

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

**Design, sintesi e caratterizzazione di
nuovi co-cristalli di API**



Relatore

Dr. Emmanuele Parisi

Correlatore

Prof.ssa Elena Simone

Candidato

Elisa Boggetti

Novembre 2023

Sommario

1. Introduzione	1
<i>1.1 Contesto applicativo.....</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Scopo e struttura della tesi.....</i>	<i>2</i>
2. Stato dell'arte	5
<i>2.1 Ingegneria dei cristalli.....</i>	<i>5</i>
2.1.1 Contesto storico	6
2.1.2 Difficoltà nell'ingegneria cristallina e sintoni supramolecolari	7
<i>2.2 Sali, solvati, idrati, polimorfi e co-cristalli.....</i>	<i>10</i>
<i>2.3 Co-cristalli</i>	<i>12</i>
2.3.1 Interazioni intermolecolari nei cristalli molecolari	13
2.3.2 Vantaggi dei co-cristalli	14
2.3.3 Metodi di preparazione di co-cristalli.....	15
<i>2.4 Co-cristalli di Quercetina</i>	<i>20</i>
<i>2.5 Scelta dei co-former</i>	<i>23</i>
<i>2.6 Co-former.....</i>	<i>26</i>
2.6.1 Imidazolo.....	26
2.6.2 Acido ferulico.....	27
2.6.3 Acido 4-amminobenzoico	28
<i>2.7 Caratterizzazione delle fasi cristalline.....</i>	<i>29</i>
2.7.1 Diffrazione dei raggi X su polveri (PXRD)	29
2.7.2 Spettroscopia Raman.....	31
2.7.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	33

2.7.4 Analisi termogravimetrica (TGA).....	34
2.8 Cristallo singolo e risoluzione struttura cristallina	35
3. Materiali e Metodi.....	37
3.1 Materiali.....	37
3.2 Scelta dei co-former.....	37
3.3 Determinazione delle curve di solubilità.....	39
3.4 Preparazione del campione <i>Que-Imi</i>	41
3.5 Preparazione del campione <i>Que-FA</i>	43
3.6 Preparazione del campione <i>Que-PABA</i>	44
3.7 Caratterizzazione delle fasi cristalline	45
3.7.1 Diffrazione dei raggi X su polveri (PXRD)	45
3.7.2 Spettroscopia Raman	45
3.7.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)	46
3.7.4 Analisi termogravimetrica (TGA).....	46
3.8 Crescita del cristallo singolo.....	47
3.8.1 Esperimenti di seminazione	47
3.8.2 Esperimenti attraverso cicli di temperatura	48
3.8.3 Esperimenti di raffreddamento veloce e lento	48
3.8.4 Esperimenti di evaporazione del solvente.....	49
3.9 Diffrazione dei raggi X da cristallo singolo (<i>SXRD</i>).....	50
4. Risultati e discussione	51
4.1 Curve di solubilità	51
4.2 Risultati prove di co-cristallizzazione di quercetina e imidazolo.....	53
4.3 Caratterizzazione del co-cristallo <i>Que-Imi</i>	57

4.3.1 Risultato della diffrazione dei raggi X su polvere	57
4.3.2 Risultato della spettroscopia Raman	58
4.3.3 Risultato per la calorimetria a scansione differenziale e l'analisi termogravimetrica.....	60
4.4 Curve di solubilità del co-cristallo <i>Que-Imi</i>	62
4.5 Esperimenti di cristallizzazione	65
4.5.1 Risultati per gli esperimenti di seminazione	65
4.5.2 Risultati per gli esperimenti attraverso cicli di temperatura.....	66
4.5.3 Risultati per gli esperimenti di raffreddamento veloce e lento.....	66
4.5.4 Risultati per gli esperimenti di evaporazione del solvente	71
4.6 Risultati per diffrattometria da cristallo singolo e risoluzione della struttura cristallina di <i>Que-Imi</i>	75
4.7 Risultati per le prove di co-cristallizzazione di <i>quercetina e acido ferulico</i>	78
5. Conclusioni	81
Bibliografia.....	83
Appendici.....	87

Lista delle abbreviazioni

API Principi attivi farmaceutici

CSD *Cambridge Structural Database*

DSC Calorimetria a scansione differenziale

EAFUS *Everything Added to Food in the United States*

EFSA Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare

EtOH Etanolo

FA Acido ferulico

FDA *Food and Drug Administration*

GRAS *Generally Regarded As Safe*

H₂O Acqua

Imi Imidazolo

IPA Isopropanolo

MeCN Acetonitrile

PABA Acido 4-amminobenzoico

PXRD Diffrazione dei raggi X su polveri

Que Quercetina

Que₂H₂O Quercetina diidrata

Que-Imi Co-cristallo quercetina-imidazolo

ssNMR Risonanza magnetica nucleare allo stato solido

SXRD Diffrazione dei raggi X su cristallo singolo

TGA Analisi termogravimetrica

MCHBP *Multi-component hydrogen bond propensity*

Indice delle figure

Figura 1. 1 - Flusso di lavoro seguito nello svolgimento della tesi	3
Figura 2. 1 - Rappresentazione di sintoni supramolecolari: (A) omosintone, dimero dell'acido carbossilico nell'acido cinnamico e (B) eterosintone, co-cristallo di acido cinnamico e teofillina con interazione acido-carbossilico-purina [12].....	9
Figura 2. 2 - Possibili forme solide in cui si può trovare un principio attivo farmaceutico (API) [18].....	11
Figura 2. 3 - Rappresentazione schematica del processo di co-cristallizzazione tra un API e un <i>co-former</i> [13]	13
Figura 2. 4 - Struttura chimica generica di un flavonoide [24]	20
Figura 2. 5 - Struttura chimica della quercetina. [22] In rosso evidenziati i gruppi donatori e accettori di legami a idrogeno	22
Figura 2. 6 - (A) Anello piridinico, struttura di base comune a nicotinamide e isonicotinamide e (B) Struttura della prolina. L'atomo di azoto presente in questi composti risulta essere un buon accettore di legami idrogeno e tende ad interagire con il gruppo fenolico dei flavonoidi	22
Figura 2. 7 - Le quattro diverse categorie di legami idrogeno valutate per ogni <i>co-former</i> nell'analisi MCHBP	24
Figura 2. 8 - Struttura chimica dell'imidazolo [30].....	26
Figura 2. 9 - Struttura chimica dell'acido ferulico [33]	27
Figura 2. 10 - Struttura chimica dell'acido 4-Amminobenzoico [35].....	28
Figura 2. 11 - Schema del modello di diffrazione dei raggi X [40].....	30
Figura 2. 12 - Diagramma di Jablonski, rappresentazione delle transizioni energetiche per lo <i>scattering</i> Rayleigh e Raman [44]	33
Figura 3. 1 - Risultati dell'analisi MCHBP. I <i>co-former</i> sono rappresentati da rombi e il colore dello sfondo è indicativo della probabile formazione del co-cristallo con	

Indice delle figure

quercetina. Sono cerchiati i <i>co-former</i> impiegati negli esperimenti di co-cristallizzazione.	38
Figura 4. 1 - Grafico di van't Hoff per Quercetina diidrata in isopropanolo, dove x rappresenta la frazione molare della quercetina diidrata.....	51
Figura 4. 2 - Grafico di van't Hoff per Quercetina diidrata in etanolo, dove x rappresenta la frazione molare della quercetina diidrata	52
Figura 4. 3 - Immagine al microscopio ottico del co-cristallo Que-Imi 2:1 ottenuto tramite co-cristallizzazione per mescolamento in MeCN.....	53
Figura 4. 4 - Confronti PXRD del campione Que-Imi ottenuto per miscelamento dei reagenti puri in acqua in rapporto stechiometrico 1:1, della quercetina diidrata pura e dell'imidazolo puro	54
Figura 4. 5 - Confronti PXRD del campione Que-Imi ottenuto tramite macinazione a secco dei reagenti puri in rapporto stechiometrico 1:1, dell'imidazolo puro e della quercetina diidrata pura.....	55
Figura 4. 6 - Confronti PXRD del co-cristallo Que-Imi 2:1, dell'imidazolo puro e della quercetina diidrata pura.....	58
Figura 4. 7 - Confronti Spettri Raman del co-cristallo Que-Imi 2:1, dell'imidazolo puro e della quercetina diidrata pura	59
Figura 4. 8 - Confronto tra diagrammi DSC di quercetina diidrata, imidazolo e co-cristallo Que-Imi.....	60
Figura 4. 9 - Confronto tra analisi DSC e TGA del co-cristallo Que-Imi.....	61
Figura 4. 10 - Grafico di van't Hoff per il co-cristallo Que-Imi in isopropanolo, dove x rappresenta la frazione molare del co-cristallo.....	63
Figura 4. 11 - Grafico di van't Hoff per il co-cristallo Que-Imi in etanolo, dove x rappresenta la frazione molare del co-cristallo.....	63
Figura 4. 12 - Grafico di van't Hoff per quercetina diidrata, imidazolo e co-cristallo Que-Imi per il confronto in isopropanolo, dove x rappresenta la frazione molare	64

Figura 4. 13 - Grafico di van't Hoff per quercetina diidrata, imidazolo e co-cristallo Que-Imi per il confronto in etanolo, dove x rappresenta la frazione molare	64
Figura 4. 14 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di seminazione.....	65
Figura 4. 15 - Esperimento di raffreddamento veloce in IPA.....	67
Figura 4. 16 - Esperimento di raffreddamento lento in IPA	67
Figura 4. 17 -Esperimento di raffreddamento veloce in IPA.....	68
Figura 4. 18 -Esperimento di raffreddamento lento in IPA	68
Figura 4. 19 - Esperimento di raffreddamento veloce in EtOH.....	69
Figura 4. 20 - Esperimento di raffreddamento lento in EtOH	70
Figura 4. 21 - Esperimento di raffreddamento veloce in EtOH.....	70
Figura 4. 22 - Esperimento di raffreddamento lento in EtOH	71
Figura 4. 23 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di cristallizzazione in cloroformio.....	72
Figura 4. 24 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di cristallizzazione in acetonitrile.....	73
Figura 4. 25 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di cristallizzazione in metanolo	73
Figura 4. 26 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di cristallizzazione in isopropanolo.....	74
Figura 4. 27 - Cristallo di Que-Imi montato su capillare di vetro per analisi SXRD	75
Figura 4. 28 - Struttura molecolare a raggi X del co-cristallo Que-Imi rappresentato in ORTEP.....	76
Figura 4. 29 - Impacchettamento cristallino del co-cristallo Que-Imi. Vista lungo l'asse c. Legami ad idrogeno identificati con linee tratteggiate nere. Le molecole sono colorate per equivalenza simmetrica.	77

Indice delle figure

Figura 4. 30 - Impacchettamento cristallino del co-cristallo Que-Imi. Vista lungo l'asse a. Distanza di stacking indicata con linee tratteggiate nere. Le molecole sono colorate per equivalenza simmetrica.	77
Figura 4. 31 - Confronto tra spettri Raman di quercetina diidrata, imidazolo e campione Que-FA in rapporto 1:1 in acetonitrile.....	78
Figura 4. 32 - Ingrandimento della regione compresa tra 1050 e 1700 cm^{-1} per gli spettri di quercetina diidrata e campione Que-FA in rapporto 1:1 in acetonitrile.....	79
Tabella 1 Appendice - Elenco di co-former e risultati dell'analisi di complementarità molecolare	89
Tabella 2 Appendice - Dati cristallografici	90

1. Introduzione

1.1 Contesto applicativo

La maggior parte delle molecole di interesse farmaceutico, agrochimico e nutraceutico presentano alcuni svantaggi legati principalmente alle loro proprietà farmacocinetiche e fisiologiche, quali solubilità, dissoluzione, igroscopicità, permeabilità membranale, stabilità chimica e resistenza meccanica. Oggigiorno, un approccio ampiamente diffuso, che mira a migliorarne le proprietà chimico-fisiche è sicuramente l'ingegneria dei cristalli.

L'ingegneria dei cristalli è una disciplina della chimica supramolecolare che ha lo scopo di studiare il *design* e la sintesi di strutture allo stato solido con proprietà desiderate attraverso al controllo di interazioni intermolecolari che si instaurano tra molecole all'interno di strutture cristalline.

Cristalli multicomponenti come co-cristalli, sali, solvati e idrati sono di grande interesse nell'ingegneria dei cristalli grazie alla loro capacità di modificare le proprietà fisiche di principi attivi farmaceutici (API).

In particolare i co-cristalli farmaceutici presentano diversi benefici rispetto alle altre forme solide. Essi sono definibili come strutture cristalline composte da un principio attivo (API) e una o più molecole partner, da qui in poi nominate "*co-former*", generalmente selezionate dalla lista GRAS (*Generally Regarded As Safe*).

Co-former tratti da queste liste possono essere additivi alimentari, conservanti, eccipienti, vitamine, minerali, aminoacidi e biomolecole.

La sintesi di co-cristalli è una tecnologia che prevede l'utilizzo di due o più molecole neutre utilizzando interazioni intermolecolari come legami ad idrogeno, legami alogeno e legami π - π .

Ad oggi sono presenti già diversi co-cristalli sul mercato e altri risultano in fase di registrazione e sperimentazione clinica.

1.2 Scopo e struttura della tesi

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è stata la sintesi di nuovi co-cristalli di interesse nutraceutico.

In particolare si è scelto un flavonoide naturale, la quercetina, che presenta numerosi benefici terapeutici, come ad esempio attività antiossidante, anticancerogena e cardioprotettiva. Tuttavia, è stato dimostrato che a causa della sua bassa solubilità, questa venga scarsamente assorbita e che sia caratterizzata da una bassa biodisponibilità orale.

Uno dei metodi più efficienti che è utilizzato per migliorarne le proprietà chimico-fisiche è appunto la sintesi co-cristallina.

Il *design* razionale di co-cristalli è frequentemente basato sullo studio delle interazioni intermolecolari. Se molecole diverse sono capaci di assemblarsi utilizzando differenti e competitive interazioni, una strategia di *design* può essere effettuata tenendo conto della gerarchia delle possibili nuove interazioni che si formano a spesa delle vecchie. Infatti, una gerarchia di interazioni, per interazioni relativamente forti e specifiche, come ad esempio legame ad idrogeno e alogeno, si può definire attraverso ad un metodo di selezione virtuale in cui i *co-former* sono ideali per instaurare interazioni intermolecolari con la molecola target di quercetina ai fini di ottimizzare tempo e risorse.

A questo proposito si è dapprima effettuata un'analisi di complementarietà molecolare utilizzando una libreria di *co-former* contenente molecole che vengono utilizzate per la realizzazione di co-cristalli. Questa analisi, basata sulla valutazione di 5 descrittori molecolari che verranno esplicitati in seguito, ha permesso così di filtrare e rimuovere una lista di molecole non adatte per la formazione di co-cristalli con la quercetina. Invece, i *co-former* che sono stati valutati positivamente dalla prima analisi sono stati sottoposti ad una seconda selezione virtuale che si basa sull'applicazione del metodo MCHBP (*Multi-component hydrogen bond propensity*). Questo metodo determina la probabilità di interazione quantitativamente attraverso un processo automatizzato che tiene conto di diverse variabili, tra cui l'interazione di legame ad idrogeno.

Dalle analisi condotte, sono stati individuati sei possibili candidati che presentavano un potenziale promettente per la formazione di co-cristalli. Di questi, gli esperimenti si sono orientati su quelli non ancora descritti in letteratura, ovvero l'acido 4-amminobenzoico, l'acido ferulico e l'imidazolo.

Gli esperimenti di co-cristallizzazione sono stati effettuati per raffreddamento o mescolamento di soluzioni soppresature utilizzando diversi rapporti stechiometrici tra le molecole.

I metodi impiegati per verificare l'ottenimento di nuove fasi co-cristalline sono stati la diffrazione dei raggi X su polveri (PXRD), la spettroscopia Raman, la calorimetria a scansione differenziale (DSC) e l'analisi termogravimetrica (TGA).

Da queste analisi è emersa la formazione di un nuovo co-cristallo tra quercetina e imidazolo (Que-Imi) che è stato cresciuto tramite l'utilizzo di un reattore a temperatura, pressione e agitazione controllata e la struttura determinata tramite diffrattometria da cristallo singolo (SXR).

Nella **Figura 1. 1** è rappresentato il diagramma del flusso di lavoro seguito durante lo svolgimento di questa tesi.

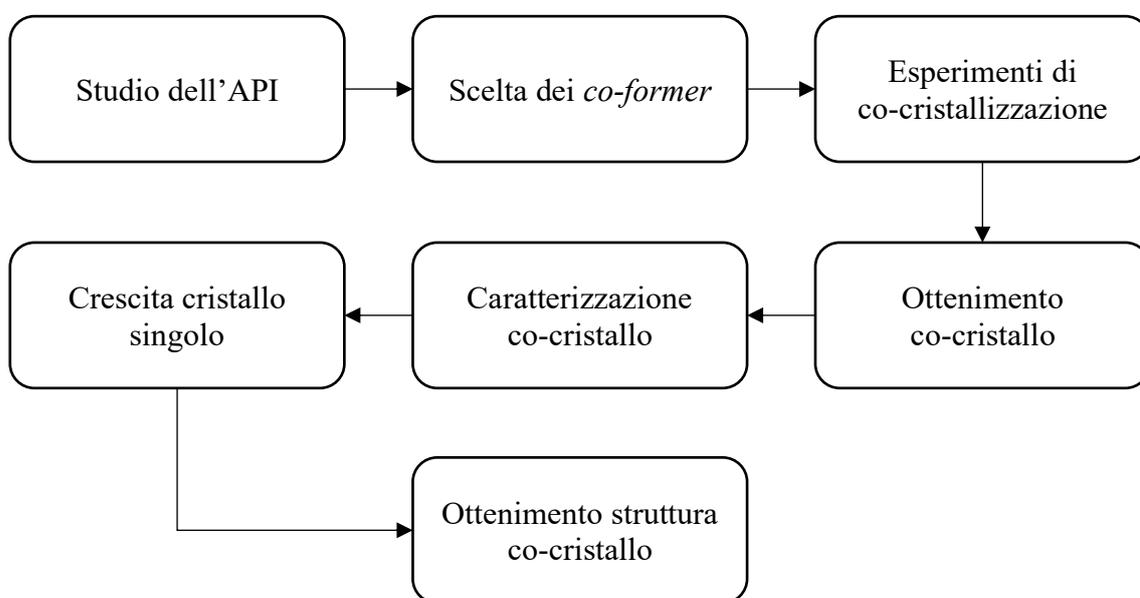


Figura 1. 1 - Flusso di lavoro seguito nello svolgimento della tesi

Capitolo 1. Introduzione

Questa tesi, oltre a questo capitolo introduttivo, si compone di altri 4 capitoli sintetizzati di seguito:

- Nel *Capitolo 2* viene fornita una panoramica generale sui principali aspetti dell'ingegneria dei cristalli e dei co-cristalli farmaceutici, ponendo l'attenzione in particolare sul co-cristallo di quercetina. Questo capitolo include anche una breve descrizione del processo di progettazione di un co-cristallo e delle tecniche impiegate per la caratterizzazione delle forme cristalline.
- Nel *Capitolo 3* vengono illustrati i metodi adottati durante il lavoro sperimentale, i materiali impiegati e le specifiche delle apparecchiature utilizzate.
- Nel *Capitolo 4* vengono riportati i principali risultati degli esperimenti eseguiti.
- Nel *Capitolo 5* sono presenti le conclusioni e le prospettive future.

2. Stato dell'arte

2.1 Ingegneria dei cristalli

L'ingegneria dei cristalli è una branca della chimica supramolecolare che si focalizza sullo studio e *design* di solidi molecolari funzionali tramite la comprensione delle interazioni intermolecolari all'interno della struttura cristallina, lo studio dell'impacchettamento cristallino ed infine le proprietà dei cristalli. [1]

Le interazioni tra molecole sono analizzate in termini di legami ad idrogeno ed altre interazioni di tipo secondario che rappresentano gli elementi costitutivi di una struttura cristallina.

Il principale obiettivo è quello di riconoscere interazioni intermolecolari abbastanza robuste per poter ottenere nuovi solidi con proprietà chimico-fisiche desiderate, come ad esempio solubilità, stabilità o particolari proprietà ottiche, magnetiche ed elettroniche.

Al giorno d'oggi, l'ingegneria dei cristalli trova applicazione in diversi campi [2] e principalmente in due importanti contesti: l'adsorbimento e lo stoccaggio di gas e i co-cristalli farmaceutici. [3]

Esempi di formulazioni farmaceutiche di co-cristalli approvate dalla FDA e commercializzate in diversi paesi includono il Lexapro® e l'Entresto®.

Lexapro®, approvato nel 2009, è un co-cristallo farmaceutico di escitalopram ossalato con acido ossalico utilizzato per il trattamento della depressione e dei disturbi d'ansia generalizzati. Entresto®, approvato nel 2015 e utilizzato per il trattamento dell'insufficienza cardiaca cronica, è una forma co-cristallina di sacubitril e valsartan. [4], [5]

Una crescente applicazione dell'ingegneria dei cristalli riguarda sicuramente la crescita di cristalli singoli di dimensioni adeguate all'utilizzo in settori come l'ottica e l'elettronica, compresi quelli di materiali puramente inorganici. Settori più recenti di impiego dell'ingegneria dei cristalli comprendono lo studio di proprietà meccaniche, la sintesi in

massa, i biomateriali, la catalisi e i dispositivi elettronici per la conversione dell'energia solare. [3]

2.1.1 Contesto storico

W. H. Bragg, fisico, chimico e cristallografo britannico, per la prima volta nel 1921 correlò la chimica e la cristallografia, quando riconobbe somiglianze tra le strutture cristalline del naftalene e dell'antracene.[2]

L'ingegneria cristallina è emersa e si è evoluta negli ultimi 60 anni come risultato naturale dell'interazione tra cristallografia e chimica. Mentre la chimica si occupa delle molecole, la cristallografia riguarda i cristalli, che rappresentano estese e ordinate aggregazioni di molecole. L'interazione tra chimica e cristallografia costituisce l'influenza tra la struttura e le proprietà delle molecole, da un lato, e quelle delle aggregazioni estese di molecole, dall'altro.

Questa fu una delle prime correlazioni tra una proprietà cristallina e una proprietà molecolare.

Nel contesto dell'ingegneria dei cristalli, la domanda cruciale è invertita: partendo dalla struttura molecolare di un composto, qual è la sua struttura cristallina?[1]

J. M. Robertson, all'Università di Glasgow, fu uno dei pionieri nel cercare di rispondere a questa domanda, tra gli anni '40 e '50, il quale si concentrò su un gruppo limitato di composti, gli idrocarburi aromatici polinucleari.[2] Robertson classificò questi composti in due gruppi: il primo costituito da molecole, ricche di idrogeno come naftalene e antracene, la cui area molecolare è piccola rispetto allo spessore molecolare, il secondo costituito da molecole, ricche di carbonio come il coronene, la cui area molecolare è grande rispetto allo spessore molecolare. Robertson fu in grado di correlare con successo una proprietà cristallina a una proprietà molecolare. [1]

Fu Pepinskij ad introdurre per la prima volta il termine "*crystal engineering*" nel 1955 al convegno dell'American Physical Society a Città del Messico in un abstract intitolato '*Crystal Engineering: A New Concept in Crystallography*'. [6]

Successivamente, tra gli anni '60 e '70, questa idea fu elaborata da Schimdt concentrandosi sull'ingegneria di strutture cristalline per la fotodimerizzazione degli acidi cinnamici.

Nel 1989, Desiraju generalizzò la definizione di ingegneria dei cristalli, definendolo come *“la comprensione delle interazioni intermolecolari nel contesto dell'impaccamento dei cristalli e l'utilizzo di tale comprensione nella progettazione di nuovi solidi con le proprietà fisiche e chimiche desiderate”*. [7]

Attualmente l'ingegneria dei cristalli è un'attività di ricerca che trova un vasto campo di applicazioni e riviste come *CrystEngComm* e *Crystal Growth & Design* ne documentano i continui progressi.

Tra gli ambiti di ricerca si trovano lo sviluppo di solidi farmaceutici e polimeri supramolecolari, la cattura dell'anidride carbonica, lo stoccaggio di gas e la catalisi.[8]

2.1.2 Difficoltà nell'ingegneria cristallina e sintoni supramolecolari

Un problema centrale nell'ingegneria cristallina è la difficoltà nel prevedere le strutture cristalline in base alle strutture molecolari, specialmente usando un approccio modulare come per i gruppi funzionali. Il modo in cui un gruppo funzionale si comporta durante la cristallizzazione è influenzato dalla natura e dalla disposizione di tutti gli altri gruppi funzionali nella molecola e dalla conformazione della molecola stessa. [1]

Pertanto, le strutture cristalline non sono correlate alle strutture molecolari (gruppi funzionali) in modo semplice.

Un'altra sfida rilevante riguarda la progressiva formazione del cristallo, che avviene attraverso le seguenti fasi distinte:

Uno → Pochi → Molti → Nucleo → Cristallo

Questo processo è chiamato Aufbau e può non essere necessariamente continuo e lineare. Infatti un cluster creato dall'assemblaggio di alcune molecole potrebbe aggregarsi ad un altro cluster e portare alla formazione di un primo cristallo grazie al processo noto come nucleazione, oppure potrebbe non essere in grado di crescere ulteriormente. Ad ogni

modo, ancora oggi studi sul processo di pre-nucleazione e nucleazione stessa rappresentano delle sfide nella crescita cristallina.[9], [10]

La cristallografia a raggi X fornisce informazioni sulla struttura cristallina finale di una molecola. Al momento, si possono avere indicazioni solo sulla struttura della molecola iniziale e su quella del cristallo finale, quindi rimangono sconosciute le strutture delle specie durante le fasi intermedie di aggregazione.[2]

Queste principali difficoltà nell'ingegneria cristallina, ovvero il fallimento dell'approccio basato sui gruppi funzionali e la complessità dell'interazione tra cinetica e termodinamica durante la nucleazione, rappresentano una problematicità nel prevedere le strutture cristalline a partire dalle strutture molecolari. Per semplificare questo processo, sono stati introdotti i "sintoni supramolecolari", rappresentativi di unità strutturali all'interno delle supermolecole.[1]

Lehn ha affermato che analogamente a come una molecola è formata da atomi legati tramite legami covalenti, una supermolecola è costruita collegando le molecole con interazioni intermolecolari.[11]

I sintoni supramolecolari vengono definiti come *“unità strutturali all'interno di supermolecole che possono essere formate e/o assemblate mediante operazioni sintetiche note o concepibili che coinvolgono interazioni intermolecolari”*. [8]

È importante cercare di identificare se molecole simili conducono a impacchettamenti cristallini simili. Infatti se una similitudine tra molecole porta anche a una similitudine di impacchettamento sotto forma di sintoni supramolecolari simili, ci si aspetta che l'uso di altre molecole simili conduca a strutture cristalline prevedibili e realisticamente ottenibili. [2]

Grazie all'introduzione del sintone, che rappresenta l'elemento essenziale tramite il quale l'informazione strutturale si trasmette dalla molecola alla struttura cristallina, viene agevolata la progettazione e la conseguente realizzazione della struttura del cristallo.

Si possono distinguere i sintoni supramolecolari in due categorie: gli omosintoni, caratterizzati dalle interazioni tra gruppi funzionali simili, e gli eterosintoni, caratterizzati dalle interazioni tra gruppi funzionali differenti.

Quest'ultimi sono particolarmente interessanti per la progettazione di co-cristalli multicomponenti, per ottenere diverse funzioni provenienti ciascuna molecola.[8]

La **Figura 2. 1** mostra la differenza tra omosintoni ed eterosintoni.

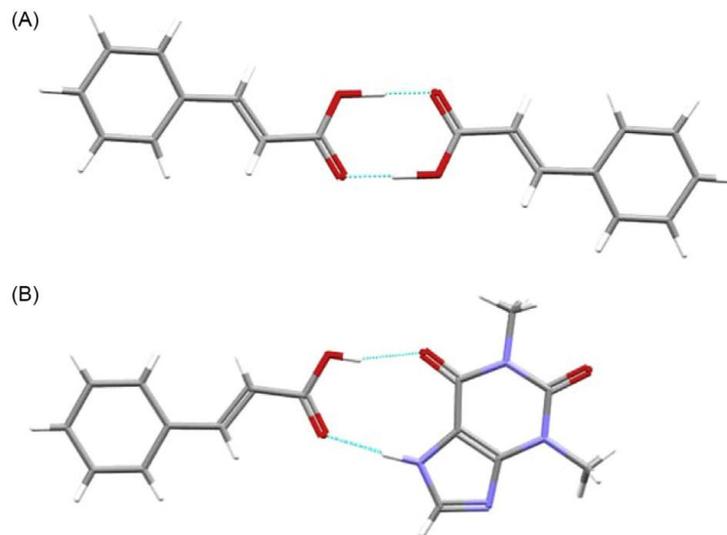


Figura 2. 1 - Rappresentazione di sintoni supramolecolari: (A) omosintone, dimero dell'acido carbossilico nell'acido cinnamico e (B) eterosintone, co-cristallo di acido cinnamico e teofillina con interazione acido-carbossilico-purina [12]

2.2 Sali, solvati, idrati, polimorfi e co-cristalli

La maggior parte delle molecole farmaceutiche presentano alcuni svantaggi legati principalmente alle loro proprietà farmacocinetiche e fisiologiche, quali solubilità, dissoluzione, igroscopicità, permeabilità della membrana, stabilità chimica, resistenza meccanica. [8], [13] Queste sono le principali ragioni per le quali meno dell'1% dei composti attivi farmaceutici (API) finisce sul mercato.[14]

Per questo motivo, chimici e ingegneri si stanno sempre più focalizzando sullo studio e sull'ottenimento di nuove forme cristalline di API.

I principi attivi di interesse farmaceutico possono trovarsi in diverse forme solide: polimorfiche, solvati, idrati, sali, co-cristalli e solidi amorfi (**Figura 2. 2**). Ciascuna di queste forme presenta proprietà fisico-chimiche uniche che hanno un impatto significativo sulla biodisponibilità, producibilità, purificazione, stabilità e altre caratteristiche prestazionali dei farmaci.[15]

La principale distinzione è quella tra struttura cristallina e struttura amorfa. Un solido cristallino presenta una struttura ordinata ed è generalmente la forma preferita, in quanto mostra una maggiore stabilità.

Come anticipato un API può presentarsi in diverse strutture cristalline, questo fenomeno è noto come polimorfismo. Le diverse varianti polimorfiche sono considerate lo stesso principio attivo, sebbene presentino proprietà fisiche distinte gli uni dagli altri a causa delle varie disposizioni del reticolo cristallino.[16]

Inoltre, gli API possono formare cristalli a più componenti come solvati/idrati, sali e co-cristalli.[17]

In base alla definizione della IUPAC, un sale è un composto chimico costituito da un insieme di cationi ed anioni. Risulta quindi che un sale farmaceutico è formato da un API ionizzabile e da un controione.

I solvati sono sistemi multicomponenti nel quale all'interno della struttura cristallina vengono incorporate molecole di solvente. Nel caso in cui il solvente sia acqua si adotta il termine 'idrato'. [17]

La distinzione chiave tra solvati e co-cristalli risiede nello stato fisico dei singoli componenti. Nei solvati almeno uno dei componenti è in stato liquido a temperatura ambiente, mentre nei co-cristalli entrambi i componenti si presentano allo stato solido a temperatura ambiente.[15]

La scelta della forma solida di un API è tutt'altro che semplice, in quanto dovrebbe essere selezionata quella che oltre a possedere una buona efficacia, presenti anche le migliori proprietà per il trattamento, la somministrazione e lo scale-up. [17]

A questo scopo storicamente la scelta è ricaduta sui sali. Grazie alla salificazione, infatti, è possibile migliorare la solubilità in acqua e la biodisponibilità di un prodotto API.

Recentemente l'attenzione si sta spostando sempre di più sui co-cristalli, a causa dei numerosi vantaggi che presentano. [18]

Tra questi, risiede la possibilità di scegliere un vasto numero di *co-former* per la realizzazione di co-cristalli rispetto ai sali, in quanto possono essere selezionate anche molecole non ionizzabili.[8]

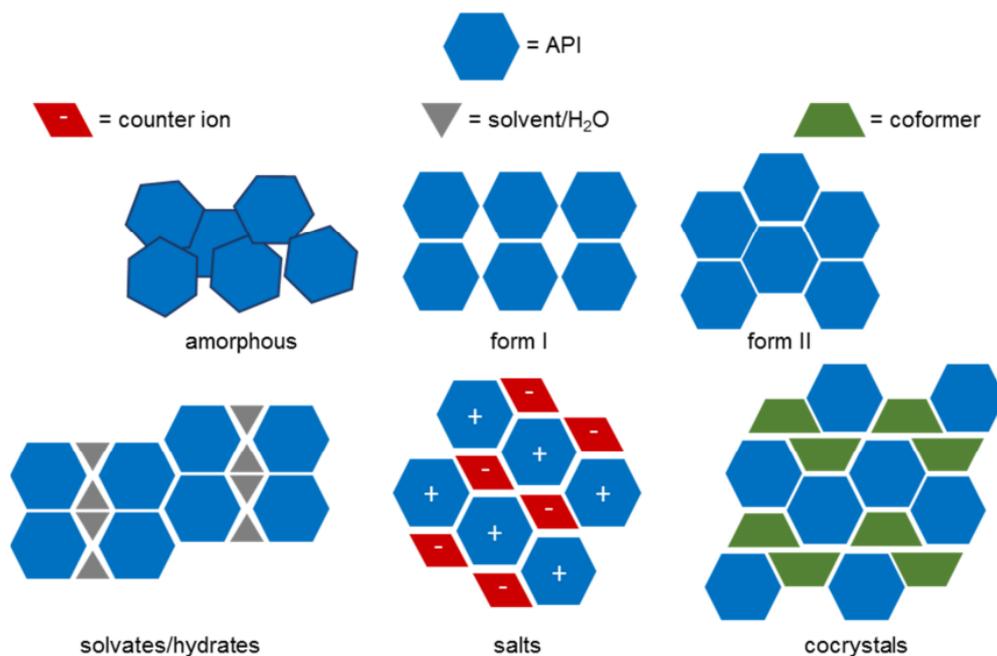


Figura 2. 2 - Possibili forme solide in cui si può trovare un principio attivo farmaceutico (API) [18]

2.3 Co-cristalli

La definizione di co-cristallo ha acceso un ampio dibattito tra gli scienziati.

Desiraju definisce il co-cristallo come *“un cristallo in cui due distinti componenti molecolari sono legati da legami idrogeno. In questi co-cristalli, i legami idrogeno del tipo A...B tra i componenti A e B sono più forti e specifici rispetto ai legami idrogeno del tipo A...A o B...B”*. [2]

Attualmente la definizione accettata all'unanimità dalla comunità dell'ingegneria cristallina è stata raggiunta durante il meeting Indo-americano nel 2011 e afferma che *“i co-cristalli sono solidi che sono materiali cristallini monofase composti da due o più differenti composti molecolari e/o ionici generalmente in una proporzione stechiometrica, che non sono né solvati né sali semplici”*. [3]

I co-cristalli farmaceutici costituiscono una categoria specifica all'interno dei co-cristalli con il componente principale rappresentato da un principio attivo farmaceutico (API), mentre il *co-former* utilizzato per creare il co-cristallo deve essere una sostanza GRAS (*Generally Regarded As Safe*) o un composto farmaceuticamente accettabile. [8]

I co-cristalli farmaceutici sono definibili come strutture cristalline multicomponente composte da un principio attivo (API) e uno o più *co-former*, anch'essi solidi a temperatura ambiente (**Figura 2. 3**). [15]

Un grande vantaggio dell'ingegneria cristallina in questo contesto risiede nel fatto di variare le proprietà fisico-chimiche di un farmaco attraverso alla scelta di uno specifico *co-former* sebbene la struttura del farmaco stesso rimanga invariata. [8]

I *co-former* vengono generalmente selezionati dalla lista GRAS compilata dalla *Food and Drug Administration* (FDA) degli Stati Uniti, che include più di 3000 sostanze e dall'elenco EAFUS (*Everything Added to Food in the United States*). *Co-former* tratti da queste liste possono essere additivi alimentari, conservanti, eccipienti, vitamine, minerali, aminoacidi, biomolecole e gli ingredienti attivi farmaceutici (API). [13], [19] Tra questi si trovano anche i nutraceutici.

Il termine "nutraceutico" è stato introdotto per la prima volta da Stephen Felice alla fine degli anni ottanta, e si riferisce a composti presenti negli alimenti o nei prodotti alimentari che possono potenzialmente aiutare nel trattamento o addirittura nella prevenzione delle malattie.

I nutraceutici si presentano anche come *co-former* promettenti grazie alla varietà di gruppi funzionali in grado di formare co-cristalli all'interno della loro struttura di base. La loro prontezza d'uso e i potenziali benefici medici li rendono particolarmente adatti per la co-cristallizzazione farmaceutica. [19]

La sintesi di co-cristalli è una tecnologia relativamente moderna per modulare le proprietà biofarmaceutiche dei farmaci, in particolare per affrontare i problemi di resistenza ai farmaci.[13]

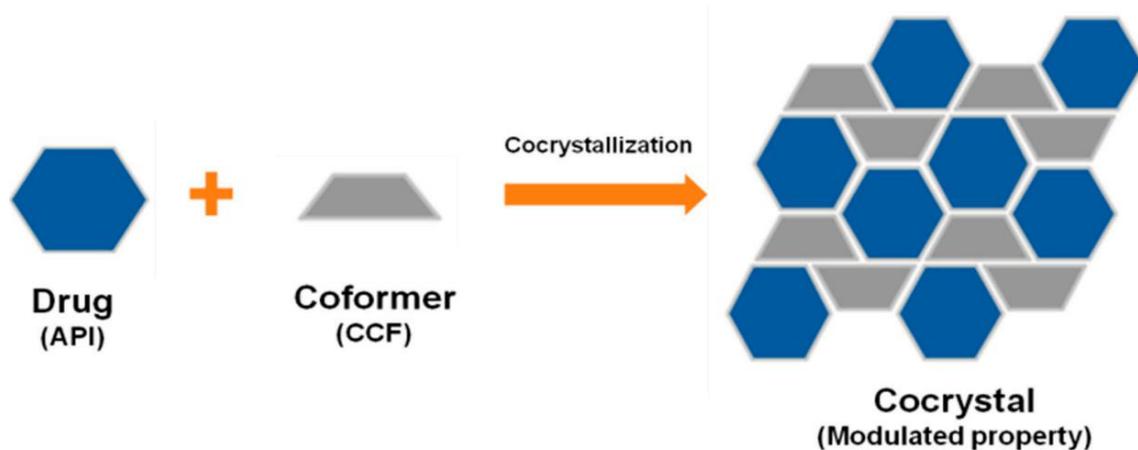


Figura 2. 3 - Rappresentazione schematica del processo di co-cristallizzazione tra un API e un *co-former* [13]

2.3.1 Interazioni intermolecolari nei cristalli molecolari

La formazione dei co-cristalli avviene tramite diverse interazioni, come il legame a idrogeno, l'impilamento $\pi \cdots \pi$ (pi-pi stacking), le forze di van der Waals e il legame alogeno. [3]

Il legame idrogeno è di particolare importanza perché è sia forte che direzionale, per questo è particolarmente efficace perché facilita la progettazione e l'assemblaggio prevedibile di strutture multimolecolari complesse.[8]

I legami ad idrogeno possono instaurarsi tra forti donatori e accettori, come O–H···O e N–H···O, o deboli accettori e donatori come C–H···O, C–H··· π e altre varianti che coinvolgono atomi metallici, accettori di atomi multipli e altri gruppi donatori e accettori di debole intensità. [2]

Questi legami idrogeno influiscono in varia misura sulla configurazione finale della struttura cristallina.

Altre forme di interazione sono i legami alogeno, in cui un atomo elettrofilo di alogeno assume un ruolo analogo all'idrogeno nei legami idrogeno. Esempi di ciò includono le interazioni Cl···Cl, Br···Br e I···I, che rappresentano casi particolari di legami alogeno. [2]

L'approccio di base implica la selezione di specifiche molecole in modo tale che presentino gruppi donatori e accettori di legami idrogeno nelle posizioni più appropriate. La disposizione e la posizione di questi gruppi vengono accuratamente scelte per creare una vasta serie di molecole collegate tramite legami idrogeno.

Si evidenzia che molte strutture cristalline non possono essere facilmente comprese basandosi sulle funzionalità molecolari, e questa è spesso la realtà più comune. Le diverse interazioni in gioco entrano in competizione, con quella predominante (più forte e direzionale) che influisce sull'organizzazione, mentre le interazioni più deboli vengono inevitabilmente adattate e modificate.[2]

2.3.2 Vantaggi dei co-cristalli

I co-cristalli offrono diversi vantaggi significativi. Prima di tutto, consentono di ottenere una forma cristallina stabile, rispetto ai solidi amorfi, senza richiedere la creazione o la rottura di legami covalenti. Questo è fondamentale per garantire la stabilità e l'affidabilità del prodotto.[15] Inoltre, i benefici derivanti dall'azione sinergica di due diversi farmaci non solo potenziano l'efficacia, ma possono anche ridurre gli effetti collaterali, consentendo di conseguenza una riduzione del dosaggio. [3]

Pertanto, il co-cristallo farmaceutico rappresenta un'interessante alternativa per potenziare l'efficacia dei farmaci. Le forme cristalline sono fortemente preferite nello sviluppo degli ingredienti attivi a causa della loro relativa facilità di ottenere purezza e stabilità, nonché della presenza di tecnologie consolidate per il miglioramento sinergico dei prodotti.[13]

Un'altra grande forza dei co-cristalli è la loro flessibilità nell'applicabilità. Possono essere teoricamente formati da una vasta gamma di molecole API, che possono essere debolmente ionizzabili o non ionizzabili. Questo allarga notevolmente il campo delle possibilità di utilizzo. Inoltre, la varietà di molecole che possono agire da *co-former* nei co-cristalli è ampia e diversificata, possono essere inclusi additivi alimentari, conservanti e altre sostanze. Ciò consente di adattare la formulazione farmaceutica in base alle esigenze specifiche del farmaco e del processo di produzione, permettendo di raggiungere un controllo più preciso delle proprietà del co-cristallo.[15]

2.3.3 Metodi di preparazione di co-cristalli

Il processo di co-cristallizzazione può avvenire mediante diversi metodi che possono essere principalmente classificati in processi basati su solventi e processi allo stato solido. [20]

Mentre i primi richiedono l'utilizzo di consistenti quantità di solvente ed è richiesta la soprasaturazione della soluzione per ottenere la co-cristallizzazione, i secondi richiedono l'uso di poco o nessun solvente.[21]

I processi basati sui solventi includono l'evaporazione del solvente, il raffreddamento, l'utilizzo di un antisolvente e la conversione in sospensione. Invece, i processi allo stato solido comprendono la macinazione a secco e la macinazione assistita dal solvente.[15]

La co-cristallizzazione in soluzione offre diversi vantaggi rispetto ai processi di stato solido, tra cui una maggiore capacità di gestire e regolare le proprietà dei cristalli e una maggiore purezza finale. Un altro importante vantaggio è la relativa facilità di scalabilità industriale per la produzione di co-cristalli su larga scala, sia in modalità batch che

continua, poiché possono essere sfruttate attrezzature già ben consolidate nei settori farmaceutico, alimentare e agrochimico, come i reattori a serbatoio agitato. In questo modo è possibile applicare la co-cristallizzazione in soluzione in diverse fasi del processo di produzione dei co-cristalli, che vanno dallo screening preliminare allo scale-up per la produzione commerciale.

Al contrario, i processi allo stato solido spesso presentano limitazioni nel controllo delle proprietà dei cristalli, richiedono notevoli quantità di energia termica o meccanica e spesso risultano complessi da estendere su scala industriale.[21] Inoltre si potrebbe raggiungere una conversione incompleta del co-cristallo che richiederebbe successive fasi di purificazione per ottenere un composto puro.[20] Quest'ultimi presentano però il vantaggio di essere più economici ed ecologici. Infatti non coinvolgono l'utilizzo di solvente e questo è vantaggioso considerando la crescente preoccupazione per una chimica più pulita e sostenibile.[3] Inoltre con i processi allo stato solido si evita la possibilità di formazione di solvati e/o idrati.

Le principali tecniche di co-cristallizzazione in soluzione sono:

1. Co-cristallizzazione tramite evaporazione del solvente: con questo approccio i *co-former* vengono disciolti in un solvente che successivamente viene fatto evaporare. Con il progredire dell'evaporazione, vi è la formazione di una soluzione soprasatura, che porta all'innesco del processo di nucleazione e crescita dei co-cristalli.

La velocità di evaporazione può notevolmente influenzare la formazione e la morfologia dei co-cristalli. Il solvente può essere allontanato velocemente tramite un evaporatore rotante oppure più lentamente lasciando la soluzione in un ambiente controllato come una cappa aspirante.[21] La scelta del solvente stesso può condizionare la velocità di evaporazione a causa della sua volatilità. Tempi di evaporazione lunghi sono auspicabili al fine di ottenere un minor numero di cristalli più grandi invece di un elevato numero di cristalli più piccoli.[20]

La diffusa preferenza di questo approccio sperimentale di selezione deriva dalla sua semplicità e dall'efficacia nel determinare le condizioni ideali per creare co-cristalli. Nonostante i vantaggi questo approccio presenta un difficile scale-up su scala industriale dovuto alla notevole quantità di energia richiesta e ai lunghi tempi necessari per l'evaporazione del solvente.

2. Co-cristallizzazione per raffreddamento: questo approccio sfrutta le variazioni di solubilità legate alla temperatura per favorire la creazione di co-cristalli. Inizialmente, entrambi i *co-former* vengono disciolti in un solvente, e successivamente, la soprassaturazione viene indotta mediante un abbassamento della temperatura della soluzione. Questo metodo richiede la valutazione della stabilità delle forme cristalline, della loro nucleazione e della cinetica di crescita. Risultano quindi più complesse la progettazione e l'operatività della co-cristallizzazione per raffreddamento rispetto alla cristallizzazione per raffreddamento di un singolo soluto.

Diversi fattori influiscono il processo di co-cristallizzazione, quali la concentrazione dei *co-former*, l'agitazione e le condizioni di flusso del fluido che possono influenzare la nucleazione dei cristalli e la formazione di diverse forme cristalline.

Questo metodo risulta ampiamente utilizzato su scala industriale per numerose molecole organiche nel settore farmaceutico.

3. Co-cristallizzazione con antisolvente: in questo metodo l'ottenimento dei co-cristalli avviene sfruttando l'utilizzo di un antisolvente in modo da ridurre le solubilità dei *co-former*. In genere, questa tecnica richiede la miscibilità tra il solvente e l'antisolvente, spesso realizzata con una combinazione di solventi organici e acqua.

Un vantaggio significativo di questa tecnica è la sua capacità di funzionare a temperatura ambiente, comportando un minor consumo di energia rispetto ai processi di evaporazione e raffreddamento del solvente.[21]

4. Co-cristallizzazione per mescolamento: questo approccio prevede la realizzazione di una sospensione in un solvente di uno o entrambi *co-former*, in rapporto stechiometrico fisso, mantenuti in agitazione per un tempo specifico. Non viene raggiunta una soluzione limpida, ma la frazione solida rimane in eccesso, ovvero si ha la formazione di soluzioni soprasature. La co-cristallizzazione è influenzata da diversi fattori, tra cui le solubilità, le concentrazioni relative e la cinetica del processo di nucleazione e crescita del sistema.[20] È una tecnica che può essere utilizzata per individuare la forma più stabile dei cristalli e permette la formazione di co-cristallo anche senza la conoscenza del rapporto stechiometrico necessario. Quindi può essere considerata un'ottima tecnica di screening e produzione di co-cristalli grazie alla sua elevata efficienza. [21]

Per quanto riguarda i processi allo stato solido, questi includono:

1. Macinazione a secco: questa tecnica prevede l'utilizzo di mezzi manuali, come mortaio e pestello, o meccanici, come mulino a sfere automatizzato, in cui le molecole nel loro stato solido vengano combinate mediante l'applicazione di una pressione.
2. Macinazione assistita da liquidi: questo metodo implica l'incorporazione di un solvente, di solito in quantità ridotta, nei solidi prima dell'inizio della macinazione. Il solvente agisce come catalizzatore nel promuovere la formazione dei co-cristalli e dovrebbe essere presente durante l'intero processo di macinazione.[20]

Nel processo di cristallizzazione, diversi parametri influiscono sulle prestazioni della forma cristallina e sulla natura stessa del cristallo. Questi includono la soprasaturazione, la velocità di raffreddamento, il grado di agitazione della soluzione, la natura del solvente di cristallizzazione, la temperatura del solvente di cristallizzazione e la presenza di impurità.

Aumentare la saturazione accelera la formazione dei nuclei rispetto alla crescita cristallina, questo si traduce nella formazione di cristalli a forma di ago. Al contrario una bassa saturazione porta alla formazione di cristalli piastriformi con maggiore velocità di dissoluzione.

Il raffreddamento veloce produce cristalli piastriformi o a forma di ago, mentre il raffreddamento più lento forma prismi compatti o allungati.

L'agitazione influisce sulla saturazione: un'agitazione intensa genera cristalli allungati con distribuzione ridotta delle dimensioni delle particelle e minor sedimentazione; un'agitazione lenta o assente produce grandi cristalli piastriformi.

Anche la temperatura del solvente di cristallizzazione influisce sulla natura del co-cristallo. Infatti a basse temperature di cristallizzazione, si formano cristalli irregolari, mentre ad alte temperature si ritarda la nucleazione e si producono cristalli fini e simmetrici.[15]

Dunque, si può sicuramente dedurre che il numero di parametri che si possono controllare durante un processo di cristallizzazione sono maggiori rispetto ai parametri totali che influenzano una co-cristallizzazione con successo di un co-cristallo target, il che rende la scienza che studia i processi di cristallizzazione in campo di ricerca in continuo fermento.

2.4 Co-cristalli di Quercetina

I nutraceutici costituiscono un settore emergente nell'ambito dell'ingegneria dei co-cristalli, comprendendo una vasta gamma di composti polifenolici tra cui le cumarine, i flavonoidi, e molti altri.[8]

I flavonoidi sono oggetto di crescente interesse a causa dei loro notevoli benefici a livello biochimico e delle proprietà antiossidanti.[22] Sono una classe di composti che si trovano diffusamente in alimenti come frutta, verdura, corteccia, radici, cereali, steli, tè, fiori e vino. La loro struttura di base è caratterizzata da due anelli fenilici e un anello eterociclico (Figura 2. 4).[23]

Numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che i flavonoidi manifestano una vasta gamma di attività biologiche, tra cui la capacità di neutralizzare i radicali liberi, l'azione antinfiammatoria, effetti antitumorali, proprietà antivirali, azioni antiallergiche, capacità di contrastare la formazione di coaguli, effetti cardioprotettivi e potenti proprietà antiossidanti.

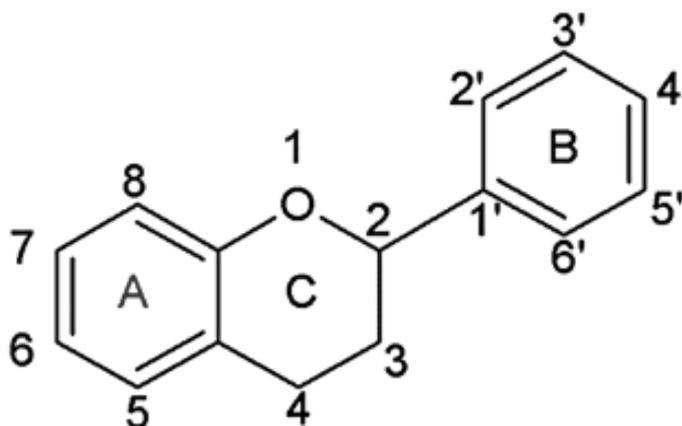


Figura 2. 4 - Struttura chimica generica di un flavonoide [24]

Tra questi composti, la quercetina (Que) è tra le strutture più diffuse tra tutti i composti fenolici di origine vegetale.[22]

I flavonoidi, tra cui la quercetina, sono generalmente considerati composti sicuri, con rari effetti tossici indesiderati negli esseri umani. Ciò consente l'uso di concentrazioni relativamente elevate senza eccessivi rischi. Tuttavia, nonostante alcune ricerche

suggeriscano benefici per la salute derivanti dall'assunzione di flavonoidi, l'approvazione da parte delle autorità regolatorie come la *Food and Drug Administration* (FDA) negli Stati Uniti e l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) è limitata a causa della mancanza di dati clinici affidabili che documentino benefici terapeutici. Attualmente, la FDA e l'EFSA non considerano i flavonoidi come prodotti farmaceutici, e non esiste una dose standard raccomandata per la quercetina. Attualmente la quercetina è ampiamente disponibile come integratore alimentare in diverse formulazioni, tra cui capsule e compresse con dosi variabili. [25]

La quercetina presenta numerosi benefici terapeutici come attività antiossidante, chelante dei metalli, antivirale, batteriostatica, anticancerogena e cardioprotettiva.[23]

Tuttavia è stato dimostrato che a causa della sua bassa solubilità, questa venga scarsamente assorbita e che sia caratterizzata da una bassa biodisponibilità orale.[22] Tali ragioni limitano notevolmente la sua applicazione clinica e per questo sono necessari nuovi approcci. Una soluzione promettente è rappresentata dalla co-cristallizzazione.

Grazie alla sua struttura chimica, la quercetina è in grado di stabilire molteplici interazioni non covalenti (**Figura 2. 5**). I gruppi ossidrilici e carbonilici presenti nella sua struttura possono partecipare a interazioni sia all'interno della molecola stessa (interazioni intramolecolari) che tra molecole diverse (interazioni intermolecolari), agendo come donatori e accettori nei legami idrogeno. [25]

La quercetina esiste in diverse forme solide che possono avere un'influenza sulle sue proprietà chimico-fisiche. Le forme cristalline più studiate sono quelle poliforme anidre e quelle idrate. [26] La quercetina diidrata risulta essere la forma solida più stabile disponibile in commercio. Per questi motivi stata la forma cristallina utilizzata durante la fase sperimentale.

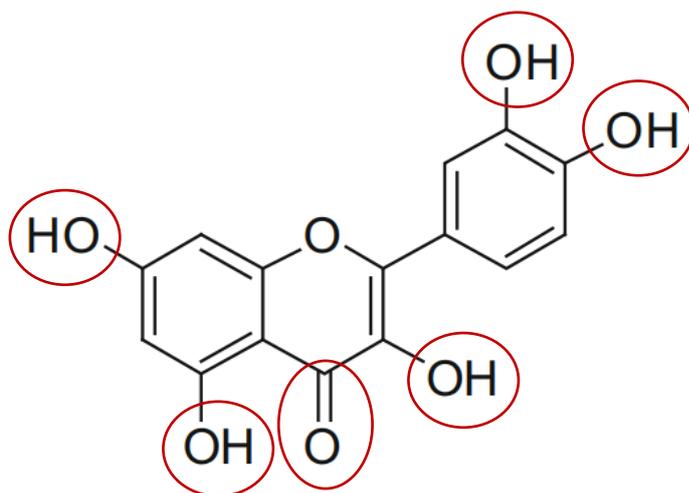


Figura 2. 5 - Struttura chimica della quercetina. [22] In rosso evidenziati i gruppi donatori e accettori di legami a idrogeno

I *co-former* più promettenti sono composti eterociclici contenenti un atomo di azoto nello scheletro molecolare con un doppietto di elettrone disponibile ad accettare interazioni di legami di idrogeno come nicotinamide, isonicotinamide, prolina, ecc (**Figura 2. 6**).[23]

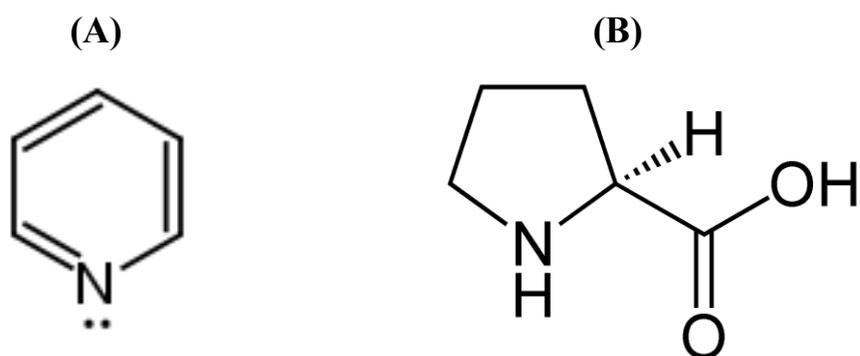


Figura 2. 6 - (A) Anello piridinico, struttura di base comune a nicotinamide e isonicotinamide e (B) Struttura della prolina. L'atomo di azoto presente in questi composti risulta essere un buon accettore di legami idrogeno e tende ad interagire con il gruppo fenolico dei flavonoidi

2.5 Scelta dei co-former

Il processo di progettazione dei co-cristalli spesso prende avvio con un'analisi del *Cambridge Structural Database* (CSD), seguita da un lavoro sperimentale. La progettazione dei co-cristalli segue il principio della sintesi supramolecolare, coinvolgendo più componenti in una specifica proporzione stechiometrica, in cui diverse specie molecolari interagiscono tramite legami a idrogeno e legami non a idrogeno.[15]

Per le interazioni forti e specifiche, come i legami a idrogeno e i legami alogeno, è possibile stabilire e sfruttare un ordine gerarchico dei sintoni. Tuttavia, quando si tratta di interazioni più deboli e meno specifiche, le cose si complicano notevolmente, poiché le molecole omologhe, che condividono gli stessi gruppi funzionali e gli stessi potenziali sintoni, possono reagire in modo diverso nella formazione di co-cristalli. Alcune molecole, inoltre, possono formare co-cristalli senza evidenti sintoni che le collegano.

Per superare questa difficoltà, spesso si ricorre a procedure sperimentali per effettuare lo screening di co-cristalli. Tuttavia, questo approccio può essere dispendioso in termini di tempo e risorse. Per questo motivo è necessario individuare altri fattori per predire il successo degli esperimenti di *screening*.

La polarità delle molecole, per esempio, risulta essere un fattore importante da prendere in considerazione. È stato dimostrato che le molecole tendono a formare preferibilmente co-cristalli con altre molecole di simile polarità.

Anche forma e dimensioni molecolari possono avere un impatto sulla formazione del co-cristallo. Si considera il volume di van der Waals della molecola racchiuso in una scatola rettangolare e si indicano gli assi con L (lungo), M (medio) e S (corto). Gli assi L, M e S danno informazioni rispetto alla dimensione della molecola, mentre i loro rapporti forniscono informazioni sulla forma molecolare. È stato provato che la similitudine di forma è più importante della similitudine di dimensioni, ovvero la corrispondenza nel rapporto tra gli assi risulta più significativa rispetto alla corrispondenza nelle lunghezze degli assi per la formazione di cristalli.

Altri fattori che possono influenzare la realizzazione del co-cristallo sono la correlazione tra l'area superficiale negativa e il numero di donatori di legami idrogeno in una molecola e la forza dei legami idrogeno tra le molecole formanti il co-cristallo. [27]

Metodi di selezione più raffinata prevedono la valutazione della propensione di formare legami ad idrogeno tra molecole di differente natura, come il metodo MCHBP (*Multi-component hydrogen bond propensity*).

Questo metodo considera ogni coppia di molecole target e *co-former* come un ambiente separato per l'analisi dei legami ad idrogeno. Indicando la molecola target con la lettera 'A', nel caso in questione la quercetina, e il *co-former* con la lettera 'B' ci sono quattro possibili categorie di interazioni di legame ad idrogeno in un sistema dato: A:A in cui la molecola target dona e accetta, A:B in cui la target dona e il *co-former* accetta, B:A in cui il *co-former* dona e la target accetta e B:B in cui il *co-former* dona e accetta (**Figura 2. 7**).

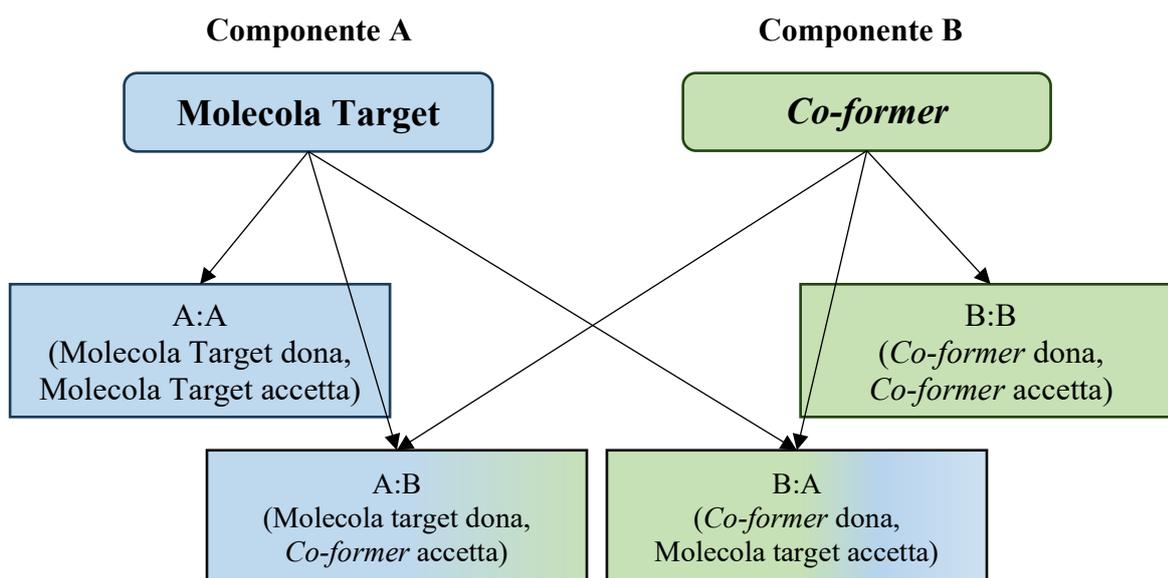


Figura 2. 7 - Le quattro diverse categorie di legami idrogeno valutate per ogni *co-former* nell'analisi MCHBP

Infine si confronta la probabilità delle interazioni etero (tra molecola target e *co-former*) con quelle delle interazioni homo (all'interno delle stesse molecole) per valutare la probabilità di formazione di un co-cristallo. Questo avviene calcolando un punteggio Multi-Componente (MC Score) basato sulla differenza tra la probabilità dell'interazione etero più probabile e quella dell'interazione homo più probabile. Un MC Score positivo indica che l'interazione etero sia più probabile di tutte le possibili interazioni homo, viceversa un MC Score negativo indica che le interazioni etero siano meno probabili rispetto a quelle homo. Per queste ragioni la formazione di un co-cristallo è molto probabile nel caso in cui il valore del MC Score sia positivo. [28]

Sono stati usati entrambi questi metodi di screening utilizzando il software Mercury 2023.2.0 sviluppato dal Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC).[29]

2.6 Co-former

2.6.1 Imidazolo

L'imidazolo è un composto eterociclico planare costituito da 5 membri, 3 atomi di carbonio e 2 atomi di azoto presenti nelle posizioni 1 e 3 (**Figura 2. 8**). Da letteratura è noto che in composti eterociclici sono estremamente importanti a causa delle loro attività biologiche e sono inclusi in un'ampia gamma di applicazioni tra cui il campo farmaceutico.

L'anello imidazolico è presente in molte importanti molecole biologiche tra cui l'istidina, la purina, l'istamina e gli acidi nucleici. Esiste in due forme tautomeriche equivalenti perché l'atomo di idrogeno può trovarsi su uno qualsiasi dei due atomi di azoto.

L'imidazolo presenta diverse proprietà mediche, quali attività antitumorale, agenti anti-invecchiamento, anticoagulanti, anti-infiammatori, antibatterici, antifungini e antivirali. Si tratta di un composto aromatico polare e ionizzabile e per questi motivi è utilizzato per ottimizzare la solubilità e i parametri di biodisponibilità di alcune molecole, migliorandone quindi le caratteristiche farmacocinetiche.[30],[31],[32]

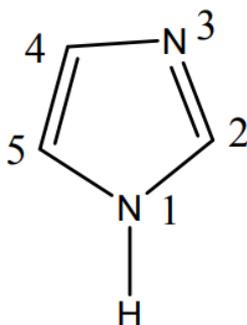


Figura 2. 8 - Struttura chimica dell'imidazolo [30]

2.6.2 Acido ferulico

L'acido ferulico (**Figura 2.9**) è un acido fenolico molto abbondante nella frutta e nella verdura. Molti alimenti come banane, agrumi, caffè, cavoli e broccoli sono ricchi di acido ferulico. In letteratura sono riportati diversi benefici terapeutici di questo composto, come per esempio una spiccata attività antiossidante, attività antimicrobiche, antinfiammatorie e antitumorali. Tuttavia la scarsa biodisponibilità dell'acido ferulico dopo ingestione o somministrazione orale rendono la farmacocinetica di questo composto sfavorevole.[33], [34]

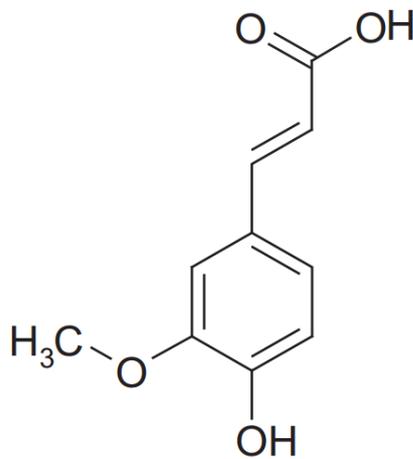


Figura 2.9 - Struttura chimica dell'acido ferulico [33]

2.6.3 Acido 4-amminobenzoico

L'acido 4-Amminobenzoico, o PABA, (**Figura 2. 10**) è un amminoacido ciclico che appartiene alle vitamine del gruppo B. Esiste in due diverse forme polimorfiche α e β ; la forma α è quella disponibile in commercio e appare sotto forma di aghi lunghi e fibrosi. Questo amminoacido non viene sintetizzato da mammiferi e esseri umani, ma risulta una componente importante del metabolismo introdotto grazie all'apporto alimentare. Esso viene invece sintetizzato da alcuni lieviti, batteri e piante. Presenta diverse applicazioni, per esempio viene utilizzato nella produzione di profumi e coloranti. Principalmente però viene utilizzato nell'industria farmaceutica. Il PABA è noto per le sue proprietà biologiche e in medicina viene utilizzato come farmaco protettivo contro l'insolazione solare, nei test diagnostici per lo stato del tratto gastrointestinale e come ingrediente antivirale per il trattamento delle infezioni virali agli occhi. [35], [36],[37]

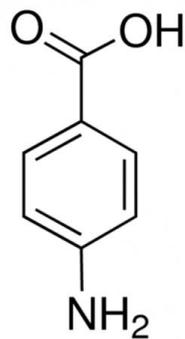


Figura 2. 10 - Struttura chimica dell'acido 4-Amminobenzoico [35]

2.7 Caratterizzazione delle fasi cristalline

I principali metodi impiegati per l'analisi di nuove fasi co-cristalline comprendono la diffrazione dei raggi X su polveri (PXR), la spettroscopia Raman, la calorimetria a scansione differenziale (DSC) e l'analisi termogravimetrica (TGA).

2.7.1 Diffrazione dei raggi X su polveri (PXR)

La diffrazione dei raggi X è un'importante tecnica non distruttiva, ampiamente diffusa in cristallografia, che utilizza i raggi X per caratterizzare i materiali cristallini. Generalmente gli esperimenti di diffrazione dei raggi X vengono eseguiti su campioni in polvere (PXR) o a cristallo singolo (SXR).

I diffrattogrammi ottenuti tramite diffrattometria dei raggi X su polveri sono stati utilizzati per verificare l'ottenimento di nuove forme cristalline, confrontando i picchi relativi al campione con quelli dei componenti puri.

I raggi X sono onde elettromagnetiche con lunghezze d'onda dell'ordine di 10^{-10} m, ovvero dell'ordine dell'angstrom, che è anche l'ordine di grandezza delle distanze intermolecolari nei cristalli.

Gli indici di Miller sono un sistema di notazione utilizzato per identificare i piani cristallini all'interno di una struttura. Questi indici, espressi con le lettere h, k e l, forniscono informazioni sull'orientamento dei piani nello spazio.

Quando un fascio di raggi X colpisce un reticolo cristallino, esso interagisce con gli elettroni degli atomi presenti nel cristallo. Essendo gli elettroni particelle cariche, emettono a loro volta una radiazione con la stessa frequenza della radiazione incidente (*scattering* elastico) in tutte le direzioni. Si ha la creazione di un fronte d'onda sferico, centrato su ogni atomo, in cui tali fonti d'onda si scontreranno inevitabilmente creando il fenomeno dell'interferenza. L'interferenza può essere costruttiva, nel caso in cui la differenza nei cammini d'onda incidenti e diffusi sia pari ad un numero intero di lunghezza d'onda della radiazione incidente, oppure distruttiva. [38],[39]

L'interferenza costruttiva si verifica solamente nel caso in cui il solido ha una disposizione ordinata della struttura atomica.

Un'interferenza costruttiva si traduce in un picco definito nel modello di diffrazione, al contrario se l'interferenza è distruttiva non appare alcun picco. La posizione del picco viene utilizzata per determinare la forma e la dimensione della cella unitaria e l'intensità del picco fornisce informazioni sulla posizione atomica all'interno della cella e sul numero atomico.

La legge di Bragg è una relazione utilizzata per descrivere il fenomeno di diffrazione dei raggi X su un cristallo.

La **Figura 2. 11** mostra lo schema del modello di diffrazione dei raggi X su un cristallo.

La teoria di Bragg assume che i cristalli presentino una distanza d tra i piani atomici e che, quando questi vengono colpiti da un fascio di raggi X con angolo di incidenza θ , essi vengano riflessi con lo stesso angolo.[40]

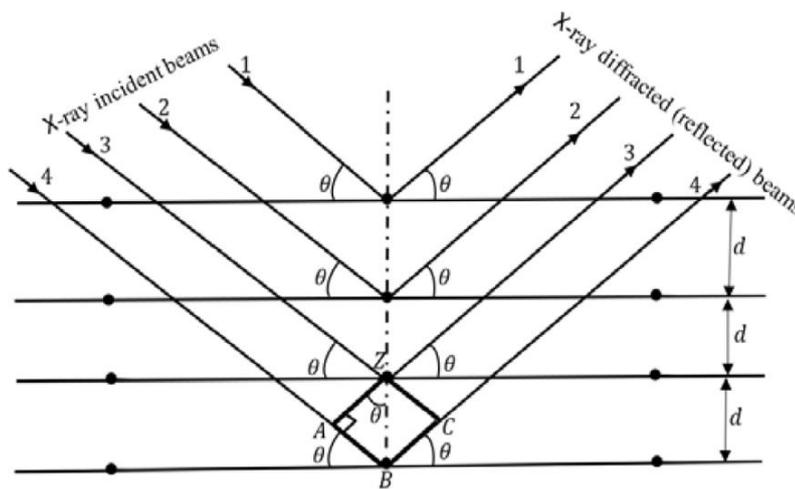


Figura 2. 11 - Schema del modello di diffrazione dei raggi X [40]

Per ricavare l'equazione di Bragg è stato utilizzato il teorema di Pitagora. Secondo la legge di Bragg l'interferenza costruttiva si verifica solo se le lunghezze della differenza di percorso sono uguali a $n\lambda$, ovvero:

$$AB + BC = n\lambda \quad (2.1)$$

Inoltre dalla **Figura 2. 11** risulta vero che $AB = BC$ e, utilizzando il teorema di Pitagora, che $\sin \theta = AB/d$, quindi si può ricavare la legge di Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (2.2)$$

dove n è un numero intero positivo, λ è la lunghezza d'onda dei raggi X, d è la distanza tra i piani cristallini e θ è l'angolo d'incidenza tra il raggio X incidente e il piano cristallino.

Inoltre poiché n è l'ordine di diffrazione da un insieme di piani reticolari (hkl) con spaziatura interplanare d_{hkl} , la legge di Bragg può essere riscritta come segue:

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} \quad (2.3)$$

La diffrattometria dei raggi X è una tecnica ampiamente utilizzata in quanto presenta numerosi vantaggi, quali:

- tecnica potente e rapida;
- facile preparazione del campione;
- interpretazione relativamente semplice dei dati;
- tecnica non distruttiva.[41]

2.7.2 Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è una spettroscopia vibrazionale basata sul processo di diffusione Raman.

Quando un raggio laser colpisce un insieme di molecole, la maggior parte della luce viene dispersa con la stessa lunghezza d'onda della sorgente laser (dispersione Rayleigh), mentre una piccola porzione viene diffusa anelasticamente.

L'effetto Raman è dovuto alla diffusione anelastica della luce, che si verifica quando i fotoni incidenti interagiscono con le molecole del campione e vengono dispersi a frequenze differenti rispetto a quelle del fotone incidente. Questa frequenza può essere

inferiore rispetto alla frequenza dei fotoni incidenti, in questo caso ci si riferisce ad una dispersione Raman Stokes, oppure superiore e viene detta dispersione Raman anti-Stokes. La spettroscopia Raman si basa sulla misurazione dello spostamento nell'energia del fotone in uscita. Questo effetto è mostrato nel diagramma di Jablonski (**Figura 2. 12**). Questo diagramma mostra le transizioni energetiche del processo di dispersione Rayleigh e di diffusione Raman. La **Figura 2. 12** mostra le tre possibili situazioni che possono accadere quando un fotone incidente interagisce ed eccita la molecola in uno stato energetico virtuale. La molecola può tornare allo stato fondamentale ed emettere un fotone di energia uguale a quella del fotone incidente (*scattering* Rayleigh); la molecola può rilassarsi raggiungendo uno stato energetico più alto emettendo un fotone di energia minore rispetto a quello incidente (*scattering* Stokes); la molecola si trova già ad uno stato energetico più alto e rilassandosi torna allo stato fondamentale emettendo un fotone con energia maggiore rispetto a quello incidente (*scattering* anti-Stokes).

Poiché c'è una probabilità molto più bassa che un fotone venga disperso con *scattering* anti-Stokes, la dispersione Raman si riferisce a quella Stokes. [42]

Lo spettro Raman può essere utilizzato come strumento per l'identificazione di diversi composti e per questo motivo può essere utilizzato come tecnica qualitativa per l'analisi di campioni sconosciuti.[43]

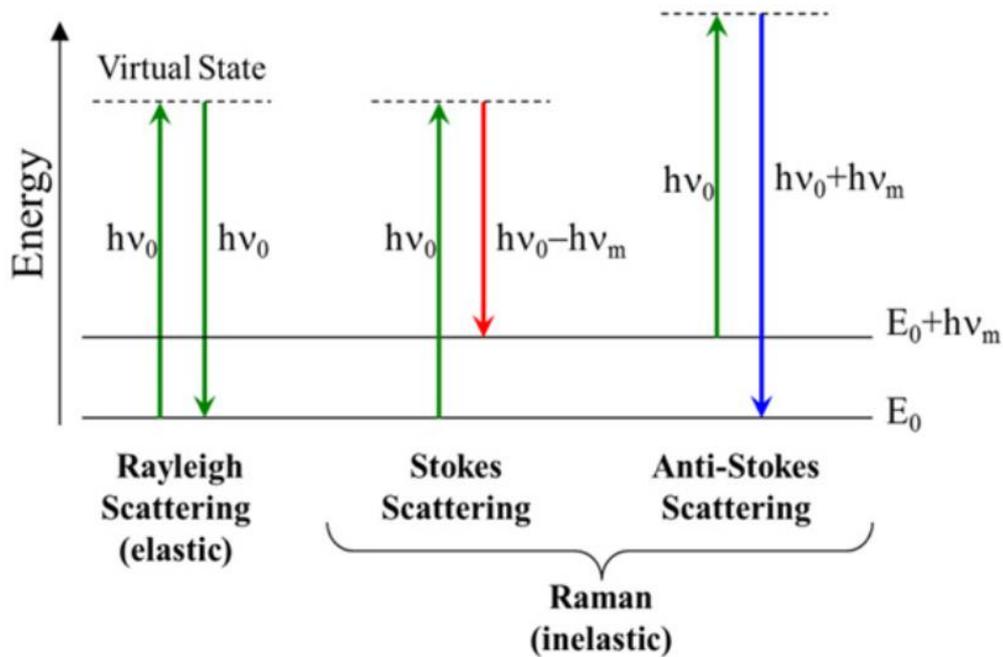


Figura 2. 12 - Diagramma di Jablonski, rappresentazione delle transizioni energetiche per lo scattering Rayleigh e Raman [44]

2.7.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

La calorimetria a scansione differenziale è un'analisi che permette la caratterizzazione termica di un campione. La DSC è quindi in grado di rivelare dettagli sul comportamento termico dei materiali solidi, fornendo sia informazioni qualitative che quantitative. Queste informazioni comprendono la temperatura di fusione e degradazione del materiale, la temperatura di transizione vetrosa, l'entalpia di fusione e cristallizzazione, il calore specifico e latente, la possibile esistenza di diverse forme polimorfiche e la purezza dei materiali.[45]

Un esperimento di DSC prevede di fornire energia simultaneamente a due celle, una contenente un portacampione con all'interno il campione di interesse e un'altra contenente un portacampione vuoto necessario come riferimento. Nel corso del tempo, entrambe le celle subiscono un aumento di temperatura identico. La differenza nell'energia fornita, necessaria per far sì che la temperatura del campione si allinei con quella del riferimento, rappresenta la quantità di calore in eccesso assorbita o rilasciata dal campione (a seconda se si tratti di un processo endotermico o esotermico). [46]

Il termogramma è la rappresentazione grafica ottenuta dopo un'analisi termica. Sull'asse delle ascisse è generalmente riportata la temperatura, mentre sull'asse delle ordinate è riportato il segnale misurato durante l'analisi termica ovvero, nel caso della DSC, il flusso di calore. Sul termogramma è dunque possibile distinguere picchi esotermici, che indicano il rilascio di energia da parte del campione, o picchi endotermici, che indicano l'assorbimento di energia da parte del campione. Analizzando la posizione e l'ampiezza di questi picchi, è possibile ottenere informazioni quantitative e qualitative sul comportamento termico del materiale. I picchi endotermici, per esempio, possono essere associati alla fusione del materiale solido o alla perdita di molecole di solvente presenti all'interno della sua struttura.

2.7.4 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica è una tecnica analitica che permette di studiare la stabilità termica e il meccanismo di degradazione di un campione.

In questa analisi il campione viene posizionato su un piatto portacampione all'interno di una fornace con atmosfera controllata e viene impostato un programma di temperatura. Grazie alla presenza di termocoppie e di una bilancia di precisione collegata al piatto portacampione vengono monitorate e registrate nel tempo la massa e la temperatura del campione. [47]

Il termogramma ottenuto da un'analisi termogravimetrica è la rappresentazione grafica della variazione della massa del campione rispetto alla temperatura o al tempo.

L'analisi del termogramma permette di ricavare importanti informazioni sul comportamento termico del materiale. È infatti possibile osservare variazioni di peso che possono essere associate a fenomeni di fusione, di degradazione o all'evaporazione di solventi presenti nella struttura. Infatti è una tecnica che può essere utilizzata per calcolare il contenuto di umidità del campione. [48]

2.8 Cristallo singolo e risoluzione struttura cristallina

Un cristallo singolo è una struttura solida costituita da atomi, molecole o ioni aventi una disposizione geometricamente regolare, che si ripete indefinitamente nelle tre dimensioni spaziali, noto come reticolo cristallino o reticolo di Bravais. Non si tratta quindi di una combinazione di più cristalli vicini che possiedono lo stesso reticolo, ma orientati in modo diverso, tipico dei materiali policristallini.

La diffrazione dei raggi X da cristallo singolo è la tecnica ideale per la determinazione strutturale, poiché permette di avere informazioni complete su una determinata sostanza, come ad esempio un co-cristallo (posizione atomiche da cui possiamo ricavare distanze e angoli di legame, impacchettamento cristallino). Tuttavia, molti materiali cristallini non possono essere preparati sotto forma di cristalli di dimensione sufficiente per essere studiati con le tecniche di diffrazione tipiche del cristallo singolo. In tal caso il metodo di diffrazione da polveri è una scelta obbligata e rappresenta un'ottima alternativa per la risoluzione strutturale.

Molteplici sono le tecniche di cristallizzazione per ottenere la crescita di cristalli più grandi.

La tecnica di seminazione è una tecnica utilizzata nel processo di cristallizzazione per promuovere la crescita di cristalli. Gli esperimenti di seminazione prevedono l'aggiunta di cristalli precedentemente ottenuti in una soluzione soprasatura della sostanza di interesse. La presenza del cristallo (seme) nella soluzione ha lo scopo di agire come punto di crescita per la deposizione/integrazione molecolare sulla superficie del seme.[41]

Un'altra tecnica che può essere utilizzata prevede l'impiego di cicli successivi di riscaldamento e raffreddamento di soluzioni contenenti la sospensione cristallina. Il processo si basa sulla maturazione di Ostwald, in cui attraverso il riscaldamento si favorisce la dissoluzione dei cristalli più fini, mentre durante il raffreddamento si favorisce la crescita dei cristalli più grandi. [49], [50]

Inoltre, mediante una graduale riduzione della temperatura si può agevolare una cristallizzazione più lenta. In questo modo, si promuove la crescita dei cristalli esistenti rispetto alla formazione di nuovi nuclei, ottenendo cristalli di maggiori dimensioni.[15]

3. Materiali e Metodi

3.1 Materiali

La quercetina diidrata (97%) e l'acido ferulico sono stati acquistati da Thermo Fisher, mentre l'imidazolo e l'acido 4-amminobenzoico sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. I reagenti sono stati utilizzati così come ricevuti, senza ulteriori purificazioni. L'isopropanolo è stato acquistato da Honeywell, l'etanolo da VWR, l'acetonitrile da Fisher Scientific mentre gli altri solventi, cioè metanolo, cloroformio, 2-metossietanolo, tetraidrofurano e 1-metil-2-pirrolidone sono stati acquistati da Sigma-Aldrich. Per la filtrazione delle soluzioni sono stati utilizzati filtri in membrana di Artiglass.

3.2 Scelta dei *co-former*

Il metodo utilizzato per lo screening dei co-cristalli si basa sulla previsione delle interazioni legate al legame a idrogeno. Con questo approccio è possibile progettare e prevedere le interazioni tra il principio attivo (API) e il *co-former* basandosi su modelli di legame tra sintoni supramolecolari.

In primo luogo si è effettuata un'analisi di complementarietà molecolare tra la molecola target e un elenco di *co-former* (vedi **Tabella 1 Appendice**). Attraverso a questa procedura è possibile diminuire la lista di possibili *co-former* grazie all'uso di alcuni descrittori molecolari come descrittori di dimensione, forma e polarità.

Una seconda scrematura dei possibili *co-former* è stata ottenuta applicando il metodo MCHBP che prevede di calcolare il MC Score. La **Figura 3. 1** mostra il risultato di questa analisi. Il colore dello sfondo è indicativo riguardo la probabilità, secondo questo metodo, di ottenere il co-cristallo con la quercetina. Infatti un MC Score positivo, sfondo verde nella figura, indica un maggiore probabilità di ottenere interazioni etero tra molecola target e *co-former* rispetto a quelle homo. Viceversa un MC Score negativo, sfondo rosso, indica che le interazioni etero siano meno probabili di quelle homo. Infine un valore di

MC Score prossimo allo zero, sfondo grigio, suggerisce che entrambi gli esiti sono possibili.

In questo modo i *co-former* più promettenti per ottenere un co-cristallo con la quercetina risultano essere 6: teofillina, nicotinamide, D,L-prolina, acido 4-amminobenzoico, acido ferulico e imidazolo. Di questi, i primi tre risultano già descritti in letteratura.[51], [52][53]

Il sistema quercetina-acido 4-amminobenzoico non ha portato alla formazione di un nuovo co-cristallo mentre si sono ottenuti risultati promettenti per quercetina-acido ferulico.

In questa tesi ci si è focalizzati sull'ottenimento e la caratterizzazione del co-cristallo quercetina-imidazolo (Que-Imi).

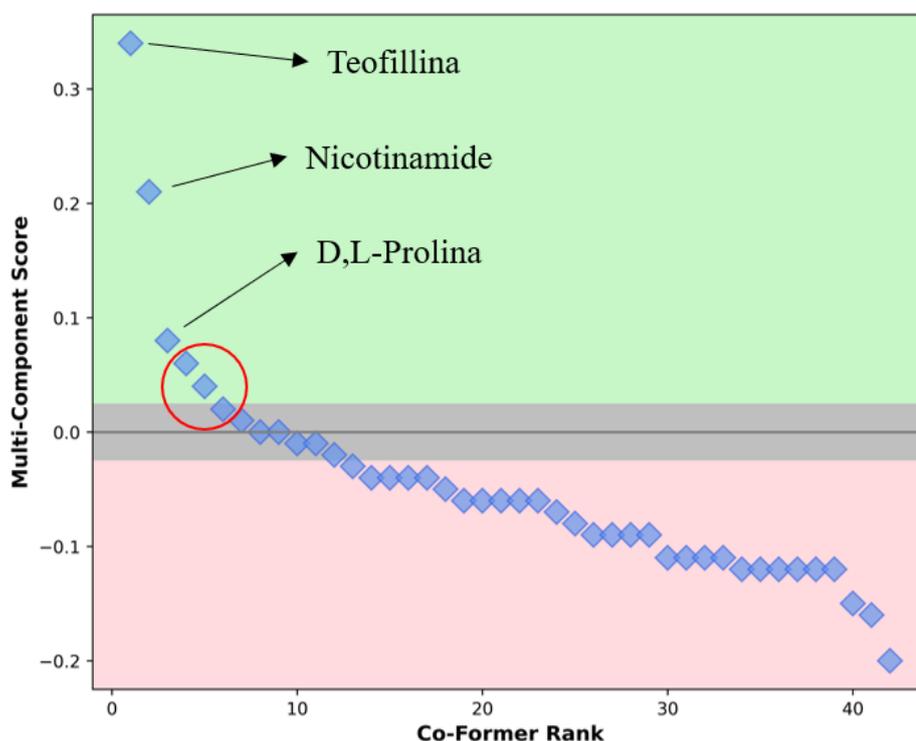


Figura 3. 1 - Risultati dell'analisi MCHBP. I *co-former* sono rappresentati da rombi e il colore dello sfondo è indicativo della probabile formazione del co-cristallo con quercetina. Sono cerchiati i *co-former* impiegati negli esperimenti di co-cristallizzazione.

3.3 Determinazione delle curve di solubilità

La solubilità di un composto in solventi organici o acqua è importante per il processo di *screening* e successivamente per il processo di sviluppo. Per il processo di selezione è necessario selezionare un solvente che abbia una sufficiente solubilità e un'elevata dipendenza della solubilità sulla temperatura. Inoltre, una selezione dei solventi e miscele di solventi che si espanda in un intervallo di possibili funzionalità chimiche potrebbe massimizzare le probabilità di trovare nuove, interessanti e sviluppabili forme solide.

La solubilità è definita come la quantità di equilibrio di un composto cristallino che può essere disciolto in un sistema solvente specifico alle condizioni di processo date, di cui la temperatura è spesso il parametro più influente. Per molti composti la solubilità cresce con la temperatura. I dati di solubilità sono usati per prendere decisioni critiche nei primi stadi di scoperta di nuove forme cristalline, durante l'intero processo di sviluppo fino alla formulazione. Per molti prodotti, la cristallizzazione è usata come purificazione e la formazione di particelle. Nella cristallizzazione di ingredienti attivi, la curva di solubilità aiuta a scegliere un processo di cristallizzazione ideale (cristallizzazione per evaporazione o raffreddamento) e determinare la resa. Dunque, la conoscenza della solubilità è essenziale per il *design* del processo di cristallizzazione. Misurare la solubilità richiede un controllo accurato della temperatura e composizione nella fase liquida e solida, preferibilmente con la capacità di generare una grande quantità di dati in un periodo breve.

Per la determinazione delle curve di solubilità dei componenti puri e dei co-cristalli si è utilizzata l'apparecchiatura Crystal16 (Technobis Crystallization Systems) che rappresenta uno strumento ideale per raccogliere efficientemente ed analizzare i dati di solubilità.

Le solubilità sono state ricavate attraverso un metodo di misura dinamica che si applica variando la temperatura. Mediante il riscaldamento di una sospensione di un composto noto, la temperatura alla quale tutto il materiale è disciolto rappresenta un punto sulla curva di solubilità. L'intervallo di temperatura nel quale la curva di solubilità può essere

misurata è limitato dal punto di ebollizione del solvente, il punto di fusione del materiale o della sua decomposizione.

In questa tesi sono state ricavate le curve di solubilità dei seguenti sistemi:

- Que2H₂O in isopropanolo;
- Que2H₂O in etanolo;
- Que-Imi in isopropanolo;
- Que-Imi in etanolo;

Lo strumento Crystal16 permette di effettuare 16 esperimenti simultanei per la stima delle solubilità in base alla misura della trasmissività.

Concretamente il materiale è stato pesato in 16 *vials* a concentrazione crescente alla quale è stato aggiunto 1 ml di solvente. Successivamente le *vials* sono state riscaldate a partire da 25°C fino a 72°C, utilizzando isopropanolo, o 62°C, utilizzando etanolo, con una velocità di riscaldamento di 0.3 °C/min e mantenendo l'agitazione dal fondo a 780 rpm, al fine di ottenere i relativi 16 “*clear point*”.

Il *clear point* si riferisce al punto di temperatura in cui la soluzione diventa completamente trasparente (corrispondente ad un valore di trasmissività pari al 100%) e la corrispondente misura nota di concentrazione è stata considerata come valore di solubilità.

La curva di solubilità è stata ricavata grazie all'utilizzo del software CrystalClear, adattando i dati dei componenti all'equazione di van't Hoff:

$$\ln x = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \quad (3.1)$$

dove x è la frazione molare del componente, ΔH è l'entalpia di dissoluzione, T_0 è la temperatura di set-point e T è la temperatura di saturazione della frazione molare x .

3.4 Preparazione del campione Que-Imi

L'ottenimento del co-cristallo Que-Imi ha richiesto diverse prove ed esperimenti. I composti di partenza, quercetina diidrata ($\text{Que}2\text{H}_2\text{O}$) e imidazolo (Imi), sono stati combinati in diversi rapporti stechiometrici e mediante l'utilizzo di differenti metodi di sintesi (**Tabella 3. 1**).

Per i primi esperimenti di screening, la co-cristallizzazione per mescolamento è stata effettuata utilizzando l'apparecchiatura Crystal16 (Technobis Crystallization Systems). Questo strumento permette di realizzare simultaneamente 16 esperimenti di mescolamento a temperatura controllata. Nello specifico quercetina diidrata e imidazolo sono stati pesati nelle *vials* in diversi rapporti stechiometrici ai quali sono state aggiunte opportune quantità di solvente al fine di ottenere soluzioni soprasature. I solventi impiegati in questi esperimenti sono stati isopropanolo, acqua, etanolo e acetonitrile. La scelta è ricaduta su questi solventi in quanto risultano essere poco o per nulla tossici per l'ambiente e l'organismo umano. Inoltre la polarità di questi solventi può favorire la formazione di co-cristalli che coinvolgono legami idrogeno. Le soluzioni sono state sottoposte ad un'agitazione pari a 780 rpm per 4 giorni, infine il materiale solido è stato raccolto mediante filtrazione sottovuoto e lasciato essiccare a temperatura ambiente.

Gli esperimenti di macinazione a secco sono stati realizzati con l'utilizzo di mortaio d'agata e pestello. I materiali di partenza sono stati pesati in differenti rapporti stechiometrici e sottoposti a pressione costante per 20 minuti.

Altri esperimenti sono stati effettuati tramite la co-cristallizzazione per raffreddamento, sfruttando nuovamente il Crystal16. Nelle *vials*, sono state preparate soluzioni soprasature del co-cristallo utilizzando due solventi: etanolo e isopropanolo. Le *vials* sono state sottoposte a riscaldamento fino a 62°C o 72°C , rispettivamente per etanolo e isopropanolo, con una velocità di riscaldamento pari a $0.3^\circ\text{C}/\text{min}$, in modo che il co-cristallo si disciogliesse nel solvente. Successivamente le *vials* sono state sottoposte a raffreddamento fino a -8°C con una velocità pari a $-0.3^\circ\text{C}/\text{min}$ al fine di ottenere la precipitazione del co-cristallo.

API	Co-former	Rapporto stechiometrico	Metodo di sintesi	Solvente
Quercetina diidrata	Imidazolo	1:1	Mescolamento	IPA, EtOH, H ₂ O, MeCN
			Raffreddamento	IPA, EtOH
			Macinazione a secco	/
		1:2	Mescolamento	IPA, EtOH, MeCN
			Raffreddamento	IPA, EtOH
			Macinazione a secco	/
		2:1	Mescolamento	IPA, EtOH, H ₂ O, MeCN
			Raffreddamento	IPA, EtOH

Tabella 3. 1 - Esperimenti di co-cristallizzazione

Al fine di ottenere quantità consistenti del co-cristallo Que-Imi, in rapporto stechiometrico 2:1, necessarie per la caratterizzazione, è stata effettuata una co-cristallizzazione per mescolamento in un reattore giacchettato da 250 ml. In particolare i materiali di partenza, quercetina diidrata 6.000 g (17.7 mmol) e imidazolo 0.604 g (8.87 mmol), sono stati lasciati in sospensione in 100 ml di acetonitrile (MeCN) in agitazione per 4 giorni a 25°C controllando la temperatura con un ministat huber 230. Il solido è stato recuperato mediante filtrazione sottovuoto e lasciato essiccare a temperatura ambiente.

3.5 Preparazione del campione Que-FA

Quercetina diidrata (Que 2 H 2 O) e acido ferulico (FA) sono stati combinati in diversi rapporti stechiometrici utilizzando come metodo di sintesi per la co-cristallizzazione il mescolamento di soluzioni soppasature. Nello specifico sono stati eseguiti esperimenti nel Crystal16 con i seguenti rapporti stechiometrici, 1:1, 1:2 a favore dell'acido ferulico e 2:1 a favore della quercetina. Isopropanolo, acqua e acetonitrile sono stati i solventi impiegati per gli esperimenti di co-cristallizzazione. Le soluzioni sono state sottoposte ad un'agitazione pari a 780 rpm per 4 giorni, infine il materiale solido è stato raccolto mediante filtrazione sottovuoto e lasciato essiccare a temperatura ambiente. I campioni sono stati analizzati tramite spettroscopia Raman per valutare la formazione di nuovi co-cristalli. Tuttavia, solo la co-cristallizzazione in acetonitrile del Que-FA in rapporto stechiometrico 1:1 ha dato risultati promettenti.

Al fine di ottenere quantità consistenti del campione Que-FA, in rapporto stechiometrico 1:1, necessarie per la caratterizzazione, è stata effettuata una co-cristallizzazione per mescolamento in un becher da 50 ml. In particolare i materiali di partenza, quercetina diidrata 1.000 g ($2.956 \cdot 10^{-3}$ mol) e acido ferulico 0.574 g ($2.956 \cdot 10^{-3}$ mol), sono stati lasciati in sospensione in 50 ml di acetonitrile in agitazione per 4 giorni a temperatura ambiente. Il solido è stato recuperato mediante filtrazione sottovuoto e lasciato essiccare a temperatura ambiente.

3.6 Preparazione del campione Que-PABA

Quercetina diidrata ($\text{Que} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e acido 4-Amminobenzoico (PABA) sono stati combinati in diversi rapporti stechiometrici utilizzando come metodo di sintesi per la co-cristallizzazione il mescolamento di soluzioni soppresature. Nello specifico sono stati eseguiti esperimenti nel Crystal16 con i seguenti rapporti stechiometrici, 1:1, 1:2 a favore dell'acido 4-Amminobenzoico e 2:1 a favore della quercetina. Isopropanolo, acqua e acetonitrile sono stati i solventi impiegati per gli esperimenti di co-cristallizzazione. Le soluzioni sono state sottoposte ad un'agitazione pari a 780 rpm per 4 giorni, infine il materiale solido è stato raccolto mediante filtrazione sottovuoto e lasciato essiccare a temperatura ambiente. I campioni sono stati analizzati tramite spettroscopia Raman per valutare la formazione di nuovi co-cristalli. Tuttavia, le sintesi condotte non hanno portato evidenze di formazione di nuovi co-cristalli.

3.7 Caratterizzazione delle fasi cristalline

3.7.1 Diffrazione dei raggi X su polveri (PXRD)

I diffrattogrammi su polveri sono stati ottenuti utilizzando un diffrattometro PANalytical X'Pert-PRO a temperatura ambiente utilizzando la radiazione $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) e un rivelatore X'cellerator. Il generatore di raggi X è stato impostato su un voltaggio di 40 kV e una corrente di 40 mA. Le scansioni sono state eseguite da 3° a $40^\circ 2\theta$ e acquisite in modo continuo utilizzando uno step size di 0.01313° a una velocità di 29.070 s/step. La geometria utilizzata per l'analisi è stata la Bragg-Brentano.

3.7.2 Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è stata eseguita utilizzando uno spettrometro LabRAM HR Evolution (HORIBA Scientific). Ogni campione è stato posto su un vetrino e posizionato all'interno del Raman al fine di ottenere gli spettri. I campioni sono stati colpiti da un laser da 100 mW che opera a 785 nm. La radiazione retrodiffusa è stata raccolta mediante un rivelatore Synapse Plus BIDD (1024 x 256 pixel), utilizzando un reticolo di diffrazione da 300 L/nm. La potenza del laser è stata impostata tra il 50% e il 100% a seconda del campione analizzato. Per ciascun spettro il tempo di acquisizione è stato di 1 secondo e si sono eseguiti 30 o 60 accumuli in base al campione. I dati sono stati elaborati mediante il software LabSpec6 Suite. Nello specifico l'elaborazione degli spettri Raman ha previsto la normalizzazione, lo *smoothing* e la correzione della *baseline*. La normalizzazione prevede di portare tutte le intensità dello spettro ad una scala comune, ciò risulta utile per confrontare spettri di differenti campioni e evidenziare variazioni tra i picchi. Lo *smoothing* viene utilizzato per ridurre il rumore rendendo più semplice l'identificazione dei picchi. Infine la correzione della *baseline* prevede di ridurre eventuali pendenze nello spettro Raman. Tutte queste operazioni di elaborazione permettono di migliorare la qualità dei dati e di facilitarne l'interpretazione.

3.7.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Le analisi di calorimetria a scansione differenziale sono state effettuate utilizzando un 8000Mettler TOLEDO DSC-1 (PerkinElmer) sotto atmosfera di azoto con la velocità di flusso impostata su 50 ml/min. Sono stati pesati 5 mg di campione in un pan di alluminio e riscaldati da 25°C a 350°C ad una velocità di 10°C/min. Questa è stata condotta sotto atmosfera di azoto con la velocità di flusso impostata su 50 ml/min. Il flusso di calore è stato misurato in mW e la posizione dell'altezza del picco è stata utilizzata per determinare il punto di fusione del campione.

3.7.4 Analisi termogravimetrica (TGA)

Le analisi termogravimetriche sono state effettuate impiegando un Mettler Toledo 1600, in atmosfera controllata utilizzando un flusso di 50 ml/min di Argon. I campioni da analizzare sono stati riscaldati da 25°C a 500°C ad una velocità di 10°C/min.

3.8 Crescita del cristallo singolo

L'ultima fase del lavoro si è incentrata sull'ottenimento di cristalli singoli di Que-Imi. Lo studio di nuovi materiali passa inevitabilmente attraverso lo studio delle proprietà fisiche seguendo la struttura cristallina del materiale. Tuttavia, gli esatti meccanismi attraverso i quali un determinato motivo strutturale restituisce una proprietà desiderata sono di significativo interesse in questo campo di ricerca. Lo studio dei motivi strutturali aiuta a capire meglio come il materiale prodotto mostra dei fenomeni desiderati. Ottenere dunque dei cristalli singoli di dimensioni adeguate al fine di poterne determinare la struttura cristallina, rappresenta un processo cruciale nello studio di un materiale. Diverse sono le tecniche che si possono utilizzare per la crescita di cristalli singoli. Quelle utilizzate in questa tesi sono state:

- Seminazione
- Cicli di temperatura
- Raffreddamento veloce e lento
- Evaporazione del solvente

3.8.1 Esperimenti di seminazione

Gli esperimenti di seminazione sono tecniche ampiamente utilizzate per indurre la crescita di cristalli. Nello specifico sono state preparate soluzioni sature a temperatura ambiente del co-cristallo Que-Imi in differenti solventi: etanolo, isopropanolo e tetraidrofurano. Nelle soluzioni è stata aggiunta una percentuale di semi pari all'1%, ovvero piccoli cristalli provenienti dalla co-cristallizzazione in MeCN. La percentuale di seminazione indica la quantità di semi aggiunta rispetto alla soluzione totale. Ciò significa che l'1% del volume totale della soluzione era costituito da semi. Il risultato sperato di questi esperimenti è l'ottenimento di cristalli di dimensioni maggiori grazie alla presenza dei piccoli cristalli aggiunti che agiscono da seme per la nucleazione di cristalli più grandi.

3.8.2 Esperimenti attraverso cicli di temperatura

Lo scopo di questi esperimenti è quello di modulare la dimensione dei cristalli attraverso cicli riscaldamento e raffreddamento continui. Partendo da una soluzione soprasatura, attraverso al riscaldamento, si favorisce la dissoluzione dei cristalli di minore dimensione. Al contrario, durante il ciclo di raffreddamento si favorisce la ricristallizzazione in soluzione. Questo significa che ciò che ci si aspetta è che riducendo la temperatura i cristalli che sono rimasti in soluzione crescano ed agiscano da nucleo per la formazione di cristalli più grandi.

Per procedere con questo tipo di esperimento è stato utilizzato il Crystal16, nella quale sono state inserite le *vials* contenenti soluzioni soprasature del co-cristallo Que-Imi in etanolo e isopropanolo. Per individuare le concentrazioni di partenza adeguate sono stati sfruttati i dati di solubilità del co-cristallo nei diversi solventi ottenuti in precedenza.

3.8.3 Esperimenti di raffreddamento veloce e lento

Al fine di valutare l'influenza della velocità di raffreddamento sulla dimensione del co-cristallo si sono portati avanti esperimenti di raffreddamento veloce e lento, utilizzando l'apparecchiatura CrystalBreeder (Technobis Crystallization Systems). Nelle apposite *vials* sono state preparate soluzioni soprasature a temperatura ambiente del co-cristallo Que-Imi in isopropanolo e etanolo. Queste sono state sottoposte dapprima a riscaldamento da 25°C fino a 72°C, utilizzando isopropanolo, o 62°C, utilizzando etanolo, con una velocità di riscaldamento di 0.3 °C/min e mantenendo l'agitazione dal fondo a 780 rpm. In seguito le soluzioni sono state raffreddate con due differenti velocità di raffreddamento, una pari a -0.5°C/min per indicare un raffreddamento veloce ed una pari a -0.1°C/min per valutare un raffreddamento lento.

Nel preparare le soluzioni iniziali si è presa l'accortezza di scegliere accuratamente le concentrazioni del co-cristallo, in modo tale che esse fossero soprasature a temperatura ambiente, ma che raggiungendo la massima temperatura il solido fosse completamente

disciolto. Questo è stato possibile sfruttando la conoscenza delle curve di solubilità del co-cristallo nei solventi scelti precedentemente ottenute.

3.8.4 Esperimenti di evaporazione del solvente

La cristallizzazione tramite evaporazione del solvente è stata effettuata mediante l'utilizzo dello strumento CrystalBreeder (Technobis Crystallization Systems).

Lo strumento permette di effettuare 32 esperimenti in parallelo utilizzando piccole quantità di campione in condizioni controllate.

In particolare sono stati realizzati esperimenti di cristallizzazione per il co-cristallo Que-Imi in differenti solventi, quali: isopropanolo, etanolo, acetonitrile, metanolo, cloroformio, 2-metossietanolo, tetraidrofurano e 1-metil-2-pirrolidone.

La risoluzione della struttura del co-cristallo Que-Imi è stata raggiunta a seguito dell'ottenimento del cristallo singolo mediante cristallizzazione in isopropanolo.

3.9 Diffrazione dei raggi X da cristallo singolo (SXR D)

I dati di diffrazione dei raggi X provenienti da un singolo cristallo di Que-Imi sono stati raccolti su un diffrattometro Agilent SuperNova a 298K. Il diffrattometro era dotato di un rivelatore CCD Atlas, a sua volta collegato a un dispositivo di bassa temperatura Oxford CryoStream. Il dispositivo utilizzava radiazioni Cu K α monocromiche speculari (λ 1,54184Å) provenienti da una sorgente di raggi X microfocalizzata. I cristalli singoli di Que-Imi esaminati avevano le seguenti dimensioni: 0,250 x 0,100 x 0,05 mm³. La struttura del cristallo è stata risolta mediante sfasamento intrinseco utilizzando l'algoritmo informatico SHELXT[54], che tiene conto della simmetria del gruppo spaziale e della posizione del picco basato sui dati di riflessione da cristallo singolo. La riduzione dei dati e la correzione semi-empirica dell'assorbimento sono state eseguite in modo analitico. Ulteriori perfezionamenti dei dati sono stati effettuati mediante una tecnica dei minimi quadrati basata su una matrice completa (F^2) utilizzando SHELXL2016[54], con l'assistenza del programma Olex 2.1.5.[55] Gli atomi di idrogeno sono stati generati stereochimicamente e raffinati utilizzando il modello *riding* a tutti gli atomi di idrogeno imponendo il fattore termico Ueq dell'atomo portatore pari a 1.2. I pattern misurati sono stati confrontati con i modelli simulati di polveri per Que-Imi nel software di visualizzazione della struttura cristallina Mercury.

4. Risultati e discussione

4.1 Curve di solubilità

La solubilità di quercetina diidrata in isopropanolo ed etanolo è stata ricavata grazie all'utilizzo dell'apparecchiatura Crystal16.

Con l'ausilio del software CrystalClear i punti di solubilità sono stati poi adattati all'equazione di van't Hoff per ottenere le curve di solubilità.

La **Figura 4. 1** e la **Figura 4. 2** mostrano la curva di solubilità della quercetina diidrata rispettivamente in isopropanolo ed etanolo.

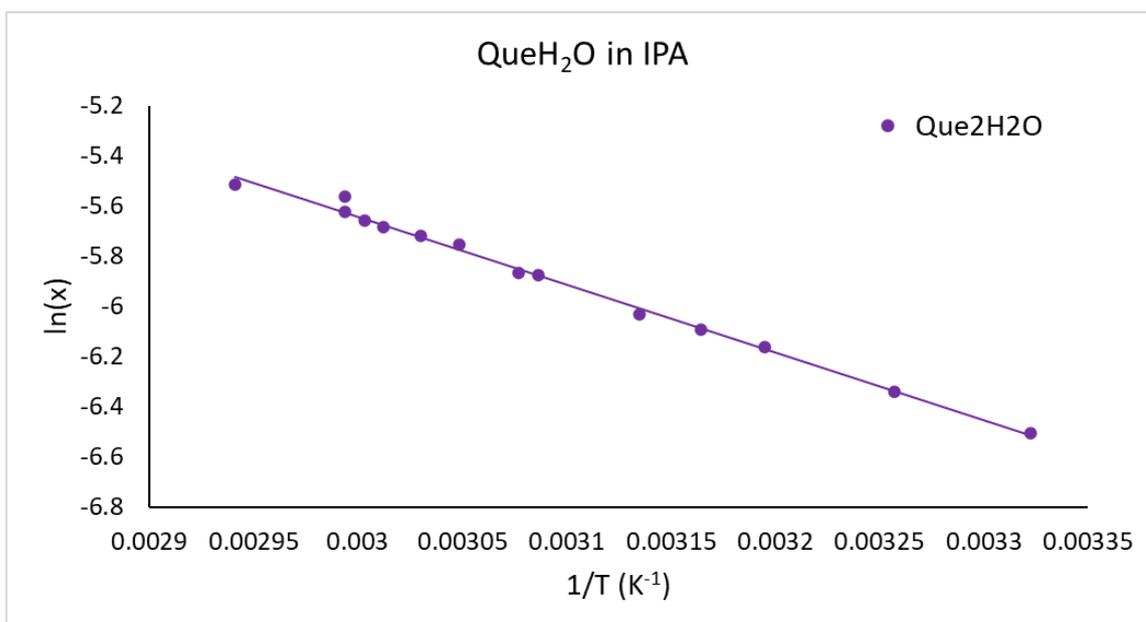


Figura 4. 1 - Grafico di van't Hoff per Quercetina diidrata in isopropanolo, dove x rappresenta la frazione molare della quercetina diidrata

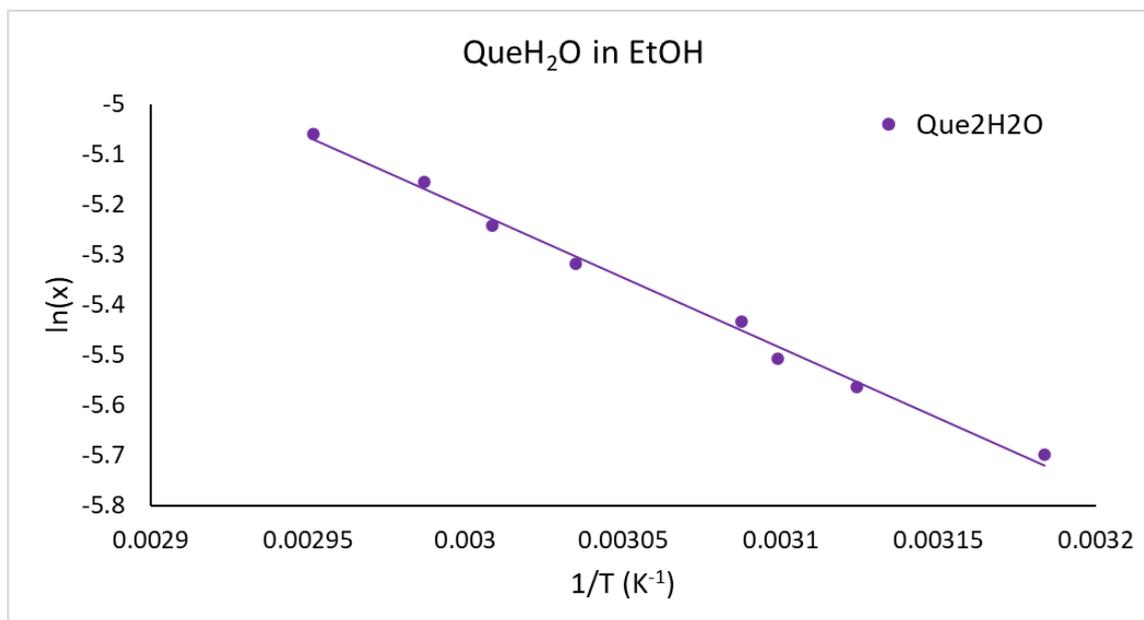


Figura 4. 2 - Grafico di van't Hoff per Quercetina diidrata in etanolo, dove x rappresenta la frazione molare della quercetina diidrata

4.2 Risultati prove di co-cristallizzazione di quercetina e imidazolo

I composti di partenza, quercetina diidrata e imidazolo, sono stati combinati in diversi rapporti stechiometrici e mediante l'utilizzo di differenti metodi di sintesi.

Il co-cristallo quercetina-imidazolo in rapporto stechiometrico 2:1 è stato ottenuto solamente mediante la co-cristallizzazione per mescolamento in acetonitrile. I cristalli raccolti risultavano molto piccoli e formavano un agglomerato di cristallini sferici di colore giallo (**Figura 4. 3**).

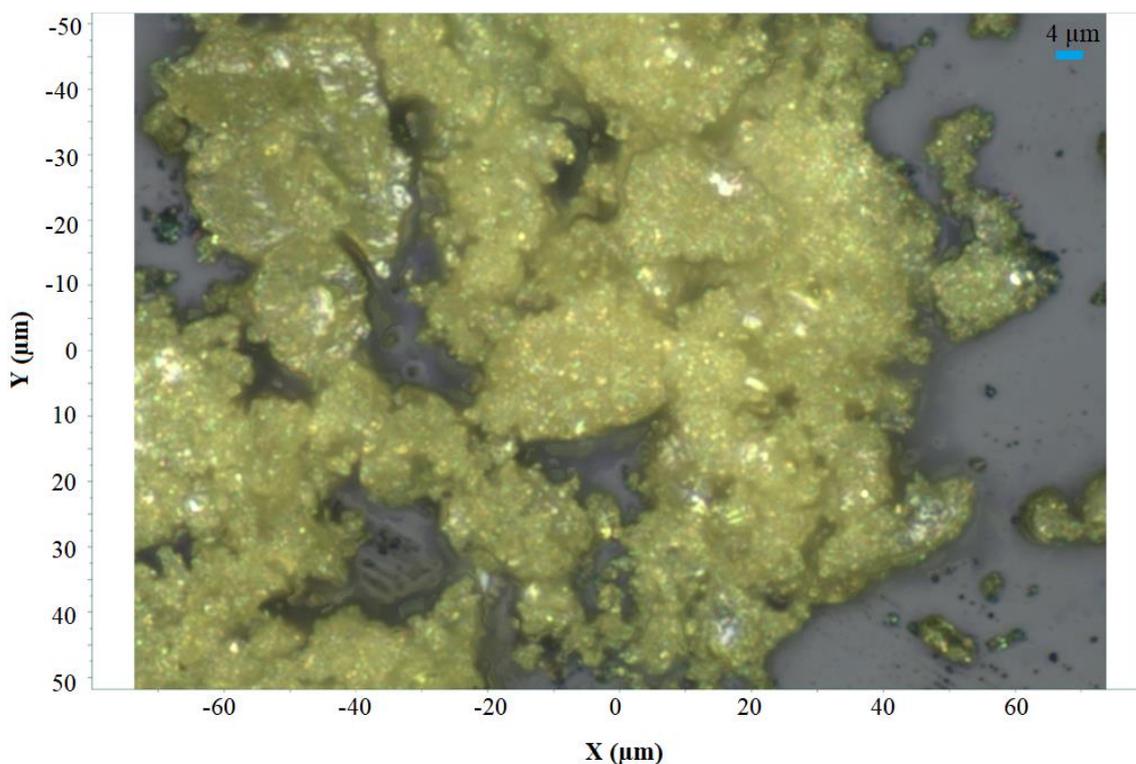


Figura 4. 3 - Immagine al microscopio ottico del co-cristallo Que-Imi 2:1 ottenuto tramite co-cristallizzazione per mescolamento in MeCN

I campioni risultanti dagli esperimenti di mescolamento in acqua, isopropanolo e etanolo sono stati analizzati mediante diffrazione dei raggi X su polvere.

L'analisi dei dati non ha rivelato la formazione di nuove fasi co-cristalline.

A titolo di esempio in **Figura 4. 4** è mostrato il confronto tra il diffrattogramma derivante da un campione sperimentale e quelli relativi ai componenti puri, quercetina e imidazolo.

Nello specifico risulta analizzato il campione raccolto mediante filtrazione ottenuto

tramite la co-cristallizzazione per miscelamento di quercetina e imidazolo in rapporto stechiometrico 1:1 in acqua.

Come è possibile osservare, il diffrattogramma del campione analizzato mostra picchi definiti corrispondenti alle posizioni dei picchi noti per i composti puri. Inoltre non sono presenti picchi aggiuntivi o spostati che potrebbero indicare la formazione di un nuovo co-cristallo tra quercetina e imidazolo.

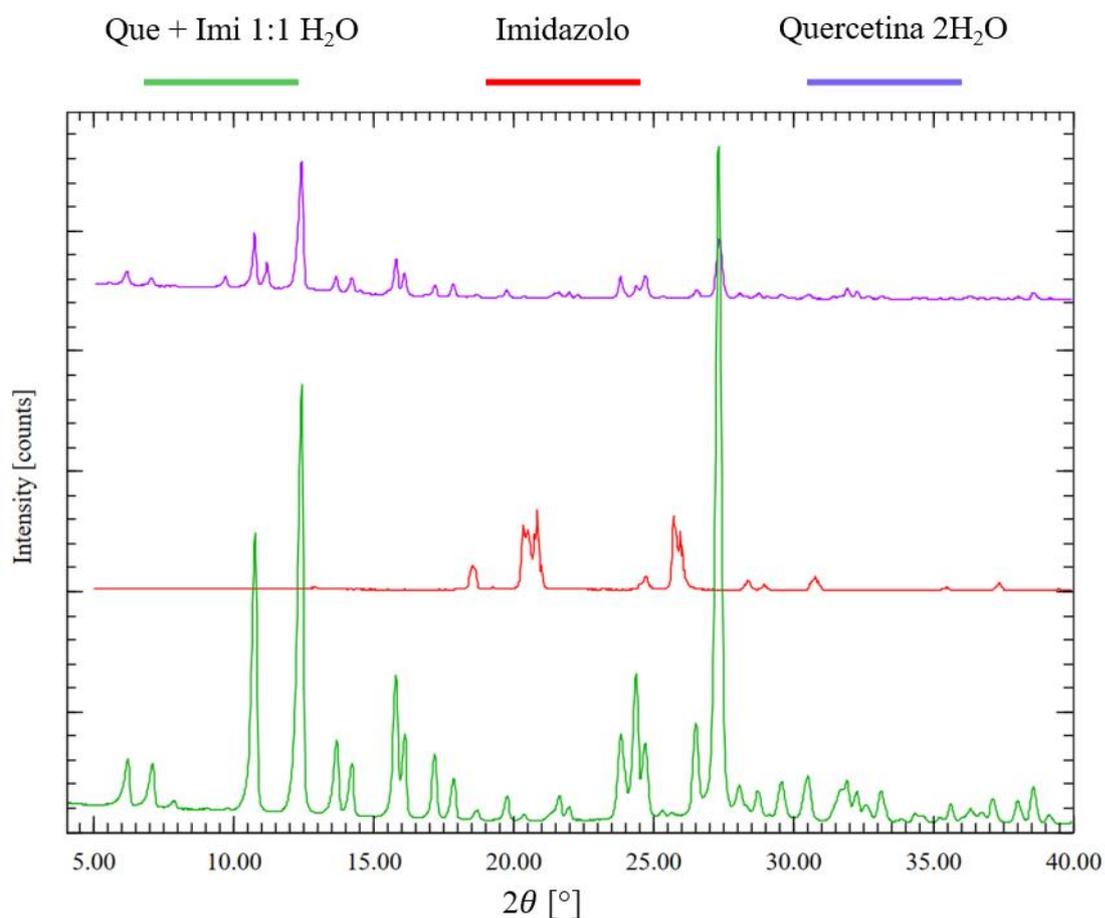


Figura 4. 4 - Confronti PXRd del campione Que-Imi ottenuto per miscelamento dei reagenti puri in acqua in rapporto stechiometrico 1:1, della quercetina diidrata pura e dell'imidazolo puro

Anche gli esperimenti di co-cristallizzazione tramite macinazione a secco di quercetina e imidazolo non hanno prodotto risultati promettenti per la formazione di un nuovo co-cristallo. Anche in questo caso i campioni sono stati caratterizzati mediante diffrazione dei raggi X su polvere. In **Figura 4. 5** è presente il confronto tra i diffrattogrammi dei composti puri e quello relativo al campione ottenuto tramite macinazione a secco di quercetina e imidazolo in rapporto stechiometrico 1:1. È possibile notare come, analogamente ai risultati precedenti, il diffrattogramma del campione sperimentale non riveli la presenza nuovi picchi caratteristici, suggerendo che si tratti di una miscela fisica tra i due composti e non di una nuova forma cristallina.

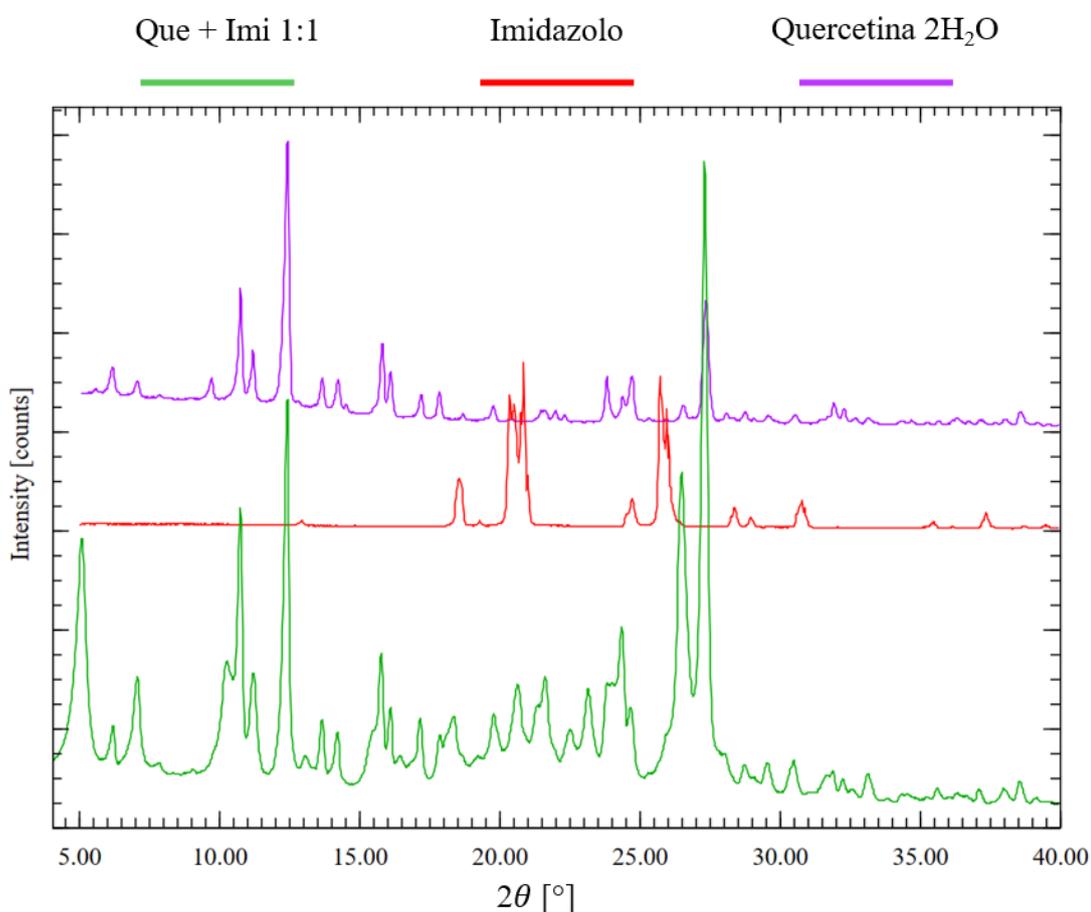


Figura 4. 5 - Confronti PXRD del campione Que-Imi ottenuto tramite macinazione a secco dei reagenti puri in rapporto stechiometrico 1:1, dell'imidazolo puro e della quercetina diidrata pura

Gli esperimenti di co-cristallizzazione per raffreddamento di quercetina e imidazolo in etanolo o isopropanolo non hanno portato alla precipitazione di materiale solido rendendo impossibile la caratterizzazione. Diversi possono essere i fattori per i quali non sia avvenuta la precipitazione di materiale solido. Tra le possibili cause vi è una scelta inappropriata del solvente impiegato durante le prove sperimentali. Anche la cinetica di cristallizzazione gioca un ruolo fondamentale nell'esperimento. È infatti possibile che il tempo dell'esperimento non sia stato sufficientemente lungo per consentire la formazione del co-cristallo e la sua precipitazione.

4.3 Caratterizzazione del co-cristallo Que-Imi

I prodotti che si sono formati a seguito della co-cristallizzazione per mescolamento in acetonitrile tra quercetina diidrata e imidazolo in rapporto stechiometrico 2:1 a favore della quercetina sono stati analizzati mediante:

- diffrazione dei raggi X su polveri;
- spettroscopia Raman;
- calorimetria a scansione differenziale;
- analisi termogravimetrica.

4.3.1 Risultato della diffrazione dei raggi X su polvere

Il diffrattogramma del campione Que-Imi è stato confrontato con quello dei componenti puri (**Figura 4. 6**). Il diffrattogramma riporta l'intensità dei picchi di diffrazione in funzione dell'angolo di diffrazione 2θ .

Dal confronto, è possibile notare la presenza di nuovi picchi distinti del campione di co-cristallizzazione che differiscono dai picchi presenti nei diffrattogrammi dei composti puri.

I picchi di diffrazione caratteristici per Que 2 H 2 O sono osservati nelle posizioni $2\theta = 10.8^\circ, 12.4^\circ$ e 27.3° . Il diffrattogramma a raggi X dell'imidazolo ha mostrato picchi caratteristici a $2\theta = 10.8^\circ, 12.4^\circ$ e 27.3° .

I picchi di diffrazione caratteristici del co-cristallo si osservano a $2\theta = 9.1^\circ, 13.4^\circ$ e 27.5° .

La comparsa di nuovi picchi nel diffrattogramma del co-cristallo indica la possibile formazione di una nuova fase cristallina. La variazione e lo spostamento di alcuni picchi possono indicare un aumento o una diminuzione della distanza tra i piani atomici del cristallo, suggerendo una modifica nella disposizione delle molecole.

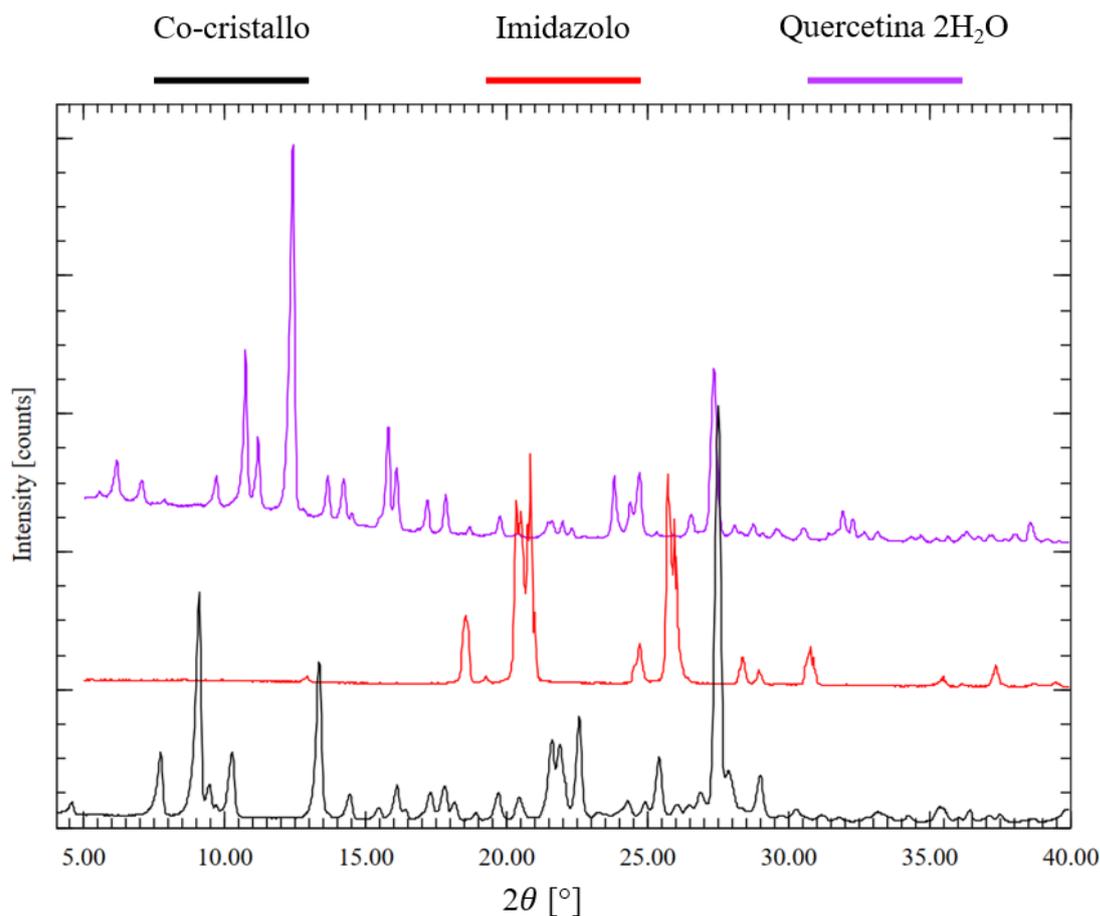


Figura 4. 6 - Confronti PXRD del co-cristallo Que-Imi 2:1, dell'imidazolo puro e della quercetina diidrata pura

L'analisi del diffrattogramma ottenuto ha quindi fornito importanti evidenze sulla possibile formazione di nuovo co-cristallo Que-Imi. Questo evento ha portato ad eseguire ulteriori analisi di caratterizzazione per confermare il successo dell'esperimento.

4.3.2 Risultato della spettroscopia Raman

Gli spettri Raman per quercetina diidrata pura, imidazolo puro e il campione Que-Imi sono presentati in **Figura 4. 7**.

Questi spettri riportano l'intensità della luce Raman dispersa in funzione della frequenza delle vibrazioni molecolari.

Anche in questo caso i risultati sono utili per confermare la formazione del co-cristallo tra quercetina e imidazolo. Infatti osservando lo spettro relativo al co-cristallo si possono

notare alcuni spostamenti nella posizione dei picchi rispetto agli spettri dei componenti puri.

Osservando la **Figura 4. 7** è possibile notare variazioni nelle posizioni dei picchi caratteristici nella zona compresa tra 1500 e 1700 cm^{-1} , associati allo stiramento e al piegamento di legami multipli. Le cause di questi spostamenti possono essere attribuite alla formazione di legami ad idrogeno che si vengono a creare nella nuova struttura cristallina.

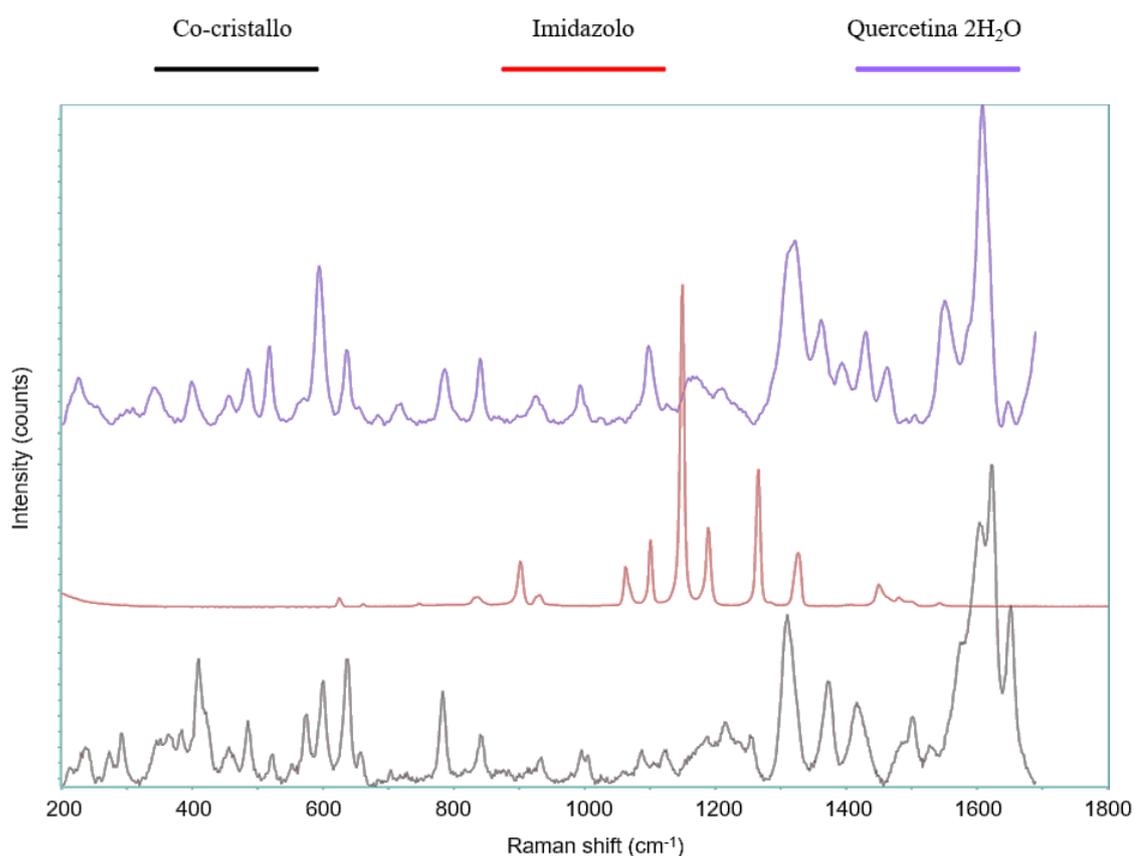


Figura 4. 7 - Confronti Spettri Raman del co-cristallo Que-Imi 2:1, dell'imidazolo puro e della quercetina diidrata pura

4.3.3 Risultato per la calorimetria a scansione differenziale e l'analisi termogravimetrica

Per ricavare informazioni sulla formazione del co-cristallo, sul comportamento termico e sulla stabilità termica è stata condotta un'analisi DSC sul campione Que-Imi.

Ancora una volta, dal confronto tra i diagrammi DSC del campione di co-cristallizzazione e i componenti puri è possibile evidenziare la formazione di nuova forma co-cristallina (**Figura 4. 8**).

I diagrammi DSC mostrano picchi endotermici che indicano i punti di fusione dei componenti puri e del campione Que-Imi. L'imidazolo (curva rossa) mostra un punto di fusione pari a 90°C, mentre per la quercetina diidrata (curva viola) risulta essere uguale a 318°C. La quercetina presenta un secondo picco endotermico più ampio a temperature inferiori associato alla perdita delle due molecole di acqua presenti nella struttura.

Il diagramma DSC del co-cristallo Que-Imi mostra la presenza di due picchi endotermici, uno a 285°C e l'altro a 324°C. È possibile notare come il punto di fusione del co-cristallo sia ad una temperatura maggiore della quercetina pura, ciò identifica una forma più stabile.

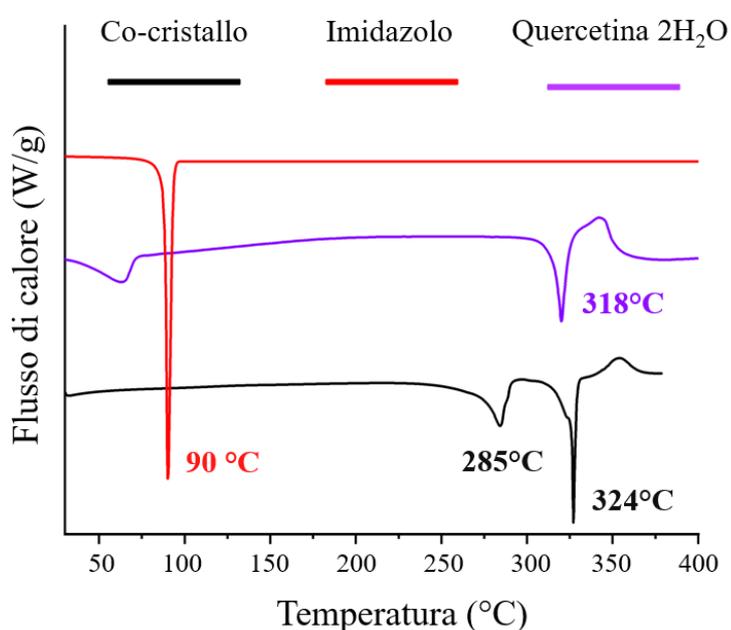


Figura 4. 8 - Confronto tra diagrammi DSC di quercetina diidrata, imidazolo e co-cristallo Que-

Imi

La **Figura 4. 9** mostra il confronto tra le curve DSC e TGA del co-cristallo Que-Imi. La curva dell'analisi termogravimetrica (curva blu) mostra le variazioni di peso del campione associate alla temperatura. Il termogramma relativo alla TGA mostra un primo gradino a circa 250°C e un secondo gradino a temperature maggiori, circa a 350°C.

Si può osservare come non vi siano variazioni di massa intorno alla temperatura di 100°C, ciò evidenzia che il co-cristallo sia anidro.

Inoltre il confronto tra le due curve rivela una correlazione tra le transizioni termiche rilevate dall'analisi DSC e le variazioni di peso misurate dal TGA.

Infatti la coincidenza tra il primo picco endotermico della DSC e il primo gradino della TGA potrebbe indicare un cambiamento nella struttura cristallina o alla fusione di una componente del co-cristallo a 285°C. Il secondo picco endotermico a 324°C potrebbe suggerire invece una reazione chimica intramolecolare nel co-cristallo o la rottura di legami più forti. Questa seconda transizione risulta confermata dalla perdita di massa associata al secondo gradino della TGA a 350°C.

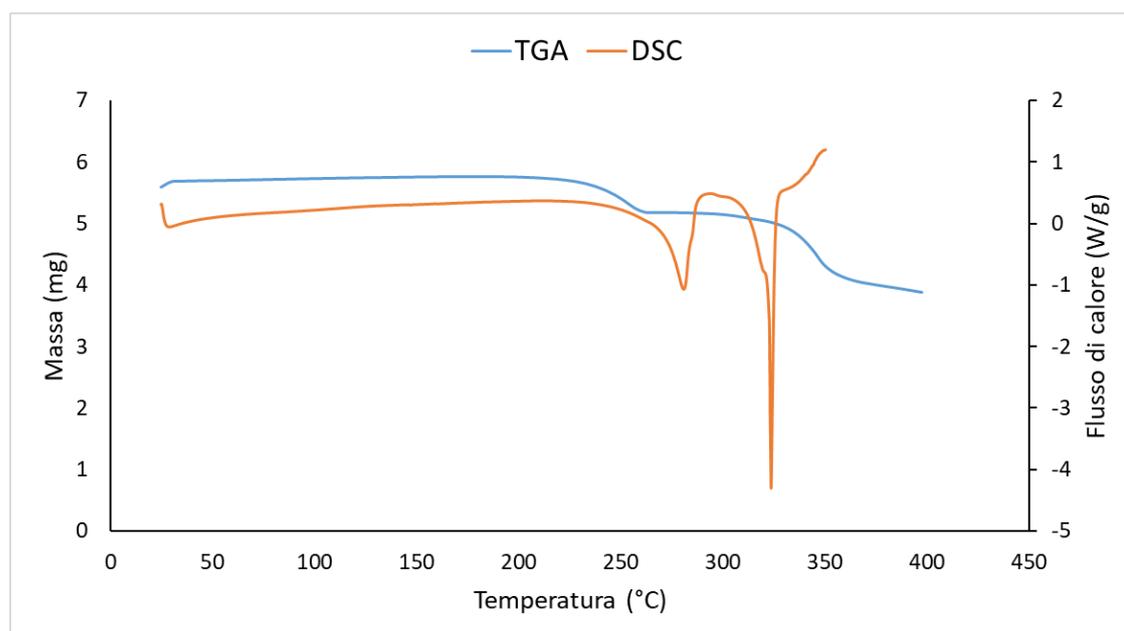


Figura 4. 9 - Confronto tra analisi DSC e TGA del co-cristallo Que-Imi

4.4 Curve di solubilità del co-cristallo Que-Imi

La solubilità del co-cristallo Que-Imi in isopropanolo ed etanolo è stata ricavata grazie all'utilizzo dell'apparecchiatura Crystal16.

Con l'ausilio del software CrystalClear i punti di solubilità sono stati poi adattati all'equazione di van't Hoff per ottenere le curve di solubilità.

Le **Figura 4. 10** e **Figura 4. 11** mostrano la curva di solubilità del co-cristallo Que-Imi rispettivamente in isopropanolo ed etanolo.

Al fine di valutare la stabilità del co-cristallo, i suoi valori di solubilità sono stati confrontati con i valori di solubilità dei reagenti puri, come illustrato nella **Figura 4. 12** e nella **Figura 4. 13**.

A questo scopo si è rivelata necessaria una ricerca in letteratura[56] per trovare i dati di solubilità relativi all'imidazolo nei due solventi presi in considerazione.

Dal confronto è possibile notare che il co-cristallo possiede una minore solubilità in isopropanolo rispetto ai componenti puri. Questa evidenza ha implicazioni importanti. In primo luogo perché l'isopropanolo è il solvente selezionato per la cristallizzazione nell'ottica di ottenere il cristallo singolo. Inoltre la ridotta solubilità indica la formazione di una struttura cristallina maggiormente stabile.

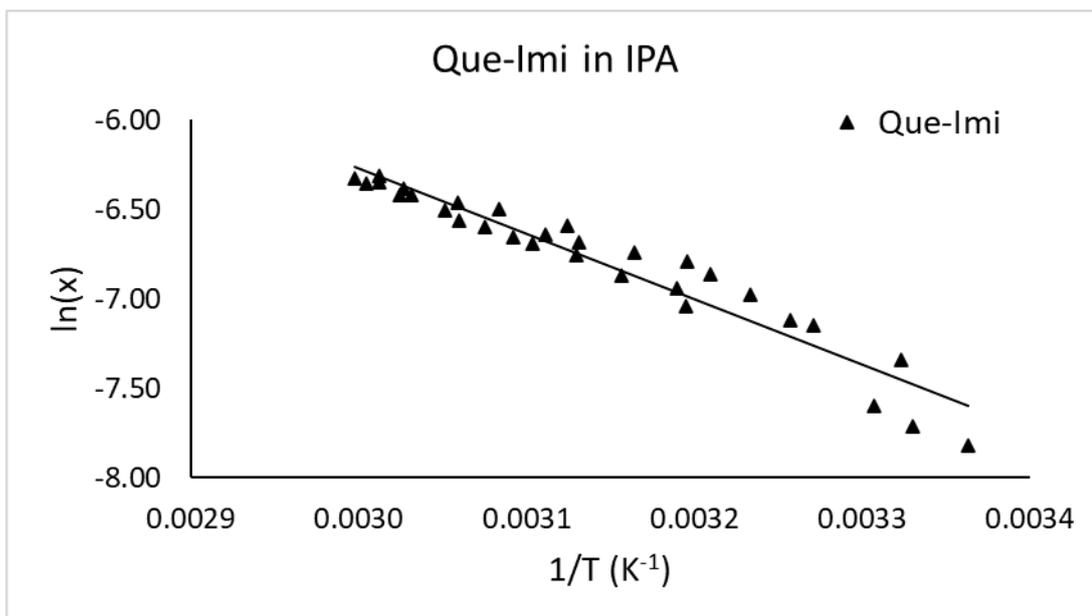


Figura 4. 10 - Grafico di van't Hoff per il co-cristallo Que-Imi in isopropanolo, dove x rappresenta la frazione molare del co-cristallo

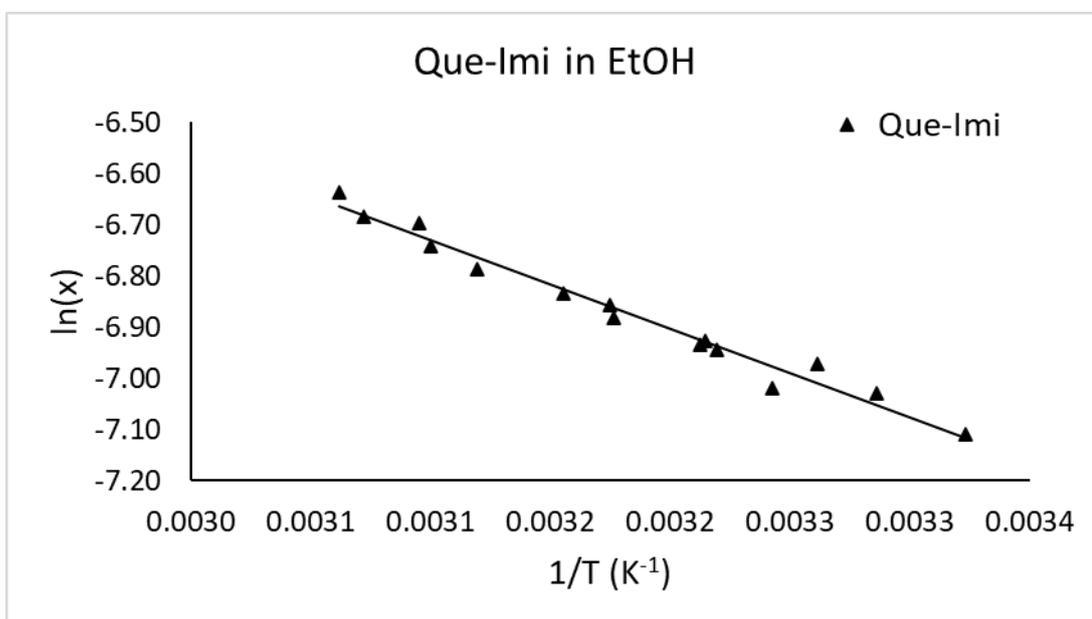


Figura 4. 11 - Grafico di van't Hoff per il co-cristallo Que-Imi in etanolo, dove x rappresenta la frazione molare del co-cristallo

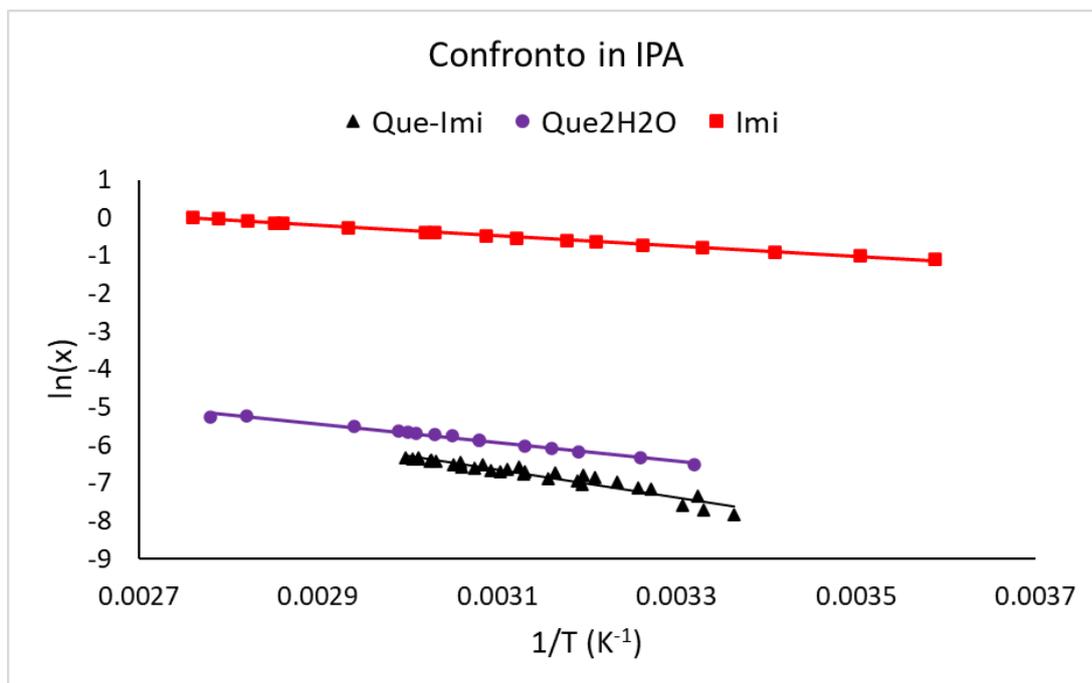


Figura 4. 12 - Grafico di van't Hoff per quercetina diidrata, imidazolo e co-cristallo Que-Imi per il confronto in isopropanolo, dove x rappresenta la frazione molare

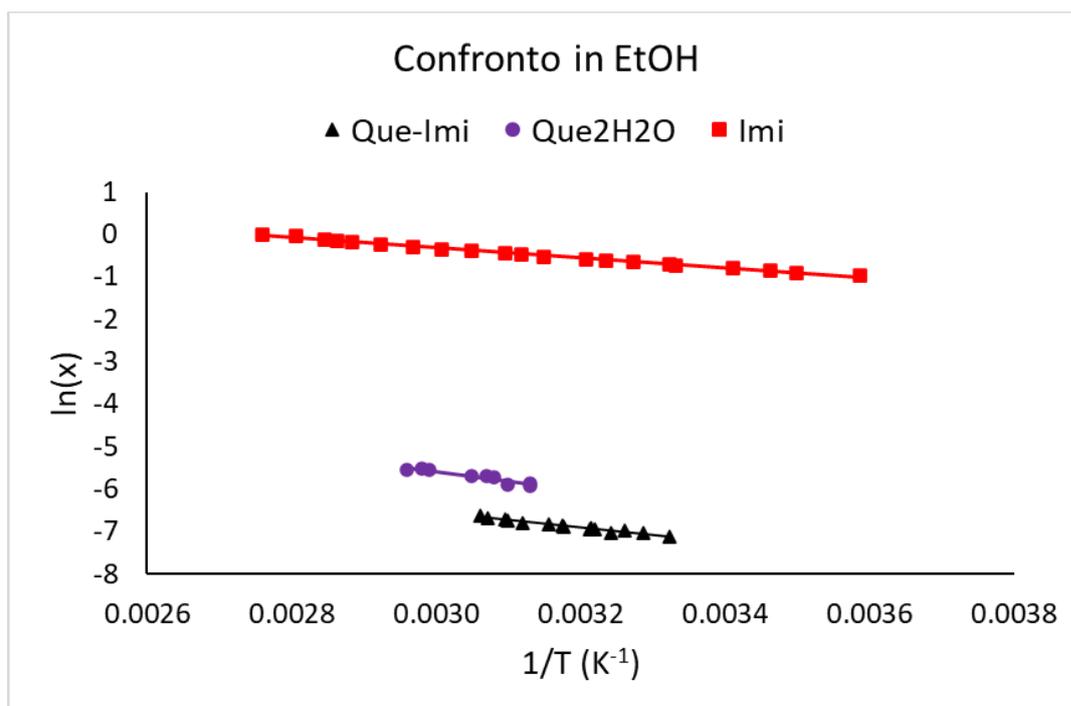


Figura 4. 13 - Grafico di van't Hoff per quercetina diidrata, imidazolo e co-cristallo Que-Imi per il confronto in etanolo, dove x rappresenta la frazione molare

4.5 Esperimenti di cristallizzazione

Nell'ottica di ottenere un cristallo di dimensioni adeguate per studiarlo nel diffrattometro a cristallo singolo sono stati eseguiti diversi esperimenti di cristallizzazione.

4.5.1 Risultati per gli esperimenti di seminazione

I cristallizzatori utilizzati in questi esperimenti sono stati lasciati riposare sia sottocappa che in frigorifero. A seguito della completa evaporazione del solvente i cristalli ottenuti sono stati raccolti. Per valutare la morfologia dei cristalli a seguito dell'esperimento sono state effettuate analisi al microscopio ottico.

Come è possibile osservare dalla **Figura 4. 14** la cristallizzazione mediante seminazione non ha prodotto i risultati sperati. Infatti non sono stati ottenuti cristalli più grandi, ma con una struttura cristallina caratterizzata da cristalli allungati e sottili.

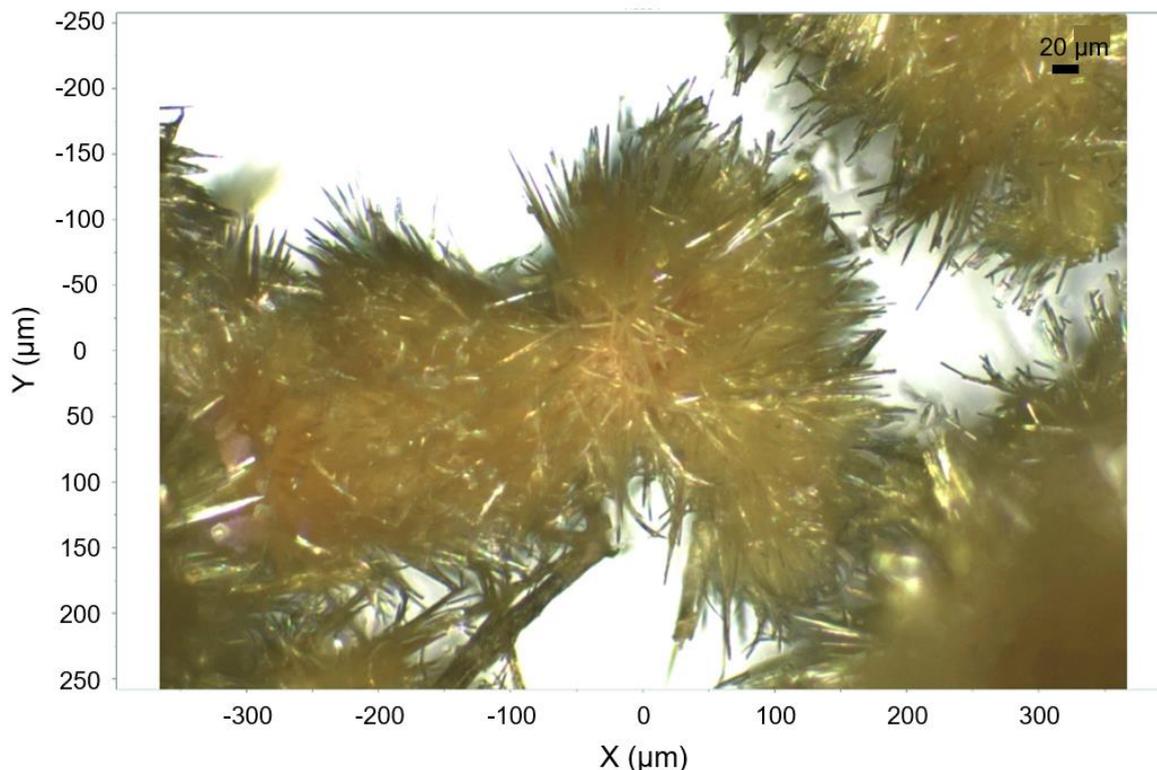


Figura 4. 14 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di seminazione

4.5.2 Risultati per gli esperimenti attraverso cicli di temperatura

Anche in questo caso, la serie di esperimenti eseguiti non ha prodotto i risultati desiderati.

Contrariamente a ciò che si aspettava, durante il ciclo di raffreddamento, il materiale precedentemente presente in sospensione rimaneva disciolto in soluzione invece di precipitare sotto forma di cristalli di dimensioni maggiori.

Le possibili cause di questo comportamento possono risiedere in:

- **soprasaturazione insufficiente:** è possibile che il livello di soprasaturazione scelto negli esperimenti non fosse adeguato per promuovere la crescita dei cristalli durante i cicli di temperatura;
- **parametri dei cicli di temperatura inadeguati:** è possibile che parametri come la velocità di riscaldamento o raffreddamento selezionati fossero inappropriati per favorire la crescita dei cristalli.

4.5.3 Risultati per gli esperimenti di raffreddamento veloce e lento

Questi esperimenti sono stati condotti al fine di valutare l'influenza della velocità di raffreddamento durante il processo di cristallizzazione per il co-cristallo Que-Imi in due solventi: etanolo e isopropanolo.

Sono state scelte due differenti velocità di raffreddamento, una pari a $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ per indicare un raffreddamento veloce e una pari a $-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ per valutare un raffreddamento lento.

La morfologia dei cristalli ottenuti è stata esaminata utilizzando un microscopio ottico.

Utilizzando isopropanolo come solvente di cristallizzazione non sono state osservate differenze significative nelle dimensioni dei cristalli tra i campioni sottoposti a raffreddamento veloce e lento (**Figura 4. 15, Figura 4. 16, Figura 4. 17 e Figura 4. 18**).

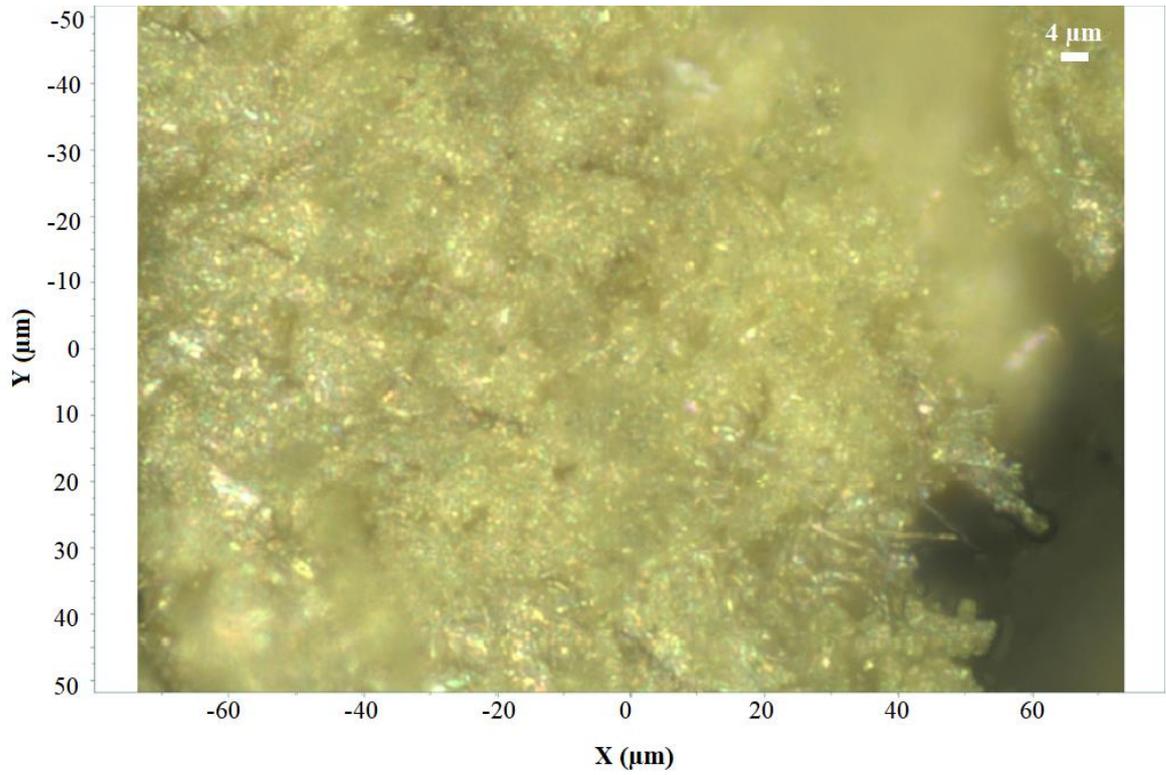


Figura 4. 15 - Esperimento di raffreddamento veloce in IPA

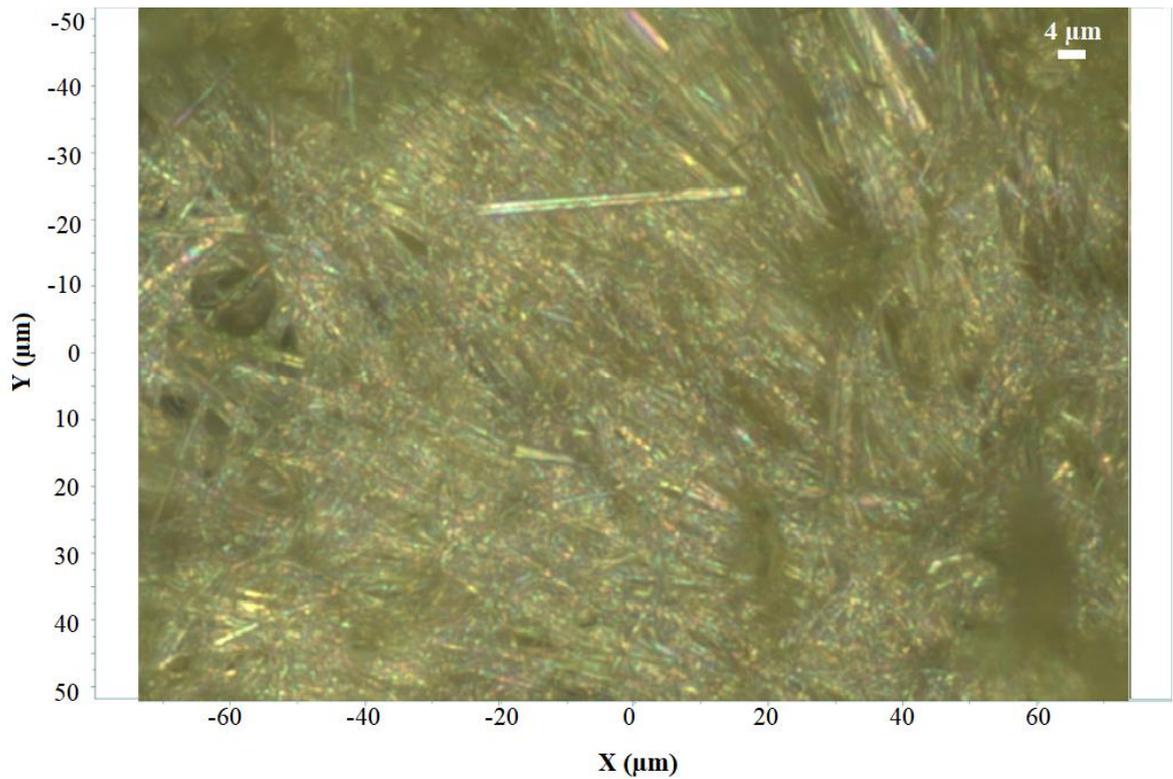


Figura 4. 16 - Esperimento di raffreddamento lento in IPA

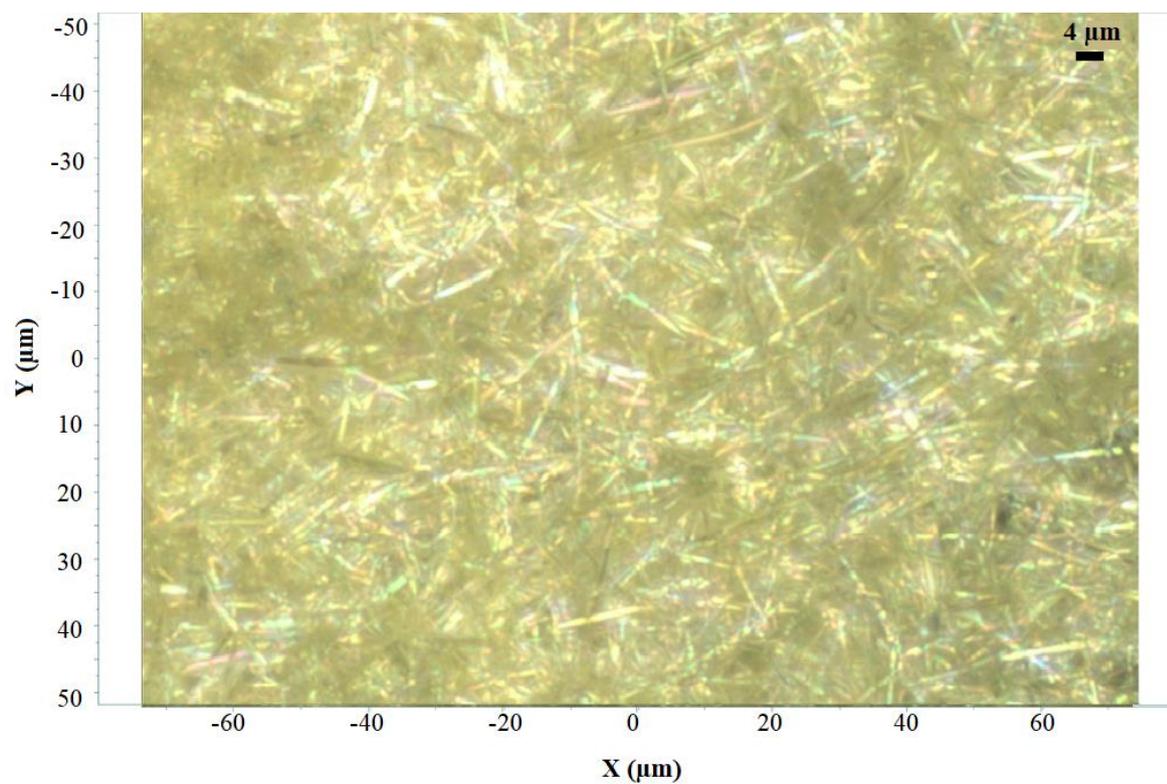


Figura 4. 17 -Esperimento di raffreddamento veloce in IPA

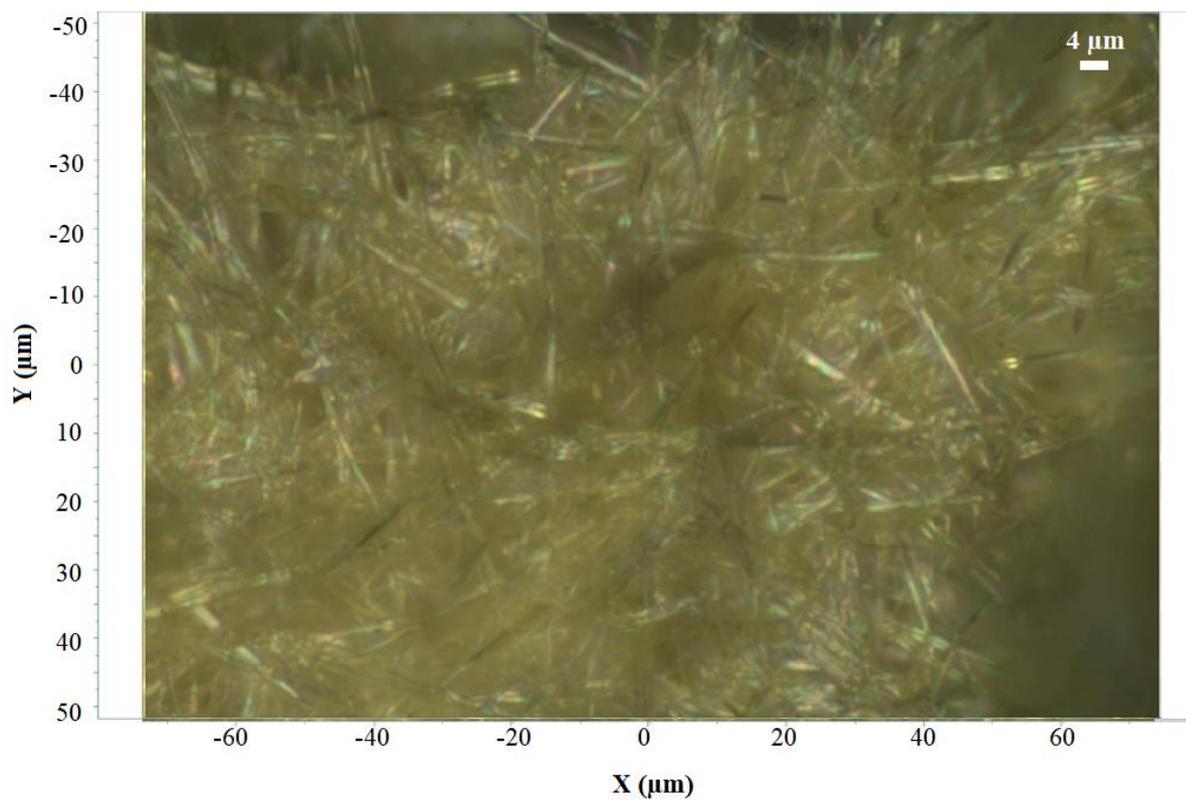


Figura 4. 18 -Esperimento di raffreddamento lento in IPA

Utilizzando etanolo come solvente di cristallizzazione, invece, il raffreddamento veloce ha prodotto cristalli di piccole dimensioni, mentre cristalli più grandi sono stati ottenuti a seguito di un riscaldamento lento (Figura 4. 19, Figura 4. 20, Figura 4. 21 e Figura 4. 22).

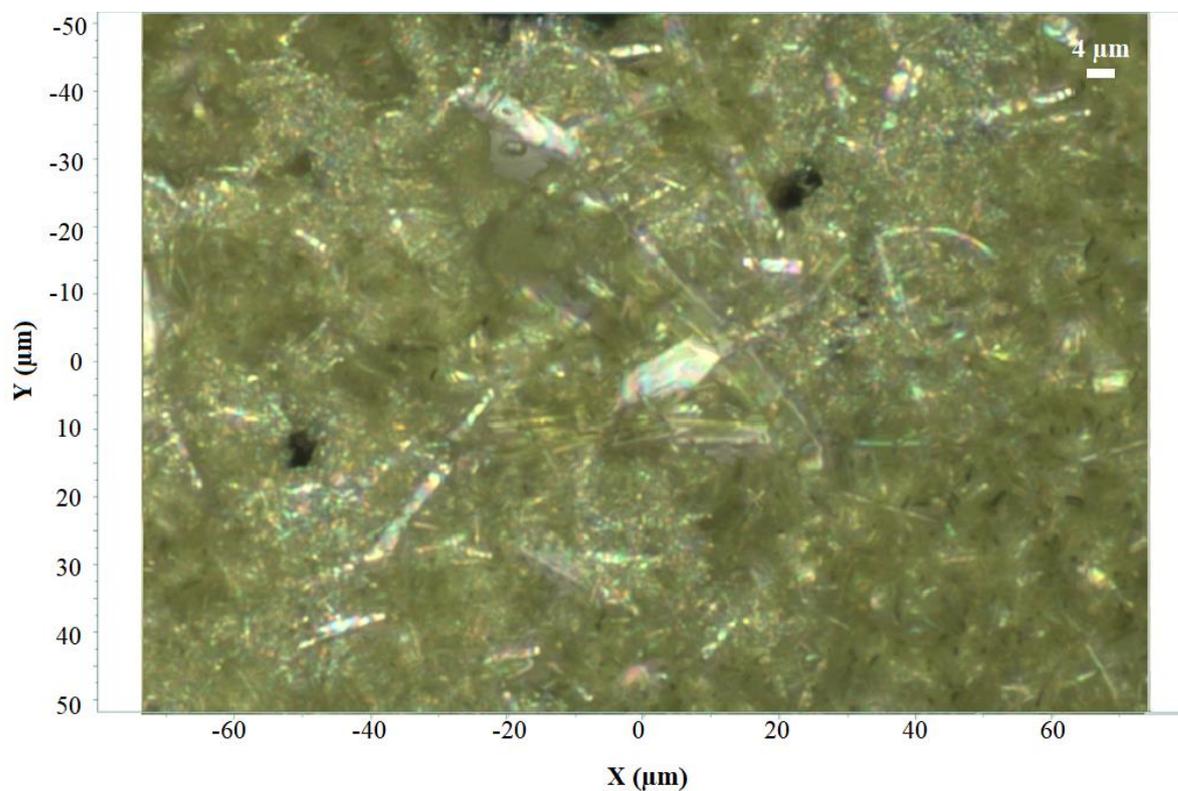


Figura 4. 19 - Esperimento di raffreddamento veloce in EtOH

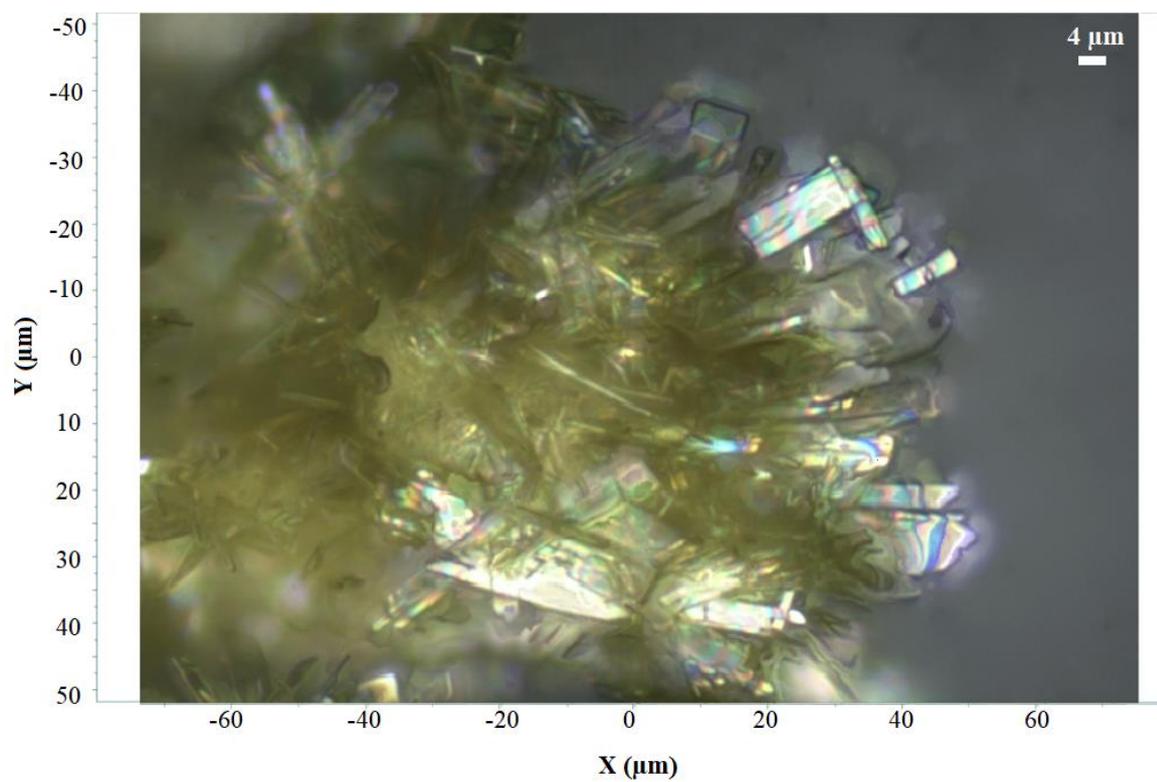


Figura 4. 20 - Esperimento di raffreddamento lento in EtOH

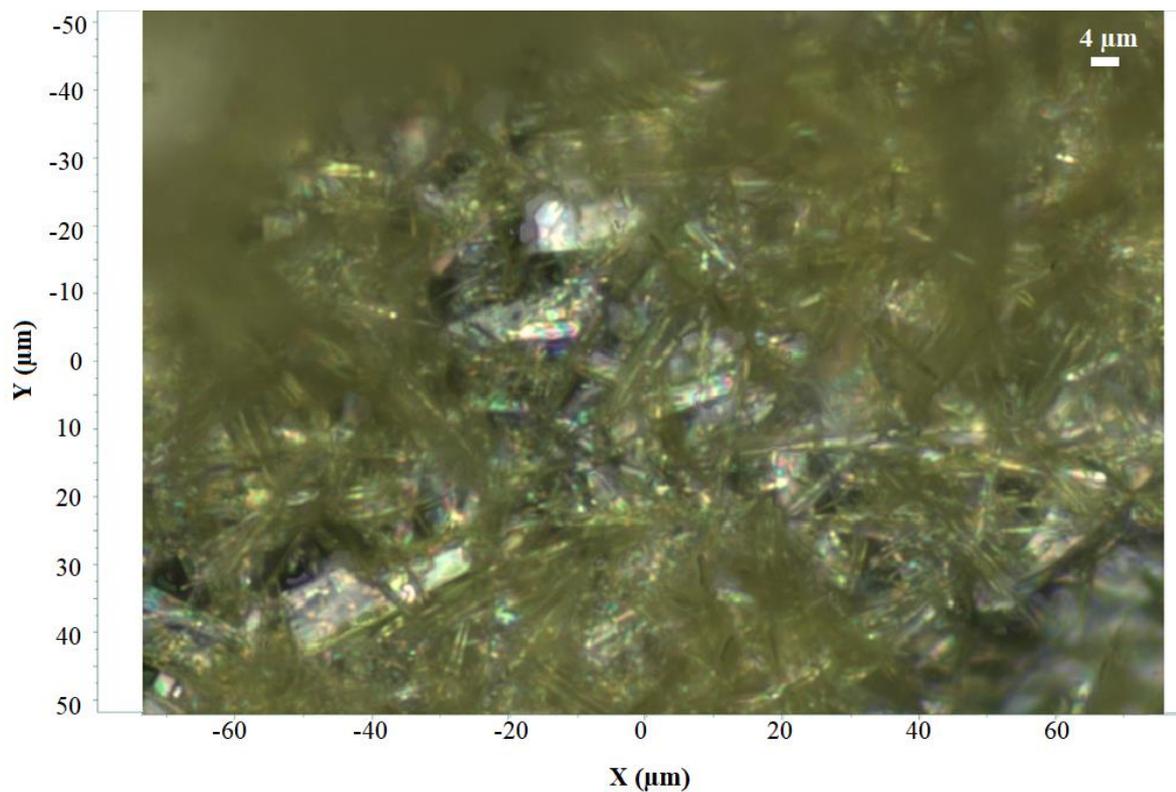


Figura 4. 21 - Esperimento di raffreddamento veloce in EtOH

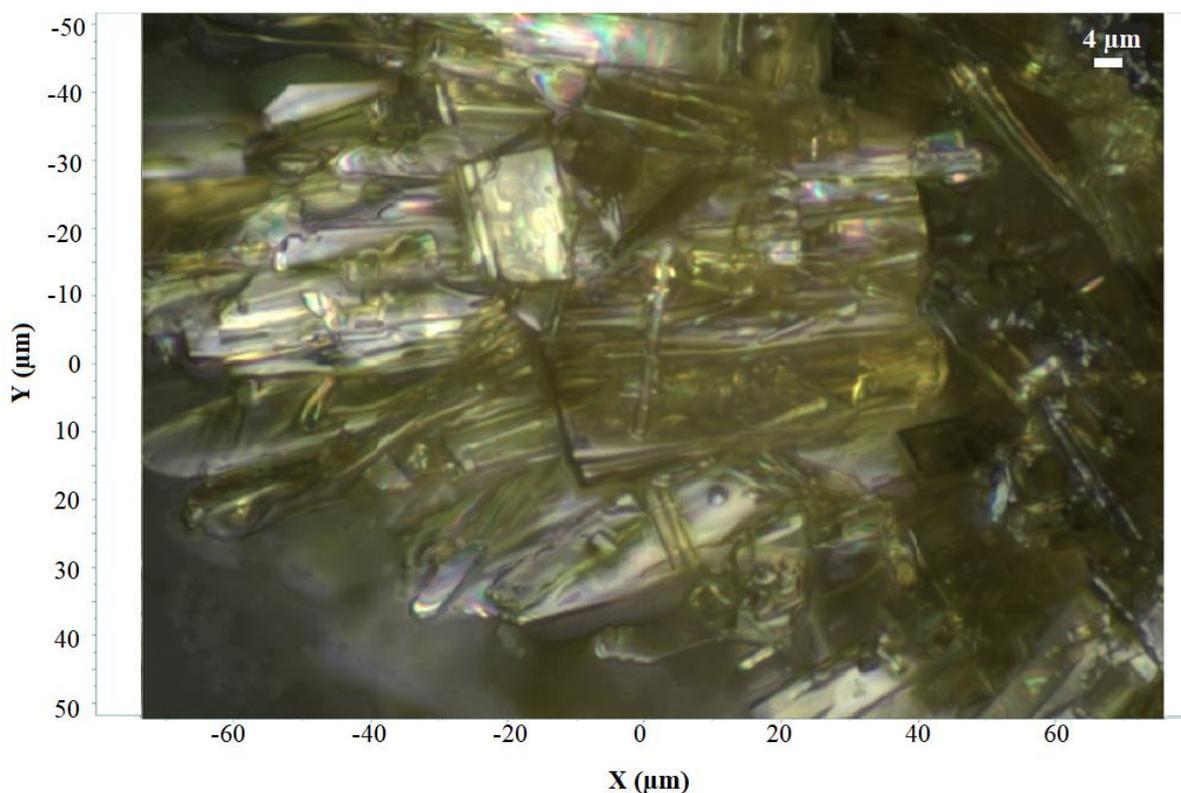


Figura 4. 22 - Esperimento di raffreddamento lento in EtOH

I risultati indicano che nelle cristallizzazioni in isopropanolo la velocità di raffreddamento sembra avere un'influenza limitata sulla dimensione dei cristalli. Invece le cristallizzazioni mediante raffreddamento lento in etanolo hanno prodotto, come ci si aspetta, cristalli di più grandi dimensioni rispetto alle cristallizzazioni sottoposte a raffreddamento veloce. Tuttavia, i cristalli più grandi non hanno raggiunto dimensioni adeguate a sottoporli alla diffrattometria a cristallo singolo.

4.5.4 Risultati per gli esperimenti di evaporazione del solvente

Negli esperimenti di cristallizzazione mediante evaporazione del solvente sono stati testati diversi solventi. Le immagini catturate al microscopio ottico hanno permesso di individuare il solvente maggiormente adatto.

Nelle **Figure 4. 23**, **4. 24**, **4. 25** e **4. 26** sono presenti alcune delle immagini ottenute. Come è possibile osservare le cristallizzazioni in solventi come cloroformio e acetonitrile

(Figura 4. 23 e Figura 4. 24) hanno prodotto numerosi cristalli ma sotto forma di aggregati, il che li rende inadeguati a sottoporli a diffrazione a cristallo singolo.

Le cristallizzazioni in metanolo hanno portato alla formazione di cristalli di colore insolito (Figura 4. 25). Questi cristalli appaiono di colore ocra/marrone, il che indica che il metanolo potrebbe influenzare la struttura o la purezza del composto e per questo motivo non si sono portati avanti altri esperimenti con tale solvente.

La Figura 4. 26 mostra i cristalli ottenuti a seguito dell'evaporazione di isopropanolo. Dall'immagine si può osservare che questo solvente ha permesso di ottenere un cristallo di dimensione adeguate nell'ottica di studiarlo al diffrattometro a cristallo singolo.

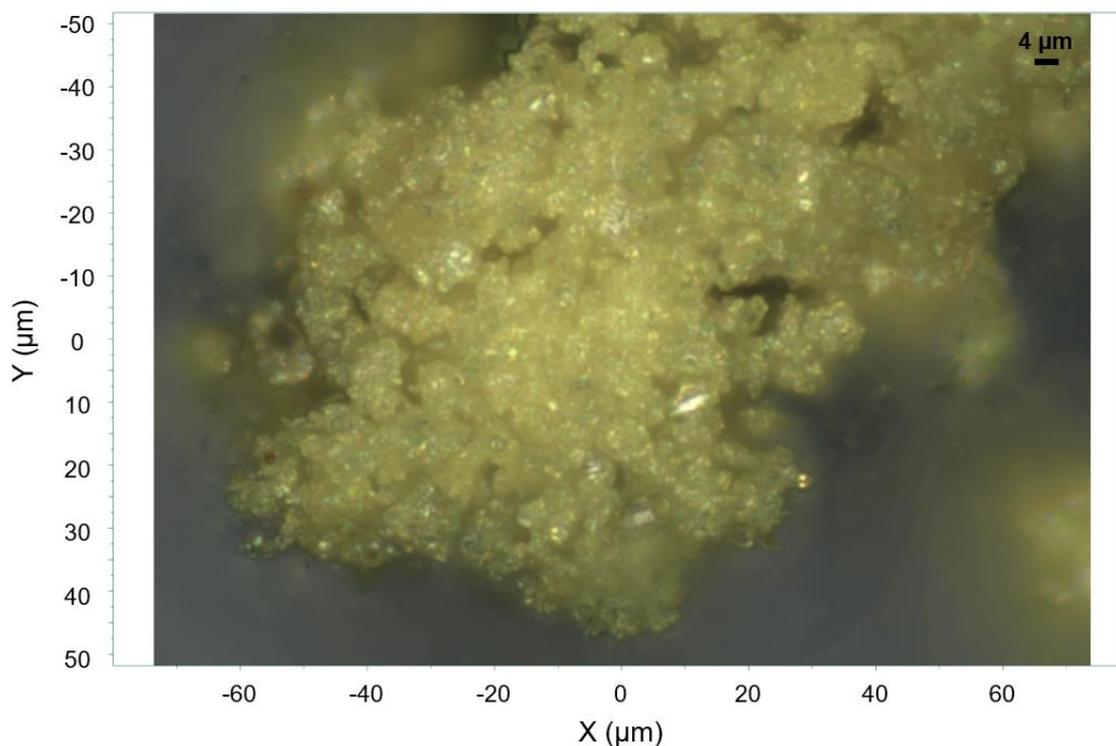


Figura 4. 23 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di cristallizzazione in cloroformio

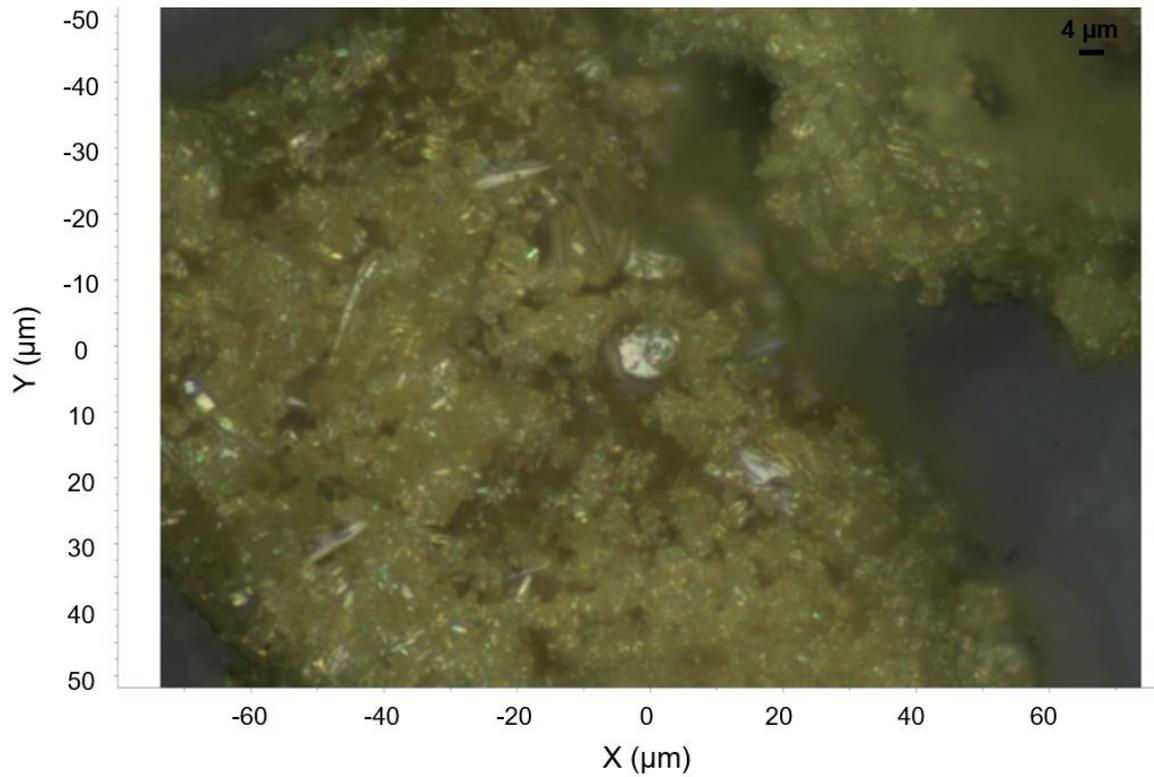


Figura 4. 24 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di cristallizzazione in acetonitrile

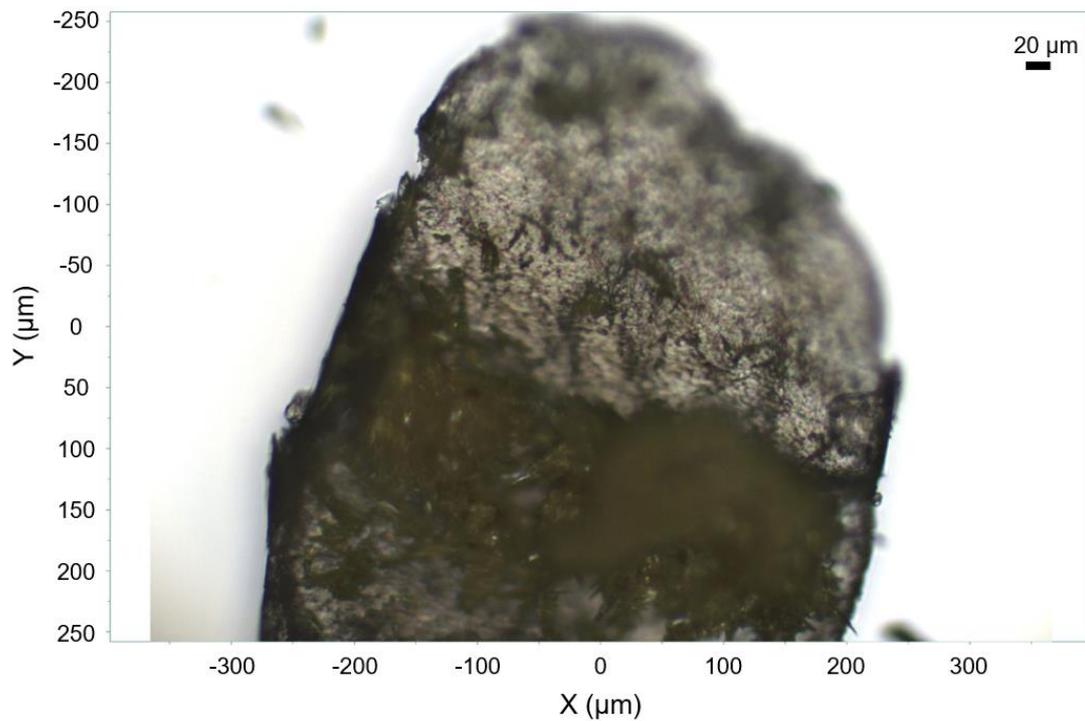


Figura 4. 25 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di cristallizzazione in metanolo

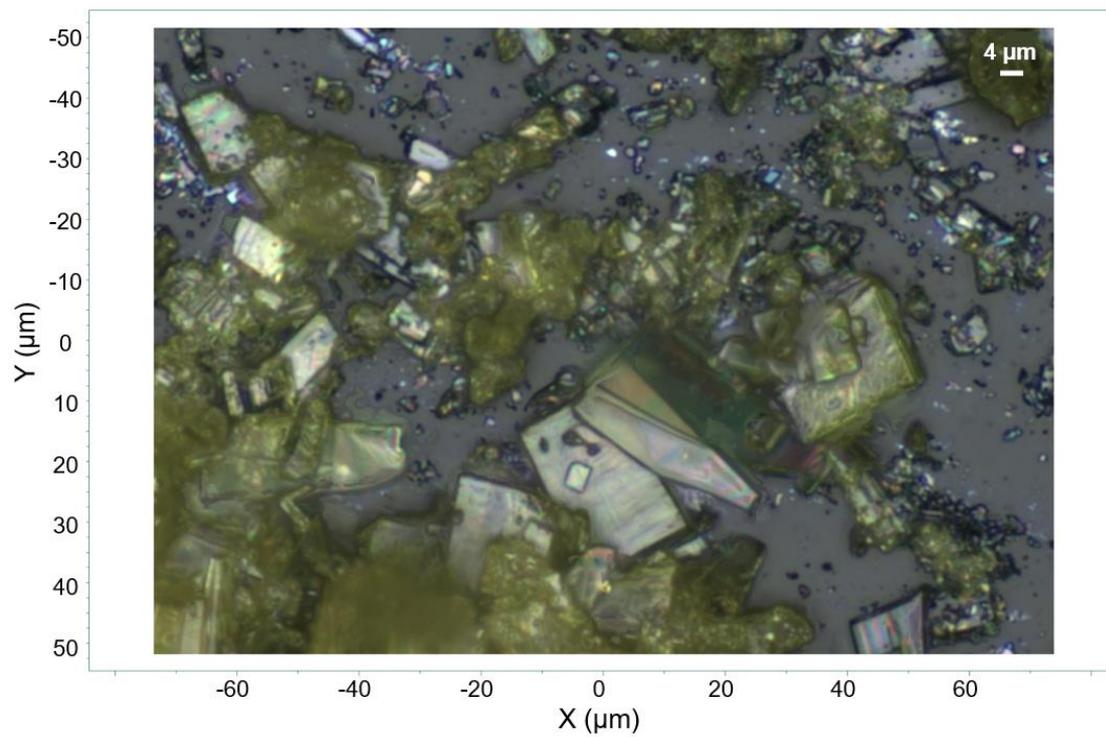


Figura 4. 26 - Immagine al microscopio ottico del cristallo ottenuto a seguito di esperimenti di cristallizzazione in isopropanolo

4.6 Risultati per diffrattometria da cristallo singolo e risoluzione della struttura cristallina di Que-Imi

I cristalli singoli mostrati in **Figura 4. 27**, sono stati utilizzati per le misure di diffrazione da cristallo singolo con lo scopo di risolvere la struttura cristallina del nuovo co-cristallo.



Figura 4. 27 - Cristallo di Que-Imi montato su capillare di vetro per analisi SXRD

La struttura molecolare del co-cristallo di Que-Imi è riportata in **Figura 4. 28**.

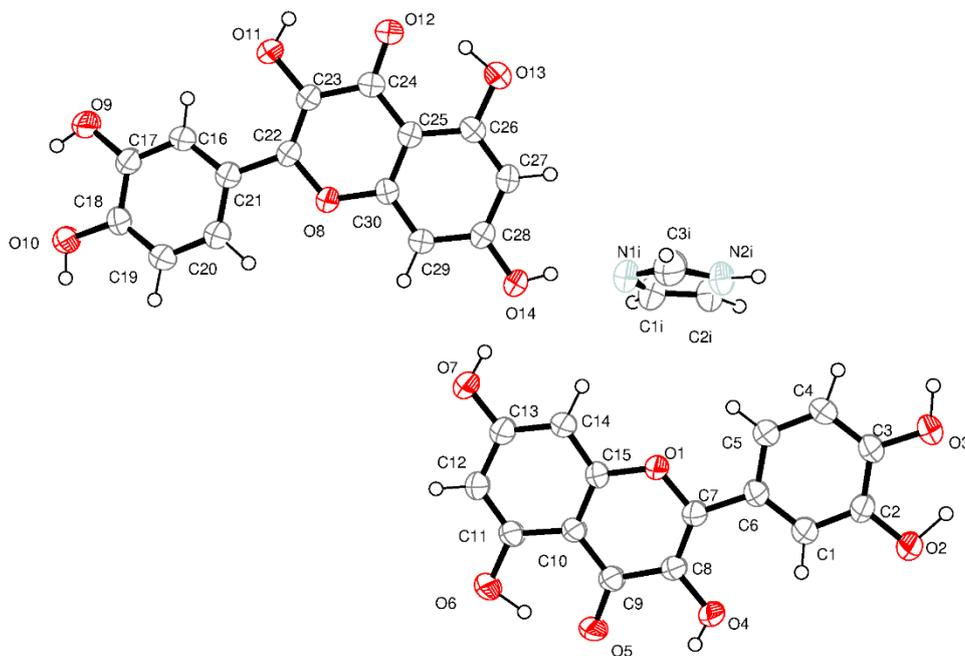


Figura 4. 28 - Struttura molecolare a raggi X del co-cristallo Que-Imi rappresentato in ORTEP

Que-Imi cristallizza nel gruppo spaziale triclino *P*-1 con due molecole di quercetina e una di imidazolo nell'unità asimetrica. I dati cristallografici sono riportati in **Tabella 2 Appendice**. L'anello fenilico e l'anello pironico sono pressochè planari formando un angolo diedro intorno al legame covalente C7-C6 di 4.71(4)° e di 9.10(3)° intorno al legame covalente C16-C22. Questi valori sono molto vicini a quelli riportati dalle strutture di quercetina idrate e con solvati in cui la presenza di altre molecole oltre la quercetina favorisce una conformazione planare dell'intero scheletro molecolare. Le distanze di legame tra gli atomi sono caratteristiche di sistemi aromatici coniugati. Le molecole sono arrangiate in nastri infiniti planari lungo l'asse *a* attraverso la formazione di forti legami ad idrogeno che si instaurano tra forti donatori O-H della quercetina ed N-H dell'imidazolo con forti atomi accettori azoto e ossigeno (**Figura 4. 29**), nell'intervallo tra 1.742-2.043 Å.

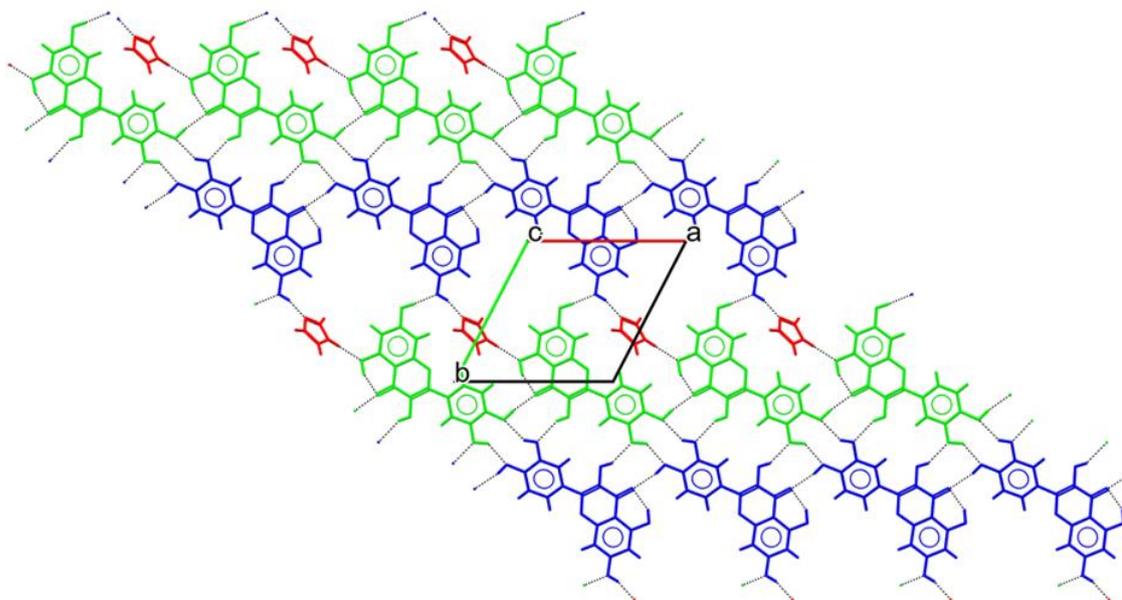


Figura 4. 29 - Impacchettamento cristallino del co-cristallo Que-Imi. Vista lungo l'asse *c*. Legami ad idrogeno identificati con linee tratteggiate nere. Le molecole sono colorate per equivalenza simmetrica.

Si formano in questo modo dei motivi supramolecolari eteroatomici ciclici lungo tutto il nastro cristallografico. I due gruppi fenilici O6-H e O13-H instaurano un'interazione intramolecolare col gruppo carbossilico rispettivamente del valore di 1.633(3) e 1.751(4) Å, caratteristico del sistema quercetina. Le molecole di quercetina si impilano lungo l'asse *c* con una distanza che ricade nell'intervallo tra 3.366(8) e 3.399(3) Å, come mostrato in **Figura 4. 30**.

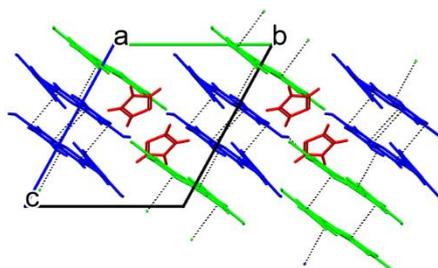


Figura 4. 30 - Impacchettamento cristallino del co-cristallo Que-Imi. Vista lungo l'asse *a*. Distanza di stacking indicata con linee tratteggiate nere. Le molecole sono colorate per equivalenza simmetrica.

4.7 Risultati per le prove di co-cristallizzazione di quercetina e acido ferulico

I campioni di co-cristallizzazione tra quercetina e acido ferulico sono stati sottoposti ad analisi tramite la spettroscopia Raman al fine di valutare la formazione di nuovi co-cristalli. È emerso che solamente il campione Que-FA in rapporto 1:1 in acetonitrile ha prodotto risultati incoraggianti. Nella **Figura 4. 31** viene mostrato il confronto degli spettri Raman tra questo campione e gli spettri dei componenti puri. Inoltre nella **Figura 4. 32** viene mostrato un ingrandimento nella regione compresa tra 1050 e 1700 cm^{-1} .

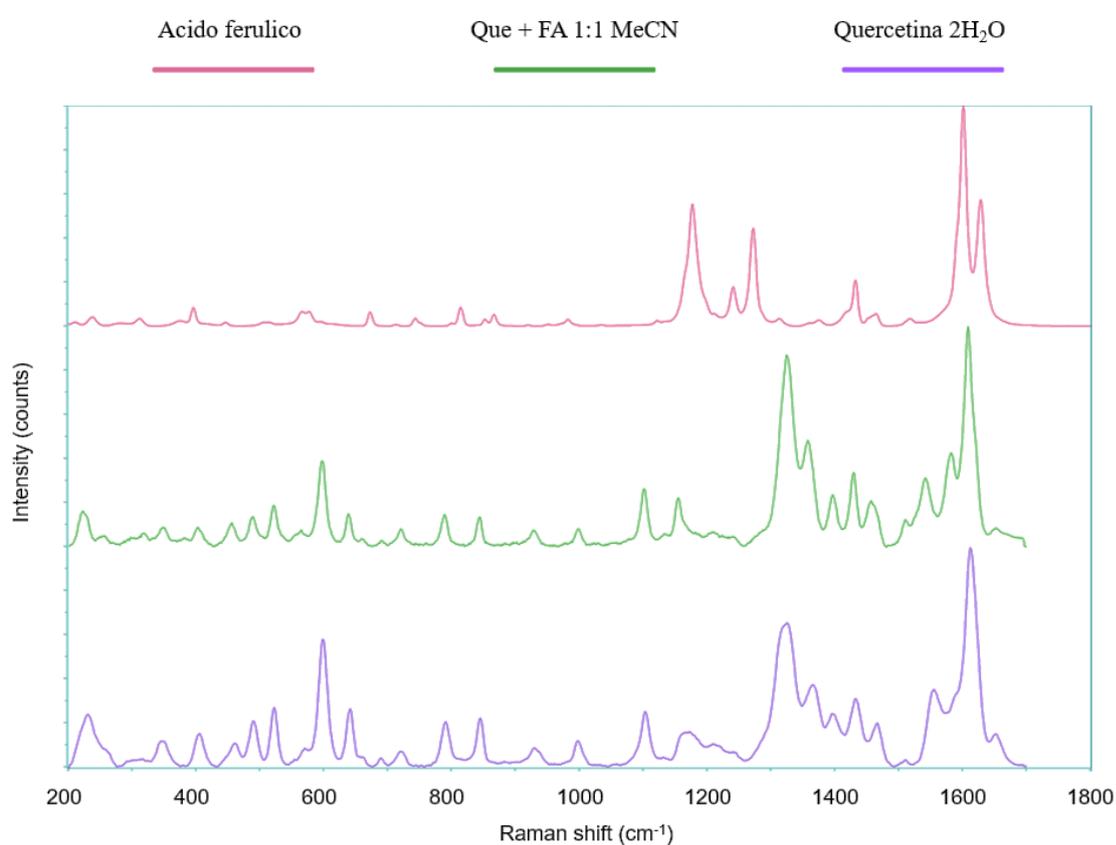


Figura 4. 31 - Confronto tra spettri Raman di quercetina diidrata, imidazolo e campione Que-FA in rapporto 1:1 in acetonitrile

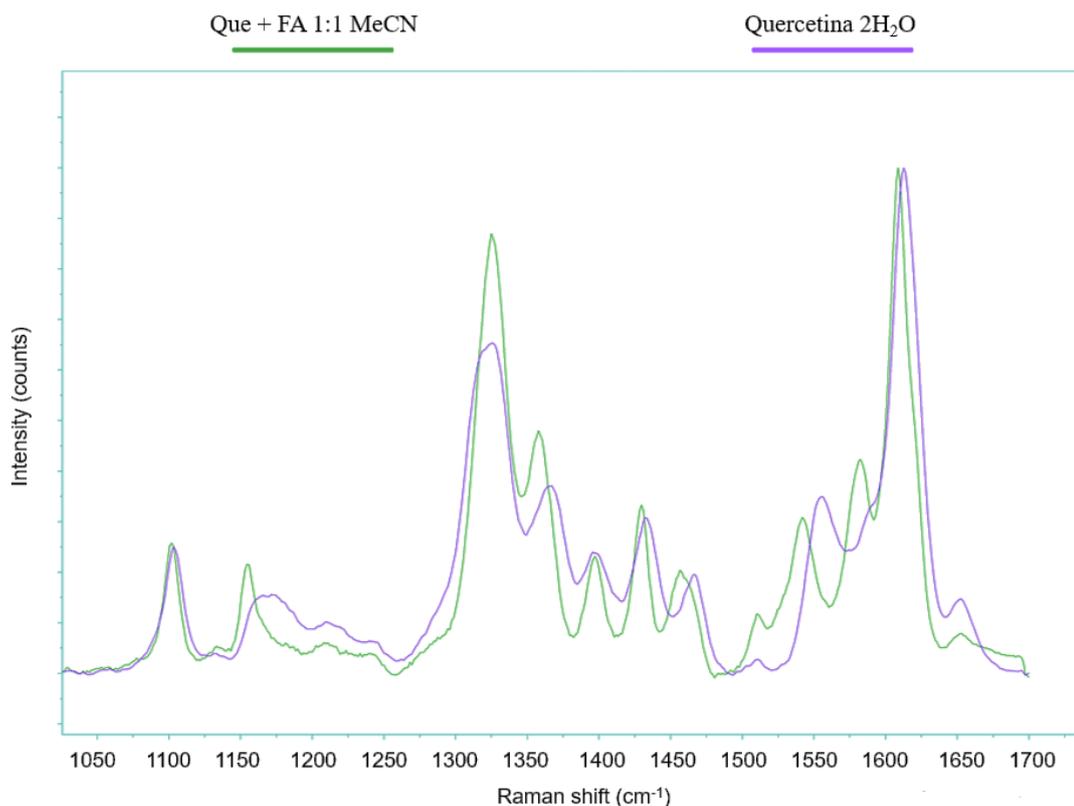


Figura 4. 32 - Ingrandimento della regione compresa tra 1050 e 1700 cm⁻¹ per gli spettri di quercetina diidrata e campione Que-FA in rapporto 1:1 in acetonitrile

Il confronto rivela che lo spettro Raman del campione Que-FA mostra la presenza di picchi spostati e nuovi picchi che non sono riconducibili ai singoli reagenti. Nello specifico si possono osservare spostamenti nelle regioni comprese tra 1150 e 1200 cm⁻¹, tra 1350 e 1400 cm⁻¹ e tra 1500 e 1600 cm⁻¹. Inoltre a 1550 cm⁻¹ si può notare la presenza di un nuovo picco non riconducibile alla quercetina diidrata pura. Queste evidenze sono un'indicazione della possibile formazione di nuovo co-cristallo che richiederanno ulteriori analisi di caratterizzazione per poter essere confermate.

5. Conclusioni

Il presente progetto di tesi ha mirato alla formazione di nuovo co-cristallo di quercetina non ancora descritto in letteratura, utilizzando l'approccio dell'ingegneria cristallina. Tale disciplina risulta essere vantaggiosa in quanto consente la produzione di materiali cristallini con proprietà specifiche, evitando lo spreco di risorse e riducendo il tempo sperimentale.

La scelta della quercetina è stata motivata dai numerosi benefici terapeutici che essa presenta. Tuttavia, la sua efficacia risulta compromessa a causa della bassa solubilità che influisce negativamente anche sulla sua biodisponibilità orale.

La ricerca si è dunque proposta nell'ottenimento di tre nuovi co-cristalli di quercetina, al fine di migliorarne le proprietà chimico-fisiche, utilizzando i seguenti *co-former*: imidazolo, acido ferulico e acido 4-amminobenzoico.

Un nuovo co-cristallo di quercetina con imidazolo è stato ottenuto e ampiamente caratterizzato. Il successo della formazione del co-cristallo è stato confermato da analisi di diffrazione dei raggi X su polveri, spettroscopia Raman e analisi termiche.

Le analisi termogravimetriche e di calorimetria a scansione differenziale hanno inoltre rivelato che il co-cristallo Que-Imi presenta un punto di fusione ad una temperatura maggiore rispetto alla quercetina pura, identificando così una forma con maggiore stabilità termica.

La co-cristallizzazione è avvenuta mediante mescolamento di soluzioni soppasature. Questo metodo di sintesi risulta essere relativamente facile da scalare a livello industriale, tenendo conto di scegliere adeguatamente i parametri di processo per garantire una produzione efficiente.

La risoluzione della struttura cristallina di Que-Imi è stata possibile mediante diffrazione dei raggi X da cristallo singolo.

L'ottenimento del cristallo singolo è stato raggiunto in seguito ad esperimenti di cristallizzazione per evaporazione, utilizzando l'isopropanolo come solvente.

Capitolo 5. Conclusioni

Inoltre gli studi svolti sulla solubilità del co-cristallo evidenziano l'ottenimento di una struttura cristallina maggiormente stabile a causa dei valori di solubilità minori rispetto ai reagenti puri.

Anche se il co-cristallo di quercetina e acido ferulico non è stato completamente confermato, le analisi di spettroscopia Raman sui campioni di co-cristallizzazione ottenuti suggeriscono la formazione di una nuova forma cristallina. Questi risultati sono incoraggianti per ulteriori ricerche future.

Per comprendere le prestazioni del co-cristallo quercetina-imidazolo, sarebbe inoltre utile condurre studi di dissoluzione in acqua per valutarne la solubilità e la biodisponibilità. Inoltre, approfondire gli studi sulle proprietà di superficie del co-cristallo potrebbe fornire informazioni cruciali sulla sua stabilità e interazioni molecolari, influenzando la sua applicabilità in ambiti farmaceutici e industriali.

Bibliografia

- [1] G. R. Desiraju, "Crystal engineering: From molecule to crystal," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 27, pp. 9952–9967, 2013, doi: 10.1021/ja403264c.
- [2] G. R. Desiraju, "Crystal engineering: A brief overview," *J. Chem. Sci.*, vol. 122, no. 5, pp. 667–675, 2010, [Online]. Available: <http://www.mindmeister.com/maps/show/68063347>.
- [3] A. K. Nangia and G. R. Desiraju, "Crystal Engineering: An Outlook for the Future," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 58, no. 13, pp. 4100–4107, 2019, doi: 10.1002/anie.201811313.
- [4] D. Guan *et al.*, "Improving the Physicochemical and Biopharmaceutical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients Derived from Traditional Chinese Medicine through Cocrystal Engineering," *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 12, pp. 1–35, 2021.
- [5] R. Shaikh, R. Singh, G. M. Walker, and D. M. Croker, "Pharmaceutical Cocrystal Drug Products : An Outlook on Product Development," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 39, no. 12, pp. 1–16, 2018, doi: 10.1016/j.tips.2018.10.006.
- [6] D. Braga, "Crystal engineering, Where from? Where to?," *Chem. Commun.*, vol. 3, no. 22, pp. 2751–2754, 2003, doi: 10.1039/b306269b.
- [7] G. Bolla, B. Sarma, and A. K. Nangia, "Crystal engineering and pharmaceutical crystallization," in *Hot Topics in Crystal Engineering*, K. Rissanen, Ed. Elsevier, 2021, pp. 157–229.
- [8] G. Bolla, B. Sarma, and A. K. Nangia, "Crystal Engineering of Pharmaceutical Cocrystals in the Discovery and Development of Improved Drugs," *Chem. Rev.*, vol. 122, no. 13, pp. 11514–11603, 2022, doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00987.
- [9] J. Anwar and D. Zahn, "Uncovering Molecular Processes in Crystal Nucleation and Growth by Using Molecular Simulation," *Angew. Chemie (International ed.)*, vol. 50, no. 9, pp. 1996–2013, 2011, doi: 10.1002/anie.201000463.
- [10] M. W. Anderson *et al.*, "Understanding crystal nucleation mechanisms : where do we stand ? General discussion," *Faraday Discuss.*, vol. 235, no. 219, pp. 219–272, 2022, doi: 10.1039/d2fd90021a.
- [11] N. Blagden, M. de Matas, P. T. Gavan, and P. York, "Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 7, pp. 617–630, 2007, doi: 10.1016/j.addr.2007.05.011.
- [12] J. Stojakovic and L. R. MacGillivray, "Cocrystals and Templates to Control Solid-State [2+2] Photodimerizations," in *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*, 2nd ed., vol. 7, Elsevier Ltd, 2017, pp. 73–87.
- [13] R. Thakuria and B. Sarma, "Drug-drug and drug-nutraceutical cocrystal/salt as alternative medicine for combination therapy: A crystal engineering approach," *Crystals*, vol. 8, no. 2, pp. 1–39, 2018, doi: 10.3390/cryst8020101.
- [14] N. Qiao, M. Li, W. Schlindwein, N. Malek, A. Davies, and G. Trappitt, "Pharmaceutical cocrystals: An overview," *Int. J. Pharm.*, vol. 419, no. 1–2, pp. 1–11, 2011, doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.07.037.

- [15] A. V. Yadav, A. S. Shete, A. P. Dabke, P. V. Kulkarni, and S. S. Sakhare, "Co-crystals: A novel approach to modify physicochemical properties of active pharmaceutical ingredients," *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 71, no. 4, pp. 359–370, 2009, doi: 10.4103/0250-474X.57283.
- [16] S. A. Tupe, S. P. Khandagale, and A. B. Jadhav, "Pharmaceutical Cocrystals: An Emerging Approach to Modulate Physicochemical Properties of Active Pharmaceutical Ingredients," *J. Drug Deliv. Ther. Open*, vol. 13, no. 4, pp. 101–112, 2023.
- [17] S. Aitipamula *et al.*, "Polymorphs, Salts, and Cocrystals: What 's in a Name?," *Cryst. Growth Des.*, vol. 12, pp. 2147–2152, 2012.
- [18] P. C. Vioglio, M. R. Chierotti, and R. Gobetto, "Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 117, no. 1, pp. 86–110, 2017, doi: 10.1016/j.addr.2017.07.001.
- [19] A. S. Sinha, U. B. Rao Khandavilli, E. L. O'Connor, B. J. Deadman, A. R. Maguire, and S. E. Lawrence, "Novel co-crystals of the nutraceutical sinapic acid," *CrystEngComm*, vol. 17, no. 26, pp. 4832–4841, 2015, doi: 10.1039/c5ce00777a.
- [20] M. Karimi-Jafari, L. Padrela, G. M. Walker, and D. M. Croker, "Creating cocrystals: A review of pharmaceutical cocrystal preparation routes and applications," *Cryst. Growth Des.*, vol. 18, no. 10, pp. 6370–6387, 2018, doi: 10.1021/acs.cgd.8b00933.
- [21] N. Pawar, A. Saha, N. Nandan, and J. V. Parambil, "Solution cocrystallization: A scalable approach for cocrystal production," *Crystals*, vol. 11, no. 303, pp. 1–18, 2021, doi: 10.3390/cryst11030303.
- [22] M. Veverka *et al.*, "Cocrystals of quercetin: Synthesis, characterization, and screening of biological activity," *Monatshfte fur Chemie*, vol. 146, no. 1, pp. 99–109, 2015, doi: 10.1007/s00706-014-1314-6.
- [23] J. Xu *et al.*, "Recent Advances in Pharmaceutical Cocrystals: A Focused Review of Flavonoid Cocrystals," *Molecules*, vol. 28, no. 613, pp. 1–20, 2023, doi: 10.3390/molecules28020613.
- [24] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra, "Flavonoids: An overview," *J. Nutr. Sci.*, vol. 5, no. 47, pp. 1–15, 2016, doi: 10.1017/jns.2016.41.
- [25] U. Maciołek, E. Mendyk, M. Kuśmierz, and A. E. Koziół, "Binary Co-Crystals of Quercetin: Synthesis, Structure, and Spectroscopic Characterization," *Chempluschem*, vol. 88, no. 7, pp. 1–14, 2023, doi: 10.1002/cplu.202300166.
- [26] P. Klitou *et al.*, "Navigating the Complex Solid Form Landscape of the Quercetin Flavonoid Molecule," *Cryst. Growth Des.*, vol. 23, no. 8, pp. 6034–6045, 2023, doi: 10.1021/acs.cgd.3c00584.
- [27] L. Fabian, "Cambridge Structural Database Analysis of Molecular Complementarity in Cocrystals," *Cryst. GROWTH & DESIGN*, vol. 9, no. 3, pp. 1436–1443, 2009.
- [28] P. A. Wood, N. Feeder, M. Furlow, P. T. A. Galek, C. R. Groom, and E. Pidcock, "Knowledge-based approaches to co-crystal design," *CrystEngComm*, vol. 16, no. 26, pp. 5839–5848, 2014, doi: 10.1039/c4ce00316k.

- [29] C. F. Macrae *et al.*, “Mercury CSD 2.0 - New features for the visualization and investigation of crystal structures,” *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 41, no. 2, pp. 466–470, 2008, doi: 10.1107/S0021889807067908.
- [30] A. Bhatnagar, P. K. Sharma, and N. Kumar, “A Review on ‘ Imidazoles ’: Their Chemistry and Pharmacological Potentials,” *PharmTech Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 268–282, 2011.
- [31] V. Gupta and V. Kant, “A Review on Biological Activity of Imidazole and Thiazole Moieties and their A Review on Biological Activity of Imidazole and Thiazole Moieties and their Derivatives,” *Sci. Int.*, vol. 1, no. 7, pp. 253–260, 2013, doi: 10.5567/sciintl.2013.253.260.
- [32] A. Verma, S. Joshi, and D. Singh, “Imidazole : Having Versatile Biological Activities,” *J. Chem.*, vol. 2013, pp. 1–12, 2013.
- [33] C. Mancuso and R. Santangelo, “Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 65, pp. 185–195, 2014, doi: 10.1016/j.fct.2013.12.024.
- [34] Z. Zhao and M. H. Moghadasian, “Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review,” *Food Chem.*, vol. 109, no. 4, pp. 691–702, 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.039.
- [35] S. Gracin and Å. C. Rasmuson, “Polymorphism and Crystallization of p-Aminobenzoic Acid,” *Cryst. GROWTH & DESIGN*, vol. 4, no. 5, pp. 1013–1023, 2004.
- [36] S. I. Akberova, “New Biological Properties of p -Aminobenzoic Acid S.,” *Biol. Bull.*, vol. 29, no. 4, pp. 390–393, 2002.
- [37] M. P. Thayer *et al.*, “pH-dependent spectral properties of para-aminobenzoic acid and its derivatives,” *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 84, no. 1, pp. 227–232, 2011, doi: 10.1016/j.saa.2011.09.032.
- [38] H. STANJEK and W. HÄUSLER, “Basics of X-ray Diffraction,” *Hyperfine Interact.*, vol. 154, pp. 107–119, 2004.
- [39] B. D. CULLITY, *Elements of X - Ray Diffraction*, 2nd ed. 1978.
- [40] E. S. Ameh, “A review of basic crystallography and x-ray diffraction applications,” *Int. J. Adv. Manuf. Technol.*, vol. 105, no. 7–8, pp. 3289–3302, 2019, doi: 10.1007/s00170-019-04508-1.
- [41] A. A. Bunaciu, E. gabriela Udriștioiu, and H. Y. Aboul-Enein, “X - RAY DIFFRACTION: Instrumentation and Applications,” *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 45, no. 4, pp. 289–299, 2015, doi: 10.1080/10408347.2014.949616.
- [42] Y. Oshima *et al.*, “Practices, Potential, and Perspectives for Detecting Predisease Using Raman Spectroscopy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 15, pp. 1–15, 2023, doi: 10.3390/ijms241512170.
- [43] P. Rostron, S. Gaber, and D. Gaber, “Raman Spectroscopy , Review,” *Int. J. Eng. Tech. Res.*, vol. 6, no. 1, pp. 50–64, 2016.
- [44] A. M. Sitarski, “Development of Spectroscopic Methods for Dynamic Cellular Level Study of Biochemical Kinetics and Disease Progression.” p. 242, 2017.

- [45] C. Leyva-Porras *et al.*, “Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 5, pp. 1–21, 2019.
- [46] P. Gill, T. T. Moghadam, and B. Ranjbar, “Differential Scanning Calorimetry Techniques : Applications in Biology and Nanoscience,” *J. Biomol. Tech.*, vol. 21, pp. 167–193, 2010.
- [47] N. Saadatkhah *et al.*, “Experimental methods in chemical engineering : Thermogravimetric analysis — TGA,” *Can. Soc. Chem. Eng.*, vol. 98, pp. 34–43, 2019, doi: 10.1002/cjce.23673.
- [48] S. Ebnesajjad and C. Ebnesajjad, “Surface and Material Characterization Techniques,” in *Surface Treatment of Materials for Adhesive Bonding*, 2nd ed., Elsevier Science & Technology Books, 2014, pp. 39–75.
- [49] Z. Wu, S. Yang, and W. Wu, “Application of temperature cycling for crystal quality control during crystallization,” *CrystEngComm*, vol. 18, pp. 2222–2238, 2016, doi: 10.1039/C5CE02522B.
- [50] A. Y. Lee, D. Erdemir, and A. S. Myerson, “Crystals and Crystal Growth,” in *Handbook of Industrial Crystallization*, 3rd ed., Cambridge University Press, 2019, pp. 32–75.
- [51] K. Vasisht, K. Chadha, M. Karan, Y. Bhalla, A. K. Jena, and R. Chadha, “Enhancing biopharmaceutical parameters of bioflavonoid quercetin by cocrystallization,” *CrystEngComm*, vol. 18, no. 8, pp. 1403–1415, 2016, doi: 10.1039/c5ce01899d.
- [52] H. He, Y. Huang, Q. Zhang, J. R. Wang, and X. Mei, “Zwitterionic Cocrystals of Flavonoids and Proline: Solid-State Characterization, Pharmaceutical Properties, and Pharmacokinetic Performance,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 16, no. 4, pp. 2348–2356, 2016, doi: 10.1021/acs.cgd.6b00142.
- [53] L. Wang *et al.*, “Drug-drug cocrystals of theophylline with quercetin,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 70, 2022.
- [54] G. M. Sheldrick, “SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination,” *Acta Crystallogr. Sect. A Found. Crystallogr.*, vol. 71, no. 1, pp. 3–8, 2015, doi: 10.1107/S2053273314026370.
- [55] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, and H. Puschmann, “OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program,” *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 42, no. 2, pp. 339–341, 2009, doi: 10.1107/S0021889808042726.
- [56] U. Domańska and M. K. Kozłowska, “Solubility of imidazoles in Alcohols,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 47, no. 1, pp. 8–16, 2002, doi: 10.1016/S0378-3812(02)00323-0.

Appendici

CO-FORMER	RISULTATO
(+)-ACIDO_CANFORICO	FAIL
(-)-ACIDO CANFORSOLFONICO	FAIL
ACIDO 1-IDROSSIETILIDENE-1,1-DIFOSFONICO	FAIL
ACIDO 2-AMMINO-5-METILBENZOICO	PASS
3-METILPIRIDINA	PASS
ACIDO 4-ACETAMIDOBENZOICO	PASS
ACIDO 4-AMMINOBENZOICO	PASS
ACIDO 4-IDROSSIBENZOICO	PASS
ACETAMMIDE	FAIL
BENZOCHINONE	PASS
ACIDO CINNAMICO	PASS
D-ALANINA	FAIL
ACIDO D-GLUCURONICO	FAIL
D-PANTOTENOLO	PASS
EDTA	PASS
ACIDO FERULICO	PASS
IDROCHINONE	PASS
L-ARGININA	PASS
ACIDO L-ASPARTICO	FAIL
ACIDO L-ASPARTICO_Z	FAIL
ACIDO L-GLUTAMMICO	PASS
ACIDO_L-GLUTAMMICO_Z	FAIL
L-GLUTAMMINA	FAIL
L-GLUTATIONE	PASS
L-ACIDO_LATTICO	FAIL
L-LEUCINA	FAIL
ACIDO L-MANDELICO	PASS
L-METIONINA	PASS
L-FENILALANINA	PASS
L-PROLINA	FAIL
L-SERINA	FAIL
ACIDO L-TARTARICO	FAIL
L-TRIPTOFANO	PASS
L-TIROSINA	PASS
N-ETILACETAMMIDE	PASS
METILE GALLATO	PASS
VANILLINA	FAIL
ACESULFAME	FAIL
ACIDO ACETICO	FAIL
ACETOFENONE_OSSIMA	PASS
ACIDO_ACETILENDICARBOSSILICO	PASS
ACIDO ADIPICO	PASS

Appendici

ALITAME	FAIL
APIGENINA	PASS
ACIDO_AZELAICO	FAIL
ACIDO BENZOICO	PASS
BIOTINA	PASS
CAPROLATTAME	FAIL
CAPSAICINA	PASS
ACIDO_COLICO	PASS
ACIDO CITRICO	FAIL
ETILPARABEN	PASS
ACIDO FOLICO	FAIL
ACIDO_FUMARICO	PASS
ACIDO_GENTISICO	PASS
ACIDO_GLUTARICO	PASS
GLICINA	PASS
ACIDO GLICOLICO	PASS
ESPERETINA	PASS
ACIDO_IPPURICO	PASS
ACIDO_IDROCINNAMICO	FAIL
IMIDAZOLO	PASS
ISONICOTINAMMIDE	PASS
ACIDO_CHETOGLUTARICO	PASS
ACIDO_LATTOBIONICO	FAIL
LATTOSIO	PASS
ACIDO MALEICO	PASS
ACIDO MALICO	PASS
ACIDO_MALONICO	PASS
MALTITOLO	FAIL
MANNITOLO	FAIL
ACIDO_METANSOLFONICO	FAIL
METILPARABEN	PASS
MONOBUTIRRINA	PASS
NICOTINAMMIDE	PASS
ACIDO OSSALICO	FAIL
ACIDO_PAMOICO	FAIL
FTALAMMIDE	PASS
ACIDO_PIMELICO	PASS
PIPERAZINA	FAIL
PROPILPARABEN	PASS
PIRAZINA	PASS
RIBOFLAVINA	PASS
SACCARINA	FAIL
ACIDO SORBICO	PASS
ACIDO_SUBERICO	PASS
ACIDO SUCCINICO	PASS
T-BUTILAMMINA	FAIL
T-BUTILIDROSSIANISOLO	FAIL
TEOFILLINA	PASS

TIMIDINA	FAIL
ACIDO_TRIFENILACETICO	FAIL
UREA	FAIL
VALEROLATTAME	FAIL
XANTINA	PASS

Tabella 1 Appendice - Elenco di co-former e risultati dell'analisi di complementarità molecolare

Dati cristallografici	
Formula chimica	2(C ₁₅ H ₁₀ O ₇)·C ₃ H ₄ N ₂
M_r	672.54
Sistema cristallino, gruppo spaziale	Triclino P
Temperatura (K)	298
a, b, c (Å)	10.9581 (8), 12.1229 (10), 13.0804 (12)
α, β, γ (°)	114.659 (8), 93.308 (7), 113.045 (7)
V (Å ³)	1401.5 (2)
Z	2
Tipo di radiazione	Cu K α
μ (mm ⁻¹)	1.08
Dimensione cristallo (mm)	50 × 250 × 100
Diffrattometro	Xcalibur, AtlasS2, Gemini ultra
Correzione dell'assorbimento	Multi-scan CrysAlis PRO 1.171.42.71a (Rigaku Oxford Diffraction, 2022) Empirical absorption correction using spherical harmonics, implemented in SCALE3 ABSPACK scaling algorithm.
Tmin, Tmax	0.957, 1.000
N. di riflessioni misurate, indipendenti e osservate [$I > 2\sigma(I)$].	16949, 4941, 3160
Rint	0.048

Appendici

$(\sin \theta/\lambda)_{\max}$ (\AA^{-1})	0.597
<i>Refinement</i>	
R[F2 > 2 σ (F2)], wR(F2), S	0.049, 0.138, 1.01
N. di riflessioni	4941
N. di parametri	535
Trattamento atomo H	Atomi di H trattati da una miscela di raffinamento indipendente e vincolato
$\Delta\rho_{\max}$, $\Delta\rho_{\min}$ (e \AA^{-3})	0.19, -0.22

Tabella 2 Appendice - Dati cristallografici