

**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

**Sintesi e Caratterizzazione di Nuovi Co-  
cristalli di Interesse Nutraceutico**



**Relatore**

Dr. Emmanuele Parisi

**Corelatore**

Prof.ssa Elena Simone

**Candidato**

Eugenio Spanu

Marzo 2024



# Sommario

<b>1. Introduzione</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Stato dell'arte</b> .....	<b>3</b>
2.1 <i>Ingegneria dei cristalli</i> .....	3
2.1.1 <i>Retrointesi supramolecolare</i> .....	4
2.2 <i>Cristalli Multicomponente, Polimorfismo e Amorfismo</i> .....	5
2.3 <i>Co-Cristalli Farmaceutici</i> .....	7
2.3.1 <i>Tecniche di sintesi di co-cristalli</i> .....	8
2.4 <i>Co-cristallizzazione a livello industriale</i> .....	11
2.4.1 <i>Quality-by-Design (QbD) e Process Analytical Technology (PAT)</i> .....	12
2.5 <i>Curcumina e suoi co-cristalli</i> .....	14
2.6 <i>Naringenina e suoi co-cristalli</i> .....	17
2.7 <i>Co-former</i> .....	19
2.7.1 <i>Prolina</i> .....	21
2.7.2 <i>Teofillina</i> .....	22
2.8 <i>Tecniche di caratterizzazione di nuovi co-cristalli</i> .....	23
2.8.1 <i>Diffrazione a raggi X su polveri (PXRD)</i> .....	23
2.8.2 <i>Spettroscopia Raman</i> .....	24
2.8.3 <i>Analisi Termogravimetrica (TGA)</i> .....	26
2.8.4 <i>Calorimetria a scansione differenziale (DSC)</i> .....	26
<b>3. Materiali e Metodi</b> .....	<b>28</b>
3.1 <i>Materiali</i> .....	28
3.2 <i>Scelta dei co-former</i> .....	28
3.3 <i>Esperimenti di co-cristallizzazione</i> .....	31
3.4 <i>Caratterizzazione delle fasi cristalline</i> .....	32
3.4.1 <i>Spettroscopia Raman</i> .....	32

3.4.2	<i>Diffrazione dei raggi X su polveri (PXRD)</i>	33
3.4.3	<i>Calorimetria a scansione differenziale (DSC)</i>	33
3.4.4	<i>Analisi termogravimetrica (TGA)</i>	34
3.4.5	<i>Angolo di contatto</i>	34
3.5	<i>Curve di solubilità per il sistema Curcumina – Prolina</i>	35
3.6	<i>Ottenimento diagramma di fase per il sistema Curcumina – Prolina</i>	36
<b>4.</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>39</b>
4.1	<i>Curve di solubilità per sistema Curcumina - Prolina</i>	39
4.2	<i>Risultati esperimenti di co-cristallizzazione Curcumina – Prolina</i>	40
4.3	<i>Caratterizzazione del co-cristallo Curcumina – Prolina</i>	43
4.3.1	<i>Diffrazione a raggi X su polveri</i>	43
4.3.2	<i>Spettroscopia Raman</i>	45
4.3.3	<i>Analisi termiche</i>	46
4.3.4	<i>Angolo di contatto</i>	50
4.4	<i>Diagramma di fase per sistema Curcumina – Prolina</i>	52
4.5	<i>Risultati esperimenti di co-cristallizzazione Naringenina – Teofillina</i>	57
4.6	<i>Caratterizzazione del co-cristallo Naringenina – Teofillina</i>	58
4.6.1	<i>Diffrazione a raggi X su polveri</i>	58
4.6.2	<i>Spettroscopia Raman</i>	59
4.6.3	<i>Analisi termiche</i>	60
4.6.4	<i>Angolo di contatto</i>	62
<b>5.</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>64</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>65</b>
	<b>Appendici</b>	<b>72</b>

## Indice delle figure

<b>Figura 2.1</b> - Esempi di omosintoni ed eterosintoni basati su legami idrogeno [5] .....	4
<b>Figura 2.2</b> - Possibili forme solide in cui si può trovare un ingrediente farmaceutico attivo (API) [6].....	5
<b>Figura 2.3</b> - Tecniche di co-cristallizzazione in soluzione [14] .....	15
<b>Figura 2.4</b> - Struttura chimica dell'Ertuglifozin (A) e dell'Acido L-Pidolico (B) [12] .....	10
<b>Figura 2.5</b> - Struttura chimica dei tautomeri della Curcumina [20] .....	12
<b>Figura 2.6</b> - Struttura del co-cristallo Curcumina-Resorcionolo (legami idrogeno indicati da linee tratteggiate in rosso) [19] .....	13
<b>Figura 2.7</b> - Struttura chimica del BPNO [18] .....	14
<b>Figura 2.8</b> - Struttura chimica base dei flavanoidi (a), dei flavanoni (b) e della Naringenina (c) [24].....	17
<b>Figura 2.9</b> - Struttura chimica dell'Isonicotinamide [24].....	18
<b>Figura 2.10</b> – Box model con tre dimensioni differenti [29].....	19
<b>Figura 2.11</b> - Tutte le possibili interazioni tra molecola target (Componente A) e co-former (Componente B) [28].....	20
<b>Figura 2.12</b> - Struttura chimica della Prolina.....	21
<b>Figura 2.13</b> - Struttura chimica della Teofillina.....	22
<b>Figura 2.14</b> - Rappresentazione schematica della diffrazione dei raggi X di un cristallo (condizione di Bragg) [39].....	23

<b>Figura 2.15</b> - Diagramma di Jablonski dove sono raffigurate le transizioni durante la dispersione Rayleigh, Stokes e Anti-Stokes [43].	25
<b>Figura 3.1</b> - Risultati dell'analisi MCHBP per la Curcumina. Sull'asse delle ascisse possiamo trovare i vari co-formers mentre sull'asse delle ordinate abbiamo il punteggio Multi-Componente.	29
<b>Figura 3.2</b> - Risultati dell'analisi MCHBP per la Naringenina. Sull'asse delle ascisse possiamo trovare i vari co-formers mentre sull'asse delle ordinate abbiamo il punteggio Multi-Componente.	30
<b>Figura 3.3</b> - Fasi da seguire per ottenere un diagramma di fase partendo dai valori di solubilità dei componenti [52].	36
<b>Figura 3.4</b> - (a) Diagramma di fase di un sistema ternario di API, co-former B e solvente a temperatura costante. (b) Diagramma che rappresenta il profilo della temperatura di saturazione in funzione della frazione molare esclusa dal solvente [52].	38
<b>Figura 4.1</b> - Grafico di van't Hoff per la Curcumina e la Prolina in etanolo.	39
<b>Figura 4.2</b> - Immagine al microscopio ottico a luce polarizzata del campione di Curcumina – Prolina 1:2 ottenuto tramite co-cristallizzazione per mescolamento in Acetonitrile.	41
<b>Figura 4.3</b> - Spettri Raman del campione di Curcumina – Prolina 1:1 ottenuto in etanolo (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina (in rosso).	42
<b>Figura 4.4</b> - Spettri Raman del campione di Curcumina – Prolina 1:2 ottenuto in isopropanolo (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina (in rosso).	42
<b>Figura 4.5</b> - Diffrattogrammi della Curcumina (in nero), del campione Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (in verde) e della Prolina (in rosso).	44
<b>Figura 4.6</b> - Diffrattogrammi della Curcumina (in nero), del campione Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo (in verde) e della Prolina (in rosso).	44

<b>Figura 4.7</b> - Spettri Raman del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina (in rosso).....	45
<b>Figura 4.8</b> - Spettri Raman del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina (in rosso).....	46
<b>Figura 4.9</b> - Diagramma DSC del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina in rosso.....	48
<b>Figura 4.10</b> - Diagramma DSC del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina in rosso.....	48
<b>Figura 4.11</b> - Confronto tra analisi DSC e TGA del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile.....	49
<b>Figura 4.12</b> - Confronto tra analisi DSC e TGA del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo.....	49
<b>Figura 4.13</b> - Angolo di contatto formato tra la superficie del disco ottenuto dal campione di Curcumina – Prolina e una goccia d’acqua.....	50
<b>Figura 4.14</b> - Angolo di contatto formato tra la superficie del disco ottenuto dal campione di Curcumina – Prolina e una goccia d’olio.....	51
<b>Figura 4.15</b> - Differenza tra la temperatura di saturazione del sistema Curcumina – Prolina e la temperatura di riferimento in funzione della temperatura di riferimento.....	53
<b>Figura 4.16</b> - Immagine al microscopio ottico del campione di Curcumina – Prolina in seguito a esperimento per valutarne la temperatura di saturazione in etanolo partendo dai valori di solubilità dei componenti puri a 25°C.....	54
<b>Figura 4.17</b> - Diffrattogrammi della Curcumina (in nero), del campione Curcumina – Prolina ottenuto in seguito a esperimento per valutarne la temperatura di saturazione partendo dalle solubilità dei componenti puri (in verde) e della Teofillina (in rosso).....	54

<b>Figura 4.18</b> - Diagramma ottenuto dall'equazione 3.3 e da cui sono stati selezionati i punti per costruire il diagramma di fase in <b>Figura 4.18</b> .....	55
<b>Figura 4.19</b> - Diagramma di fase ottenuto per il sistema Curcumina – Prolina.....	56
<b>Figura 4.20</b> - Immagine al microscopio ottico a luce polarizzata del campione di Naringenina – Teofillina 1:1 ottenuto tramite co-cristallizzazione per mescolamento in Acetonitrile.....	57
<b>Figura 4.21</b> - Diffrattogrammi della Naringenina (in nero), del co-cristallo Naringenina – Teofillina (in verde) e della Teofillina (in rosso).....	59
<b>Figura 4.22</b> - Spettri Raman del campione di Naringenina – Teofillina (in verde), della Naringenina (in nero) e della Teofillina (in rosso).....	60
<b>Figura 4.23</b> - Diagramma DSC del campione di Naringenina – Teofillina (in verde), della Naringenina (in nero) e della Teofillina in rosso.....	61
<b>Figura 4.24</b> - Confronto tra analisi DSC e TGA del campione di Naringenina – Teofillina.....	62
<b>Figura 4.25</b> - Angolo di contatto formato tra la superficie del disco ottenuto dal campione di Naringenina – Teofillina e una goccia d'acqua.....	63
<b>Figura 4.26</b> - Angolo di contatto formato tra la superficie del disco ottenuto dal campione di Naringenina – Teofillina e una goccia d'olio.....	63



## **Lista delle abbreviazioni**

API Ingredienti farmaceutici attivi

CCDC *Cambridge Crystallographic Data Centre*

DSC Calorimetria a scansione differenziale

EtOH Etanolo

FDA *Food and Drug Administration*

GRAS *Generally Regarded As Safe*

HBP *Hydrogen Bond Propensity*

HME *Hot Melt Extrusion*

IPA Isopropanolo

MC *Multi-Component*

MeCN Acetonitrile

MeOH Metanolo

PXRD Diffrazione dei raggi X su polveri

QbD *Quality by Design*

QbT *Quality by Testing*

TGA Analisi Termogravimetrica

# 1. Introduzione

Questa tesi è focalizzata sulla sintesi e caratterizzazione di nuovi co-cristalli organici di interesse nutraceutico.

Lo studio è stato effettuato attraverso l'applicazione dell'ingegneria dei cristalli che rappresenta un approccio razionale per il *design* di solidi molecolari con proprietà chimiche e fisiche desiderate con un'applicabilità estesa in molti campi di ricerca in cui è elevato l'interesse per materiali allo stato solido.

Alla base dell'ingegneria dei cristalli vi è lo studio delle interazioni deboli, quali interazioni dispersive, interazioni  $\pi$ -stacking, ma soprattutto legami a idrogeno, che possono instaurarsi tra due (o più) molecole diverse stabilizzando la struttura cristallina.

In questa tesi si riportata la sintesi di cristalli multicomponente ovvero di materiali cristallini che presentano nella loro struttura reticolare due o più molecole distinti legate attraverso questo tipo di interazioni.

A seconda della natura delle molecole si possono ottenere diversi tipi di cristalli multicomponente: sali, solvati, idrati e co-cristalli. Negli ultimi anni, la co-cristallizzazione è stata identificata come il metodo più efficiente e versatile per la sintesi di nuovi materiali solidi cristallini di interesse farmaceutico e nutraceutico in particolar modo per migliorare le proprietà di molecole target, quali durata di conservazione, velocità di dissoluzione e biodisponibilità. Se uno dei composti è un ingrediente farmaceutico attivo (API), allora si parla di co-cristalli farmaceutici, e l'altro composto prende il nome di co-former. I co-former, generalmente, devono essere composti non dannosi e quindi vengono selezionati dalla lista di composti GRAS (Generally Recognized As Safe) stilata dalla FDA (Food and Drug Administration). Questa tesi verte sulla scoperta e caratterizzazione di nuovi co-cristalli di una molecola di interesse nutraceutico, la curcumina, un fenolo idrofobico estratto dal rizoma della pianta *Curcuma Longa*, e la Naringenina, appartenente alla classe dei flavononi. Queste due molecole sono note specialmente per le loro proprietà farmacologiche e biologiche, quali antiossidanti, antinfiammatorie, antimicrobiche, antimalariche e anticarcinogeniche. Tuttavia, queste molecole presentano una scarsa solubilità in acqua, scarsa biodisponibilità e uno scarso assorbimento ed è per questo che si cerca di migliorarne le proprietà fisico-chimiche attraverso la co-cristallizzazione. Nella prima fase del lavoro di tesi è stata dedicata alla ricerca di *co-former* ideali per la co-cristallizzazione condotta mediante uno *screening* virtuale multi-componente, tramite l'utilizzo del software Mercury del Cambridge Crystallographic Data Center. L'analisi è stata condotta attraverso due concetti fondamentali: complementarità molecolare e capacità di formare

interazioni favorevoli di legame ad idrogeno con le molecole target del lavoro di tesi. Tale approccio ha consentito di selezionare in modo mirato i *co-former* con maggiore potenziale per la formazione di co-cristalli con Curcumina e Naringenina. Di questi, gli esperimenti sono stati focalizzati in particolare su due *co-former* i cui co-cristalli rispettivi con Curcumina e Naringenina non sono descritti in letteratura. Gli esperimenti di co-cristallizzazione sono stati effettuati principalmente 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). Queste analisi hanno portato con successo all'isolamento di due nuovi co-cristalli, Curcumina-Prolina e Naringenina-Teofillina.

Inoltre, sono anche state effettuate delle misure di angolo di contatto per i nostri campioni, al fine di valutarne la bagnabilità.

Infine, per il co-cristallo di Curcumina-Prolina è stato possibile ottenere un diagramma di fase che identifica la regione di stabilità di formazione del co-cristallo applicando un metodo sistematico che sfrutta le solubilità dei componenti puri e la comprensione dei fattori termodinamici che influenzano la formazione del co-cristallo.

## 2. Stato dell'arte

### 2.1 Ingegneria dei cristalli

L'ingegneria del cristallo è quella disciplina nata dall'interazione tra chimica e cristallografia che si occupa della sintesi e design di strutture cristalline con proprietà fisiche, chimiche o funzionali desiderate attraverso la modulazione delle interazioni intermolecolari.

Le sue origini risalgono al 1921 quando W.H. Bragg notò somiglianze tra le strutture cristalline del naftalene e antracene andando così a scoprire la prima correlazione tra proprietà cristallina e proprietà molecolare [1].

Il primo a derivare con successo una proprietà cristallina da una proprietà molecolare fu JM Robertson che tra gli anni '40 e '50 studiò le strutture cristalline di un gran numero di idrocarburi aromatici polinucleari [2].

Il termine ingegneria del cristallo fu invece introdotto per la prima volta nel 1955 da R. Pepinsky mentre le basi furono definite da GMJ Schmidt grazie allo studio delle reazioni fotochimiche degli acidi trans-cinnammici [1].

Nel 1989 Desiraju pubblicò il suo libro "Ingegneria dei cristalli: la progettazione dei solidi organici" all'intero del quale troviamo una definizione di ingegneria dei cristalli valida ancora oggi, ovvero la seguente "la comprensione di interazioni intermolecolari nel contesto dell'impaccamento dei cristalli e nell'utilizzo di tale comprensione nella progettazione di nuovi solidi con le proprietà fisiche e chimiche desiderate" [2].

L'ingegneria dei cristalli cerca quindi di dare risposta a uno specifico quesito, ovvero comprendere la struttura cristallina data quella molecolare. Quindi ci si chiede come le molecole si riconoscono tra loro dai primi stadi di associazione, verso la nucleazione e infine la cristallizzazione. [1]

Il problema però è che le strutture cristalline non possono essere previste facilmente a partire da quelle molecolari, poiché esse non sono legate in maniera semplice essendo la struttura cristallina una proprietà emergente [3].

Quindi non è utilizzabile un approccio modulare come con i gruppi funzionali.

Un altro problema è che la costruzione di un cristallo deve essere considerata in modo graduale e questi passaggi possono essere abbastanza discreti: uno → pochi → molti → nucleo → cristallo.

Questo è detta costruzione Aufbau e non è detto che sia un processo fluido e continuo [2].

Questa serie di problemi ha portato a una semplificazione, ovvero l'introduzione dei cosiddetti sintoni sopramolecolari, che verranno approfonditi nel successivo capitolo.

### 2.1.1 *Retrouvailles supramoléculaire*

Il concetto di cristallo come entità supramolecolare fu introdotto da Jean Marie Lehn, il quale affermò che una supramolecola sta alla molecola come un'interazione molecolare sta al legame covalente.

Importante fu anche il contributo di Jack Dunitz, il quale affermò invece che il cristallo è l'entità sopramolecolare per eccellenza [3].

Nel 1995 Gautam Desiraju diede una definizione di sintoni supramolecolari: "Quindi, i sintoni supramolecolari sono unità strutturali all'interno di supermolecole che possono essere formate e/o assemblate mediante operazioni sintetiche note o concepibili che coinvolgono interazioni intermolecolari" [4].

I sintoni sono quindi costituiti da frammenti molecolari e dalle associazioni supramolecolari tra loro attraverso legami intermolecolari come legami idrogeno, interazioni  $\pi$ - $\pi$ , interazioni dipolo-dipolo, interazioni di Van Der Waals.

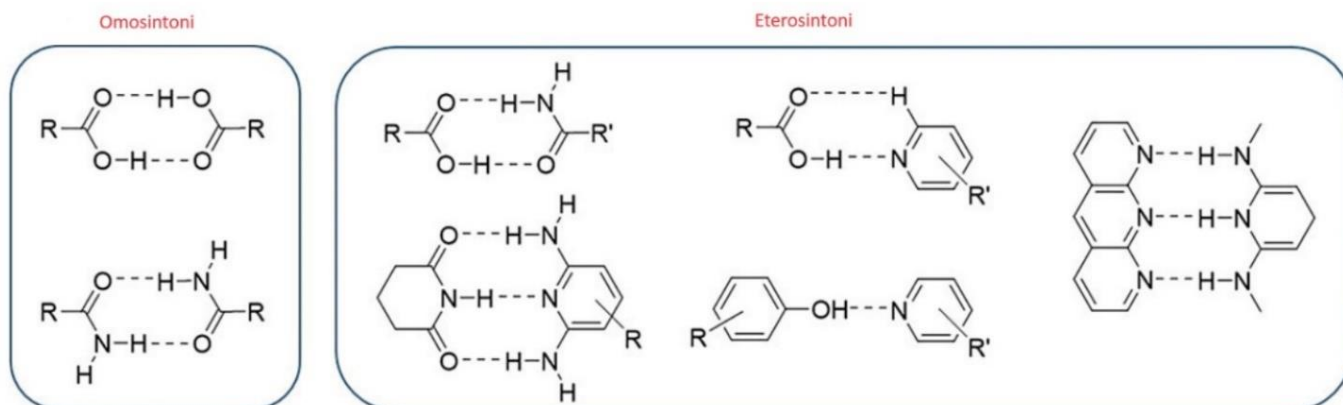
Tra questi il legame idrogeno, che si forma tra un gruppo donatore e un gruppo accettore, è particolarmente importante poiché è forte, direzionale e quindi predicibile [5].

Un'altra questione è che il sintone è un evento probabilistico, più è forte e più spesso verrà osservato in strutture in cui è presente un particolare insieme di funzionalità molecolari.

Ovviamente tali eventi non sono universali e la competizione tra sintoni conduce spesso alla formazione di impacchettamenti cristallini differenti per la stessa molecola, ovvero il polimorfismo [1].

Le interazioni sintoniche supramolecolari possono essere raggruppate essenzialmente in due categorie: gli omosintoni (composto da gruppi funzionali auto-complementari) e gli eterosintoni (composto da gruppi funzionali diversi ma complementari) (**Figura 2.1**).

Esempi di eterosintoni sostenuti da legami idrogeno sono spesso basati su interazioni O-H...N che si possono formare tra acido carbossilico – dimeri ammidici, acido carbossilico – azoto aromatico e fenolo – azoto aromatico [5].



**Figura 2.1** Esempi di omosintoni ed eterosintoni basati su legami idrogeno [5].

## 2.2 Cristalli Multicomponente, Polimorfismo e Amorfismo

I cristalli multicomponenti sono materiali cristallini che presentano nella loro struttura reticolare due o più componenti distinti.

Questi componenti possono differire per la loro struttura 2D, gli elementi chimici coinvolti o persino per la chiralità, purché non siano di segno opposto.

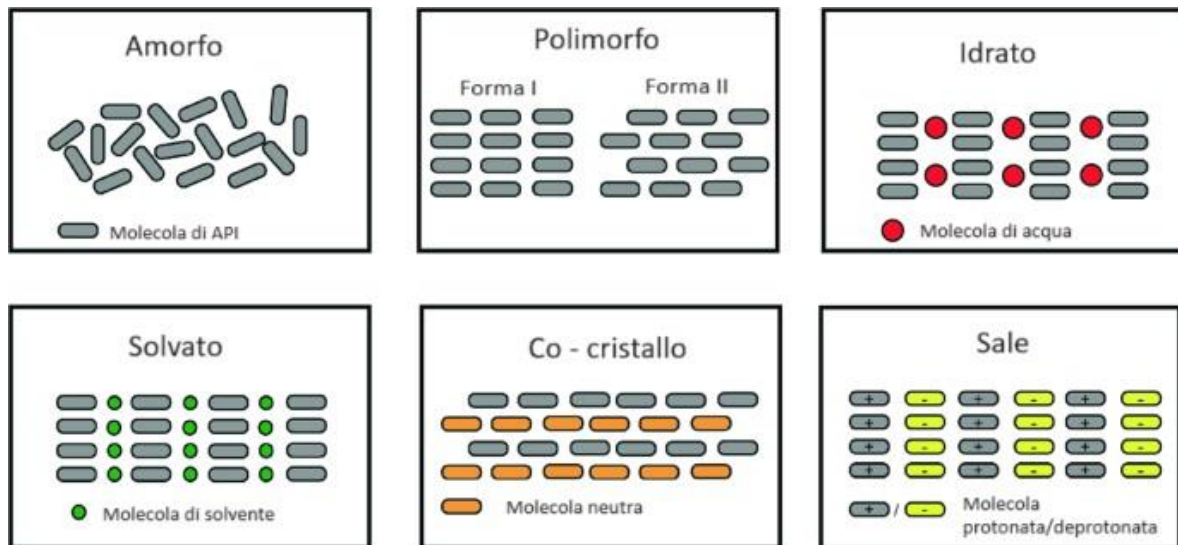
Un residuo in questo contesto rappresenta un insieme completo di elementi che sono covalentemente legati all'interno della struttura cristallina [6].

In base alla tipologia di residui possiamo classificare i cristalli multicomponente nel seguente modo (**Figura 2.2**):

- Sali, se i residui sono ioni;
- Solvati, se all'interno della struttura cristallina sono contenute molecole di solvente (idrati se il solvente è acqua);
- Co-cristalli, se i residui sono tutti allo stato solido e neutri a temperatura ambiente [7].

I cristalli multicomponente vengono utilizzati in svariati settori in quanto riescono a modificare le proprietà chimico fisiche di un cristallo senza modificare le proprietà chimiche della molecola di interesse.

Un settore di particolare interesse è quello farmaceutico, dove le molecole di interesse sono gli ingredienti farmaceutici attivi (API) ovvero le componenti principali dei farmaci, che conferiscono ad essi l'effetto terapeutico [6].



**Figura 2.2** – Possibili forme solide in cui si può trovare un ingrediente farmaceutico attivo (API) [7].

La maggior parte di queste molecole presenta fenomeni di polimorfismo, ovvero la capacità di esistere in due o più forme cristalline in cui le molecole hanno differenti disposizioni (polimorfismo di imballaggio) e/o conformazioni (polimorfismo conformazionale) nel reticolo cristallino.

Un'altra condizione che si può avere è quella dell'amorfismo, ovvero un arrangiamento disordinato di molecole e quindi privo di cristallinità [8].

### 2.3 Co-Cristalli Farmaceutici

La co-cristallizzazione è una tecnica molto diffusa e utilizzata nell'ultimo ventennio e si presenta come un'ottima alternativa ad altre tecniche già in utilizzo: essa, infatti, è molto simile alla salificazione, ma a differenza di quest'ultima non è limitata ai composti ionizzabili e quindi risulta molto più versatile [9].

Una definizione generale di co-cristallo è la seguente: "I co-cristalli sono solidi che sono materiali cristallini in fase singola composti da due o più differenti composti molecolari e/o ionici generalmente in rapporto stechiometrico, che non sono né solvati né sali semplici".

Si parla di co-cristalli molecolari (MCCs) se questi composti molecolari devono essere solidi e neutri a temperatura ambiente [10].

Esistono inoltre altre due sottoclassi dei co-cristalli ovvero i co-cristalli ionici (ICCs) e i co-cristalli salini (SCCs): i co-cristalli ionici presentano un ingrediente attivo e un sale inorganico o alcalino terroso nella stessa cella mentre i co-cristalli salini consistono in un ingrediente attivo salificato e un co-former, o viceversa, nella stessa cella [9].

Se uno dei composti è un ingrediente API allora si parla di co-cristallo farmaceutico e gli altri composti prendono il nome di co-former.

Quest'ultimi devono essere composti sicuri e vengono quindi selezionati dalla lista di composti GRAS (Generally Recognized As Safe) stilata dalla FDA.

La ricerca di nuovi co-cristalli nell'industria farmaceutica è desiderata in quanto essi migliorano le proprietà fisico-chimiche (biodisponibilità, solubilità, permeabilità, stabilità, punto di fusione, comprimibilità) degli ingredienti attivi senza andare a modificarne la struttura e quindi le proprietà farmacologiche.

Inoltre, la co-cristallizzazione è considerata una tecnica ecologica per diverse ragioni [10]:

- Ridotto utilizzo di solventi rispetto ai tradizionali processi di sintesi chimici con conseguente riduzione di rifiuti e quindi minor impatto ambientale e minor rischio di pericoli associati alla salute;
- I processi di co-cristallizzazione operano spesso in condizioni più blande rispetto alle reazioni chimiche; quindi, nel complesso risultano più eco sostenibili;
- Preservano la potenza del farmaco;
- La co-cristallizzazione, a differenza di molti processi chimici, può essere eseguita usando co-former e solventi non tossici e pericolosi, migliorando così il profilo di sicurezza complessivo del processo di sviluppo del farmaco;



- Vantaggi in termini di approvazione e controllo qualità;
- Lo scale-up dei processi di co-cristallizzazione è spesso facilmente eseguibile.

### 2.3.1 *Tecniche di sintesi di co-cristalli*

Esistono svariate tecniche di sintesi di co-cristalli documentate tuttavia spesso c'è poca coerenza nell'applicazione di metodi diversi e persino nella terminologia utilizzata per descriverli.

Dettagli come la scelta del solvente, la concentrazione dei composti trattati e il processo di recupero spesso non sono forniti, rendendo difficile ripetere o confrontare le varie tecniche di sintesi [12].

Una prima suddivisione generica che si può fare è quella tra tecniche allo stato solido, dove viene utilizzata una minima o nulla quantità di solvente e quelle in soluzione, dove invece viene utilizzata una grande quantità di solventi [13].

Per quanto riguarda lo stato solido esistono le seguenti tecniche [14]:

- Macinazione meccanochimica, detta anche macinazione a secco. In questa tecnica l'API e il co-former vengono macinati tramite un mortaio o grazie a strumenti come il mulino a sfere. Bisogna prestare particolare attenzione al calore sviluppato, in quanto potrebbe andare a compromettere la stabilità dei composti utilizzati;
- Macinazione assistita da liquido (LAG, Liquid Assisted Grinding). In questa tecnica avviene sempre la macinazione dell'API e del co-former, ma viene addizionata una piccola quantità di solvente che funge da catalizzatore per la formazione del co-cristallo;
- Estrusione a caldo (HME, Hot Melt Extrusion). In questa tecnica l'API e il co-former vengono miscelati e portati a fusione grazie all'utilizzo di un estrusore a vite riscaldata;
- Estrusione a doppia vite (TSE, Twin Screw Extrusion). A differenza della HME, in questa tecnica si opera a temperature inferiori al punto di fusione dei componenti [12];

Invece, per quanto riguarda le tecniche in soluzione abbiamo le seguenti possibilità:

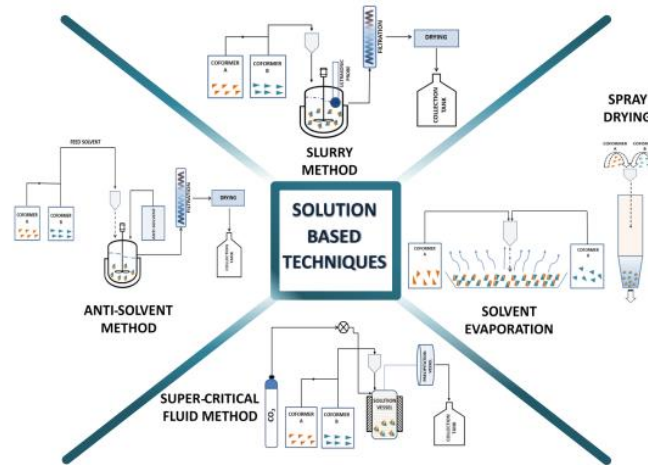
- Co-cristallizzazione per evaporazione. In questa tecnica si utilizza un solvente volatile per preparare una soluzione dell'API e del co-former che viene lasciata evaporare, a temperatura controllata o meno, per garantire una lenta evaporazione e la nucleazione e crescita di cristalli [13];
- Co-cristallizzazione per raffreddamento. In questa tecnica l'API e il co-former vengono disciolti in un solvente e successivamente, raffreddando il sistema, si ottiene la precipitazione di cristalli. La temperatura, infatti, gioca un ruolo fondamentale: per alcuni composti un aumento di essa comporta un aumento della solubilità mentre nel caso di soluzioni supersature, un raffreddamento porta alla formazione e precipitazione di co-cristalli [13].
- Co-cristallizzazione per antisolvente. In questa tecnica viene utilizzato un antisolvente per ridurre la solubilità dell'API e del co-former in soluzione, portando alla formazione di co-cristalli. Un esempio di combinazione solvente-antisolvente molto utilizzata è quella solvente organico-acqua. Inoltre, questa tecnica può essere eseguita a temperatura ambiente e quindi richiede meno energia rispetto alle precedenti [12];
- Co-cristallizzazione per mescolamento isoterma. Questa è la tecnica di *screening* più efficiente [13]. Essa consiste in una sospensione dell'API e del co-former, in un rapporto molare fissato, in un solvente in cui la frazione solida rimane in eccesso [12];
- Co-cristallizzazione con fluidi supercritici. Questa è una tecnica esplorata ultimamente in quanto più eco sostenibile. Essa consiste nell'utilizzo di un fluido supercritico, CO<sub>2</sub> per la grande maggioranza, il quale viene pressurizzato e riscaldato oltre al suo punto critico in modo tale da avere la diffusività di un gas e la capacità di solvatazione di un liquido [15].

A questo punto il fluido supercritico può agire da solvente, rendendo così non necessario l'utilizzo di un altro solvente aggiuntivo [13], oppure da antisolvente. In questo caso sarà necessaria una soluzione dell'API e del co-former, alla quale il fluido supercritico verrà aggiunto, andando così a ridurre la solubilità e favorendo la nucleazione della fase cristallina. Ovviamente in questo caso il fluido supercritico deve essere miscibile nel solvente utilizzato [15].

Le tecniche allo stato solido presentano alcuni vantaggi come ad esempio la loro ecologicità, dato lo scarso o nullo utilizzo di solventi.

Tuttavia, queste tecniche presentano molti problemi come la difficile scalabilità a livello industriale, lo scarso controllo sui parametri di processo e sulle proprietà finali dei cristalli.

Questi problemi vengono colmati dalle tecniche in soluzione: infatti permettono un preciso controllo dei parametri e della purezza ma soprattutto sono facilmente scalabili a livello industriale, sia in batch che in continuo [15].



**Figura 2.3** – Tecniche di co-cristallizzazione in soluzione. [15]

## 2.4 Co-cristallizzazione a livello industriale

Le tecniche di co-cristallizzazione sono numerose, ma la maggior parte di esse sono utilizzabili solo in scala di laboratorio dove le quantità in gioco sono minime (grammi o milligrammi di prodotto) [16].

Questo perché la scalabilità spesso risulta molto complessa per svariati motivi e inoltre essa non deve andare a compromettere le caratteristiche del prodotto come purezza, morfologia, resa.

Inoltre, per lo scale-up è richiesto lo sviluppo di modelli matematici e di strumenti di monitoraggio in-line per monitorare fenomeni di nucleazione, concentrazioni dei soluti, distribuzione delle dimensioni, *etcetera* [15].

Sono quindi poche le tecniche che vengono utilizzate a livello industriale. Tra queste troviamo per esempio la co-cristallizzazione con antisolvente, ma anche la co-cristallizzazione per raffreddamento e slurry sono tecniche promettenti [15].

Un'altra tecnica usata a livello industriale è la HME, con la quale ad esempio son stati prodotti con successo co-cristalli di carbamazepina-nicotinamide da *Beska et al. (2014)* [13].

Esistono inoltre altre tecniche più innovative che da pochi anni vengono utilizzate a livello industriale come lo *spray drying* e lo *spray cooling*, nelle quali viene sfruttato il processo di atomizzazione.

Un'altra questione che riguarda la co-cristallizzazione a livello industriale è quella della produzione in continuo. Ad oggi, infatti, la maggior parte degli impianti di produzione di farmaci sono di tipo batch ma è sempre maggiore l'interesse delle industrie farmaceutiche a passare a impianti in continuo [16].

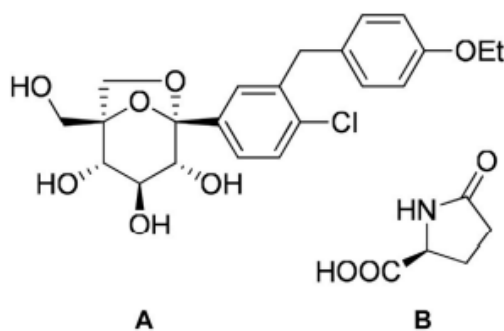
Questo perché, anche se la produzione in continuo richiede un più accurato design e controllo in-line, offre numerosi vantaggi rispetto a quella in batch [15],[16]:

- Miglior controllo del processo;
- Qualità del prodotto costante;
- Costi di produzione ridotti;
- Minori tempi morti e minore manodopera richiesta;
- Consumi energetici e sprechi ridotti;
- Maggiore sicurezza.

Ad oggi sul mercato sono presenti diversi farmaci basati su co-cristalli e questo evidenzia il successo di questa tecnica.

Un esempio è Steglatro®, farmaco utilizzato per la cura del diabete mellito di tipo 2. Esso contiene Ertuglifozin, un inibitore del trasportatore sodio-glucosio di tipo 2, e l'acido L-pidolico come co-former in rapporto stechiometrico 1:1.

Grazie alla formazione di questo co-cristallo, si va ad aumentare la stabilità e le proprietà fisicochimiche dell'API [13].



**Figura 2.4** – Struttura chimica dell'Ertuglifozin (A) e dell'Acido L-Pidolico (B). [13]

Un altro esempio è Suglat®. Anche questo farmaco è usato per il trattamento del diabete ed è composto da ipragliflozin, che è l'API, e dalla L-Prolina che è il co-former. Grazie alla co-cristallizzazione viene conferita stabilità contro la formazione di idrati [13].

#### 2.4.1 *Quality-by-Design (QbD) e Process Analytical Technology (PAT)*

Nell'industria farmaceutica è molto importante il concetto di controllo di qualità.

I metodi tradizionali di sviluppo e produzione del prodotto si basano sulla filosofia del Quality by Testing (QbT). In QbT, la qualità viene valutata seguendo una sequenza di passaggi, tra cui il controllo delle materie prime e il controllo finale del prodotto. Questo approccio però ha diverse problematiche a causa della scarsa conoscenza del processo [17].

Recentemente, quindi, l'industria farmaceutica sta abbandonando il QbT per invece utilizzare un approccio più sistematico e flessibile che è il Quality by Design (QbD).

Questo nuovo approccio è stato proposto dall'International Conference on Harmonization (ICH) che l'ha definito come “un approccio sistematico allo sviluppo che inizia con obiettivi predefiniti e enfatizza la comprensione del prodotto e del processo e il controllo del processo basato su solide basi scientifiche e la gestione del rischio di qualità” [16].

Quindi nel QbD lo scopo è quello di ottenere un prodotto di alta qualità grazie alla comprensione del prodotto stesso e del processo e implementando questa conoscenza nella progettazione e design del processo.

Uno strumento fondamentale per il QbD è il Process Analytical Technology (PAT), definito dalla FDA come “un sistema per la progettazione, analisi e controllo dei processi di produzione attraverso misurazioni tempestive delle caratteristiche critiche di qualità e prestazioni dei materiali grezzi e in fase di lavorazione e dei processi, con l'obiettivo di garantire la qualità del prodotto finale” [13].

Questa tecnologia permette quindi di monitorare in tempo reale il processo, senza andare a interromperlo, per ottenere parametri al fine di migliorare la qualità.

Gli strumenti PAT possono essere categorizzati in quattro classi:

- Strumenti multivariati per il design, acquisizione dati e analisi;
- Analizzatori di processo;
- Strumenti di controllo del processo;
- Strumenti per un continuo miglioramento e per la gestione della conoscenza [17].

Per quanto riguarda l'applicazione della PAT ci sono diverse possibilità come la spettroscopia Raman, spettroscopia UV-VIS, risonanza nucleare magnetica (NMR), spettroscopia del vicino infrarosso (NIR).

Tra queste la più utilizzata è la NIR, in quanto è una tecnica analitica rapida, non invasiva e la preparazione del campione è semplice [17].

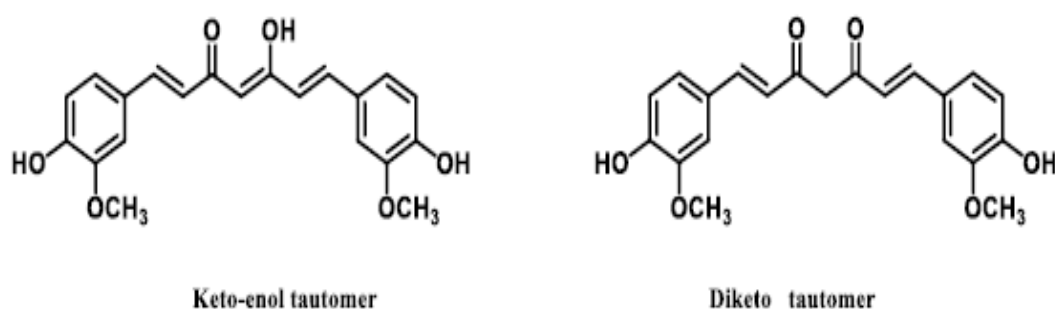
## 2.5 Curcumina e suoi co-cristalli

La curcumina ((1E,6E) -1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil) -epta-1,6-dien-3,5-dione) è un fenolo idrofobico appartenente alla classe dei curcuminoidi la cui formula molecolare è C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>. Nella sua struttura presenta due 2-metossi fenoli uniti simmetricamente da un dichetone insaturo a sette atomi di carbonio, che induce a una tautomerica cheto-enolica. [18]

Nella maggior parte delle strutture cristalline riportate è presente la forma cheto-enolica, in quanto essa è più stabile. [19]

Essa possiede caratteristico colore che va dal giallo all'arancione chiaro che viene estratta dal rizoma della pianta *Curcuma Longa*. [20]

Inoltre, rappresenta il 60-70% della spezia Indiana Curcuma, la quale viene utilizzata in ambito culinario, medico, cosmetico e tessile. [19]



**Figura 2.5** – Struttura chimica dei tautomeri della Curcumina. [20]

Questo composto trova molto interesse a livello nutraceutico in quanto presenta effetti antitumorali, antibatterici, antinfiammatori e anti-invecchiamento, confermati da numerosi test in vivo e in vitro. [22]

Inoltre, la Curcumina, grazie a esperimenti eseguiti su umani e animali, è considerata altamente sicura persino ad alte dosi (8-12 g/giorno) [19].

Tuttavia, la sua efficacia clinica è limitata poiché essa presenta una scarsa solubilità in acqua (7.8 mg/L) e una scarsa biodisponibilità, dovuta al minimo assorbimento e al rapido metabolismo di essa nel fegato e nella parete intestinale [20].

Sono quindi differenti i metodi utilizzati per migliorare le proprietà fisico-chimiche della curcumina:

- Polimorfi della Curcumina. Essa, infatti, possiede tre forme polimorfiche, ed il polimorfo I è quello disponibile commercialmente. Le altre due forme polimorfiche presentano una minore stabilità termodinamica ma una maggiore solubilità in acqua [22] e una maggiore velocità di dissoluzione [18]. Inoltre, la Curcumina possiede anche una forma amorfa, la quale presenta una maggiore solubilità della forma polimorfica I [20];
- Aggiungendo adiuvanti come la Piperina per bloccare le vie metaboliche della Curcumina [19];
- Tramite nuovi sistemi di *drug delivery* come le nanoparticelle, liposomi e micelle [19];
- Tramite la concomitante somministrazione di Lecitina, Quercetina, Eugenolo [19];
- Tramite la formazione di complessi con Ciclodestrine (CDC) [19];
- Tramite la sintesi di co-cristalli [19].

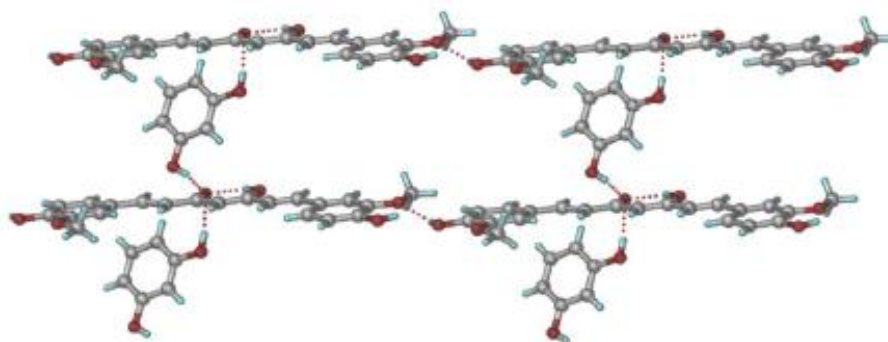
La formazione di co-cristalli è preferita rispetto alla formazione di altri cristalli multicomponente come, ad esempio, i sali in quanto nella Curcumina non sono presenti gruppi elettron attrattori [19].

Il gruppo ossidrilico della Curcumina possiede una buona reattività, la quale può esser modulata durante la formazione di co-cristalli, andando quindi a formare sintoni supramolecolari attraverso legami idrogeno con gruppi funzionali idrossilici, amminici, ammidici, acidi e basici [18], [19].

I primi co-cristalli di Curcumina isolati presentano co-former appartenenti al gruppo dei fenoli.

Ne è un esempio quello con il Resorcinolo, ottenuto in rapporto 1:1 utilizzando la tecnica LAG (Liquid Assisted Grinding), grazie al quale si ha un aumento di solubilità in soluzioni etanoliche [22].

In questo co-cristallo, considerato farmaceutico in quanto il co-former è una molecola GRAS, il Resorcinolo forma un legame idrogeno con il gruppo carbonile della Curcumina (Figura 2.6) [19].

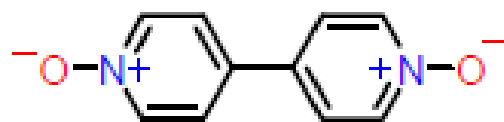


**Figura 2.6** Struttura del co-cristallo Curcumina-Resorcinolo (legami idrogeno indicati da linee tratteggiate in rosso) [19].

Recenti studi hanno anche riportato co-cristalli della Curcumina con co-former basici.



Ne è un esempio il co-cristallo formato con il BPNO (4,4-bipiridina N, N'-diossido) (Figura 2.7 [18]), basato sul legame idrogeno tra il gruppo ossidrilico della Curcumina e l'ammino ossido del BPNO [19].



**4,4-Bipyridine-N, N-Oxide (BPNO)**

**Figura 2.7** Struttura chimica del BPNO [18].

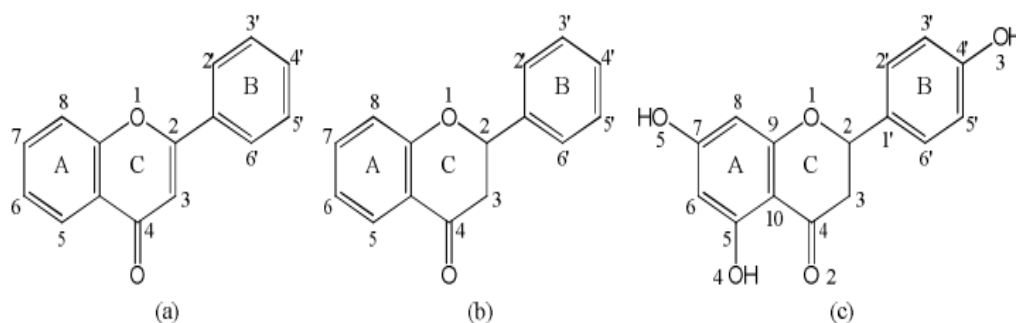
## 2.6 Naringenina e suoi co-cristalli

La Naringenina (5,7-diidrossi-2-(4-idrossifenil)croman-4-one) è un flavonoide appartenente alla sottoclasse dei flavanoni ( $C_{15}H_{12}O_5$ ) (**Figura 2.8**).

Essa, come molti altri flavanoidi, è presente principalmente in frutti della classe Citrus e nei pomodori. [23]

I flavanoidi derivano tutti dalla configurazione costituita da quindici atomi di carbonio disposti in due anelli aromatici uniti da un ponte a tre atomi di carbonio (**Figura 2.8a**). La Naringenina (**Figura 2.8b**) possiede tre gruppi idrossilici in posizione 4', 5 e 7 (**Figura 2.8c**) [24].

Al pari della Curcumina, numerosi sono gli effetti biologici della naringenina (antinfiammatori, anticarcinogenici, antiossidanti, etc. [25]). Tuttavia, anch'essa presenta una scarsa solubilità in acqua ( $46 \pm 6 \mu\text{g/mL}$  [24]) e una scarsa biodisponibilità, infatti solo il 15 % di essa viene assorbita dal tratto gastrointestinale [23]. Sono quindi diversi i metodi utilizzati al fine di migliorarne queste proprietà fondamentali: riduzione della dimensione delle particelle, tramite formazione di complessi con ciclodestrine, dispersioni solide, nanoparticelle e nanocarriers, formazione di sali e co-cristalli [26].

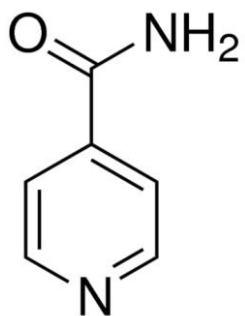


**Figura 2.8** Struttura chimica base dei flavanoidi (a), dei flavanoni (b) e della Naringenina (c) [24].

Tra questi le dispersioni solide con il polivinilpirrolidone (PVP) e sistemi di nanoparticelle hanno dato ottimi risultati [24], mentre ad esempio la formazione di sali risulta complicata a causa dei gruppi funzionali fenolici debolmente acidi [25].

La formazione di co-cristalli di Naringenina è un approccio relativamente recente ma molto promettente: infatti, la Naringenina presenta due siti competitivi per la formazione di legami idrogeno che possono agire sia da donatori che da accettori, ovvero il gruppo ossidrilico e il gruppo carbonilico [27] (**Figura 2.8c**).

Ad oggi sono pochi i co-cristalli di Naringenina riportati in letteratura. Un esempio è quello con l'Isonicotinammide, ottenuto utilizzando la tecnica di co-cristallizzazione per mescolamento in rapporto stechiometrico 1:2 in favore dell'isonicotinammide [24].



**Figura 2.9** Struttura chimica dell'Isonicotinammide.

## 2.7 Co-former

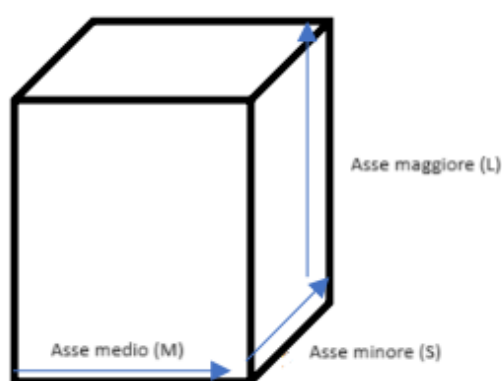
La scelta dei co-former è uno step cruciale per il design e la scoperta di nuovi co-cristalli. Bisogna considerare che, a seconda del campo di applicazione del co-cristallo, i co-former disponibili possono essere qualche centinaio (nel caso di applicazioni farmaceutiche e quindi di co-former GRAS) o arrivare anche a milioni.

È quindi necessario individuare co-former ideali per la co-cristallizzazione di molecole target, come la Curcumina e la Naringenina.

A questo scopo è molto utile il metodo di selezione virtuale di co-former ideali fornito dal Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), attraverso il quale si utilizza un database cristallografico da cui ricavare le strutture cristalline d'interesse e valutare così il tipo di interazioni intermolecolari che possono instaurarsi in una nuova struttura cristallina [28].

Il metodo di *screening* utilizzato per la selezione per la selezione dei co-former ideali è basato su due processi consecutivi: il primo di Complementarità Molecolare (Molecular Complementary MC) e il secondo di Propensione al Legame Idrogeno (Hydrogen-Bond Propensity HBP).

Il metodo MC è un approccio basato su un *box model* dell'impacchettamento cristallino con tre dimensioni differenti ( $L > M > S$ ) (**Figura 2.10**) e utilizza dei descrittori molecolari di forma (Asse corto (S), rapporto asse corto/asse lungo S/L e rapporto asse medio/asse lungo M/L) e di polarità (frazione di azoto e ossigeno e momento di dipolo) [29].

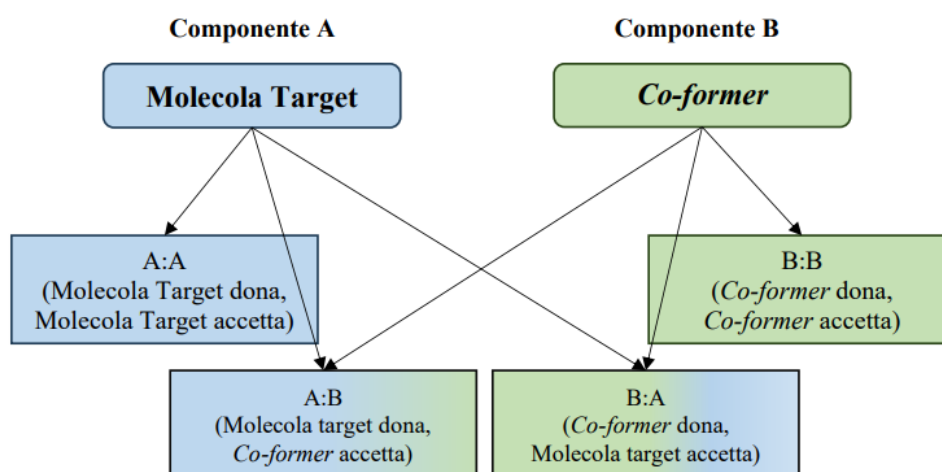


**Figura 2.10** *Box model* con tre dimensioni differenti [29].

Il metodo HBP invece restituisce la probabilità che si formi un legame idrogeno nello specifico sistema analizzato (in questo caso la coppia molecola bersaglio/co-former) [29].

Andando a indicare la molecola target come “A” e il co-former come “B” possiamo avere diverse categorie di legami a idrogeno (**Figura 2.11**) che possiamo dividere in omo-interazioni e etero-interazioni.

È possibile quindi valutare il cosiddetto punteggio Multi-Componente (MC score) come indicato in figura ed esso sarà positivo nel caso in cui un’etero-interazione (A:B o B:A) è più probabile di tutte le possibili omo-interazioni (A:A o B:B) e negativo se tutte le possibili etero-interazioni sono meno probabili della più probabile omo-interazione [28].



**Figura 2.11** Tutte le possibili interazioni tra molecola target (Componente A) e co-former (Componente B) [28].

### 2.7.1 Prolina

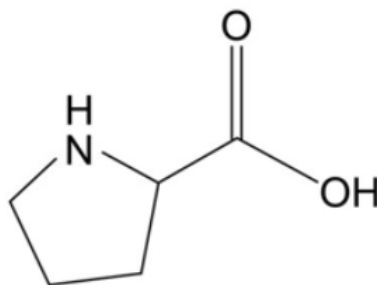
La Prolina ( $C_5H_9NO_2$ ) è un amminoacido non essenziale che può essere sia sintetizzato dall'organismo, sia assunto grazie alla dieta.

La sua struttura chimica è particolare, essa infatti è l'unico amminoacido che possiede un anello pirrolidinico in cui la catena laterale è unita al gruppo amminico a formare un'ammina secondaria (Figura 2.12) [31].

Come la maggior parte degli amminoacidi la Prolina possiede un unico centro chirale sul carbonio in posizione due e quindi possiede due enantiomeri, L e D.

Essa svolge un ruolo importante nella sintesi e struttura delle proteine come l'arginina, nel metabolismo, nelle reazioni antiossidanti e nelle risposte immunitarie.

La Prolina oltre ad essere economica e facilmente reperibile, presenta una elevata solubilità in acqua (162 g/L) rispetto agli altri amminoacidi. Inoltre, essa viene utilizzata come catalizzatore data la sua enantioselettività [32].



**Figura 2.12** Struttura chimica della Prolina.

Così come gli altri amminoacidi, la Prolina può essere utilizzata come co-former data la sua elevata sicurezza e al fine di aumentare la stabilità e dissoluzione di ingredienti farmaceutici attivi con problemi di solubilità. Questo perché gli amminoacidi possiedono un gruppo amminico e un gruppo carbossilico che possono agire da donatori e accettori di legami a idrogeno [34].

### 2.7.2 Teofillina

La Teofillina (dimetilxantina) è un composto chimico appartenente alla classe degli alcaloidi, con formula molecolare  $C_7H_8N_4O_2$ .

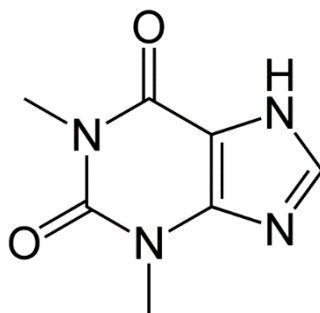
Essa deriva dalla xantina e contiene nella sua struttura due gruppi metilici in posizione 1 e 3 [35]. Inoltre, possiede quattro polimorfi anidri, di cui la forma polimorfica II è cineticamente stabile a temperatura ambiente ed è quella disponibile commercialmente [36].

Naturalmente la possiamo trovare in prodotti come il tè nero, nel cioccolato e nel caffè [35].

La Teofillina viene utilizzata nel trattamento di disturbi respiratori [37] e recentemente è stata anche utilizzata per trattare pazienti colpiti dal COVID-19 [35].

Anche se considerato un composto GRAS, un frequente utilizzo può portare a tossicità epatica [37].

La Teofillina è stata utilizzata come co-former per la sintesi di diversi co-cristalli farmaceutici con lo scopo di aumentare la sua bioattività: infatti essa possiede un protone imidazolico, un azoto imidazolico e due gruppi carbonili che possono formare legami a idrogeno [36].



**Figura 2.13** Struttura chimica della Teofillina.

## 2.8 Tecniche di caratterizzazione di nuovi co-cristalli

Le tecniche di caratterizzazione sono essenziali durante lo studio e la ricerca di nuovi co-cristalli farmaceutici.

Tra queste tecniche le principali sono le seguenti: diffrazione a raggi X su polveri (PXRD), spettroscopia Raman, analisi termogravimetrica (TGA) e la calorimetria a scansione differenziale (DSC).

### 2.8.1 Diffrazione a raggi X su polveri (PXRD)

La diffrazione a raggi X su polveri (PXRD) è una tecnica non distruttiva molto utilizzata nel settore farmaceutico data la sua efficacia e semplicità nella preparazione del campione.

Essa viene quindi utilizzata per rilevare impurità cristalline, cambiamenti nella morfologia e possibili nuove fasi cristalline.

Inoltre, questa tecnica offre la possibilità di risolvere le nuove strutture cristalline quando non è possibile la sintesi di cristalli singoli della dimensione e della qualità adeguate alla diffrazione a raggi X su cristallo singolo (SXRD) [38].

I raggi X sono onde elettromagnetiche la cui lunghezza d'onda è dell'ordine di  $10^{-10}m$ .

Quando un fascio di raggi X colpisce gli atomi di un materiale cristallino, essi generano raggi X con la stessa lunghezza d'onda del fascio mediante l'oscillazione degli elettroni e questi raggi sono onde sferiche centrate sui rispettivi atomi [39].

L'ampiezza di queste onde è proporzionale al numero di elettroni nell'atomo e quindi al numero atomico ed è descritta dal fattore di forma dell'atomo  $f$  [40].

I fenomeni di diffrazione dei raggi X sono quindi attribuiti a determinate relazioni di fase tra due o più onde ed è importante sapere che due onde sono in fase se la differenza di cammino ottico è pari a zero o a un multiplo intero della lunghezza d'onda.

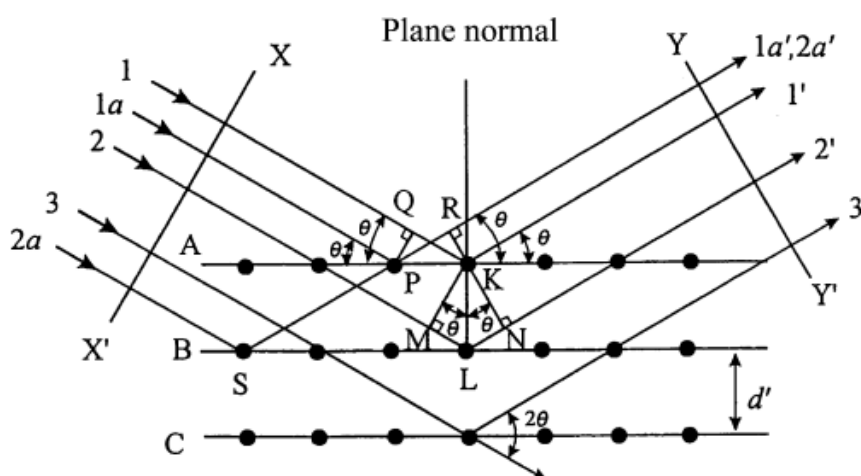
L'obiettivo principale della diffrazione dei raggi X dai cristalli è quello di conoscere la particolare condizione in cui i raggi X diffusi dagli atomi e i raggi X incidenti sono completamente in fase e si rafforzano a vicenda per produrre un fascio di diffrazione rilevabile [39].



Questa condizione, detta anche di interferenza costruttiva o riflessione di Bragg, è descritta dalla legge di Bragg:

$$2d' \sin\theta = n\lambda \quad (2.1)$$

Dove  $d'$  è la distanza tra due piani adiacenti,  $n$  è definito ordine di riflessione ed è un numero intero,  $\lambda$  è la lunghezza d'onda e  $\theta$  è l'angolo d'incidenza (Figura 2.14).



**Figura 2.14** Rappresentazione schematica della diffrazione dei raggi X di un cristallo (condizione di Bragg) [39].

### 2.8.2 Spettroscopia Raman

La spettroscopia è lo studio dell'interazione tra radiazioni elettromagnetiche e la materia. Le tecniche spettroscopiche possono basarsi su fenomeni di emissione, assorbimento, fluorescenza o scattering [41].

La spettroscopia Raman è una tecnica di spettroscopia vibrazionale che presenta svariati vantaggi rispetto ad altre tecniche, come ad esempio il fatto che il segnale raccolto sia poco influenzato dalla presenza di acqua, consentendo così l'uso in molte applicazioni dove le analisi all'infrarosso sono poco affidabili [42].

In questa tecnica il campione viene colpito da un laser monocromatico e l'interazione tra luce e materia fa sì che venga indotto un dipolo nelle molecole poiché gli atomi si polarizzano.

Questo dipolo indotto oscilla con la frequenza del campo elettromagnetico esterno e agisce da sorgente di radiazione per un campo magnetico diffuso in tutte le direzioni [43].

Nel caso di dispersione elastica, detta dispersione Rayleigh, il fotone emesso e quello entrante possiedono la stessa energia e la molecola coinvolta ritorna in uno stato con la stessa energia di quello iniziale (Figura 2.15) [42].

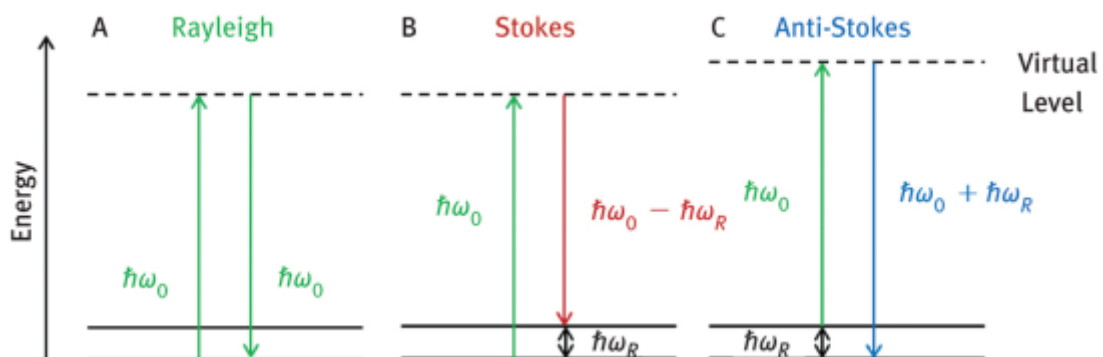
La spettroscopia Raman si basa invece su due tipi di dispersione inelastica (Figura 2.15):

- Dispersione Raman Stokes, dove l'energia viene trasferita dal fotone alla molecola, ovvero il fotone emesso ha energia minore di quello entrante e lo stato finale è uno stato quantico eccitato;
- Dispersione Raman Anti-Stokes, dove l'energia viene trasferita dal sistema quantico molecolare al fotone e quindi il fotone emesso ha energia maggiore rispetto a quello entrante [42] [43].

La differenza di energia tra il fotone in entrata e quello in uscita è detta spostamento Raman ("Raman Shift") [42].

Secondo la distribuzione di Boltzmann, lo stato fondamentale vibrazionale è più popolato rispetto agli stati vibrazionali eccitati a temperatura ambiente, di conseguenza l'intensità della dispersione Raman Stokes è maggiore dell'intensità della dispersione Raman Anti-Stokes.

Per questo motivo quando si parla di dispersione Raman si riferisce alla dispersione Raman Stokes [43].



**Figura 2.15** Diagramma di Jablonski dove sono raffigurate le transizioni durante la dispersione Rayleigh, Stokes e Anti-Stokes [43].

### 2.8.3 *Analisi Termogravimetrica (TGA)*

L'analisi termogravimetrica (TGA) è una tecnica termoanalitica utilizzata per misurare la variazione di peso in funzione della temperatura (con velocità di riscaldamento costante) o del tempo (a temperatura costante). Viene quindi utilizzata per valutare possibili perdite di solvente nel cristallo oppure la sublimazione o decomposizione di un campione, ma anche ad esempio il contenuto di umidità.

Questa tecnica presenta svariati vantaggi: infatti è semplice, presenta un'alta sensibilità, riproducibilità e richiede una piccola quantità di campione [44].

Un fattore che gioca un ruolo importante in questo tipo di analisi è l'atmosfera utilizzata che può essere reattiva, ossidante o inerte [45].

Lo strumento è dotato di una termocoppia e una bilancia di precisione grazie alla quale vengono monitorate la massa e la temperatura.

Il risultato dell'analisi è il cosiddetto termogramma che rappresenta la variazione di massa del campione in funzione della temperatura o del tempo.

Un generico termogramma presenta più sezioni:

- Sotto i 150°C si libera l'acqua fisiosorbita, composti volatili a basso peso molecolare, solventi e gas intrappolati;
- Tra i 150°C e i 200°C la perdita di massa è data dalla perdita di acqua chemisorbita e composti a basso peso molecolare come additivi e prodotti di decomposizione.
- Sopra i 250°C i composti iniziano a decomporsi tra la cosiddetta temperatura *onset* e *endset* [46].

### 2.8.4 *Calorimetria a scansione differenziale (DSC)*

La calorimetria a scansione differenziale (DSC) è la tecnica di analisi termica più utilizzata grazie alla sua velocità di esecuzione e semplicità [47].

Grazie ad essa possiamo determinare il flusso di calore e la temperatura associati alle transizioni di fase del nostro campione [48] quali fusione, cristallizzazione e transizione vetrosa [44].

Inoltre, può anche essere applicata per studiare reazioni di ossidazione e altre reazioni chimiche [44].

In base al meccanismo di operazione possiamo avere due tipi di calorimetria a scansione differenziale:

- DSC a flusso di calore. In questo caso un crogiolo contenente il campione e un crogiolo vuoto di riferimento sono posizionati in un disco termoelettrico circondato da una fornace che viene riscaldata e il calore trasferito ai crogioli grazie al disco;
- DSC a compensazione di potenza. In questo caso il crogiolo contenente il campione e quello vuoto di riferimento vengono posti in due fornaci riscaldate da differenti elementi [48].

In generale comunque in una prova di calorimetria a scansione differenziale le temperature di entrambe le celle vengono innalzate allo stesso modo nel tempo e la differenza nell'energia immessa per far coincidere la temperatura del campione con quella del riferimento sarà la quantità di calore in eccesso assorbita o rilasciata dal campione a seconda che sia un processo esotermico o endotermico [48].

Questa tecnica viene anche utilizzata per lo screening di co-cristalli in quanto si assume che la temperatura di fusione di un co-cristallo differisca da quella dei componenti [49].

## 3. Materiali e Metodi

### 3.1 Materiali

La Curcumina e la Teofillina sono state acquistate dalla Thermo Scientific mentre la Naringenina e la Prolina sono state acquistate dalla Fisher Scientific. I reagenti sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

L'acetone nitrile è stato acquistato da Fisher Scientific, l'isopropanolo da Honeywell, l'etanolo da VWR, l'acetone nitrile da Fisher Scientific e il metanolo da Sigma-Aldrich.

Per la filtrazione sono stati utilizzati filtri in membrana di Artiglass.

### 3.2 Scelta dei co-former

Il primo step in questo lavoro di tesi è stato quello di valutare possibili co-formers per ottenere co-cristalli di Curcumina e Naringenina.

Questo procedimento è importante in quanto si va a ridurre la lista di co-formers con lo scopo di andare a focalizzare gli esperimenti su pochi composti, aumentando così la probabilità di successo.

Il metodo utilizzato si basa sulla previsione delle interazioni basate su legami a idrogeno tra il nostro ingrediente farmaceutico attivo (API) e il co-former.

In un primo step si è effettuata un'analisi di complementarità molecolare tra le nostre molecole bersaglio e una lista di possibili co-formers. Questa analisi si basa su alcuni descrittori di dimensioni, forma e polarità (descritti nel capitolo 2.7). In base al valore di questi descrittori restituisce come risultato FAIL in caso di esito negativo e PASS in caso di esito positivo (vedi **Tabella 1 Appendice** e **Tabella 2 Appendice**).

I co-former che hanno superato il primo processo di selezione sono stati utilizzati come input per il metodo MCHBP (Multi-Component Hydrogen Bonding Propensity) che prevede di calcolare il punteggio Multi-Componente (Multi-Component score MC) come descritto nel capitolo 2.7.

In **Figura 3.1** e in **Figura 3.2** possiamo quindi rispettivamente vedere i risultati ottenuti per la Curcumina e la Naringenina.

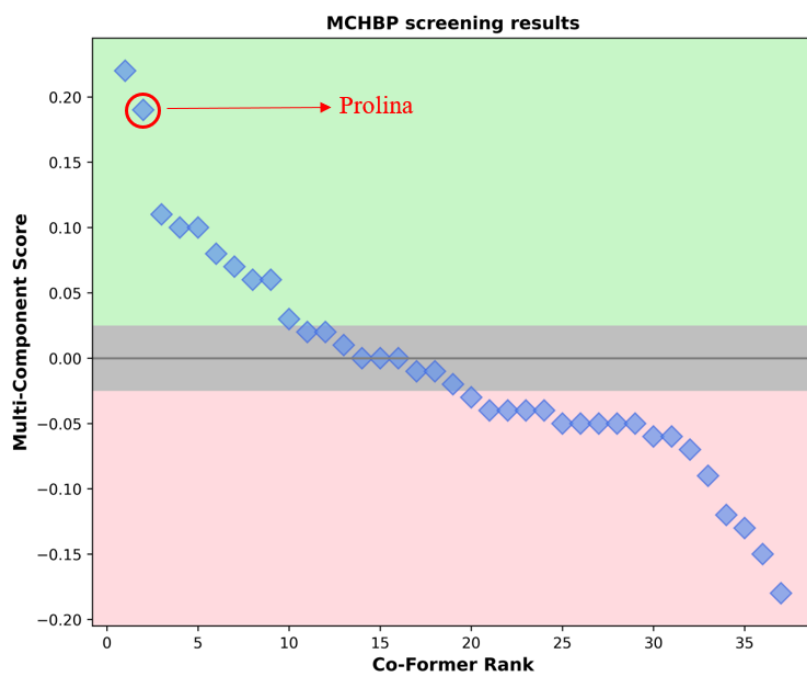
In caso di punteggio Multi-Componente maggiore di zero (sfondo verde in **Figura 3.1** e **Figura 3.2**) allora la probabilità che si formi una etero-interazione (API:co-former o co-former:API) è maggiore rispetto alla formazione di una omo-interazione (API:API o co-former:co-former).

Invece, se il punteggio Multi-Componente è minore di zero (sfondo rosso in **Figura 3.1** e **Figura 3.2**), allora le omo-interazioni saranno più probabili rispetto alle etero-interazioni.

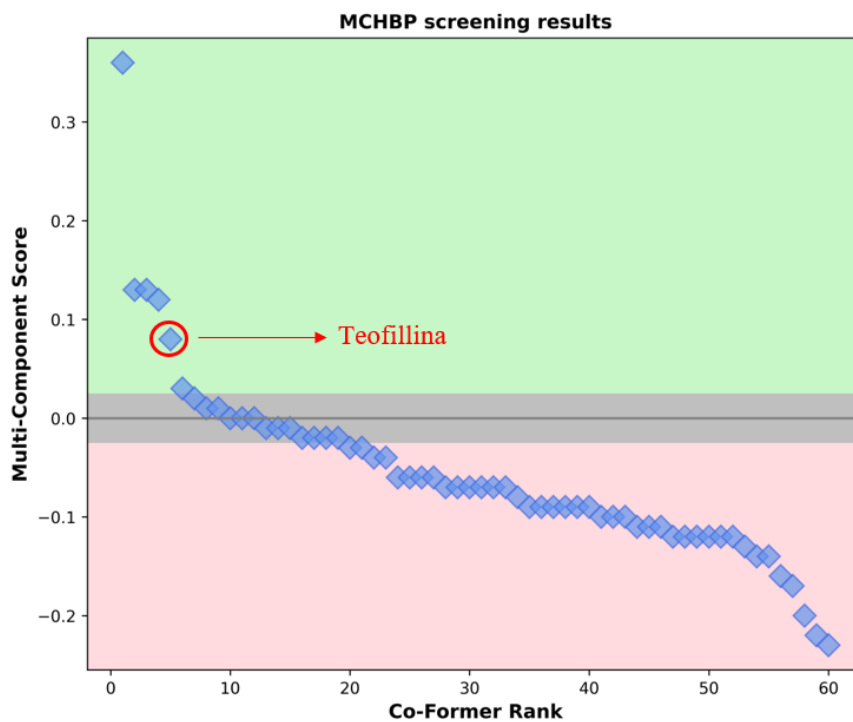
Per valori prossimi allo zero (sfondo grigio in **Figura 3.1** e **Figura 3.2**) allora le omo-interazioni e le etero-interazioni hanno la stessa probabilità di formarsi.

Grazie a queste analisi è stato quindi possibile focalizzare gli esperimenti sui co-former più promettenti.

Sono stati quindi ottenuti e caratterizzati due co-cristalli: Curcumina – Prolina e Naringenina – Teofillina.



**Figura 3.1** Risultati dell'analisi MCHBP per la Curcumina. Sull'asse delle ascisse possiamo trovare i vari co-formers mentre sull'asse delle ordinate abbiamo il punteggio Multi-Componente.



**Figura 3.2** Risultati dell'analisi MCHBP per la Naringenina. Sulla'asse delle ascisse possiamo trovare i vari co-formers mentre sull'asse delle ordinate abbiamo il punteggio Multi-Componente.

### 3.3 *Esperimenti di co-cristallizzazione*

Una volta individuati i possibili co-former son stati effettuati degli esperimenti di co-cristallizzazione. In questo lavoro di tesi non sono stati utilizzati tecniche di cristallizzazione allo stato solido ma solo tecniche in soluzione.

I primi esperimenti sono stati effettuati usando la tecnica di co-cristallizzazione per mescolamento utilizzando il cristallizzatore Crystal16, strumento della Technobis Crystallization System.

Questo strumento possiede sedici reattori con un volume di 1 mL (*vials*) ed è quindi possibile effettuare sedici esperimenti in contemporanea a temperatura e agitazione controllata.

Quindi, sia per il sistema Curcumina – Prolina, sia per il sistema Naringenina – Teofillina, sono stati effettuati diversi esperimenti a diversi rapporti stechiometrici (1:1, 1:2, 2:1) in un volume pari a 1 mL di diversi solventi: Etanolo, Acetonitrile, Isopropanolo e Metanolo. Questi solventi sono stati sia scelti poiché la maggior parte di essi son poco o per niente tossici per l'ambiente e per l'organismo, ma anche per la loro polarità che può favorire la formazione di co-cristalli che coinvolgono legami idrogeno.

Le quantità di API e co-former sono state scelte, dopo uno studio sulle solubilità dei componenti puri, in modo tale da creare soluzioni sovrassature.

Inoltre, la Curcumina, prima di ogni esperimento, è stata gentilmente macinata grazie a un mortaio. Quindi gli esperimenti di co-cristallizzazione per miscelazione sono stati effettuati alla temperatura costante di 25 °C e, grazie a un agitatore magnetico, in agitazione (780 rpm) per un tempo di due giorni.

Successivamente sono stati effettuati degli altri esperimenti per un periodo di tempo maggiore, in modo tale da fare proseguire la reazione per più tempo. Questo perché le prime analisi hanno dato risultati positivi, ovvero si è ottenuta una fase cristallina, ma non pura e quindi si è ipotizzato fosse una questione di cinetica.

Al termine di ogni esperimento il contenuto delle vials è stato filtrato tramite filtrazione sottovuoto utilizzando carta da filtro e lasciato essiccare a temperatura ambiente sotto una cappa aspirante.

Successivamente questi campioni sono stati caratterizzati inizialmente tramite spettroscopia Raman e diffrazione a raggi X da polveri (PXRD) per verificare la formazione di possibili nuove fasi cristalline.

Al fine di effettuare ulteriori caratterizzazioni per i sistemi più promettenti, sono stati preparati campioni di Curcumina – Prolina e Naringenina – Teofillina in volumi maggiori di solvente (30 mL) utilizzando dei becher graduati da 200 mL. Anche in questo caso il sistema è stato mantenuto a 25 °C



e in agitazione (500 rpm), grazie a un agitatore magnetico con piastra riscaldante, per un tempo di 4 giorni.

Al termine di questi esperimenti il precipitato solido è stato recuperato tramite filtrazione sottovuoto e lasciato essiccare a temperatura ambiente sotto cappa aspirante.

### *3.4 Caratterizzazione delle fasi cristalline*

La fase di caratterizzazione è molto importante poiché ci permette di confermare se è stata ottenuta una nuova fase cristallina e ci permette di valutarne la proprietà chimico-fisiche al fine di confrontarle con quelle dei componenti puri (API e co-former).

Le tecniche di caratterizzazione che sono state utilizzate in questo lavoro di tesi sono le seguenti: spettroscopia Raman, diffrazione a raggi X da polveri (PXRD), calorimetria a scansione differenziale (DSC) e analisi termogravimetrica (TGA).

#### *3.4.1 Spettroscopia Raman*

La spettroscopia Raman è stata utilizzata per avere informazioni sulla struttura molecolare dei campioni e per confrontarne i loro spettri con quelli dei composti puri.

Questa tecnica presenta molti vantaggi, tra cui la velocità di esecuzione e la minima quantità di campione richiesta. Quindi è molto utile per effettuare uno screening iniziale.

Lo strumento utilizzato in questo lavoro di tesi è uno spettrometro LabRAM HR Evolution della HORIBA Scientific.

Il laser utilizzato è un laser da 100 mW che opera a 785 nm e la radiazione retrodiffusa è stata raccolta da un rilevatore Synapse Plus BIDD (1024 x 256 pixels), utilizzando un reticolo di diffrazione da 300 L/nm.

I vari spettri sono stato ricavati in un range di valori di Raman shift pari a 250 e 1690  $\text{cm}^{-1}$  e i parametri di acquisizione utilizzati sono stati i seguenti: 1 secondo di acquisizione e 15 accumuli.

La preparazione del campione è relativamente semplice. Una piccola quantità viene posizionata su un vetrino porta oggetti, il quale poi viene inserito all'interno dello strumento. A questo punto, prima di far partire l'acquisizione, il campione dovrà esser messo a fuoco e ciò sarà possibile grazie a un obiettivo (obiettivo confocale Olympus 10x).

Infine, gli spettri ottenuti sono stati elaborati tramite il software LabSpec6 al fine di ottenere degli spettri di maggiore qualità e di più facile comprensione per una successiva analisi.

Questa elaborazione consiste prima di tutto nel normalizzare gli spettri a una scala di intensità che va da 0 a 100 in modo tale da rendere più facile il confronto.

Successivamente grazie allo smoothing è stato possibile ridurre il rumore al fine di rendere più chiari gli spettri e grazie alla correzione della baseline è stato possibile eliminare possibili pendenze negli spettri al fine di renderli più lineari.

#### *3.4.2 Diffrazione dei raggi X su polveri (PXRD)*

La diffrazione a raggi X da polveri è stata effettuata sui campioni al fine di ottenere informazioni sulla loro struttura cristallina e per confrontarne i diffrattogrammi ottenuti con quelli dei componenti puri.

Questa tecnica presenta molti vantaggi, tra cui la specificità dei diffrattogrammi, la minima quantità di campione richiesta e il fatto di essere una tecnica non distruttiva.

I diffrattogrammi sono stati acquisiti grazie a un diffrattometro PANalytical X'pert PRO operante a temperatura ambiente utilizzando la radiazione Cu K- $\alpha$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) e un rivelatore X'celerator.

Il generatore di raggi X è stato impostato su un voltaggio di 40 kV e una corrente di 40 mA.

I diffrattogrammi sono stati acquisiti per valori di  $2\theta$  compresi tra  $4^\circ$  e  $30^\circ$  con uno step size di  $0.02626^\circ$  a una velocità di 29.070 s/step. La geometria utilizzata per l'analisi è la Bragg-Brentano.

Per effettuare questa analisi il campione (polvere) è stato disposto su un porta campione chiamato *zero-background*. Bisogna assicurarsi che il campione formi una superficie piana e omogenea per evitare fenomeni di orientazione preferenziale della fase cristallina.

#### *3.4.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)*

Questa analisi termica è stata effettuata utilizzando un 8000Mettler TOLEDO DSC-1 (PerkinElmer) in atmosfera inerte di N<sub>2</sub> (50 mL/min).

Una piccola quantità di campione (non inferiore a 3 mg) è stata disposta in un crogiolo di alluminio e portata da 25°C a 250°C con una velocità di riscaldamento pari a 10°C/min.

Il grafico che lo strumento ci restituisce mostra come varia il flusso di calore (W/g) al variare della temperatura.

Grazie ad essi abbiamo potuto valutare come si comportano i nostri campioni al variare della temperatura rispetto ai componenti puri e verificare se avvengono transizioni di fase (fusione, transizione vetrosa, cristallizzazione).

#### *3.4.4 Analisi termogravimetrica (TGA)*

L'analisi termogravimetrica è stata effettuata utilizzando un Mettler Toledo 1600 e utilizzando un'atmosfera inerte di Argon con un flusso di 50 mL/min.

Una piccola quantità di campione (qualche mg) è stata disposta in un crogiolo di allumina e portata da 25 a 500°C, grazie a una fornace, a una velocità di riscaldamento pari a 10°C/min.

Lo strumento restituisce quindi un grafico che mostra come varia il peso del nostro campione (%peso) al variare della temperatura.

Grazie a questi grafici è quindi stato possibile valutare il comportamento dei campioni al variare della temperatura rispetto ai componenti puri.

#### *3.4.5 Angolo di contatto*

La bagnabilità delle particelle è stata valutata misurando l'angolo di contatto che si forma su un disco di polvere compressa.

Le misurazioni sono state effettuate a temperatura ambiente utilizzando un analizzatore di forma di gocce DSA25 (Krüss Scientific) dotato di una microsiringa e una telecamera ad alta velocità. Dischi compressi della polvere sono stati creati posizionando una piccola quantità di polvere delicatamente macinata tra le piastre di una pressa idraulica. Due dischi di carta tracciante sono stati inseriti tra le piastre per garantire la formazione di una superficie del disco omogenea e più liscia. La polvere è stata poi pressata con una pressione di 200 bar per 30 secondi. Gocce d'acqua e d'olio (volume di 2  $\mu$ L) sono state versate sulle superfici del disco utilizzando un ago, e il comportamento delle gocce è stato registrato con una telecamera. Questi solventi sono stati scelti per la loro differente polarità (acqua polare e olio non polare).

Il contorno della goccia è stato analizzato utilizzando il metodo di Young-Laplace con il software Krüss Advance 1.12.0.35401, e gli angoli di contatto tra il substrato del disco e l'acqua ( $\theta_w$ ) o la goccia d'olio ( $\theta_o$ ) sono stati così determinati.

### 3.5 Curve di solubilità per il sistema Curcumina – Prolina

Al fine di costruire un diagramma di fase per il sistema Curcumina – Prolina e per confrontare la solubilità del co-cristallo con quella dei componenti puri, sono state ricavate le curve di solubilità in etanolo per la Curcumina e per la Prolina.

Questo è stato possibile grazie all'utilizzo del Crystal16, che permette di ricavare velocemente e efficacemente dati di solubilità per un composto desiderato.

Questo perché esso può andare a misurare per ogni reattore valori di trasmissività che variano da 0 (soluzione torbida) a 100 (soluzione completamente limpida) che possono quindi esser associati a temperature di saturazione, ovvero la temperatura alla quale il nostro soluto si è completamente disciolto.

Quindi sono state preparate sedici soluzioni a concentrazione nota crescente utilizzando sempre 1 mL di solvente. Successivamente queste soluzioni sono state riscaldate imponendo una rampa di temperatura con una velocità di riscaldamento pari a 0.3 °C/min e agitate grazie un agitatore magnetico a 780 rpm.

La temperatura massima raggiunta è limitata dal punto di ebollizione del solvente: in questo caso lavorando con etanolo, che ha una temperatura di ebollizione di 79°C, si è arrivati a una temperatura massima di 65°C.

Una volta terminati gli esperimenti, grazie al software CrystalClear, si è andati a costruire le curve di solubilità grazie ai *clear point*, ovvero i punti di temperatura in cui la soluzione raggiunge un valore di trasmissività del 100% (soluzione completamente limpida).

Successivamente i dati di solubilità sono stati linearizzati tramite l'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,  $\Delta H$  è l'entalpia di dissoluzione,  $T_0$  è la temperatura iniziale e  $T$  è la temperatura di saturazione della frazione molare  $x$ .

La linearizzazione di van't Hoff permette di interpolare o estrapolare le solubilità ad altri valori di temperatura.

### 3.6 Ottenimento diagramma di fase per il sistema Curcumina – Prolina

Dopo i primi esperimenti di co-cristallizzazione con rapporti stechiometrici definiti sono stati effettuati degli esperimenti al fine di ottenere un diagramma di fase del sistema Curcumina – Prolina in Etanolo.

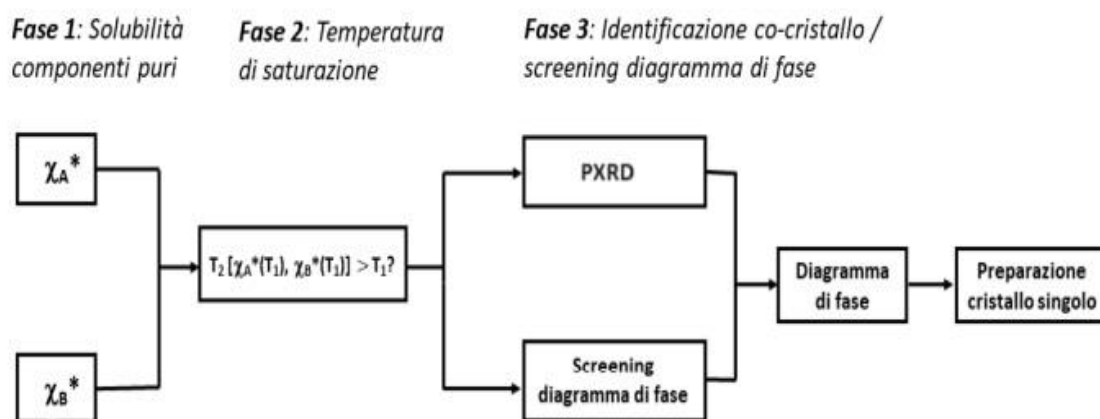
Grazie a questo diagramma possiamo definire una zona di stabilità del co-cristallo, ovvero una zona dove sia più favorevole la sua formazione.

Queste informazioni sono utili per andare a effettuare successivi esperimenti di ottenimento di cristalli singoli e per lo scale-up del sistema.

Chiarella et al. hanno dimostrato che la cristallizzazione in soluzione che utilizzano la stechiometria del co-cristallo non porterà a priori alla sua sintesi, perché la regione del diagramma di fase più favorevole potrebbe essere persa e quindi hanno concluso che un punto di partenza migliore per la sintesi siano le solubilità [50].

Inoltre, Nehm et al. hanno suggerito che, se il co-cristallo è più stabile dei suoi componenti, allora la sua solubilità sarà inferiore alla combinazione dei suoi costituenti [51].

La costruzione del diagramma di fase è stata effettuata seguendo i passi mostrati in **Figura 3.3** [52].



**Figura 3.3** Fasi da seguire per ottenere un diagramma di fase partendo dai valori di solubilità dei componenti [52].

Quindi il primo passo è stato valutare le solubilità dei componenti puri a differenti temperature costruendo delle curve di solubilità come spiegato nel capitolo precedente.

Successivamente è stata valutata la temperatura di saturazione di soluzioni miste dei due componenti: se il sistema Curcumina – Prolina è in grado di co-cristallizzare, una soluzione con una

concentrazione di Curcumina e Prolina pari alle solubilità a una determinata temperatura avrà una temperatura di saturazione maggiore alla temperatura di riferimento.

Questi esperimenti sono stati condotti utilizzando gli stessi parametri di misura utilizzati per ottenere le curve di solubilità dei componenti puri.

Dunque, le temperature di saturazione sono state determinate leggendo i valori di trasmittanza pari al 100%.

Come riportato in letteratura, se la temperatura di saturazione risulterà essere maggiore di almeno 10°C rispetto alla temperatura di saturazione dei componenti puri allora con molta probabilità avremo ottenuto una fase co-cristallina più stabile e quindi meno solubile.

I residui solidi ottenuti da questi esperimenti sono quindi stati recuperati tramite filtrazione sottovuoto e lasciati asciugare a temperatura ambiente sotto cappa aspirante, per poi essere analizzati tramite PXRD.

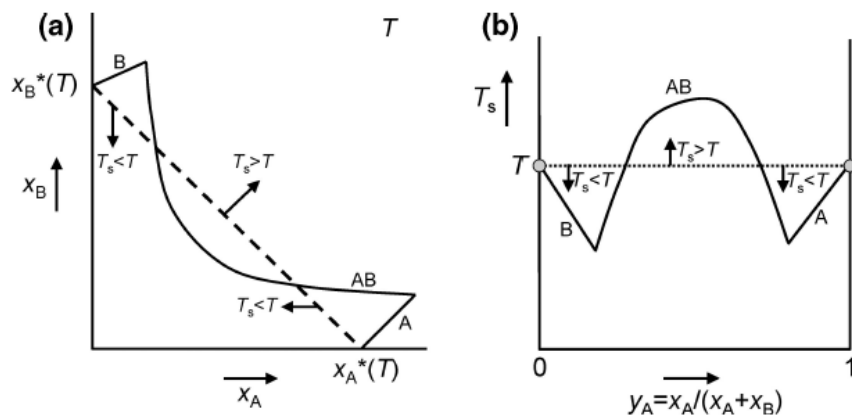
Successivamente a queste analisi è stato costruito il diagramma di fase come quello in **Figura 3.4b** dove sull'asse delle ordinate troviamo la temperatura di saturazione mentre sull'asse delle ascisse troviamo la frazione molare dell'ingrediente API, in questo caso la Curcumina, escluso il contributo del solvente:

$$y_A = \frac{X_A}{X_A + X_B} \quad (3.2)$$

dove A rappresenta la Curcumina e B rappresenta la Prolina.

Le composizioni  $X_A$  e  $X_B$  sono state facilmente campionate lungo la linea tratteggiata come in **Figura 3.4a** che è descritta dalla seguente equazione:

$$\frac{X_B}{X^*_B} = 1 - \frac{X_A}{X^*_A} \quad (3.3)$$



**Figura 3.4** (a) Diagramma di fase di un sistema ternario di API, co-former B e solvente a temperatura costante. (b) Diagramma che rappresenta il profilo della temperatura di saturazione in funzione della frazione molare esclusa dal solvente [52].

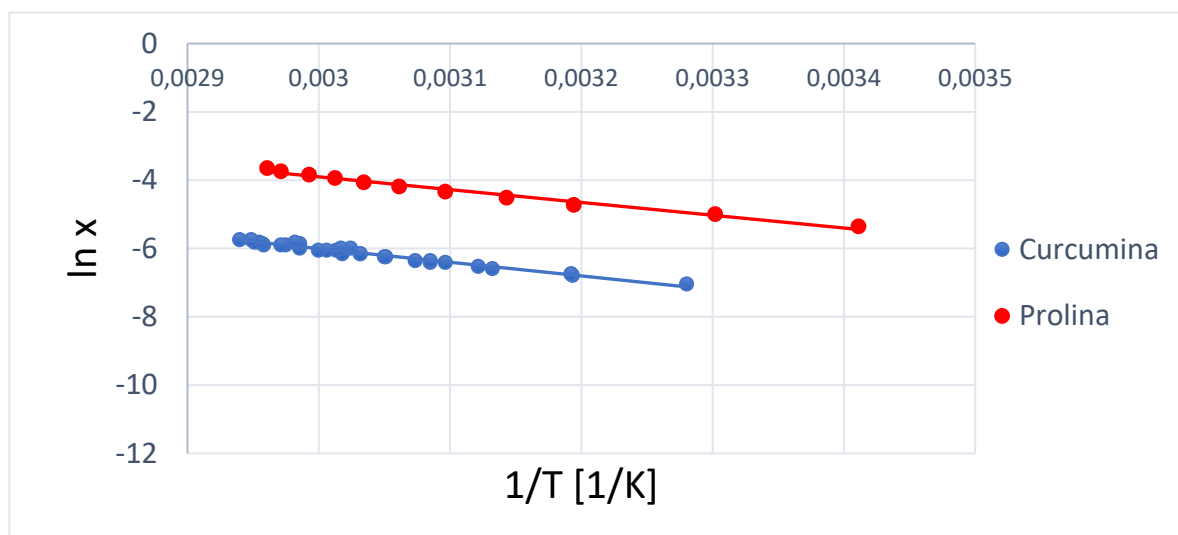
## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Curve di solubilità per sistema Curcumina - Prolina

In **Figura 4.9** possiamo osservare le curve di solubilità ottenute in etanolo per la Curcumina e per la Prolina.

Nell'asse delle ascisse troviamo l'inverso della temperatura espressa in Kelvin mentre nell'asse delle ordinate troviamo il logaritmo naturale della frazione molare.

Da queste due curve possiamo osservare come la solubilità della Prolina in etanolo sia maggiore rispetto a quella della Curcumina.



**Figura 4.1** - Grafico di van't Hoff per la Curcumina e la Prolina in etanolo.



#### 4.2 Risultati esperimenti di co-cristallizzazione Curcumina – Prolina

Gli esperimenti di co-cristallizzazione per il sistema Curcumina - Prolina sono stati condotti tramite tecnica di co-cristallizzazione per mescolamento in Acetonitrile, Isopropanolo, Etanolo e Metanolo in tre differenti rapporti stechiometrici: 1:1, 1:2 e 2:1 (**Tabella 3**).

Le polveri recuperate tramite filtrazione dopo gli esperimenti al Crystal16 sono state inizialmente analizzate tramite spettroscopia Raman e PXRD per verificare in maniera rapida la possibile formazione di nuove fasi co-cristalline.

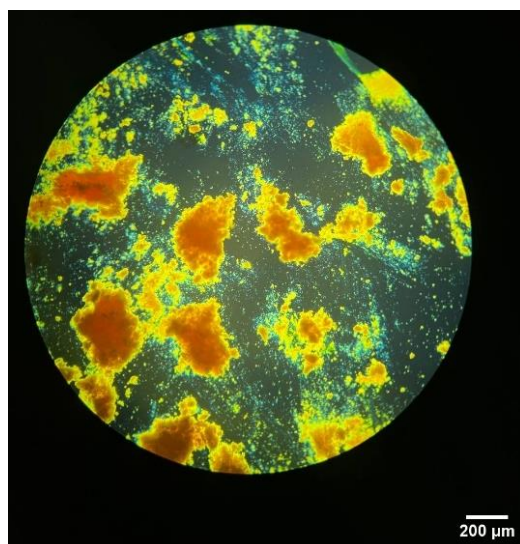
Questo procedimento consiste nell'andare a confrontare gli spettri Raman e i diffrattogrammi dei campioni con quelli dei componenti puri.

I risultati maggiormente positivi sono stati ottenuti per il rapporto stechiometrico 1:2 in Acetonitrile e Metanolo.

Del primo campione è stata quindi effettuata una sintesi con maggiori quantità per effettuare in maniera completa tutte le analisi di caratterizzazione.

API	Co-former	Rapporto stechiometrico	Metodo di sintesi	Solvente
Curcumina	Prolina	1:1	Mescolamento	EtOH, MeOH, MeCN, IPA
		1:2		
		2:1		

**Tabella 3** – Esperimenti di co-cristallizzazione per il sistema Curcumina – Prolina.



**Figura 4.2** - Immagine al microscopio ottico a luce polarizzata del campione di Curcumina – Prolina 1:2 ottenuto tramite co-cristallizzazione per mescolamento in acetonitrile.

A titolo di esempio è riportato in **Figura 4.3** lo spettro Raman del campione di Curcumina – Prolina in rapporto stechiometrico 1:1 ottenuto tramite mescolamento in etanolo per due giorni a 25°C.

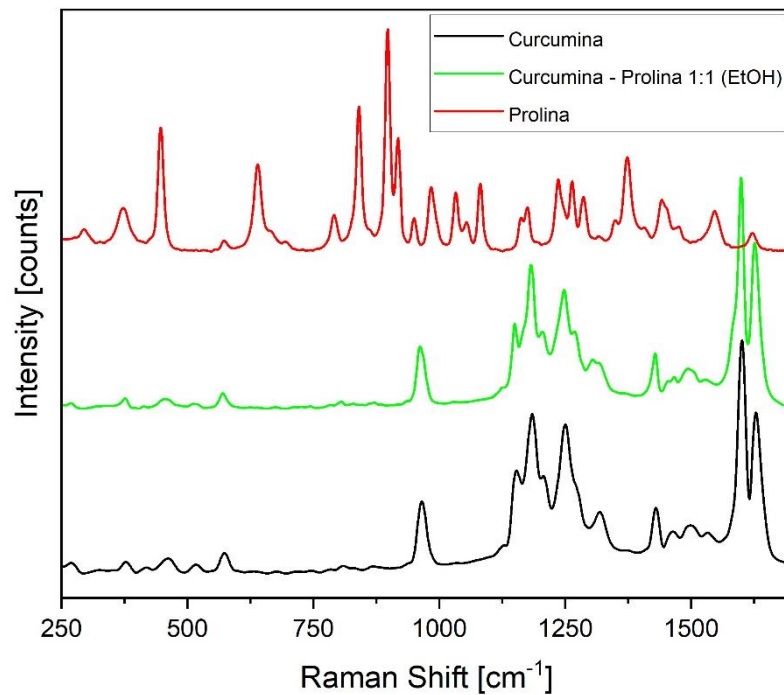
Possiamo osservare come, dal confronto con gli spettri dei componenti puri, lo spettro del campione Curcumina – Prolina sia identico a quello della Curcumina.

Questo indica che non abbiamo nessuna nuova fase e quindi che l'esperimento non ha dato risultati positivi.

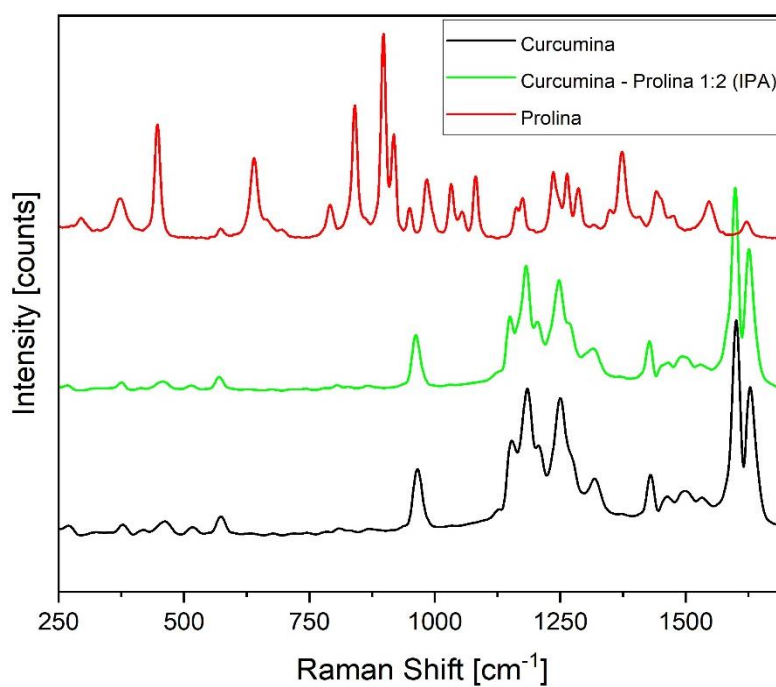
In **Figura 4.4** invece è riportato lo spettro Raman del campione di Curcumina – Prolina in rapporto stechiometrico 1:2 ottenuto tramite mescolamento in isopropanolo per due giorni a 25°C.

Anche in questo caso, confrontando questo spettro con quello dei componenti puri possiamo notare come esso sia identico a quello della Curcumina.

Quindi anche in questo caso con molta probabilità non si è formata una nuova fase co-cristallina.



**Figura 4.3** - Spettri Raman del campione di Curcumina – Prolina 1:1 ottenuto in etanolo (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina (in rosso).



**Figura 4.4** - Spettri Raman del campione di Curcumina – Prolina 1:2 ottenuto in isopropanolo (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina (in rosso).

### 4.3 Caratterizzazione del co-cristallo Curcumina – Prolina

Le tecniche di caratterizzazione utilizzate per analizzare il co-cristallo Curcumina - Prolina sono le seguenti:

- Diffrazione a raggi X su polveri (PXRD);
- Spettroscopia Raman;
- Calorimetria a scansione differenziale (DSC);
- Analisi Termogravimetrica (TGA);

#### 4.3.1 Diffrazione a raggi X su polveri

Un diffrattogramma riporta l'intensità dei picchi di diffrazione in funzione dell'angolo di diffrazione ( $2\theta$ ).

I diffrattogrammi del campione di Curcumina – Prolina in acetonitrile (**Figura 4.5**) e in metanolo (**Figura 4.6**) è stato confrontato con quello dei componenti puri: questo permette di capire se abbiamo ottenuto una nuova fase co-cristallina o una miscela dei due componenti.

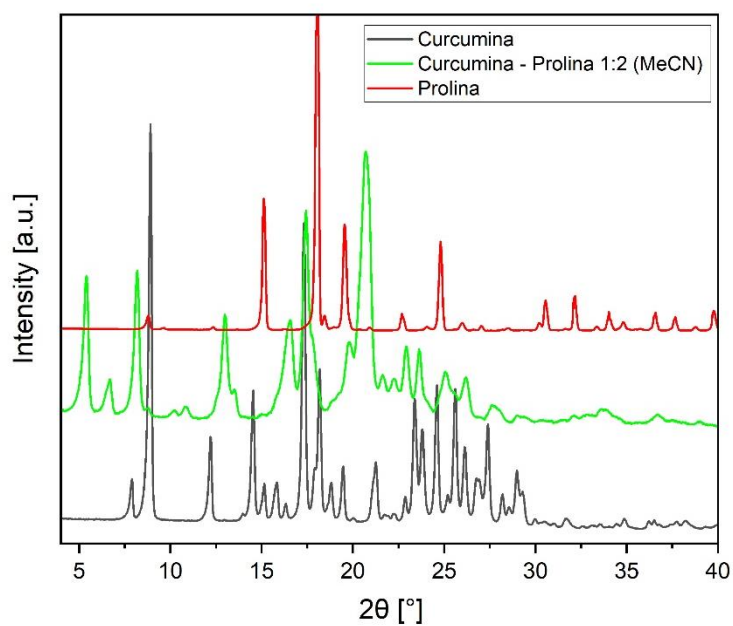
Possiamo notare come nel diffrattogramma del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile ci siano dei picchi nuovi differenti da quelli dei componenti puri. I suoi picchi caratteristici si trovano a valori di  $2\theta$  pari a  $8.18^\circ$ ,  $17.42^\circ$  e  $20.70^\circ$ .

Per quanto riguarda invece i composti puri abbiamo picchi caratteristici per i seguenti valori: per la Curcumina a valori di  $2\theta$  pari a  $8.92^\circ$ ,  $17.32^\circ$  e  $18.19^\circ$  mentre per la Prolina a valori di  $2\theta$  pari a  $15.12^\circ$ ,  $18.06^\circ$  e  $19.55^\circ$ .

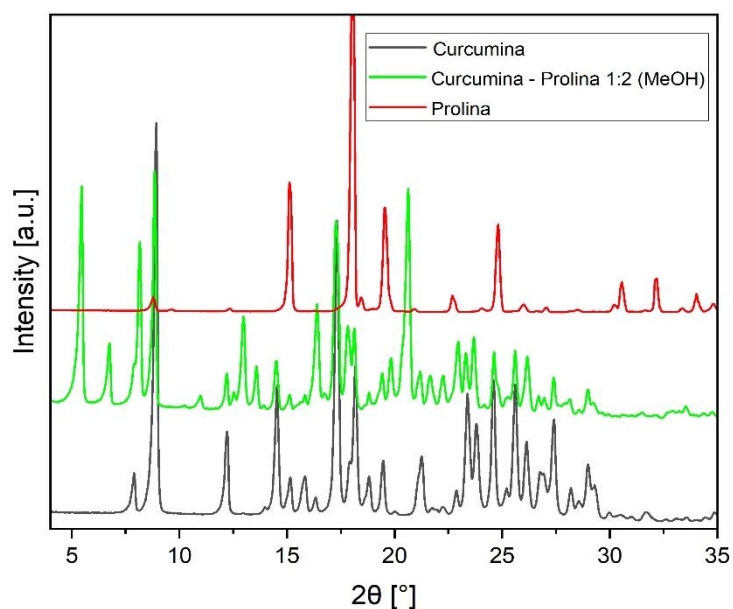
La presenza di picchi di intensità e posizioni differenti nel campione sintetizzato identifica l'ottenimento di una fase cristallina differente dai materiali di partenza e dunque la possibile formazione di un co-cristallo.

Nel diffrattogramma del campione di Curcumina – Prolina, ottenuto dalla sintesi per mescolamento in metanolo possiamo osservare non solo la presenza degli stessi presenti per la specie cristallina ottenuta in acetonitrile ma anche alcuni picchi aggiuntivi che sono sovrapponibili ai picchi della Curcumina.

Quindi potrebbe trattarsi di una miscela di due o più fasi formata da una forma co-cristallina non pura e Curcumina.



**Figura 4.5** - Diffratogrammi della Curcumina (in nero), del campione Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (in verde) e della Prolina (in rosso).



**Figura 4.6** - Diffratogrammi della Curcumina (in nero), del campione Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo (in verde) e della Prolina (in rosso).

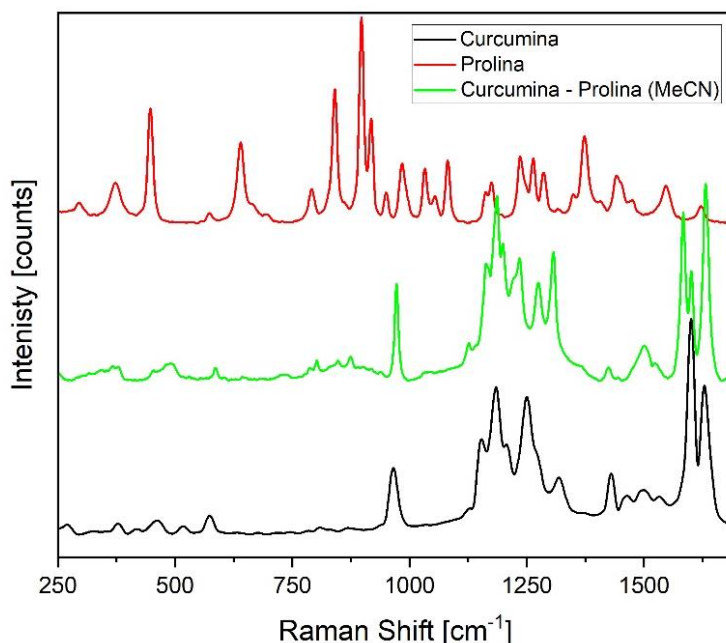
### 4.3.2 Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman, al pari della diffrazione a raggi X da polveri, è stata utilizzata per identificare la natura delle fasi solide ottenute.

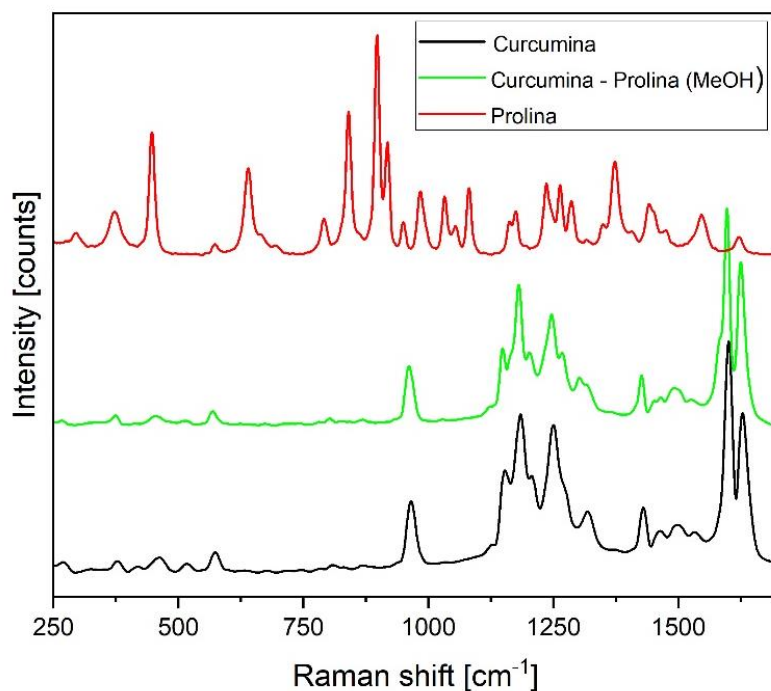
Anche in questo caso si è andati a confrontare lo spettro del campione di Curcumina - Prolina ottenuto in acetonitrile (**Figura 4.7**) e lo spettro del campione ottenuto in metanolo (**Figura 4.8**) con gli spettri dei componenti puri per confermare la formazione del co-cristallo.

Nello spettro del campione ottenuto in acetonitrile possiamo notare la presenza di nuovi picchi e di spostamenti rispetto a quelli dei componenti puri, soprattutto nella zona tra valori di spostamento Raman pari a 1000 e 1700  $\text{cm}^{-1}$ . In questa zona, è possibile identificare lo stretching e il bending di gruppi funzionali della Curcumina e della Prolina potenzialmente impiegati nella formazione di legami a idrogeno.

Invece, nello spettro Raman del campione ottenuto in metanolo non possiamo osservare nuovi picchi caratteristici; infatti, lo spettro è molto simile a quello della Curcumina. Questo può confermare quanto detto sulle analisi da polveri, ovvero che potrebbe trattarsi di una miscela di due o più fasi formata da una forma co-cristallina non pura e Curcumina.



**Figura 4.7** - Spettri Raman del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina (in rosso).



**Figura 4.8** - Spettri Raman del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina (in rosso).

#### 4.3.3 Analisi termiche

Le caratterizzazioni termiche, come la calorimetria a scansione differenziale (DSC) e l'analisi termogravimetrica (TGA), sono state utili per definire la presenza di impurezze nei campioni sintetizzati sia nel determinare la stabilità termica e il punto di fusione dei campioni.

Sono quindi riportati i confronti delle DSC del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (**Figura 4.9**) e del campione ottenuto in metanolo (**Figura 4.10**) con le DSC dei campioni puri.

La Curcumina presenta un picco endotermico a 177.7 °C che corrisponde al suo punto di fusione mentre la Prolina va incontro a fusione a 215.4°C.

Inoltre, per la Prolina possiamo osservare un fenomeno di degradazione subito dopo la fusione.

Il campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile presenta un picco endotermico a 157.8°C, temperatura diversa rispetto a quella dei componenti puri.

Questo evento corrisponde ad una fusione con degradazione del co-cristallo. Inoltre, l'assenza di ulteriori picchi endotermici evidenzia la presenza di una sola fase cristallina.

Per quanto riguarda il campione Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo possiamo notare un picco endotermico a 162.02°C, ovvero a una temperatura leggermente maggiore rispetto al campione ottenuto in acetonitrile e sempre diversa da quella dei composti puri.

Anche in questo caso possiamo osservare un secondo fenomeno endotermico successivo al primo, sempre in corrispondenza della temperatura di fusione della curcumina, ma molto meno accentuato. Grazie al confronto tra le due analisi termiche possiamo notare come il picco endotermico della DSC sia correlato al gradino presente nel termogramma che indica come il nostro campione dopo quella temperatura (circa 230°C) inizia a perdere peso in maniera molto evidente a indicare un fenomeno di degradazione.

Nei grafici successivo troviamo invece il confronto tra DSC e TGA del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (**Figura 4.11**) e del campione ottenuto in metanolo (**Figura 4.12**).

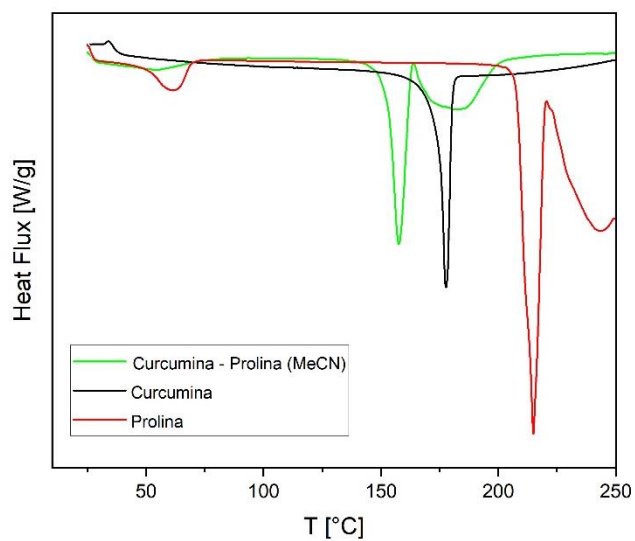
Grazie al confronto tra le due analisi termiche possiamo notare come il picco endotermico della DSC sia correlato al gradino presente nel termogramma.

Nel campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (peso di partenza: 5.6 mg) possiamo notare che si ha una perdita di peso evidente tra 150°C e 190°C (circa 1.5 mg). Successivamente si ha comunque una perdita di peso ma meno marcata, fino ad arrivare a circa 2 mg di campione a 500°C.

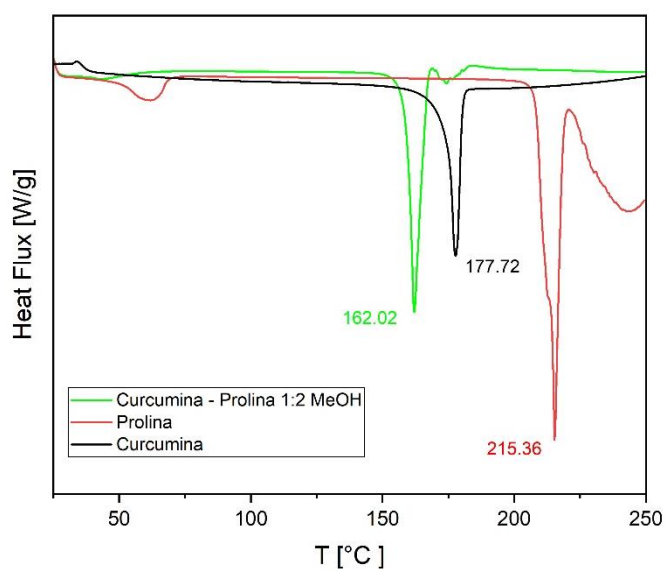
Invece, per il campione Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo (peso di partenza 4.2 mg), si osserva una perdita di peso evidente tra 160°C e 180°C (circa 0.5 mg). Successivamente si ha un piccolo plateau fino a 200°C e poi una ulteriore perdita di peso meno marcata fino ad arrivare a circa 2 mg di campione a 500°C.

Inoltre, da questo confronto è possibile osservare come nel diagramma DSC del campione Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo sia presente un picco esotermico successivamente al secondo picco endotermico.

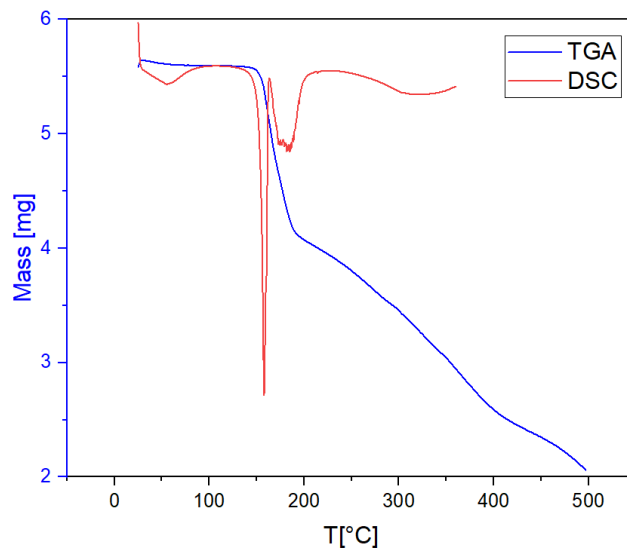




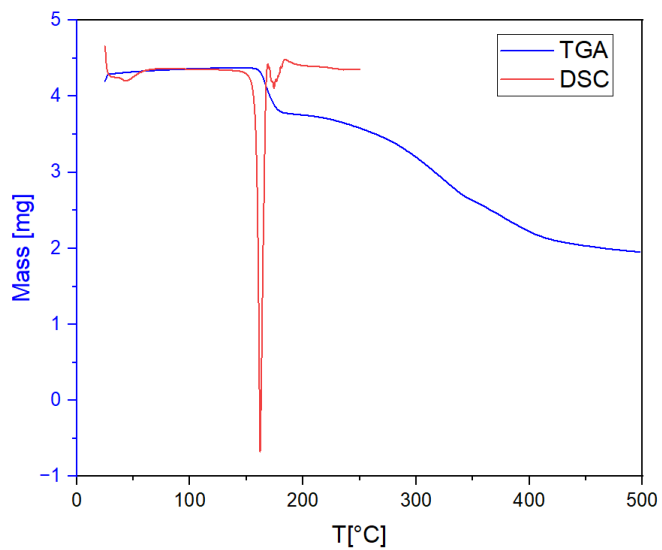
**Figura 4.9** - Diagramma DSC del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina in rosso.



**Figura 4.10** - Diagramma DSC del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo (in verde), della Curcumina (in nero) e della Prolina in rosso.



**Figura 4.11** - Confronto tra analisi DSC e TGA del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile.



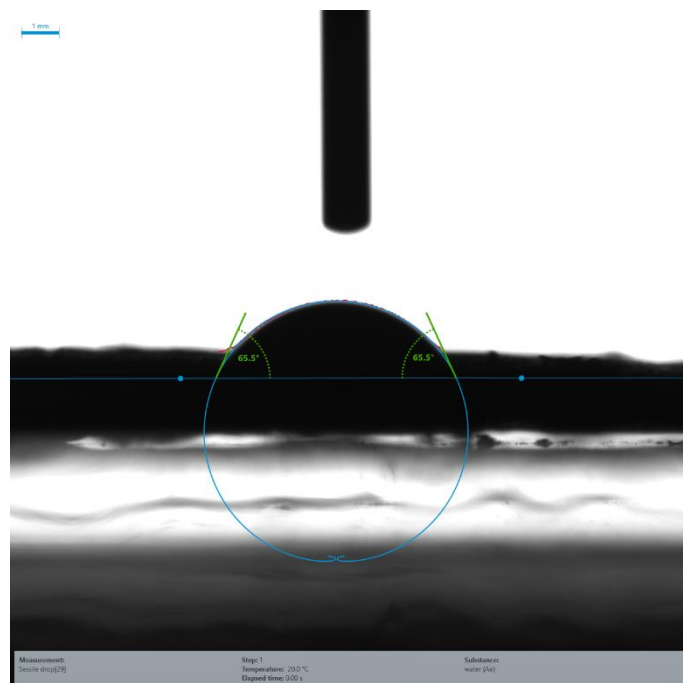
**Figura 4.12** - Confronto tra analisi DSC e TGA del campione di Curcumina – Prolina ottenuto in metanolo.

#### 4.3.4 Angolo di contatto

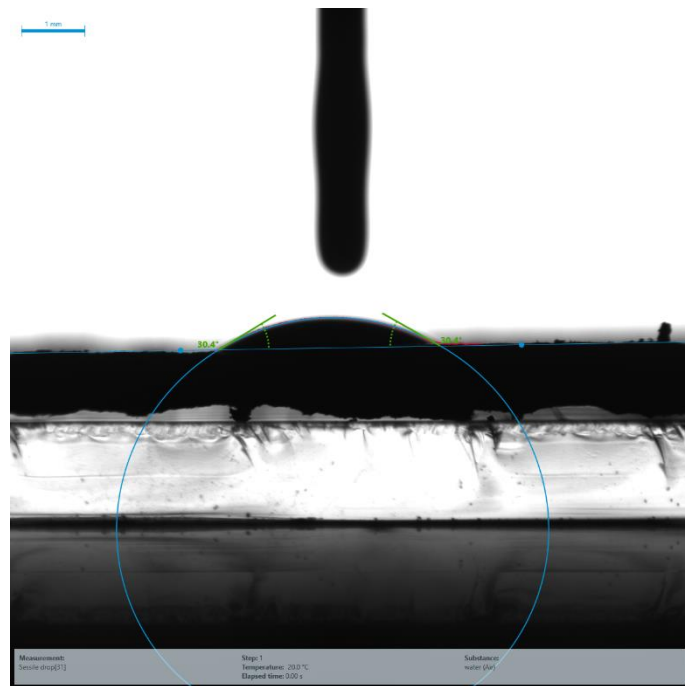
Dopo aver effettuato le misure dell'angolo di contatto del campione di Curcumina - Prolina per una goccia d'acqua e una d'olio di semi di girasole, si è andati a confrontare il valore ottenuto con quello dei componenti puri.

Per quanto riguarda i valori di angolo di contatto formati tra la superficie del disco di campione di Curcumina – Prolina ottenuto in acetonitrile e una goccia d'acqua (**Figura 4.13**) possiamo in generale osservare come il valore ottenuto ( $66^\circ \pm 3.7^\circ$ ) sia minore rispetto al valore di angolo di contatto per la Curcumina ( $90^\circ \pm 5^\circ$ ) e maggiore di quello calcolato sulla Prolina ( $37.55^\circ \pm 10.85^\circ$ ). Questo sta a indicare, che nel caso dell'acqua, si ha una maggiore bagnabilità del campione di Curcumina – Prolina rispetto alla Curcumina pura e quindi una maggiore idrofilicità del sistema.

Per quanto riguarda invece i valori di angolo di contatto formati tra la superficie del disco di campione di Curcumina – Prolina e una goccia d'olio (**Figura 4.14**) possiamo osservare come il valore ottenuto ( $26.6^\circ \pm 3.8^\circ$ ) sia minore rispetto a quelli ottenuti per la Curcumina ( $34.1^\circ \pm 6^\circ$ ) e per la Prolina ( $29.7^\circ \pm 4.6^\circ$ ). Questo sta a indicare, che nel caso dell'olio, si ha una bagnabilità pressoché paragonabile nell'errore di misura del campione di Curcumina – Prolina rispetto ai componenti puri.



**Figura 4.13** - Angolo di contatto formato tra la superficie del disco ottenuto dal campione di Curcumina – Prolina e una goccia d'acqua.



**Figura 4.14** - Angolo di contatto formato tra la superficie del disco ottenuto dal campione di Curcumina – Prolina e una goccia d’olio.

#### 4.4 Diagramma di fase per sistema Curcumina – Prolina

Dopo aver ricavato le solubilità di Curcumina e Prolina in Etanolo sono stati effettuati degli esperimenti per determinare le temperature di saturazione di soluzioni con diversa composizione: in questo caso sono state utilizzate le solubilità dei componenti puri a 15, 20 e 25 °C.

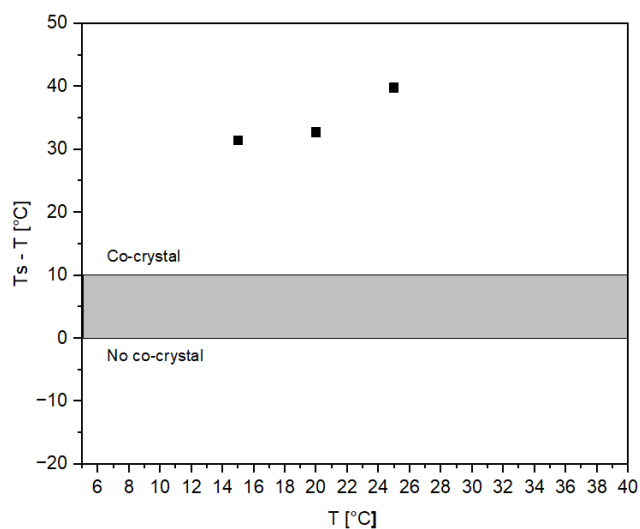
In **Tabella 1** possiamo vedere i risultati di questi esperimenti, che han dato risultati positivi in tutti e tre i casi.

T [°C]	X <sub>CUR</sub> * [mmol/mol]	X <sub>PRO</sub> * [mmol/mol]	T <sub>s</sub> [°C]	T <sub>s</sub> -T [°C]
15	0.376	3.468	46.4	31.4
20	0.477	4.329	52.7	32.7
25	0.6	5.363	64.8	39.8

**Tabella 4** - Temperature di saturazione misurate (T<sub>s</sub>) per il sistema Curcumina – Prolina in differenti temperature di riferimento (T).

Questi risultati sono anche stati riportati in un grafico (**Figura 4.15**) per evidenziare la positività dei risultati: sull'asse delle ordinate troviamo la differenza tra la temperatura di saturazione misurata della soluzione con composizione pari alle solubilità dei componenti puri alla temperatura di riferimento e quella di riferimento, mentre sull'asse delle ascisse troviamo la temperatura di riferimento.

In questo caso per tutti e tre gli esperimenti la differenza tra temperatura di saturazione del sistema Curcumina – Prolina e la temperatura di riferimento è maggiore di 10°C e quindi è probabile la formazione di una fase co-cristallina maggiormente stabile e quindi meno solubile nel solvente selezionato.



**Figura 4.15** - Differenza tra la temperatura di saturazione del sistema Curcumina – Prolina e la temperatura di riferimento in funzione della temperatura di riferimento.

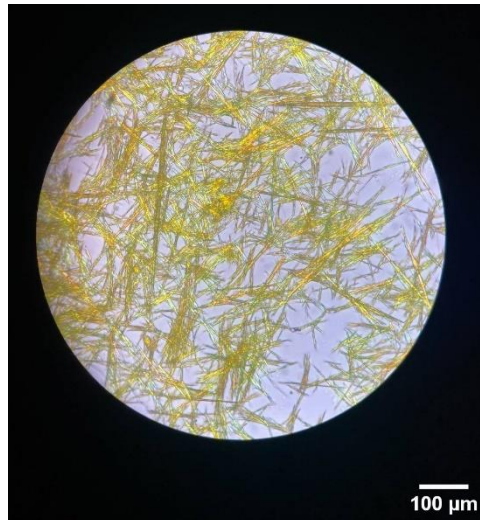
Successivamente il residuo solido all'interno delle vials è stato recuperato tramite filtrazione sottovuoto e poi analizzato tramite diffrazione a raggi X da polveri (PXRD).

In seguito, quindi vengono riportati il diffrattogramma ottenuto per l'esperimento condotto utilizzando i valori di solubilità a 25°C (**Figura 4.16**) e un'immagine al microscopio ottico a luce polarizzata di questo campione (**Figura 4.17**).

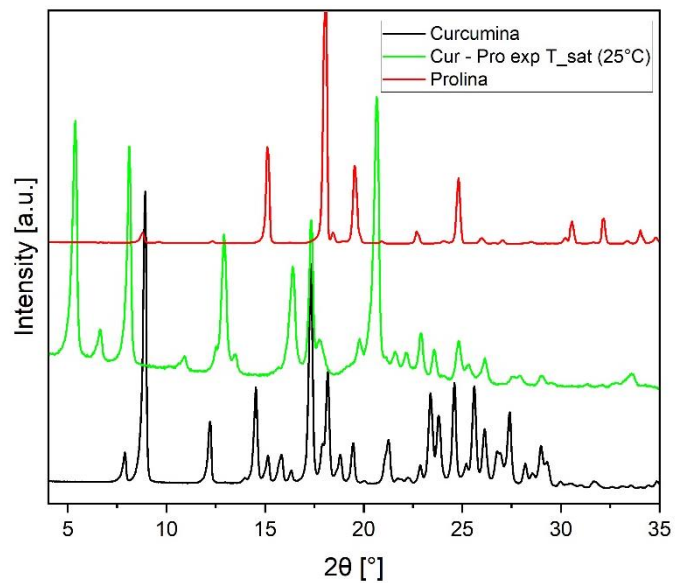
Come possiamo notare i picchi caratteristici del sistema Curcumina – Prolina si trovano a valori di  $2\theta$  differenti rispetto a quelli dei composti puri, rispettivamente a valori di  $2\theta$  pari a 5.38°, 8.12° e 20.66°.

Per quanto riguarda invece i composti puri abbiamo picchi caratteristici per i seguenti valori: per la Curcumina a valori di  $2\theta$  pari a 8.92°, 17.32° e 18.19° mentre per la Prolina a valori di  $2\theta$  pari a 15.12°, 18.06° e 19.55°.

Dall'immagine al microscopio possiamo notare come si siano formati molti micro-cristalli aghiformi dal colore caratteristico giallo/arancione.



**Figura 4.16** - Immagine al microscopio ottico del campione di Curcumina – Prolina in seguito a esperimento per valutarne la temperatura di saturazione in etanolo partendo dai valori di solubilità dei componenti puri a 25°C.



**Figura 4.17** - Diffrattogrammi della Curcumina (in nero), del campione Curcumina – Prolina ottenuto in seguito a esperimento per valutarne la temperatura di saturazione partendo dalle solubilità dei componenti puri (in verde) e della Prolina (in rosso).

Infine, grazie alle informazioni ottenute dagli esperimenti precedenti, è stato costruito un diagramma di fase per stabilire l'esistenza e la dimensione della regione di stabilità e formazione del co-cristallo Curcumina – Prolina.

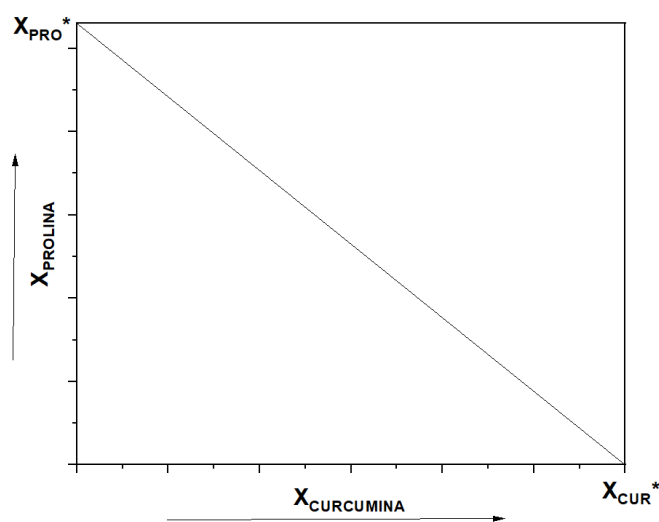
I valori di frazione molare di Curcumina e Prolina utilizzati per ricavare questo diagramma sono stati campionati dal grafico in **Figura 4.18**.

Questo diagramma di fase, che possiamo vedere in **Figura 4.19**, rappresenta la frazione molare di Curcumina (escluso il solvente) in funzione della temperatura di saturazione.

Possiamo osservare come, per valori di frazione molare di Curcumina compresi tra 0.04 e 0.2 la temperatura di saturazione sia maggiore di quella di riferimento.

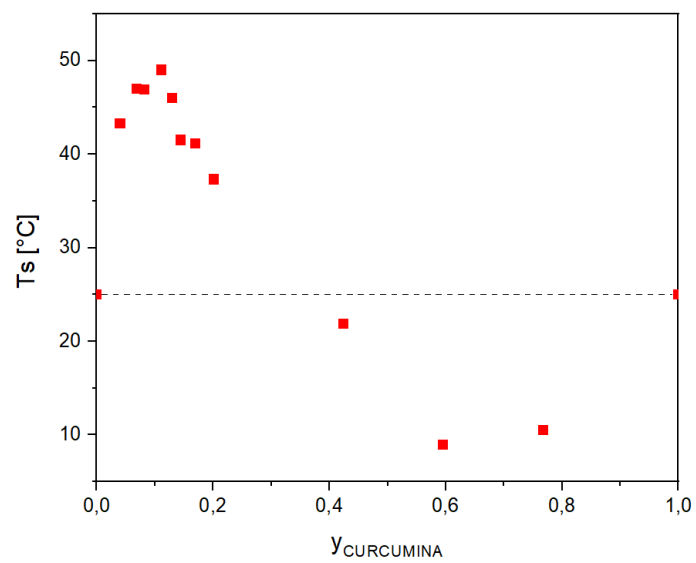
Inoltre, possiamo notare che, per valori di frazione molare di Curcumina prossimi allo zero, non abbiamo la zona in cui la temperatura di saturazione è minore di quella di riferimento o comunque questa zona sarebbe molto ristretta. Questo potrebbe essere conseguenza della superiore solubilità della Prolina rispetto alla Curcumina.

Questa zona del diagramma rappresenta quindi la zona di formazione e stabilità del nostro co-cristallo e questa informazione può essere utile per esperimenti di sintesi del cristallo singolo e per lo scale-up del sistema.



**Figura 4.18** - Diagramma ottenuto dall'equazione 3.3 e da cui sono stati selezionati i punti per costruire il diagramma di fase in **Figura 4.19**.





**Figura 4.19** - Diagramma di fase ottenuto per il sistema Curcumina – Prolina.

#### 4.5 Risultati esperimenti di co-cristallizzazione Naringenina – Teofillina

Gli esperimenti di co-cristallizzazione per il sistema Naringenina – Teofillina sono stati condotti tramite tecnica di co-cristallizzazione per mescolamento in Acetonitrile, Isopropanolo ed Etanolo in tre differenti rapporti stechiometrici: 1:1, 1:2 e 2:1.

I risultati maggiormente positivi sono stati ottenuti per il rapporto stechiometrico 1:1 in Acetonitrile (**Figura 4.20**).

Si riportano quindi in seguito i risultati ottenuti dalle analisi.



**Figura 4.20** - Immagine al microscopio ottico a luce polarizzata del campione di Naringenina – Teofillina 1:1 ottenuto tramite co-cristallizzazione per mescolamento in Acetonitrile.

#### 4.6 Caratterizzazione del co-cristallo Naringenina – Teofillina

Le tecniche di caratterizzazione utilizzate per analizzare il co-cristallo Naringenina – Teofillina sono le seguenti:

- Diffrazione a raggi X su polveri (PXRD);
- Spettroscopia Raman;
- Calorimetria a scansione differenziale (DSC);
- Analisi Termogravimetrica (TGA);

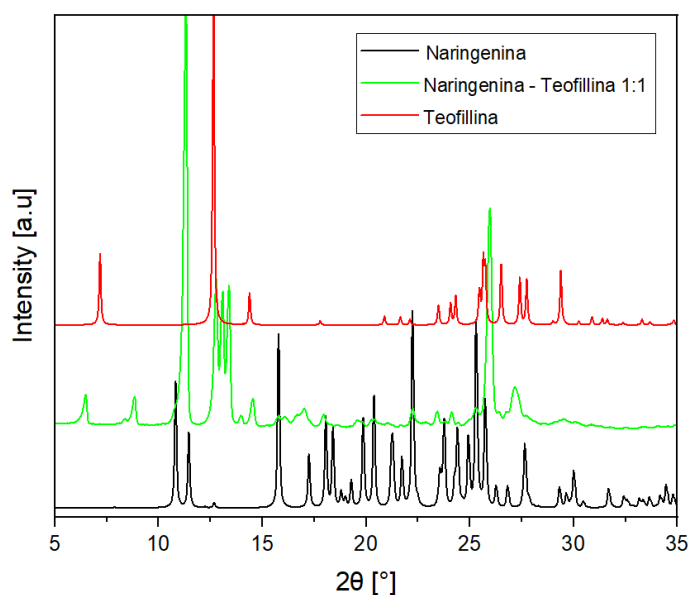
##### 4.6.1 Diffrazione a raggi X su polveri

Il diffrattogramma del campione di Naringenina – Teofillina è stato confrontato con quello dei componenti puri (**Figura 4.21**).

Possiamo notare come nel diffrattogramma del campione di Naringenina – Teofillina ci siano dei picchi nuovi differenti da quelli dei componenti puri. I suoi picchi caratteristici si trovano a valori di  $2\theta$  pari a  $11.3^\circ$ ,  $12.8^\circ$  e  $26^\circ$ .

Per quanto riguarda invece i composti puri abbiamo picchi caratteristici per i seguenti valori: per la Naringenina a valori di  $2\theta$  pari a  $15.8^\circ$ ,  $22.2^\circ$  e  $25.3^\circ$  mentre per la Teofillina a valori di  $2\theta$  pari a  $7.2^\circ$ ,  $12.6^\circ$  e  $25.6^\circ$ .

La presenza di picchi di intensità e posizioni differenti nel campione sintetizzato identifica l'ottenimento di una fase cristallina differente dai materiali di partenza e dunque la possibile formazione di un co-cristallo.



**Figura 4.21** - Diffrattogrammi della Naringenina (in nero), del co-cristallo Naringenina – Teofillina (in verde) e della Teofillina (in rosso).

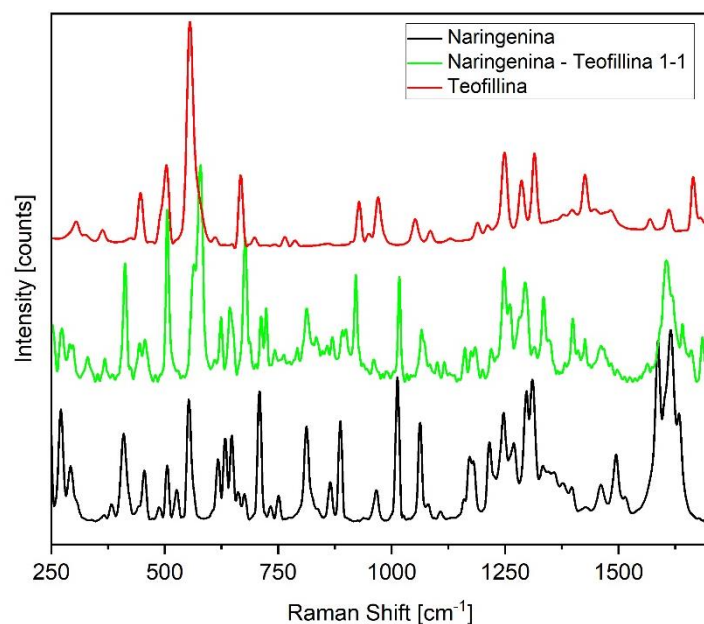
#### 4.6.2 Spettroscopia Raman

Anche in questo caso si è andati a confrontare lo spettro del campione di Naringenina – Teofillina con gli spettri dei componenti puri per confermare la formazione del co-cristallo (**Figura 4.22**).

Possiamo quindi notare come nello spettro del campione di Naringenina – Teofillina siano presenti dei picchi nuovi o spostati rispetto a quelli dei componenti puri.

In particolare, possiamo notare la presenza di un picco caratteristico nella zona compresa tra 1500 e 1700  $cm^{-1}$ .

La presenza di picchi di intensità e posizioni differenti nel campione sintetizzato identifica l'ottenimento di una fase cristallina differente dai materiali di partenza e dunque la possibile formazione di un co-cristallo.



**Figura 4.22** - Spettri Raman del campione di Naringenina – Teofillina (in verde), della Naringenina (in nero) e della Teofillina (in rosso).

#### 4.6.3 Analisi termiche

Infine, sono state effettuate le analisi termiche, ovvero la calorimetria a scansione differenziale (DSC) e l'analisi termogravimetrica (TGA).

In **Figura 4.23** è riportato il confronto della DSC del campione di Naringenina – Teofillina con le DSC dei campioni puri.

I picchi endotermici ci indicano a che temperatura il nostro composto va incontro a fusione o decomposizione.

La Naringenina presenta un picco endotermico a 253.2 °C che corrisponde al suo punto di fusione mentre la Teofillina va incontro a fusione a 270.5°C

Invece il campione di Naringenina-Teofillina presenta un unico picco endotermico a 222.7°C, temperatura diversa rispetto a quella dei componenti puri.

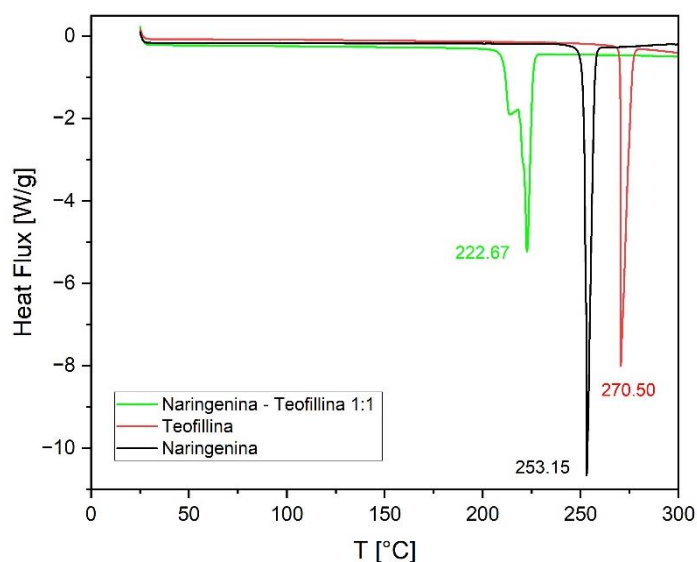
Inoltre, possiamo osservare un piccolo picco esotermico prima del picco endotermico di fusione.

Questo conferma che non abbiamo una miscela dei due componenti ma un'unica fase cristallina.

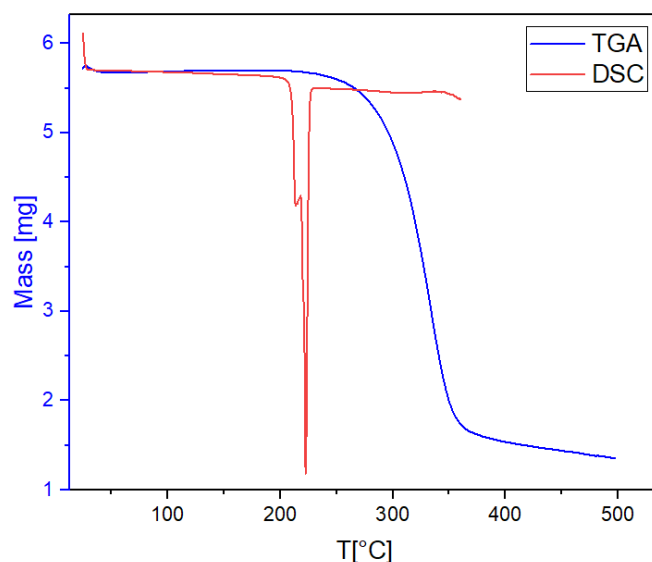
Nel grafico successivo troviamo invece il confronto tra DSC e TGA del campione di Naringenina – Teofillina (**Figura 4.24**).

Grazie all'analisi termogravimetrica possiamo vedere come varia il peso del nostro campione al variare della temperatura.

Dal grafico della TGA possiamo osservare come ci sia una quasi totale perdita di peso tra 235°C e 365°C. Successivamente la perdita di peso è molto meno marcata, fino ad arrivare a 1.4 mg di campione a 500°C (peso di partenza 5.7 mg).



**Figura 4.23** - Diagramma DSC del campione di Naringenina – Teofillina (in verde), della Naringenina (in nero) e della Teofillina in rosso.



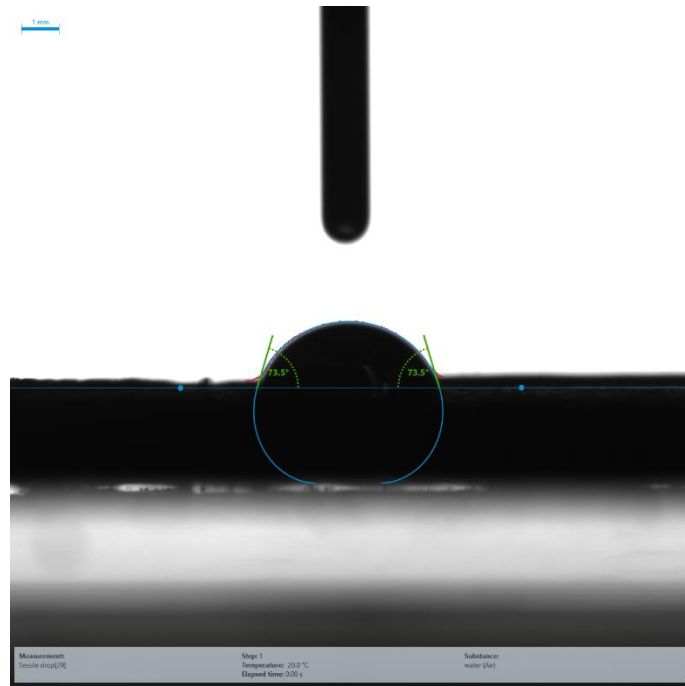
**Figura 4.24** - Confronto tra analisi DSC e TGA del campione di Naringenina – Teofillina.

#### 4.6.4 Angolo di contatto

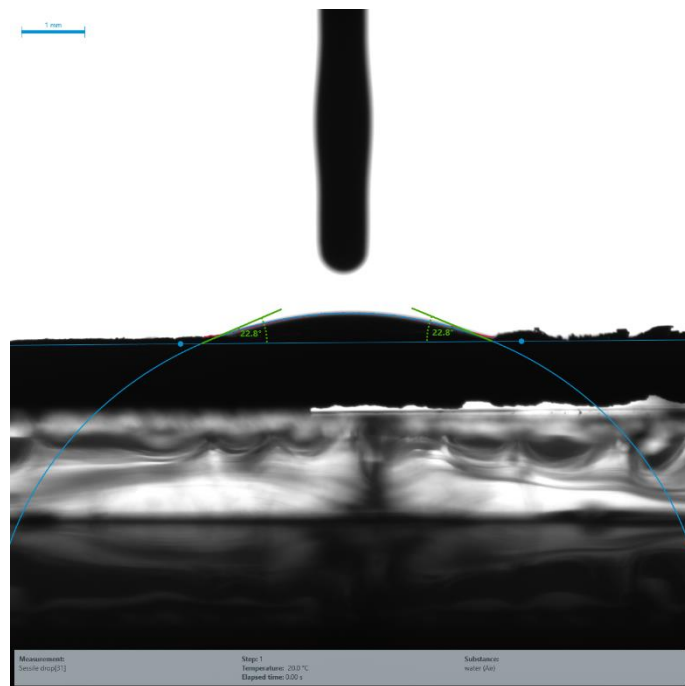
Dopo aver effettuato le misure dell'angolo di contatto del campione di Naringenina – Teofillina per una goccia d'acqua e una d'olio di semi di girasole, si è andati a confrontare il valore ottenuto con quello dei componenti puri.

Per quanto riguarda i valori di angolo di contatto formati tra la superficie del disco di campione di Naringenina – Teofillina e una goccia d'acqua (**Figura 4.25**) possiamo in generale osservare come il valore ottenuto ( $73.1^\circ \pm 2.5^\circ$ ) sia maggiore rispetto ai valori di angolo di contatto per la Naringenina ( $63.15^\circ \pm 12.15^\circ$ ) e per la Teofillina ( $53.2^\circ \pm 4.9^\circ$ ). Questo sta a indicare, che nel caso dell'acqua, si ha una minore bagnabilità del campione di Naringenina – Teofillina rispetto ai componenti puri.

Per quanto riguarda invece i valori di angolo di contatto formati tra la superficie del disco di campione di Naringenina – Teofillina e una goccia d'olio (**Figura 4.26**) possiamo osservare come il valore ottenuto ( $23.7^\circ \pm 3.2^\circ$ ) sia minore rispetto a quelli ottenuti per la Naringenina ( $25.25^\circ \pm 3.35^\circ$ ) e per la Teofillina ( $31.65^\circ \pm 7.05^\circ$ ). Questo sta a indicare, che nel caso dell'olio, si ha una maggiore bagnabilità del campione di Naringenina – Teofillina rispetto ai componenti puri. Dunque il co-cristallo ottenuto risulta essere più idrofobico rispetto ai componenti puri.



**Figura 4.25** - Angolo di contatto formato tra la superficie del disco ottenuto dal campione di Naringenina – Teofillina e una goccia d’acqua.



**Figura 4.26** - Angolo di contatto formato tra la superficie del disco ottenuto dal campione di Naringenina – Teofillina e una goccia d’olio.



## 5. Conclusioni

In questa tesi l'obiettivo è stato quello di ottenere un co-cristallo di applicare l'ingegneria dei cristalli per il design, la sintesi e la caratterizzazione di nuovi co-cristalli di Curcumina e Naringenina.

La scelta dei co-former è stata effettuata attraverso uno screening basato sulla complementarità molecolare e sulla propensione al legame idrogeno tra le molecole target e una libreria di co-former.

Grazie quindi ad esperimenti di co-cristallizzazione per mescolamento di soluzioni soprasature è stato possibile ottenere un co-cristallo.

Questo è stato caratterizzato grazie a diverse analisi quali la diffrazione a raggi X da polveri (PXRD), spettroscopia Raman, analisi termogravimetrica e calorimetria a scansione differenziale.

Inoltre, è stato valutato l'angolo di contatto formato dal campione di Curcumina – Prolina a contatto con acqua e olio di semi di girasole al fine di valutarne la bagnabilità e la natura idrofobica/idrofilica del co-cristallo.

Infine, è stato anche costruito un diagramma di fase del sistema Curcumina – Prolina, utile a comprendere la zona di stabilità e di formazione del co-cristallo.

Questo diagramma inoltre sarà utile per andare a effettuare esperimenti di sintesi di cristalli singoli che potranno essere utilizzati per andare a ricavare la struttura tramite diffrazione a raggi X da cristallo singolo (SXR).

Inoltre, per comprendere meglio le prestazioni del co-cristallo di Curcumina, sarebbe utile condurre degli esperimenti di dissoluzione in acqua per valutarne la solubilità e biodisponibilità.

In contemporanea sono anche stati effettuati dei primi esperimenti con un altro composto di interesse nutraceutico ovvero la Naringenina, che presenta stessi benefici e problemi della Curcumina.

Grazie sempre allo stesso metodo di screening è stato individuato come possibile co-former la Teofillina.

Dopo esperimenti di co-cristallizzazione per mescolamento di soluzioni soprasature è stato individuato un possibile co-cristallo tra Naringenina e Teofillina ed è quindi stato analizzato sempre utilizzando le stesse tecniche di caratterizzazione utilizzate per il co-cristallo di Curcumina – Prolina.

Questi primi risultati sono incoraggianti per ulteriori studi e ricerche future.

## Bibliografia

- [1] Desiraju, G. (2013). Crystal Engineering: From molecule to crystal. *Journal of the American Chemical Society*, 135(27), 9952–9967. <https://doi.org/10.1021/ja403264c>.
- [2] Desiraju, G. R. (2010b). Crystal engineering: A brief overview. *Journal of Chemical Sciences*, 122(5), 667–675. <https://doi.org/10.1007/s12039-010-0055-2>.
- [3] Desiraju, G. R. (2007). Crystal Engineering: A Holistic View. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(44), 8342–8356. <https://doi.org/10.1002/anie.200700534>.
- [4] Dunitz, J. D., & Gavezzotti, A. (2012). Supramolecular synthons: Validation and ranking of intermolecular interaction energies. *Crystal Growth & Design*, 12(12), 5873–5877. <https://doi.org/10.1021/cg301293r>.
- [5] Hutchins, K. M. (2018). Functional materials based on molecules with hydrogen-bonding ability: applications to drug co-crystals and polymer complexes. *Royal Society Open Science*, 5(6), 180564. <https://doi.org/10.1098/rsos.180564>.
- [6] Grothe, E., Meekes, H., Vlieg, E., Ter Horst, J. H., & De Gelder, R. (2016). Solvates, Salts, and Cocrystals: A proposal for a feasible classification system. *Crystal Growth & Design*, 16(6), 3237–3243. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00200>.
- [7] Putra, O. D., & Uekusa, H. (2020). Pharmaceutical multicomponent crystals: structure, design, and properties. In Springer eBooks (pp. 153–184). [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5085-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5085-0_9).
- [8] Lü, J., & Rohani, S. (2009). Polymorphism and crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs). *Current Medicinal Chemistry*, 16(7), 884–905. <https://doi.org/10.2174/092986709787549299>
- [9] Vioglio, P. C., Chierotti, M. R., & Gobetto, R. (2017). Pharmaceutical aspects of salt and cocrystal forms of APIs and characterization challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 117, 86–110. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.07.001>.

- [10] Duggirala, N. K., Perry, M. L., Almarsson, Ö., & Zaworotko, M. J. (2016). Pharmaceutical cocrystals: along the path to improved medicines. *Chemical Communications*, 52(4), 640–655. <https://doi.org/10.1039/c5cc08216a>.
- [11] Chettri, A., Subba, A., Singh, G., & Bag, P. P. (2023). Pharmaceutical co-crystals: A green way to enhance drug stability and solubility for improved therapeutic efficacy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgad097>.
- [12] Karimi-Jafari, M., Padrela, L., Walker, G., & Croker, D. M. (2018). Creating Cocrystals: A review of pharmaceutical cocrystal preparation routes and applications. *Crystal Growth & Design*, 18(10), 6370–6387. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00933>.
- [13] Bandaru, R. K., Rout, S. R., Kenguva, G., Gorain, B., Alhakamy, N. A., Kesharwani, P., & Dandela, R. (2021). Recent advances in pharmaceutical cocrystals: From bench to market. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.780582>.
- [14] Thayyil, A. R., Thimmasetty, J., Nayak, S., & Kamath, S. (2020). Pharmaceutical Co-Crystallization: Regulatory aspects, design, characterization, and applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(2), 203–212. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.024>.
- [15] Pawar, N., Saha, A., Nandan, N., & Parambil, J. V. (2021). Solution cocrystallization: a scalable approach for cocrystal production. *Crystals*, 11(3), 303. <https://doi.org/10.3390/cryst11030303>.
- [16] Rodrigues, M., Baptista, B., Lopes, J., & Sarraguça, M. C. (2018). Pharmaceutical cocrystallization techniques. Advances and challenges. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1–2), 404–420. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.024>.
- [17] Zhang, L., & Mao, S. (2017). Application of quality by design in the current drug development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.07.006>.

- [18] Suresh, K., & Nangia, A. (2018b). Curcumin: pharmaceutical solids as a platform to improve solubility and bioavailability. *CrystEngComm*, 20(24), 3277–3296. <https://doi.org/10.1039/c8ce00469b>
- [19] Sanphui, P., & Bolla, G. (2018). Curcumin, a biological wonder molecule: A crystal engineering point of view. *Crystal Growth & Design*, 18(9), 5690–5711. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00646>
- [20] Sanphui, P., Goud, N. R., Khandavilli, U. B. R., Bhanoth, S., & Nangia, A. (2011). New polymorphs of curcumin. *Chemical Communications*, 47(17), 5013. <https://doi.org/10.1039/c1cc10204d>
- [21] Lee, W., Loo, C., Bebawy, M., Luk, F., Mason, R., & Rohanizadeh, R. (2013). Curcumin and its Derivatives: Their Application in Neuropharmacology and Neuroscience in the 21st Century. *Current Neuropharmacology*, 11(4), 338–378. <https://doi.org/10.2174/1570159x11311040002>
- [22] Górnicka, J., Mika, M., Wróblewska, O., Siudem, P., & Paradowska, K. (2023). Methods to Improve the Solubility of Curcumin from Turmeric. *Life*, 13(1), 207. <https://doi.org/10.3390/life13010207>
- [23] Salehi, B., Fokou, P. V. T., Sharifi-Rad, M., Zucca, P., Pezzani, R., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). The therapeutic potential of Naringenin: A review of clinical trials. *Pharmaceuticals*, 12(1), 11. <https://doi.org/10.3390/ph12010011>
- [24] Luo, C., Wen-Dong, L., Chen, X., Wang, J., Deng, Z., & Zhang, H. (2018). Pharmaceutical cocrystals of naringenin with improved dissolution performance. *CrystEngComm*, 20(22), 3025–3033. <https://doi.org/10.1039/c8ce00341f>
- [25] Khandavilli, U. B. R., Skořepová, E., Sinha, A. S., Bhogala, B. R., Maguire, N. M., Maguire, A. R., & Lawrence, S. E. (2018). Cocrystals and a salt of the bioactive flavonoid: naringenin. *Crystal Growth & Design*, 18(8), 4571–4577. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00557>
- [26] Khan, A. W., Kotta, S., Ansari, S. H., Sharma, R. K., & Ali, J. (2014). Enhanced dissolution and bioavailability of grapefruit flavonoid Naringenin by solid dispersion utilizing fourth generation

carrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(5), 772–779.  
<https://doi.org/10.3109/03639045.2014.902466>

- [27] Cui, W., He, Z., Zhang, Y., & Fan, Q. (2019). Naringenin Cocrystals prepared by Solution Crystallization Method for improving bioavailability and anti-hyperlipidemia effects. *AAPS PharmSciTech*, 20(3). <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1324-0>
- [28] Wood, P. A., Feeder, N., Furlow, M., Galek, P. T. A., Groom, C. R., & Pidcock, E. (2014). Knowledge-based approaches to co-crystal design. *CrystEngComm*, 16(26), 5839. <https://doi.org/10.1039/c4ce00316k>
- [29] Sarkar, N., Gonnella, N. C., Krawiec, M., Xin, D., & Aakeröy, C. B. (2020). Evaluating the predictive abilities of protocols based on Hydrogen-Bond propensity, molecular complementarity, and Hydrogen-Bond energy for cocrystal screening. *Crystal Growth & Design*, 20(11), 7320–7327. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c00987>
- [30] Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodríguez-Monge, L., Taylor, R., Van De Streek, J., & Wood, P. A. (2008). Mercury CSD 2.0– new features for the visualization and investigation of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*, 41(2), 466–470. <https://doi.org/10.1107/s0021889807067908>
- [31] Vettore, L., Westbrook, R. L., & Tennant, D. A. (2021b). Proline metabolism and redox; maintaining a balance in health and disease. *Amino Acids*, 53(12), 1779–1788. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03051-2>
- [32] Wu, G., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Kim, S. W., Knabe, D. A., Li, P., Li, X., McKnight, J. R., Satterfield, M. C., & Spencer, T. E. (2010). Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*, 40(4), 1053–1063. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0715-z>
- [33] Qiu, J., Huang, H., He, H., Liu, H., Hu, S., Han, J., Yi, D., An, M., & Wang, P. (2019). Solubility behavior and data modeling of L-Proline in different neat and binary solvent systems. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 64(12), 5920–5928. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.9b00802>

- [34] Nugrahani, I., & Jessica, M. A. (2021). Amino acids as the Potential Co-Former for Co-Crystal Development: A review. *Molecules*, 26(11), 3279. <https://doi.org/10.3390/molecules26113279>
- [35] Montaña, L. M., Sommer, B., Gómez-Verján, J. C., Morales-Paoli, G. S., Ramírez-Salinas, G. L., Solís-Chagoyán, H., Sanchez-Florentino, Z. A., Calixto, E., Pérez-Figueroa, G. E., Carter, R., Jaimez-Melgoza, R., Romero-Martínez, B. S., & Flores-Soto, E. (2022). Theophylline: Old Drug in a New Light, Application in COVID-19 through Computational Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4167. <https://doi.org/10.3390/ijms23084167>
- [36] Darwish, S., Żegliński, J., Krishna, G. R., Shaikh, R., Khraisheh, M., Walker, G., & Croker, D. M. (2018). A new 1:1 Drug-Drug Cocrystal of theophylline and Aspirin: Discovery, Characterization, and construction of ternary phase diagrams. *Crystal Growth & Design*, 18(12), 7526–7532. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b01330>
- [37] Wang, L., Li, S., Xu, X., Xu, X., Wang, Q., Li, D., & Zhang, H. (2022). Drug-drug cocrystals of theophylline with quercetin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 70, 103228. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103228>
- [38] Чернышев, В. В. (2023). Structural Characterization of Pharmaceutical Cocrystals with the Use of Laboratory X-ray Powder Diffraction Patterns. *Crystals*, 13(4), 640. <https://doi.org/10.3390/cryst13040640>
- [39] Waseda, Y., Matsubara, E., & Shinoda, K. (2011). X-Ray diffraction crystallography. In Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16635-8>
- [40] Stanjek, H., & Häusler, W. (2004). Basics of X-ray diffraction. *Hyperfine Interactions*, 154(1–4), 107–119. <https://doi.org/10.1023/b:hype.0000032028.60546.38>
- [41] Bumrah, G. S., & Sharma, R. M. (2016). Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(3), 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.06.001>

- [42] Orlando, A., Franceschini, F., Muscas, C., Pidkova, S., Bartoli, M., Rovere, M., & Tagliaferro, A. (2021). A comprehensive review on Raman Spectroscopy applications. *Chemosensors*, 9(9), 262. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9090262>
- [43] Cialla-May, D., Schmitt, M., & Popp, J. (2019). Theoretical principles of Raman spectroscopy. *Physical Sciences Reviews*, 4(6). <https://doi.org/10.1515/psr-2017-0040>
- [44] Qiao, Y., Qiao, R., He, Y., Shi, C., Liu, Y., Hao, H., Su, J., & Zhong, J. (2017). Instrumental analytical techniques for the characterization of crystals in pharmaceuticals and foods. *Crystal Growth & Design*, 17(11), 6138–6148. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b00759>
- [45] Gabbott, P. (2008). Principles and applications of thermal analysis. In Wiley eBooks. <https://doi.org/10.1002/9780470697702>
- [46] Saadatkhan, N., García, A. C., Ackermann, S. L. G., Leclerc, P., Latifi, M., Samih, S., Patience, G. S., & Chaouki, J. (2019b). Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(1), 34–43. <https://doi.org/10.1002/cjce.23673>
- [47] Koshy, O., Subramanian, L., & Thomas, S. (2017). Differential scanning calorimetry in nanoscience and nanotechnology. In Elsevier eBooks (pp. 109–122). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-46139-9.00005-0>
- [48] Gill, P., Moghadam, T. T., & Ranjbar, B. (2010). Differential scanning calorimetry techniques: applications in biology and nanoscience. PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21119929>
- [49] Saganowska, P., & Wesołowski, M. (2017). DSC as a screening tool for rapid co-crystal detection in binary mixtures of benzodiazepines with co-formers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 133(1), 785–795. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6858-3>
- [50] Chiarella, R. A., Davey, R. J., & Peterson, M. L. (2007). Making Co-Crystals The utility of Ternary Phase Diagrams. *Crystal Growth & Design*, 7(7), 1223–1226. <https://doi.org/10.1021/cg070218y>

- [51] Chiarella, R. A., Davey, R. J., & Peterson, M. L. (2007). Making Co-Crystals The utility of Ternary Phase Diagrams. *Crystal Growth & Design*, 7(7), 1223–1226. <https://doi.org/10.1021/cg070218y>
- [52] Ter Horst, J. H., Deij, M., & Cains, P. W. (2009b). Discovering new Co-Crystals. *Crystal Growth & Design*, 9(3), 1531–1537. <https://doi.org/10.1021/cg801200h>



## Appendici

<b>Co-former</b>	<b>Risultato</b>
(+)-camphoric_acid	FAIL
(-)-camphorsulfonic_acid	FAIL
1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic_acid	FAIL
2-amino-5-methylbenzoic_acid	PASS
3-methylpyridine	PASS
4-acetamidobenzoic_acid	PASS
4-aminobenzoic_acid	FAIL
4-hydroxybenzoic_acid	FAIL
D-alanine	FAIL
D-glucuronic_acid	FAIL
D-pantothenol	PASS
EDTA	PASS
L-arginine	PASS
L-aspartic_acid	FAIL
L-aspartic_acid_z	FAIL
L-glutamic_acid	PASS
L-glutamic_acid_z	FAIL
L-glutamine	FAIL
L-glutathione	FAIL
L-lactic_acid	FAIL
L-leucine	FAIL
L-mandelic_acid	PASS
L-methionine	PASS
L-phenylalanine	PASS
L-proline	PASS
L-serine	FAIL
L-tartaric_acid	FAIL
L-tryptophan	PASS
L-tyrosine	PASS
N-ethylacetamide	PASS
acesulfame	FAIL
acetic_acid	FAIL
acetophenone_oxime	PASS
acetylenedicarboxylic_acid	FAIL
adipic_acid	PASS
alitame	PASS
apigenin	FAIL
azelaic_acid	PASS
benzoic_acid	FAIL
biotin	PASS
caprolactam	FAIL
capsaicin	PASS
cholic_acid	PASS
citric_acid	FAIL

<b>ethylparaben</b>	PASS
<b>folic_acid</b>	PASS
<b>fumaric_acid</b>	FAIL
<b>gentisic_acid</b>	FAIL
<b>glutaric_acid</b>	PASS
<b>glycine</b>	FAIL
<b>glycolic_acid</b>	FAIL
<b>hesperetin</b>	PASS
<b>hippuric_acid</b>	PASS
<b>hydrocinnamic_acid</b>	FAIL
<b>imidazole</b>	FAIL
<b>isonicotinamide</b>	FAIL
<b>ketoglutaric_acid</b>	PASS
<b>lactobionic_acid</b>	FAIL
<b>lactose</b>	PASS
<b>maleic_acid</b>	FAIL
<b>malic_acid</b>	FAIL
<b>malonic_acid</b>	FAIL
<b>maltitol</b>	FAIL
<b>mannitol</b>	FAIL
<b>methanesulfonic_acid</b>	FAIL
<b>methylparaben</b>	PASS
<b>monobutyryn</b>	PASS
<b>nicotinamide</b>	FAIL
<b>oxalic_acid</b>	FAIL
<b>pamoic_acid</b>	PASS
<b>phthalamide</b>	FAIL
<b>pimelic_acid</b>	PASS
<b>piperazine</b>	FAIL
<b>propylparaben</b>	PASS
<b>pyrazine</b>	FAIL
<b>riboflavin</b>	FAIL
<b>saccharin</b>	FAIL
<b>sorbic_acid</b>	PASS
<b>suberic_acid</b>	PASS
<b>succinic_acid</b>	PASS
<b>t-butylamine</b>	FAIL
<b>t-butylhydroxyanisole</b>	PASS
<b>theophylline</b>	FAIL
<b>thymidine</b>	FAIL
<b>triphenylacetic_acid</b>	FAIL
<b>urea</b>	FAIL
<b>valerolactam</b>	FAIL
<b>xanthine</b>	FAIL

**Tabella 1 Appendice** – Elenco di co-former e risultati dell'analisi di complementarità molecolare per la Curcumina.

<b>Co-former</b>	<b>Risultato</b>
(+)-camphoric_acid	PASS
(-)-camphorsulfonic_acid	PASS
1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic_acid	FAIL
2-amino-5-methylbenzoic_acid	PASS
3-methylpyridine	PASS
4-acetamidobenzoic_acid	PASS
4-aminobenzoic_acid	FAIL
4-hydroxybenzoic_acid	FAIL
ACEMID03	PASS
CINMAC07	FAIL
D-alanine	FAIL
D-glucuronic_acid	PASS
D-pantothenol	PASS
EDTA	PASS
GASVOL01	PASS
HYQUIN12	FAIL
L-arginine	PASS
L-aspartic_acid	FAIL
L-aspartic_acid_z	FAIL
L-glutamic_acid	PASS
L-glutamic_acid_z	FAIL
L-glutamine	PASS
L-glutathione	PASS
L-lactic_acid	FAIL
L-leucine	PASS
L-mandelic_acid	PASS
L-methionine	PASS
L-phenylalanine	PASS
L-proline	PASS
L-serine	FAIL
L-tartaric_acid	FAIL
L-tryptophan	PASS
L-tyrosine	PASS
N-ethylacetamide	PASS
YUHTEA03	FAIL
acesulfame	FAIL
acetic_acid	PASS
acetophenone_oxime	PASS
acetylenedicarboxylic_acid	PASS
adipic_acid	PASS
alitame	PASS
apigenin	FAIL
azelaic_acid	PASS
benzoic_acid	FAIL
biotin	PASS
caprolactam	PASS

capsaicin	PASS
cholic_acid	PASS
citric_acid	PASS
ethylparaben	PASS
folic_acid	PASS
fumaric_acid	FAIL
gentisic_acid	FAIL
glutaric_acid	PASS
glycine	FAIL
glycolic_acid	FAIL
hesperetin	PASS
hippuric_acid	PASS
hydrocinnamic_acid	PASS
imidazole	FAIL
isonicotinamide	FAIL
ketoglutaric_acid	PASS
lactobionic_acid	FAIL
lactose	PASS
maleic_acid	FAIL
malic_acid	FAIL
malonic_acid	FAIL
maltitol	PASS
mannitol	PASS
methanesulfonic_acid	FAIL
methylparaben	PASS
monobutyryn	PASS
nicotinamide	FAIL
oxalic_acid	FAIL
pamoic_acid	PASS
phthalamide	PASS
pimelic_acid	PASS
piperazine	PASS
propylparaben	PASS
pyrazine	FAIL
riboflavin	PASS
saccharin	PASS
sorbic_acid	PASS
suberic_acid	PASS
succinic_acid	PASS
t-butylamine	FAIL
t-butylhydroxyanisole	PASS
theophylline	PASS
thymidine	PASS
triphenylacetic_acid	FAIL
urea	FAIL
valerolactam	PASS
xanthine	FAIL

**Tabella 1 Appendice** - Elenco di co-former e risultati dell'analisi di complementarità molecolare per la Naringenina.

