regione metastabile, in cui si ha una soluzione sovrasatura. Con il procedere del raffreddamento, il sistema raggiunge il limite di metastabilità, oltre il quale può avvenire la cristallizzazione [3]. Una soluzione sovrasatura, quindi, si trova in condizioni lontane dall'equilibrio termodinamico, e questo fa sì che la soluzione evolva per riportarsi all'equilibrio. Questa evoluzione avviene con la separazione di fase, che porta quindi alla cristallizzazione del soluto e, conseguentemente, alla diminuzione della concentrazione di soluto disciolto in soluzione. In Figura 1.2 sono rappresentate le diverse condizioni di stabilità di una soluzione.



**Figura 1.2:** Differenti condizioni di stabilità. Figura tratta da [1] con modifiche.

La differenza tra le diverse condizioni di stabilità sta nella diversa quantità di energia da fornire per far avvenire la trasformazione desiderata. Le soluzioni metastabili rappresentano un caso intermedio

tra stabilità e instabilità, che può essere descritto con un punto di flesso. In questo caso è necessaria una piccola variazione delle condizioni del sistema per far avvenire il cambiamento di stato. Il comportamento delle soluzioni metastabili può essere descritto con il seguente esempio, riportato in Figura 1.3.



**Figura 1.3:** Rappresentazione della zona metastabile in un sistema KCl-acqua. Figura tratta da [1] con modifiche.

Partendo dal punto A, si raffredda la soluzione oltre la curva di solubilità fino a raggiungere il punto B, in cui si avrà una soluzione sovrassatura. Lasciando la soluzione in questo punto, ci vorranno molti giorni affinché essa cristallizzi. Raffreddando ancora di più fino a raggiungere il punto C, il tempo necessario alla cristallizzazione sarà di alcune ore. Questo dimostra che la soluzione diventa via via più instabile con l'aumentare del grado di sovrassaturazione.

La sovrassaturazione può essere espressa in diversi modi: con la differenza di concentrazione  $\Delta c$ , il rapporto tra concentrazioni  $S$  o la sovrassaturazione relativa  $\sigma$ .

$$\Delta c = c - c^* \tag{1.1}$$

$$S = \frac{c}{c^*} \tag{1.2}$$

$$\sigma = \frac{\Delta c}{c^*} = S - 1 \tag{1.3}$$

dove  $c$  è la concentrazione della soluzione considerata e  $c^*$  è la solubilità del soluto.

## 1.2.2 Modi per ottenere il grado di sovrasaturazione desiderato

L'inizio del processo di cristallizzazione consiste nel creare delle soluzioni sovrasature. La sovrasaturazione rappresenta la condizione per cui il contenuto di soluto in soluzione eccede la quantità massima di soluto che è possibile sciogliere in un solvente. Ci sono principalmente tre diversi modi per ottenerla: raffreddamento, evaporazione del solvente e aggiunta di antisolvente [1].

### 1.2.2.1 Raffreddamento

Dalla curva di solubilità, rappresentata in Figura 1.1, si nota che la solubilità di una soluzione dipende fortemente dalla temperatura. Diminuendo la temperatura del sistema, esso evolverà spostandosi verso la sinistra del grafico, fino a raggiungere e superare il limite di sovrasaturazione. Quindi la diminuzione della temperatura favorisce la sovrasaturazione delle soluzioni e quindi il fenomeno di cristallizzazione. Questo è relativo a determinati soluti per i quali, diminuendo la temperatura si verifica una variazione della solubilità, con la conseguente creazione di soluzioni sovrasature. Utilizzando altri tipi di soluti e/o solventi, pur diminuendo la temperatura, la solubilità può rimanere molto alta.

### 1.2.2.2 Evaporazione di solvente

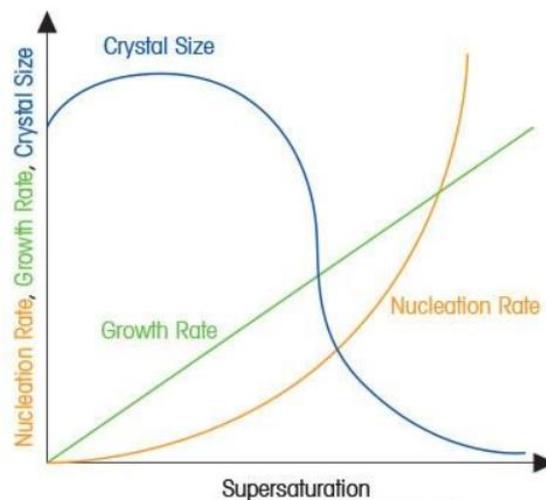
Il metodo è utilizzato quando la variazione di temperatura non influisce in modo significativo sulla solubilità. Questo approccio viene comunemente usato quando il solvente è una specie non acquosa, e ha una tensione di vapore alta. Il metodo consiste nel rimuovere il solvente con l'evaporazione, in modo da ottenere una soluzione molto concentrata. Se si esegue a temperatura costante, la soluzione in primo luogo diventerà satura, poi sovrasatura, e dopo aver raggiunto un certo valore massimo, il sistema cristallizzerà. Esistono diversi metodi per evaporare il solvente in base alle proprietà dei materiali utilizzati. Il metodo più comune utilizzato per soluti la cui solubilità diminuisce al diminuire della temperatura è quello di raffreddare il sistema evaporando il solvente: l'evaporazione, infatti, causa il raffreddamento di qualsiasi sistema a causa della sottrazione di calore dal sistema dovuta all'energia di vaporizzazione. In campo industriale, l'evaporazione di solvente è condotta ponendo il sistema sottovuoto. In alcuni casi il raffreddamento rallenta l'evaporazione diminuendo la tensione di vapore. In questi casi viene somministrato calore al sistema per mantenere la temperatura costante.

### 1.2.2.3 Aggiunta di antisolvente

Un altro modo per ottenere la sovrasaturazione è aggiungere al sistema un solvente con particolari proprietà, chiamato antisolvente. Si opera un'opportuna miscelazione del solvente utilizzato per la cristallizzazione con un solvente in cui il soluto non sia miscibile. In questo caso l'obiettivo è creare una miscela con solubilità minore.

### 1.3 Nucleazione: concetti base e teorie

Il processo di cristallizzazione comporta la nascita di una fase solida a partire da una fase liquida, chiamata soluzione, che consiste nell'insieme di due o più specie che formano una fase omogenea. Il processo si articola in due fasi consecutive: nucleazione e crescita dei cristalli. La prima fase è la nascita dei nuclei a partire da una soluzione, e la seconda fase riguarda la crescita dei nuclei e dei cristalli fino al raggiungimento dell'equilibrio. Per velocità di nucleazione si intende il numero di nuclei che si formano all'interno del sistema per unità di tempo e nell'unità di volume. Per velocità di accrescimento, invece, è la velocità con cui i cristalli crescono di dimensione. Tracciando le equazioni di crescita dei due fenomeni, si ottiene un grafico che mostra l'andamento in funzione del grado di sovrasaturazione, mostrato in Figura 1.4.



**Figura 1.4:** Andamento di dimensione dei cristalli, velocità di nucleazione e di crescita in funzione del grado di sovrasaturazione. Figura tratta da [9] con modifiche.

Come mostrato in Figura 1.4, grandezza e numero di cristalli ottenuti dipendono dal rapporto tra velocità di crescita e velocità di nucleazione. Se il primo stadio del processo è più veloce si otterranno tanti cristalli di piccole dimensioni, se invece a prevalere è il secondo si avranno pochi cristalli grandi. Controllare quindi il grado di sovrasaturazione permette di scegliere, in base alle caratteristiche di produzione desiderate, la dimensione e la quantità dei cristalli ottenuti in soluzione.

#### 1.3.1 Nucleazione omogenea ed eterogenea

La nucleazione è lo step fondamentale del processo di cristallizzazione, che determina la cinetica del processo in quanto rappresenta una barriera energetica dovuta alla formazione di una nuova fase. Il fenomeno implica la formazione di nuove strutture in soluzione attraverso l'auto-organizzazione delle molecole. La nucleazione ha origine dal cosiddetto sito di nucleazione, che può essere una particella o un corpo estraneo capace di interagire con le molecole di soluto, innescando la nucleazione e portando alla crescita di cristalli a partire dalla superficie della particella.

Possiamo distinguere due tipi di nucleazione: primaria e secondaria. La nucleazione primaria avviene in fase liquida, in assenza di cristalli, mentre la secondaria si verifica in seguito alla formazione di embrioni sulla superficie di cristalli preesistenti che vengono successivamente rilasciati ad opera dei fenomeni di attrito tra i cristalli. Questi cristalli fungono da germi di cristallizzazione. La nucleazione primaria a sua volta si divide in omogenea ed eterogenea. La differenza tra i due fenomeni sta nella posizione del sito di crescita dei cristalli: nella nucleazione eterogenea il sito di nucleazione è rappresentato da una superficie o da impurità presenti nel sistema. La nucleazione omogenea è un fenomeno spontaneo che avviene in soluzione lontano da superfici esterne e richiede la totale assenza di corpi estranei o impurità, motivo per il quale avviene raramente in natura. Un altro motivo per il quale la nucleazione eterogenea è più probabile in natura è la barriera energetica [10]. La nucleazione rappresenta la barriera energetica da superare per far avvenire la formazione dei nuclei. Nella nucleazione eterogenea, i siti di nucleazione sono rappresentati dalle pareti del contenitore o dalla presenza di particelle esterne, chiamati agenti nucleanti. Questi ultimi interagendo con il processo abbassano la barriera energetica, rendendo statisticamente più probabile, e quindi più veloce il fenomeno [11]. La nucleazione secondaria può avvenire solamente come meccanismo eterogeneo. Il suo studio risulta molto complesso e difficile e inoltre è possibile che i due fenomeni, primario e secondario, possano avvenire contemporaneamente.

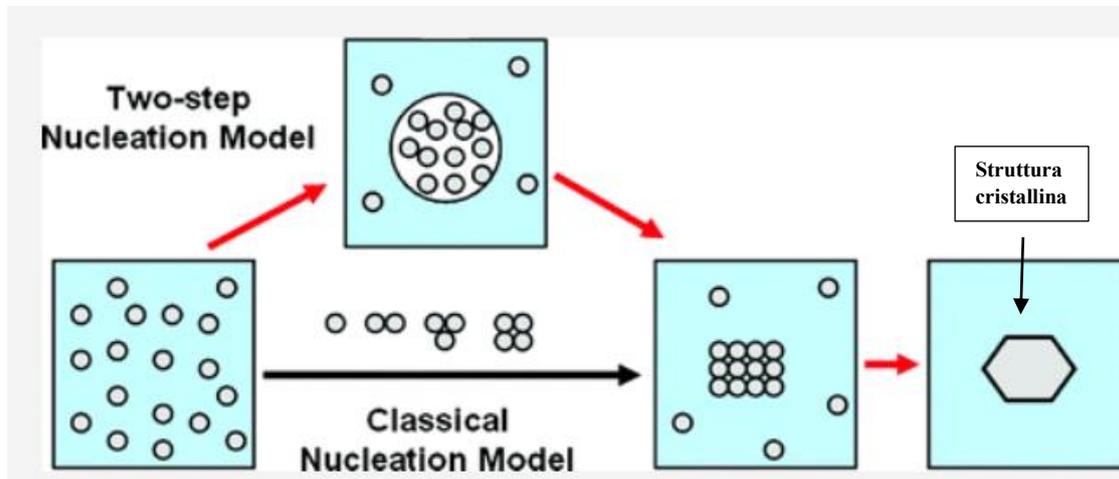
### **1.3.2 Teorie sulla nucleazione: diversi approcci**

Nonostante la cristallizzazione sia un fenomeno molto studiato, ancora oggi l'identificazione di una precisa trattazione teorica del processo risulta un aspetto controverso e molto dibattuto. Per lo studio della nucleazione primaria sono state infatti proposte diverse teorie: la teoria classica della nucleazione, anche chiamata CNT, la teoria della nucleazione a due stadi e quella del liquido denso [1].

La Teoria classica della nucleazione è il metodo di studio più utilizzato; i primi studi risalgono alla prima metà del '900 ad opera di studiosi come Volmer, Weber e Zeldovich. L'obiettivo iniziale dello studio consisteva nel descrivere la condensazione dei vapori, ma in seguito ha subito delle modifiche per essere applicata allo studio della cristallizzazione. L'approssimazione alla base della teoria è considerare i cluster come oggetti macroscopici, cioè come fasi cristalline separate dal bulk liquido da cui si formano. La CNT afferma che le molecole di soluto in una soluzione sovrasatura formano reversibilmente piccoli aggregati, chiamati clusters. Una volta che la dimensione del cluster raggiunge un valore critico, diventa termodinamicamente stabile e di conseguenza la sua crescita sarà favorita. Un'altra approssimazione per lo studio è considerare tutti gli atomi ugualmente destinati, in termini di probabilità, a raggiungere questa dimensione critica per favorire la reazione di cristallizzazione [12]. In questo modo si può affermare che la nucleazione rappresenta il processo tramite il quale un sistema, a seguito di una perturbazione che lo porta in condizioni di instabilità, raggiunge nuovamente l'equilibrio termodinamico tramite la formazione di una nuova fase. Secondo la teoria classica, è presente quindi una barriera energetica da superare per favorire l'aggregazione degli atomi in soluzione, visibile nella Figura 1.5.

A seguito di scoperte, la formulazione della CNT è stata rielaborata e nove teorie sono state proposte. Le modifiche più importanti riguardano il meccanismo della nucleazione a due stadi. Secondo questa teoria, la nucleazione non è in un singolo step, ma avviene in due steps separati: in primo luogo si ha la formazione di una fase liquida densa di molecole di soluto grazie a fluttuazioni locali della densità della soluzione. Successivamente i clusters metastabili si riorganizzano nello

spazio per dare origine alla struttura cristallina [13]. In Figura 1.5, è riportato un grafico che mostra le differenze tra i due meccanismi: si può notare come nel secondo approccio siano due le barriere energetiche che il sistema deve superare per ottenere la formazione di un nucleo stabile.



**Figura 1.5:** Meccanismo di nucleazione classico e a due stadi. Figura tratta da [13] con modifiche.

Il terzo approccio si basa invece sul meccanismo di cristallizzazione del liquido denso. In questo processo ammassi di liquido ad alta densità fungono da precursori della nucleazione [15].

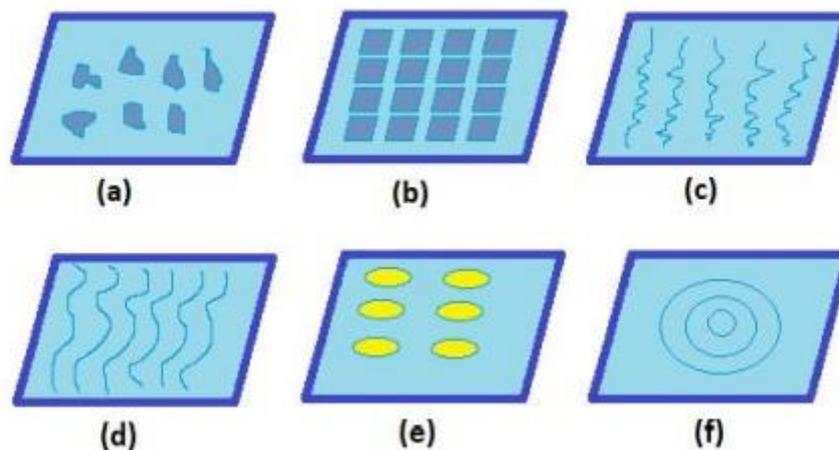
## 1.4 Cristallizzazione in presenza di superfici

### 1.4.1 Caratteristiche del processo

Nella cristallizzazione, la presenza di superfici, chimicamente inerti e non, permette di operare i processi con gradi di sovrasaturazione minori, in quanto permette di abbassare la barriera energetica rendendo il processo più veloce. Se la superficie interagisce con il sistema soluto-solvente è possibile diminuire il tempo necessario alla formazione dei nuovi cristalli, indurre la nucleazione e quindi agire in modo significativo sullo step maggiormente controllante [16]. Inoltre, le dimensioni dei cristalli, nonché la forma cristallina dei prodotti finali, possono essere variate senza andare a modificare le condizioni di processo come la temperatura, il pH o la concentrazione di soluto. Nonostante gli innumerevoli vantaggi, alcune fasi, come l'identificazione e la sintesi di queste superfici richiedono tempi molto lunghi. Queste superfici hanno una struttura molto complicata dal punto di vista ingegneristico, e trovare le giuste combinazioni tra le superfici e i soluti può richiedere numerosi tentativi, data la natura stocastica del processo di nucleazione. La cristallizzazione con superfici viene usata sia per piccole molecole che per più complessi prodotti biofarmaceutici [14].

### 1.4.2 Interazione tra superfici e soluzione

Una superficie può agire influenzando il processo di cristallizzazione in due modi: mediante la sua morfologia e la sua chimica. Molto spesso questi due fattori agiscono sinergicamente sul processo, o altre volte uno dei due è considerato dominante. In primo luogo, le caratteristiche morfologiche della superficie interagiscono con le molecole. Questa interazione coinvolge i difetti intrinseci presenti sulle superfici, come vacanze, impurità o dislocazioni, che possono agire come siti di nucleazione eterogenea. La morfologia della superficie può però essere intenzionalmente modificata creando diversi pattern, come mostrato in Figura 1.6. Diverse sono le tecniche utilizzate per controllare la morfologia: pori irregolari, pori regolari, rugosità, nano pieghe, nano isole e pattern regolari ottenuti tramite etching. Nella cristallizzazione di molecole piccole, si è visto che se i pori sono di dimensione minore di 100 nm, essi influenzano positivamente il processo in termini di aggregazione delle molecole. Un altro aspetto per cui la morfologia influenza la nucleazione, è la presenza di spigoli nelle superfici. Si è dimostrato, infatti, che la nucleazione avviene più velocemente in presenza di superfici aventi pori sagomati con angoli ben precisi, piuttosto che con una superficie piatta. In particolare, pori sagomati in modo da recare due angoli corrispondenti all'angolo intrinseco maggiormente ricorrente all'interno della struttura cristallina del soluto hanno permesso di indurre il fenomeno di nucleazione, abbassando la barriera energetica da superare. In più, se è presente la compatibilità tra l'angolo intrinseco del cristallo e quello della superficie, i cristalli crescono liberi da ogni sforzo dovuto al contenimento della superficie. In caso contrario, angoli della superficie inferiori all'angolo intrinseco del cristallo agiscono negativamente aggiungendo un altro contributo di energia alla barriera energetica. Un altro fattore che influenza il processo è la rugosità della superficie: essa può avere un effetto importante sulla bagnabilità della superficie, ma può anche promuovere delle sovrasaturazioni locali più elevate e quindi accelerare la nucleazione. Infine, a seconda della natura del solvente, se si utilizza l'acqua come liquido di prova, le superfici idrofobiche aumentano l'angolo di contatto, idrofiliche diminuiscono l'angolo di contatto e quindi ritardano il processo [14,17].



**Figura 1.6:** Esempio di morfologia adottata per controllare la cristallizzazione: a)pori irregolari, b)matrice periodica dei pori , c)rugosità superficiale, d) nano pieghe, e) nano isole , f) pattern regolare. Figura tratta da [14] con modifiche.

Per quanto riguarda invece la chimica della superficie, gioca un ruolo fondamentale l'interazione tra i gruppi funzionali presenti sulla superficie e il soluto. L'interazione può riguardare l'assorbimento, i legami a idrogeno o i legami  $\pi$ - $\pi$ . Nel caso di assorbimento non specifico, una superficie agisce promuovendo la nucleazione eterogenea grazie all'abbassamento della barriera energetica. Nel caso della formazione di legami a idrogeno, l'interazione può anche indurre il corretto orientamento delle molecole verso una direzione di crescita preferenziale. Un altro tipo di interazione è quella elettrostatica tra substrato e soluto: le cariche presenti nella superficie attraggono o respingono le altre presenti nel soluto, con potenziali conseguenze sullo step di nucleazione.

### **1.4.3 Tipologie di superfici impiegate**

Nella cristallizzazione, vengono impiegate due tipologie di superfici: cristalline e amorfe. Le superfici cristalline causano il cosiddetto fenomeno dell'epitassia, ovvero la deposizione periodica di materiale cristallino orientato in modo preciso grazie alla struttura ordinata del substrato.

Le superfici amorfe impiegate sono generalmente superfici polimeriche a base di carbonio o vetrose a base di silicio. Le prime sono ottenute dalla deposizione di film polimerici supporti. In questo caso il principale vantaggio è quello di poter scegliere il monomero base alle affinità dei suoi gruppi funzionali con il soluto da cristallizzare. Le superfici vetrose invece, vengono modificate con l'aggiunti di silani o acrilati in modo da modificare le proprietà fisico-chimiche delle superfici. I materiali a base di silicio vengono anche sfruttati per la possibilità di avere delle strutture porose e quindi confinare la cristallizzazione all'interno dei pori [14].

### **1.4.4 Principali parametri controllati**

La cristallizzazione è un processo impiegato in moltissimi campi per ottenere dei prodotti di alta qualità e per altri scopi farmaceutici. Alcuni parametri devono essere strettamente controllati, come il polimorfismo, la velocità di nucleazione delle specie e la dimensione dei cristalli [14].

#### *1.4.4.1 Polimorfismo*

Le specie cristalline sono presenti in natura in differenti forme polimorfiche. Ogni forma cristallina ha una propria energia che ne determina la stabilità termodinamica. Imponendo delle variazioni nelle condizioni operative, le specie possono subire delle transizioni polimorfiche modificando le caratteristiche del prodotto desiderato. Svariati metodi possono essere usati per controllare il polimorfismo. Ad esempio, in fase di cristallizzazione si possono aggiungere dei cristalli aventi la forma cristallina del prodotto che si vuole ottenere, o degli additivi solubili, come i sali, che fungono da inibitori per la specie cristallina indesiderata. L'uso di additivi, comunque, è altamente specifico e vale solo per alcuni tipi di soluti. Un altro modo è quello di utilizzare dei solventi che 'catalizzino' la formazione del prodotto desiderato.

#### *1.4.4.2 Velocità di nucleazione*

Il tempo di nucleazione è definito come il tempo che intercorre tra il raggiungimento delle condizioni di sovrasaturazione e la nascita dei primi nuclei in soluzione. Nei processi di cristallizzazione, si può valutare la distribuzione di probabilità del tempo di nucleazione, data la natura stocastica del fenomeno. Il tempo di nucleazione è funzione del grado di sovrasaturazione e della temperatura. La distribuzione di probabilità cumulativa può essere descritta dalla distribuzione di Poisson, un tipo di distribuzione discreta che esprime la probabilità che un certo numero di eventi possano verificarsi o meno nell'arco di tempo  $t$ .

#### *1.4.4.3 Dimensione dei cristalli*

La dimensione dei cristalli è un parametro fondamentale, in quanto influenza la velocità di dissoluzione del soluto cristallino, aspetto fondamentale per molte applicazioni farmaceutiche. I nuclei, infatti, devono raggiungere una dimensione critica al di là della quale si ha la formazione dei primi cristalli. Per controllare la dimensione dei cristalli si può agire su alcune variabili, come il grado di sovrasaturazione. Sappiamo, infatti, che livelli alti del grado di sovrasaturazione accelerano il processo di nucleazione, quindi si avranno tanti cristalli di piccole dimensioni. Altri modi sono l'utilizzo di determinati fluidi, essiccamento spray, tecnologie ultrasoniche oppure altre tecniche post processo.

## **1.5 Peculiarità della cristallizzazione di proteine**

La cristallizzazione di proteine riveste oggi un ruolo importante in una vasta area delle scienze biologiche, biochimiche e biotecnologiche. A livello industriale il processo include la purificazione delle proteine. I primi studi risalgono al 1926, quando uno studioso isolò e cristallizzò l'enzima ureasi e dimostrò che era una proteina. Lo studio mediante diffrazione a raggi X della struttura tridimensionale di macromolecole biologiche è divenuto negli ultimi decenni un potentissimo strumento per la comprensione di numerosi meccanismi biochimici per i sistemi viventi [18]. Le proteine in natura presentano differenti strutture: primaria, secondaria, terziaria e quaternaria. Le ultime due sono delle strutture tridimensionali globulari. In molti studi, si è dimostrato che le proteine sono in grado di cristallizzare quando sono presenti in natura con struttura globulare o comunque rigida. Se, infatti, la struttura delle proteine è flessibile, si possono formare delle eterogeneità che possono inibire la cristallizzazione o influenzare negativamente il prodotto finale ottenuto. Il processo è molto complesso e si basa su una lenta e controllata precipitazione delle proteine. La fase iniziale del processo è instaurare un adeguato livello di sovrasaturazione in soluzione per indurre le proteine alla separazione di fase in modo controllato.

Per quanto riguarda il processo di cristallizzazione, ci sono alcune differenze tra piccole molecole e macromolecole. In primo luogo, le piccole molecole, organiche e inorganiche, presentano forti interazioni inter-reticolari che conferiscono loro una struttura cristallina robusta, invece le proteine hanno una struttura sensibile alle condizioni dell'ambiente esterno. Dal punto di vista del processo, sia le piccole molecole che le macromolecole richiedono la sovrasaturazione come forza motrice. La differenza sta nel valore di sovrasaturazione necessario a indurre la nucleazione. Nella

cristallizzazione di proteine, infatti, si ha la necessità di avere dei gradi di sovrasaturazione molto alti, intorno a 100, a differenza del valore di poche unità nella cristallizzazione di piccole molecole [19]. Molte variabili influenzano la solubilità delle proteine, come la temperatura, la pressione e il pH. Il pH ha un'influenza significativa, infatti la solubilità può cambiare per variazioni di pH di 0.5 unità o in altri casi solo di 0.1. Nei processi sono accettabili valori di pH che non alterino le strutture ripiegate delle proteine. Per quanto riguarda la pressione può avere degli effetti variabili, ma comunque si hanno conseguenze sostanziali solo a valori di pressione estremi. Invece la temperatura influenza in modo significativo il processo, soprattutto perché molte proteine possono essere denaturate, e quindi perdere la propria struttura, a valori di temperatura maggiori anche solo di poche decine rispetto alla temperatura ambiente. Per ottenere la cristallizzazione di proteine si ha la necessità aggiungere dei sali per far precipitare le proteine dalla soluzione. Il concetto base è che aumentando la salinità del sistema, quindi aggiungendo degli elettroliti, le proteine sono indotte a separarsi in fase solida. L'effetto dell'elettrolita sulla solubilità delle proteine è noto come 'salting in' o 'salting out'. Il 'salting in' implica l'aumento della solubilità una volta che il sale è stato aggiunto. Il 'salting out' invece si riferisce alla necessità delle proteine di essere idratate dall'acqua. In questo caso l'elettrolita è visto come competitor nell'idratazione delle superfici. Da questa competizione ne deriva l'esposizione della parte di superficie disidratata di una macromolecola di proteina ad un'altra proteina, facilitando quindi il contatto tra le macromolecole. In questo caso aggiungere un elettrolita implica la diminuzione della solubilità della proteina. Un altro fattore che riduce la solubilità delle proteine, è l'aggiunta di antisolventi che danno origine a una miscela con solubilità minore. L'aggiunta di antisolvente, in realtà, ha un duplice effetto sulle proteine. In primo luogo, gli antisolventi agiscono come gli elettroliti e hanno l'effetto di 'salting out' sulle proteine [1]. In secondo luogo, riducono la costante dielettrica dell'acqua, facilitano le interazioni elettrostatiche tra le proteine e riducono la solubilità della proteina. Generalmente, questi solventi vengono aggiunti quando le proteine sono in condizioni di bassa temperatura. Ci sono concentrazioni critiche di antisolventi che possono denaturare le proteine, quindi in genere l'obiettivo è quello di mantenersi al di sotto di queste concentrazioni.

## 1.6 Obiettivo della tesi

In questa tesi si intende presentare e discutere l'utilizzo di sistemi ingegnerizzati capaci di influenzare i processi di nucleazione di farmaci e proteine. In particolar modo ci si focalizzerà sulla derivazione di un modello matematico che descriva la cinetica di nucleazione di piccole molecole farmaceutiche, sia su superfici piate sia su superfici aventi pori sagomati.

In questo primo capitolo si è descritto in sommi capi il processo, descrivendo i parametri cardine da controllare e le superfici impiegate nel campo della cristallizzazione di farmaci e biomolecole. Si è dedicato inoltre un paragrafo alla descrizione della cristallizzazione delle macromolecole, sottolineando le principali differenze con le piccole molecole sia per le caratteristiche che per il processo. Nel secondo capitolo si passerà a derivare il modello che descrive la cinetica della nucleazione, ricavando le equazioni per ogni caso studiato, con le opportune assunzioni e semplificazioni fatte. Il terzo capitolo è dedicato alla presentazione di un caso di studio riguardante la cristallizzazione di aspirina, che verrà impiegato ai fini di convalida del modello. Infine, il quarto capitolo presenta un metodo alternativo di cristallizzazione, basato sull'utilizzo di gel di agarosio.

Verranno illustrate le proprietà del gel e verrà condotta un'analisi su dati storici riguardanti le dimensioni dei cristalli ottenuti al variare della concentrazione del gel di agarosio.



## **2. Derivazione di un modello per la descrizione della cinetica della nucleazione di farmaci**

In questo capitolo verrà presentata la derivazione di un modello matematico capace di descrivere la nucleazione di molecole organiche in soluzioni sottoraffreddate.

Il fenomeno di nucleazione rappresenta lo step controllante per il processo di cristallizzazione in termini cinetici. Partendo dalla formulazione matematica della teoria classica della nucleazione, sono state derivate delle equazioni per descrivere la cinetica di nucleazione in varie configurazioni. Tra queste, verranno distinte nucleazione omogenea ed eterogenea, e quest'ultima verrà analizzata sia considerando superfici piane che superfici con pori aventi una precisa geometria.

### **2.1 Selezione dell'approccio teorico per la descrizione del processo**

Come discusso nel Capitolo 1, sono molte le teorie dedicate allo studio della nucleazione, ma data la complessità del fenomeno non è facile ottenere una descrizione accurata del processo. Ricavare la cinetica di nucleazione è quindi un passo difficoltoso. In questa tesi si è scelto di prendere spunto dalla teoria CNT. I motivi per i quali si è scelto di prendere in considerazione questo approccio sono molteplici. Innanzitutto, la teoria classica della nucleazione è una teoria piuttosto semplice, assodata e ben conosciuta; infatti, sono tanti gli studiosi che si sono nel tempo dedicati al suo perfezionamento. Inoltre, si è dimostrato che la CNT può essere utilizzata per descrivere i fenomeni di nucleazione sia di molecole organiche che inorganiche, sia di macromolecole [1].

#### **2.1.1 Ipotesi iniziali**

Per semplificare la trattazione, la teoria classica della nucleazione si basa su delle ipotesi [13].

- 1) cluster di forma sferica: i cluster vengono considerati come degli aggregati di particelle che possono essere descritte come una sfera con densità uniforme, che non dipende dalla dimensione delle particelle, e avente interfacce ben definite. Questa assunzione implica considerare delle strutture cristalline ben ordinate.
- 2) approssimazione capillare: la tensione superficiale non dipende dalla dimensione delle particelle, quindi dalla curvatura. Inoltre, è indipendente dalla temperatura.
- 3) il meccanismo di crescita dei cluster avviene con l'aggiunta di un singolo monomero per volta: vengono trascurate le collisioni tra più di due particelle o altre preesistenti.
- 4) la velocità di nucleazione non dipende dal tempo: si considerano sistemi allo stato stazionario. Inoltre, la temperatura non varia e i cluster, durante il cambiamento di fase, sono termicamente in equilibrio.
- 5) i cluster sono considerati incompressibili.

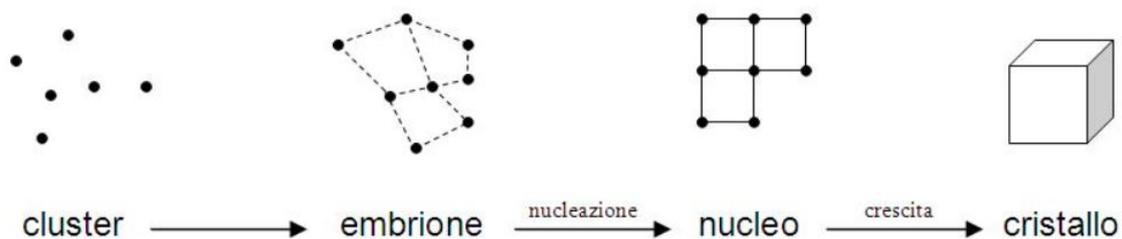
#### **2.1.2 Approccio proposto**

In questa trattazione si intende mostrare uno studio su caratteristiche e peculiarità del processo di cristallizzazione, focalizzando l'attenzione sul modello di cinetica del processo. Si è scelto, partendo dai concetti base della teoria CNT, di suddividere il problema in dei sottoinsiemi, che vengono risolti a step. In primo luogo, si è scelto di partire dal ricavare la cinetica della nucleazione omogenea per

poi passare a quella eterogenea su delle superfici e infine a ricavare il modello di cinetica della nucleazione eterogenea all'interno dei pori, considerato obiettivo di questa trattazione.

## 2.2 Applicazione della CNT alla nucleazione omogenea

La nucleazione omogenea avviene spontaneamente in soluzione e si verifica in assenza di particelle estranee o impurità all'interno del sistema. In soluzione, il processo comincia a partire da singole molecole che si aggregano tra di loro formando in primo luogo dei cluster di molecole instabili, poi dei nuclei stabili, che rispecchiano fedelmente l'organizzazione strutturale dei cristalli ma con dimensioni ridotte, e infine dei cristalli veri e propri, come mostrato in Figura 2.1.



**Figura 2.1:** Dinamica del processo di nucleazione omogenea.

La barriera energetica da superare è molto alta, per questo motivo la nucleazione omogenea avviene raramente in natura. Questa barriera energetica è l'energia libera di Gibbs, indicata in seguito con  $\Delta G$ , e rappresenta l'energia di attivazione da superare per permettere alla nucleazione di avvenire. Secondo la teoria classica della nucleazione, la formazione di un cluster è dovuta al meccanismo di addizione di singole molecole al cluster [1], secondo un meccanismo che può essere descritto come:

$$\begin{aligned}
 a + a &= a_2 \\
 a + a_2 &= a_3 \\
 a + a_3 &= a_4 \\
 \dots &\dots \dots \dots \\
 a_{c-m} + a_m &= a_c
 \end{aligned}
 \tag{2.1}$$

dove  $a_i$  sono i monomeri.

La velocità di nucleazione, indicata con  $J$ , sarà un'esponenziale che comprende l'energia libera e la temperatura, come indicato in equazione 2.2:

$$J = A \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}}{K_B T}\right)
 \tag{2.2}$$

dove  $\Delta G_{cr}$  è la variazione di energia libera critica che porta alla formazione dei nuclei,  $K_B$  è la costante di Boltzmann,  $A$  è il fattore pre-esponenziale e  $T$  è la temperatura, espressa in kelvin. Il fattore pre-esponenziale  $A$  è dell'ordine di  $10^{30}$  ed è composto da tre termini moltiplicati tra loro:  $n$  che rappresenta il numero di molecole in soluzione, quindi la concentrazione delle molecole,  $v$  rappresenta la velocità di attaccamento dei monomeri al nucleo, e  $Z$  che è il fattore di Zeldovich, che esprime la probabilità di superare l'energia di attivazione per far avvenire la nucleazione, cioè la probabilità che un cluster di dimensione critica continui a crescere e non si dissolva. In questo caso l'equazione che esprime la velocità di nucleazione si può esprimere come:

$$J = n Z v \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}}{K_B T}\right) \quad (2.3)$$

I termini che contribuiscono all'equazione 2.3 che esprime la velocità di nucleazione possono essere espressi in funzione di grandezze tipiche del processo di cristallizzazione.

### 2.2.1 Concentrazione delle molecole

Per quanto riguarda la concentrazione delle molecole, la probabilità per un nucleo di dimensione  $i+1$  di formarsi a partire da un nucleo di dimensione  $i$  è rappresentata da un esponenziale che contiene l'energia libera dovuta alla formazione del nucleo, quindi  $\exp\left(-\frac{\Delta G_i}{K_B T}\right)$ . Si può scrivere:

$$n \Delta G_i = \Delta G \quad (2.4)$$

$$\frac{N_n}{N_1} = \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}}{K_B T}\right) \quad (2.5)$$

in cui  $N_i$  rappresenta il numero di cluster presenti nel sistema in un certo momento  $i$ . Il rapporto  $N_n/N_1$  rappresenta la concentrazione critica dei cluster.

L'energia libera  $\Delta G$  è la somma di due contributi, uno relativo alla superficie, indicato con  $\Delta G_s$ , e uno relativo al volume, indicato con  $\Delta G_v$ . Il contributo di volume rappresenta lo scambio di energia libera per unità di volume tra liquido e solido; nel caso della cristallizzazione rappresenta il contributo energetico per formare la nuova fase. Il contributo di superficie invece rappresenta la quantità di energia necessaria per formare una nuova superficie solida [13]. Si può scrivere quindi:

$$\Delta G = \Delta G_s + \Delta G_v = S \Delta g_s + V \Delta g_v \quad (2.6)$$

in cui i termini  $\Delta g_v$  e  $\Delta g_s$  rappresentano i termini di energia specifica, rispettivamente di volume e di superficie.

Analizziamo i due contributi separati:

-contributo superficiale: dato dal prodotto tra l'area della superficie sferica di raggio  $r$  e la tensione interfacciale  $\gamma$  tra il cluster e la soluzione, indicato in equazione 2.7:

$$\Delta G_s = Area * \gamma = 4 \pi r^2 * \gamma \quad (2.7)$$

-contributo volumico: rappresentato dalla differenza tra i potenziali chimici in fase solida e in fase liquida, indicato in equazione 2.8:

$$\Delta g_v = -n (\mu_\alpha - \mu_\beta) \quad (2.8)$$

in cui  $n$  è il numero di molecole in soluzione, e  $\mu_\alpha$  e  $\mu_\beta$  sono i potenziali chimici rispettivamente in fase solida e liquida. I potenziali chimici possono essere espressi in funzione del coefficiente di attività delle due fasi,  $a$ , come riportato in equazione 2.9:

$$\begin{aligned} \mu_\alpha &= K T \ln(a_\alpha) \\ \mu_\beta &= K T \ln(a_\beta) \end{aligned} \quad (2.9)$$

Esprimendo il grado di sovrasaturazione  $S$  come il rapporto tra i coefficienti di attività, si trova che:

$$\mu_\alpha - \mu_\beta = K T \ln(S) \quad (2.10)$$

Quindi si trova, infine, che il contributo di energia libera volumica è equivalente a:

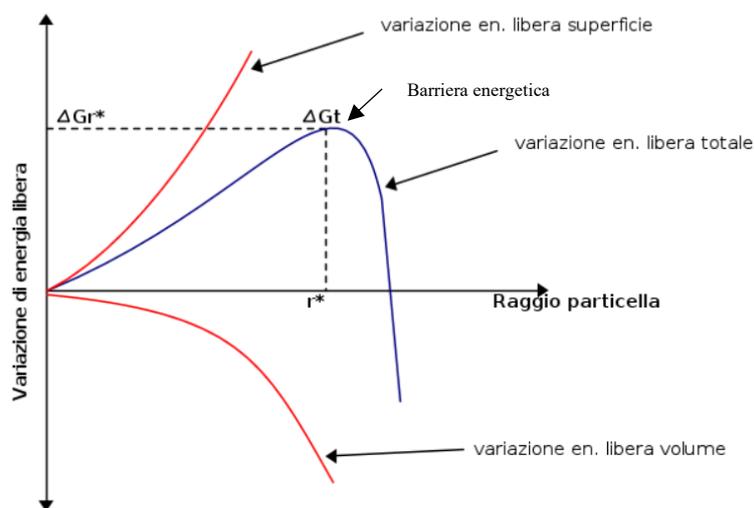
$$\Delta g_v = -n v K T \ln(S) \quad (2.11)$$

dove  $v$  è il volume molecolare del soluto.

Sostituendo le equazioni 2.7 e 2.11 all'equazione 2.6, si trova il contributo totale di energia libera, mostrato in equazione 2.12.

$$\Delta G = 4 \pi r^2 \gamma - \frac{4}{3} \pi r^3 n v K T \ln(S) \quad (2.12)$$

L'energia libera totale, quindi, è funzione del grado di sovrasaturazione, della tensione interfacciale e del raggio del cluster critico. In Figura 2.2 è mostrato l'andamento dell'energia  $\Delta G$  in funzione del raggio del cluster. Come si può notare, la barriera energetica per raggi di basso valore ha un andamento crescente fino ad arrivare ad un massimo, corrispondente ad un preciso valore del raggio, che di seguito si chiamerà dimensione critica, al di là del quale subisce una diminuzione repentina.



**Figura 2.2:** Energia libera in funzione del raggio caratteristico del nucleo. Figura tratta da [3] con modifiche.

In accordo con la CNT, esiste una dimensione critica, indicata con  $r_c$ , al di sotto della quale il cluster solido si discioglie nuovamente nel liquido. Ponendo uguale a zero la derivata prima dell'energia libera totale si trova:

$$\frac{d(\Delta G)}{dr} = 8 \pi r_c \Delta g_s + 4 \pi r_c^2 \Delta g_v = 0$$

$$r_c = -2 \frac{\Delta g_s}{\Delta g_v} \quad (2.13)$$

Sostituendo la dimensione critica, indicata in equazione 2.13, all'equazione dell'energia libera totale 2.12, si trova l'energia libera critica, ovvero quella barriera energetica da raggiungere e superare affinché si abbia la formazione del nucleo. L'energia critica quindi è:

$$\Delta G_{cr} = \frac{4 \pi r_c^2 \gamma}{3} = \frac{16 \pi \gamma^3 v^2}{3 (KT \ln(S))^2} \quad (2.14)$$

### 2.2.2 Fattore di Zeldovich e velocità di attaccamento

Per quanto riguarda gli altri due fattori inclusi nel termine esponenziale, il fattore di Zeldovich dipende dalla radice quadrata della derivata seconda dell'energia relativa al contributo di volume, come espresso nell'equazione 2.15:

$$Z = \sqrt{\frac{\Delta G_{cr}}{3 \pi K_B T n}} \quad (2.15)$$

La velocità di attaccamento invece dipende proporzionalmente dal coefficiente di diffusione  $D$ , dalla concentrazione  $n$  e dalla dimensione critica  $r_c$ :

$$v = 4 \pi n D C_1 r_c^2 \quad (2.16)$$

in cui  $C_1$  è la concentrazione dei monomeri.

Sostituendo all'equazione 2.3 le espressioni delle varie grandezze, la velocità di nucleazione per il caso di nucleazione omogenea, può essere espressa come:

$$J = n Z v \exp\left(-\frac{16 \pi \gamma^3 v^2}{3 (\ln(S))^2 (K_B T)^3}\right) \quad (2.17)$$

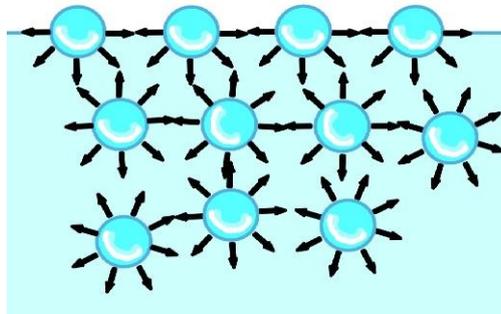
## 2.3 Nucleazione eterogenea su superficie piana e liscia

La nucleazione eterogenea si verifica sulle superfici di particelle esterne o impurità presenti nel sistema. Queste particelle sono chiamate agenti nucleanti, in quanto abbassano l'energia libera necessaria per far avvenire il processo. Inoltre, la nucleazione eterogenea generalmente richiede valori minori di sovraturazione [1]. La diminuzione dell'energia libera è dovuta al favorevole contributo superficiale, in particolare all'angolo di contatto e alle tensioni interfacciali che si hanno tra il cluster, il liquido e la superficie solida. Infatti, a differenza di quella omogenea nella quale la

superficie interessata del fenomeno era quella di una sfera, nella nucleazione eterogenea questa superficie è minore perché parte del contorno del nucleo è ospitato dalla superficie su cui sta nucleando.

### 2.3.1 Il concetto di tensione interfacciale e bagnabilità

La tensione interfacciale di un fluido, indicata con la lettera greca  $\gamma$ , è la tensione meccanica di coesione delle particelle sulla superficie esterna del fluido. Essa rappresenta la densità superficiale dell'energia di legame all'interfaccia tra un corpo continuo e un altro materiale, come un solido, un liquido o un gas. In termodinamica, la tensione interfacciale rappresenta il lavoro da compiere per aumentare la superficie di un corpo continuo di una unità [20]. Un esempio pratico per capire il concetto di tensione interfacciale è considerare un contenitore all'interno del quale sono presenti delle particelle di liquido, come mostrato in Figura 2.3.



**Figura 2.3:** Schema delle forze di attrazione delle molecole presenti in un liquido.

Come si può vedere in Figura 2.3, le molecole di liquido interne sono circondate da altre molecole che tendono ad attrarle; esse sono in una condizione di equilibrio per cui la risultante delle forze è nulla. Le molecole che si trovano nello strato superficiale, invece, non sono in equilibrio in quanto la risultante delle forze attrattive non è compensata da quelle nell'altra fase, che nel caso in questione è un gas. Di conseguenza, le molecole presenti sullo strato superficiale hanno una risultante diretta verso l'interno del liquido, che funge da forza di coesione per le molecole in superficie. Questa forza di coesione è la tensione interfacciale. La stessa cosa accade in un sistema in cui le due fasi sono solido e liquido, come nel caso della cristallizzazione. L'unità di misura nel SI della tensione interfacciale  $\gamma$  è newton su metro (N/m).

Quando si tratta il caso in cui una goccia di liquido è depositata su una superficie solida, si deve introdurre il concetto di bagnabilità. La bagnabilità è la capacità di un liquido di mantenere il contatto con la superficie solida, e dipende dalle interazioni intermolecolari che si instaurano tra le fasi [21,22]. Questo contatto è mantenuto grazie all'equilibrio tra le forze di adesione tra liquido e solido, e le forze di coesione, interne tra le particelle delle singole fasi. La bagnabilità si quantifica con il coefficiente di spandimento, indicato con  $S_{SL}$ , mostrato in equazione 2.18:

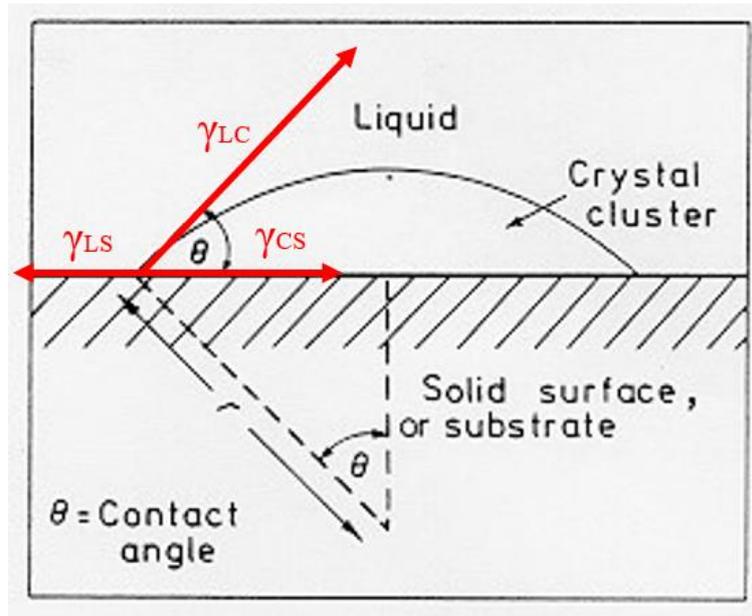
$$S_{SL} = \gamma_{SL} - \gamma_{CS} - \gamma_{LC} \quad (2.18)$$

in cui le tre tensioni si riferiscono rispettivamente all'interfaccia solido-liquido, cluster-solido, e liquido-cluster. Se il coefficiente di spandimento è maggiore di zero, il liquido si spande totalmente

sul solido, se invece esso è inferiore o uguale allo zero il liquido non si spande bene sul solido, quindi la goccia rimarrà in equilibrio sulla superficie.

### 2.3.2 Derivazione del modello

Per la nucleazione eterogenea, le equazioni che rappresentano la cinetica presentate in 2.2 subiscono delle modifiche. Il fenomeno interessa la crescita di un cluster su una superficie, su cui presenta un angolo di contatto  $\theta$ , come rappresentato in Figura 2.4.



**Figura 2.4:** Formazione di un cluster su una superficie solida, con rappresentazione delle tensioni interfaciali presenti tra le fasi. Figura tratta da [1] con modifiche.

Affinché un liquido mantenga la sua posizione su una superficie solida, è necessario che ci sia equilibrio tra le forze agenti, e quindi tra le tensioni interfaciali. Questo equilibrio è rappresentato dall'equazione di Young, indicata di seguito in equazione 2.19, ed è possibile applicarlo anche al caso cluster-superficie:

$$\gamma_{SL} = \gamma_{CS} + \gamma_{LC} \cos \theta \quad (2.19)$$

Nel caso della nucleazione eterogenea su superficie piana e liscia, le superfici e i volumi in gioco sono: la superficie liquido-cluster, la superficie cluster-solido e il volume del cluster, indicati in equazione 2.20, 2.21, 2.22.

$$S_{LC} = 2 \pi r^2 (1 - \cos \theta) \quad (2.20)$$

$$S_{CS} = \pi r^2 \sin^2 \theta \quad (2.21)$$

$$V_C = \frac{4}{3} \pi r^3 \left( \frac{2 - 3 \cos \theta + \cos^3 \theta}{4} \right) \quad (2.22)$$

La velocità di nucleazione eterogenea è data da:

$$J_{et} = n Z^{et} v^{et} \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}^{et}}{K_B T}\right) \quad (2.23)$$

in cui il fattore di Zeldovich e la velocità di attaccamento eterogenei sono rispettivamente:

$$v^{et} = \rho^{et} v^{om} \frac{1 - 2 \cos \theta}{2} \quad (2.24)$$

$$Z^{et} = \sqrt{\frac{\Delta G_{cr}^{et}}{3 \pi K_B T n}} \quad (2.25)$$

Nell'equazione 2.24 la grandezza  $\rho^{et}$  rappresenta un coefficiente di proporzionalità legato alla densità dei siti di nucleazione sulla superficie del substrato.

Come nel caso della nucleazione omogenea, si passa a valutare la barriera energetica  $\Delta G^{et}$ :

$$\Delta G^{et} = V_C \Delta G_v + S_{CS}(\gamma_{CS} - \gamma_{LS}) + S_{LC} \gamma_{LC} \quad (2.25)$$

Sostituendo il volume del cluster e le due superfici nell'equazione 2.25, si ottiene:

$$\Delta G^{et} = \frac{4}{3} \pi r^3 \left( \frac{2 - 3 \cos \theta + \cos^3 \theta}{4} \right) \Delta G_v + \pi r^2 \sin^2 \theta (\gamma_{CS} - \gamma_{LS}) + 2 \pi r^2 (1 - \cos \theta) \gamma_{LC} = \quad (2.26)$$

$$= \frac{4}{3} \pi r^3 \left( \frac{2 - 3 \cos \theta + \cos^3 \theta}{4} \right) \Delta G_v + 2 \pi r^2 (1 - \cos \theta) \gamma_{LC} + \pi r^2 (1 - \cos^2 \theta) (\gamma_{CS} - \gamma_{LS}) \quad (2.27)$$

Si può quindi scrivere, come nel caso della nucleazione omogenea, la barriera energetica come somma di due contributi, uno relativo al volume e l'altro relativo alla superficie, come indicato in equazione 2.28:

$$\Delta G^{et} = \frac{4}{3} \pi r^3 \left( \frac{2 - 3 \cos \theta + \cos^3 \theta}{4} \right) \Delta G_v + \Delta G_{sup}^{et} \quad (2.28)$$

Per ottenere l'equazione finale che descrive l'energia libera relativa alla nucleazione eterogenea si sono svolti calcoli e semplificazioni per i due contributi in modo separato.

Per il contributo di superficie si ha:

$$\Delta G_{sup}^{et} = 2 \pi r^2 (1 - \cos \theta) \gamma_{LC} + \pi r^2 (\gamma_{CS} - \gamma_{CS} \cos^2 \theta - \gamma_{LS} + \gamma_{SL} \cos^2 \theta) \quad (2.29)$$

Sostituendo l'equazione 2.19 dell'equilibrio delle tensioni interfacciali nell'equazione 2.29, si ottiene:

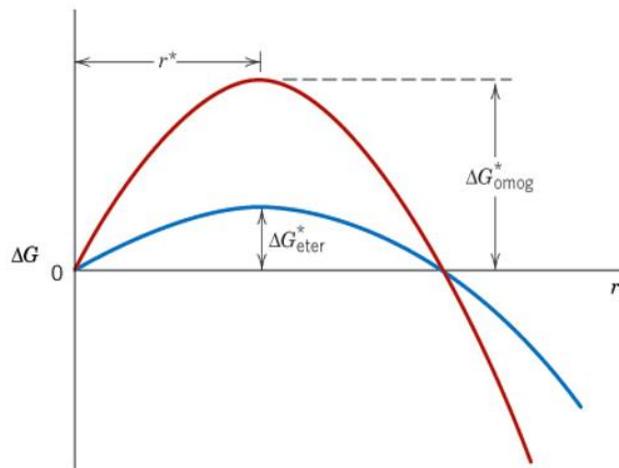
$$\begin{aligned} \Delta G_{sup}^{et} &= 2 \pi r^2 (1 - \cos \theta) \gamma_{LC} + \pi r^2 (\gamma_{CS} - \gamma_{CS} \cos^2 \theta - \gamma_{CS} - \gamma_{LC} \cos \theta + \gamma_{CS} \cos^2 \theta + \gamma_{LC} \cos^3 \theta) = \\ &= 2 \pi r^2 (1 - \cos \theta) \gamma_{LC} + \pi r^2 (-\gamma_{LC} \cos \theta + \gamma_{LC} \cos^3 \theta) = \\ &= \pi r^2 \gamma_{LC} (2 - 2 \cos \theta - \cos \theta + \cos^3 \theta) = \end{aligned}$$

$$= 4\pi r^3 \gamma_{LC} \left( \frac{1}{2} - \frac{3}{4} \cos \theta + \frac{1}{4} \cos^3 \theta \right) \quad (2.30)$$

Quindi il  $\Delta G^{et}$  diventa:

$$\begin{aligned} \Delta G^{et} &= \frac{4}{3} \pi r^3 \left( \frac{1}{2} - \frac{3}{4} \cos \theta + \frac{1}{4} \cos^3 \theta \right) \Delta G_v + 4\pi r^3 \gamma_{LC} \left( \frac{1}{2} - \frac{3}{4} \cos \theta + \frac{1}{4} \cos^3 \theta \right) = \\ &= \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v + 4\pi r^2 \gamma_{LC} \left( \frac{1}{2} - \frac{3}{4} \cos \theta + \frac{1}{4} \cos^3 \theta \right) = \Delta G^{om} * f(\theta) \end{aligned} \quad (2.31)$$

L'equazione 2.31 dimostra quanto già detto nei paragrafi precedenti: infatti la barriera energetica trovata per il caso di nucleazione eterogenea risulta minore di quella della nucleazione omogenea, in quanto per angoli di contatto  $\theta$  compresi tra  $0^\circ$  e  $180^\circ$ , caso sempre verificato nei nostri studi, la funzione  $f(\theta)$  risulta minore dell'unità. La Figura 2.5 mostra un confronto tra le barriere energetiche per i fenomeni di nucleazione omogenea ed eterogenea.



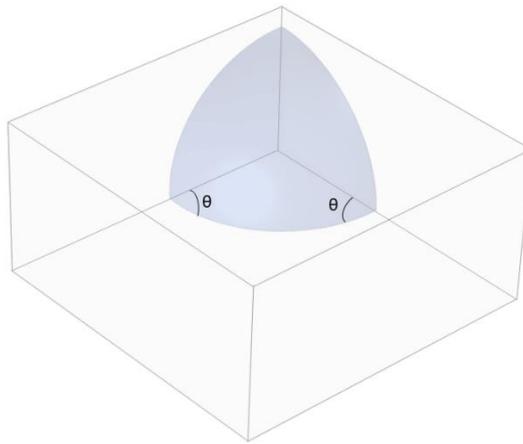
**Figura 2.5:** Confronto tra nucleazione omogenea ed eterogenea in termini di barriera energetica. Figura tratta da [1] con modifiche.

## 2.4 Nucleazione all'interno dei pori

Recentemente, il processo di cristallizzazione è stato studiato in presenza di superfici aventi pori con diversa geometria. Le motivazioni sono essenzialmente legate al fatto che si è dimostrato che la velocità di nucleazione diminuisce con la presenza di microstrutture porose [23]. Le dimensioni dei pori possono variare dalla scala atomica fino a centinaia di micrometri. Possono fornire anche un'ampia gamma di geometrie diverse come superfici polimeriche recanti pori sferici, allumina con pori cilindrici, membrane trattate con incisioni, nanotubi di carbonio, o recanti pori irregolari o sagomati. Esse sono realizzate con composti organici, macromolecole, metalli e anche particelle colloidali. Le strutture porose utilizzate come mezzo per la cristallizzazione influenzano una serie di fattori, come la velocità di nucleazione, i punti di fusione e congelamento dei materiali, nonché le forme polimorfiche, le dimensioni e perfino l'orientamento dei cristalli. Per quanto riguarda la velocità di nucleazione, l'effetto della presenza dei pori è l'aumento di questa velocità, dovuto al fatto che la riduzione del volume in cui avviene il fenomeno fa ridurre di circa un fattore dieci il tempo medio di nucleazione [14]. Un altro vantaggio nell'uso di strutture porose è la possibilità di controllare il polimorfismo dei materiali: infatti, le velocità di diffusione ridotte all'interno dei pori possono portare a lente conversioni tra le forme polimorfiche, favorendo così la stabilità di una struttura metastabile [24,25,26]. Per quanto riguarda i punti di fusione e congelamento, questi subiscono una diminuzione quando si confinano i processi all'interno di piccoli volumi quali sono i pori. Infine, l'orientamento dei cristalli è influenzato dal fatto che alcuni pori, come ad esempio quelli cilindrici, presentano effetti di crescita competitiva, per cui la crescita senza ostacoli avviene solo lungo l'asse del poro. Ne consegue che i cristalli cresceranno in maniera ordinata lungo l'asse, a discapito di altri cristalli con orientamenti diversi.

### 2.4.1 Ipotesi del modello matematico per la nucleazione all'interno di pori

Per la trattazione della nucleazione all'interno dei pori, ci si riferisce ad una rappresentazione in tre dimensioni, che mostra una porzione di sfera inserita all'interno di un poro di forma parallelepipedo, come rappresentato in Figura 2.6. A seconda dei valori diversi degli angoli di contatto si avranno diverse configurazioni. L'angolo di contatto  $\theta$  dipende dalle forze di adesione e coesione, esistenti tra le due fasi.



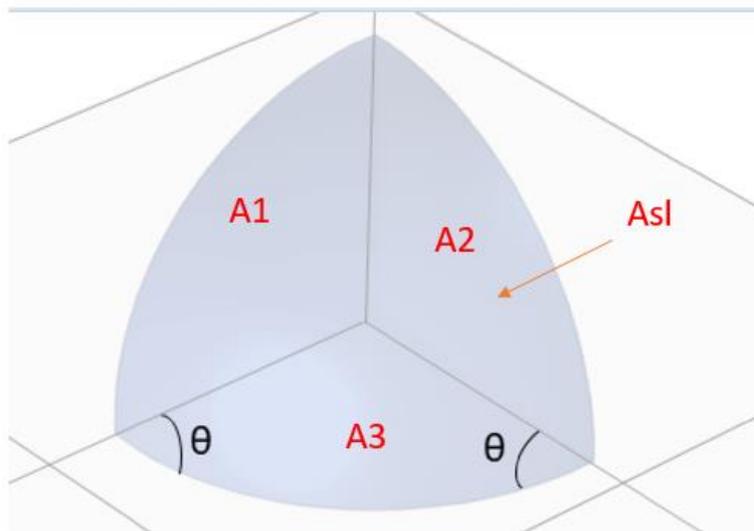
**Figura 2.6:** Rappresentazione 3D della nucleazione all'interno dei pori.

Si è inizialmente pensato ad un caso specifico di configurazione per poi espanderlo ad altri casi. Per ottenere l'equazione che rappresenta la cinetica, si sono fatte le seguenti ipotesi [13,27]:

1. il poro ha la forma di un parallelepipedo;
2. la sfera cresce all'interno del parallelepipedo a partire dal suo angolo interno di base ed è tagliata perfettamente in quattro parti da esso;
3. le aree interessate dal contatto tra le fasi sono tre settori circolari di ampiezza  $\beta$ , pari a  $90^\circ$ , e l'area della superficie laterale di una parte di sfera;
4. la nucleazione si verifica nell'angolo del poro;
5. se un cluster subcritico cresce fino a raggiungere la parete opposta del poro, esso ha raggiunto la dimensione critica;
6. una volta che il nucleo ha riempito totalmente il poro, la nucleazione continua al di sopra del poro. Tale ipotesi è legata al metodo sperimentale per la misura del tempo di nucleazione, basato sulla microscopia ottica. Tale metodo individua la presenza di nuclei solo dopo che sono cresciuti al di fuori del poro;
7. la differenza tra l'angolo  $\beta$  del poro e l'angolo tra le facce del cristallo in crescita introduce un difetto nel cristallo in crescita, che può essere assimilato a una dislocazione e a cui si può associare un'energia  $E_d$ ;

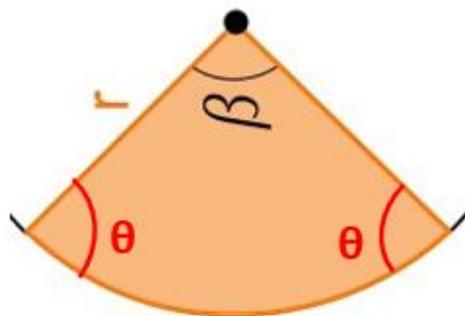
#### 2.4.2 Definizione e valutazione delle aree di contatto

In Figura 2.6 è rappresentato la porzione di sfera, che rappresenta il nucleo, che verrà considerata nei calcoli del contributo di  $\Delta G$ . La porzione di sfera è ricavata dalla sua intersezione con un parallelepipedo cavo rappresentante il poro. Per il calcolo della cinetica si è ipotizzato che la sfera fosse tagliata dal parallelepipedo in modo simmetrico, in modo tale che la porzione della sfera all'interno del poro corrisponda esattamente a un quarto del cluster. Rispetto alla nucleazione su superfici, ciò che cambia in questo caso sono le aree in gioco, come mostrato in Figura 2.7.



**Figura 2.7:** Rappresentazione delle aree di contatto cluster-poro.

Data l'ipotesi fatta per la posizione della sfera all'interno del poro, si è considerato che in ogni faccia del parallelepipedo l'area di contatto con la sfera fosse un settore circolare di angolo  $\beta$  di ampiezza uguale a  $90^\circ$ , identificati dalle aree  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$ , come rappresentato in Figura 2.8.



**Figura 2.8:** Rappresentazione delle aree di contatto cluster-solido, equivalenti a settori circolari.

Il primo passo fatto per ricavare la cinetica è stato quello di identificare tutte le aree interessate, che sono  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ , e  $A_{sl}$ , mostrate in equazione 2.32 e 2.33. Per quanto riguarda le prime tre aree, esse saranno dei settori circolari, invece  $A_{sl}$  è la metà della superficie laterale di uno spicchio di sfera.

$$A_1 = A_2 = A_3 = \pi r^2 \frac{\beta}{360^\circ} = \pi r^2 \frac{90^\circ}{360^\circ} = \frac{1}{4} \pi r^2 \quad (2.32)$$

$$A_{sl} = \frac{\beta}{90^\circ} \pi r^2 * \frac{1}{2} = \frac{1}{2} \pi r^2 \quad (2.33)$$

Per quanto riguarda il calcolo del volume, si è considerato esso fosse il volume di uno spicchio di sfera diviso a metà, identificato in equazione 2.34:

$$V = \frac{\beta \pi r^3}{270^\circ * 2} = 6 \pi r^3 \quad (2.34)$$

Diversamente dal caso in cui la cristallizzazione avviene su superficie piana, in cui si ha il contatto tra le tre fasi solido, liquido e cluster, nel caso in cui la cristallizzazione avviene all'interno di un poro si considerano delle aree di contatto che nascono e altre che scompaiono a seguito della nucleazione. In particolare, verrà meno il contatto tra la fase liquida e quella solida del poro, invece le aree che compaiono sono quelle riguardanti il contatto tra il cluster e le pareti del solido e tra cluster e liquido.

### 2.4.3 Barriera energetica critica e velocità di nucleazione

La velocità di nucleazione all'interno dei pori avrà la medesima struttura dei precedenti casi, mostrata in equazione 2.23.

$$J_{et} = n Z^{et} v^{et} \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}^{et}}{K_B T}\right) \quad (2.23)$$

La quantità da calcolare è in primo luogo la barriera di energia  $\Delta G$ . Essa sarà somma di due contributi, uno di superficie e uno di volume. Per quanto riguarda il contributo di superficie si devono tenere in considerazione i contributi che si eliminano e quelli che compaiono:

-aree che compaiono:  $A_1 A_2 A_3 A_{sl}$  moltiplicati per le tensioni superficiali cluster-solido e cluster-liquido.

-aree che scompaiono:  $A_1 A_2 A_3$  moltiplicati per la tensione interfacciale solido-liquido.

Il contributo energetico di superficie è indicato in equazione 2.35:

$$\Delta G_s = (A_1 + A_2 + A_3) * \gamma_{CS} + A_{sl} * \gamma_{LC} - (A_1 + A_2 + A_3) * \gamma_{SL} \quad (2.35)$$

Il contributo energetico di volume è indicato in equazione 2.36:

$$\Delta G_v = V \Delta g_v = -6 \pi r^3 n K_B T \ln(S) \quad (2.36)$$

Come nei casi precedenti, ciò che occorre calcolare per valutare la cinetica del processo è la barriera di energia critica, necessaria per avere la formazione dei primi aggregati in soluzione. Per il calcolo dell'energia critica si deve in primo luogo calcolare la dimensione critica  $r_c$ , ponendo la derivata dell'energia totale in funzione della dimensione uguale a zero.

$$\Delta G_{tot} = (A_1 + A_2 + A_3) * \gamma_{CS} + A_{sl} * \gamma_{LC} - (A_1 + A_2 + A_3) * \gamma_{SL} + 6 \pi r^3 \Delta g_v \quad (2.37)$$

$$\frac{d(\Delta G)}{dr} = \frac{5}{8} \pi r (\gamma_{CS} + \gamma_{LC}) - \frac{3}{8} \pi r \gamma_{SL} + 18 \pi r^2 \Delta g_v = 0 \quad (2.38)$$

In questo modo si riesce a calcolare la dimensione critica dei cluster, indicata in equazione 2.39.

$$r_c = \frac{3\gamma_{SL} - 3\gamma_{CS} - 2\gamma_{LC}}{144\Delta g_v} \quad (2.39)$$

Per ottenere l'equazione della barriera di energia critica, si sostituisce l'equazione 2.39 alla 2.37 della barriera totale di energia. Dopo varie semplificazioni si è arrivati all'equazione finale, da sostituire in seguito nell'esponenziale della velocità di nucleazione. L'equazione dell'energia critica è indicata in equazione 2.40.

$$\Delta G_{cr} = \frac{1}{\Delta g_v^2} \{a\gamma_{CS}^3 - \gamma_{LC}^3 [c + \cos \theta (d + \cos^2 \theta)] - e\gamma_{CS}\gamma_{LC}(\gamma_{CS} \cos \theta + \gamma_{LC}(f + \cos^2 \theta))\} \quad (2.40)$$

Quindi la barriera di energia critica dipende dall'angolo di contatto e dalle tensioni interfacciali tra le tre fasi. I coefficienti  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $d$ ,  $e$ ,  $f$  sono dei coefficienti numerici ottenuti da semplificazioni e moltiplicazioni nei vari steps per ottenere l'equazione finale e sono mostrati in Tabella 2.1.

**Tabella 2.1:** Coefficienti numerici presenti in equazione 2.40

Coefficienti	Valori
$a$	-1,87e-03
$b$	6,87e-04
$c$	1.037
$d$	0,67
$e$	2,04e-03
$f$	0,45

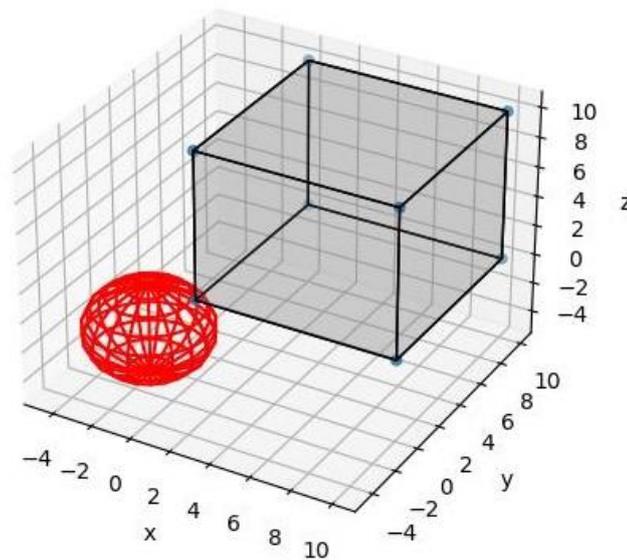
Per ottenere quindi la cinetica di questo caso specifico, si inserisce l'equazione 2.40 all'interno dell'equazione 2.23.

I procedimenti appena illustrati non sono molto semplici e richiedono molto tempo. Quindi, dal punto di vista dello studio del processo, ricavare manualmente cinetica, angolo di contatto e tensioni interfacciali per visualizzare la posizione della sfera rispetto al poro è un primo step limitante. Come già detto prima, sono innumerevoli i casi che si possono verificare, dal caso estremo in cui la sfera è fuori dal poro all'altro in cui la sfera è interamente contenuta nel poro. Per questi motivi, per avere una visione più ampia e per trattare una più vasta casistica, si è scelto di implementare queste equazioni sviluppando un modello in Python utilizzando metodi numerici. Il metodo utilizzato è il metodo 'Monte Carlo', un metodo computazionale che si basa sul campionamento casuale per ottenere dei risultati numerici. In questo caso, questo metodo è stato utilizzato per valutare le aree di intersezione tra il nucleo e le superfici del poro, la superficie laterale e il volume del nucleo all'interno del poro. Si è scelto di condurre un campionamento su un numero di punti  $n$  pari a 20000, per avere una maggiore accuratezza dei parametri calcolati. Lo script implementato su Python fornisce una rappresentazione tridimensionale del nucleo di dimensione  $r$  all'interno di un poro di dimensione  $dp$ , entrambe espresse in nanometri, con due angoli interni pari a  $90^\circ$  e l'angolo rimanente indicato con  $\beta$ . L'angolo di contatto tra il nucleo e il poro è indicato con l'angolo  $\theta$ . Si è scelto di utilizzare dei valori casuali dei parametri, utilizzando però per l'angolo  $\theta$  i valori presenti in letteratura, in modo da poterli utilizzare nel capitolo successivo in cui si ricaverà la cinetica per un caso specifico di nucleazione. In particolare, si sono inseriti angoli di contatto  $\theta$  pari a  $60^\circ$ ,  $75^\circ$ ,  $90^\circ$ ,  $110^\circ$ ,  $120^\circ$ ,  $140^\circ$

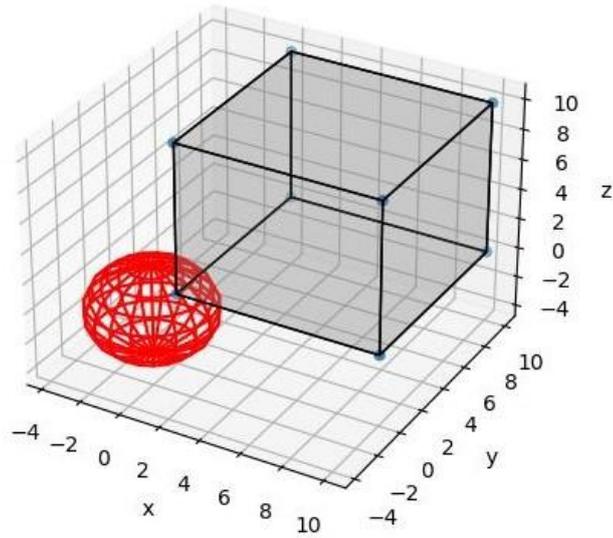
e 180°. Per quanto riguarda la dimensione del nucleo e del poro si è scelto di impostare una dimensione uguale per tutti i casi per visualizzare le diverse posizioni all'interno del poro: si è scelto di utilizzare 10 nm per  $dp$  e 3 nm per  $r$ . Di seguito, nelle figure 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.13, 2.14, 2.15, si mostrano i risultati ottenuti dall'algoritmo. In tabella 2.2 sono riportati invece i valori di superficie e volume ottenuti per ogni caso.

**Tabella 2.2:** Superfici e volumi calcolati in Python

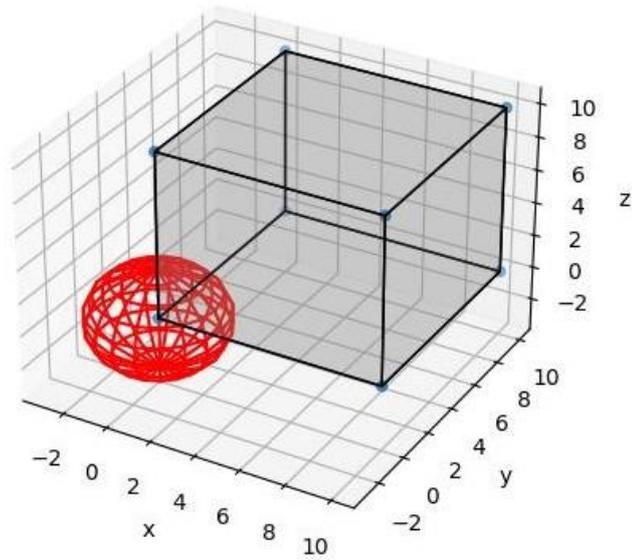
$\theta$	$A_3$ , $\text{nm}^2$	$A_{SL}$ , $\text{nm}^2$	$V$ , $\text{nm}^3$
60°	0,34	0,3	0,01
75°	5,3	3,95	1,2
90°	21	14	14
110°	49,9	35,7	73,2
120°	52,2	45,2	88,2
140°	35	69,5	107,2
180°	1,27e-30	113,1	113,1



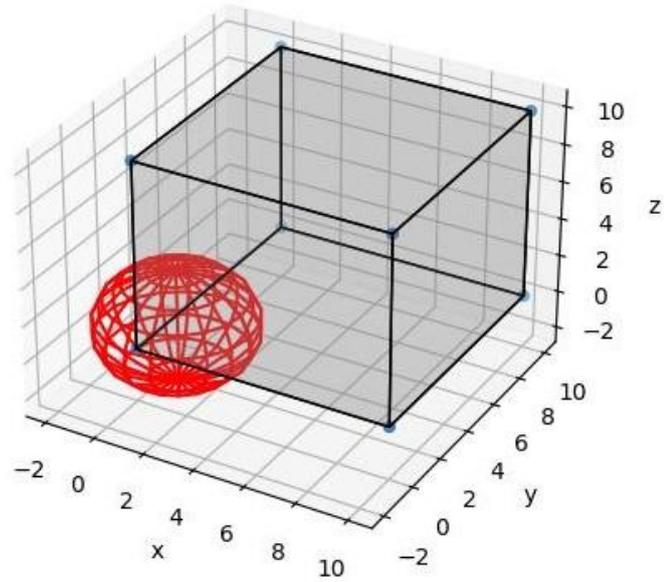
**Figura 2.9:** Rappresentazione tridimensionale con un angolo di contatto tra nucleo e poro  $\theta=60^\circ$ .



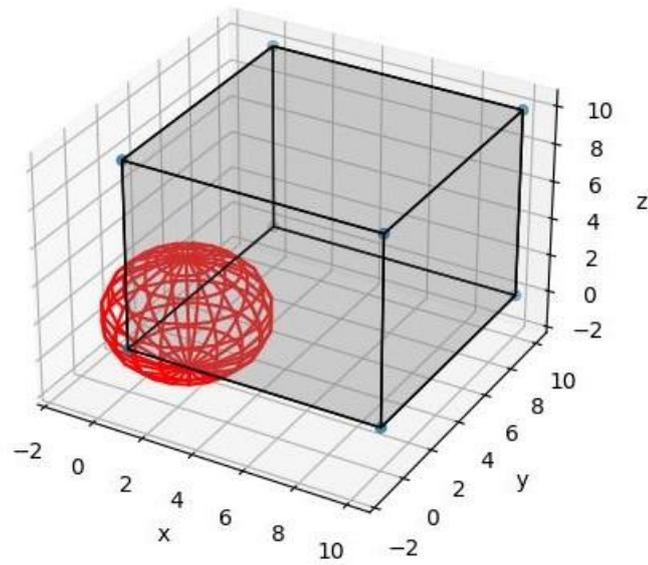
**Figura 2.10:** Rappresentazione tridimensionale con un angolo di contatto tra nucleo e poro  $\theta = 75^\circ$ .



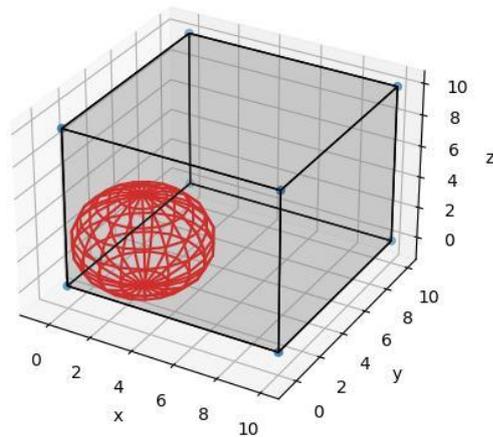
**Figura 2.11:** Rappresentazione tridimensionale con un angolo di contatto tra nucleo e poro  $\theta = 90^\circ$ .



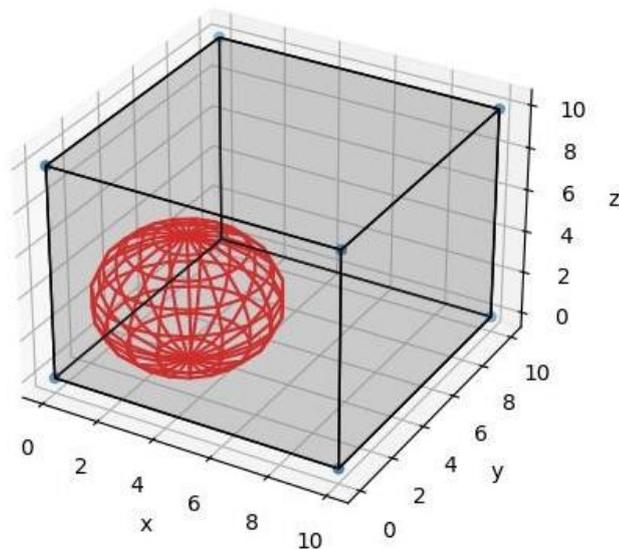
**Figura 2.12:** Rappresentazione tridimensionale con un angolo di contatto tra nucleo e poro di  $\theta = 110^\circ$ .



**Figura 2.13:** Rappresentazione tridimensionale con un angolo di contatto tra nucleo e poro  $\theta = 120^\circ$ .



**Figura 2.14:** Rappresentazione tridimensionale con un angolo di contatto tra nucleo e poro  $\theta= 140^\circ$ .



**Figura 2.15:** Rappresentazione tridimensionale con un angolo di contatto tra nucleo e poro  $\theta= 180^\circ$ .

Come si può notare in Figura 2.14 e 2.15 un angolo di contatto  $\theta > 140^\circ$  genera una situazione in cui il nucleo è distaccato dall'angolo interno del poro e si presta ad occupare interamente il poro.

#### 2.4.4 Approfondimento del fenomeno di nucleazione in presenza di superfici porose

Quando si parla di nucleazione all'interno del poro si distinguono due fasi nella formazione dei nuclei. In primo luogo, il poro viene riempito totalmente dal nucleo, fino a raggiungere la dimensione critica. Dopo che il poro è completamente riempito, la nucleazione continua al di fuori del poro [28]. In questo paragrafo si è scelto di distinguere i due casi per ottenere le informazioni di questo processo a due step.

#### 2.4.4.1 Nucleazione all'interno del poro

Il meccanismo di nucleazione all'interno del poro è stato già descritto e si è dimostrato che la nucleazione avviene con velocità maggiore rispetto al caso della nucleazione eterogenea in presenza di superfici lisce e piatte [28,29]. La differenza tra l'angolo del poro  $\beta$  e l'angolo tra le facce del cristallo in crescita introduce nel reticolo un difetto che può essere assimilato ad una dislocazione. Per tenere conto di questa differenza, si è deciso di introdurre nel modello l'energia di dislocazione, indicata con  $E_d$ . In questo caso, la barriera energetica da superare affinché la nucleazione possa avvenire è descritta dall'equazione 2.39. Nelle prossime equazioni la lettera  $P$  ad apice indica che la nucleazione si verifica all'interno del poro.

$$\Delta G_{cr}^P = V_{cr}\Delta g_v + \gamma_{SL}A_{SL} + (\gamma_{SP} - \gamma_{LP})A_{SP} \quad (2.41)$$

in cui le tensioni interfacciali  $\gamma_{SP}$  e  $\gamma_{LP}$  corrispondono alle interfacce cluster-poro e poro liquido.

La velocità di nucleazione in questo caso è data dal prodotto di tre termini, quali la concentrazione critica, la velocità di attaccamento e il fattore di Zeldovich.

$$J = \omega^P Z^P C_{cr}^P \quad (2.42)$$

La concentrazione critica è data da:

$$C_{cr}^P = C_1 \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}^P + E_d}{K_B T}\right) \quad (2.43)$$

La velocità di attaccamento è data da:

$$\omega_{cr}^P = \rho^P D A_{SL} C_1 \quad (2.44)$$

in cui  $\rho^P$  indica un fattore di proporzionalità legato alla densità superficiale dei pori. In particolare, maggiore è il numero dei pori, maggiore sarà la velocità di nucleazione. Il coefficiente  $D$  indica il coefficiente di diffusione, e il termine  $C_1$  è un fattore pre-esponenziale. Il termine restante è il fattore di Zeldovich, indicato in equazione 2.45.

$$Z^P = \sqrt{\frac{\Delta G_{cr}^P + E_d}{3\pi K_B T n_{cr}}} \quad (2.45)$$

Come si può notare dalle equazioni 2.43 e 2.45, il fatto che non ci sia una perfetta corrispondenza tra l'angolo del poro e l'angolo delle facce del cluster che cresce è causa di un rallentamento del processo, dato il termine aggiuntivo nei due fattori che influenzano la velocità di nucleazione.

L'energia di dislocazione è legata all'interferenza tra due angoli. Essa può essere quantificata utilizzando il vettore di Burger, indicato con  $b$ . Il vettore di Burger rappresenta l'ampiezza e la direzione della distorsione reticolare risultante dalla presenza di una dislocazione all'interno del reticolo cristallino, ed è perpendicolare alla linea di dislocazione. L'energia di dislocazione è indicata in equazione 2.46.

$$E_d = G_m b^2 L \quad (2.46)$$

Essendo l'energia di dislocazione sempre maggiore di zero, ad ogni dislocazione è associato un aumento di energia. Nell'equazione 2.46, il termine  $G_m$  rappresenta il modulo elastico a taglio, che

esprime il rapporto tra sforzo e deformazione, e il termine  $L$  coincide con la lunghezza massima della superficie del cluster a contatto con il poro e dipende quindi dall'angolo di contatto  $\theta$ . In particolare, possiamo distinguere diversi casi caratteristici, indicati nelle equazioni 2.47, 2.48, 2.49 e 2.50.

$$\theta > \frac{3}{4}\pi \quad L(\theta) = 2r \sin \theta \quad (2.47)$$

$$\frac{\pi}{4} < \theta < \frac{3}{4}\pi \quad L(\theta) = r(\sin \theta - \cos \theta) \quad (2.48)$$

$$\theta < \frac{\pi}{4} \quad L(\theta) = L\left(\frac{\pi}{2}\right) - L\left(\frac{\pi}{2} - \theta\right) \quad (2.49)$$

$$\theta = \frac{\pi}{4} \quad L(\theta) = \frac{L\left(\frac{\pi}{2}\right)}{2} \quad (2.50)$$

Il vettore di Burger  $b$  si può esprimere in funzione della lunghezza  $L$  e della differenza tra l'angolo del poro, indicato con  $\beta_p$ , e l'angolo del cristallo, indicato con  $\beta_r$ .

$$b = L \sin(\beta_p - \beta_r) \quad (2.51)$$

#### 2.4.4.2 Nucleazione al di fuori del poro

Una volta che il poro è stato riempito totalmente dalla comparsa dei cluster, il fenomeno di nucleazione non viene arrestato ma continua al di fuori della superficie del poro. In questo caso, la nucleazione è facilitata rispetto al caso in cui essa avviene su una superficie liscia per il fatto che il soluto si è depositato anche solo in parte su una superficie formata dal cristallo stesso. L'angolo di contatto è quindi pari a zero, e la velocità di nucleazione aumenta. In questa sezione le lettere  $OP$  ad apice indicano che il fenomeno avviene al di fuori del poro. La barriera di energia critica è:

$$\Delta G_{cr}^{OP} = \Delta G_{cr}^{et} - (\gamma_{SP} - \gamma_{LP})\pi a_{cr}^2 \sin^2 \theta + [(\gamma_{SP} - \gamma_{LP})(\pi a_{cr}^2 \sin^2 \theta - d_p^2) - \gamma_{SL} d_p^2] \quad (2.52)$$

in cui i termini  $a_{cr}$  e  $d_p$  rappresentano rispettivamente la dimensione critica e il diametro del poro.

La velocità di nucleazione, come nel caso precedente, è dato dal prodotto di tre contributi, indicati di seguito.

$$J^{OP} = \omega_{cr}^{OP} Z^{OP} C_{cr}^{OP} \quad (2.53)$$

I tre termini sono:

$$C_{cr}^{OP} = C_1 \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}^{OP}}{K_B T}\right) \quad (2.54)$$

$$\omega_{cr}^{OP} = \rho^{OP} \omega_{cr}^{omo} \frac{1 - \cos \theta}{2} \quad (2.55)$$

$$Z^{OP} = \sqrt{\frac{\Delta G_{cr}^{OP}}{3\pi K_B T n_{cr}}} \quad (2.56)$$

Come si nota dalle equazioni precedenti, il fatto che la nucleazione avvenga al di fuori del poro elimina il contributo dell'energia dovuta alla presenza di dislocazione, quindi si dimostra come venga facilitato il fenomeno.

Il tempo di nucleazione complessivo dipende dalla somma dei tempi necessari per far avvenire i due fenomeni, in quanto consecutivi. Poiché i tempi si sommano, la velocità di nucleazione complessiva è data da:

$$J^{P+OP} = \frac{1}{\frac{1}{J^P} + \frac{1}{J^{OP}}} \quad (2.57)$$

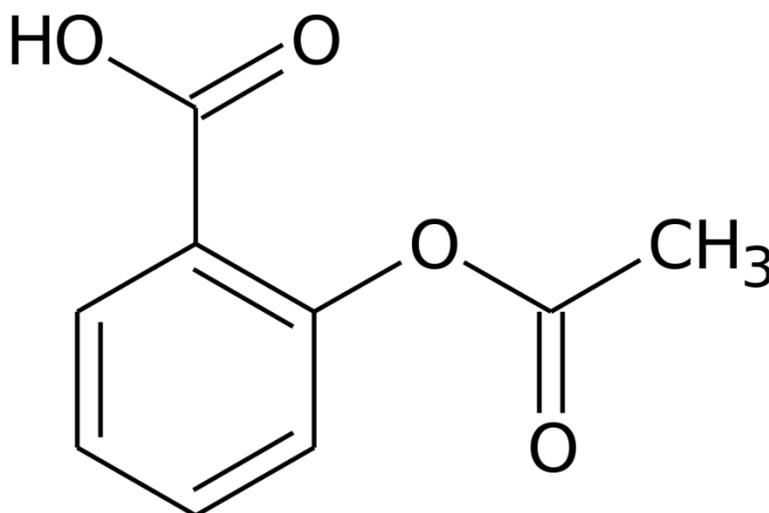
In questo capitolo si è arrivati a trovare un modello della cinetica per il processo di nucleazione per tutti i casi presi in considerazione. Sono state fatte le opportune semplificazioni e ipotesi per avere calcolare al meglio le velocità di nucleazione e le barriere di energia critica. Attraverso questi parametri appena calcolati, nel capitolo successivo si prenderà in considerazione il caso specifico della nucleazione di aspirina.



### 3. Applicazione del modello ad un caso di studio

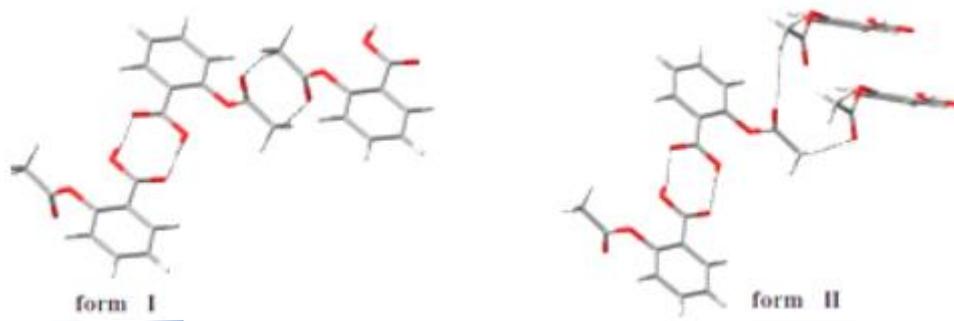
La cristallizzazione di molecole organiche e macromolecole è un processo importante nell'industria, in particolare per quanto riguarda i processi finalizzati alla produzione di principi attivi farmaceutici. Questi processi possono essere condotti in batch, semi-batch o in continuo. Tra questi, la cristallizzazione in batch è ampiamente utilizzata in quanto permette la produzione su larga scala, nonostante le limitazioni riguardanti il controllo del trasferimento di calore e massa, che vanno ad influenzare le dimensioni dei cristalli ottenuti [30].

In questo capitolo si intende validare il modello derivato nel Capitolo 2 considerando un caso di studio riguardante la cristallizzazione di farmaci. In particolar modo si è scelto di prendere in considerazione la molecola dell'aspirina (IUPAC: acido 2-(acetilossi) benzoico, CAS: 50-78-2), la cui formula di struttura è mostrata in Figura 3.1. L'aspirina è un farmaco antiinfiammatorio non steroideo appartenente alla famiglia dei salicilati.



**Figura 3.1:** Formula di struttura dell'aspirina.

In natura, l'aspirina si presenta sotto forma di cristalli incolori, polvere o granuli bianchi. La cristallizzazione permette di controllare i differenti polimorfi delle specie chimiche. Per molto tempo solo una forma cristallina dell'aspirina è stata nota; nel 1964 tramite la tecnica dei raggi X fu scoperta la forma monoclinica del cristallo di aspirina. Soltanto nel 2005 fu scoperta una forma alternativa del cristallo di aspirina [30]. I due polimorfi sono presentati in Figura 3.2.



**Figura 3.2:** Polimorfi dell'aspirina. Figura tratta da [30] con modifiche.

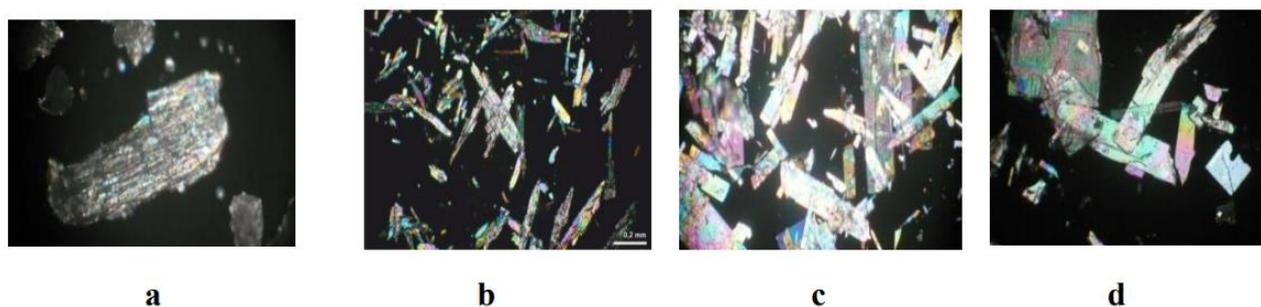
La cristallizzazione di aspirina e di farmaci in generale riveste un'importanza fondamentale in quanto permette elevata purezza e qualità dei prodotti che vengono utilizzati a scopo terapeutico sugli esseri umani. La cristallizzazione di aspirina viene normalmente condotta con il metodo a raffreddamento del sistema. L'aspirina viene cristallizzata tramite l'utilizzo di una soluzione acquosa di un solvente, generalmente un alcol. Vengono usati solventi con diversa polarità e lunghezza di catena, mostrati in Tabella 3.1 [30].

**Tabella 3.1:** Solventi utilizzati nella cristallizzazione di aspirina

<b>Solvente</b>	<b>Formula</b>	<b>Punto di ebollizione, °C</b>	<b>Punto di fusione, °C</b>
Acqua	H <sub>2</sub> O	100	0
Metanolo	CH <sub>4</sub> O	64	-98
Etanolo	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	78	-114
2-propanolo	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	82	-88
n-butanolo	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	118	-80
Acetone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	56	-95
Toluene	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	110	-95

Tra questi solventi, vengono maggiormente utilizzati gli alcoli con basso peso molecolare, come metanolo, etanolo e butanolo, in quanto la lunghezza e la ramificazione della catena influiscono sulla resa del processo e sulla purezza del prodotto cristallizzato [30]. Si è dimostrato infatti che se, ad esempio, si usa isopropanolo come solvente per la cristallizzazione, la resa di processo diminuisce. Questo perché l'isopropanolo ha una catena idrocarburica più lunga e ramificata rispetto a metanolo ed etanolo, e ciò influisce negativamente sulla qualità del prodotto di cristallizzazione.

L'interazione tra le molecole di solvente e le molecole di aspirina, permette di modificare le differenti morfologie cristalline. In questo caso gioca un ruolo fondamentale il legame a idrogeno: nella forma cristallina le molecole di aspirina sono collegate tra loro in una catena lineare, con dei legami idrogeno presenti tra i gruppi carbossilici. L'uso di solventi polari o non polari cambia la direzione di crescita dei cristalli e quindi la morfologia. Infatti, l'uso di solventi polari favorisce la crescita dei cristalli di aspirina lungo le direzioni x e y; in questo caso, i cristalli di aspirina formati assumono la forma di parallelepipedi piatti. I solventi non polari o parzialmente polari invece inibiscono la crescita lungo la direzione x e la favoriscono quella lungo la direzione y, conferendo ai cristalli di aspirina la forma aciculare. In Figura 3.3 sono rappresentate diverse immagini dei cristalli di aspirina in diversi solventi, in particolare metanolo, etanolo, isopropanolo e acetone. In queste immagini si può osservare la diversa morfologia assunta dai cristalli.



**Figura 3.3:** Morfologia dei cristalli di aspirina usando differenti solventi: a) metanolo, b) etanolo, c) isopropanolo, d) acetone. Figura tratta da [30] con modifiche.

In questo capitolo si è scelto di prendere in esame il caso della cristallizzazione di aspirina in presenza di etanolo come solvente. I dati trovati in letteratura sono stati utilizzati come punto di partenza per convalidare il modello teorico ricavato nel capitolo precedente. Analogamente a quanto presentato nel Capitolo 2, si è scelto di dividere il problema in tre sotto problemi analizzando il caso omogeneo e il caso eterogeneo, in presenza di superfici piane e di pori. Tali set di dati sono stati utilizzati per ricavare alcuni parametri di fitting del modello e validare le predizioni del modello confrontandole con i dati sperimentali.

### 3.1 Nucleazione omogenea di aspirina

Essendo la nucleazione omogenea non molto diffusa industrialmente, non è stato trovato in letteratura un elevato numero di dati sperimentali riguardanti la nucleazione omogenea di aspirina, indicata con ASA. Sono stati quindi presi in considerazione due diversi gradi di sovrasaturazione di ASA in etanolo, EtOH [31]. Il volume di soluzione di ASA ( $V_{soluzione}$ ) è di 0,2 mL con una temperatura di cristallizzazione di 15°C. I dati sono rappresentati in tabella 3.2.

Per quanto riguarda la temperatura, si è scelto di prendere i dati alla temperatura costante di 15°C in quanto nelle equazioni teoriche del modello è presente il coefficiente di diffusività  $D$ , che dipende fortemente dalla temperatura. Introducendo la costanza della temperatura si ingloba questa grandezza all'interno del fattore pre-esponenziale semplificando la convalida del modello. La velocità di nucleazione  $J$  è stata calcolata come il reciproco del prodotto tra il tempo di nucleazione  $\tau$  e il volume  $V$ .

**Tabella 3.2:** Dati sperimentali utilizzati per la cristallizzazione omogenea di aspirina. [31]

Soluto	Solvente	<i>S</i>	<i>T</i> , °C	<i>V</i> <sub>soluzione</sub> , mL	<i>τ</i> , h	<i>J</i> nuclei/h*L
ASA	EtOH	1,8	15	0,2	29900	0,2
ASA	EtOH	2,4	15	0,2	3140	1,6

Le condizioni in cui avviene il processo di nucleazione influenzano anche l'orientazione dei cristalli di aspirina [32]. Questo dipende dall'interazione tra i cristalli e le superfici o i solventi utilizzati per condurre il processo. Ai fini della convalida del modello, si sono inizialmente utilizzati i valori di tensione superficiale di aspirina rappresentati in Tabella 3.3. Si è scelto di analizzare tre tensioni diverse, a seconda della faccia cristallina considerata, distinguendo le componenti di tensione superficiale dispersiva e polare, indicate rispettivamente con  $\gamma_d$  e  $\gamma_p$ , che fanno riferimento a diversi meccanismi di interazione tra le molecole. Tale distinzione è stata effettuata anche per le componenti di tensione superficiale del solvente. L'unità di misura per tutte le tensioni è mJ/m<sup>2</sup>.

**Tabella 3.3:** Valori delle tensioni superficiali di tre diverse facce cristallina dell'aspirina e dell'etanolo [32].

	$\gamma$ , mJ/m <sup>2</sup>	$\gamma_d$ , mJ/m <sup>2</sup>	$\gamma_p$ , mJ/m <sup>2</sup>
ASA 001	46,2	32,4	13,8
ASA 100	51,1	32,5	18,6
ASA 011	59,9	37,2	22,7
EtOH	21,4	18,8	2,6

Per il calcolo della tensione interfacciale tra aspirina ed etanolo si è utilizzata l'equazione di Owens-Wendt, rappresentata in equazione 3.1.

$$\gamma_{ASA/EtOH} = \gamma_{ASA} + \gamma_{EtOH} - 2\sqrt{\gamma_{ASA}^d * \gamma_{EtOH}^d} - 2\sqrt{\gamma_{ASA}^p * \gamma_{EtOH}^p} \quad (3.1)$$

Utilizzando l'equazione 3.1 si sono calcolate le tensioni interfacciali tra le tre diverse facce cristalline prese in esame e l'etanolo. Poiché è difficile predire secondo quale orientazione crescano i cristalli di aspirina, si è considerata una tensione interfacciale media tra ASA ed etanolo. I dati sono presentati in tabella 3.4.

**Tabella 3.4:** Valori di tensione interfacciale aspirina-etanolo.

	$\gamma$ , mJ/m <sup>2</sup>
ASA-001/EtOH	6,3
ASA-100/EtOH	9,2
ASA-011/EtOH	13,0
ASA/EtOH media	9,5

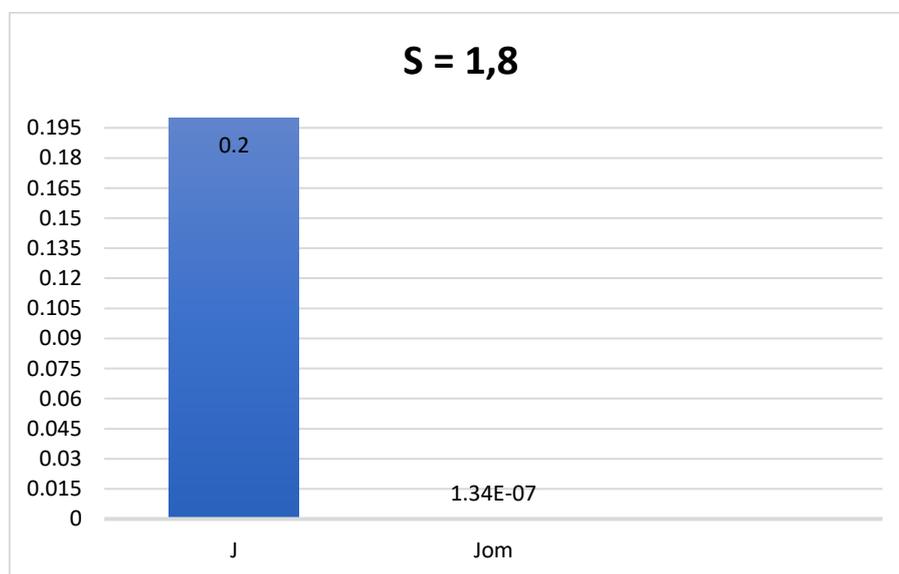
Utilizzando i valori delle tensioni interfacciali si procede al calcolo dei contributi di energia critica,  $\Delta G_{cr}$ , dimensione critica,  $r_{cr}$ , concentrazione critica,  $n_{cr}$ , e infine la velocità di nucleazione, indicata con  $J_{om}$ , e il rispettivo tempo medio di nucleazione, indicato con  $\tau_{model}$ . La velocità di nucleazione corrispondente ai dati di letteratura è indicata con  $J$ . I risultati sono presentati in Tabella 3.5, facendo distinzione tra i dati a disposizione da letteratura e quelli previsti dal modello. I calcoli sono stati fatti

inserendo i valori di letteratura nelle equazioni della cristallizzazione omogenea presenti nel Capitolo 2.

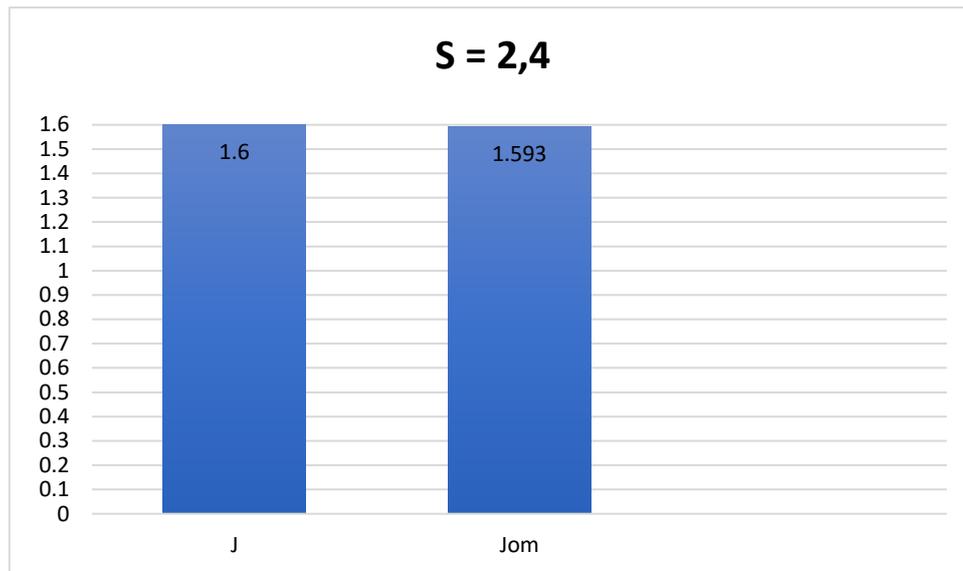
**Tabella 3.5:** Valori sperimentali e previsti dal modello.

Dati sperimentali			Dati previsti dal modello					
<i>S</i>	$\tau$ , h	<i>J</i>	$\Delta G$ , J	$r_{cr}$ , m	$n_{cr}$ , mol	$\tau_{model}$ , h	$J_{om}$ , nuclei/h*L	Errore, nuclei/h*L
1,8	29900	0,2	1,19 e-19	1,7 e-09	1,70 e-22	7455559	1,3 e-07	0,03
2,4	3140	1,6	5,40 e-20	1,16 e-09	5,1 e-23	0,628	1,593	2 e-16

I valori della velocità di nucleazione sono stati ottenuti minimizzando l'errore calcolato confrontando il valore di velocità teorico e sperimentale, variando il fattore pre-esponenziale *A*, presentato in equazione 2.2. Di conseguenza, il fattore pre-esponenziale *A* è l'unico parametro di fitting del modello riguardante la nucleazione omogenea. Come si può notare dal valore di errore molto basso per il caso di sovrasaturazione maggiore, c'è una buona corrispondenza tra la velocità di nucleazione stimata dal modello e quella sperimentale. Questo si suppone sia legato al valore del tempo medio di nucleazione: infatti per il caso di *S*=1,8 il valore di  $\tau$  è superiore di un ordine di grandezza rispetto al secondo caso, per cui avere un tempo di induzione alla nucleazione così alto rende più probabile il fatto che possano avvenire dei fenomeni di disturbo, come vibrazioni o ingresso di impurezze nel sistema, che vanno a perturbare le misurazioni. In Figura 3.3 e 3.4 sono rappresentati due grafici che mostrano il confronto tra valori della velocità di nucleazione omogenea stimati dal modello e sperimentali.



**Figura 3.3:** Confronto tra le velocità di nucleazione omogenea sperimentale e stimata dal modello con grado di sovrasaturazione pari a 1.8.



**Figura 3.4:** Confronto tra le velocità di nucleazione omogenea sperimentale e stimata dal modello con grado di sovrasaturazione pari a 2.4.

## 3.2 Nucleazione eterogenea di aspirina

### 3.2.1 Cristallizzazione in presenza di superfici

Molti studi riportano la cristallizzazione di aspirina per via eterogenea. Essa è stata spesso studiata in presenza di superfici polimeriche, che hanno l'abilità di favorire il decorrere del processo. Le superfici polimeriche nel processo di cristallizzazione di farmaci possono infatti agire come eteronucleanti. La selezione di queste superfici viene condotta tenendo conto principalmente di tre fattori: il tipo di solvente utilizzato, la temperatura a cui si opera il processo, e la chimica della superficie in gioco. Per quanto riguarda la chimica della superficie, la scelta riguarda soprattutto i gruppi funzionali presenti che favoriscono o meno la formazione dei cristalli. L'azione benefica di queste superfici è dovuta alla presenza su di esse di gruppi funzionali capaci di formare legami a idrogeno. Inoltre, si è dimostrato che, in presenza di legami a idrogeno tra aspirina e superficie, la nucleazione delle facce polari di aspirina è predominante. Si è dimostrato che condurre la cristallizzazione in presenza di film polimerici incrementa di molto la velocità di nucleazione; inoltre, se la nucleazione avviene all'interno di pori, il tempo medio di nucleazione diminuisce almeno di un fattore 20 [14].

Per la convalida del modello, il set di dati di letteratura selezionato riguarda la cristallizzazione di ASA in presenza di film polimerici ottenuti a partire da alcol polivinilico, indicati in seguito con PVA. Come nel caso della nucleazione omogenea, la cristallizzazione è condotta con una soluzione di aspirina utilizzando come solvente etanolo, il volume è di 0.2 mL e la temperatura è di 15°C [31]. I dati sperimentali utilizzati sono elencati in Tabella 3.6.

**Tabella 3.6:** Dati di letteratura utilizzati per la convalida della parte del modello riguardante la nucleazione eterogenea di aspirina in presenza di superfici piane e lisce [31].

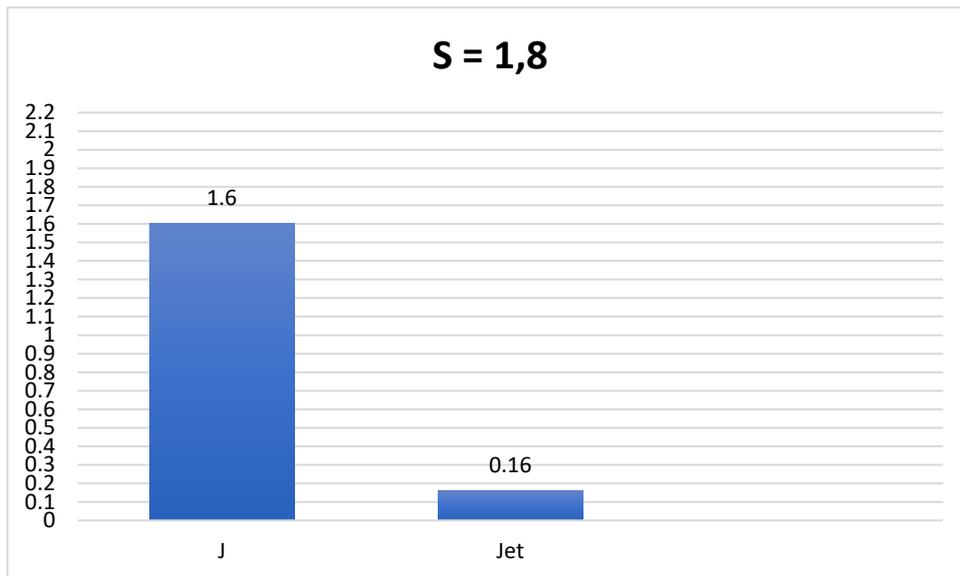
Soluto	Solvente	Superficie	$T, ^\circ\text{C}$	$\tau, \text{h}$	Volume, mL	$S$	$J, \text{nuclei/h}^*\text{L}$
ASA	EtOH	PVA	15	3090	0,2	1,8	1,6
ASA	EtOH	PVA	15	222	0,2	2,4	22,5

Utilizzando i valori presenti in Tabella 3.6 sono state calcolate, come nel caso della nucleazione omogenea, le grandezze necessarie per il calcolo della velocità di nucleazione eterogenea,  $J_{et}$ . Per questo caso i risultati sono stati ottenuti tramite il fitting del fattore pre-esponenziale  $\rho_{et}$ , un coefficiente legato alla densità dei siti di nucleazione eterogenea. Per il calcolo dell'energia critica si è scelto di calcolare il contributo della nucleazione omogenea,  $\Delta G_{om, cr}$  e la funzione dell'angolo di contatto,  $f(\theta)$ , calcolato tramite l'equazione di Young (equazione 2.19) e pari ad un valore di  $75,21^\circ$ , calcolato come la media dei tre angoli di contatto calcolati per le diverse facce dell'aspirina. I parametri calcolati sono mostrati in Tabella 3.7.

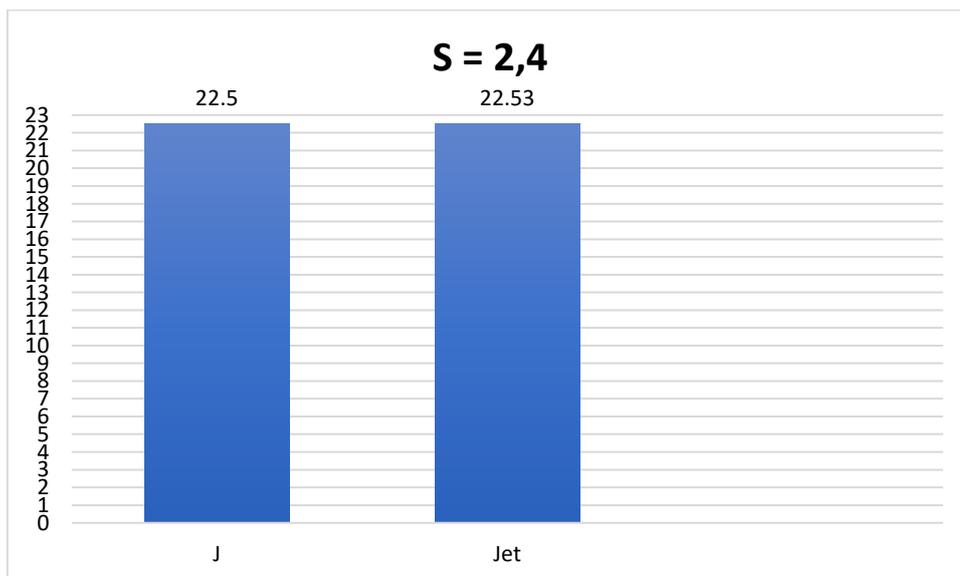
**Tabella 3.7:** Valori sperimentali e previsti dal modello.

Dati sperimentali			Dati previsti dal modello						
$S$	$\tau, \text{h}$	$J, \text{nuclei/h}^*\text{L}$	$\Delta G_{om, cr}, \text{J}$	$f(\theta)$	$r_{cr}, \text{m}$	$n_{cr}, \text{mol}$	$\tau_{model}, \text{h}$	$J_{et}, \text{nuclei/h}^*\text{L}$	Errore, $\text{nuclei/h}^*\text{L}$
1,8	3090	1,6	1,19E-19	0,31	1,73E-09	1,7E-22	6,3	0,16	2,13
2,4	222	22,5	5,38E-20	0,31	1,16E-09	5,13E-23	0,04	22,53	1,05E-04

Dai risultati mostrati in Tabella 3.7 si può subito notare che anche in questo caso il discostamento tra teorico e sperimentale è maggiore nel caso di grado di sovrasaturazione minore. In Figura 3.5 e Figura 3.6 sono rappresentati i grafici che mostrano il confronto tra la velocità di nucleazione sperimentale,  $J$  e prevista dal modello  $J_{et}$ .



**Figura 3.5:** Confronto tra le velocità di nucleazione eterogenea sperimentale e stimata dal modello con grado di sovrasaturazione pari a 1,8.



**Figura 3.6:** Confronto tra le velocità di nucleazione eterogenea sperimentale e stimata dal modello con grado di sovrasaturazione pari a 2,4.

Dall'osservazione della Figura 3.6 si può affermare che il modello ricavato nel capitolo precedente è adatto per descrivere il caso applicativo in esame. In particolare, come si può notare in Tabella 3.7, l'errore per il caso di sovrasaturazione maggiore è molto basso, quindi offre una buona rappresentazione della cinetica.

### 3.2.2 Nucleazione all'interno di pori di diversa geometria

Oltre che in presenza di superfici, un altro fattore che aumenta la velocità di nucleazione di aspirina è la presenza di pori su tali superfici. Si è dimostrato che quando il fenomeno di nucleazione si verifica all'interno di pori, si genera un abbassamento della barriera energetica critica e di conseguenza aumenta di molto la velocità di nucleazione.

Per la convalida del modello anche in questo caso si è fatto riferimento a dati di letteratura, in cui la cristallizzazione di aspirina avviene in presenza della superficie PVA. La temperatura è considerata costante al valore di 15°C e il volume è di 0.2 mL. I dati di letteratura utilizzati sono mostrati in Tabella 3.8, in cui sono presenti le informazioni riguardanti sia le caratteristiche dei pori che il tempo medio di nucleazione sperimentale  $\tau$  e la velocità di nucleazione sperimentale  $J$ . I dati si riferiscono ad una soluzione di aspirina in etanolo, con la presenza di pori di diametro pari a 250 nm e profondità 55 nm [31].

**Tabella 3.8:** Dati utilizzati per il modello della nucleazione all'intero di pori.

$S$	Angolo del poro, °	$\tau$ , h	$J$ , nuclei/h*L
1,8	40	828	6,0
1,8	60	799	6,3
1,8	65	751	6,7
1,8	80	340	14,7
1,8	85	215	23,3
1,8	90	400	12,5
2,4	40	158	31,6
2,4	60	126	39,7
2,4	65	130	38,5
2,4	80	91	54,9
2,4	85	48	104,2
2,4	90	100	50,0

Per il calcolo della velocità di nucleazione all'interno dei pori sono state calcolate la dimensione critica e il numero critico di molecole, le aree di contatto tra il cluster e il liquido e il cluster e la superficie del poro, indicate con  $A_{SL}$  e  $A_{SP}$ , e il volume del cluster a contatto con il poro, indicato con  $V_{cr}$ . In seguito, si è calcolata l'energia di dislocazione  $E_d$  che dipende dal vettore di Burger  $b$ , dalla lunghezza  $L$  e dal modulo elastico a taglio  $G_m$ , quest'ultimo utilizzato come coefficiente di fitting. I risultati sono mostrati in Tabella 3.9, 3.10 per i valori corrispondenti al grado di sovrasaturazione pari a 1,8, e in Tabella 3.11, 3.12 per il grado di sovrasaturazione 2,4. La velocità di nucleazione all'interno dei pori è indicata con  $J_p$ .

**Tabella 3.9:** Parametri calcolati dal modello riguardanti la nucleazione all'interno dei pori, con grado di sovrasaturazione  $S=1,8$ .

Angolo del poro, °	$A_{SL}, m^2$	$A_{SP}, m^2$	$V_{cr}, m^3$	$r_{cr}, m$	$n_{cr}, mol$	$\Delta G_{cr}, J$
40	1,25E-19	2,8E-19	6,15E-30	1,7E-09	1,7E-23	4,3E-22
60	5,6E-19	1,05E-19	6,25E-29	1,7E-09	1,7E-23	2,07E-21
65	6,8E-19	1,2E-19	8,2E-29	1,7E-09	1,7E-23	2,7E-21
80	1,1E-18	1,6E-19	1,5E-28	1,7E-09	1,7E-23	4,7E-21
85	1,2E-18	1,7E-19	1,9E-28	1,7E-09	1,7E-23	5,6E-21
90	1,4E-18	1,9E-19	2,2E-28	1,7E-09	1,7E-23	6,5E-21

**Tabella 3.10:** Parametri calcolati dal modello riguardanti la nucleazione all'interno dei pori, con grado di sovrasaturazione  $S=1,8$ .

Angolo del poro, °	$L, m$	$b, m$	$E_d, J$	$\tau, h$	$J, nuclei/h^* L$	$J_p, nuclei/h^* L$	Errore, nuclei/h *L
40	4E-20	2,8E-10	3,4E-21	0,2	6,0	4,9	1,4
60	8,25E-10	3,4E-10	1,00E-20	0,2	6,3	4,8	2,03
65	9,25E-10	3,03E-10	9,15E-21	0,16	6,7	6,3	0,11
80	1,05E-09	7,5E-11	6,3E-22	0,03	14,7	34,3	385,40
85	1,1E-09	1,8E-11	3,9E-23	0,03	23,3	38,1	220,4
90	1,2E-09	1,2E-10	1,9E-21	0,04	12,5	25,8	177,9

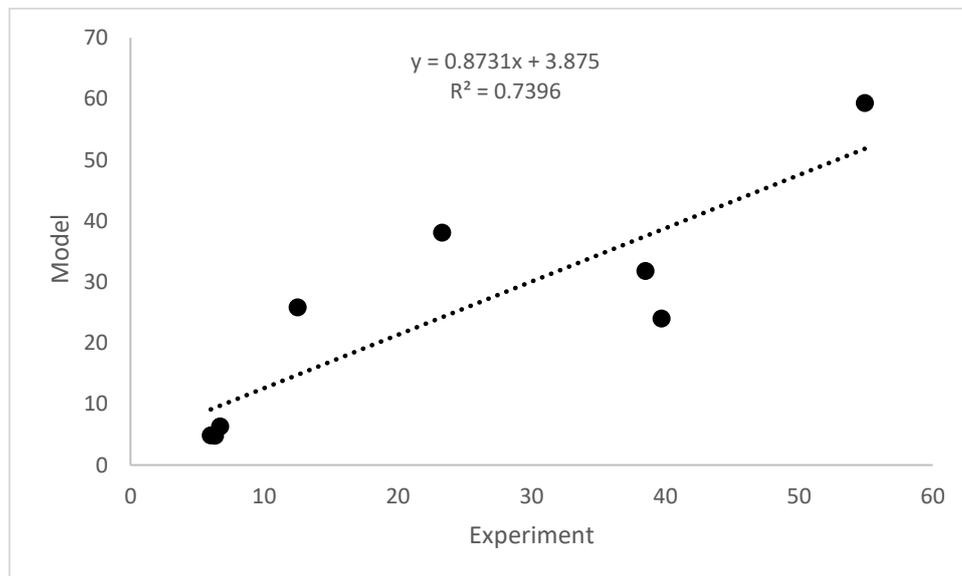
**Tabella 3.11:** Parametri calcolati dal modello riguardanti la nucleazione all'interno dei pori, con grado di sovrasaturazione  $S=2,4$ .

Angolo del poro, °	$A_{SL}, m^2$	$A_{SP}, m^2$	$V_{cr}, m^3$	$r_{cr}, m$	$n_{cr}, mol$	$\Delta G_{cr}, J$
40	5,7E-20	1,3E-19	1,8E-30	1,16E-09	5,1E-23	1,9E-22
60	2,5E-19	4,7E-19	1,8E-29	1,16E-09	5,1E-23	9,8E-22
65	3,1E-19	5,5E-19	2,5E-29	1,16E-09	5,1E-23	1,2E-21
80	4,9E-19	7,4E-19	5,03E-29	1,16E-09	5,1E-23	2,05E-21
85	5,6E-19	7,9E-19	5,8E-29	1,16E-09	5,1E-23	2,5E-21
90	6,25E-19	8,4E-19	6,7E-29	1,16E-09	5,1E-23	2,8E-21

**Tabella 3.12:** Parametri calcolati dal modello riguardanti la nucleazione all'interno dei pori, con grado di sovrasaturazione  $S=2,4$ .

Angolo del poro, °	$L, m$	$b, m$	$E_d, J$	$\tau, h$	$J, \text{nuclei/h}^*L$	$J_p, \text{nuclei/h}^*L$	Errore, $\text{nuclei/h}^*L$
40	2,7E-10	1,9E-10	1,01E-21	0,15	31,6	6,55	629,9
60	5,9E-10	2,4E-10	3,7E-21	0,04	39,7	23,9	246,06
65	6,2E-10	2,05E-10	2,8E-21	0,03	38,5	31,8	44,4
80	7,4E-10	5,3E-11	2,2E-22	0,01	54,9	59,3	19,03
85	8,04E-10	1,25E-11	1,3E-23	0,01	104,2	67,14	1370,5
90	7,65E-10	7,85E-11	5,1E-22	0,01	50	70,11	404,5

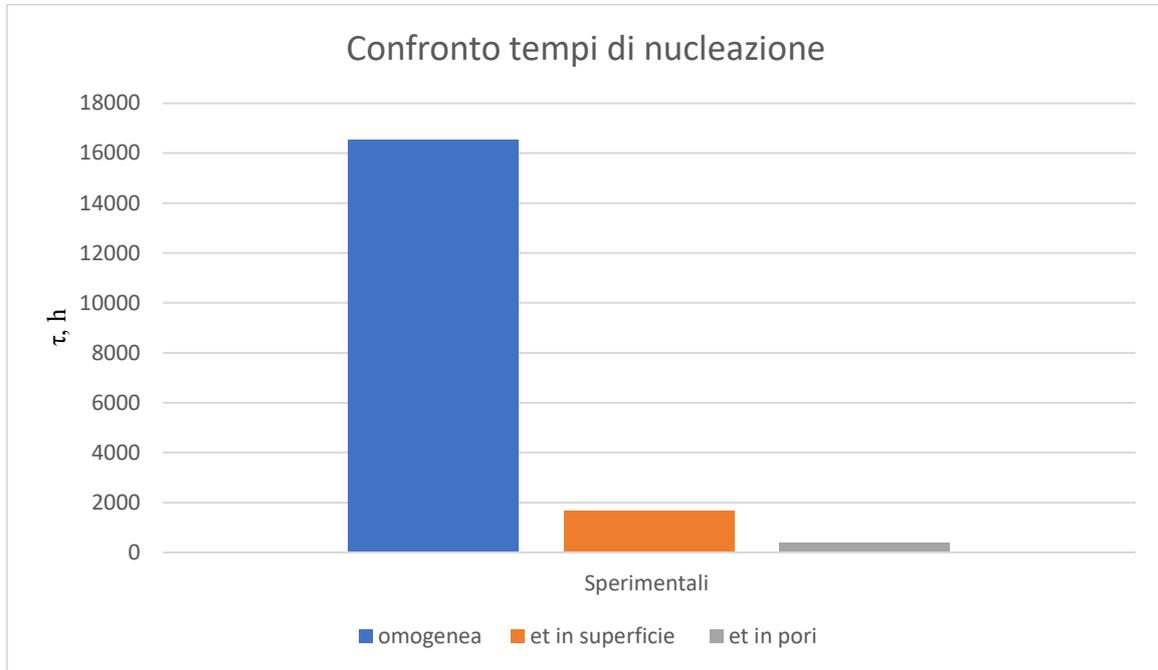
Per avere una visione chiara e completa per la nucleazione all'interno di pori, si sono raggruppati i dati in un grafico per mostrare la correlazione tra i valori della velocità di nucleazione. L'analisi preliminare dei dati è stata condotta osservando l'errore che deriva dalla misurazione della velocità di nucleazione. Come visibile in Tabella 3.10, 3.12 in alcuni casi l'errore è molto alto, per cui si è scelto di calcolare anche l'errore relativo sul tempo medio di nucleazione per capire quali dati fossero da trascurare in quanto contenenti ritenuti meno affidabili. In Figura 3.7 si può vedere la correlazione tra le velocità della nucleazione all'interno del poro.



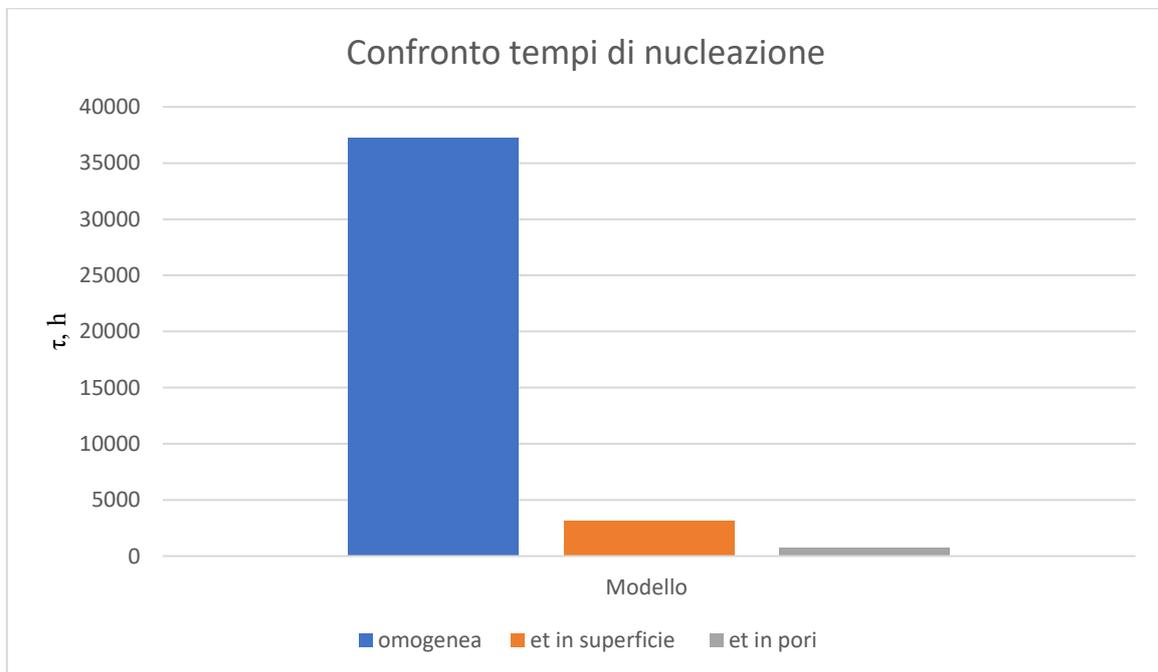
**Figura 3.7:** Correlazione tra dati sperimentali e previsti dal modello riguardanti la nucleazione all'interno del poro.

Come si può notare da Figura 3.7, la correlazione tra i valori non è perfetta; questo è dovuto al fatto che, in primo luogo, all'interno del modello ricavato nel capitolo precedente sono state introdotte delle ipotesi semplificative e, in secondo luogo, come già discusso, in alcuni casi i valori dei tempi di nucleazione sperimentale sono molto elevati e quindi meno affidabili.

La nucleazione all'interno dei pori comunque implica un abbassamento del tempo medio di nucleazione e quindi un aumento della velocità di nucleazione. In Figura 3.8 e Figura 3.9 si mostra un confronto tra i tempi di nucleazione nei vari casi per mostrare quanto appena affermato. Nei grafici si mostra l'andamento del tempo medio di nucleazione per i tre casi analizzati, sia facendo riferimento ai dati in letteratura sia ai dati stimati dal modello.



**Figura 3.8:** Confronto tra tempi di nucleazione sperimentali per i tre casi analizzati.



**Figura 3.9:** Confronto tra tempi di nucleazione stimati dal modello per i tre casi analizzati.

Generalmente, la cristallizzazione all'interno di pori avviene tramite l'utilizzo di pori sferici, pori sagomati o pori con diverse geometrie regolari. La geometria del poro influenza la velocità di nucleazione e di conseguenza il tempo durante il quale avviene il fenomeno.

In questo capitolo, attraverso l'analisi dei dati sperimentali, si è riusciti a dimostrare che il modello ricavato nel capitolo precedente, fornisce una buona approssimazione per la cinetica di nucleazione applicandolo a un caso specifico di studio di cristallizzazione. Le discrepanze tra il modello teorico e i dati sperimentali sono riconducibili alle ipotesi introdotte per la semplificazione. Partendo dal caso più semplice della nucleazione omogenea, il modello fornisce lo stesso andamento dei dati sperimentali, confermando l'azione positiva dell'aumento del grado di sovrasaturazione. Nel caso specifico di nucleazione all'interno dei pori il modello fornisce, inoltre, la conferma della diminuzione del tempo medio necessario a far avvenire il fenomeno. Come si può notare in Figura 3.8, 3.9 il modello ricavato fornisce il medesimo andamento del tempo di nucleazione in funzione dei diversi tipi di nucleazione analizzati.



## 4. Cristallizzazione di proteine in gel di agarosio

L'agarosio si presta a molte applicazioni, come in elettroforesi, in cui funge da supporto per la separazione delle proteine [33], e in cristallizzazione, in cui funge da catalizzatore per il processo [34]. Grazie alle sue proprietà chimico-fisiche nonché alla sua stabilità termodinamica e alla sua non interazione con le molecole, l'agarosio è stato ampiamente utilizzato in diversi ambiti. L'agarosio è utilizzato in medicina per combattere malattie come il diabete e abbassare il livello di colesterolo nel sangue. È utilizzato anche in medicina veterinaria nell'allevamento di mammiferi marini, grazie alla sua alta capacità di idratazione. Per quanto riguarda la cristallizzazione, l'agarosio viene impiegato per il suo essere inerte nei confronti delle specie chimiche utilizzate. In particolar modo, esso è utilizzato nella cristallizzazione proteica data la sua capacità di promuovere il processo di nucleazione [35,36]. Numerose sono le applicazioni dell'agarosio nella cristallizzazione proteica. Un esempio è la cristallizzazione del Lisozima [37].

I metodi per intrappolare le macromolecole nella matrice di gel sono essenzialmente due. Il primo consiste nel miscelare la soluzione proteica con una soluzione contenente il precursore del gel, e successivamente gelificare l'agarosio abbassando la temperatura del sistema. Il secondo consiste nel produrre le particelle di gel e successivamente introdurre in esse le proteine con il meccanismo di diffusione [38,39]. Il secondo metodo ha il vantaggio di inserire una supplementare fase di purificazione degli aggregati proteici grazie al meccanismo di diffusione nella matrice di gel.

### 4.1 Descrizione della chimica del gel di agarosio

L'agarosio è noto fin dal diciassettesimo secolo in Giappone per le sue ottime proprietà chimico-fisiche e per la sua stabilità termodinamica. È usato in molte applicazioni, tanto da sostenere una vera e propria industria della pesca e della coltivazione delle alghe da cui viene estratto. L'agarosio è un polimero polisaccaride ottenuto dalla purificazione dell'agar-agar. L'agar-agar è un polisaccaride gelatinoso estratto dalla famiglia delle *Rhodophyta*, alghe rosse, composto da due molecole principali: agarosio e agaropectina. L'agarosio è un polimero lineare, la cui unità principale è l'agarobiosio, un disaccaride composto da (1,3)- $\beta$ -D-galattopiranosio-(1,4)-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galattopiranosio. Le due unità di monosaccaridi sono tenute insieme da un legame glicosidico, come mostrato in Figura 4.1.

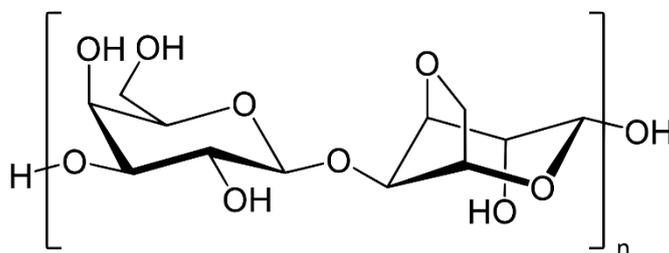
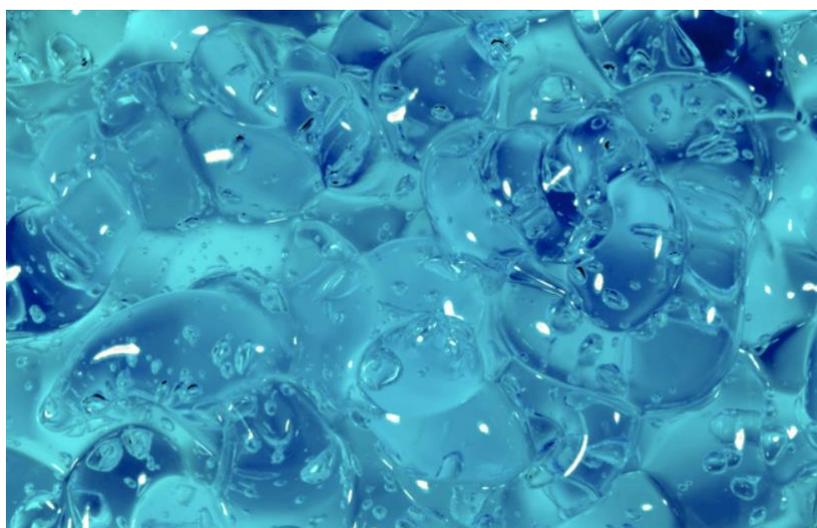


Figura 4.1: Struttura dell'unità fondamentale dell'agarosio.

L'agarosio si presenta in natura come polvere bianca, solubile in acqua a temperature intorno ai 100°C. Una volta gelificato, la struttura tridimensionale del gel, mostrata in Figura 4.2, è mantenuta grazie alla presenza di legami idrogeno, che si instaurano tra le fibre elicoidali di gel, capaci di trattenere molta acqua. L'acqua intrappolata nel reticolo è in parte legata alle fibre di gel, mentre la

restante è libera di muoversi dentro o fuori la matrice di gel se quest'ultima è posta sotto intensa pressione. La versatilità del gel di agarosio è anche dovuta al fatto che le variazioni di temperatura possono facilmente far cambiare lo stato fisico del prodotto. Infatti, scaldando il gel, esso può tornare nuovamente allo stato liquido. L'agarosio è soggetto al fenomeno dell'isteresi: se, infatti, la temperatura scende nuovamente intorno ai 40°C il gel torna allo stato liquido. Abbassando la temperatura la sostanza gelifica alla temperatura  $T_{gel}$ , il cui valore dipende dalla natura chimica del gel stesso. In natura esistono infatti diversi tipi di gel di agarosio: i gel di agarosio standard, derivanti da *Geldium*, presentano valori di  $T_{gel}$  di 34-38°C, mentre quelli derivanti da *Glacilaria*, mostrano una temperatura  $T_{gel}$  compresa tra 40°C e 52 °C, a causa della maggior presenza di gruppi sostituenti metossili. La temperatura  $T_{gel}$  a cui si ha la formazione del gel dipende da un elevato numero di fattori, tra cui la concentrazione di agarosio, la concentrazione dei sali in soluzione, il valore del pH ma anche dai gruppi funzionali aggiunti. Il valore di questa temperatura può essere modificato tramite l'aggiunta nel gel dei gruppi sostituenti. In particolare, le metilazioni hanno la funzione di ridurre la temperatura  $T_{gel}$ , mentre l'aggiunta di gruppi solfati causano un incremento di  $T_{gel}$ .



**Figura 4.2:** Presentazione del gel di Agarosio.

## 4.2 Applicazione del gel al processo di cristallizzazione

L'utilizzo di gel nel processo di cristallizzazione presenta numerosi vantaggi, in quanto esso può introdurre un maggior livello di controllo sui fenomeni di nucleazione. Fino ad alcuni di anni fa veniva utilizzato solo per la cristallizzazione di piccole molecole, ma recenti studi hanno riportato il suo utilizzo anche per la cristallizzazione di macromolecole come le proteine [40].

Molto spesso, lo step più difficoltoso della cristallizzazione di proteine in gel e che necessita di un'accurata ottimizzazione, è la creazione del gel. Inoltre, i precursori del gel devono essere in grado di non interagire chimicamente con le specie presenti in soluzione. Sostanzialmente, due sono i gel che vengono utilizzati: il gel a base di silice e il gel di agarosio. Tra questi il gel di agarosio presenta numerosi vantaggi: è maggiormente disponibile nei laboratori ed è facile da maneggiare, non interagisce con le molecole ed esplica la sua funzione in concentrazioni minori rispetto al gel di silice.

Il vantaggio principale nell'utilizzare il gel come precursore della cristallizzazione è il fatto che esso contrasta la sedimentazione dei cristalli, e di conseguenza, ne impedisce la rottura [41].

Utilizzando il gel, i cristalli tendono a rimanere sospesi all'interno della matrice di gel e quindi a non accumularsi sul fondo. Infatti, la conformazione reticolare del gel fa sì che i nuclei, una volta formati, non possano più muoversi all'interno della matrice. Un altro aspetto importante nell'uso del gel di agarosio nella cristallizzazione di proteine è il fatto che la matrice di gel rappresenta una protezione ai cristalli ottenuti. Riducendo i fenomeni di convezione all'interno del sistema, i gel garantiscono un maggior controllo dei fenomeni di trasporto di materia durante la nucleazione e la crescita dei cristalli [40], grazie all'instaurazione di un regime diffusivo. Una differenza sostanziale nella cristallizzazione operata utilizzando il gel e non, sta nella qualità del prodotto finale: si è visto infatti che l'uso del gel genera cristalli di qualità maggiore e isometrici, in quanto la crescita è uniforme nelle tre dimensioni. Si è dimostrato, inoltre, che usando il gel per il processo di cristallizzazione, l'analisi post-produzione è facilitata, in quanto le proteine presentano un indice di diffrazione maggiore [41].

In genere nella cristallizzazione si utilizzano percentuali di gel che vanno dallo 0 al 2 %, considerati come valori ottimali. Si possono utilizzare anche concentrazioni più alte avendo ottimi risultati, ma in questo caso la limitazione sta nella difficoltà di manipolare il gel. Infatti, a basse concentrazioni il comportamento del gel è assimilabile a quello di un liquido non Newtoniano. Aumentando la concentrazione, invece, si comporta come un fluido viscoelastico. Inoltre, se la cristallizzazione avviene in batch, dopo il processo si deve estrarre e sezionare il gel per sottoporlo all'analisi con il microscopio ottico. Se la percentuale di gel è molto alta, l'analisi potrebbe essere compromessa a causa dell'opacità del gel.

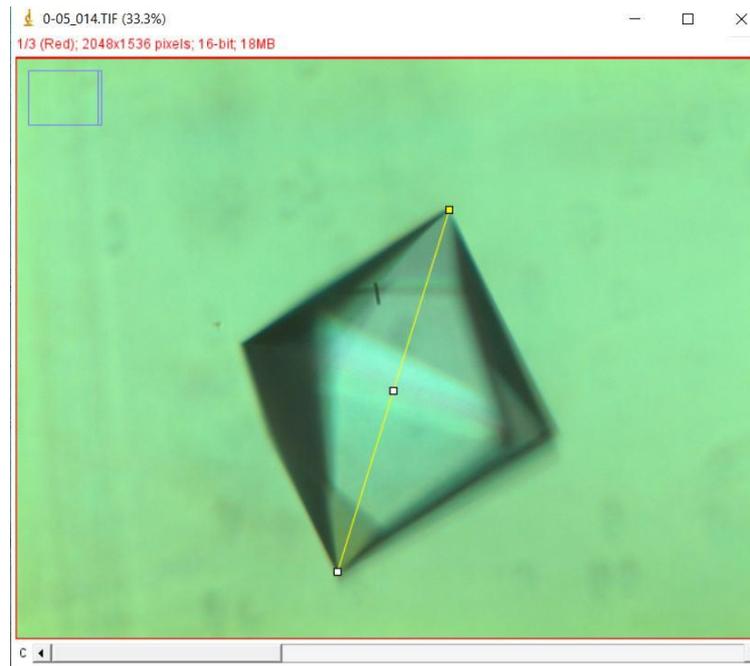
### 4.3 Materiali e metodi

Tramite l'uso di dati sperimentali, si è operato uno studio sulla dimensione dei cristalli di una proteina modello, la proteinasi K, cresciuti in presenza di gel di agarosio. I dati sono stati raccolti dalla Dott.ssa Artusio durante una campagna sperimentale volta allo studio della cristallizzazione delle proteine in gel. L'agarosio OmniPur è stato acquistato da Calbiochem (San Diego, CA, USA). La proteinasi K (liofilizzata, A3830) è stata acquistata da PanReac AppliChem (Barcellona, Spagna). La proteina è stata dapprima disciolta in 50 mM HEPES (pH 7,0) e la concentrazione è stata misurata per via spettrofotometrica a 280 nm. La preparazione del gel è stata eseguita dissolvendo l'agarosio in acqua MilliQ a 95 °C per 10 minuti sotto agitazione. La soluzione è stata poi portata a 45 °C e vi sono stati aggiunti il precipitante e la proteina, per un volume complessivo pari a 80 µL. Le condizioni di cristallizzazione in batch sono riportate in Tabella 4.1. La cristallizzazione è stata condotta all'interno di provette per PCR.

**Tabella 4.1:** Condizioni di cristallizzazione per proteinasi K in gel di agarosio.

Proteina	Buffer	Precipitante	agarosio
6.0 mg/mL proteinasi K	50 mM HEPES (pH 7.0)	0.5 M NaNO <sub>3</sub> , 25 mM citrato di sodio (pH 6.5)	0-1.9 %

I campioni sono stati incubati a 20 °C e sono stati monitorati periodicamente tramite microscopia ottica. Una volta che i campioni hanno raggiunto l'equilibrio, sono state acquisite le immagini relative alle popolazioni di cristalli ottenute con diversi quantitativi di agarosio. Per l'analisi delle dimensioni dei cristalli, si è utilizzato il software 'Imagej'. Per il calcolo delle dimensioni, si è scelta una lunghezza caratteristica corrispondente alla distanza tra i due vertici del cristallo piramidale, come mostrato in Figura 4.3. Le immagini sono state riferite a due scale distinte, a seconda dell'ingrandimento utilizzato.

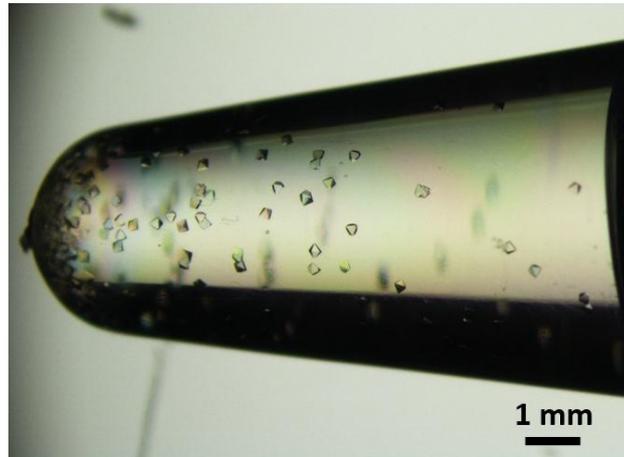


**Figura 4.3:** Rappresentazione di come è stata eseguita la misura della dimensione dei cristalli.

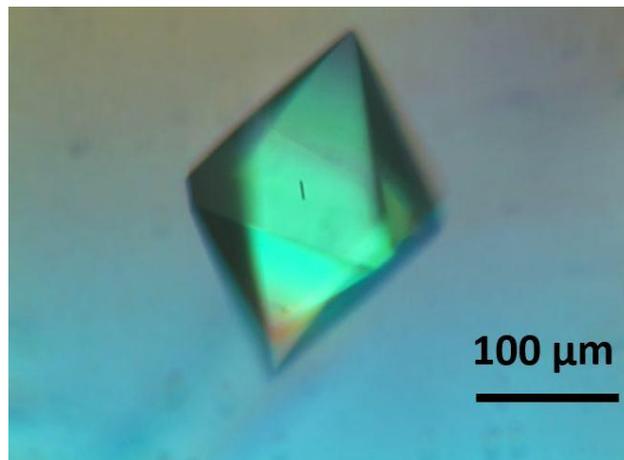
## 4.4 Risultati

### 4.4.1 Andamento delle dimensioni dei cristalli in funzione della percentuale di gel

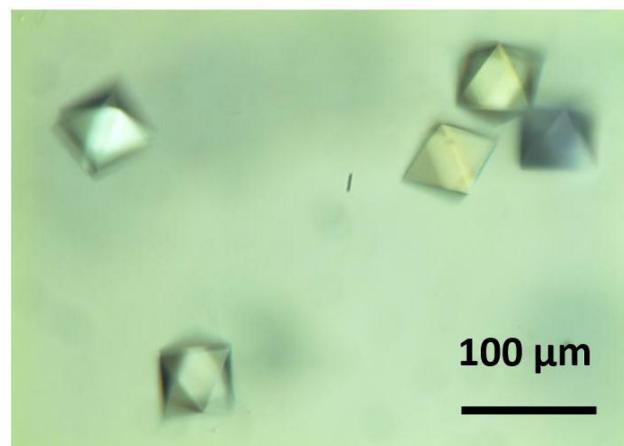
Per l'analisi delle dimensioni dei cristalli, si è partito dai dati con 0% di gel di agarosio fino a quelli con 1.9% per studiare l'effetto del gel nei confronti del fenomeno di nucleazione. Di seguito, nelle figure 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11 si mostrano delle immagini rappresentative utilizzate per ogni percentuale di gel.



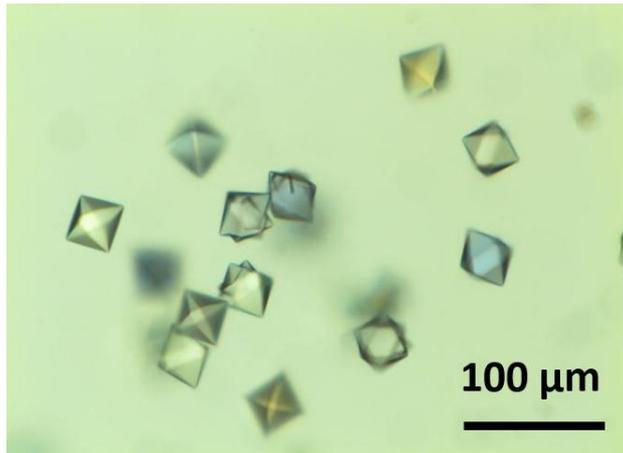
**Figura 4.4:** campione con 0% di gel di agarosio.



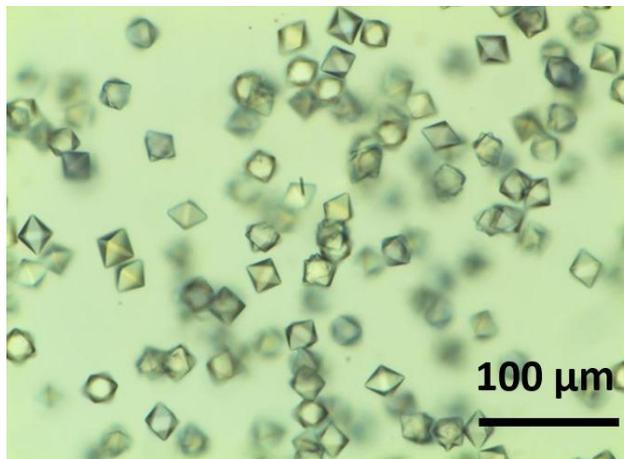
**Figura 4.5:** soluzione con 0.05 % di gel di agarosio.



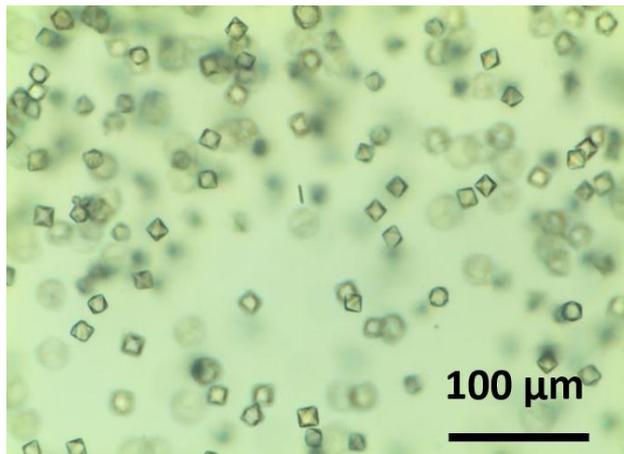
**Figura 4.6:** soluzione con 0.1 % di agarosio.



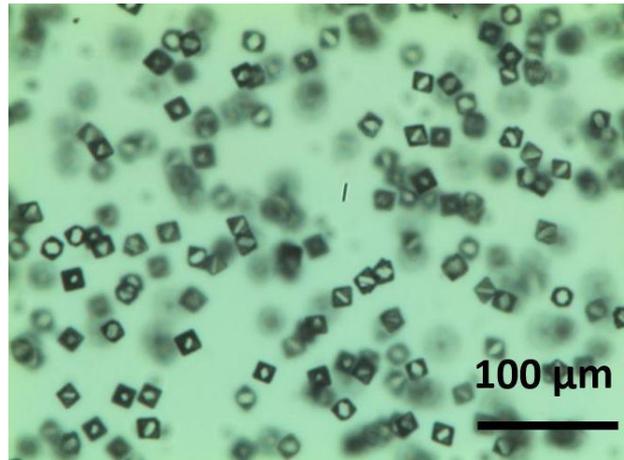
**Figura 4.7:** soluzione con 0.5 % di gel di agarosio.



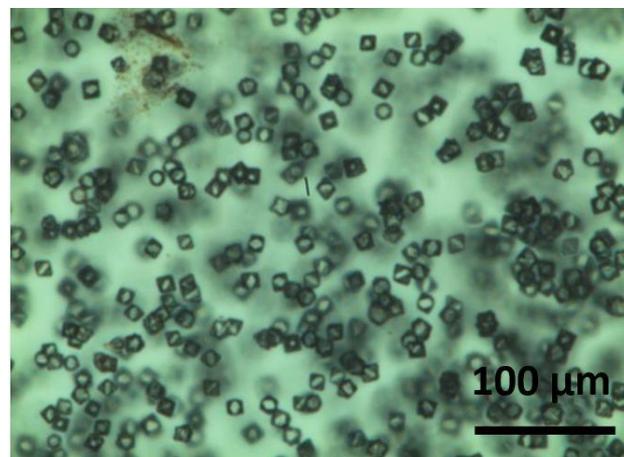
**Figura 4.8:** soluzione con 0.9 % di gel di agarosio.



**Figura 4.9:** soluzione con 1.3 % di gel di agarosio.



**Figura 4.10:** soluzione con 1.7 % di gel agarosio.



**Figura 4.11:** soluzione con 1.9 % di gel di agarosio.

Avendo a disposizione una serie di queste immagini, si è scelto di utilizzare il software ‘Imagej’, un software di analisi delle immagini che permette di analizzarle e processarle. Per ogni percentuale di gel si sono analizzate in media 15 immagini, diverse per avere una visione completa dell’azione del gel di agarosio e una buona statistica. In totale si sono analizzati circa 50 cristalli.

#### 4.4.2 Rappresentazione grafica delle misure effettuate

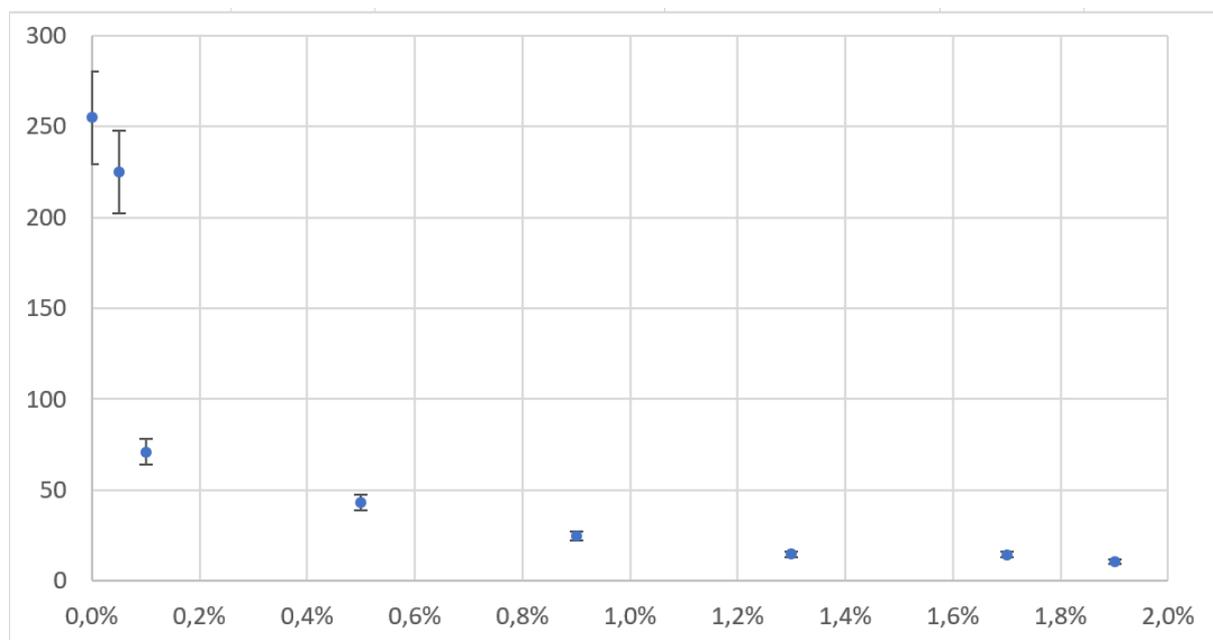
Dopo aver calcolato, per ogni percentuale, tutte le dimensioni dei cristalli a disposizione, si è passato a calcolare la dimensione media dei cristalli per avere una visione omogenea e completa dell’andamento. In Tabella 4.2 sono riportati i valori delle dimensioni, in micrometri.

**Tabella 4.2:** Dimensioni medie dei cristalli per ogni percentuale di gel di agarosio.

Percentuale di gel, %	Dimensione media, μm
0	255
0,05	225

0,1	71,2
0,5	43,4
0,9	24,5
1,3	14,7
1,7	14,5
1,9	10,7

In Figura 4.12 è rappresentato il grafico che mostra l'andamento delle dimensioni in funzione della percentuale di gel. In esso è contenuta anche la barra di errore riferita alla deviazione standard. Come si può notare, per le alte percentuali di gel i dati sono migliori in termini di dispersione statistica, come mostrato dal progressivo ridursi delle barre di errore. Questo può essere ricondotto sia alla maggiore quantità di cristalli analizzati per le alte percentuali di gel di agarosio, sia al fatto che esse erano più nitide, quindi l'errore dovuto alla misurazione è notevolmente ridotto. Come si può notare dal grafico, la relazione tra percentuale di gel e dimensioni dei cristalli non è lineare, ma si ha un andamento monotono decrescente. Questo andamento riflette l'azione del gel di agarosio sulla nucleazione: aumentando infatti la concentrazione, la dimensione dei cristalli diminuisce, indice del fatto che aumenta il numero di cristalli contenuti in quello specifico volume, a parità di concentrazione di proteina. Si è dimostrato nel caso specifico come l'agarosio favorisca la nucleazione in termini di numero di nuclei, e quindi di cristalli formati.



**Figura 4.12:** Andamento delle dimensioni media in funzione della percentuale di gel. Le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard.

#### 4.4.3 Meccanismo di interazione tra gel di agarosio e proteina

La cristallizzazione di proteine ha la particolarità di richiedere la presenza degli agenti precipitanti, come sali e polimeri, per ridurre la solubilità della proteina e indurre l'aggregazione delle macromolecole sottoforma di cristalli. I precipitanti possono avere la funzione di schermi di carica oppure possono andare a sostituirsi alle molecole di acqua presenti per far sì che le proteine aggregino.

L'uso del gel di agarosio nel processo è un vantaggio per via dell'interazione di esso con l'agente precipitante. L'interazione è di tipo fisico e avviene tra le molecole di proteina e le fibre di gel. L'agarosio ha una struttura a doppia catena elicoidale e ha la capacità di trattenere all'interno della propria struttura molte molecole di acqua. Per via della riduzione dell'attività dell'acqua, la concentrazione nominale di sale e proteina all'interno del volume di acqua libera è quindi molto più alta di quella che si avrebbe in una soluzione priva di gel. Quindi, aumentando la concentrazione di gel all'interno della soluzione, aumenta la quantità di acqua trattenuta dalle fibre, e quindi il grado di sovrasaturazione. Di conseguenza è stato possibile indurre la nucleazione della proteinasi K sfruttando le proprietà del gel di agarosio. In particolar modo, all'aumentare della concentrazione di agarosio, si è visto che il numero di cristalli ottenuto è aumentato. Viceversa, la dimensione media dei cristalli ha subito un trend decrescente fino a stabilizzarsi attorno a 10  $\mu\text{m}$ . La causa di ciò è il fatto che la capacità del gel di indurre la nucleazione viene saturata oltre certe concentrazioni, quindi questo giustifica il fatto che la dimensione dei cristalli si arresta ad un plateau. Questo è il motivo per il quale si usa il gel di agarosio, perché non solo si induce il fenomeno di nucleazione in termini di tempo, ma anche in termini di quantità di cristalli. L'altra importantissima proprietà del gel di agarosio è che non presenta interazioni di tipo chimico con le molecole, che possono andare a modificare strutture e proprietà delle proteine.

In questo capitolo, attraverso l'analisi dei dati sperimentali, si è cercato di dimostrare i motivi per i quali l'uso del gel nella cristallizzazione è vantaggioso. Inoltre, senza cambiare la concentrazione di proteina o sale ma instaurando un gradiente di agarosio è possibile fare uno screening della cristallizzazione. Ottenere dei cristalli con uguali dimensioni in assenza di gel non è semplice, per cui l'uso del gel di agarosio assicura anche un controllo dimensionale.



## 5. Conclusioni

Il lavoro si presenta come uno studio sperimentale e modellistico del processo di cristallizzazione di farmaci e biofarmaci, il cui obiettivo è quello di descrivere e presentare sistemi ingegnerizzati che possano influenzare il processo e ricavare un modello matematico che ne descriva la cinetica. Il lavoro di tesi è diviso in due parti principali. La prima parte è stata dedicata alla formulazione matematica e convalida di un modello matematico per descrivere la cinetica di nucleazione di farmaci all'interno di pori. La seconda parte è stata rivolta all'analisi di dati sperimentali per caratterizzare l'impatto di una matrice gel sulle dimensioni di cristalli di proteine ottenuti in batch.

Per quanto riguarda la prima parte, il primo step è stato quello di identificare una serie di ipotesi semplificative per ricavare una cinetica che descrivesse in modo semplice ma accurato il fenomeno della nucleazione. Si è scelto quindi come punto di riferimento la teoria classica della nucleazione CNT. Il lavoro è stato svolto per gradi, al fine di ricavare delle equazioni che descrivessero la cinetica di nucleazione considerando casi via via più complessi. Si è infatti partiti considerando la nucleazione omogenea, il caso più semplice, per poi passare ad analizzare la nucleazione eterogenea su superfici piane. Infine, si è considerato il caso più complesso, ossia la nucleazione eterogenea all'interno di pori dotati di una precisa geometria. Data la complessità del fenomeno, si è scelto di approssimare la nucleazione a partire dall'angolo del poro con l'intersezione di un cluster sferico, che rappresenta il nucleo, e di un parallelepipedo avente la stessa geometria del poro. Questa rappresentazione ha permesso di condurre uno studio sulle diverse posizioni del cluster all'interno del poro in funzione dell'angolo di contatto.

Il modello matematico ricavato consiste in un insieme di equazioni che descrivono i vari contributi energetici necessari per far avvenire il processo e l'identificazione di termini pre-esponenziali, per ricavare un'equazione che descriva la velocità di nucleazione in funzione di grandezze riferite al sistema in esame. Attraverso l'applicazione di queste equazioni a un caso di studio, si è riusciti a dimostrare che il modello ricavato è capace di predire in modo piuttosto accurato il fenomeno della nucleazione di aspirina all'interno di pori. Tale convalida è stata ottenuta minimizzando l'errore tra i dati cinetici sperimentali e i valori previsti dal modello, agendo su opportuni coefficienti di fitting. Inoltre, si è riusciti a predire l'andamento di tempo di induzione alla nucleazione medio e velocità di nucleazione per nucleazione omogenea, nucleazione eterogenea su superfici e all'interno di pori di diversa geometria.

L'applicazione del modello al caso di studio dell'aspirina ha avuto esito positivo in quanto con un modello semplice si è riusciti a descrivere in modo piuttosto accurato un set di dati sperimentali. Per quanto riguarda le prospettive future, si potrebbero rivedere alcune delle ipotesi semplificative per cercare di ottenere un modello cinetico più sofisticato. Inoltre, il modello potrebbe essere utilizzato per studiare altre configurazioni della nucleazione eterogenea all'interno di pori, al fine di verificare la sua adeguatezza nel descrivere il fenomeno. Tra queste, il modello potrebbe essere applicato allo studio della nucleazione di aspirina in pori aventi diametro diverso ma medesimo angolo, oppure su superfici aventi una diversa chimica esposta e quindi un diverso angolo di contatto tra aspirina e superficie.

In questo lavoro si è deciso di presentare inoltre una tecnica innovativa per il processo di cristallizzazione. Attraverso l'analisi di dati storici riguardanti la nucleazione di una proteina modello indotta dalla presenza di gel di agarosio, si è dimostrato che l'incremento della concentrazione di gel di agarosio nel sistema provoca un incremento del numero di cristalli, e quindi induce il fenomeno di nucleazione. L'utilizzo di tale composto presenta numerosi vantaggi, per cui, si potrà pensare ad un possibile approfondimento del relativo processo di cristallizzazione. Il gel di agarosio potrebbe essere utilizzato, ad esempio, in combinazione con delle superfici recanti pori, per ottenere un aumento sostanziale della velocità del processo.

In conclusione, la cristallizzazione in ambito farmaceutico ha un impatto importante nella produzione di farmaci in quanto permette di conferire ai composti le proprietà fisiche ottimali sia per le fasi di sintesi del principio attivo che per il processo di produzione del prodotto farmaceutico finito contenente il principio attivo.

## Lista dei simboli

$a$	coefficiente di attività
$A$	fattore pre-esponenziale
$a$	monomero
$A_1$	area di contatto cluster-poro
$A_2$	area di contatto cluster-poro
$A_3$	area di contatto cluster-poro
$A_{SL}$	area superficie laterale cluster inserito nel poro
$A_{SP}$	area di contatto cluster-poro
$b$	vettore di Burger
$C$	concentrazione
$C^*$	solubilità
$C_{cr}$	concentrazione critica
$D$	coefficiente di diffusione
$d_p$	diametro poro
$E_d$	energia di dislocazione
$G$	energia libera di Gibbs
$G_{cr}$	energia libera critica
$G_{et}$	energia libera eterogenea
$G_m$	modulo elastico a taglio
$G_{om}$	energia libera omogenea
$G_s$	energia libera di superficie
$g_s$	energia libera specifica di superficie
$g_v$	energia libera specifica di volume
$G_v$	energia libera di volume
$J$	velocità di nucleazione
$J_{et}$	velocità di nucleazione eterogenea
$J_{om}$	velocità di nucleazione omogenea
$J^{OP}$	velocità di nucleazione al di fuori del poro

$J^p$	velocità di nucleazione dentro il poro
$K_B$	costante di Boltzmann
$L$	lunghezza massima della superficie del cluster a contatto con il poro
$n$	numero di molecole in soluzione
$n_{cr}$	numero di molecole in soluzione critico
$r$	raggio del cluster
$r_c$	dimensione critica
$S$	sovrasaturazione
$S$	superficie
$S_{SL}$	coefficiente di spandimento
$T$	temperatura
$T_{gel}$	temperatura di gelificazione
$V$	volume
$Z$	fattore di Zeldovich
$Z^{et}$	fattore di Zeldovich eterogeneo
$\beta$	angolo di base del poro
$\gamma$	tensione superficiale
$\gamma_{CS}$	tensione interfacciale cluster-solido
$\gamma_{LC}$	tensione interfacciale liquido-cluster
$\gamma_{LP}$	tensione interfacciale liquido-poro
$\gamma_{SL}$	tensione interfacciale solido-liquido
$\gamma_{SP}$	tensione interfacciale superficie cluster-poro
$\theta$	angolo di contatto
$\mu_\alpha$	potenziale chimico fase solida
$\mu_\beta$	potenziale chimico fase liquida
$v$	velocità di attaccamento dei monomeri al nucleo
$v$	volume molecolare
$\rho^{et}$	fattore di proporzionalità legato alla densità di siti di nucleazione eterogenea
$\sigma$	sovrasaturazione relativa
$\tau$	tempo medio di nucleazione

$\tau_{model}$  tempo medio di nucleazione stimato dal modello matematico

$\omega$  velocità di attacco dei monomeri al nucleo

$\omega_{cr}$  velocità di attacco critica

## Abbreviazioni

ASA	acido 2-(acetilossi) benzoico
CNT	teoria classica della nucleazione
EtOH	etanolo
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVA	alcol polivinilico

## Bibliografia

- [1] Myerson A., Erdemir D., Lee A., 2019. Handbook of Industrial Crystallization. Cambridge University Press, Cambridge, USA.
- [2] Thakore, S. D., Sood, A., & Bansal, A. K. (2020). Emerging role of primary heterogeneous nucleation in pharmaceutical crystallization. *Drug development research*, 81(1), 3–22.
- [3] Mullin J. W., 2001. Crystallization. 4th edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.
- [4] Dessau, M. A., & Modis, Y. (2011). Protein crystallization for X-ray crystallography. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (47), 2285.
- [5] Santos O. M. M., Reis M. E. D., Jacon J. T., Lino M. E. de Sousa, Simões J. S., Doriguetto A. C., 2014. Polymorphism: an evaluation of the potential risk to the quality of drug products from the Farmácia Popular Rede Própria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(1), 1-24
- [6] Ulrich J., Froberg P., 2013. Problems, potentials and future of industrial crystallization. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 7(1), 1-8.
- [7] Gao Z., Rohani S., Gong J., Wang J., 2017. Recent developments in the crystallization process: toward the pharmaceutical industry. *Engineering*, 3(3), 343-353.
- [8] Banerjee, M., & Brettmann, B. (2020). Combining Surface Templating and Confinement for Controlling Pharmaceutical Crystallization. *Pharmaceutics*, 12(10), 995.
- [9] Prof. Dr. Arne. E. Nielsen, (1969). Nucleation and Growth of Crystals at High Supersaturation, 4(1), 17-38.
- [10] Espinosa, J. R., Vega, C., Valeriani, C., Frenkel, D., & Sanz, E., (2019). Heterogeneous versus homogeneous crystal nucleation of hard spheres. *Soft matter*, 15(47), 9625–9631.
- [11] Jun, Y. S., Kim, D., & Neil, C. W. (2016). Heterogeneous Nucleation and Growth of Nanoparticles at Environmental Interfaces. *Accounts of chemical research*, 49(9), 1681–1690.
- [12] Jreidini, P., Kocher, G., & Provatas, N. (2018). Classical nucleation theory in the phase-field crystal model. *Physical review. E*, 97(4-1), 042802.
- [13] Erdemir, D., Lee, A. Y., & Myerson, A. S. (2009). Nucleation of crystals from solution: classical and two-step models. *Accounts of chemical research*, 42(5), 621–629.
- [14] Artusio F., Pisano R., 2018. Surface-induced crystallization of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1), 190-208.
- [15] Vekilov, P. G., 2004. Dense liquid precursor for the nucleation of ordered solid phases from solution. *Crystal Growth & Design*, 4(4), 671-685.

- [16] Diao Y., Harada T., Myerson A.S., Alan Hatton T., Trout B.L., 2011. The role of nanopore shape in surface-induced crystallization. *Nature Materials*, 10(11), 867–871.
- [17] Diao, Y., Myerson, A. S., Hatton, T. A., & Trout, B. L. (2011). Surface design for controlled crystallization: the role of surface chemistry and nanoscale pores in heterogeneous nucleation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 27(9), 5324–5334.
- [18] Giegé R. (2013). A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *The FEBS journal*, 280(24), 6456–6497.
- [19] McPherson A. (2017). Protein Crystallization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1607, 17–50.
- [20] Wu, W., & Nancollas, G. H. (1999). Determination of interfacial tension from crystallization and dissolution data: a comparison with other methods. *Advances in colloid and interface science*, 79(2-3), 229–279.
- [21] Butt H.J., Graf K., Kappl M., 2003. *Physics and Chemistry of Interfaces*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- [22] Myers D., 1991. *Surfaces, interfaces, and colloids: principles and applications*. VCH Publishers, New York, USA.
- [23] Vilimali López-Mejías, Allan S. Myerson, and Bernhardt L. Trout, (2013), Geometric Design of Heterogeneous Nucleation Sites on Biocompatible surfaces, *Crystal Growth & Design*, 13, 3835-3841.
- [24] Filippov, A. V., Doroginikij, M. M., & Vartapetyan, R. (1998). Crystallization of poly(ethylene oxide) confined in pores of active carbon. *Magnetic resonance imaging*, 16(5-6), 631–633.
- [25] Nanev, C. N., Saridakis, E., & Chayen, N. E. (2017). Protein crystal nucleation in pores. *Scientific reports*, 7, 35821.
- [26] Page, A. J., & Sear, R. P. (2009). Crystallization controlled by the geometry of a surface. *Journal of the American Chemical Society*, 131(48), 17550–17551.
- [27] D W Oxtoby, 1992, Homogeneous nucleation:experiments and theory, *Journal of Physics:condensed matter*, 4 7627-7650.
- [28] Page, A. J., & Sear, R. P. (2006). Heterogeneous nucleation in and out of pores. *Physical review letters*, 97(6), 065701.
- [29] Thangswamy, M., Maheshwari, P., Dutta, D., Bera, A. K., Singh, M. N., Sinha, A. K., Yusuf, S. M., & Pujari, P. K. (2020). Evolution of confined ice nano structures at different levels of pore filling: a synchrotron based X-ray diffraction study. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 22(25), 14309–14317.
- [30] M. Huremovic, M. Srabovic, B. Ćatovic, E. Huseinovic, (2017). Crystallization and morphological characteristics of acetyl-salicylic acid (aspirin) synthesized from substrates of different source. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 7(1), 231-246.

- [31] L.Tan, R. M. Davis, Allan S. Myerson, B. L Trout, (2015). Control of Heterogeneous Nucleation via Rationally Designed Biocompatible Polymer Surfaces with Nanoscale Features. *Crystal Growth & Design*, 15,5, 2176-2186.
- [32] Heng, J. Y., Bismarck, A., Lee, A. F., Wilson, K., & Williams, D. R. (2007). Anisotropic surface chemistry of aspirin crystals. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(8), 2134–2144.
- [33] Voytas D. (2001). Agarose gel electrophoresis. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 2, Unit2.5A.
- [34] Diao, Y., Whaley, K. E., Helgeson, M. E., Woldeyes, M. A., Doyle, P. S., Myerson, A. S., Hatton, T. A., & Trout, B. L. (2012). Gel-induced selective crystallization of polymorphs. *Journal of the American Chemical Society*, 134(1), 673–684.
- [35] Wang, L., & Liu, X. Y. (2008). Kinetic analysis of protein crystal nucleation in gel matrix. *Biophysical journal*, 95(12), 5931–5940.
- [36] K. Tanabe, M. Hirose, R. Murai, S. Sugiyama, N. Shimizu *et al*, (2009), Promotion of Crystal Nucleation of protein by Semi-Solid Agarose gel, *Applied Physics Express*, 2 125501.
- [37] O. Vidal, M.C. Robert, F. Bouè, (1998), Gel growth of lysozyme crystals studied by small angle neutron scattering: case of agarose gel, a nucleation promotor, *Journal of Crystal Growth*, 192(1-2), 257-270.
- [38] Willaert, R., Zegers, I., Wyns, L., & Sleutel, M. (2005). Protein crystallization in hydrogel beads. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 61(Pt 9), 1280–1288.
- [39] Gavira, J. A., & García-Ruiz, J. M. (2002). Agarose as crystallisation media for proteins II: trapping of gel fibres into the crystals. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 58(Pt 10 Pt 1), 1653–1656.
- [40] Biertümpfel, C., Basquin, J., Suck, D., & Sauter, C. (2002). Crystallization of biological macromolecules using agarose gel. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 58(Pt 10 Pt 1), 1657–1659.
- [41] Lorber, B., Sauter, C., Robert, M. C., Capelle, B., & Giegé, R. (1999). Crystallization within agarose gel in microgravity improves the quality of thaumatin crystals. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 55(Pt 9), 1491–1494.



## Ringraziamenti

Il termine di questo lavoro rappresenta la fine di un grande capitolo della mia vita, pieno di sacrifici ma altrettanta convinzione che questa fosse la mia strada. In questo percorso sono stati tanti i momenti di difficoltà ma per fortuna accompagnati da momenti di gioia, che oggi guardo con immenso orgoglio. In tutto questo, desidero ringraziare me stessa per averci sempre creduto e tutte le persone che con la loro vicinanza, anche non fisica, mi hanno aiutata a raggiungere questo grande traguardo.

Voglio innanzitutto ringraziare tanto i miei relatori, il Professore Roberto Pisano per avermi dato la possibilità di svolgere questo lavoro ed aver creduto nelle mie capacità, nonostante le avverse condizioni del periodo che stiamo vivendo, e la Dottoressa Fiora Artusio per la grande disponibilità e la vicinanza dimostrata in questi mesi, per il supporto e per la professionalità nel seguirmi nella stesura di questo lavoro.

Ai miei genitori, per i loro sacrifici quotidiani, per il supporto e la vicinanza dimostratami a tanti chilometri di distanza. Grazie per aver creduto in me prima che io lo facessi, per avermi supportata fin dalla scelta del percorso di studi, per avermi rincuorata nei momenti difficili e aver gioito insieme a me nelle soddisfazioni avute. Senza di voi, non sarei la persona che sono adesso. Un grazie speciale va a mia sorella Katia e mio fratello Gianpaolo, per essere stati sempre presenti in tutte le mie scelte, per aver sopportato le mie infinite paure e per avermi riempita d'affetto come solo un fratello può fare.

Ringrazio di cuore Alessio, la persona che più di tutte è stata capace di capirmi e sostenermi in tutti i momenti. Grazie per le ore passate ad ascoltarmi prima di ogni esame, grazie per aver cercato in ogni istante la soluzione a tutti i miei problemi e avermi aiutata a credere di più in me stessa. Grazie per quello che sei e sarai, spero, sempre per me.

Alla mia immensa famiglia, zii, nonni, cugini, per avermi dimostrato che la distanza è solo un ostacolo fisico ed essere stati sempre pronti a far festa al mio ritorno. Grazie per avermi trasmesso i valori di famiglia in cui tutti crediamo. In qualunque momento della vita, porterò sempre tutto con me.

Ai miei colleghi di corso, Chiara, Giorgia, Martina e Giuseppe, per le ore interminabili passate insieme sui libri, per la forza che mi avete trasmesso e per essere diventati la mia famiglia torinese.

Per ultime, non per importanza, le mie amiche. Nominarvi tutte sarebbe impossibile, le amiche di sempre e le nuove arrivate. La fine di questo percorso è avvenuta anche grazie a voi, al vostro sostegno e ai vostri consigli. Ci siamo sostenute a vicenda nei nostri percorsi, e gioito insieme al traguardo finale.

Un caloroso grazie a tutti, vi voglio bene.

Margherita

23 Marzo 2021