

# La Cristallizzazione di Principi Attivi: strategie, sviluppi e controlli

Dipartimento di Chimica

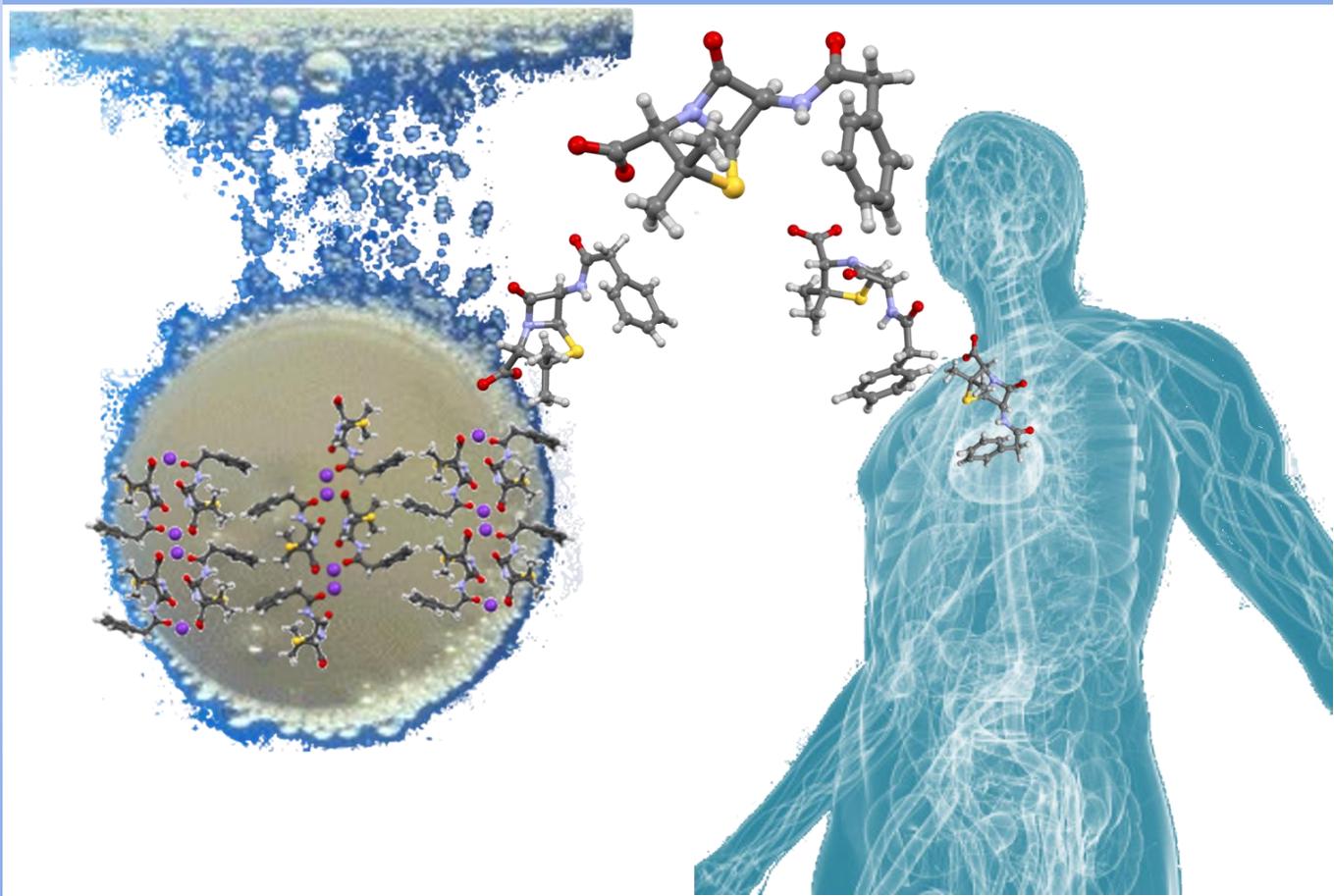


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Alessia Bacchi



Laboratorio di  
Strutturistica  
"Mario Nardelli"



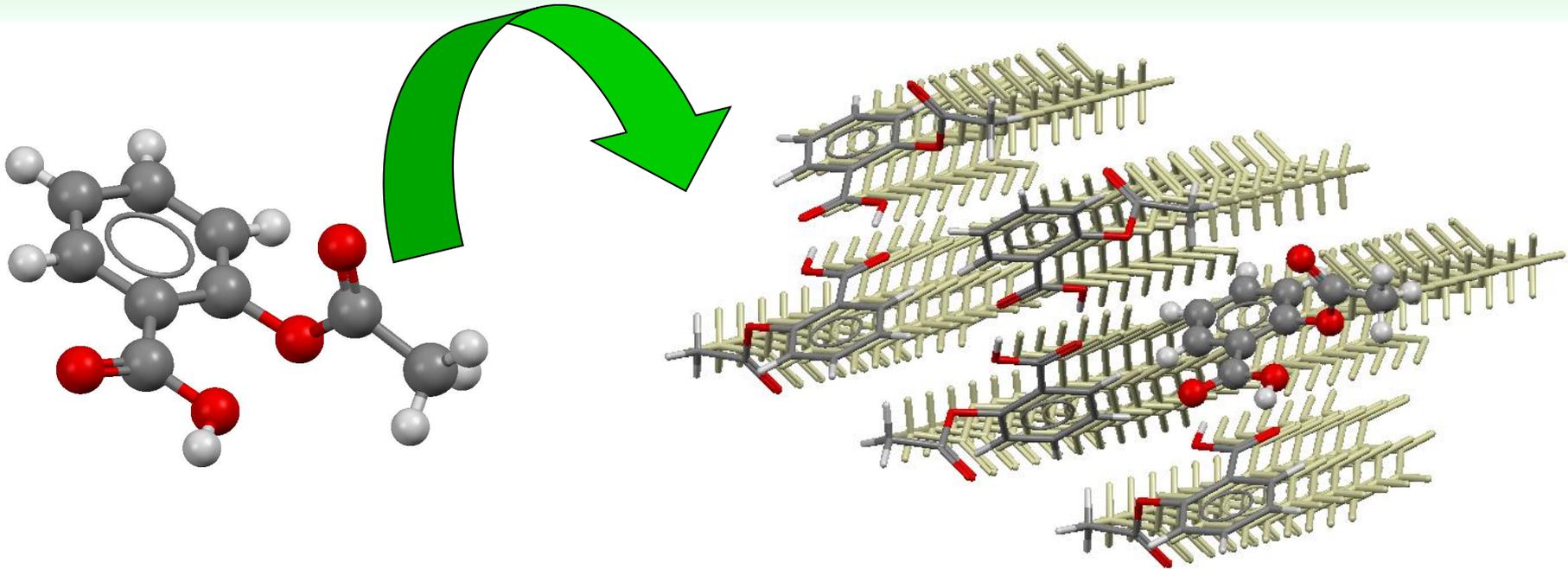
# Obiettivo

illustrare i principi chimico-fisici che governano  
la cristallizzazione,  
la definizione della morfologia,  
e le tecniche per caratterizzare le forme cristalline

# Outline

- aggregazione molecolare
- forme cristalline: polimorfismo, solvati, cocristalli
- cristallizzazione
- morfologia
- tecniche di caratterizzazione strutturale
- utilizzo della Banca Dati Cristallografica di Cambridge

# 1. aggregazione molecolare



Per comprendere l'organizzazione dello stato cristallino occorre considerare due aspetti:

- PERCHE': qual è la natura e la grandezza delle forze di interazione tra le molecole
- COME: qual è la disposizione spaziale delle molecole che si trovano a stretto contatto nel cristallo

## 1. **close packing: attrazione fatale**

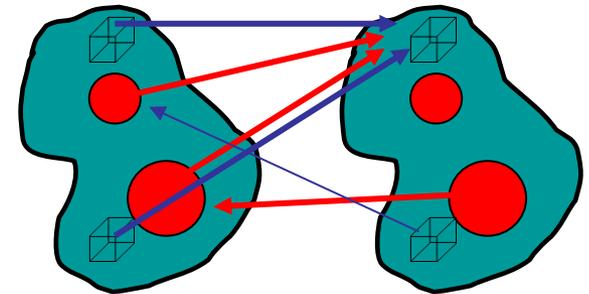
Principio dell'impacchettamento compatto (A. Kitaigorodski): le molecole tendono a disporsi nel modo più compatto possibile nei cristalli molecolari, per massimizzare i contatti intermolecolari.



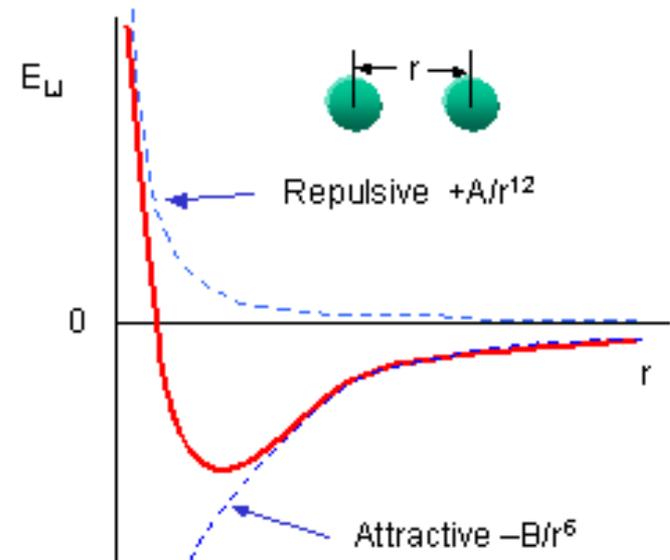
## 1. interazioni ed energia

L'assemblaggio delle molecole nella struttura cristallina è governato dall'ottimizzazione del bilancio tra interazioni attrattive e repulsive.

Le forze attrattive responsabili della coesione di un cristallo sono conseguenza del potenziale elettrostatico molecolare.

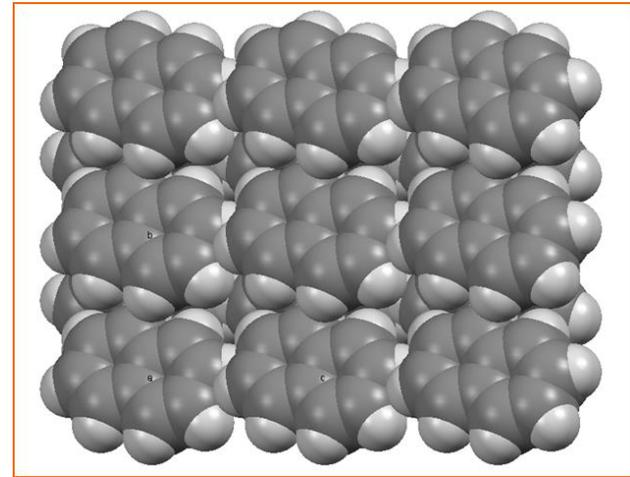
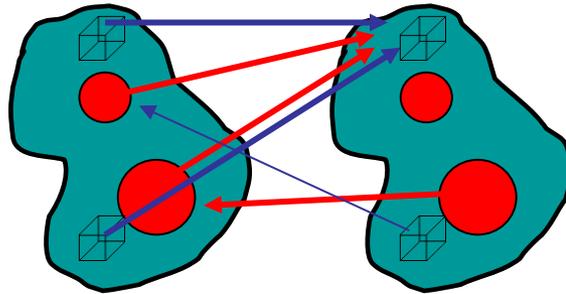


Il principio di Pauli invece governa la repulsione a corto raggio tra molecole a guscio chiuso.



## 1. calcolo dell'energia di coesione delle molecole nel cristallo

A rigori le forze elettrostatiche dipendono solo dalla esatta distribuzione istantanea delle cariche (nuclei ed elettroni), e sono di natura coulombiana, di attrazione fra elettroni e nuclei, e di repulsione tra nuclei e nuclei e tra elettroni ed elettroni.



Tuttavia non è possibile conoscere l'esatta distribuzione istantanea della densità di cariche nel cristallo, poiché bisognerebbe risolvere l'equazione di Schroedinger per tutto il cristallo.

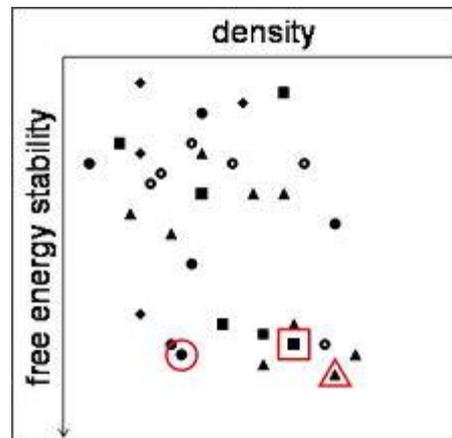
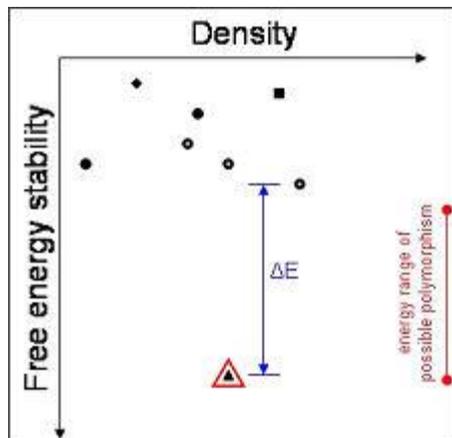
**Si utilizzano metodi empirici**

# 1. è possibile prevedere a priori una struttura cristallina?

I metodi computazionali di previsione della possibile struttura cristallina di un nuovo composto si basano su:

1. generazione di un grande numero di possibili strutture applicando varie combinazioni degli elementi di simmetria
2. calcolo dell'energia di tutte le strutture così generate
3. scelta della struttura più stabile

Tuttavia le differenze di energia tra strutture a diversa simmetria sono solitamente molto piccole (4-8 kJ/mol) rispetto al grado di approssimazione con cui si può calcolare l'energia reticolare.



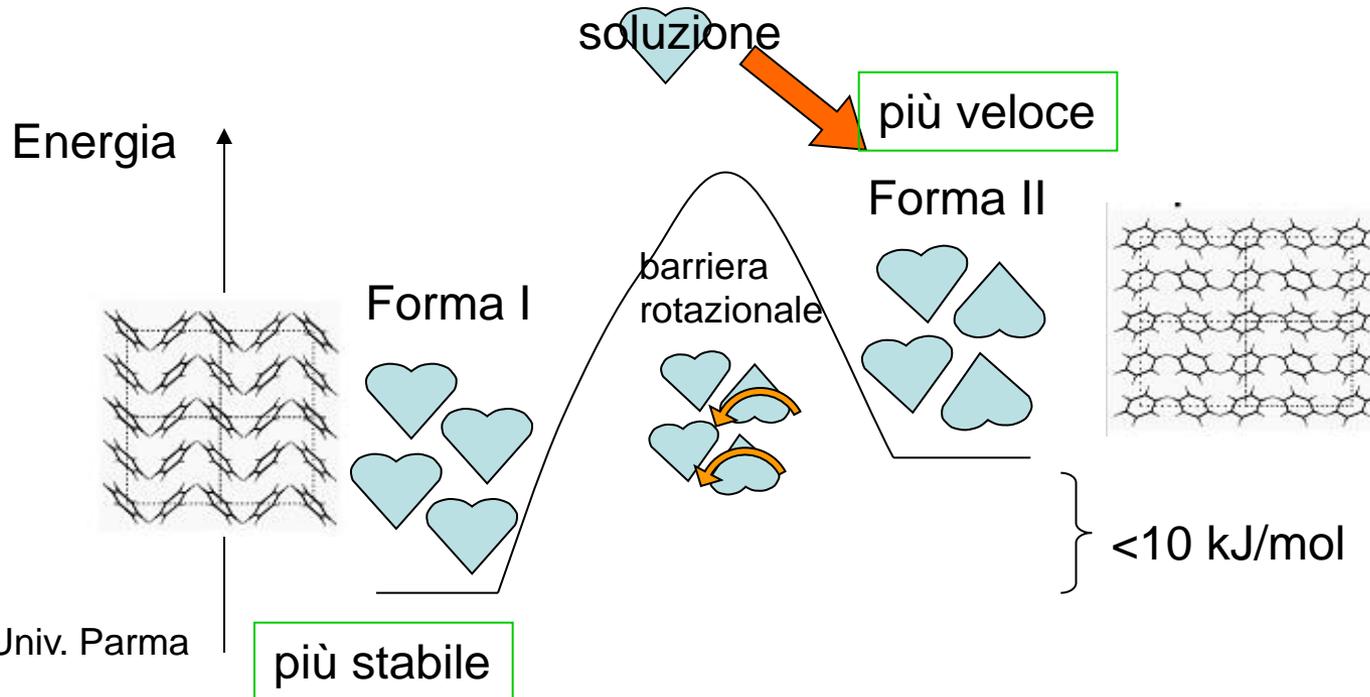
**a)** The observed crystal structure (red triangle) is distinctly more stable than the other hypothetical structures ( $< 10$  kJ mol<sup>-1</sup>). **b)** Energy landscape typical of the results obtained from most crystal structure prediction studies. The different shapes represent crystal structures with distinct hydrogen bonding motifs. Red highlighting = experimentally observed crystal structures.

**Non è quindi attualmente possibile prevedere con certezza la struttura cristallina di un nuovo composto e stabilire se questo avrà polimorfi.**

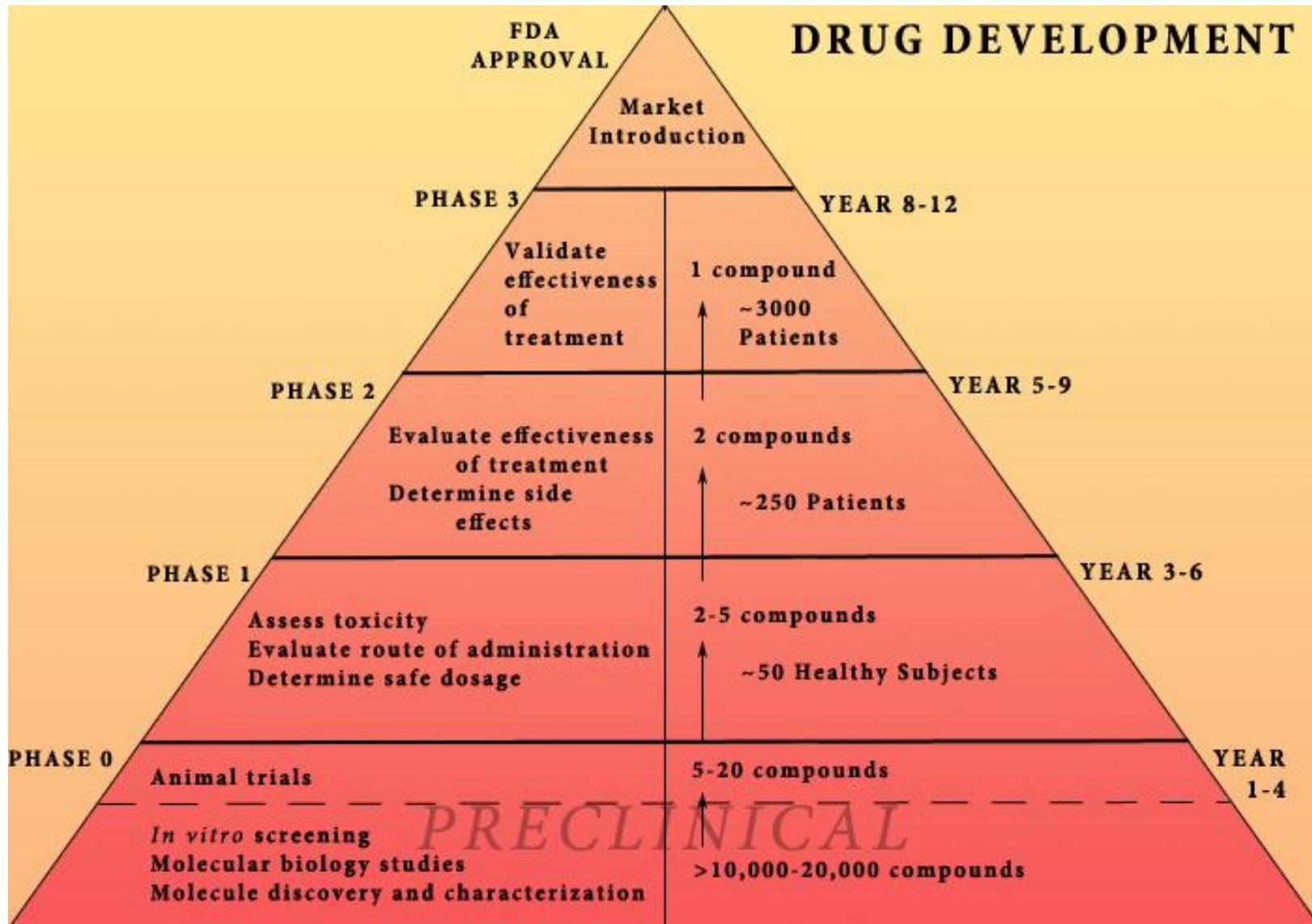
## 2. forme cristalline: polimorfismo, solvati, cocristalli

*Polymorphism is the existence of a substance in more than one crystalline form.*

- I calcoli di energia reticolare mostrano che esistono modo alternativi di assemblare una stessa molecola, con energie comparabili. Una stessa sostanza può quindi avere strutture con stabilità poco diversa.
- Il processo di cristallizzazione è inoltre sottoposto a controllo cinetico, e il prodotto della cristallizzazione deriva dal nucleo con maggior propensione a nucleare e a crescere velocemente. La conversione della specie cineticamente favorita nella specie termodinamicamente più stabile può essere impedita da una barriera energetica relativa al riarrangiamento delle molecole allo stato solido.
- La propensione alla formazione di una forma può dipendere da fattori quali: T, solvente, impurezze



## 2. l'importanza della forma e della sostanza



## 2. i polimorfi hanno differenti proprietà

Solubilità

Biodisponibilità

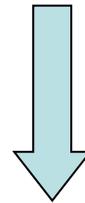
Igroscopicità

conducibilità termica ed elettrica

stabilità chimica

durezza

tempo di vita



Conseguenze su

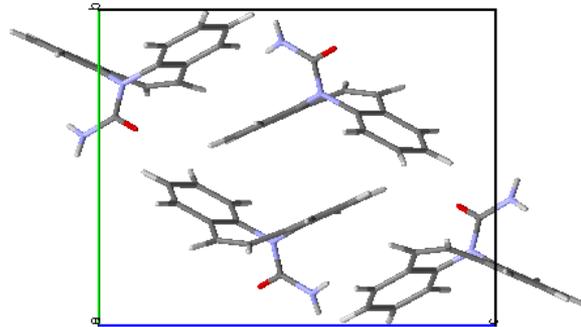
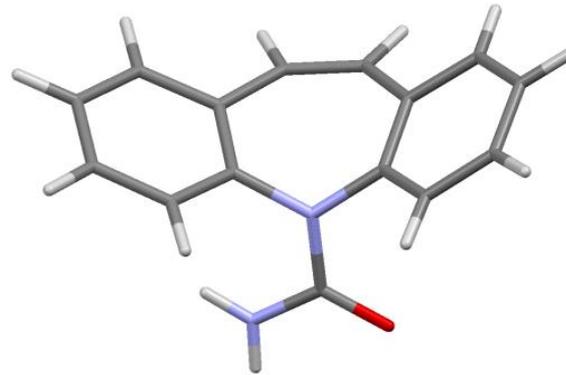
utilizzo, manipolazione ed assorbimento,  
aspetti brevettuali / normativi / registrazione

## 2. esempi

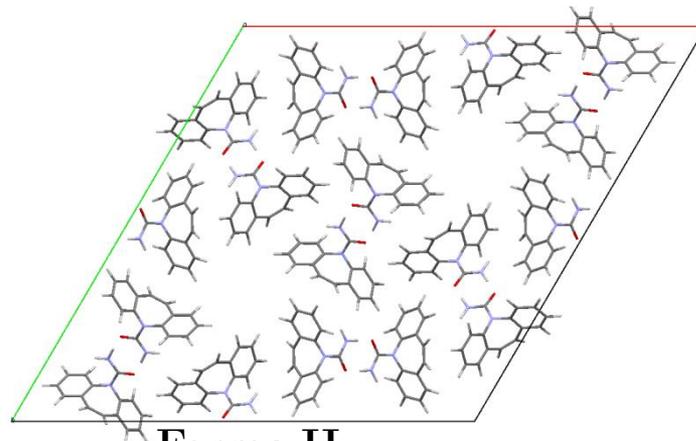
*A polymorph is a solid crystalline phase of a given compound resulting from the possibility of at least two crystalline arrangements of the molecules of that compound in the solid state.*

W.C. McCrone, in *Physics and Chemistry of the Organic Solid State*, Vol. 2, Wiley Interscience(1965), p. 725.

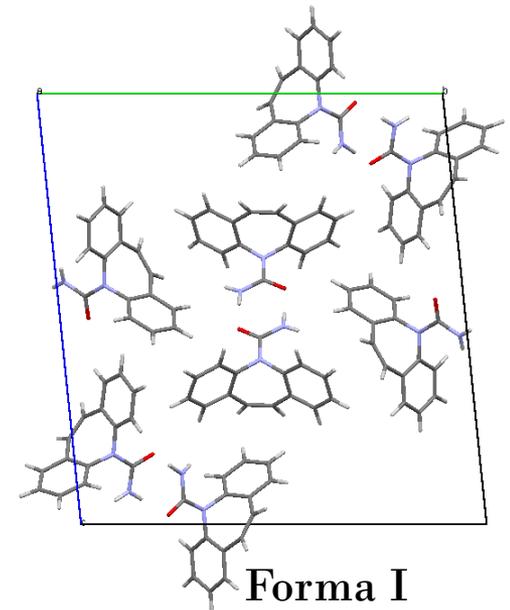
carbamazepine  
analgesic and anticonvulsant drug



Forma III



Forma II

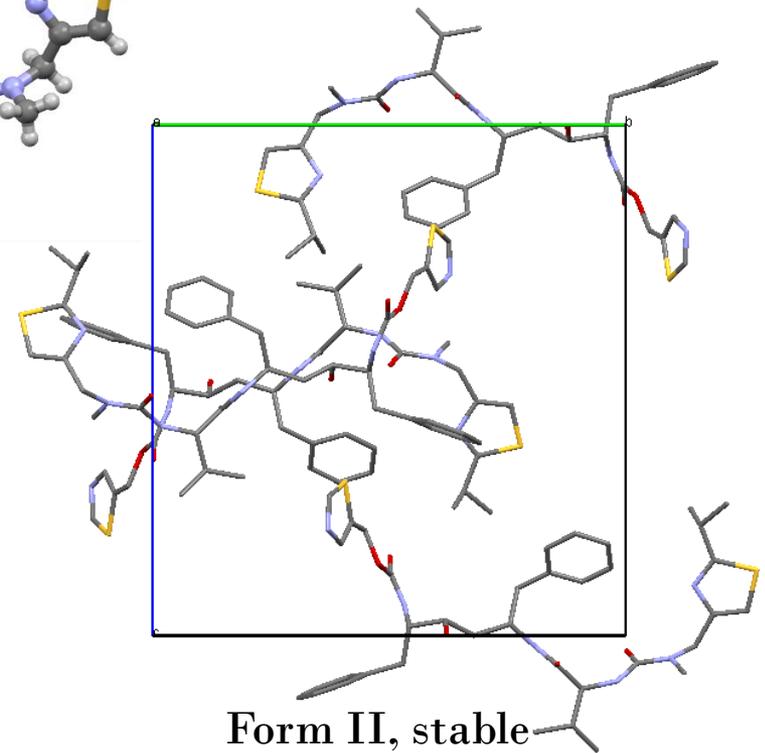
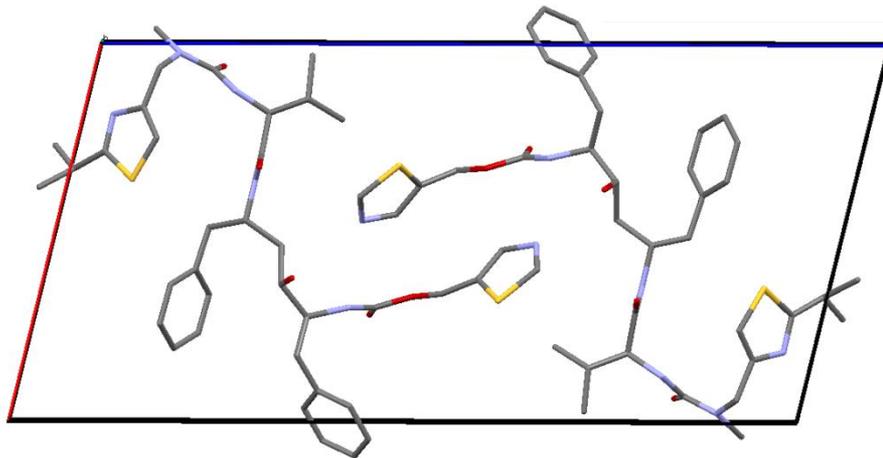
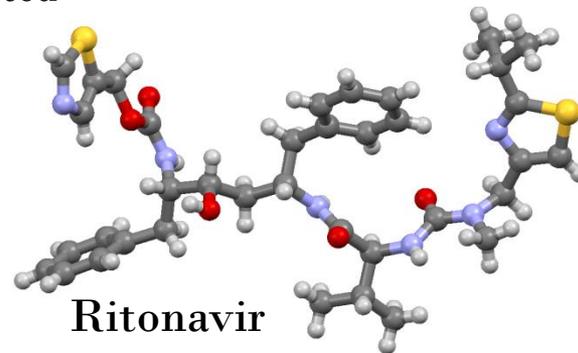


Forma I



## 2. polimorfismo e solubilità

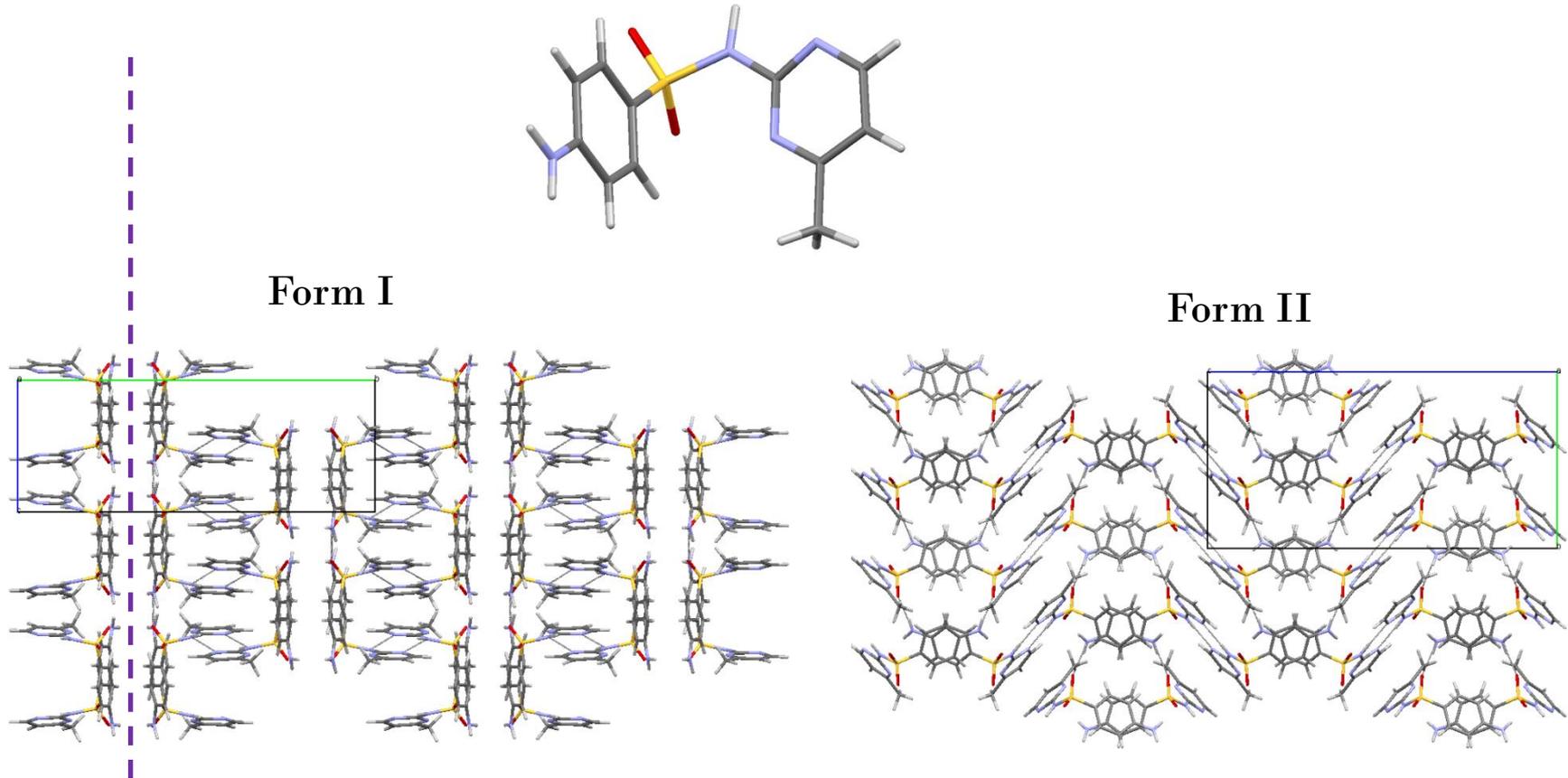
Ritonavir (Norvir; Abbott) is a drug for treating patients infected with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1). It was discovered in 1992 and crystallized as Form I. It was launched on to the market in 1996 as soft gelatin capsules and as oral solutions. Early in 1998, some lots of ritonavir capsules failed the dissolution test. Investigation revealed that a new crystal form of ritonavir precipitated from the formulation, Form II, less soluble than Form I, and thermodynamically more stable. The adverse effect of the decreased dissolution rate on the bioavailability of ritonavir led to withdrawal of the extant formulated



## 2. polimorfismo e proprietà meccaniche

### *polymorphs of sulfamerazine*

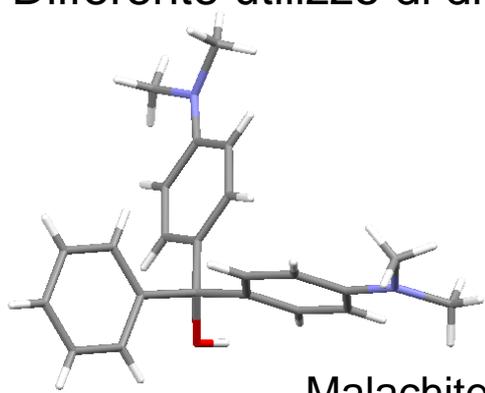
polymorph I has well defined **slip planes** and gives greater plasticity, compressibility and tableability than polymorph II, which has no discernible slip planes



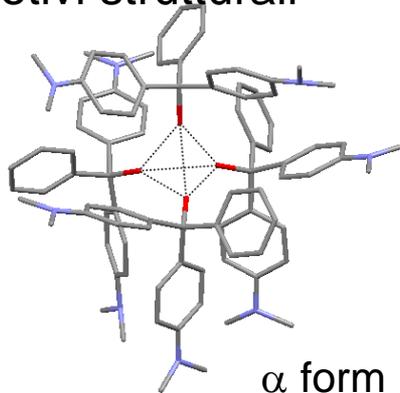
Sun, C. & Grant, D. J. W. Influence of crystal structure on the tableting properties of sulfamerazine polymorphs. *Pharm. Res.*, 18, 274–280 (2001).

## 2. origini strutturali del polimorfismo

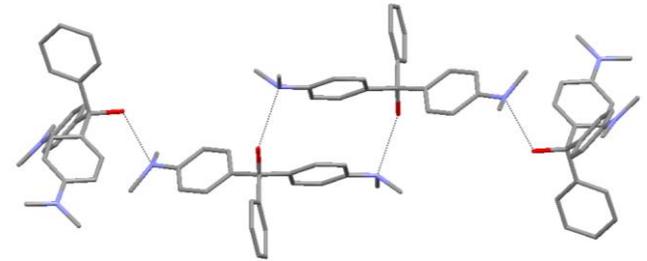
- Differente utilizzo di diversi motivi strutturali



Malachite green

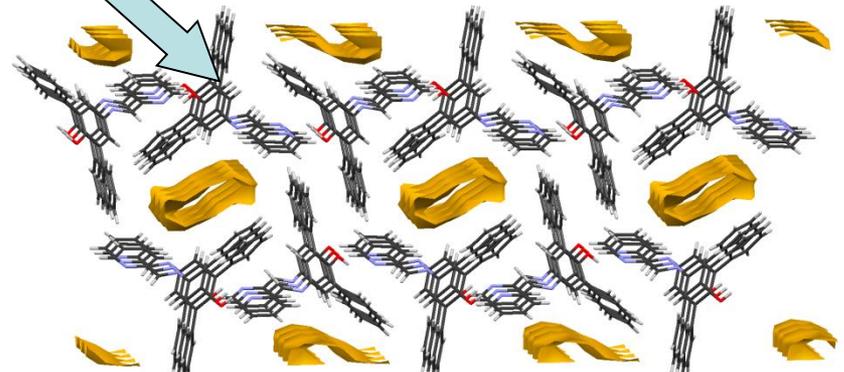
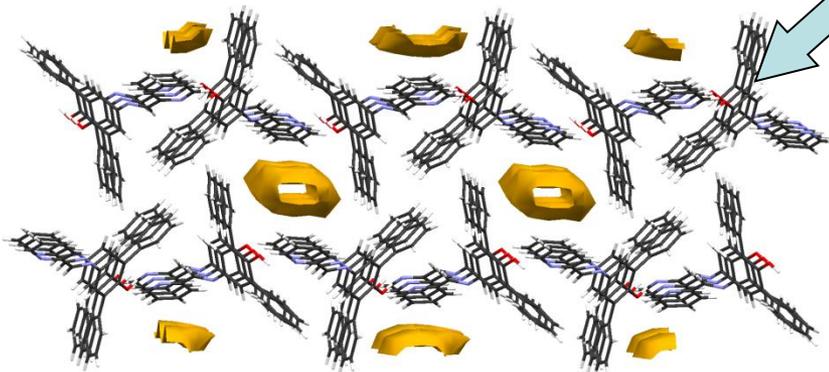
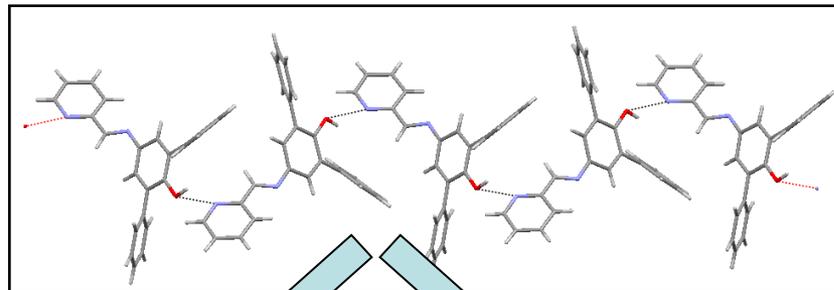


$\alpha$  form



$\beta$  form

- Differente  
assemblaggio di motivi  
strutturali analoghi



## 2. influenza del solvente sul polimorfismo

Acido tetrolico: da pentano  
etanolo  
cloroformio

→ due polimorfi concomitanti  
→ forma  $\beta$  (catemero)  $P2_1$  stabile  
→ forma  $\alpha$  (dimero)  $P-1$  metastabile

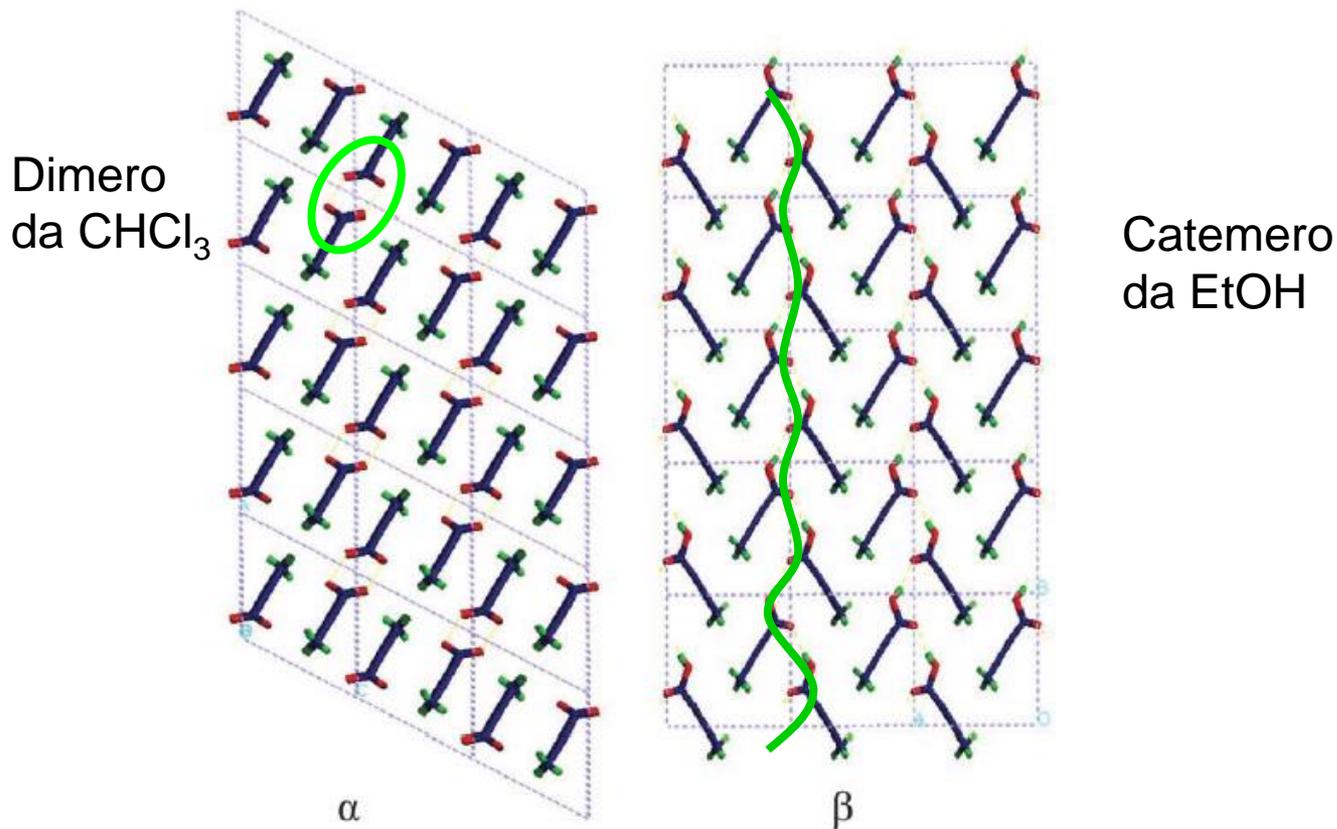
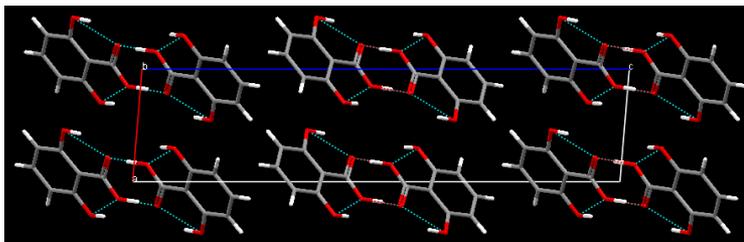
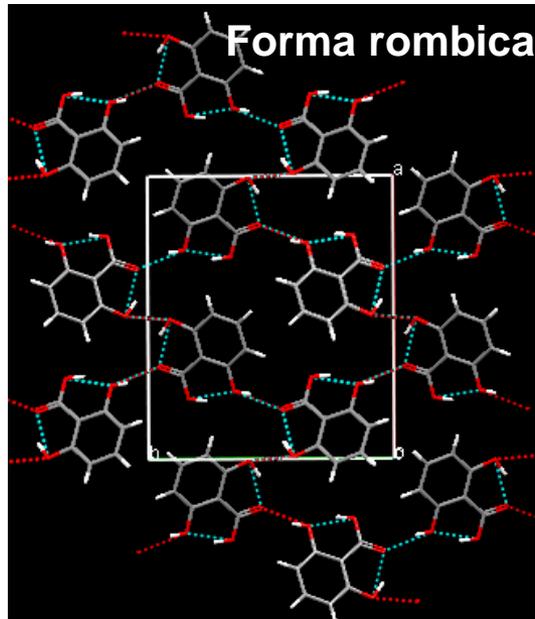


Fig. 1 Packing diagrams of  $\alpha$  and  $\beta$  forms of tetrolic acid.

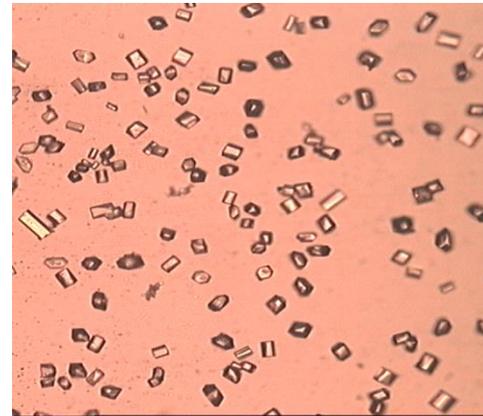
## 2. fasi stabili e metastabili

In alcuni casi si può avere precipitazione di una forma metastabile e successiva conversione nella forma stabile

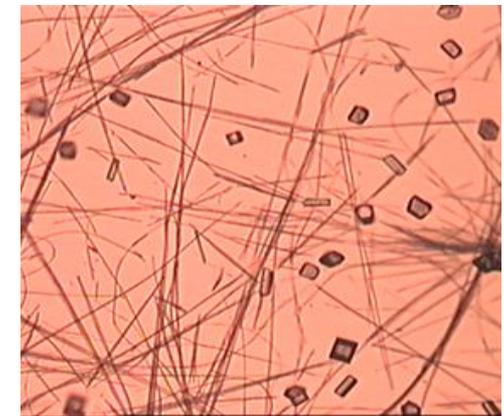
### Acido 2,6-diidrossibenzoico



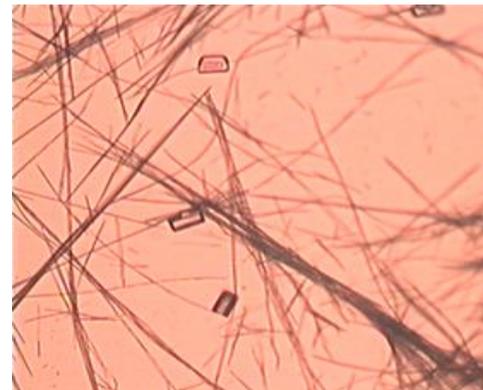
A. Bacchi-Univ. Parma



Time = 0 hrs. | 0.2mm



Time = 15 hrs.



Time = 30 hrs.



Time = 45 hrs.

## 2. forme cristalline: solvati

Spesso una forma cristallina è stabilizzata mediante l'inclusione di molecole di solvente che partecipano al packing. La propensità dei 20 solventi organici più comuni a dare solvatazione è stata studiata statisticamente.

### Propensità a dare forme solvate

Solvent	$N$	$N_{ord}$	$N_{Acta}$	$O_{corr}^a$
DMF	122	63	5	5.69
DMSO	142	70	7	4.73
Dioxane	161	83	8	4.70
<i>p</i> -Xylene	49	22	3	3.81
Benzene	471	271	32	3.43
THF	188	54	14	3.13
MeCN	396	181	31	2.98
AcOH	105	54	10	2.45
CCl <sub>4</sub>	59	14	7	1.97
Toluene	266	65	36	1.72
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	455	183	77	1.38
CHCl <sub>3</sub>	386	132	67	1.34
MeOH	795	433	158	1.17
Acetone	346	169	82	0.98
Pr <sup>1</sup> OH	65	33	16	0.95
Cyclohexane	56	9	21	0.62
EtOAc	155	52	75	0.48
EtOH	406	168	206	0.46
Et <sub>2</sub> O	144	54	96	0.35
Hexane	84	21	181	0.11
Total	4851	2131	1132	

DMF, DMSO e dioxane sono le molecole con maggior propensità a dare solvati

EtOH, Et<sub>2</sub>O e n-hexane hanno bassa probabilità di essere incluse

## 2. incidenza della solvatazione

- 1/3 dei composti organici cristallizza come solvato o idrato, inoltre per uno stesso solvente, la probabilità di osservare diversi solvati è maggiore dell'80% quando un solvato è già stato ottenuto.
- La formazione di solvati seguita da una desolvatazione controllata è una delle principali vie per ottenere forma polimorfe, o per ottenere materiali amorfi.
- Se un particolare soluto può essere cristallizzato in una determinata forma solvata, la desolvatazione può essere l'unico metodo per ottenere il soluto puro e cristallino.
- Una ricerca nella banca dati di CSD rivela che ci sono più di 220 (dato in continuo aumento) solventi organici che cocrystalizzano in strutture organiche o metallorganiche.
- Le quindici molecole organiche più ricorrenti sono: metanolo, diclorometano, benzene, etanolo, cloroformio, acetonitrile, acetone, toluene, THF, acetato di etile, etere etilico, diossano, DMSO, DMF e n-esano.
- Questi coprono più dell'82% del numero totale di solvati (esclusi gli idrati).
- Il numero degli idrati è molto superiore al numero dei solvati di strutture organiche, ma è invece minore considerando le strutture metallorganiche.

## 2. forme cristalline: idrati

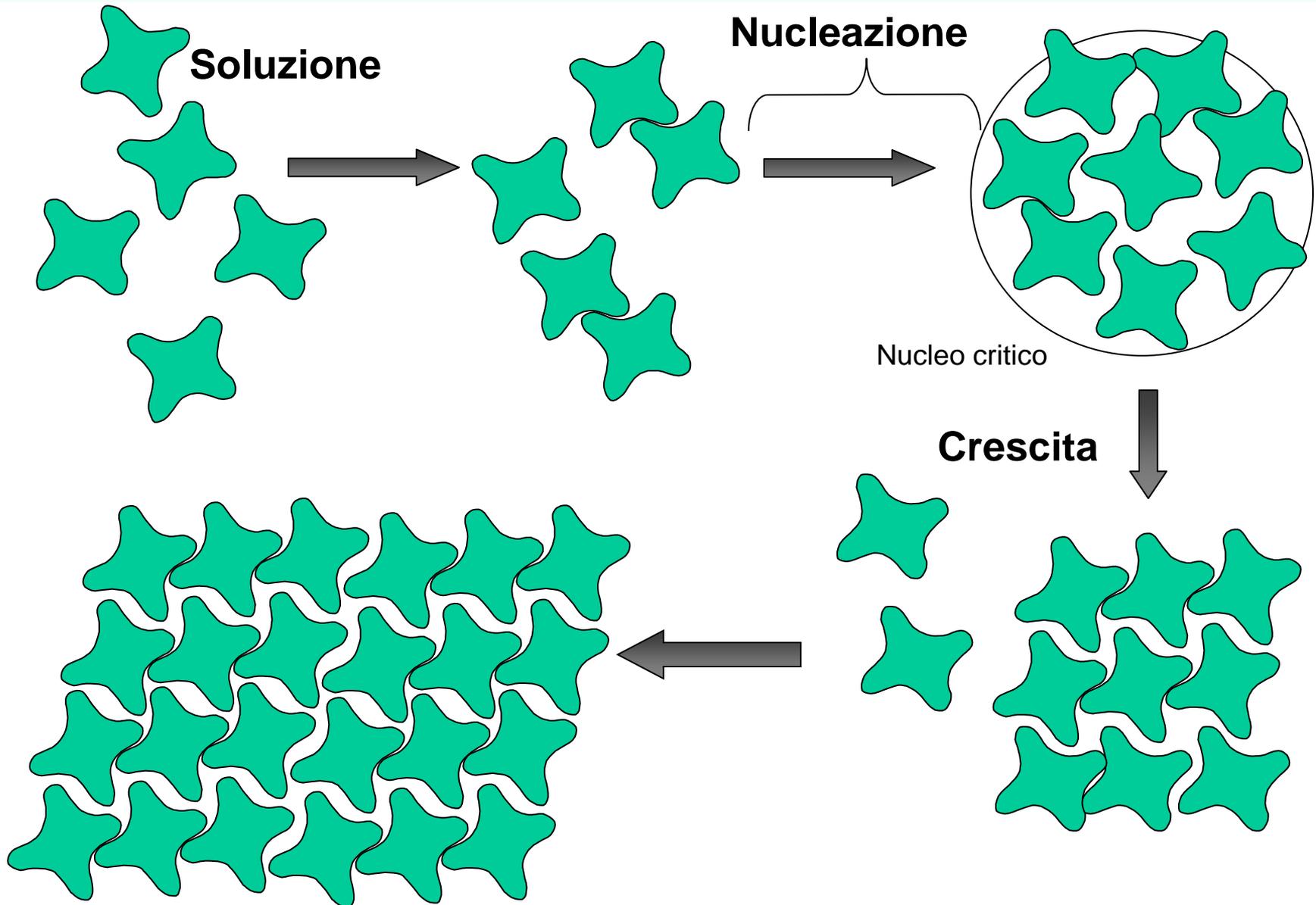
Recenti indagini statistiche sulla Cambridge Structural Database mostrano che il 25% dei cristalli cresciuti in acqua sono idrati.

Indicativamente la principale driving force verso la formazione di idrati è la presenza di donatori di legame a idrogeno non impegnati. Contemporaneamente però si nota che gli idrati tendono a non formarsi se il composto non ha accettori di legami a idrogeno.

Nel caso in cui si formi un idrato, il numero di molecole di acqua incorporate aumenta all'aumentare della massa molecolare, e all'aumentare del numero di potenziali donatori e accettori di legame a idrogeno.

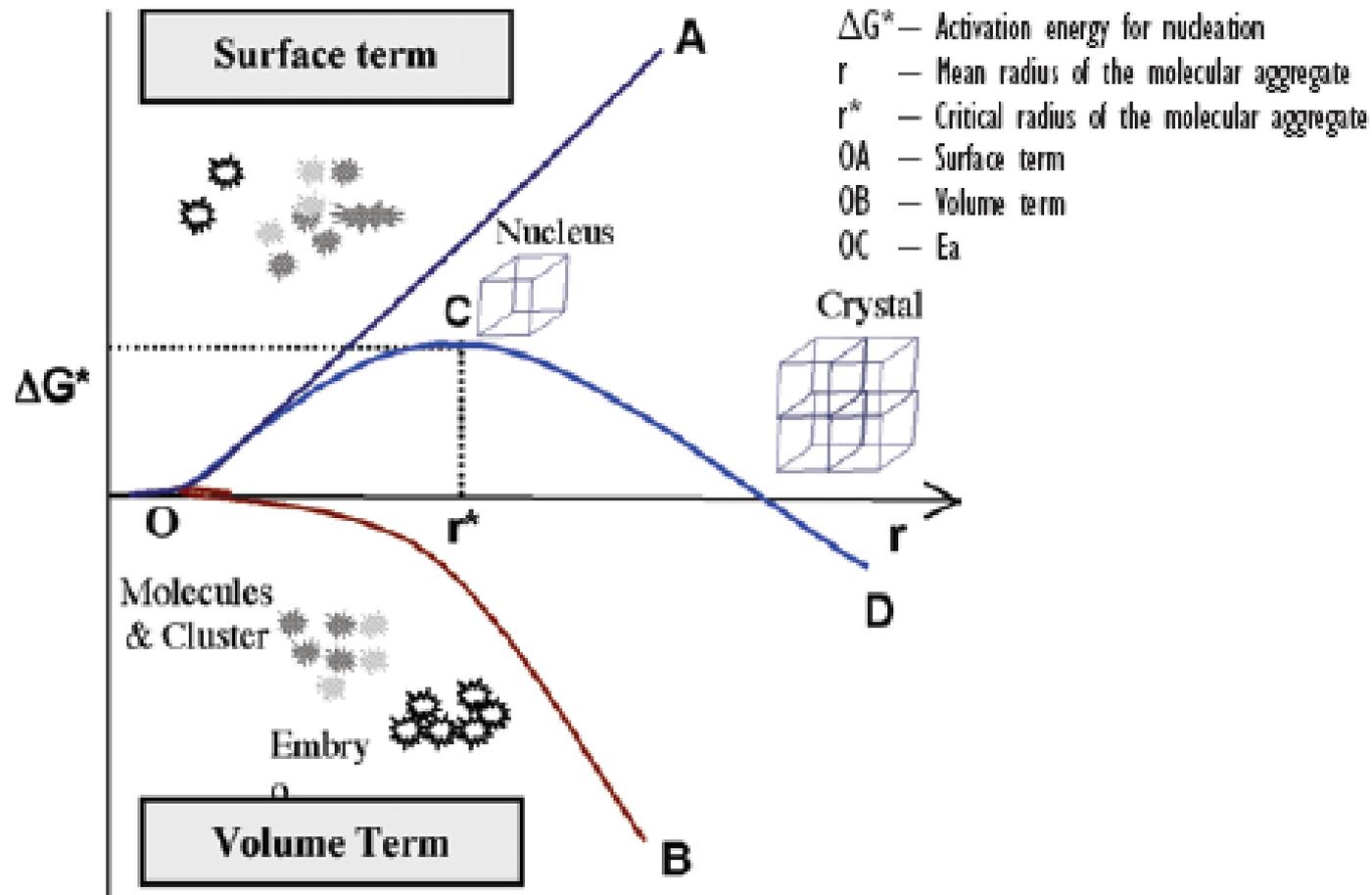
Si nota inoltre una forte tendenza dei composti chirali a formare idrati, a testimonianza che l'idratazione aumenta la possibilità di ottenere close packing in assenza di centri di inversione.

### 3. cristallizzazione



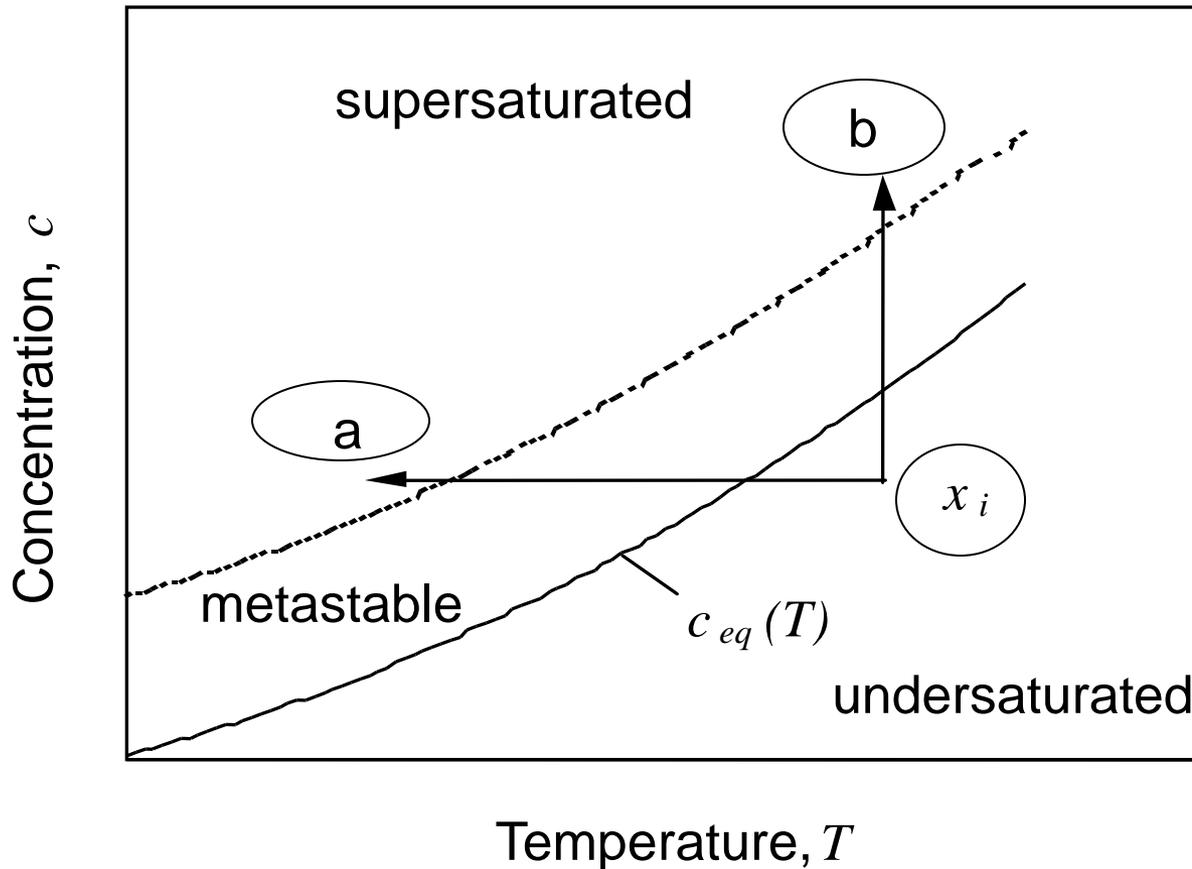
## 3. nucleazione

**Figure 3: Thermodynamic Relationship Between Activation Energy for Nucleation and Mean Radius of Molecular Aggregate**



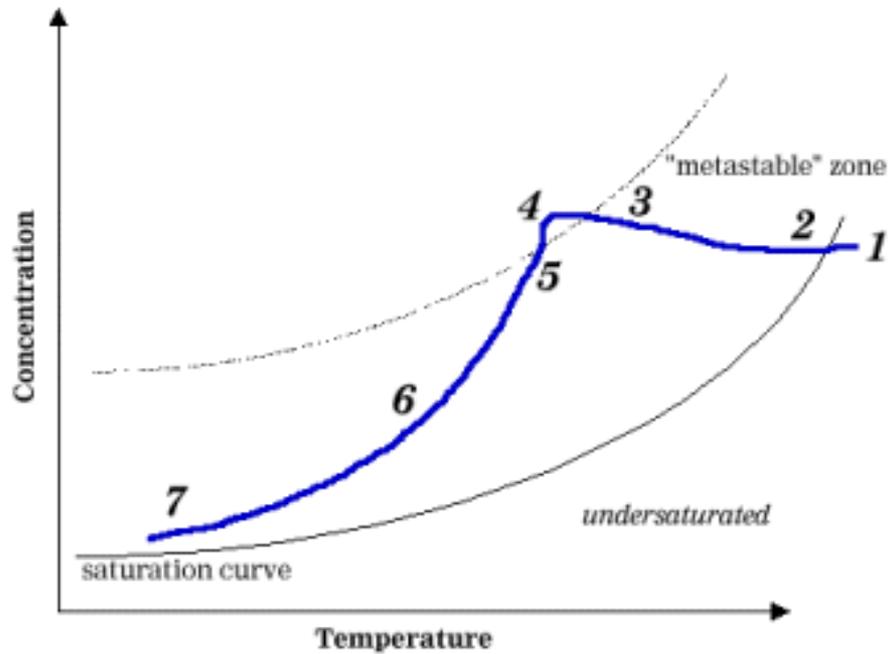
### 3. cristallizzazione da soluzione

- (a) Raffreddamento: conveniente se la curva di solubilità varia molto con  $T$
- (b) Evaporazione: si usa se la curva è poco sensibile a  $T$  (es. NaCl)

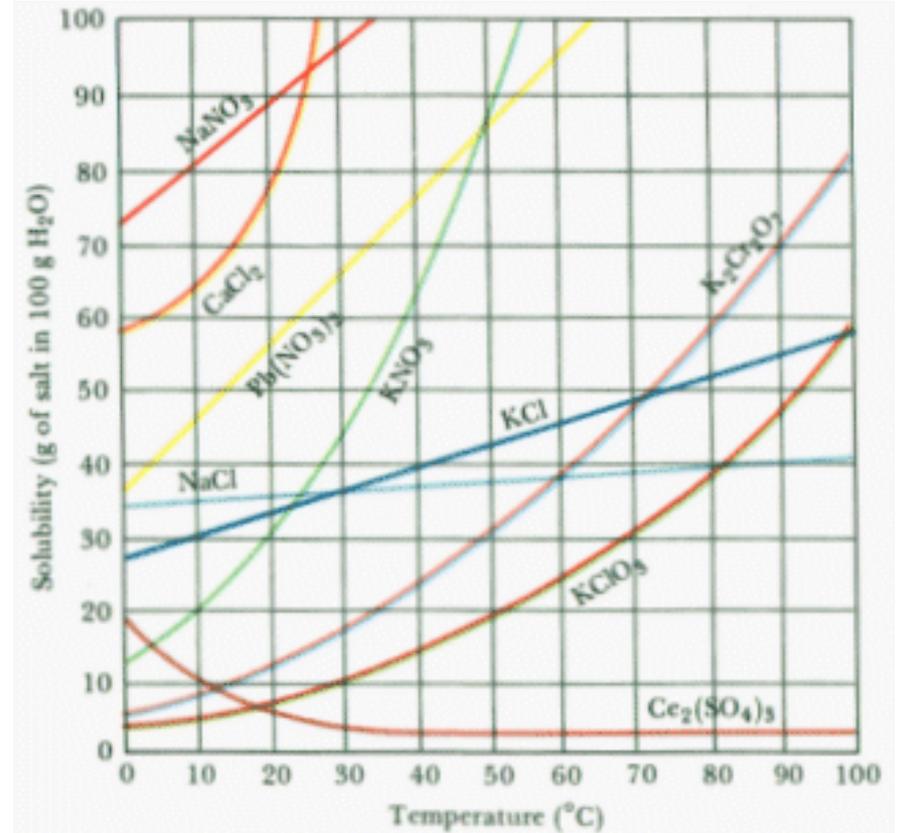


In entrambi i casi, una volta iniziata la cristallizzazione, il sistema si muove spontaneamente verso la composizione dell'equilibrio.

## 3. cristallizzazione da soluzione



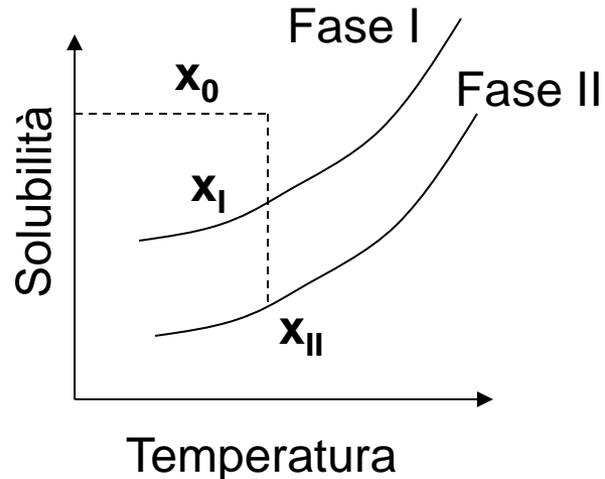
- 1 Feed location, undersaturated
- 2 Solution cools to saturation
- 3 Enter "metastable" zone, nucleation begins
- 4 Rapid nucleation
- 5 Concentration decreases with crystal growth
- 6 Crystal growth during main cooling cycle
- 7 Exit location, supersaturated



### 3. cristallizzazione di sistemi polimorfi (Ostwald's rule)

Secondo la regola di Ostwald (rule of stages, 1897) un sistema che sta cristallizzando progredisce dallo stato di sovrassaturazione fino all'equilibrio seguendo degli stadi, dove ogni stadio rappresenta la variazione più piccola di energia.

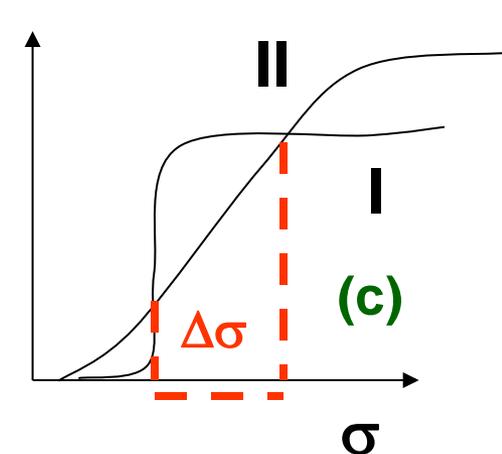
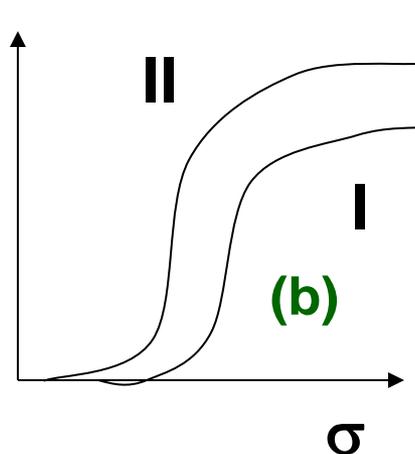
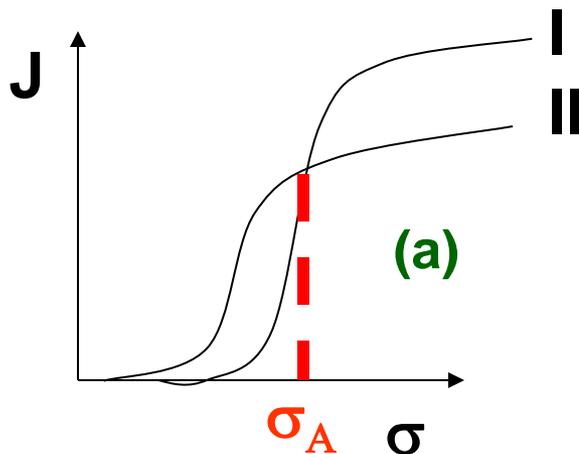
In realtà la regola vale solo se  $J_I \gg J_{II}$



Partendo dal punto  $x_0$   
l'apparizione delle fasi I e II dipende  
dalla rispettiva velocità di  
nucleazione.

Esistono 3 casi:

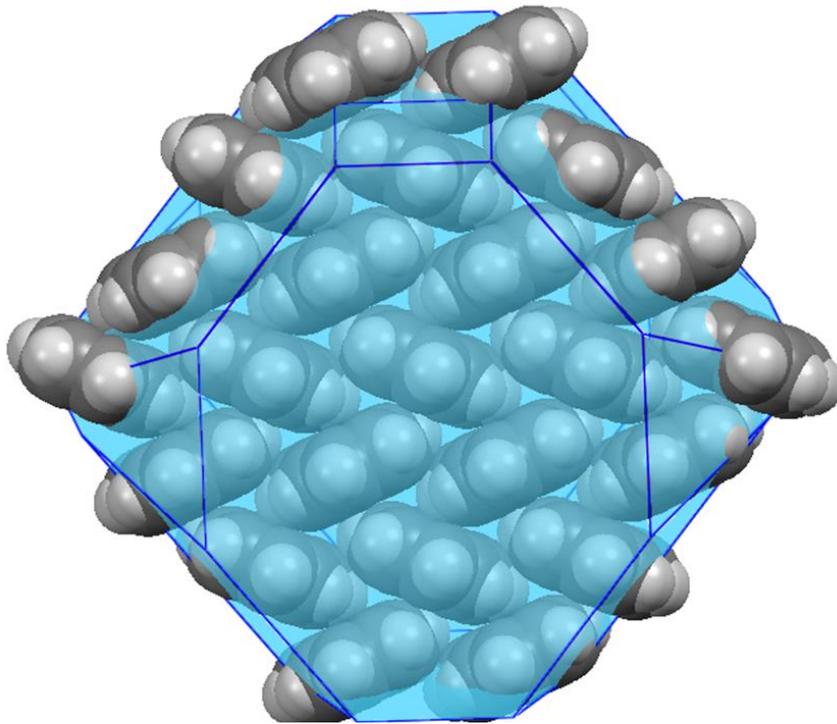
- (a) Nuclea prima I per  $\sigma > \sigma_A$  (Ostwald)  
Nuclea prima II per  $\sigma < \sigma_A$
- (b) Nuclea sempre prima II
- (c) Nuclea prima I (Ostwald) solo in  $\Delta\sigma$



# 3. Morfologia

La morfologia è la forma macroscopica del cristallo, e di solito si distingue tra morfologia di equilibrio e morfologia di crescita.

La prima è la forma che il cristallo adotta quando può equilibrarsi con l'ambiente, e corrisponde alla minimizzazione dell'energia libera superficiale del cristallo. La seconda è la forma adottata quando domina la cinetica.



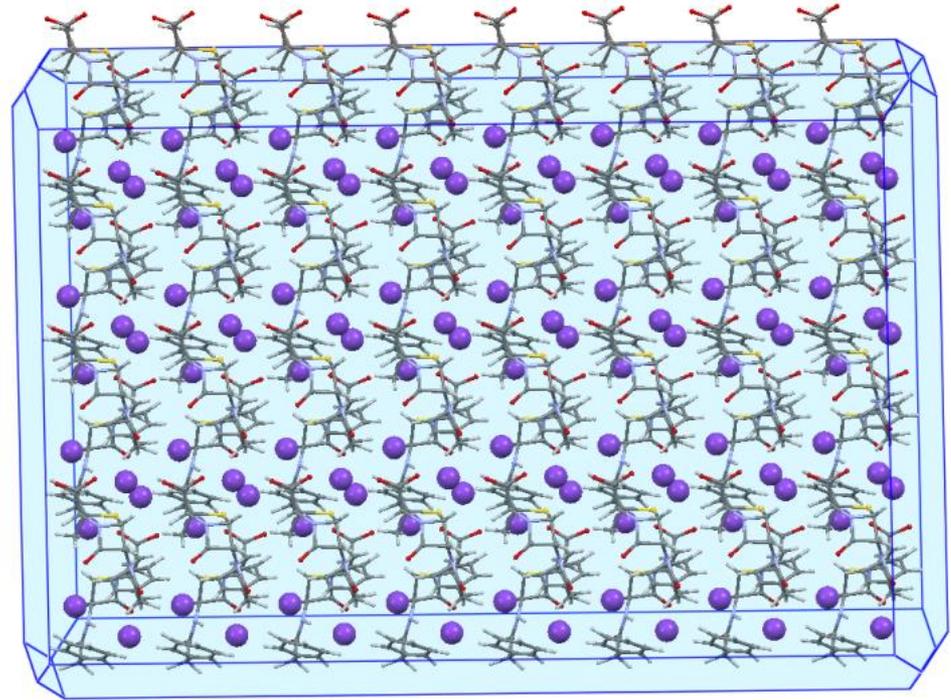
La morfologia è determinata da due fattori:

- simmetria interna della struttura del cristallo
- velocità relativa di crescita delle facce esterne, che è collegata alla facilità di inglobare una molecola nella struttura.

### 3. morfologia di equilibrio

Forma che il cristallo adotta quando può equilibrarsi con l'ambiente: corrisponde alla minimizzazione dell'energia libera superficiale del cristallo.

In un mezzo isotropo come un liquido questo porta a una forma sferica. Siccome in un cristallo i diversi piani di molecole hanno diverse energie, il cristallo assume una forma sfaccettata anche a costo di una maggior superficie.

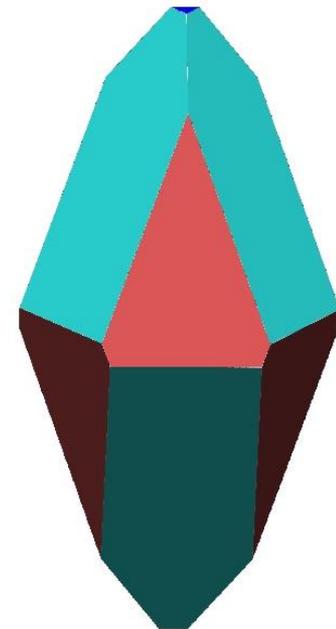
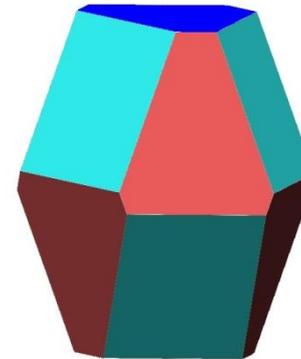
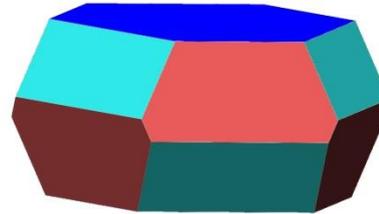
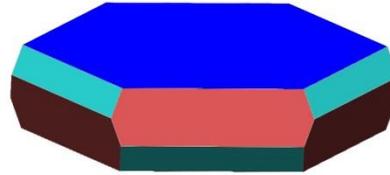


### 3. morfologia di crescita

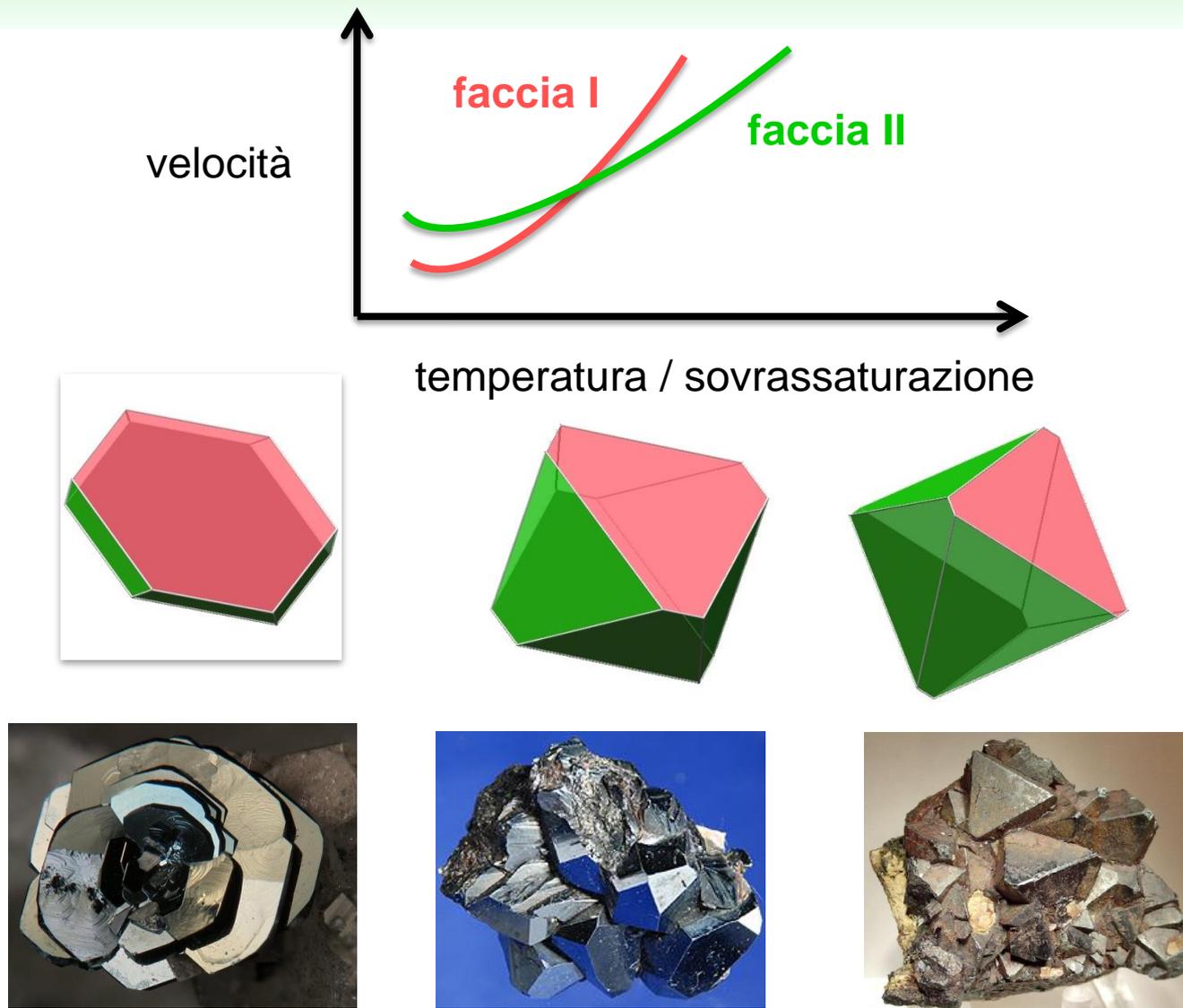
La morfologia può essere influenzata da:

- sovrassaturazione
- temperatura
- solvente
- impurezze

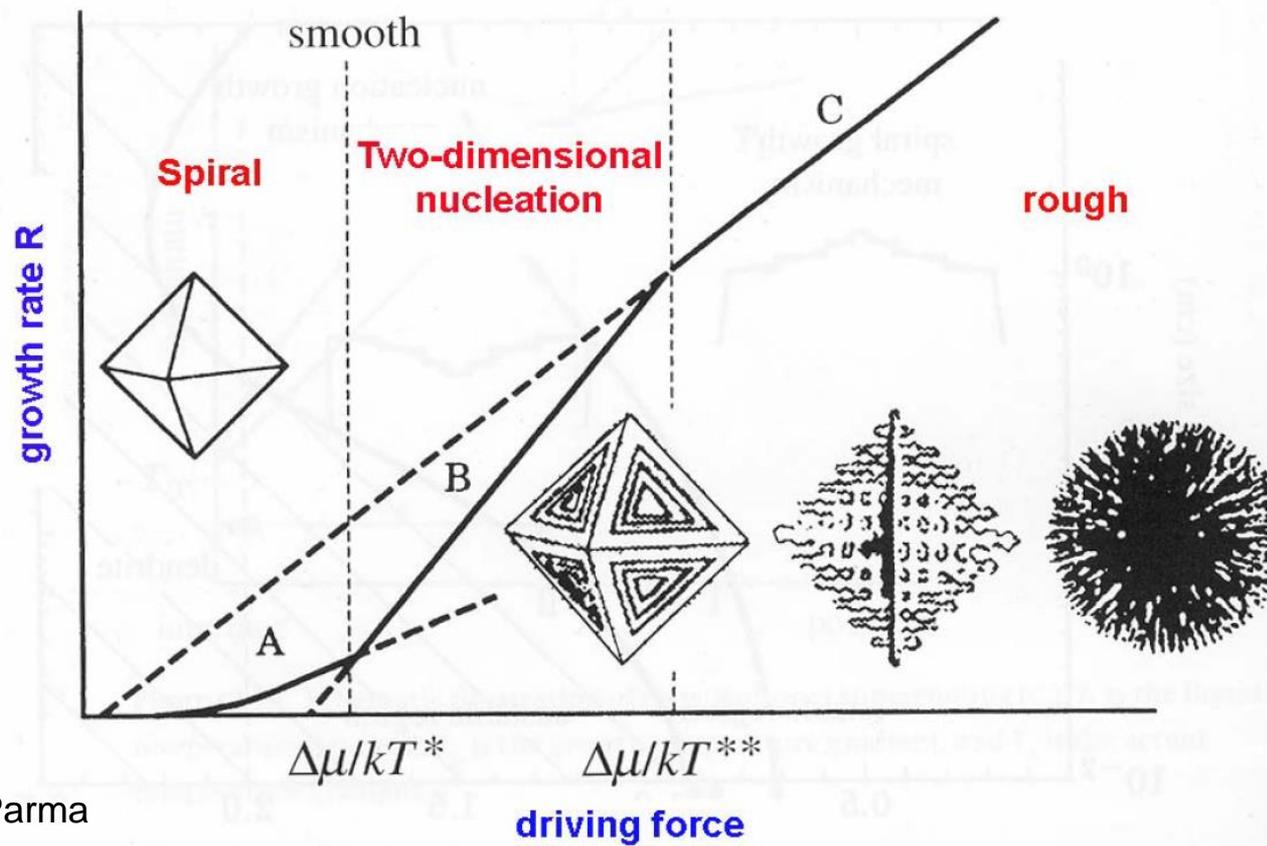
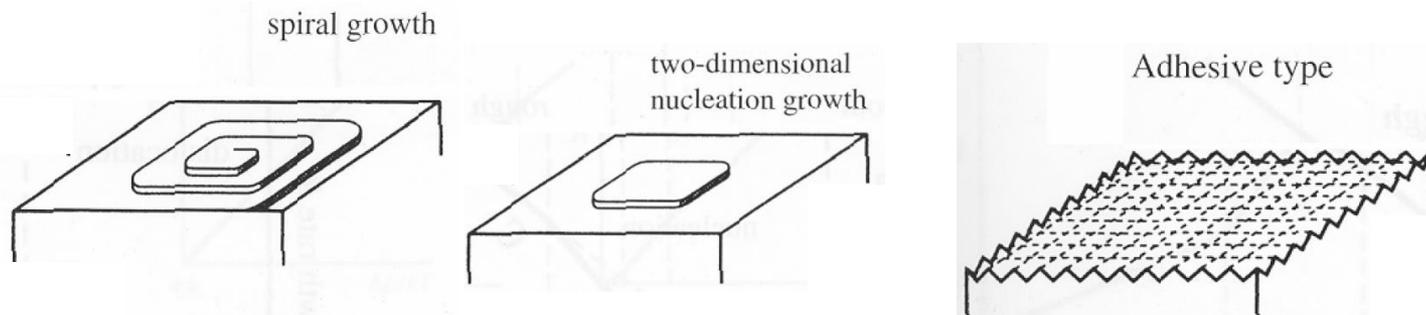
che possono modificare la velocità con cui crescono le facce.



## 3. morfologia di crescita

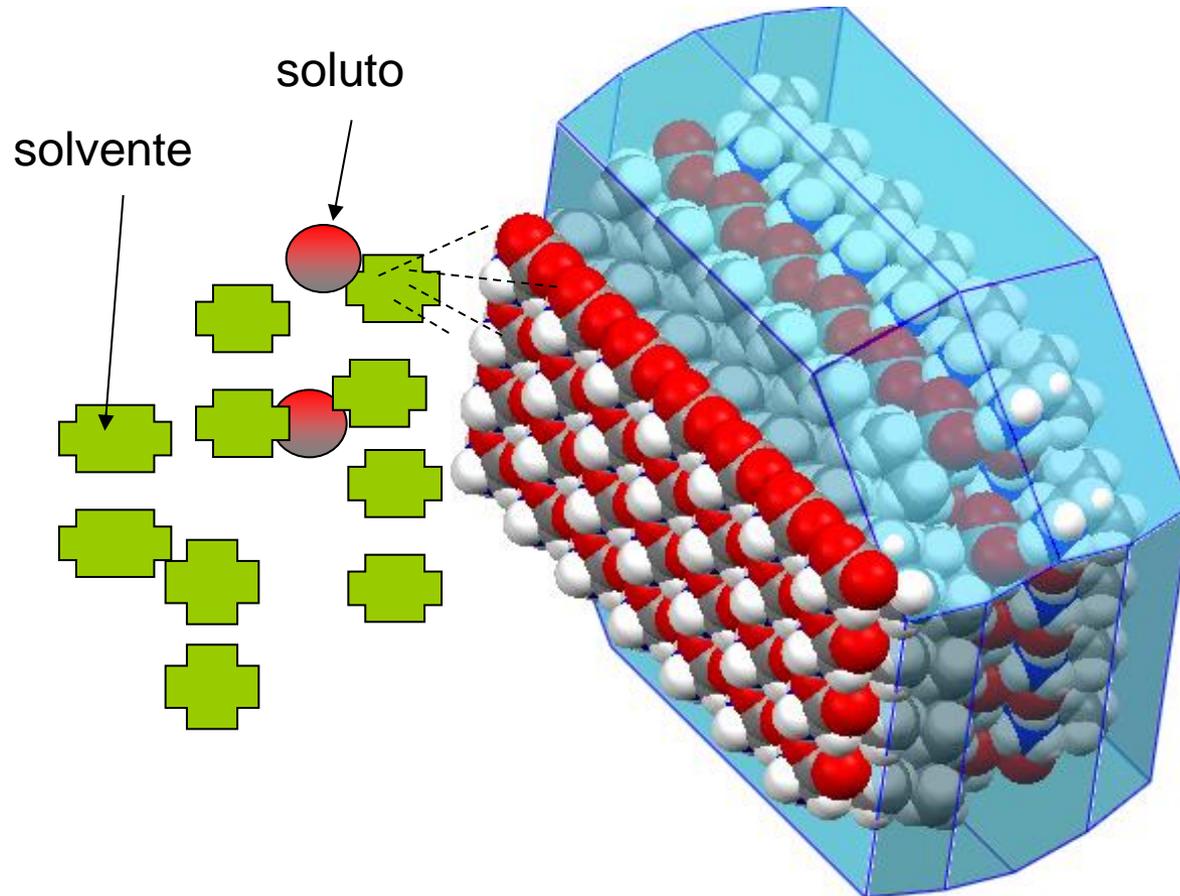
Ematite,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$

## 3. il ruolo della sovrassaturazione sul meccanismo di crescita

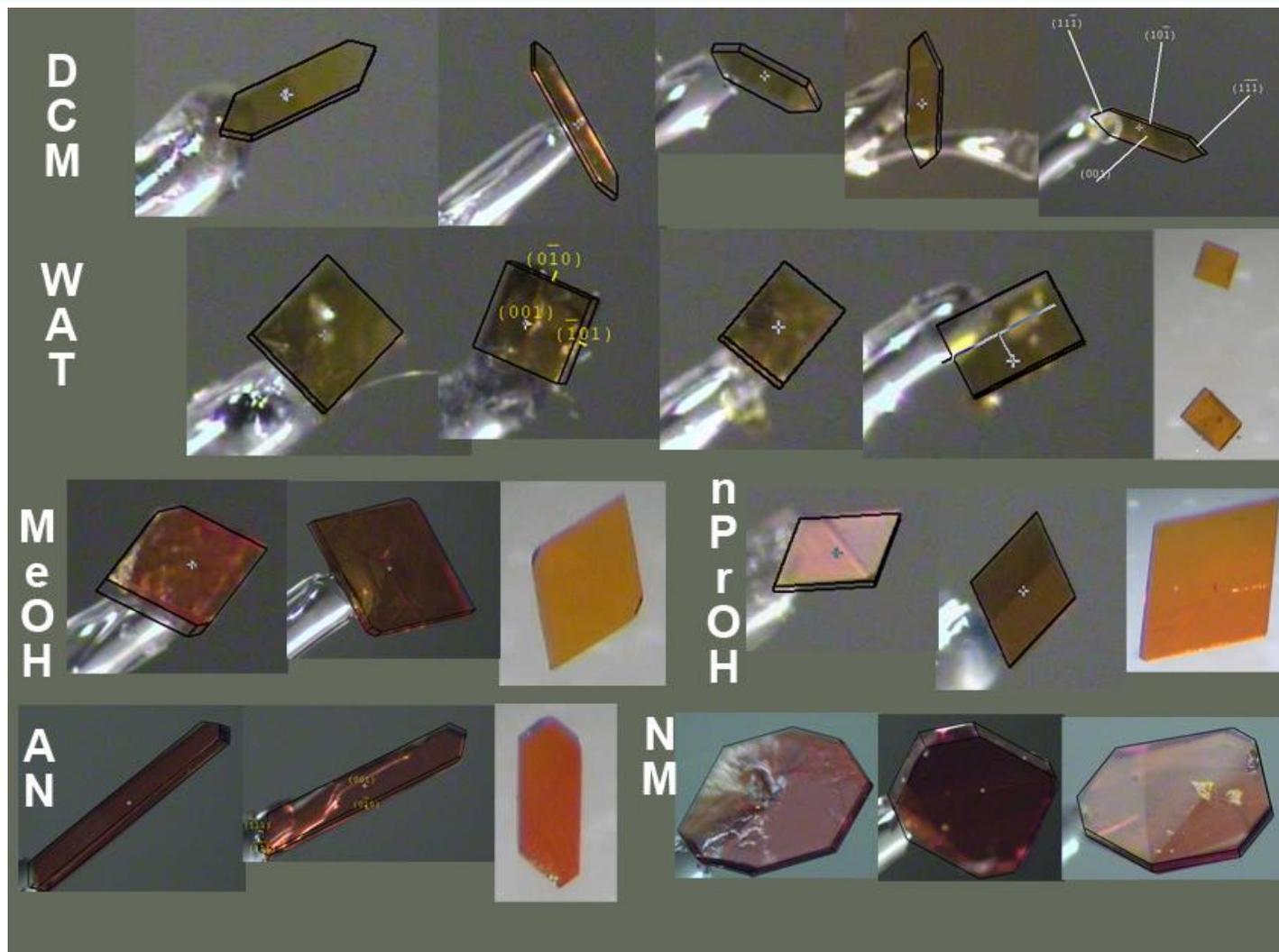


### 3. il ruolo di solvente e impurezze sulla morfologia di crescita

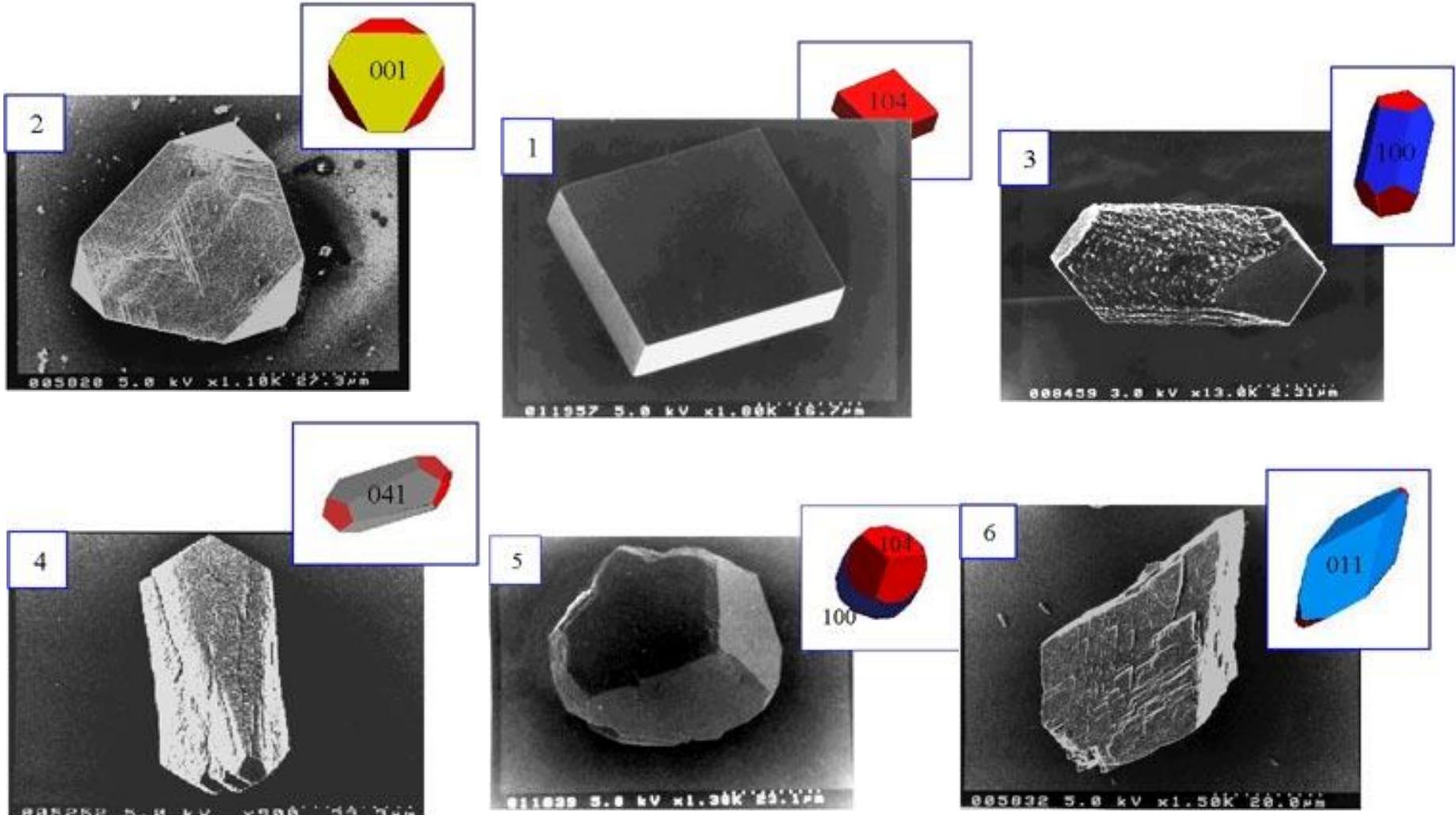
Durante la crescita, il solvente o le impurezze possono 'avvelenare' una faccia con cui formano interazioni preferenziali, rallentandone la crescita.



## 3. esempio: il ruolo della solvente sulla morfologia di crescita



Cristalli di Calcite ottenuti in presenza di diversi additivi ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , fosfati, acidi organici)

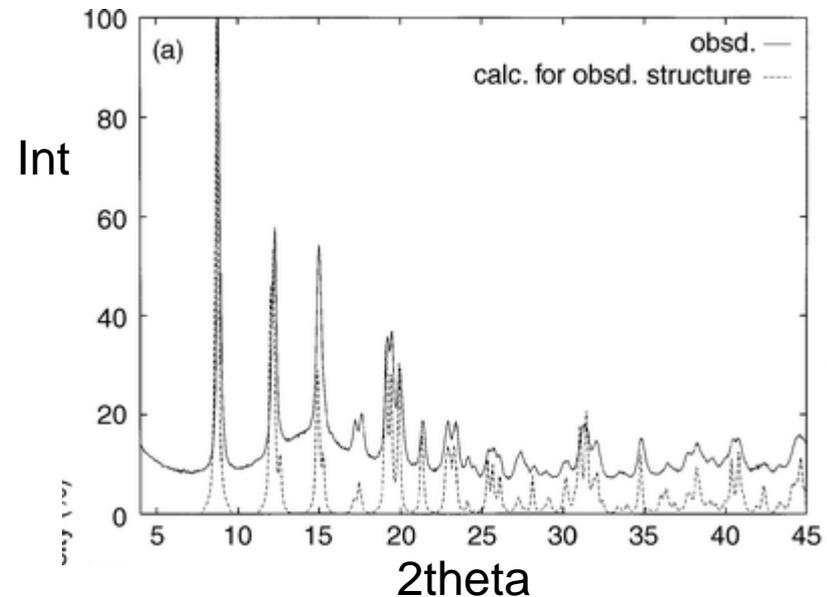


## 4. tecniche di determinazione strutturale e caratterizzazione di forme cristalline

- Diffrazione di raggi X su cristallo singolo → determinazione strutturale completa
- Diffrazione di raggi X su polveri → identificazione univoca della fase, no struttura

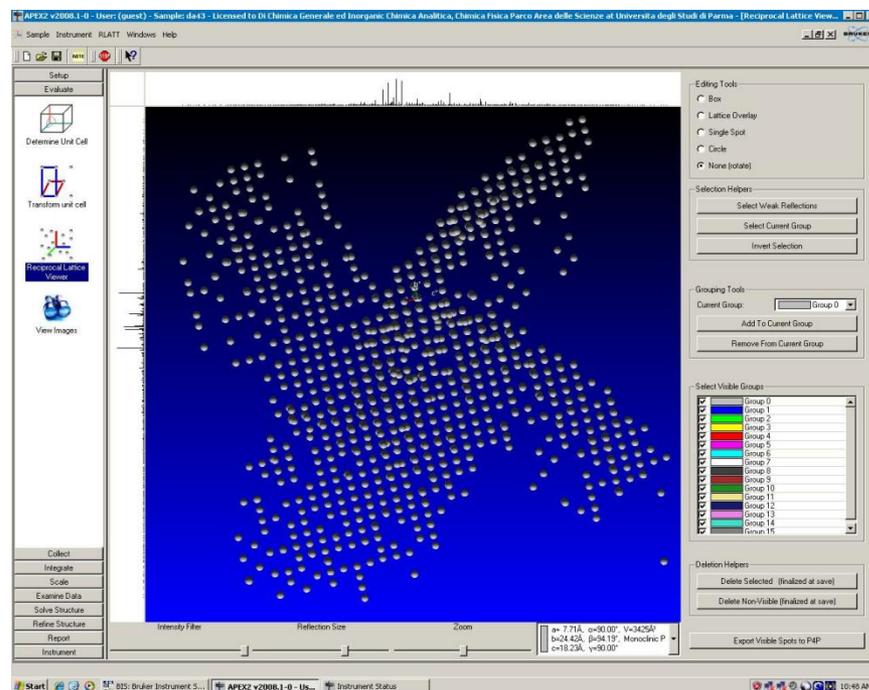
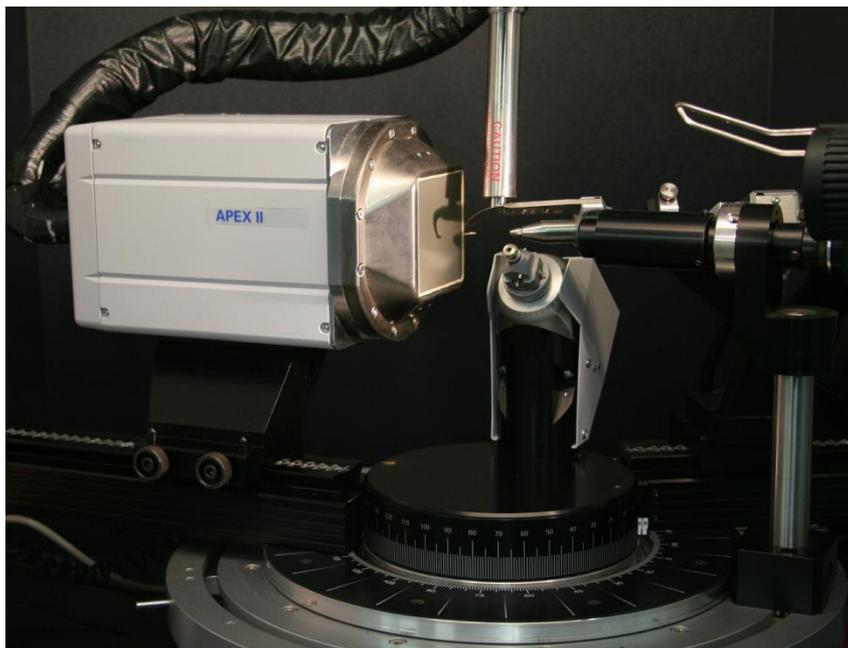
Conoscendo la struttura cristallina è possibile simulare lo spettro di polveri per identificare una fase già nota.

- Analisi termiche (distruttive)
- Microscopie
- spettroscopia IR
- spettroscopia NMR allo stato solido
- spettroscopia Raman



## 4. diffrazione da cristallo singolo

Nella maggior parte dei casi la raccolta dati viene effettuata tramite un rivelatore ad area detector e richiede generalmente tempi che vanno dalle 24 alle 48 ore. La raccolta può essere effettuata a temperatura ambiente, a bassa temperatura o ad alta temperatura.

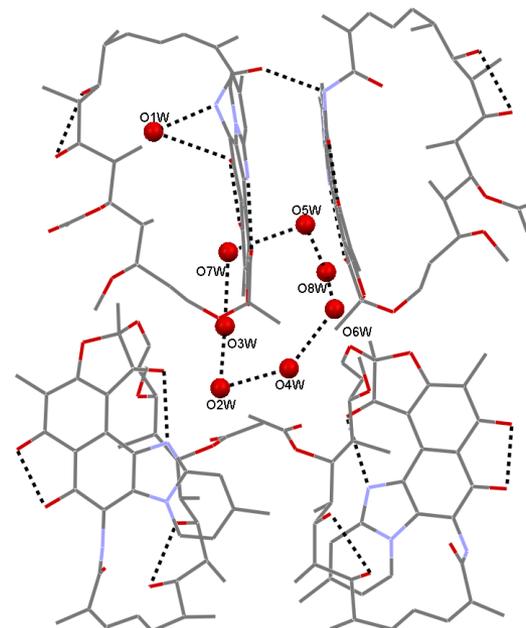
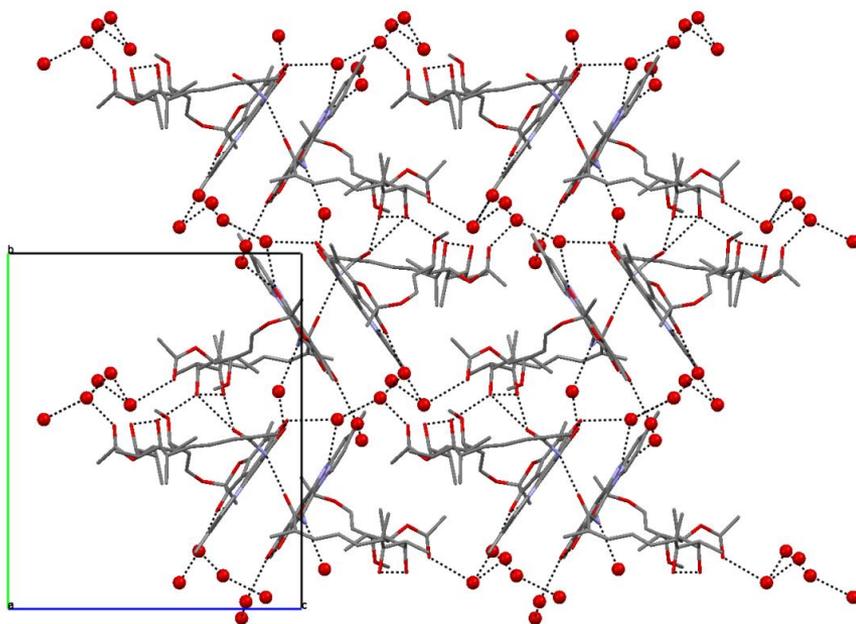
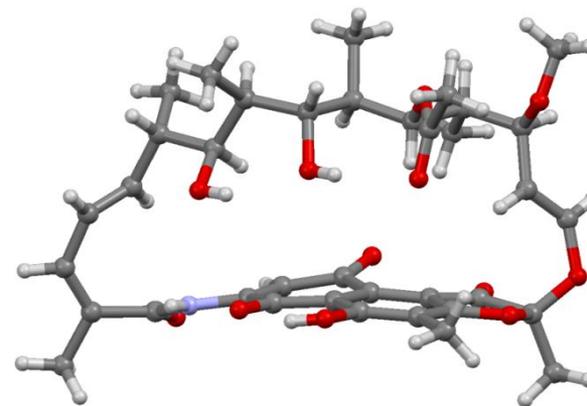


## 4. Sua Maestà il cristallo singolo

Informazioni ottenibili:

determinazione univoca della struttura e configurazione assoluta molecolare

definizione accurata della struttura cristallina di forme polimorfe, idrate, solvate in condizioni ambientali o a bassa temperatura



## 5. Cambridge Structural Database

<http://www.ccdc.cam.ac.uk> DVD, distribuzione attraverso centri nazionali, a pagamento

La CSD raccoglie tutte le strutture a cristallo singolo (RX, neutroni) di composti contenenti almeno un C, con un numero di atomi fino a 1000, i polipeptidi contenenti fino a 24 residui e i mono-, di-, e tri-nucleotidi.

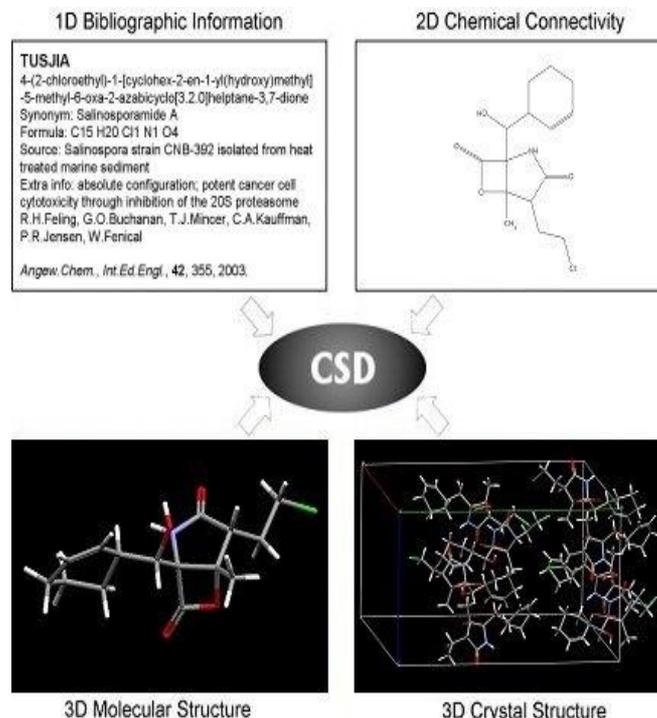
Il database viene aggiornato ogni 6 mesi, e attualmente (inizio 2013) contiene circa 800000 strutture.

I campi di informazione su cui si può effettuare la ricerca

sono:

- Bibliografiche (autore, rivista, anno, ...)
- **Chimiche (formula, nome, diagramma, ...) 2D, 3D**
- Cristallografiche (cella, Z, gruppo spaziale, ...)
- Testuali (attività, polimorfismo, colore, disordine, ...)

**E' anche possibile la ricerca di gruppi coinvolti in interazioni intermolecolari (non-bonded contacts).**



# Contatti

Prof. Alessia Bacchi

Dipartimento di Chimica, Università degli Studi di Parma

Parco Area delle Scienze, 17A – 43124 Parma

[alessia.bacchi@unipr.it](mailto:alessia.bacchi@unipr.it)

+39 0521 905421

Laboratorio di Strutturistica 'Mario Nardelli'

<http://www.chim.unipr.it/ls/home.html>