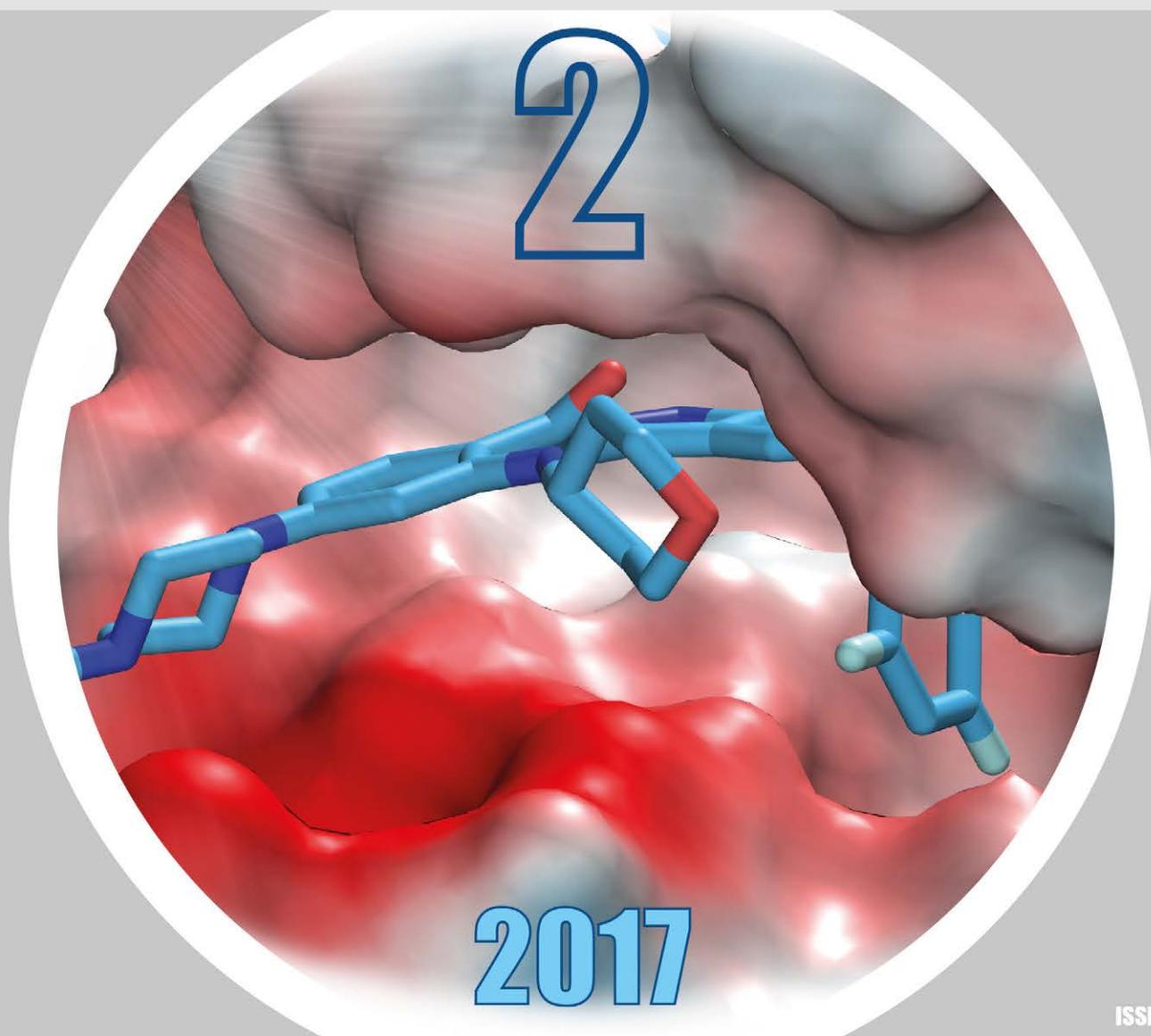


anno I - N° 2 - MARZO/APRILE 2017

La **Chimica e Industria** online

 Organo Ufficiale della Società Chimica Italiana



ISSN 2283-544X

- **Cristallografia e spettroscopia a raggi X per la caratterizzazione di materiali**
- **Fotochimica per la conversione di energia e la sintesi organica**

# TESTA I TANTI UTILIZZI DEL CARBONE ATTIVO

Filtrazioni speciali  
industriali



Purificazione prodotti  
alimentari e farmaceutici

Depurazione  
di aria e acqua



European Operations of  
Calgon Carbon Corporation

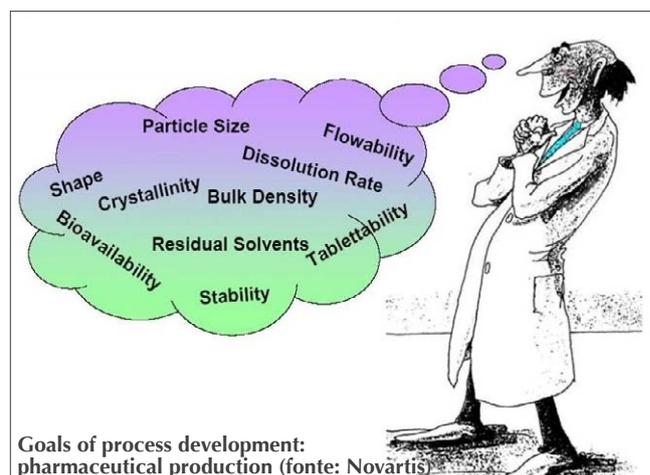
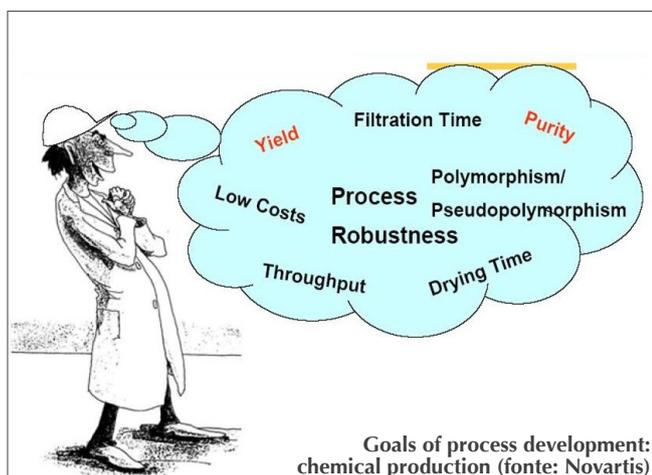
**Chemviron Italia S.r.l.**

Via Pregnana, 63  
20017 Rho (Milano)  
info@chemviron.eu

**chemviron.eu**



## LA PRODUZIONE DI CRISTALLI: LA PIÙ GRANDE SFIDA PER L'INDUSTRIA



**G**li obiettivi che ci si pone quando si vuole ottenere un prodotto per cristallizzazione sono i seguenti: ottime rese, prodotti ultrapuri, desiderata forma polimorfica, riproducibilità delle dimensioni delle particelle e della loro distribuzione e morfologia esterna desiderata.

La cristallizzazione è utilizzata nell'industria chimica sia per ottenere prodotti solidi a partire da sali inorganici e molecole organiche, sia come metodo di purificazione per ottenere intermedi ultrapuri e per eliminare sali. Si utilizza la cristallizzazione come metodo di purificazione quando il prodotto è termolabile, quando non c'è differenza di volatilità

fra prodotto e le impurezze, quando il prodotto è desiderato in forma solida ed è più economico produrlo direttamente che attraverso una previa distillazione e quando occorrono prodotti ultrapuri. Inoltre gli aspetti economici favoriscono la cristallizzazione rispetto alla distillazione grazie alle minori spese energetiche, soprattutto quando la distillazione deve operare ad alta temperatura.

La produzione di cristalli è fattore di successo, in molti settori industriali, come produzione di pitture e vernici, prodotti farmaceutici, fitosanitari, catalizzatori, materiali nanotecnologici, nell'elettronica e nella cosmetica. La cristallizzazione coinvolge, sem-

pre, diverse altre operazioni unitarie, tutte fisiche, a monte ed a valle della produzione del cristallo, i cui risultati dipendono dalle dimensioni delle apparecchiature; è quindi necessario sempre un passaggio attraverso impianti pilota di diverse dimensioni per tutte le fasi.

Per esempio si può partire da un cristallizzatore di laboratorio da 50 ml e dopo da 600 ml, poi si passa ad un pilota da 2 litri, successivamente a uno 50 litri e, infine, al reattore industriale da 700 litri.

La realizzazione industriale è una delle più difficili dell'industria chimica, perché occorre determinare non solo le proprietà chimiche e fisiche ottimali dei cristalli, ma anche la loro processabilità, ossia la flussabilità della polvere, la filtrabilità, le proprietà abrasive, il tempo di essiccamento, la coesività (facilità con cui si possono formare pasticche), la compressibilità ed il comportamento nella centrifuga. Quasi tutte le sostanze organiche ed inorganiche presentano diverse strutture polimorfe, ossia strutture cristalline diverse che influenzano tutte le proprietà del solido ed è quindi necessario fare delle prove iniziali, un primo screening delle diverse forme polimorfe.

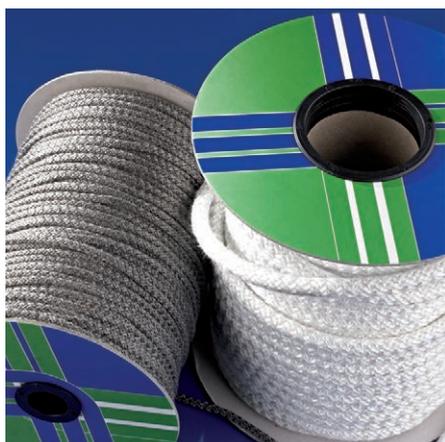
La struttura cristallina è importante e si può, infatti, brevettare la preparazione di una specifica forma polimorfa. La struttura più stabile è il "polimorfo termodinamico", quelle meno stabili sono dette cinetiche. Se la struttura voluta è quella termodinamica è facile realizzarla a livello industriale, se invece è quella cinetica è molto più difficile e tutto dipende dalla struttura cristallina, ma anche dalle condizioni sperimentali di preparazione. La morfologia esterna dipende da quali sono le facce presenti alla superficie e dall'area che occupano e le forme morfologiche possono essere ad aghi, cubica, piatta ed a dendriti. È opinione comune (in gran parte giustificata) che lo

*scale-up* di un cristallizzatore sia uno dei più difficili dell'industria chimica. I problemi principali sono: le condizioni di miscelazione che sono difficili da riprodurre dal laboratorio al pilota e all'impianto industriale; la facile omogeneità degli impianti di laboratorio, sia quella di composizione sia quella di temperatura, che non può essere garantita nel pilota e nell'impianto industriale. Inoltre l'obiettivo non è la resa e la selettività in una molecola, ma la resa e la purezza in un solido con certe caratteristiche. L'obiettivo è quindi più complesso della sintesi di una molecola allo stato liquido o solido: il mezzo di reazione è sempre una sospensione, sistema difficile da trattare; bisogna utilizzare lo stesso solvente e le stesse soluzioni con le stesse impurezze nel laboratorio, nel pilota e nell'industriale e questo non è sempre realizzabile; le fasi successive, quelle della filtrazione o centrifugazione, del lavaggio, dell'essiccamento e della macinazione, possono modificare i risultati ottenuti nel cristallizzatore.

Per la produzione di cristalli oltre alla cristallizzazione, utilizzata sia per produrre sia per purificare cristalli e in cui lo stadio lento è la nucleazione e occorre l'aggiunta di semi, ed è, quindi, importante sia il controllo del trasferimento di massa che di calore, si ha la precipitazione (o cristallizzazione reattiva, utilizzata per produrre solidi), dove è velocissimo lo stadio di nucleazione ed è importante il controllo del trasferimento di massa, e la cristallizzazione dallo stato fuso, utilizzata soprattutto per purificare, dove è lento lo stadio di nucleazione, velocissimo quello di accrescimento ed importante il controllo del trasferimento di calore.

La cristallizzazione è, dunque, un processo complesso che richiede specifiche competenze e coinvolge molti ambiti dell'industria chimica e farmaceutica.

# Guarnizioni industriali e prodotti tessili per l'isolamento termico



Trecce in vetro



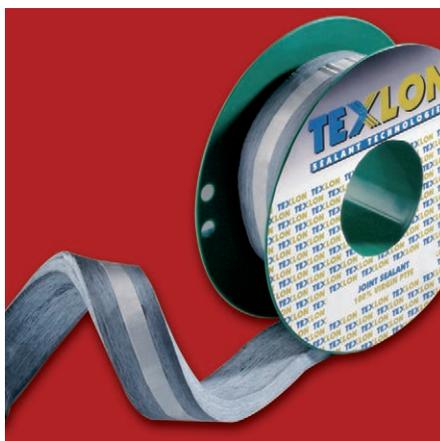
Copriavvola



Texlon piattina soffice



Guarnizioni in kepan



Texlon adesiva



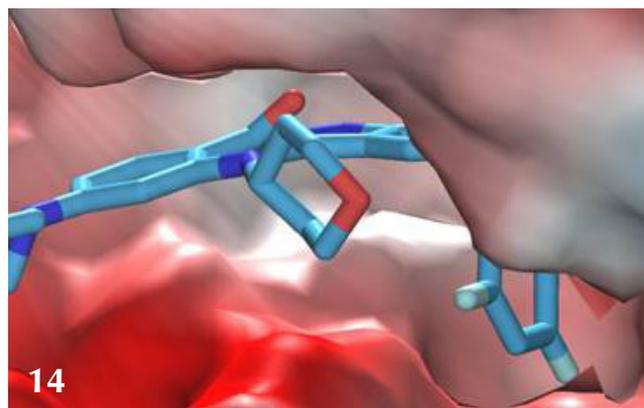
Metaltex

**TEXPACK®**

Richiedete il catalogo generale al nostro Customer Service

Texpack srl - unipersonale Via Galileo Galilei, 24 - 25030 Adro (BS) Italia  
Tel. +39 030 7480168 - Fax +39 030 7480201 - info@texpack.it - www.texpack.it

Copertina: per gentile concessione Nerviano Medical Sciences



### EDITORIALE

- 3** LA PRODUZIONE DI CRISTALLI:  
LA PIÙ GRANDE SFIDA PER L'INDUSTRIA  
Ferruccio Trifirò

### CHIMICA & AMBIENTE

- 8** LA CANAPA: UN MATERIALE  
INTERESSANTE PER IL TRATTAMENTO  
DELLE ACQUE CONTAMINATE DA METALLI  
Sonia Loiacono, Nadia Morin-Crini,  
Cesare Cosentino, Gilles Chanet, Peter  
Winterton, Giangiacomo Torri, Grégorio Crini

### CHIMICA & CRISTALLOGRAFIA

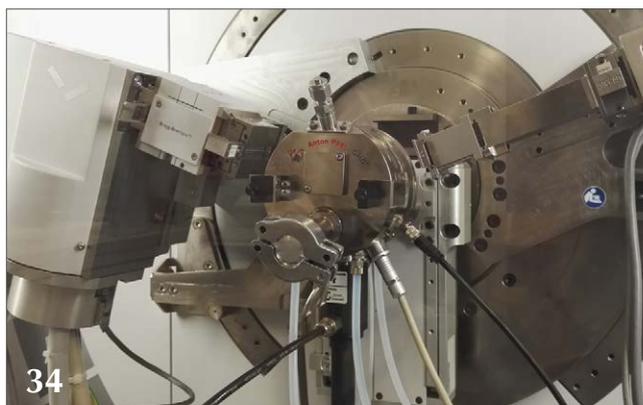
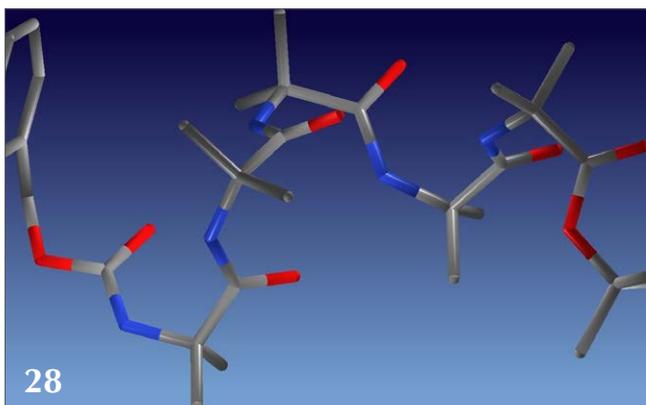
- 14** IL FARMACO VISTO AI RAGGI X  
Giulia Canevari, Marina Fasolini,  
Elena Casale
- 20** LA DIFFRAZIONE DEI RAGGI X  
PER L'ANALISI STRUTTURALE DEI  
MATERIALI POLIMERICI E OLTRE  
Claudio De Rosa, Finizia Auriemma
- 28** LA SFIDA DELLA SOLUZIONE  
STRUTTURALE DA POLVERI  
IN CRISTALLOGRAFIA  
Angela Altomare, Nicola Corriero,  
Corrado Cuocci, Aurelia Falcicchio,  
Anna Moliterni, Rosanna Rizzi,  
Michele Saviano

- 34** LA DIFFRAZIONE DI RAGGI X DA POLVERI  
E IL "PROBLEMA DELLA FORMA" IN  
CAMPO FARMACEUTICO  
Matteo Daldosso, Zadeo Cimarosti,  
Brigida Allieri

### CHIMICA & FOTOCHIMICA

- 40** NANOCRISTALLI DI SILICIO:  
UNA PIATTAFORMA FUNZIONALE  
PER LA COSTRUZIONE DI  
NANOSTRUTTURE IBRIDE PER  
LA CONVERSIONE DI ENERGIA  
Raffaello Mazzaro
- 48** PROCESSI FOTOCATALITICI VIA ANIONE  
DECATUNGSTATO PER LA SINTESI  
ORGANICA  
Luca Capaldo, Silvia Garbarino,  
Stefano Protti, Maurizio Fagnoni,  
Davide Ravelli
- 56** DETERMINAZIONE QUANTITATIVA  
DELLO STATO D'IBRIDIZZAZIONE  
DEL CARBONIO TRAMITE SPETTROSCOPIA  
DI ASSORBIMENTO A RAGGI X  
Filippo Mangolini, John Brandon McClimon,  
Robert W. Carpick

### CHIMICA & SPETTROSCOPIA



**DALLA LETTERATURA**  
**62** a cura di Silvia Cauteruccio e Monica Civera

**TECNOLOGIE INNOVATIVE**  
**64** a cura di Pierfausto Seneci

**LA CHIMICA ALLO SPECCHIO**  
**66** QUESTIONI DI SICUREZZA  
 Claudio Della Volpe



**DIRETTORE RESPONSABILE**  
 Ferruccio Trifirò

**REDAZIONE SCIENTIFICA**  
 Anna Simonini

Piazzale R. Morandi, 2 - 20121 Milano - tel. +39 345 0478088  
 anna.simonini@soc.chim.it

**COMITATO DI REDAZIONE**

Alessandro Abbotto, Nicola Cardellicchio, Martino Di Serio,  
 Daniele Donati, Matteo Guidotti, Oreste Piccolo, Anna Simonini,  
 Marco Taddia, Ferruccio Trifirò, Fiorenza Viani, Paolo Zanirato

**COMITATO SCIENTIFICO**

Angela Agostiano, Alberto Albinati, Vincenzo Barone,  
 Luigi Campanella, Sergio Carrà, Donatella Caruso,  
 Silvia Colombo, Gabriele Costantino, Gianluca Farinola,  
 Carla Isernia, Aldo Laganà, Francesco Paolucci, Italo Pasquon,  
 Francesco Luigi Pignataro, Raffaele Riccio, Adriana Saccone,  
 Elena Selli, Lucia Toniolo, Giovanni Villani

**HANNO COLLABORATO**

Silvia Cauteruccio, Monica Civera,  
 Claudio Della Volpe, Pierfausto Seneci

**PROGETTO GRAFICO E IMPAGINAZIONE**

Sara Moscardini - info@hamletcommunication.com - Skype: hamlet262

**CONCESSIONARIA DI PUBBLICITÀ**

Agicom Srl  
 Viale Caduti in Guerra, 28 - Castelnuovo di Porto (Roma)  
 Tel. +39 06 9078285, fax +39 06 9079256  
 agicom@agicom.it  
 Skype: agicom.advertising

**EDITORE**

PAS-SCI Srl  
 Roma

Reg. Tribunale di Milano n. 134 del 11/04/2017  
 ISSN 2283-544X



SONIA LOIACONO<sup>1,2</sup>, NADIA MORIN-CRINI<sup>1</sup>, CESARE COSENTINO<sup>3</sup>, GILLES CHANET<sup>4</sup>,  
PETER WINTERTON<sup>5</sup>, GIANGIACOMO TORRI<sup>3</sup>, GRÉGORIO CRINI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR CHRONO-ENVIRONNEMENT, UNIVERSITÀ DI BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ, BESANÇON

<sup>2</sup>UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA

<sup>3</sup>ISTITUTO G. RONZONI, MILANO

<sup>4</sup>EUROCHANVRE, ARC-LES-GRAY

<sup>5</sup>UNIVERSITÀ DI TOULOUSE

GREGORIO.CRINI@UNIV-FCOMTE.FR

# LA CANAPA: UN MATERIALE INTERESSANTE PER IL TRATTAMENTO DELLE ACQUE CONTAMINATE DA METALLI

*Da circa un trentennio, i prodotti di origine agroalimentare, come la canapa, suscitano un grande interesse per le loro numerose applicazioni in diversi campi industriali. Ciò nonostante, in campo ambientale non esistono ancora applicazioni reali. Con questo studio si propone l'utilizzo di feltri a base di fibra di canapa per la decontaminazione delle acque dai metalli.*



In Europa, dagli inizi del XXI secolo con l'attuazione della "Direttiva Quadro sulle Acque - DQA del 2000" (Direttiva 2000/60/CE), è stato necessario migliorare le metodiche di decontaminazione delle acque; ciò ha portato alla realizzazione di tecnologie ecologiche e poco dispendiose in termini di energia. Una delle tecniche di recente utilizzo, per il trattamento delle acque, è il bio-adsorbimento mediante l'utilizzo di sostanze naturali [1]. Il bio-adsorbimento è una tecnica di separazione solido-liquido che si avvale, mediante un meccanismo fisico e/o chimico, dell'af-

finità delle sostanze in soluzione per la superficie del materiale solido (bio-adsorbente). I materiali convenzionalmente usati per questo tipo di trasferimento di massa sono carboni attivi; ma negli ultimi anni sono stati proposti ed utilizzati nuovi materiali provenienti da vegetali (fibre vegetali, coprodotti agroalimentari), esopolimeri di origine marina, microorganismi e biomasse. Le sostanze naturali sono ritenute molto interessanti per diversi motivi: sono risorse abbondanti, rinnovabili, biodegradabili, biocompatibili, realizzabili in molti Paesi, sono facili da manipolare e hanno un basso costo. Non meno importante, non essendo prodotti sintetici, il loro utilizzo non pregiudica la salute umana (essendo derivati da vegetali o animali) a differenza delle formulazioni di origine petrolifera, le quali possono avere un certo grado di tossicità. Le risorse agroalimentari sono molto interessanti anche per la loro struttura macromolecolare (polisaccaridi con molti gruppi chimicamente reattivi) che permette una grande versatilità nella preparazione di nuovi materiali. Tra le varie risorse, in questi ultimi anni, la canapa ha suscitato un grande interesse in Europa (la Francia è il primo produttore) per le sue numerose applicazioni e la facilità di coltivazione.

Questo studio è stato presentato al XV Convegno Scuola sulla Chimica dei Carboidrati (Certosa di Pontignano, Siena, 19-22 giugno 2016).



### La materia prima: la canapa

La canapa (*Cannabis sativa*), che fa parte della famiglia delle Cannabinaceae, è una pianta originaria dell'Asia Orientale ed è conosciuta da più di 2500 anni; già i Fenici usavano vele di canapa per le loro imbarcazioni. È una pianta annuale, a ciclo di sviluppo molto corto (110-130 giorni), composta da fibre e semi ricchi di olio, la sua coltura possiede numerosi vantaggi. È una pianta rustica (con caratteristiche di pianta selvatica), che cresce in ogni condizione e si adatta bene a quasi tutti i climi in Europa, non necessita, inoltre, di pesticidi. La sua coltura è anche interessante per gli agricoltori, in quanto, come le patate, è una tipica coltura da rinnovo e presenta un buon rendimento. Le sue fibre sono però molto resistenti e questo può ostacolare la raccolta. La canapa può essere coltivata per due scopi principali: per i semi e per la paglia. Dai primi si estrae l'olio per uso alimentare, per la fabbricazione di vernici poco tossiche, per uso dermatocostetico (fabbricazione di saponi, creme e olii), etc. Dalla paglia si ottengono fibre tessili, stoppa e legno. Importanti settori di utilizzo sono il campo edilizio, dove viene impiegata come isolante o come materiale di costruzione, la sintesi di altri materiali (automobili e plasturgia), il tessile, la carta, il giardinaggio e l'allevamento. Non esistono però ancora applicazioni reali in campo ambientale anche se in letteratura sono stati pubblicati, da circa dieci anni, risultati ottenuti con le fibre di canapa [1].

Le fibre della canapa sono costituite principalmente da cellulosa ed emicellulosa, e da altre sostanze estraibili (lignina, proteine, pectine, cere, etc.) che contengono diverse funzioni chimiche: acidi carbossilici, gruppi idrossilici, composti aromatici, fenoli, eteri, etc.

Il gruppo di ricerca di Besançon studia da più di vent'anni l'utilizzo di sostanze naturali (amidi, ciclodestrine, cellulosa, alginati e canapa) per la salvaguardia dell'ambiente; in particolare si occupa del trattamento di acque contaminate, in collaborazione con l'Istituto G. Ronzoni di Milano, il quale è specializzato nella caratterizzazione di fibre naturali e sintetiche. In questo studio proponiamo, per la prima volta, l'utilizzo di feltri a base di fibra di canapa per la decontaminazione delle acque dai metalli, la cosiddetta decontaminazione terziaria delle acque. I nostri feltri sono stati preparati mediante un processo di pressatura e asciugatura rapida delle fibre di canapa mescolate in maniera aggrovigliata: la loro fabbricazione è stata realizzata mediante



Fig. 1 - Feltro di canapa realizzato da una cooperativa agricola regionale (EUROCHANVRE, Arc-les-Gray, France)

agugliatura meccanica, senza aggiunta di collanti o leganti chimici e lo spessore del feltro ottenuto è di 5 mm. La fibra di partenza è costituita da cellulosa (75%), emicellulosa (15%), lignina (3%), proteine (0,7%), pectine (0,5%) cere (4%), ceneri (0,5%) e altre sostanze estraibili (Fig. 1).

### Prove di adsorbimento: soluzioni monocontaminate

Per stabilire l'affinità della canapa con i differenti metalli, gli studi preliminari sono stati effettuati in esperimenti di equilibrio soluzione/adsorbente utilizzando soluzioni contenenti un singolo potenziale, contaminate utilizzando 6 metalli bivalenti (Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Zn) salificati come solfati, e partendo da una concentrazione iniziale di metallo di 100 mg/L (Ci) in acqua osmotica (pH 5). Abitualmente questa concentrazione di metalli la riscontriamo nelle acque reflue industriali non ancora chiarificate. Fissata la concentrazione della soluzione, è stata fatta variare la massa del filtro partendo da 2 g/100 ml fino a 0,25 g/100 ml. Successivamente, è stata fatta variare anche la Ci dei metalli in soluzione. Il tempo di contatto è stato fissato a 1 h, T di 20 °C, velocità di agitazione 250 rpm (condizioni preliminari). I risultati mostrati sono i valori medi calcolati su tre esperimenti. I risultati mostrano che per le masse più elevate del feltro, si può ottenere l'assorbimento dei metalli nell'ordine dell'80%. Considerando che questo è osservato per soluzioni diluite, il dato evidenzia la forte affinità della canapa per i metalli. L'ordine di adsorbimento dei metalli rimane costante (Cu>Cd>Zn>Ni>Co>Mn) per ogni concentrazione esaminata. La percentuale di adsorbimento è inversamente proporzionale alla concentrazione della

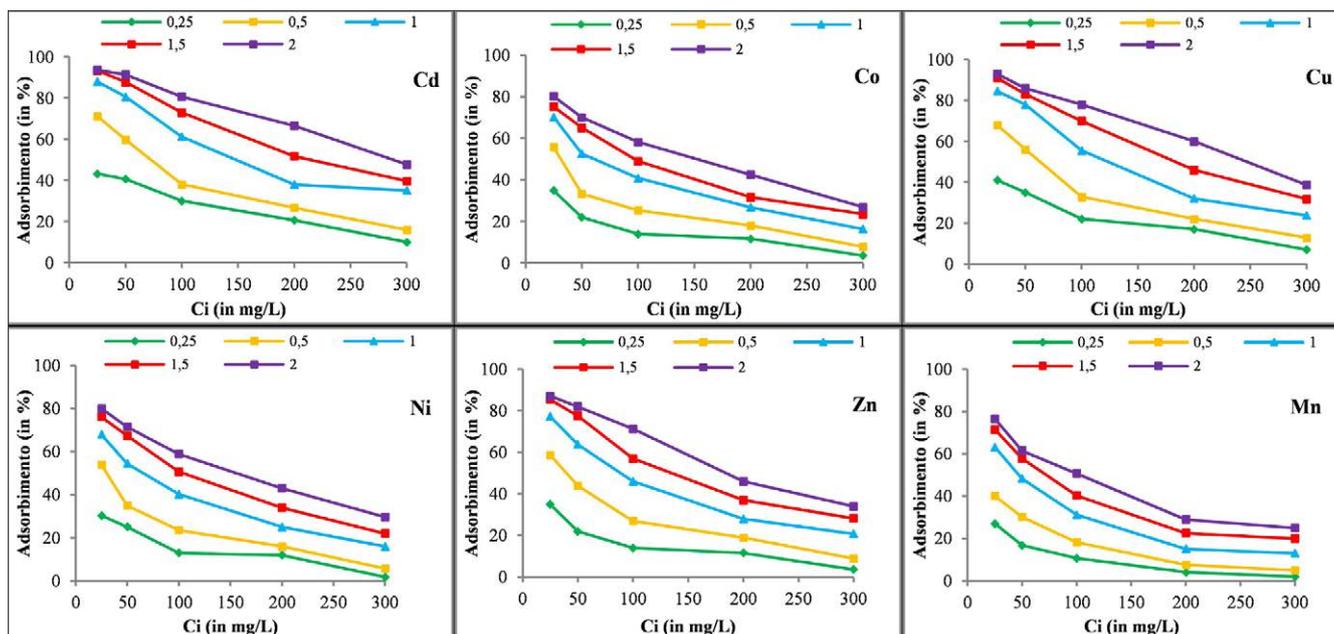


Fig. 2 - Variazione dell'adsorbimento in funzione della concentrazione iniziale (Ci) in soluzione monocontaminata facendo variare la massa del feltro. I tracciati sono a valori crescenti di massa del filtro

soluzione e direttamente proporzionale alla massa di feltro utilizzata. In particolare, il cadmio ed il rame presentano l'affinità maggiore per la canapa (Fig. 2). Da questi dati si può evincere che uno dei fattori principali che rendono affine il metallo al feltro è l'elettronegatività degli ioni in soluzione. È inoltre vero che, se la massa del metallo è maggiore, il suo adsorbimento sarà facilitato, perché la probabilità di collisione del metallo con il polimero è più alta. Infine, la capacità di adsorbimento dei polisaccaridi è favorita per i cationi con un più ampio raggio ionico (Tab. 1).

### Prove di adsorbimento: soluzioni policontaminate

Una volta caratterizzato l'andamento della concentrazione dei singoli metalli in soluzione, si è operato, sempre utilizzando l'equilibrio soluzione/adsorbente, con una soluzione contenente i 6 metalli (soluzione policontaminata) per valutare l'efficienza del feltro di canapa nel caso di presenza contemporanea di più sostanze in soluzione. Partendo da una medesima concentrazione per

ogni metallo di 16,66 mg/L, per un totale di circa 100 mg/L, e utilizzando le stesse condizioni (massa di canapa 1 g, pH 4,9-5,2, tempo 1 h,  $t=20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e

	Cu	Cd	Zn	Ni	Co	Mn
Elettronegatività di Pauling	1,9	1,7	1,6	1,8	1,8	1,5
Massa molare (g/mol)	63,54	112,41	65,39	58,69	58,9	54,93
Raggio ionico (pm)	72(+2)	97(+2)	74(+2)	69(+2)	63(+2)	46(+2)

Tab. 1 - Principali caratteristiche dei metalli in esame

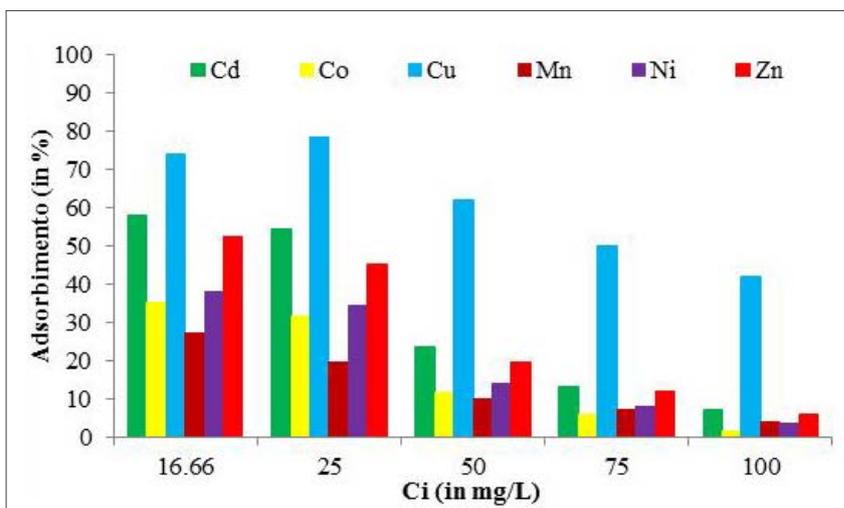


Fig. 3 - Variazione dell'assorbimento in funzione della concentrazione iniziale (Ci) in soluzione policontaminata (le concentrazioni in grafico si intendono per ogni metallo)

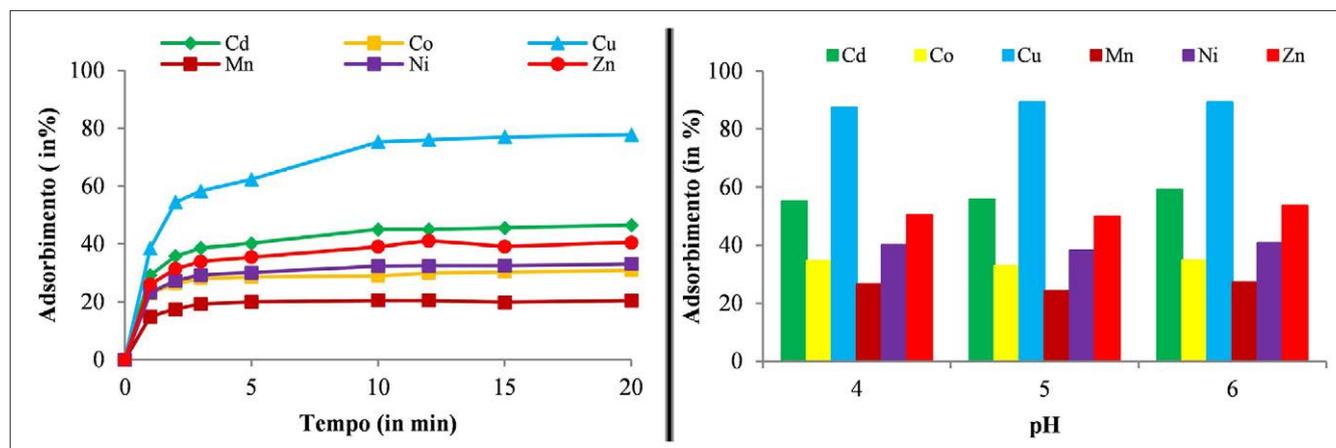


Fig. 4 - a) cinetica di assorbimento (a sinistra), b) influenza del pH (a destra)

velocità di agitazione 250 rpm), abbiamo stavolta fatto variare la concentrazione iniziale  $C_i$  della soluzione fino a 100 mg/L (600 mg/L di metalli totali in soluzione).

Dai risultati riportati in grafico (Fig. 3), si può notare che, anche aumentando la concentrazione della soluzione in esame, il feltro di canapa funziona molto bene, per questo intervallo di concentrazione. In effetti anche a dosaggi piuttosto alti (nell'ordine di 150 mg/L di metalli totali in soluzione), abbiamo un assorbimento che va dal 78% per il rame e fino al 30% e non meno del 20% per ciascun metallo. Inoltre, a concentrazioni più basse (inferiori a 10 mg/L), i metalli sono quasi totalmente assorbiti (dati non presenti in figura). Variando la concentrazione dei metalli, possiamo notare come essi seguano sempre lo stesso ordine di adsorbimento; importante è notare come, man mano che aumenta la concentrazione dei metalli, diminuisce drasticamente il loro assorbimento ad eccezione del cadmio a bassa concentrazione e particolarmente del rame. Nel caso specifico del rame, anche ad alte concentrazioni (100 mg/L), la canapa riesce ad assorbire il 50% della sostanza in soluzione, quando invece gli altri metalli in soluzione vengono eliminati in bassissima percentuale (circa 2-7%). Usando una massa di feltro più grande le percentuali di adsorbimento aumentano quasi proporzionalmente, questo dimostra la grande capacità della canapa di decontaminare soluzioni acquose dai metalli a qualunque concentrazione.

Successivamente, abbiamo fatto variare il tempo di contatto nello studio in batch, per valutare il tempo di adsorbimento all'equilibrio, fattore rilevante per una futura applicazione a livello industriale. I risul-

tati riportati in figura, mostrano che l'assorbimento è uniforme e rapido, si può notare che l'assorbimento dei metalli i) aumenta rapidamente nei primi minuti (l'incremento è dovuto ad una rapida interazione fra i metalli e la superficie di contatto del materiale), ii) aumenta gradualmente man mano che raggiunge l'equilibrio, per iii) rimanere poi costante (plateau di saturazione) (Fig. 4a). Il dato interessante è che la cinetica è molto rapida, 10 minuti sono sufficienti per raggiungere l'equilibrio di adsorbimento per i sei metalli in soluzione. Risultati simili sono stati ottenuti anche per le soluzioni monocontaminate. Un altro risultato molto interessante è che l'assorbimento è indipendente dal pH nel range tra 4 e 6 (Fig. 4b), valore di pH ritrovato nelle acque industriali sopracitate.

In tutte le condizioni studiate, il rame e il cadmio presentano una più alta affinità per il feltro di canapa rispetto agli altri e questo risultato viene confermato anche negli esperimenti fatti sulle soluzioni monocontaminate. Ciò può essere dovuto alla competizione dei siti disponibili in base alla struttura chimica dell'elemento; un gioco di equilibri fra elettronegatività, massa molecolare, raggio ionico, potrebbero giustificare la peculiarità del comportamento in soluzione mista. In effetti, altri gruppi come quello rumeno di Paduraru [2, 3], serbo di Kostic [4, 5] e greco di Kyzas [6], nei loro studi sull'assorbimento di metalli simili a quelli utilizzati dal nostro gruppo, ma in soluzione monocontaminata e usando fibre di canapa semplici, hanno proposto delle interpretazioni simili. Tuttavia, bisogna anche dire che, le sole considerazioni sulle caratteristiche chimiche dei metalli, non sono sufficienti per spiegare la selettività del meccanismo di adsorbimento;

nel quale la natura del bio-adsorbente (struttura chimica, composizione) e le condizioni sperimentali giocano ugualmente un ruolo importante, soprattutto perché nel nostro caso, non si tratta di fibre semplici, ma di feltri confezionati a partire da queste, quindi i metalli potrebbero essere adsorbiti non solo in superficie, ma anche all'interno della struttura della nostra matrice. Per avere delle conferme sulle nostre supposizioni sono in fase di studio analisi specifiche (NMR, microscopia, EDS) più approfondite sulla struttura del nostro feltro prima e dopo le prove di adsorbimento. Abbiamo ottenuto anche delle buone percentuali di resa nei primi studi fatti in laboratorio su reali effluenti.

In conclusione possiamo dire che i feltri a base di canapa potrebbero essere un'ottima risorsa in campo ambientale per la decontaminazione delle acque reflue dell'industria metallurgica. I vantaggi dell'utilizzo di questo materiale sono, non solo le sue proprietà di complessazione, ma anche il loro basso costo (0,50 euro al chilogrammo) e la possibilità di rigenerazione, poichè le interazioni metallo-feltro sono deboli; possono inoltre essere bruciati come fonte di energia alternativa e per il recupero dei metalli adsorbiti.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] G. Crini, P.M. Badot, *Sorption Processes and Pollution*, Presses Universitaires de Franche-Comté, Besançon (F), 2010.
- [2] L. Tofan *et al.*, *Applied Surface Science*, 2013, **285P**, 33.
- [3] C. Paduraru, L. Tofan, *EEMJ*, 2008, **7**, 687.
- [4] M. Vukcevic *et al.*, *Fibers and Polymers*, 2014, **15**, 687.
- [5] B.M. Pejic *et al.*, *Chemical Engineering Journal*, 2011, **172**, 354.
- [6] G. Kyzas *et al.*, *Journal of Molecular Liquids*, 2015, **209**, 209.

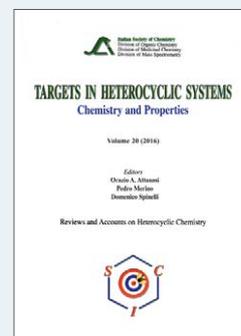
### Hemp: an Interesting Material for Metals Removal from Polycontaminated Solutions

Natural fiber-based materials such as hemp are reality since thirty years for their numerous applications. However, applications in the environmental domain are scarce. In this study, we investigated, for the first time, the potential of using a hemp-based felt as adsorbent material for removing metals from synthetic solutions with multiple contaminants.

## LIBRI E RIVISTE SCI

### Targets in Heterocyclic Systems Vol. 20

È disponibile il 20° volume della serie "Targets in Heterocyclic Systems", a cura di Orazio A. Attanasi, Pedro Merino e Domenico Spinelli  
[www.soc.chim.it/it/libri\\_collane/ths/vol\\_20\\_2016](http://www.soc.chim.it/it/libri_collane/ths/vol_20_2016)



Sono disponibili anche i volumi 1-19 della serie.

I seguenti volumi sono a disposizione dei Soci gratuitamente, è richiesto soltanto un contributo spese di € 10:

- G. Scorrano "La Storia della SCI", Edises, Napoli, 2009 (pp. 195)
- G. Scorrano "Chimica un racconto dai manifesti", Canova Edizioni, Treviso, 2009 (pp. 180)
- AA.VV. CnS "La Storia della Chimica" numero speciale, Edizioni SCI, Roma 2007 (pp. 151)
- AA.VV. "Innovazione chimica per l'applicazione del REACH" Edizioni SCI, Milano, 2009 (pp. 64)

Oltre "La Chimica e l'Industria", organo ufficiale della Società Chimica Italiana, e "CnS - La Chimica nella Scuola", organo ufficiale della Divisione di Didattica della SCI ([www.soc.chim.it/riviste/cns/catalogo](http://www.soc.chim.it/riviste/cns/catalogo)), rilevante è la pubblicazione, congiuntamente ad altre Società Chimiche Europee, di riviste scientifiche di alto livello internazionale:

- ChemPubSoc Europe Journal
- Chemistry A European Journal
- EURJOC
- EURJIC
- ChemBioChem
- ChemMedChem
- ChemSusChem
- Chemistry Open
  
- ChemPubSoc Europe Sister Journals
- Chemistry An Asian Journal
- Asian Journal of Organic Chemistry
- Angewandte Chemie
- Analytical & Bioanalytical Chemistry
- PCCP, Physical Chemistry Chemical Physics

**Per informazioni e ordini telefonare in sede,  
06 8549691/8553968,  
o inviare un messaggio a [manuela.mostacci@soc.chim.it](mailto:manuela.mostacci@soc.chim.it)**

QUANDO FINISCE IL SUV,  
COMINCIA STELVIO.



## ALFA ROMEO STELVIO

Val. Max. consumi ciclo combinato (l/100 km) 7. Emissioni CO<sub>2</sub> (g/km) 161.

*La meccanica delle emozioni*

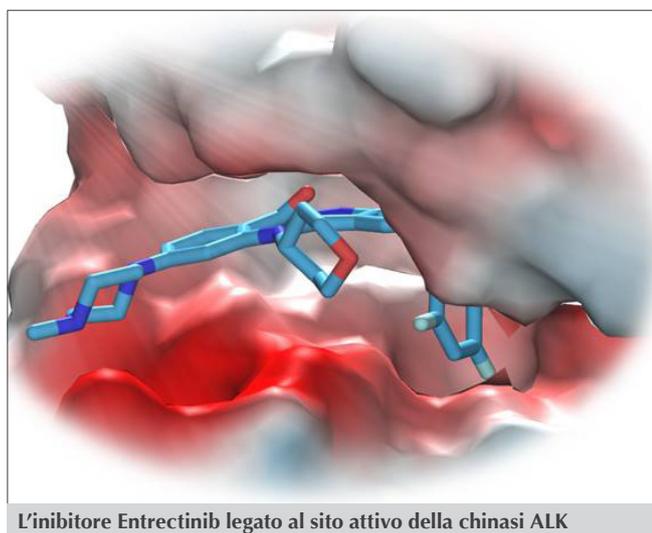




GIULIA CANEVARI, MARINA FASOLINI, ELENA CASALE  
DIPARTIMENTO DI CHEMICAL CORE TECHNOLOGIES  
NERVIANO MEDICAL SCIENCES SRL, NERVIANO (MI)  
ELENA.CASALE@NERVIANOMS.COM

## IL FARMACO VISTO AI RAGGI X

*Non solo chimica e biologia, anche la cristallografia ha un ruolo chiave nella progettazione di nuovi farmaci. La conoscenza dettagliata delle interazioni tra la proteina bersaglio e il suo legante facilita il drug design, aumentando la probabilità di successo in molte fasi del processo di drug discovery.*



L'inibitore Entrectinib legato al sito attivo della chinasi ALK

A più di mezzo secolo dalle sue prime applicazioni in campo biologico, la cristallografia a raggi X rimane la tecnica d'elezione per ottenere un modello a risoluzione atomica della struttura tridimensionale di macromolecole d'interesse biologico, siano esse acidi nucleici, proteine, complessi multiproteici o virus. Le informazioni strutturali ottenute con questa metodologia, non solo hanno aiutato a rivelare e comprendere la complessità dei sistemi biologici, ma hanno anche contribuito alla scoperta e allo sviluppo di numerosi farmaci, con l'avvento del cosiddetto Structure-Based Drug Design (SBDD). Avere a disposizione un modello dettagliato della macromolecola bersaglio (*drug target*, nella maggior parte dei casi una proteina) in forma libera o in complesso con piccole molecole (ad esempio cofattori, substrati o inibitori) permette di capire dove e come i leganti interagiscano con il target, fornendo prezio-

se indicazioni per la progettazione di un farmaco. Le prime strutture cristallografiche di proteine risalgono agli anni Cinquanta e Sessanta, con i pionieristici lavori di Kendrew (struttura della mioglobina, 1958) [1] e Perutz (struttura dell'emoglobina, 1960) [2]. Tuttavia, la mancanza di opportuni supporti sperimentali e computazionali ha inizialmente rallentato lo sviluppo applicativo della tecnica, il cui utilizzo nella ricerca farmaceutica risale a poco più di una trentina di anni fa. I primi successi dello SBDD risalgono alla fine degli anni Ottanta, con lo sviluppo di inibitori delle proteasi dell'HIV [3]; pochi anni dopo nascono compagnie biotech come Vertex, Syrrx e Astex che puntano principalmente su questo approccio per l'identificazione di nuovi farmaci. Oggi la cristallografia di proteine è comunemente utilizzata nell'industria farmaceutica e si può considerare parte integrante del processo di sviluppo di un farmaco (*drug discovery*).

### Legenda

ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
cryo-EM	Crio-Microscopia Elettronica
FBDD	Fragment Based Drug Design
HTS	High-Throughput Screening
MAD	Multiple Anomalous Dispersion
MIR	Multiple Isomorphous Replacement
MR	Molecular Replacement
NMR	Risonanza Magnetica Nucleare
PDB	Protein Data Bank
SAD	Single Anomalous Diffraction
SAR	Relazione Attività-Struttura
SBDD	Structure-Based Drug Design
SPR	Risonanza Plasmonica Superficiale



## La determinazione della struttura cristallografica

Per determinare la struttura è necessario innanzitutto ottenere i cristalli della proteina di interesse; questo è purtroppo ancora oggi il “collo di bottiglia” di tutto il processo (Fig. 1). Nella fase di cristallizzazione, si devono identificare le condizioni chimico-fisiche che riducono la solubilità della proteina e ne favoriscono il passaggio dalla soluzione allo stato solido “cristallino”. Il processo è strettamente empirico e consiste nel testare (per esempio mediante la tecnica della diffusione di vapore) numerose condizioni in cui vengono variati parametri come precipitante, tampone, pH e temperatura. Il successo è legato alla qualità della macromolecola da cristallizzare, che deve essere pura ed omogenea (ovvero avere per esempio lo stesso stato di fosforilazione, oligomerizzazione etc.). Non sempre è possibile ottenere cristalli della proteina intera (full length) perché troppo flessibile ed è quindi necessario lavorare con forme troncate o mutate (costrutti) o con singoli domini. Le variabili coinvolte sono numerose e la cristallizzazione può richiedere tempi molto lunghi; i progressi tecnologici degli ultimi decenni hanno in parte velocizzato il processo aumentandone le probabilità di successo. Lo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante ha, per esempio, reso disponibili metodi e strumentazioni che permettono il clonaggio, l'espressione e la purificazione di diversi costrutti, che possono essere testati in parallelo. In fase di cristallizzazione, sono oggi disponibili kit commerciali di soluzioni precipitanti (sparse matrix screens) e vengono impiegati sistemi automatizzati che consentono di disegnare e preparare centinaia di prove di cristallizzazione utilizzando quantità minime di campione.

Nel processo SBDD è importante ottenere cristalli della proteina legata con più ligandi. I complessi possono essere preparati per cocrystallizzazione (aggiungendo l'inibitore alla proteina in soluzione e cristallizzando il complesso) o per soaking (immergendo i cristalli della proteina nativa in una “soluzione madre” contenente il ligando). Per entrambi i metodi è comunque cruciale identificare una condizione di cristallizzazione robusta e facilmente riproducibile, in quanto spesso è necessario determinare decine di strutture.

Ottenuti i cristalli, la fase successiva è quella della raccolta dei dati di diffrazione. A questo scopo, i cristalli sono congelati in azoto liquido per ridurre il danneggiamento causato dalla radiazione e ottenere quindi dati a più alta risoluzione.

La raccolta dei dati è oggi effettuata principalmente utilizzando la radiazione di sincrotrone, che ha il vantaggio di essere molto intensa (migliaia di volte in



Fig. 1 - Le fasi della determinazione della struttura cristallografica in un processo di SBDD

più rispetto alle sorgenti di laboratorio) e modulabile (ovvero è possibile scegliere la lunghezza d'onda del fascio, cosa utile per esempio per gli esperimenti di dispersione anomala MAD, Multiple Anomalous Dispersion). I sincrotroni di ultima generazione producono un fascio di raggi X estremamente brillante e focalizzato, che permette l'analisi di cristalli anche molto piccoli (poche decine di micron di lato) e sono equipaggiati con sistemi automatizzati per il montaggio dei cristalli e con rivelatori molto veloci, che permettono la raccolta di un set di dati in pochi minuti.

Le immagini di diffrazione sono costituite da una serie di riflessi, per ciascuno dei quali è possibile misurare l'intensità  $I(hkl)$ , che è proporzionale al quadrato del modulo del fattore di struttura  $F(hkl)$ . Quest'ultimo è una quantità complessa (dotata cioè di modulo e fase) da cui è possibile risalire alla densità elettronica del cristallo mediante anti-trasformata di Fourier. Per eseguire quest'operazione, però, non è sufficiente conoscere il modulo di  $F(hkl)$ , ma è necessario anche ricavarne la fase, incognita. Per la soluzione del problema della fase sono stati sviluppati diversi approcci. Se si ha a disposizione la struttura di una proteina simile a quella di interesse, si può utilizzare il metodo del Molecular Replacement (MR): mediante l'uso di funzioni di rotazione e traslazione, il modello viene posizionato all'interno della cella elementare del cristallo e poi utilizzato per calcolare le fasi e la mappa di densità

elettronica. In assenza di un modello di partenza, si utilizzano metodi che sfruttano lo scattering anomalo osservato per alcuni elementi chimici; ad esempio, il Multiple Isomorphous Replacement (MIR) richiede di raccogliere dati dal cristallo nativo e in complesso con più atomi pesanti. Il Single Anomalous Diffraction (SAD) sfrutta il segnale dello zolfo, mentre il MAD prevede la raccolta di più dataset a diverse lunghezze d'onda e può richiedere l'inserimento di seleniomietionine all'interno della proteina.

Una volta ottenuta la mappa di densità elettronica, si costruisce un modello iniziale che è poi migliorato mediante cicli iterativi d'affinamento e ricostruzione per migliorare l'accordo tra il modello e i dati sperimentali.

Per l'analisi dei dati cristallografici sono oggi disponibili software molto efficienti, che hanno permesso una notevole automatizzazione del processo.

Testimone della straordinaria evoluzione della tecnica nel tempo è la "Protein Data Bank" (PDB, la banca dati che raccoglie le coordinate e i dati di diffrazione di tutte le strutture macromolecolari pubblicate), che, alla fine del 2016, contava più di 112.000 strutture depositate, di cui circa l'80% nell'ultimo decennio.

Lo sviluppo tecnologico ha rappresentato un enorme vantaggio anche per la drug discovery; oggi è possibile acquisire i dati di diffrazione e risolvere la struttura in poche ore, direttamente dal computer del proprio ufficio, collegandosi in remoto ad un sincrotrone. Il chimico farmaceutico può quindi apprendere, entro pochi giorni dalla sua sintesi, come un inibitore si lega al target, consentendone l'ottimizzazione per cicli di sintesi e feedback strutturistico, quasi "in tempo reale".

## Il contributo della cristallografia di proteine nel processo di drug discovery

La scoperta di un farmaco è un percorso lungo e complesso che nasce dalla sinergia di diverse competenze e tecnologie. Tutto comincia con l'identificazione del bersaglio biologico (target identification). Mediante saggi biochimici *in vitro*, si testano poi diverse librerie di composti chimici (High-Throughput Screening, HTS) e si identificano i primi "hits", ovvero composti dotati di una minima attività biologica nei confronti del bersaglio (hit identification). La fase successiva consiste nell'ottimizzazione chimica degli "hits" per ottenere il "lead", ovvero una molecola, all'interno di una classe chimica profilata per relazione tra struttura e attività (SAR), con una buona attività biologica e un profilo di selettività e tossicità accettabili (lead identification). Livelli successivi di ottimizzazione chimica,

finalizzati a migliorare le caratteristiche farmacodinamiche, metaboliche e tossicologiche trasformano poi il lead in quello che sarà il potenziale farmaco (lead optimization).

La cristallografia può contribuire a tutte queste fasi, ma senza dubbio il suo impatto è maggiore negli stadi iniziali. Idealmente sarebbe desiderabile ottenere i cristalli della proteina target il più presto possibile, addirittura in fase di validazione del bersaglio molecolare. La struttura tridimensionale può rivelare, infatti, se il target è "druggable" ovvero se esistano delle cavità (sito attivo, tasche allosteriche, interfacce proteina-proteina) che sono accessibili e adatte a legare un inibitore, o se vi siano elementi strutturali che permettano di ottenere selettività. Questo aspetto non è da trascurare, soprattutto quando il bersaglio appartiene a una famiglia di proteine strutturalmente simili, come per esempio le chinasi.

Conoscendo la struttura, si possono identificare inibitori utilizzando metodi computazionali: disegnare molecole che si legano in modo simile a leganti naturali o comunque noti (rational drug design) oppure effettuare uno screening virtuale di librerie chimiche (virtual screening) e, in base a calcoli modellistici, selezionare un numero ristretto di molecole a cui dare priorità di valutazione in test biologici.

Al termine della campagna HTS, ottenere la struttura della proteina bersaglio legata ai diversi hits identificati può facilitare le scelte dei chimici farmaceutici. L'impatto è tanto maggiore quante più strutture cristallografiche si hanno a disposizione e quanto più strutturalmente diversi fra loro sono gli hits. Le informazioni che si possono ottenere dalla comparazione di più strutture cristallografiche sono molteplici. È possibile caratterizzare in maniera dettagliata il sito di legame rivelando gli amminoacidi chiave per l'interazione con la molecola bioattiva e quelli potenzialmente importanti per modulare affinità e selettività. A volte l'interazione con un legante può indurre dei cambiamenti conformazionali della proteina non facilmente prevedibili e che possono offrire nuove opportunità. Un esempio sono gli inibitori chinasi di tipo II, molecole che si legano alla proteina che si trova in una conformazione inattiva, definita "DFG out" [4]. Interagendo con zone diverse della proteina questi composti possono avere potenze e profili di selettività differenti rispetto agli inibitori che occupano solo il sito attivo (inibitori di tipo I). L'Imatinib (Glivec), primo farmaco inibitore di chinasi messo sul mercato per la cura della leucemia mieloide cronica è appunto un inibitore di tipo II [5].

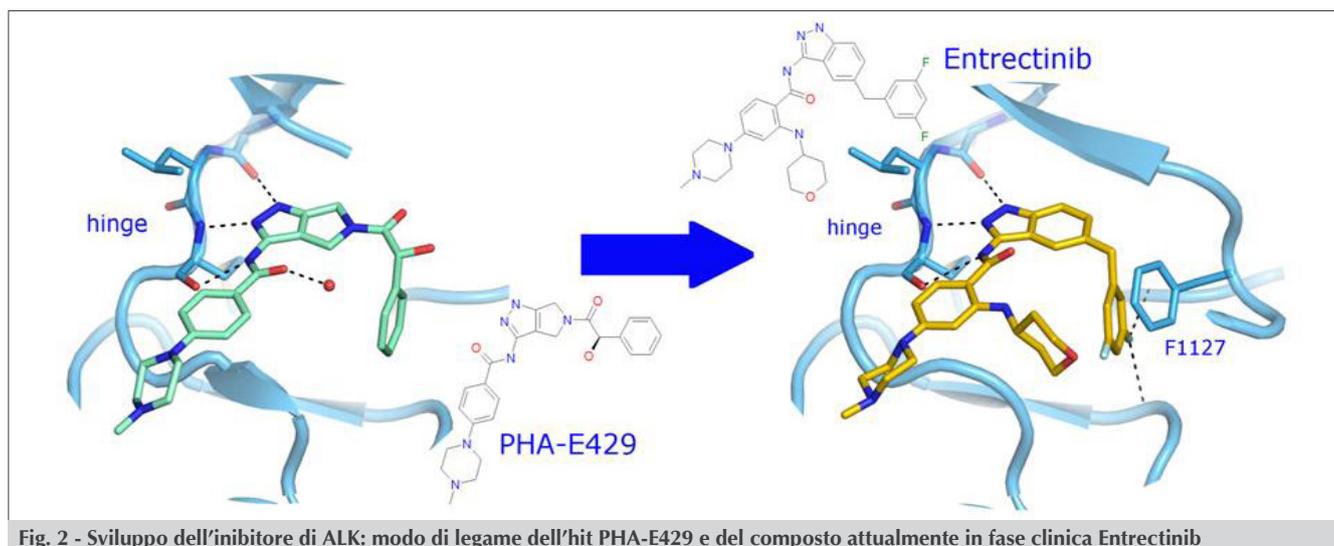


Fig. 2 - Sviluppo dell'inibitore di ALK: modo di legame dell'hit PHA-E429 e del composto attualmente in fase clinica Entrectinib

Da un punto di vista più strettamente chimico, la disponibilità di dati strutturali facilita la comprensione della relazione tra struttura e attività (SAR) in quanto permette di identificare i gruppi funzionali dell'inibitore (donatori o accettori di legame idrogeno, superfici lipofile, sostituenti aromatici) responsabili dell'attività biologica. Queste informazioni, unite a valutazioni di fattibilità chimica, contribuiscono alla selezione degli hit che inizieranno il percorso di ottimizzazione per divenire il futuro farmaco.

Il supporto strutturale continua nelle fasi di hit e lead optimization in modo interattivo e a stretto contatto con il chimico medicinale. Le nuove molecole sintetizzate sono cristallizzate e, basandosi sui dati SAR e SBDD, si identificano i gruppi che possono essere modificati per migliorare inizialmente le caratteristiche di potenza e selettività o, in fase finale, quelle farmacocinetiche o metaboliche.

È opportuno sottolineare che la caratterizzazione strutturale del sito di legame permette anche la progettazione di inibitori di seconda generazione in grado di legare forme mutate del target resistenti (poco affini) al farmaco.

In un processo SBDD è importante ottenere cristalli che diffrangano ad una buona risoluzione ( $\leq 2,0$ - $2,5$  Å). Avendo a disposizione un modello atomico ad alta risoluzione non solo si determinano in modo accurato le interazioni tra legante e residui amminoacidici (distanze di legami idrogeno o interazioni Van der Waals) ma è anche possibile visualizzare la presenza di molecole d'acqua strutturali, legate alla proteina. Queste possono mediare le interazioni tra la molecola bioattiva e il target, quindi contribuire alla sua affinità. L'opportuna modifica dell'inibitore con gruppi funzionali che mimano le interazioni delle molecole di acqua può portare un miglioramento della sua potenza.

Questo tipo di analisi è stato utile per l'identificazione di inibitori della proteina chinasi ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), progetto sviluppato in Nerviano Medical Sciences (NMS) che riportiamo come esempio di approccio SBDD [6]. Mutazioni attivanti o traslocazioni di ALK sono responsabili dell'insorgenza di diversi tipi di tumore, come ad esempio il linfoma a grandi cellule anaplastico e il tumore del polmone non a cellule piccole (NSCLC). Oggi ALK è un target validato, per il quale sono stati sviluppati diversi inibitori, alcuni di questi (crizotinib e alectinib) già approvati dalle autorità regolatorie statunitensi (FDA). Quando il progetto ALK ha avuto inizio in NMS non erano noti né inibitori di questa proteina né la sua struttura cristallografica. Una campagna di screening della collezione di molecole sintetiche proprietarie ha permesso di identificare alcuni hit, tra cui i più promettenti sono stati i composti 3-ammino indazoli. Parallelamente sono iniziate le prove per ottenere i cristalli del dominio chinasi di ALK. L'identificazione delle condizioni di cristallizzazione non è stata facile; dopo numerosi tentativi, utilizzando diversi costrutti, la strategia vincente è risultata essere quella di co-purificare la proteina in presenza dell'inibitore d'interesse. Questo approccio ci ha permesso di ottenere la struttura ad alta risoluzione di ALK in complesso sia con inibitori della classe chimica degli indazoli sia con altri hit emersi dallo screening. Tutti i composti si legano al sito attivo della chinasi in modo competitivo rispetto al legante naturale (ATP), formano due o tre legami a idrogeno chiave con la regione della "hinge region" (una breve sequenza di amminoacidi che funge da "cardine" tra i due lobi delle chinasi) e si estendono all'interno della tasca, dando luogo ad un network di interazioni, polari e non polari, con i residui del sito attivo. In parti-

colare, la struttura di ALK in complesso con l'inibitore PHA-E429 (Fig. 2) ha rivelato la presenza di una molecola d'acqua nella regione normalmente occupata dalla parte zuccherina dell'ATP, legata mediante un ponte a idrogeno con il composto. Questo dettaglio ha suggerito che l'introduzione di un opportuno sostituito sull'anello, in posizione 2', potesse spiazzare la molecola d'acqua instaurando interazioni favorevoli. Utilizzando queste informazioni, facendo leva sulla disponibilità di librerie combinatoriali di analoghi rappresentate nella collezione dello screening e sui protocolli di sintesi modulare di queste librerie, con un approccio combinato di chimica medicinale e docking *in silico*, è stato possibile consolidare e affinare una SAR che ha poi portato in breve tempo all'identificazione della molecola lead, Entrectinib (Fig. 2). La successiva determinazione della struttura cristallografica ha confermato le assunzioni fatte in fase di ottimizzazione, mostrando, inoltre, una particolare conformazione "chiusa" del "glycine-rich loop" (una regione flessibile che funge da "tetto" del sito attivo delle chinasi), mai osservata in precedenza, in cui la fenilalanina 1127 forma un'interazione di stacking favorevole con il composto. Il cammino di Entrectinib è proseguito con successo, e la molecola si trova ora in fase di sperimentazione clinica.

## La cristallografia e il Fragment Based Drug Design

Lo screening di frammenti (Fragment Based Drug Design, FBDD) è un metodo, complementare al tradizionale screening HTS, utile per la selezione e lo sviluppo degli hits.

Il FBDD si basa sull'identificazione di frammenti, ovvero molecole molto piccole (150-300 Dalton) in grado di legarsi, seppur debolmente, alla proteina target riconoscendo siti specifici nonostante la loro semplicità e limitatezza di punti di interazione. La determinazione della struttura cristallografica di complessi con frammenti di debole affinità è cruciale per confermare e localizzare il riconoscimento specifico e facilitare un disegno razionale di espansione sintetica. Gli hits, essendo strutturalmente semplici, sono facilmente modificabili da un punto di vista chimico e rappresentano un ottimo punto di partenza per l'ottenimento di inibitori strutturalmente nuovi. Questo approccio si è rivelato molto potente [7] e ha portato negli ultimi anni allo sviluppo di due farmaci attualmente in commercio: Vemurafenib, un inibitore della forma mutata della chinasi BRAF, utilizzato nella cura del melanoma [8], e Venetoclax, farmaco per la leucemia linfatica cronica, che agisce inibendo la proteina Bcl-2 [9].

La cristallografia ha un ruolo chiave in questo processo e i suoi contributi sono molteplici. I raggi X possono essere utilizzati come metodo iniziale di screening, mediante il soaking di cristalli della proteina target con miscele di frammenti, oppure nella riconferma degli hits identificati con altre tecniche (Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) o la Risonanza Plasmonica Superficiale (SPR)) per escludere effetti artefactuali, frequenti nella misurazione di deboli attività.

Il ruolo della cristallografia è fondamentale soprattutto nella fase di ottimizzazione degli hits; conoscere come uno o più frammenti si legano nel sito attivo della proteina permette di utilizzare tecniche come il "fragment growing" (crescita del frammento mediante l'introduzione di gruppi funzionali che aumentano le interazioni con la proteina) o il "fragment linking" (ottimizzazione basata sull'unione di due frammenti che occupano zone prossimali diverse del sito attivo) che possono portare, attraverso un processo iterativo, all'ottenimento di un inibitore con l'attività biologica desiderata.

L'approccio FBDD è stato applicato con successo presso il Nerviano Medical Sciences per l'identificazione di inibitori di HSP90 [10]. La Heat Shock Protein 90 (Hsp90) è una chaperonina che regola la stabilità conformazionale e l'attività di molte proteine oncogeniche, ed è quindi un target oncologico interessante. Il progetto è iniziato in modo "classico", conducendo una campagna HTS, che però ha portato all'identificazione di molecole poco adatte ad essere ottimizzate. Si è perciò deciso di testare, mediante un saggio NMR, la collezione proprietaria di frammenti (1200 composti). Lo screening ha permesso di identificare un derivato di tipo resorcinolico con una debole attività enzimatica (Fig. 3). In questa fase non ha importanza la potenza, ma è rilevante l'efficienza di legame relativa al peso molecolare (ligand efficiency).

Per facilitare il programma di sintesi chimica è stata determinata la struttura cristallografica di questa molecola in complesso con il dominio catalitico di HSP90. Il gruppo resorcinolico occupa il sito dell'ATP, formando un network d'interazioni con la proteina mediate da diverse molecole d'acqua, mentre l'anello dicloro fenilico s'inserisce in una piccola tasca di natura idrofobica che non esiste nella proteina nella forma libera ma è indotta dalla presenza del composto. La combinazione di informazioni strutturali, modeling e attività di sintesi ha permesso di modificare il frammento, introducendo sostituenti che si estendono nel sito dell'ATP (fragment growing) e di identificare un composto potente, con buone caratteristiche di farmacocinetica, adatto ad un successivo sviluppo clinico (Fig. 3).

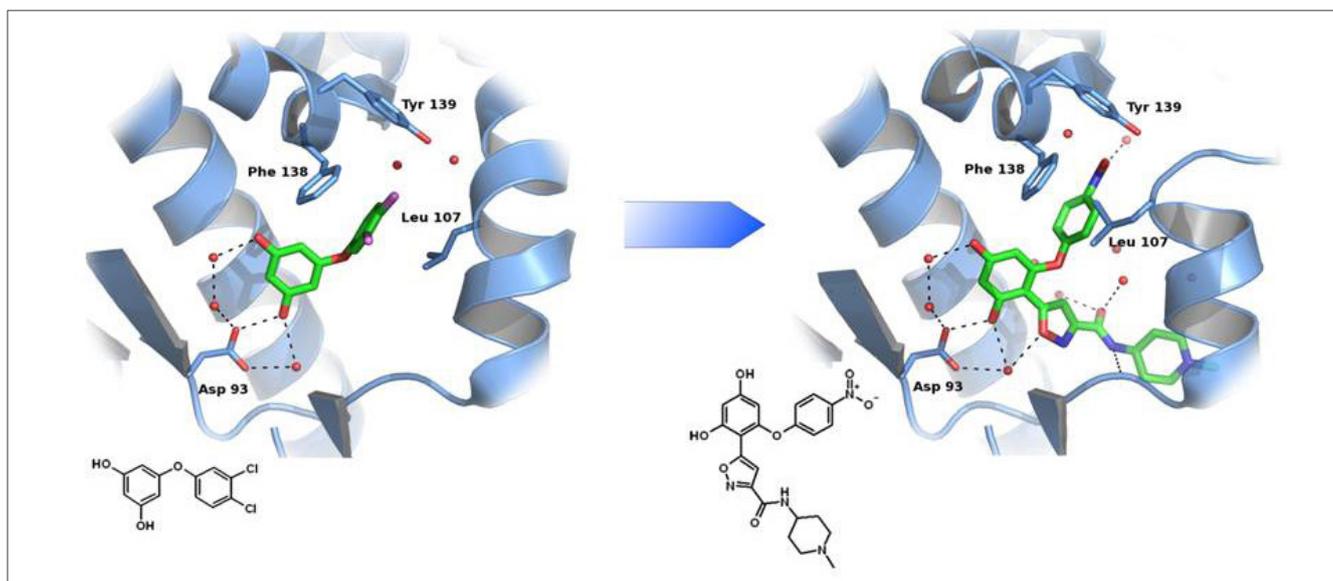


Fig. 3 - Sviluppo FBDD di inibitori di HSP90: modo di legame del frammento iniziale e della molecola identificata alla fine del processo di ottimizzazione

### Le sfide della cristallografia

La cristallografia rimane indubbiamente la metodologia principale per la determinazione di strutture di macromolecole biologiche. Tuttavia, la tecnica presenta alcune fondamentali limitazioni. L'ostacolo principale è rappresentato dalla necessità di ottenere cristalli della proteina bersaglio. Se da un lato vi sono stati enormi progressi nelle tecniche di cristallizzazione, d'altro canto l'interesse della ricerca si è progressivamente spostato verso target sempre più ambiziosi, come i grandi complessi proteici e le proteine di membrana, la cui cristallizzazione è ben lontana dal diventare una routine. Non va inoltre dimenticato che il modello ottenuto mediante raggi X è un'immagine statica, che non dà informazioni sulla dinamica della proteina e sulla sua flessibilità, aspetti che in alcuni casi sono determinanti per la comprensione del meccanismo d'azione del farmaco. L'ambizione di conoscere a fondo le proprietà di dinamica molecolare di un target è tendenzialmente in aumento per poter meglio valutare le probabilità e gli effetti di cambi conformazionali della proteina. Una tecnica complementare alla cristallografia, da questo punto di vista, è senza dubbio l'NMR che permette di ricostruire la struttura delle diverse varianti conformazionali presenti nel campione in esame. Per lo studio di proteine o complessi di grandi dimensioni, invece, la crio-microscopia elettronica (cryo-EM) per singola particella sta emergendo come una tecnica di indagine molto potente. Inizialmente la cryo-EM era in grado di fornire modelli a bassa risoluzione, ma, recentemente, sono stati pubblicati esempi di strutture di complessi proteina-inibitore a risoluzione atomica

dove è possibile caratterizzare il modo di legame del legante [11]. Appare pertanto evidente che lo studio strutturale di target sempre più complessi non potrà prescindere dall'uso complementare e sinergico di più tecniche biofisiche.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] J.C. Kendrew *et al.*, *Nature*, 1958, **181**, 662.
- [2] M.F. Perutz *et al.*, *Nature*, 1960 **185**, 416.
- [3] N. Roberts *et al.*, *Science*, 1990, **249**, 527.
- [4] D.K. Treiber *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2015, **11**, 818.
- [5] T. Schindler *et al.*, *Science*, 2000, **289**, 1938.
- [6] a) R.T. Bossi *et al.*, *Biochemistry*, 2010, **49**, 6813; b) M. Menichincheri *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2016, **59**, 3392.
- [7] C.N. Johnson *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2017, **60**, 89.
- [8] J. Tsai *et al.*, *PNAS*, 2007, **105**, 3041.
- [9] A.J. Souers *et al.*, *Nature Medicine*, 2013, **19**, 202.
- [10] M.G. Brasca *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 7047.
- [11] A. Merk *et al.*, *Cell*, 2016, **165**, 1698.

### X-Rays Shed Light on the Drug

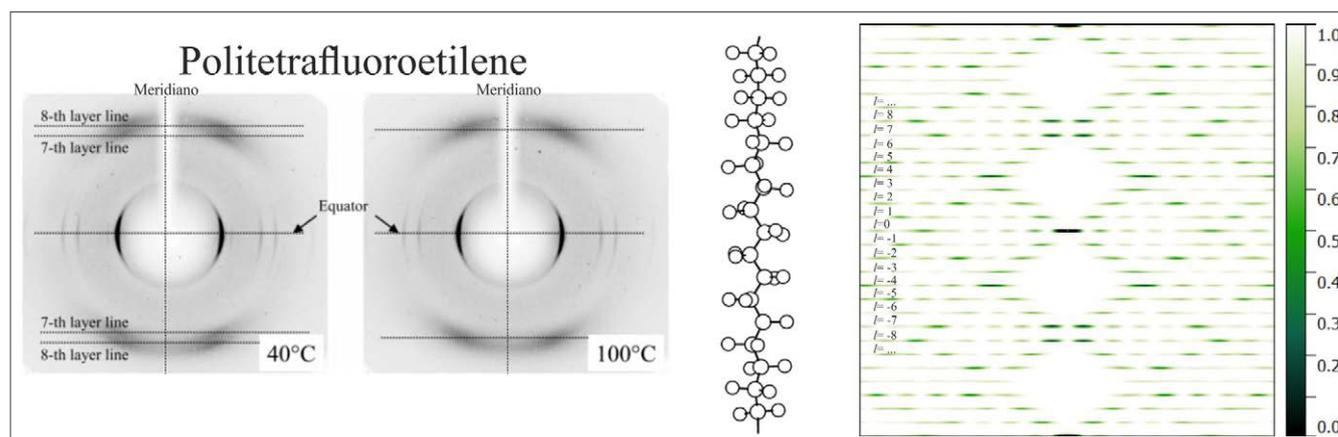
Macromolecular X-ray crystallography is an important and powerful technique in drug discovery. The availability of high resolution structures of the target protein in complex with small molecules of interest, in fact, can boost a more focused chemical optimization of drug candidates.



CLAUDIO DE ROSA, FINIZIA AURIEMMA  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE  
UNIVERSITÀ DI NAPOLI "FEDERICO II"  
CLAUDIO.DEROSA@UNINA.IT

# LA DIFFRAZIONE DEI RAGGI X PER L'ANALISI STRUTTURALE DEI MATERIALI POLIMERICI E OLTRE

*Lo studio della struttura cristallina dei polimeri utilizzando la diffrazione dei raggi X consente di approdare alla comprensione delle loro proprietà su basi molecolari. Ciò rende possibile la progettazione di nuovi materiali con specifiche proprietà direttamente nello stadio di reazione.*



## La diffrazione dei raggi X di polimeri

Lo sviluppo della cristallografia a raggi X per lo studio dell'organizzazione strutturale degli atomi nella materia ha contribuito notevolmente al progresso scientifico e tecnologico in numerosi campi, che vanno dalla fisica, alla chimica, dalla scienza dei materiali alla geologia, dalla biologia alla medicina. La cristallografia rappresenta, infatti, una scienza interdisciplinare che ha consentito di comprendere in maniera sostanziale la natura dei legami chimici sia intra- sia inter-molecolare. Dal momento che le proprietà della materia dipendono dalla natura degli atomi che la costituiscono e da come questi sono organizzati tra loro nello spazio a tre dimensioni, le conoscenze acquisite attraverso studi cristallografici hanno consentito e consentono di ottenere materiali con nuove proprietà e prestazioni e/o di migliorare le proprietà di materiali

già noti attraverso modifiche mirate della struttura. La scienza dei materiali polimerici è una scienza "giovane", che deve larga parte del suo successo allo sviluppo quasi-contemporaneo della cristallografia, in tutti i suoi aspetti, sia teorici sia pratici, grazie anche all'evoluzione della strumentazione e dei metodi di analisi strutturale, nonché alla disponibilità di strumenti sempre più potenti e di facile utilizzo.

In questo articolo si illustrano le caratteristiche principali inerenti la natura della cristallinità nei polimeri in relazione a esperimenti di diffrazione e, successivamente, si delineano i metodi di analisi di tali materiali mediante la diffrazione dei raggi X. In tale rassegna saranno riportati alcuni esempi significativi che illustrano come l'interpretazione strutturale delle proprietà dei materiali polimerici, conseguibile utilizzando i principi e le leggi della cristallografia e metodi non convenzionali sviluppati *ad hoc*, abbia

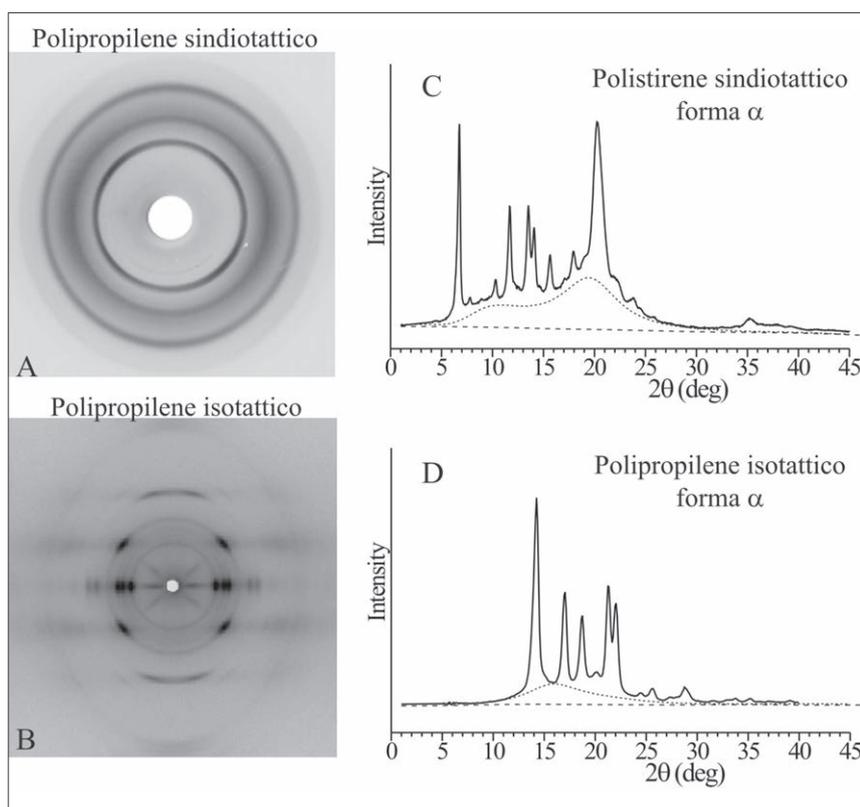


Fig. 1 - Immagini di diffrazione bidimensionali dei raggi X (A,B) e profili di diffrazione dei raggi X di campioni in polvere (C,D) relativi a campioni di polipropilene sindiotattico (A), polipropilene isotattico (B,D) e polistirene sindiotattico (C). La fibra in A è scarsamente orientata, in B è ben orientata tramite applicazione di sforzi tensili. In A i riflessi appaiono diffusi per effetto dello stiro che a basse deformazioni induce la frammentazione delle lamelle. In B sono presenti riflessi stretti su precise linee di strato, un alone dovuto alla fase amorfa, e intensità diffusa localizzata ad alti valori dell'angolo di diffrazione  $2\theta$ , dovuta a disordine strutturale nei cristalli. Le immagini in A e in B non sono in scala tra loro. In C e D il contributo della fase amorfa è indicato dalla linea punteggiata al di sopra del contributo della radiazione di fondo delineato con tratteggio

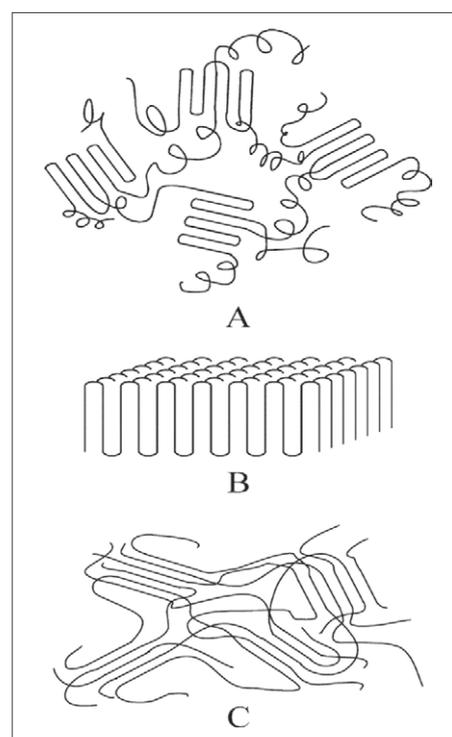


Fig. 2 - Modelli della microstruttura di polimeri cristallini: a) lamelle a catene ripiegate, sono connesse tra loro da spezzoni di catena a formare un network; b) modello limite di cristallo lamellare di un polimero, caratterizzato dal rientro adiacente delle catene nel cristallo; c) modello limite di cristalli lamellari delimitati da catene che fuoriescono a frangia, esenti da rientri delle catene nello stesso cristallo. I modelli A e C rappresentano il possibile assetto cristallino in polimeri a catena flessibile e rigida, rispettivamente

consentito di andare *oltre*, e cioè di chiarire aspetti fondamentali di questi sistemi, aprire nuove linee di ricerca e di produzione di nuovi polimeri, introdurre nuovi concetti, identificare nuove applicazioni e da qui stabilire le regole per la progettazione di nuovi materiali polimerici con proprietà mirate.

La diffrazione dei raggi X da parte della materia dà luogo ad aloni diffusi nel caso di gas, liquidi e materiali amorfi, a picchi stretti puntuali (riflessi) o sparpagliati lungo archi o circonferenze nel caso di materiali cristallini [1]. L'analisi di posizione, intensità, larghezza e forma dell'intensità diffratta consente di dedurre, attraverso differenti gradi di sofisticazione, numerose informazioni. Nel caso dei polimeri, è possibile ottenere informazioni che riguardano l'identità del materiale, il grado di cristallinità, la disposizione relativa degli atomi nei cristalli, il grado e il tipo di disordine, eventuali correlazioni nella distribuzione del disordine strutturale, l'arrangiamento relativo dei cristalliti, i meccanismi fondamentali coinvolti nei

processi di lavorazione e deformazione dei polimeri ecc. [2]. Queste informazioni consentono spesso di interpretare il complesso comportamento meccanico dei materiali polimerici [2].

Le immagini di diffrazione dei raggi X dei polimeri cristallini solitamente contengono sia aloni tipici dei materiali amorfi, sia riflessi caratteristici tipici di materiali cristallini e, molto spesso, una grande quantità di intensità diffusa (Fig. 1). Tali caratteristiche derivano dalla natura intrinseca dei materiali polimerici che non sono mai cristallini al 100%, ma sono semicristallini. Il grado di cristallinità ponderale può essere facilmente valutato misurando il rapporto tra l'intensità sottesa ai picchi di diffrazione  $I_c$  e l'intensità totale  $I_{tot}$  diffratta dal campione semicristallino,  $I_c/I_{tot}$ . Inoltre, la larghezza dei picchi di diffrazione è generalmente maggiore di quella dei composti cristallini a bassa massa molecolare. Ciò è dovuto al fatto che i polimeri (semi)cristallini sono costituiti da cristalli di piccole dimensioni e sono caratterizza-

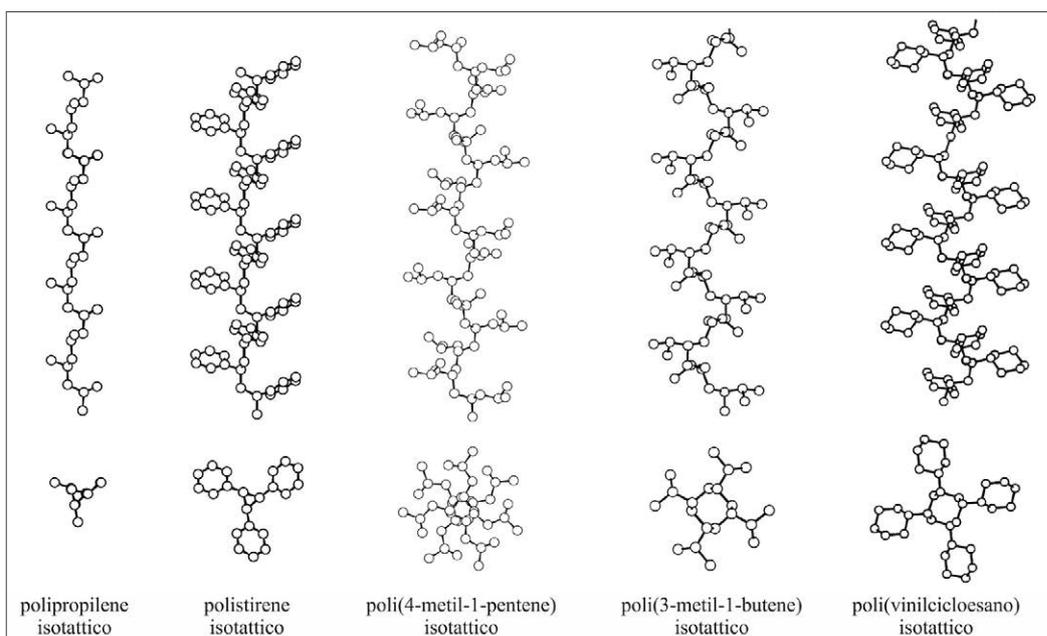
ti dalla presenza di un'enorme quantità di disordine strutturale nei cristalli [2, 3]. La misura del grado di cristallinità mediante diffrazione dei raggi X è la base per la comprensione delle proprietà meccaniche di polimeri semicristallini.

Il più semplice modello strutturale che emerge dai dati di diffrazione dei raggi X di polimeri è un modello a due fasi, la fase cristallina e la fase amorfa. I cristalli (cristalliti) presentano forma lamellare,

con una dimensione parallela (o circa parallela) all'asse di catena di 2-10 nm molto più piccola delle dimensioni laterali >100 nm. Le lamelle cristalline sono immerse nella fase amorfa e sono estremamente interconnesse (Fig. 2). Ciascuna catena si ripiega su se stessa rientrando nuovamente nella medesima lamella cristallina, oppure entra in una nuova lamella creando un tratto d'unione (*tie-molecules*) tra una lamella e l'altra [2, 4]. I terminali di catena, la presenza di dislocazioni nei cristalli e di catene ripiegate impediscono di raggiungere gradi di cristallinità del 100%. Persino i cristalli singoli (Fig. 2B) contengono regioni disordinate in corrispondenza delle superfici basali delle lamelle ove risiedono i ripiegamenti delle catene. La ragione per cui le catene che fuoriescono dalle superfici basali dei cristalli lamellari dei polimeri tendono a rientrare nella medesima lamella, è ascrivibile alla necessità di alleviare il sovrappollamento delle catene che si crea all'interfaccia tra fase cristallina a più alta densità e fase amorfa a densità più bassa [5].

In generale, la condizione di ripetizione regolare e periodica all'infinito di una unità strutturale nelle tre dimensioni dello spazio associata al concetto di cristallo ideale, può realizzarsi, nel caso dei polimeri, solo se si verificano simultaneamente quattro condizioni:

- 1) catena di lunghezza infinita;
- 2) costituzione regolare;

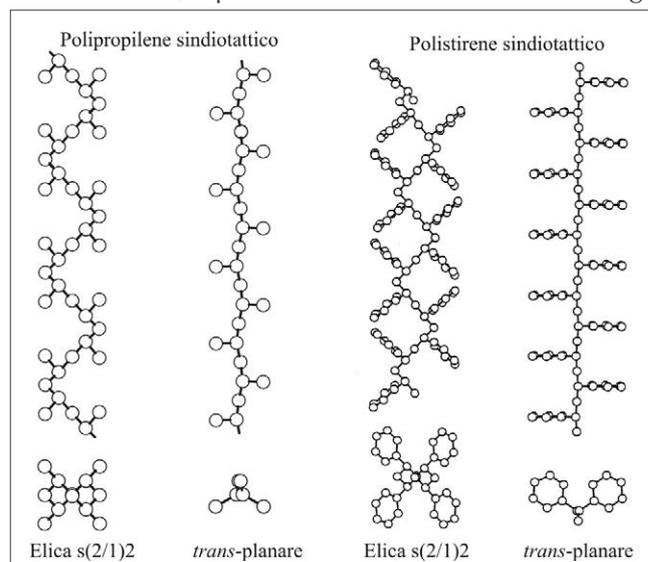


**Fig. 3 - Modelli delle conformazioni regolari e periodiche di macromolecole di polimeri isotattici assunte nello stato cristallino, corrispondenti alle eliche 3/1 per il polipropilene isotattico e il polistirene isotattico, 7/2 per il poli(4-metil-1-pentene) isotattico, e 4/1 per il poli(3-metil-1-butene) isotattico e il poli(vinilcicloesano) isotattico**

3) configurazione regolare;

4) conformazione regolare (Fig. 3 e 4).

Ciò implica che per polimeri aventi costituzione e configurazione regolare, ad esempio isotattica (Fig. 3) o sindiotattica (Fig. 4), è possibile definire un'unità costituzionale del polimero, spesso coincidente con l'unità monomerica, che si ripete in maniera regolare e periodica lungo l'asse di catena, spesso coincidente con uno degli



**Fig. 4 - Modelli delle conformazioni regolari di macromolecole di polimeri sindiotattici assunte nello stato cristallino, corrispondenti all'elica a simmetria s(2/1)2 e alla conformazione trans-planare del polipropilene sindiotattico e del polistirene sindiotattico**



assi della cella elementare del reticolo cristallino. Tuttavia, nessuna di queste condizioni può essere completamente soddisfatta nei cristalli di un polimero reale. La presenza dei terminali di catena, la polidispersione delle masse molecolari, come pure la presenza dei ripiegamenti di catena che si collocano sulle superfici basali delle lamelle implica che non è possibile verificare la ripetizione periodica all'infinito degli atomi lungo l'asse di catena (Fig. 2).

### Oltre

Lo studio della cristallinità di polimeri mediante le tecniche della diffrazione dei raggi X permette di accedere ad informazioni molto dettagliate relative al tipo di disordine strutturale e spiegare come mai in presenza di elevate concentrazioni di difetti (costituzionali e/o configurazionali) i polimeri sono ancora in grado di cristallizzare con ovvie conseguenze nello sviluppo di proprietà a volte inattese. Difetti costituzionali sono, ad esempio, le ramificazioni laterali nel caso del polietilene, o unità costituzionali isomorfe ben tollerate nel reticolo cristallino ospite. Polimeri che pur essendo atattici sono in grado di cristallizzare sono, ad esempio, il poliacrilonitrile [6] e il polivinilalcol [7].

Il caso dei copolimeri sindiotattici propene-butene [8-11] illustra molto bene il ruolo dell'isomorfismo costituzionale sulla cristallizzazione dei polimeri. I dati di diffrazione indicano che questi copolimeri sono cristallini nell'intero intervallo di composizione (Fig. 5), grazie al fatto che le unità di butene e di propene sono ben tollerate, rispettivamente, nei reticoli cristallini del polipropilene e del polibutene sindiotattici [8-11]. All'aumentare del contenuto di butene si verifica una graduale diminuzione

della temperatura di fusione e in contemporanea un graduale aumento dei valori dei parametri della cella elementare (Fig. 5).

Come esempio di irregolarità configurazionale, si cita il ruolo che hanno i difetti sterici sulla cristallizzazione della forma  $\gamma$  del polipropilene isotattico (iPP) (Fig. 6A) [12-15].

La forma  $\gamma$  dell'iPP rappresenta uno dei rari esempi tra i polimeri cristallini, in cui le catene sono disposte nella cella elementare ad assi non paralleli, ma circa perpendicolari tra loro come illustrato nel modello strutturale di Fig. 6C [16]. Campioni di iPP stereo-irregolari con una distribuzione casuale dei difetti lungo la catena, cristallizzano più facilmente nella forma  $\gamma$  piuttosto che nella normale forma  $\alpha$  del iPP (Figura 6B) [12-15, 17]. Ciò è stato messo in relazione con l'effetto interruzione da parte dei difetti sterici, la cui presenza accorcia la lunghezza dei tratti di catena a configurazione isotattica. Sequenze isotattiche lunghe e regolari cristallizzano nella forma  $\alpha$  dell'iPP, formando lamelle a catene ripiegate. Sequenze isotattiche più corte tendono invece a cristallizzare nella forma  $\gamma$ . Dal momento che l'arrangiamento quasi perpendicolare delle catene nei cristalli di forma  $\gamma$  non comporta sovrapposizione

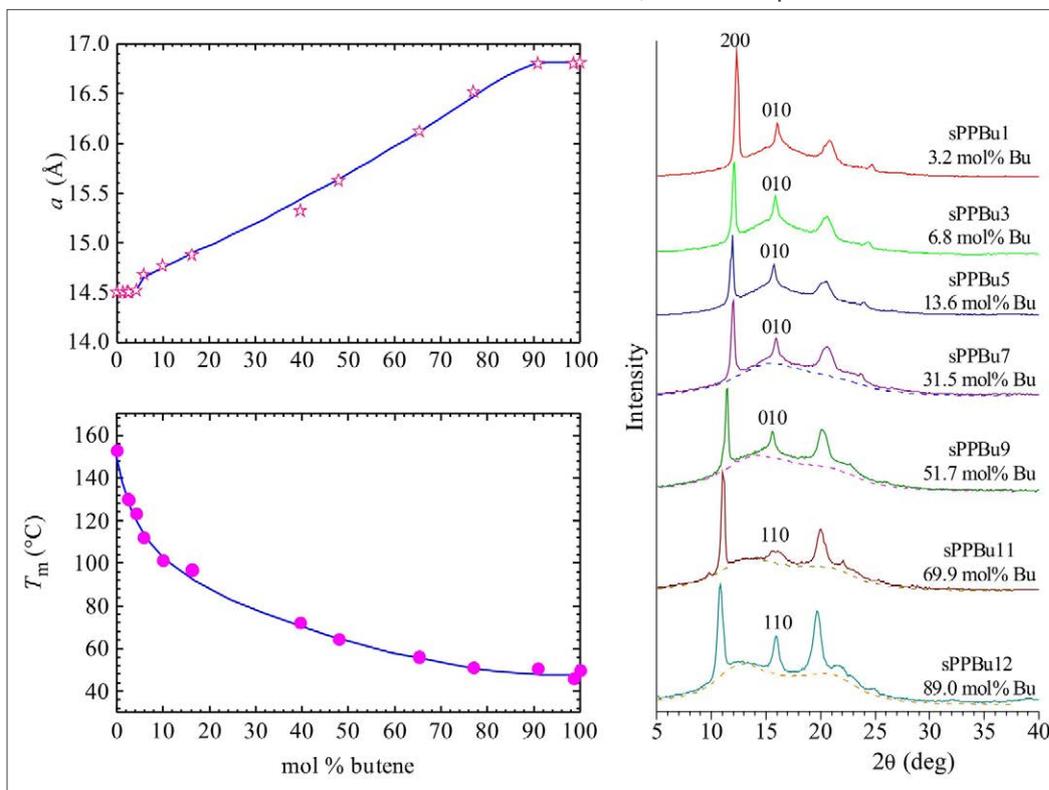


Fig. 5 - Valori del parametro  $a$  della cella elementare e della temperatura di fusione e profili di diffrazione dei raggi X dei copolimeri sindiotattici propene/butene, che risultano cristallini in tutto l'intervallo di composizione

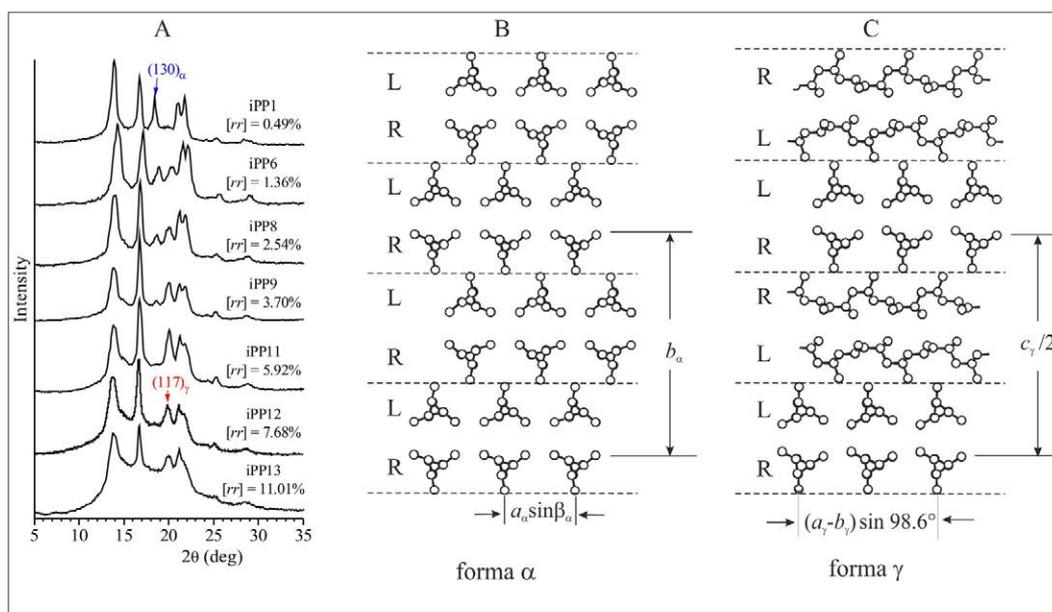


Fig. 6 - Profili di diffrazione dei raggi X di campioni stereo-irregolari di polipropilene isotattico (A) e modelli strutturali delle forme  $\alpha$  (B) e  $\gamma$  (C) dell'iPP. In A sono indicati gli indici di Miller dei riflessi caratteristici delle forme  $\alpha$  (130) $_{\alpha}$  e  $\gamma$  (117) $_{\gamma}$ . L'ammontare relativo di cristalli di forma  $\gamma$  aumenta all'aumentare del contenuto di difetti di stereoregolarità, rappresentati dalle triadi steriche rr.

in uscita, le catene non hanno alcuna necessità di rientrare nella lamella attraverso ripiegamenti [12-15, 17, 18]. Per campioni di iPP stereoirregolari, con una distribuzione casuale di difetti, anche una piccola concentrazione di difetti, induce un accorciamento dei tratti isotattici, e, quindi, essi cristallizzano più facilmente in forma  $\gamma$  (Fig. 6A) [12-15, 17]. Ulteriori studi hanno messo in evidenza che i difetti sterici dei campioni di Fig. 6A sono ben tollerati e parzialmente inclusi nella forma  $\gamma$  [2, 14, 18, 19]. La cristallizzazione della forma  $\gamma$ , anche in presenza di alte concentrazioni di difetti sterici, induce lo sviluppo di proprietà elastiche inattese [12, 14, 19].

Gli esempi riportati illustrano come la presenza di difetti non preclude affatto la cristallizzazione dei polimeri, ma talvolta ne influenza il polimorfismo, la conformazione locale delle catene nei cristalli, la forma dei cristalli e la morfologia. È interessante notare che ciò si riflette sulle proprietà fisiche, termiche e meccaniche e implica che attraverso l'introduzione mirata di difetti lungo la catena, è possibile controllare le proprietà ultime, allo scopo di progettare materiali per specifiche applicazioni.

## Metodi di analisi strutturale

I metodi di analisi strutturale dei materiali polimerici hanno seguito un'evoluzione a sé stante rispetto ai materiali cristallini a bassa massa molecolare [2, 3]. La ragione di ciò risiede nella presenza costante di una fase amorfa, nel piccolo numero di riflessi pre-

senti nelle immagini di diffrazione dei raggi X dei polimeri, nella scarsa risoluzione dei riflessi che spesso si presentano sotto forma di picchi slargati, nella presenza di un'enorme quantità di disordine strutturale che genera scattering diffuso. Proprio per queste caratteristiche, spesso risulta difficile estrarre informazioni strutturali quantitative e significative utilizzando i metodi classici di analisi strutturale.

In generale, nel caso di campioni non orientati, è possibile raccogliere con un diffrattometro l'intensità diffusa dal campione in funzione dell'angolo di diffrazione  $2\theta$  definito come l'angolo tra la direzione del fascio incidente e la direzione del fascio diffratto. Si ottengono così profili di diffrazione come quelli delle Fig. 1C,D, 5 e 6. Nel caso di campioni uniaxialmente orientati (fibre), è possibile raccogliere l'intensità diffusa dal campione utilizzando sistemi di rivelazione bidimensionali digitali, come ad esempio lastre digitalizzabili a fosfori fotostimolabili (imaging plates), o dispositivi ad accoppiamento di carica (CCD) sensibili alla radiazione X. Si ottengono immagini bidimensionali del tipo mostrato in Fig. 1A,B.

Dalle immagini di diffrazione dei raggi X di Fig. 1 è possibile ottenere numerose informazioni, tra cui:

- i) i valori dei parametri della cella elementare attraverso la determinazione della posizione  $2\theta$  dei riflessi e l'utilizzo della legge di Bragg  $2d\sin\theta = n\lambda$ ;
- ii) la grandezza dei cristalli attraverso la misura della larghezza dei riflessi e l'utilizzo della formula di Scherrer:  $L_{hkl} = K\lambda/\beta\cos\theta$ , dove  $L_{hkl}$  è la dimensione dei cristalli nella direzione perpendicolare ai piani reticolari  $hkl$ ,  $\beta$  è l'ampiezza a metà altezza, misurata in radianti, del picco di diffrazione del riflesso  $hkl$  che presenta il massimo all'angolo di diffrazione  $2\theta$  e  $K$  è una costante compresa tra 0,89 e 0,94;
- iii) il grado e il tipo di orientazione dei cristalli attra-



verso l'analisi della forma dei picchi estratta dalle immagini bidimensionali di Fig. 1A,B;  
iv) la conformazione delle catene e il modello di impacchettamento delle catene tramite l'analisi dettagliata dell'intensità dei riflessi e il calcolo dei fattori di struttura.

Ad esempio, nel caso di campioni orientati, è possibile ottenere immagini bidimensionali di diffrazione dei raggi X in cui i riflessi risultano organizzati lungo ben precise linee di stato, come mostrato in Fig. 1B e nello schema di Fig. 7, se il supporto digitale è avvolto in una camera cilindrica. Il periodo d'identità lungo l'asse della catena, coincidente convenzionalmente con l'asse  $c$  della cella elementare, è deducibile misurando la separazione  $y_1$  tra le linee di stato  $l$  (Fig. 7) [2, 3] mediante l'equazione:

$$c = l\lambda / \sin[\tan^{-1}(y_1/R)] \quad (1)$$

dove  $\lambda$  è la lunghezza d'onda dei raggi X utilizzati e  $R$  è il raggio della camera cilindrica attorno alle pareti della quale è avvolto il supporto digitale per la registrazione dell'immagine.

I rimanenti parametri della cella elementare sono determinati successivamente fino a indicizzare tutti i riflessi osservati attraverso una procedura a tentativi [2]. Si determina quindi il numero di unità monomeriche per cella elementare, confrontando la densità calcolata con quella sperimentale. Dall'analisi degli indici di Miller dei riflessi osservati, si stabilisce il

possibile o i possibili gruppi spaziali di simmetria [1, 2]. Come già detto, per la risoluzione strutturale dei polimeri non è possibile applicare le procedure automatiche che si utilizzano come routine nel caso delle sostanze cristalline di bassa massa molecolare. È necessario, infatti, associare alla diffrazione dei raggi X informazioni che si possono ottenere da un'analisi geometrica delle conformazioni possibili

assunte dalle macromolecole nello stato cristallino e da calcoli di energia conformazionale e di impacchettamento.

Questa procedura prevede la costruzione di modelli delle possibili conformazioni di massima simmetria della catena, compatibili con la costituzione, la configurazione e con il periodo di identità e che rispondono al requisito di minima energia [2, 3]. Ad esempio la conformazione ad elica 3/1 del polipropilene isotattico (Fig. 3) è compatibile con il periodo di identità  $c$  pari a 6,5 Å, deducibile da immagini di diffrazione bidimensionali come quella di Fig. 1B, la configurazione isotattica delle catene, e risponde al requisito di minima energia [20]. Tale conformazione, identificata col simbolo 3/1, corrisponde alla ripetizione identica di tre unità monomeriche per ciascun giro di elica e ad una successione di angoli di torsione interna lungo la catena di tipo TG+TG+TG+... per l'elica sinistra e TG-TG-TG-... per l'elica destra, ove i simboli T, G+ e G- indicano valori degli angoli di torsione interna  $\approx 180^\circ$ ,  $\approx +60^\circ$  e  $\approx -60^\circ$ , rispettivamente [20].

Lo stadio finale di questa procedura prevede la costruzione di possibili modelli di impacchettamento delle catene nella cella elementare, il calcolo dei fattori di struttura, e il confronto di questi con le intensità di diffrazione osservate [2]. Attraverso tentativi successivi si procede nell'analisi strutturale, fino ad ottenere un buon accordo dei dati sperimentali con quelli calcolati, utilizzando opportune figure di merito.

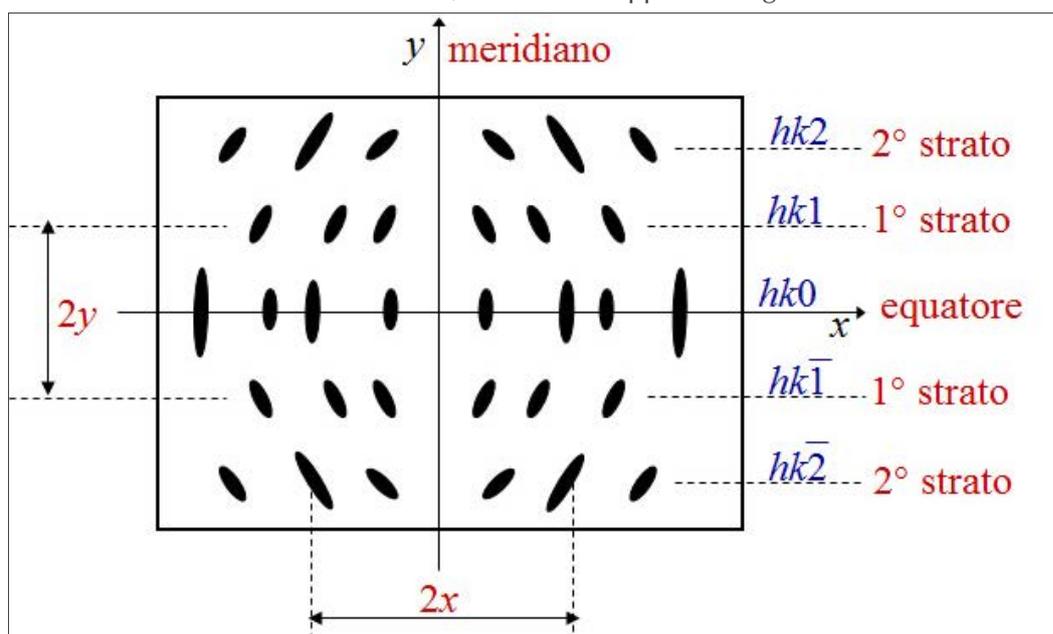


Fig. 7 - Schema di una immagine di diffrazione dei raggi X di una fibra di un polimero registrata con una camera cilindrica. Vengono mostrati i riflessi  $hkl$  organizzati in linee di stato, l'equatore e il meridiano dell'immagine e il metodo per la misura delle coordinate  $x$  e  $y$  dei riflessi in un sistema cartesiano  $xy$

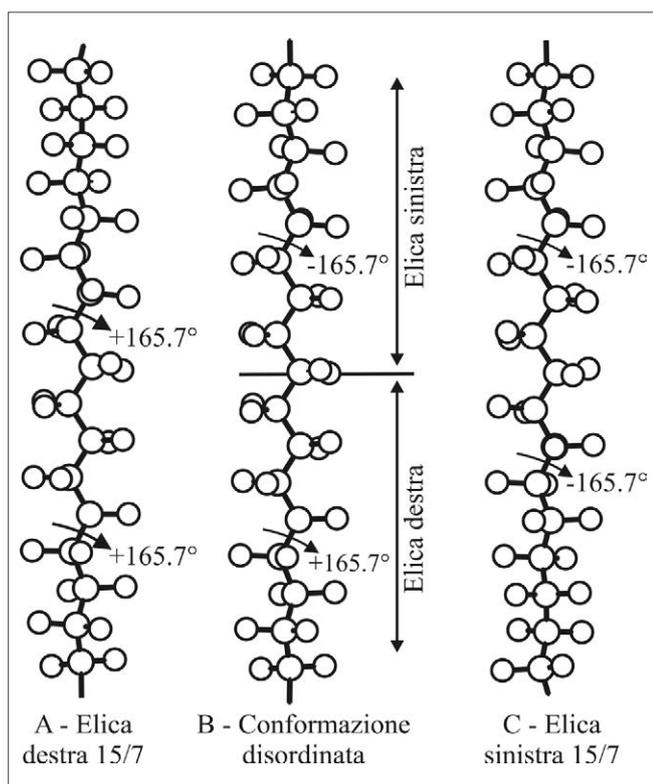


Fig. 8 - Modelli di catene di politetrafluoroetilene nella conformazione a elica 15/7 destro-giro (A) e levo-giro (C), corrispondenti a sequenze di angoli di torsione interna lungo la catena principale pari a ...+165,7°;+165,7°;+165,7°;... e ...-165,7°;-165,7°;-165,7°;... rispettivamente, e modello di una catena di politetrafluoroetilene in conformazione disordinata che include un'inversione nella spiralizzazione dell'elica (B), corrispondente a sequenze di angoli di torsione del tipo ...+165,7°;+165,7°;+165,7°(T'; 180°;T'')-165,7°;-165,7°;-165,7°... dove T' e T'' sono valori dell'angolo di torsione interna leggermente diversi da 180° in modo da mantenere le porzioni di catena adiacenti al giunto in asse

Dalle immagini bidimensionali di diffrazione dei raggi X di fibre, del tipo dello schema di Fig. 7, è possibile, dalla lettura della distribuzione dell'intensità dei riflessi sulle varie linee di strato, determinare, nel caso di polimeri aventi catene in conformazione ad elica complessa  $M/N$ , i parametri dell'elica (cioè il numero  $M$  di unità monomeriche e numero  $N$  di giri dell'elica per periodo di identità). Si prenda, ad esempio, in considerazione l'elica complessa 15/7 del politetrafluoroetilene (PTFE) nella forma I che si ottiene a 30 °C, in cui 15 unità  $-CF_2-$  sono incluse in 7 giri dell'elica per ciascun periodo di identità di 19,5 Å. La forma I del PTFE è caratterizzata dall'impacchettamento pseudo-esagonale delle catene, e un elevato grado di disordine strutturale [21-23]. Immagini di diffrazione dei raggi X bidimensionali di tale forma cristallina, collezionate a due diverse temperature, sono mostrate nella figura in apertura. La forma I è caratterizzata da riflessi netti solo sull'equatore, mentre in corrispondenza del 7° e 8° strato si osserva intensità diffusa [2,

24-26]. All'aumentare della temperatura, l'intensità diffusa sul 7° e 8° strato si sposta gradualmente in una posizione intermedia, fino ad avere coalescenza dell'intensità sui due strati in unico alone slargato per temperature maggiori di 100 °C [21-25]. Applicando lo schema teorico derivato per la prima volta da Cochran, Crick e Vand [27] è possibile prevedere la distribuzione dell'intensità sulle varie linee di strato per una generica elica  $M/N$  caratterizzata dall'inclusione di  $M$  unità che si avvolgono in  $N$  giri per ciascun periodo di identità, attraverso la regola di selezione:

$$l = mM + nN \quad (2)$$

ove  $l$  è l'indice di Miller dello strato,  $m$  è un numero intero compreso tra  $-\infty$  a  $+\infty$  e  $n$  l'ordine della funzione di Bessel, dal cui quadrato dipende l'intensità diffratta. Si verifica che l'intensità diffratta sulle linee di strato è tanto più elevata quanto più piccolo è l'ordine  $n$  della funzione di Bessel, e che valori piccoli di  $n$  corrispondono a massimi di intensità nella regione dell'immagine bidimensionale dei raggi X vicina al centro della lastra, corrispondente al meridiano [27, 28]. Nella parte destra della figura in apertura è riportata la distribuzione di intensità calcolata nel caso di un'elica 15/7. Si nota, che al di fuori dell'equatore, che dipende dall'impacchettamento delle catene, la distribuzione dell'intensità calcolata per l'elica isolata riflette bene la distribuzione di intensità della forma I del PTFE. La ragione per cui nel caso sperimentale sulle linee di strato diverse dall'equatore e dalle linee con  $l = 7$  e 8, si osserva solo intensità diffusa, è dovuto a disordine traslazionale delle catene nella direzione parallela al loro asse e rotazionale delle catene intorno al loro asse [23, 25]. La coalescenza dell'intensità sulla 7° e 8° linea di strato in un unico largo alone centrato in una posizione intermedia nel caso della forma I ad alta temperatura [23-26], è stata spiegata sulla base di disordine conformazionale, in cui porzioni di catene a elica di opposta chiralità sono giunte tra loro lungo la stessa catena a basso costo di energia interna (Fig. 8B) [24-26]. All'aumentare della temperatura, la concentrazione di inversioni di spiralizzazione lungo la catena aumenta, l'energia interna non varia in maniera significativa, mentre si verifica un netto aumento dell'entropia.

### Ancora oltre...

La determinazione della struttura cristallina di un polimero rappresenta per sé un ambizioso traguardo dell'analisi strutturale. Tuttavia esso rappresenta an-



che un punto di partenza in studi fondamentali e applicativi. Per esempio lo studio strutturale delle varie forme cristalline del polipropilene sindiotattico, ha consentito di individuare una nuova classe di materiali con proprietà elastiche, gli elastomeri cristallini, in cui il comportamento elastico è associato ad una transizione di fase cristallo-cristallo ed è di natura entalpica [2, 14, 29].

Un altro esempio significativo è rappresentato dallo studio strutturale e dei fenomeni di disordine che si verificano nel caso di campioni stereoirregolari del iPP e dei copolimeri isotattici del propene con altre olefine ottenuti da catalizzatori single-site metallorganici [2, 13, 14, 30]. Ciò ha consentito di identificare una nuova categoria di materiali, con proprietà completamente differenti da quelli ottenuti industrialmente con catalizzatori Ziegler-Natta eterogenei, in cui, variando il contenuto e tipo di difetti, è possibile controllare indipendentemente densità, temperatura di fusione, duttilità, modulo tensile, e resistenza meccanica.

Lo studio della struttura cristallina dei materiali polimerici e materiali in generale, effettuato con i metodi e il linguaggio rigoroso della cristallografia, apre nuove opportunità, consente di approdare a nuovi concetti e di identificare nuove applicazioni, stimolando l'identificazione di nuovi metodi di sintesi e di lavorazione dei materiali per l'ottenimento dei manufatti finiti.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] W. Clegg *et al.*, *Crystal Structure Analysis: Principles and Practice*, Oxford University Press, Oxford, 2002.
- [2] C. De Rosa, F. Auriemma, *Crystals and Crystallinity in Polymers: Diffraction Analysis of Ordered and Disordered Crystals*, J. Wiley, Hoboken, 2014.
- [3] P. Corradini, in *The Stereochemistry of Macromolecules*, A.D. Ketley (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1968, Vol. 3, pag. 1.
- [4] P. Corradini, F. Auriemma, C. De Rosa, *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 314.
- [5] A. Keller, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 1979, **68**, 145.
- [6] P. Rizzo *et al.*, *Macromolecules*, 1996, **29**, 8852.
- [7] C.W. Bunn, *Nature*, 1948, **161**, 929.
- [8] C. De Rosa *et al.*, *Macromolecules*, 2008, **41**, 5301.
- [9] C. De Rosa *et al.*, *Macromolecules*, 2008, **41**, 8712.
- [10] C. De Rosa *et al.*, *Macromol. Mater. Eng.*, 2008, **293**, 810.
- [11] C. De Rosa *et al.*, *Macromolecules*, 2009, **42**, 4728.
- [12] C. De Rosa *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 17040.
- [13] C. De Rosa, F. Auriemma, *Lect. Not. Phys.*, 2007, **714**, 345.
- [14] C. De Rosa, F. Auriemma, *Polym. Chem.*, 2011, **2**, 2155.
- [15] C. De Rosa, F. Auriemma, *Macromolecules*, 2002, **35**, 9057.
- [16] S. Brückner, S.V. Meille, *Nature (London)*, 1989, **340**, 455.
- [17] C. De Rosa *et al.*, *Macromolecules*, 2002, **35**, 3622.
- [18] F. Auriemma *et al.*, *Macromolecules*, 2001, **34**, 4815.
- [19] C. De Rosa *et al.*, *Macromolecules*, 2004, **37**, 6843.
- [20] G. Natta, P. Corradini, *Nuovo Cimento, Suppl.* 1960, **15**, 40.
- [21] C.A. Sperati, H.W. Starkweather Jr., *Adv. Polym. Sci.*, 1961, **2**, 465.
- [22] C.W. Bunn, E.R. Howells, *Nature*, 1954, **174**, 549.
- [23] E.S. Clark, L.T. Muus, *Z. Kristallogr.*, 1962, **117**, 119.
- [24] P. Corradini *et al.*, *Macromolecules*, 1987, **20**, 3043.
- [25] C. De Rosa *et al.*, *Macromolecules*, 1988, **21**, 1174.
- [26] M. D'Amore *et al.*, *Macromolecules*, 2004, **37**, 9473.
- [27] W. Cochran, F.H.C. Crick, V. Vand, *Acta Crystallogr.*, 1952, **5**, 581.
- [28] F. Auriemma, C. De Rosa, *Macromolecules*, 2009, **42**, 5179.
- [29] C. De Rosa, F. Auriemma, *Prog. Polym. Sci.*, 2006, **31**, 145.
- [30] C. De Rosa, F. Auriemma, O. Ruiz de Ballesteros, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 3523.

### The X-Ray Diffraction for the Structural Analysis of Polymeric Materials and Beyond

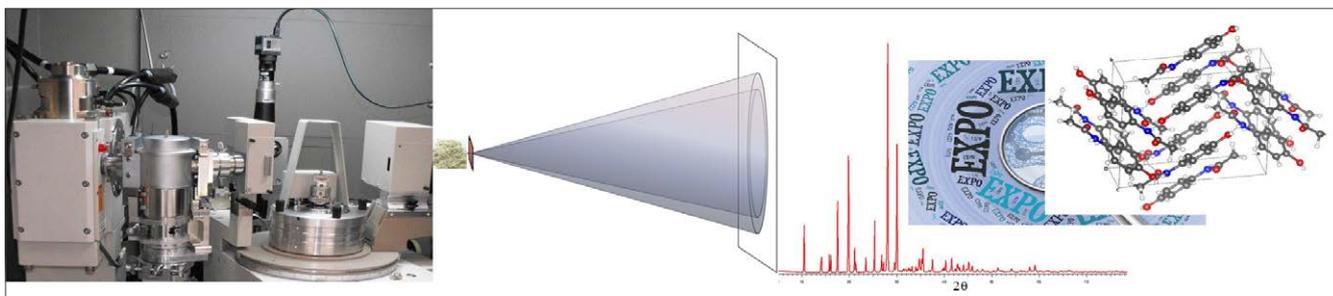
Understanding material properties at molecular level is still a challenge. The study of the structure of polymers with the use of diffraction techniques paves the way toward this objective, with the aim of discovering the laws for the design of material properties directly in the reactor plants.



ANGELA ALTOMARE, NICOLA CORRIERO, CORRADO CUOCCI, AURELIA FALCICCHIO,  
ANNA MOLITERNI, ROSANNA RIZZI, MICHELE SAVIANO  
ISTITUTO DI CRISTALLOGRAFIA-CNR, BARI  
ANGELA.ALTOMARE@IC.CNR.IT

# LA SFIDA DELLA SOLUZIONE STRUTTURALE DA POLVERI IN CRISTALLOGRAFIA

*Negli ultimi venticinque anni il metodo della diffrazione da polveri è stato applicato con successo crescente per risolvere strutture cristalline (composti organici, inorganici, metallorganici). Nonostante ciò, la soluzione strutturale da polveri è ancora oggi una sfida perché i problemi del metodo, dovuti principalmente all'interpretazione dei dati sperimentali, devono essere ancora risolti.*



La cristallografia è una scienza multidisciplinare che, utilizzando l'informazione fornita dalla diffrazione X, o da neutroni o da elettroni, permette di caratterizzare un materiale cristallino su scala atomica e di risalire alla relazione struttura-proprietà. L'interesse verso gli studi cristallografici è sempre più crescente non solo in ambito scientifico (Chimica, Scienze dei Materiali, Scienze Farmaceutiche, Mineralogia, Biologia...), ma anche industriale (ad esempio farmaci, catalizzatori, coloranti, pigmenti).

Molti materiali cristallini non possono essere preparati sotto forma di cristalli di dimensione sufficiente per essere studiati con le tecniche di diffrazione tipiche del cristallo singolo. In tal caso il metodo di diffrazione da polveri è una scelta obbligata e rappresenta l'unica possibilità per poter caratterizzare il materiale. D'altronde, per molti materiali di importanza industriale, è fondamentale che essi vengano preparati e utilizzati sotto forma di polveri microcristalline, per esempio, allo scopo di incrementare

la loro area superficiale (ad esempio i catalizzatori), per potenziare la loro dispersibilità (ad esempio i pigmenti) e per ottimizzare la loro solubilità (ad esempio i farmaci). È importante che questi materiali vengano analizzati nelle stesse condizioni in cui vengono utilizzati.

Una polvere ideale è costituita da numerosi microcristalliti (dimensioni tipiche 1-10  $\mu\text{m}$ ) orientati nello spazio in modo casuale. Il metodo di diffrazione da polveri, introdotto nel 1916 da Debye e Scherrer, è stato applicato, per circa cinquant'anni, esclusivamente per l'analisi qualitativa (identificazione della/e fase/i cristallina/e presente/i in una polvere), semi-quantitativa (stima approssimata delle percentuali in peso delle fasi presenti in una polvere) e per misure di stress macroscopico. Il metodo ha ampliato il suo spettro di applicazione a partire dal 1969 grazie a Hugo Rietveld [1], che propose una procedura di affinamento strutturale di grande successo basata sull'uso dell'intero profilo di diffrazione da polveri.



Negli ultimi venticinque anni, i notevoli progressi in campo metodologico e computazionale, associati all'uso di computer dalla potenza di calcolo elevata, a diffrattometri di nuova generazione e alla disponibilità della luce di sincrotrone, hanno consentito di applicare con successo il metodo delle polveri anche alla soluzione strutturale. Tale applicazione era impensabile fino agli anni Ottanta, essendo storicamente riservata alla diffrazione da cristallo singolo.

Il numero e la complessità delle strutture cristalline risolte mediante la diffrazione da polveri è ad oggi in crescita. Fino al 2002 le strutture risolte e depositate nel Cambridge Structural Database (CSD) erano in totale 370 [2], a cui si sono successivamente aggiunte in media 82 strutture per anno (tale numero è stato calcolato considerando il periodo 2003-2012) [3]. Malgrado ciò, la diffrazione da polveri continua a presentare dei limiti che possono rendere il processo di soluzione strutturale particolarmente complicato e talvolta fallimentare anche nel caso di strutture di modesta complessità (molecole con pochi atomi non-H nell'unità asimmetrica). Il principale limite del metodo è legato alla monodimensionalità del profilo sperimentale e alla conseguente sovrapposizione dei picchi di diffrazione, a cui possono aggiungersi problemi addizionali, quali, ad esempio, l'orientazione preferenziale dei cristalliti (quando i cristalliti non sono distribuiti casualmente nello spazio) e un'errata definizione del segnale di fondo.

Il processo di soluzione da dati da polveri consta di alcune fasi: determinazione della cella cristallina, identificazione del gruppo spaziale, estrazione delle intensità integrate di diffrazione, soluzione e affinamento strutturale. Ciascuna di queste fasi presenta delle criticità, tanto da limitare, a tutt'oggi, la soluzione solo alle piccole molecole. Ciò non ha ostacolato l'interesse anche verso lo studio di macromolecole. Vale la pena citare il lavoro pionieristico di Von Dreele [4] che nel 1999 ha affinato per la prima volta la struttura della metmioglobina, applicando il metodo Rietveld, guidato da vincoli stereochimici. Da allora si è sviluppato un intraprendente filone di ricerca rivolto all'applicazione della diffrazione da polveri anche alla caratterizzazione di proteine.

I metodi utilizzati per la soluzione sono di due tipi: i metodi tradizionali (ad esempio Metodi Diretti), detti anche metodi *ab-initio*, che operano nello spazio reciproco [5] e i metodi che operano nello spazio reale (metodi di ottimizzazione globale) [6]. Questi ultimi hanno permesso di estendere ulteriormente i confini di applicazione della diffrazione da polveri, consen-

tendo di risolvere strutture cristalline sempre più complesse come, ad esempio, il composto farmaceutico clorotiazide (diuretico) solvatato con dimetilformamide (94 atomi nell'unità asimmetrica) [3].

Sono stati sviluppati numerosi programmi di calcolo dedicati a una (o più) fasi del processo di soluzione. Tra questi, uno dei più diffusi è il software EXPO [7], capace di eseguire tutte le fasi del processo di soluzione in modo prevalentemente automatico e di operare sia nello spazio reciproco (scelta di *default*) che nel diretto.

### Determinazione della cella cristallina

La determinazione della cella cristallina, processo noto anche come indicizzazione, è il primo passo da effettuare nel percorso che conduce alla soluzione di una struttura. Un'errata valutazione dei parametri di cella preclude ogni altra fase successiva del processo di soluzione [8]. Il numero di parametri da determinare varia da 1 a 6, a seconda della simmetria del cristallo: è massimo nel caso di simmetria più bassa (sistema cristallino triclino) e decresce al crescere della simmetria (è pari ad 1 nel caso del sistema cristallino cubico).

Il processo di indicizzazione è così chiamato perché assegna ad ogni effetto di diffrazione, detto anche riflesso, un'appropriata terna di indici, detti indici di Miller ( $hkl$ , o, in termini vettoriali,  $\mathbf{h}$ ), che definiscono la famiglia di piani con distanza interplanare  $d_h$  coinvolti nella diffrazione. La posizione dei picchi sperimentali dipende dall'angolo  $\theta_h$ , legato alla distanza interplanare  $d_h$  dalla nota legge di Bragg  $2d_h \sin \theta_h = \lambda$ , con  $\lambda$  lunghezza d'onda della radiazione sperimentale. Dai dati sperimentali si risale alla cella reciproca (i cui parametri sono  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $c^*$ ,  $\alpha^*$ ,  $\beta^*$  e  $\gamma^*$ ) e, da questa, si ricava la cella diretta (i cui parametri sono  $a$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).

Nel caso del cristallo singolo i dati sperimentali sono tridimensionali e gli effetti di diffrazione sono generalmente ben separati, di conseguenza, la determinazione dei parametri di cella è un obiettivo raggiunto con facilità. Nel caso delle polveri la monodimensionalità del profilo di diffrazione può rendere il processo particolarmente complicato e, a volte, irrealizzabile.

I metodi tradizionali di indicizzazione ricavano i parametri  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $c^*$ ,  $\alpha^*$ ,  $\beta^*$  e  $\gamma^*$  nello spazio reciproco, risolvendo l'equazione fondamentale dell'indicizzazione, che lega i valori di  $d_h$  ai corrispondenti indici  $h$ ,  $k$ ,  $l$  e ai parametri di cella incogniti. Tali metodi sono alla base dei programmi di calcolo più largamente utilizzati dalla comunità scientifica.

Metodi alternativi ai tradizionali, di sviluppo più recente, si basano su algoritmi di ottimizzazione globale (ad esempio, Monte Carlo, algoritmo genetico) e operano nello spazio reale [8].

A causa di fattori, molteplici e spesso concomitanti (ad esempio, la sovrapposizione dei picchi di diffrazione, e/o errori nella posizione di  $2\theta$  zero, e/o basso grado di cristallinità del campione, e/o basso rapporto segnale/rumore di fondo...), i valori di  $d_h$ , ricavati sperimentalmente, sono spesso affetti da errori che compromettono il processo di indicizzazione. Un'altra possibile causa di fallimento del processo di indicizzazione è dovuta alla presenza di picchi di diffrazione non attribuibili alla fase cristallina di interesse. Ciò accade in presenza di più di una fase, in particolare nel caso di impurezze o di miscela multicristallina.

Un ulteriore punto critico è legato alla non unicità della soluzione trovata: spesso il processo di indicizzazione fornisce più di una cella plausibile; si pone, quindi, il problema di riconoscere quella corretta. A tale scopo sono stati proposti strumenti matematici (figure di merito), che permettono di valutare la plausibilità delle soluzioni.

## Determinazione del gruppo spaziale

Una volta individuati i parametri di cella e il corrispondente sistema cristallino, la fase successiva del processo di soluzione strutturale è la determinazione del gruppo spaziale.

Un'analisi statistica delle intensità integrate dei picchi sperimentali di diffrazione consente di ottenere informazioni sulla simmetria [9-11]. In particolare, l'intensità integrata nulla di classi di riflessi con determinata parità degli indici ( $hkl$ ) è dovuta alla presenza di elementi di simmetria. Tale indicazione, combinata con l'informazione del gruppo di Laue, consente di determinare il simbolo di estinzione (SE) e, da quest'ultimo, il gruppo spaziale. Il numero dei possibili simboli di estinzione varia con il sistema cristallino: 14 gruppi di estinzione per il monoclino, 111 per l'ortorombico, 31 per il tetragonale, 12 per il trigonale-esagonale e 18 per il sistema cubico. La determinazione del simbolo di estinzione si basa sulle stime delle intensità integrate di diffrazione, che, nel caso delle polveri, sono affette da errori inevitabili (v. paragrafo successivo).

Metodi per la determinazione del gruppo spaziale, basati su approcci probabilistici, sono stati proposti da Markvardsen e collaboratori [12] e Altomare e collaboratori [9-11]. Tali approcci consentono di calcolare un valore di probabilità per ogni SE compatibile

con il sistema cristallino determinato in fase di indicizzazione. Non sempre il simbolo di estinzione definisce in modo univoco il gruppo spaziale; è possibile, infatti, che ad uno stesso SE corrispondano più di un gruppo spaziale. Ad esempio, se si considera il sistema monoclino, al simbolo di estinzione ' $P 1_1$ ' corrispondono tre gruppi spaziali ( $P2$ ,  $Pm$ ,  $P2/m$ ). In tal caso per individuare il gruppo spaziale corretto si può optare per una delle due seguenti alternative:

- effettuare il processo di soluzione strutturale per ognuno dei possibili gruppi spaziali e scegliere la soluzione corretta tra tutte le soluzioni candidate;
- risolvere la struttura cristallina selezionando il gruppo spaziale più frequente in letteratura che è maggiormente in accordo con le proprietà molecolari del materiale in esame.

## Estrazione delle intensità integrate di diffrazione

Il processo di estrazione delle intensità integrate consiste nella decomposizione del profilo sperimentale al fine di stimare l'area sottesa da ciascun picco di diffrazione.

Si tratta di un processo non semplice ma necessario se si sceglie di applicare i metodi tradizionali operanti nello spazio reciproco (ad esempio Metodi Diretti). Esso non è invece richiesto nei casi di soluzione mediante metodi nello spazio diretto (v. paragrafo successivo).

I problemi legati all'interpretazione dei dati da polveri, sovrapposizione dei picchi di diffrazione, orientazione preferenziale dei cristalliti, errata stima del segnale di fondo, ostacolano il corretto processo di estrazione delle intensità e sono responsabili di inevitabili errori, spesso gravi, sulla loro stima (errori medi intorno al 40%).

Il grado di accuratezza del processo di estrazione delle intensità integrate dipende principalmente:

- dalla qualità dei dati sperimentali (ad esempio, se si utilizzano sorgenti da sincrotrone, i picchi di diffrazione sono meglio risolti e meno sovrapposti e il rapporto segnale/rumore è più elevato rispetto al caso di dati da diffrattometro convenzionale);
- dalle tecniche matematiche su cui il metodo di decomposizione è basato.

I due approcci alternativi, storicamente più applicati per l'estrazione delle intensità integrate di un profilo di diffrazione sono il metodo di Pawley [13] e il metodo di Le Bail [14].

Vale la pena evidenziare un'efficace proprietà dell'algoritmo di Le Bail: la dipendenza dai valori iniziali delle intensità assegnati ai riflessi [15]. Ciò ha suggerito

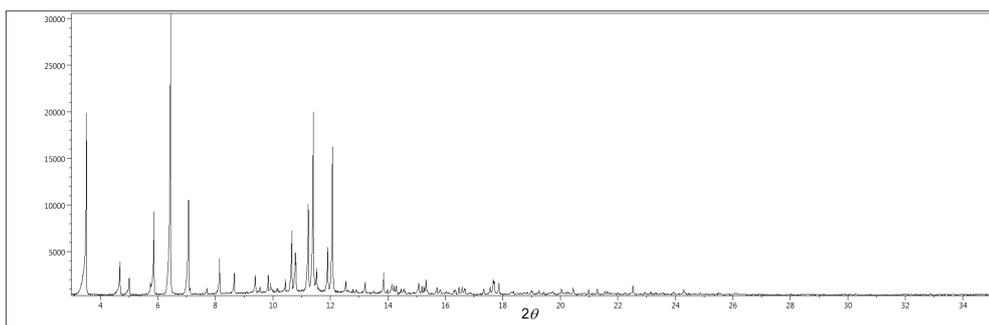


Fig. 1 - Profilo di diffrazione da polveri microcristalline del cocrystallo  $C_9H_{11}N_3O \cdot C_7H_6O_4$

rito lo sviluppo di una serie di procedure che, utilizzando informazioni a priori nell'algoritmo di Le Bail (riguardanti pseudosimmetria, orientazione preferenziale, mappa Patterson, frammento ben posizionato e orientato), possono ridurre sensibilmente gli errori sulla stima delle intensità integrate.

Come esempio di profilo di diffrazione da polveri, nella Fig. 1 si riporta quello relativo al cocrystallo  $C_9H_{11}N_3O \cdot C_7H_6O_4$ , relativo alle due molecole di isoniazide e niazide, di notevole importanza farmaceutica (in particolare, la prima molecola è ampiamente usata come agente antitubercolare) [16]. Il profilo è stato raccolto sulla linea X16C del 'National Synchrotron Light Source' di Brookhaven, con lunghezza d'onda di 0,6999 Å. Il software EXPO determina automaticamente i parametri di cella  $a=8,5813$ ,  $b=22,7241$ ,  $c=8,8513$  Å,  $\beta=95,760^\circ$  e il gruppo spaziale  $P2_1/c$ . La procedura di estrazione stima l'intensità integrata di 1139 riflessi corrispondenti ai picchi di diffrazione contenuti nel profilo, sovrapposti tra loro con un livello di sovrapposizione medio dell'ordine del 46%, stimato in accordo ad Altomare *et al.* [17].

### Soluzione strutturale nello spazio reciproco

Le informazioni disponibili al termine del processo di decomposizione del profilo di diffrazione sono le intensità integrate dei riflessi  $\{I_h\}$ , le quali non sono sufficienti per poter risalire alla struttura cristallina del composto di interesse. L'intensità  $I_h$  del riflesso  $h$  è proporzionale al quadrato del modulo del fattore di struttura  $F_h \cdot F_h^*$ , entità complessa definita da un modulo ( $|F_h|$ ) e da una fase ( $\varphi_h$ ), rappresenta l'ampiezza totale dell'onda diffratta dagli atomi del cristallo che giacciono sulla famiglia di piani ( $hkl$ ). Per determinare la struttura è necessario ricavare la mappa di densità elettronica  $\rho(\mathbf{r})$  calcolata dalla trasformata di Fourier inversa di  $F_h$ . Lo studio della mappa di densità elettronica, guidato dalla conoscenza della composizione chimica del materiale, permette di localizzare le posizioni dei picchi nella mappa e assegnare loro una

specie atomica in base alle loro intensità, ottenendo un modello strutturale chimicamente interpretabile. Il ruolo del fattore di struttura è quindi determinante: esso contiene in sé l'informazione strutturale, essendo una funzione delle coordinate degli atomi presenti nel

composto e del loro fattore di diffusione. La funzione densità elettronica  $\rho(\mathbf{r})$  può essere calcolata, a condizione che siano noti sia i moduli che le fasi dei fattori di struttura. Sfortunatamente l'informazione sulla fase è perduta nell'esperimento di diffrazione. Risolvere una struttura cristallina mediante i metodi tradizionali che operano nello spazio reciproco equivale quindi a risolvere quello che in cristallografia è noto come *il problema della fase*.

I Metodi Diretti [5] sono i principali metodi tradizionali di soluzione strutturale operanti nello spazio reciproco, in grado di risolvere strutture cristalline di varia natura (organica, inorganica, metallorganica). Come lo stesso nome suggerisce, essi determinano le fasi dei riflessi *direttamente dalle osservazioni sperimentali* attraverso metodi matematici di tipo statistico-probabilistico che si basano sulle seguenti assunzioni: 1) positività della  $\rho(\mathbf{r})$ ; 2) atomicità di  $\rho(\mathbf{r})$ ; 3) posizioni atomiche considerate variabili *random* uniformemente distribuite nella cella. Grazie ai sorprendenti avanzamenti metodologici sviluppati nel corso degli anni, oggi il processo di soluzione da cristallo singolo attraverso i Metodi Diretti è routinario, affidabile, veloce (richiede pochi minuti) sia nel caso di piccole molecole che di medie molecole (fino a 300 atomi non-H nell'unità asimmetrica). Si stima che più di 5000 nuove strutture da cristallo singolo sono risolte all'anno grazie ai Metodi Diretti. Tale progresso, sebbene ancora in atto, non può ancora estendersi, negli stessi termini, alla soluzione da polveri anche di piccole molecole, a ragione della difficoltà a ricavare valori sperimentali di  $|F_h|$  accurati e, di conseguenza, valori di  $\varphi_h$  affidabili. Un'attenzione particolare è stata rivolta allo sviluppo di approcci computazionali innovativi per migliorare il processo di stima di  $|F_h|$  [15], senza dubbio il punto più critico della soluzione *ab-initio* da polveri. Un'ulteriore difficoltà riguarda la risoluzione sperimentale spesso lontana da quella atomica ( $>1,0$  Å), in particolare nel caso di strutture organiche, a causa del rapido decadimento dei loro

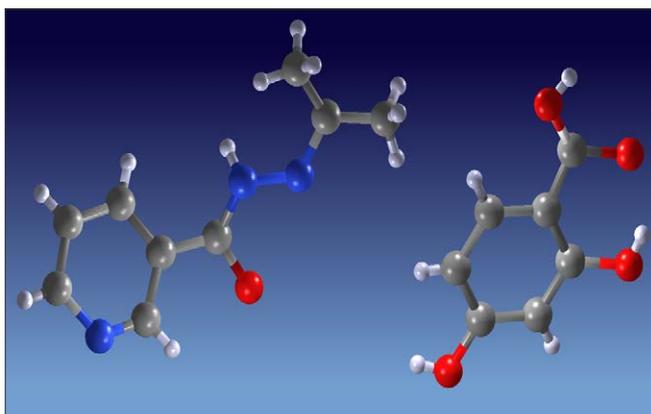


Fig. 2 - Struttura atomica del cocrystallo  $C_9H_{11}N_3O \cdot C_7H_6O_4$  (unità asimmetrica), risultato del processo di soluzione strutturale *ab-initio*, realizzato dal software *EXPO*

fattori di diffusione. Le problematiche si combinano in modo tale che il modello strutturale che si ricava dalla  $\rho(\mathbf{r})$  è talvolta non chimicamente interpretabile, e spesso imperfetto: alcuni atomi sono mancanti, altri posizionati in modo approssimato ecc. L'ottimizzazione del modello si rende necessaria. Le procedure di ottimizzazione finora sviluppate si basano principalmente su:

- 1) cicli di minimi quadrati opportunamente pesati che minimizzano la differenza tra i moduli dei fattori di struttura osservati e calcolati dal modello strutturale. L'originalità del metodo consiste nell'aver individuato un peso associato ad ogni riflesso  $\mathbf{h}$  che tiene conto dell'affidabilità del valore sperimentale di  $|F_{\mathbf{h}}|$  in funzione del livello di sovrapposizione del picco di diffrazione corrispondente ad  $\mathbf{h}$  nel profilo sperimentale [18]. Tale procedura è di particolare efficacia per il miglioramento di modelli strutturali di composti inorganici;
- 2) correzione degli errori presenti nella mappa di densità elettronica dovuti alla risoluzione sperimentale limitata: allargamento e spostamento dei picchi, presenza di intensità negative. Il metodo, denominato RBM (acronimo di *Resolution Bias Modification*) [19, 20], consente di eliminare picchi falsi e localizzare atomi inizialmente mancanti, completando o migliorando notevolmente modelli strutturali anche molto imperfetti e incompleti. Tale approccio è particolarmente indicato per correggere la mappa di densità relativa a materiali organici e metallorganici;
- 3) correzione della mappa di densità elettronica sfruttando il principio di covarianza tra punti della mappa (COVMAP) [21].

In Fig. 2 è mostrato il risultato del run automatico di *EXPO* per la soluzione del cocrystallo  $C_9H_{11}N_3O \cdot C_7H_6O_4$ .

## Soluzione strutturale nello spazio reale

I metodi di soluzione strutturale che agiscono nello spazio diretto, contrariamente al caso dei metodi nello spazio reciproco, hanno il vantaggio di non richiedere l'estrazione delle intensità integrate. La loro applicazione ha contribuito a potenziare notevolmente il successo del metodo delle polveri, consentendo di risolvere strutture sempre più complesse, anche nel caso di dati a bassa risoluzione, casi in cui, in genere, i metodi di soluzione tradizionali falliscono.

I metodi nello spazio diretto presentano però lo svantaggio, rispetto ai metodi nello spazio reciproco, di richiedere a priori l'informazione sulla geometria molecolare. Si tratta di metodi stocastici basati sulla generazione di numerosi modelli strutturali random tutti compatibili con l'informazione sulla geometria molecolare attesa. A ogni modello che varia per posizione, orientazione e conformazione interna, si associa una funzione costo che valuta l'attendibilità del modello (ad esempio l'indice di accordo tra profilo osservato e calcolato). Lo scopo dei metodi nello spazio diretto (noti anche come metodi di ottimizzazione globale) è cercare la configurazione ottimale corrispondente al minimo della funzione costo. Sono stati sviluppati metodi basati su varie tecniche di ottimizzazione, tra cui si menziona: algoritmo genetico, simulated annealing (SA) [6], e hybrid big-bang big-crunch [22].

Una metodica ormai ampiamente diffusa consiste nel validare le soluzioni ottenute da metodi nello spazio diretto tramite ottimizzazione geometrica mediante DFT-D (dispersion-corrected density functional theory) [23].

I metodi di ottimizzazione globale implementati in *EXPO* sono *simulated annealing* e *hybrid big-bang big-crunch*. Un esempio di soluzione strutturale di successo tramite simulated annealing in *EXPO* è mostrato in Fig. 3. Esso riguarda il composto penta-peptidico  $Z-(Aib)_5-O-t-Bu-C_{32}H_{51}N_5O_8$ , con 45 atomi non-H nell'unità asimmetrica (numero di atomi troppo elevato per la soluzione tramite Metodi Diretti) e risoluzione sperimentale di 1,2 Å, struttura già risolta in passato con dati da cristallo singolo [24]. Il numero totale di gradi di libertà del modello strutturale è 26 (3 per la posizione, 3 per l'orientazione e 20 per le torsioni). Al termine di 100 *run* di SA, *EXPO* ordina i corrispondenti modelli strutturali in funzione di valori crescenti di una funzione costo (l'indice di accordo pesato tra profilo di diffrazione osservato e calcolato) e seleziona correttamente la soluzione mostrata in Fig. 3 (gli atomi di H sono stati trascurati nel processo di soluzione strutturale).

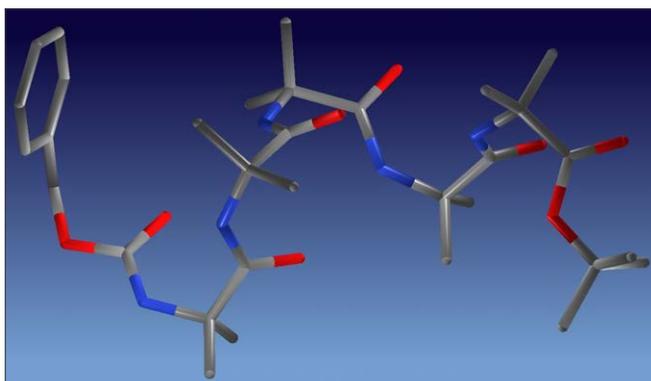


Fig. 3 - Struttura atomica del pentapeptide Z-(Aib)<sub>5</sub>-O-t-Bu (unità asimmetrica; gli atomi di H sono stati trascurati nel processo di soluzione strutturale), risultato del processo di soluzione strutturale mediante simulated annealing, realizzato dal software EXPO

### Conclusioni

Negli ultimi venticinque anni, il metodo della diffrazione da polveri microcristalline si è rivelato uno strumento analitico potente e di estrema utilità per lo studio di materiali disponibili solo nella forma di polveri. La confidenza nel metodo da polveri si è spinta a tal punto da tentare, con esiti positivi in molti casi, anche la caratterizzazione di piccole proteine. Il processo di soluzione strutturale da polveri, più complesso di quello da cristallo singolo, è stato ottimizzato in tutte le sue fasi, grazie allo sviluppo metodologico, computazionale e sperimentale rivolto in tale direzione. L'avanzamento, sia dei metodi che operano nello spazio reciproco che di quelli che lavorano nello spazio reale, hanno ampliato il *range* di applicazione a composti di diversa natura: organici, inorganici, metallorganici, ibridi, con livello di complessità strutturale crescente nel corso degli anni (fino a 100 atomi nell'unità asimmetrica) e con risoluzione sperimentale anche abbastanza lontana da quella atomica (fino a 2,0 Å). Si tratta di traguardi impensabili fino a qualche anno fa. Il software EXPO, supportato da continui sviluppi metodologici e da elevate potenzialità grafiche e computazionali, ha contribuito ad incrementare il numero di strutture risolte da polveri. L'obiettivo di migliorare il processo di soluzione strutturale da polveri in modo tale da renderlo sempre più confrontabile con quello da cristallo singolo è una sfida scientifica per il presente e futuro.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] H.M. Rietveld, *J. Appl. Crystallogr.*, 1969, **2**, 65.
- [2] F.H. Allen, *Acta Crystallogr.*, 2002, **B58**, 380.
- [3] K. Shankland *et al.*, *Acta Crystallogr.*, 2013, **C69**, 1251.
- [4] R.B. Von Dreele, *J. Appl. Crystallogr.*, 1999, **32**, 1084.
- [5] C. Giacovazzo, *Phasing in Crystallography: A Modern Perspective*, IUCr/Oxford University Press, Oxford, England, 2013.
- [6] R. Cerny *et al.*, *Z. Kristallogr.*, 2007, **222**, 105.
- [7] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2013, **46**, 1231.
- [8] A. Altomare *et al.*, Indexing and Space Group determination, In Dinnebier, R.E. & Billinge, S.J.L. (Eds.), *Powder Diffraction Theory and Practice*, Cambridge, RSC Publishing, 2008, 206.
- [9] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2004, **37**, 957.
- [10] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2005, **38**, 760.
- [11] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, **40**, 743.
- [12] A.J. Markvardsen *et al.*, *Acta Crystallogr.*, 2001, **A57**, 47.
- [13] G.S. Pawley, *J. Appl. Crystallogr.*, 1981, **14**, 357.
- [14] A. Le Bail *et al.*, *Math. Res. Bull.*, 1988, **37**, 447.
- [15] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 1996, **29**, 667.
- [16] S.H. Lapidus *et al.*, *Acta Crystallogr.*, 2012, **C68**, o335.
- [17] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 1995, **28**, 738.
- [18] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2006, **39**, 558.
- [19] A. Altomare *et al.*, *Acta Crystallogr.*, 2008, **A64**, 326.
- [20] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2008, **41**, 592.
- [21] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2012, **45**, 789.
- [22] A. Altomare *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2013, **46**, 779.
- [23] J. van de Streek, *et al.*, *Acta Crystallogr.*, 2014, **B70**, 1020.
- [24] E. Benedetti, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 2437.

### The Challenge of Structural Solution by Powders in Crystallography

In the last 25 years the powder diffraction method has been applied more and more successfully to solve crystal structures (organic, inorganic, metal-organic compounds). Despite this, structure solution by powder is still now a challenge because problems of the method, mainly related to the interpretation of the experimental data, must still be solved.



MATTEO DALDOSSO, ZADEO CIMAROSTI, BRIGIDA ALLIERI  
APTUIT, CENTER FOR DRUG DISCOVERY & DEVELOPMENT, VERONA  
MATTEO.DALDOSSO@APTUIT.COM

# LA DIFFRAZIONE DI RAGGI X DA POLVERI E IL “PROBLEMA DELLA FORMA” IN CAMPO FARMACEUTICO

*I principi attivi farmaceutici (API) spesso presentano la tendenza ad ordinarsi allo stato solido in differenti strutture cristalline, dette polimorfi, che possono presentare proprietà chimico-fisiche molto diverse. La scelta della forma di un determinato principio attivo per lo sviluppo farmaceutico ha un impatto enorme sulle proprietà stesse della prodotto finale: il “problema della forma” presenta implicazioni in campo etico, terapeutico, brevettuale, commerciale ed economico. La diffrattometria a raggi X per polveri (X-Rays Powdern Diffraction, XRPD) è la tecnica principe per la determinazione e quantificazione delle varie forme solide (polimorfi, solvati, idrati, amorfo, sali, co-cristalli, etc.) di un determinato composto e quindi uno strumento analitico imprescindibile per dare risposta al “problema della forma”.*

*It is at least this author's opinion that every compound has different polymorphic forms and that, in general, the number of forms known for each compound is proportional to the time and money spent in on that compound.*

*Walter C. McCrone, 1965.*

Il 1° marzo del 1996 la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti d'America ha approvato il Ritonavir (Norvir), farmaco scoperto e sviluppato dalla società farmaceutica Abbott, noto con la sigla ABT-538 nella sua fase sperimentale.

Il Ritonavir è un farmaco antiretrovirale appartenente alla classe degli inibitori delle proteasi utilizzato nel trattamento dell'infezione del virus HIV e frequentemente inserito nella terapia HAART (terapia antiretrovirale altamente attiva), che consiste nella combinazione di farmaci inibitori delle proteasi con altri farmaci atti a bloccare la proliferazione del virus HIV. Questo farmaco è stato lanciato sul mercato in capsule per somministrazione orale, formulato partendo dall'unica forma cristallina nota durante il suo sviluppo, denominata forma I.

Nel 1998, del tutto inaspettatamente, una nuova forma cristallina (forma II) del Ritonavir è apparsa: una forma con struttura a minor energia libera e conseguentemente più stabile se paragonata alla forma I [1]. La forma II presentava caratteristiche chimico-fisiche ben diverse dalla forma commercializzata: era drammaticamente meno solubile e di conseguenza molto meno bio-disponibile, inficiando l'efficacia terapeutica della formulazione originale. In più, la comparsa della forma II ha compromesso i processi produttivi della forma I in quanto, sebbene presente in tracce, semi (seeds) di forma II catalizzavano l'interconversione delle forme durante il manufacturing. La compromessa efficacia del prodotto commercializzato e l'impossibilità di ottenere la forma solida autorizzata dalla FDA costrinse la Abbott a ritirare

il farmaco dal mercato per un lungo periodo (con un danno economico stimato in 3 milioni di dollari per giorno di assenza del prodotto dal mercato) e poi a sostituire la distribuzione del Norvir in forma solida con una formulazione in sospensione con maggiori problemi di stabilità.

Le capsule sono state poi sostituite da particolari capsule/gel refrigerate e nel 2000 una formulazione modificata in compressa (oggi proprietà dell'azienda AbbVie) è stata approvata per la commercializzazione, eliminando la necessità della conservazione a bassa temperatura.

A seguito di questo episodio, la comunità internazionale e gli enti regolatori hanno cominciato ad

occuparsi (e preoccuparsi) del cosiddetto "Problema della Forma", direttamente connesso al polimorfismo. Il polimorfismo è la tendenza di un composto molecolare (per elementi puri si parla di allotropia) o di miscele stechiometriche di composti ad ordinarsi allo stato solido in differenti strutture cristalline. Si parla poi di idrati (o solvati) quando, per una determinata molecola, acqua (o solvente) viene incorporata nel reticolo cristallino, dando origine a strutture cristallografiche peculiari.

Spesso idrati e solvati vengono denominati pseudo-polimorfi di un dato composto molecolare, tuttavia per motivi "pratici" la definizione di polimorfo dell'FDA non fa distinzioni, includendo solvati ed idrati.

Questo fenomeno è molto comune nei composti organici e, di conseguenza, è quantomai frequente in campo farmaceutico. Esempio emblematico è l'acetaminofene (paracetamolo) che presenta varie "forme": due polimorfi anidri, un solvato, un di-idrato, un tri-idrato (Fig. 1).

Attualmente la FDA richiede alle industrie farmaceutiche sia lo studio del polimorfismo dei farmaci sottoposti a test clinici e successivamente immessi sul mercato sia un monitoraggio continuo del processo di produzione.

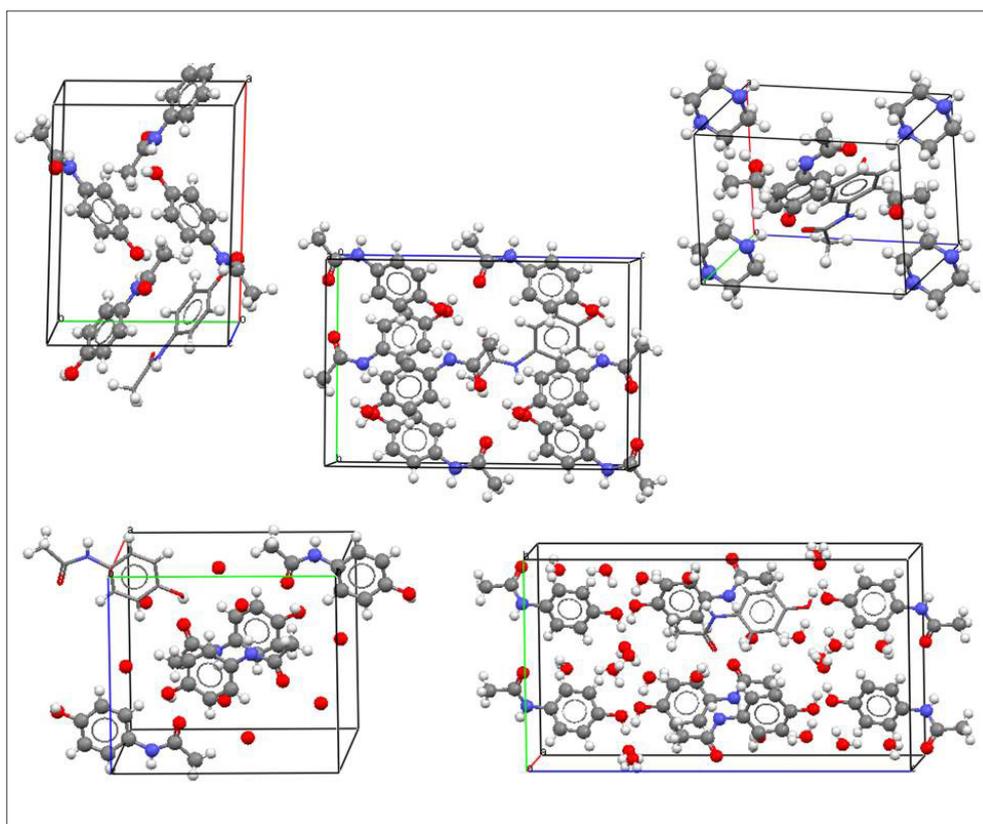


Fig. 1 - Le varie forme dell'acetaminofene (paracetamolo): due polimorfi anidri, un solvato, un di-idrato, un tri-idrato

Questo perchè la scelta della forma cristallina di un determinato principio attivo farmaceutico identificata per lo sviluppo del prodotto finito ha un impatto enorme sulle proprietà stesse della forma farmaceutica finale.

Differenti polimorfi possono infatti avere proprietà chimico-fisiche e meccaniche anche molto diverse (stabilità, velocità di dissoluzione, solubilità, igroscopicità, conducibilità termica ed elettrica, durezza, etc.) con conseguenze notevoli sul loro utilizzo, manipolazione ed assorbimento. Inoltre la possibilità di interconversione tra le varie forme può avere conseguenze molto serie sulla vita di un prodotto e sul mantenimento delle sue proprietà (efficacia terapeutica, stabilità chimica, etc.).

Più in specifico, va considerato che, in funzione di variabili quali temperatura, pressione, umidità relativa, una forma metastabile può trasformarsi in una forma termodinamicamente più stabile, oppure una forma cristallina anidra può trasformarsi in una forma cristallina idrata per assorbimento di vapore dall'ambiente, ed una forma cristallina solvata può, a sua volta, trasformarsi in una forma cristallina anidra o con diverso grado di solvatazione per perdita di solvente.

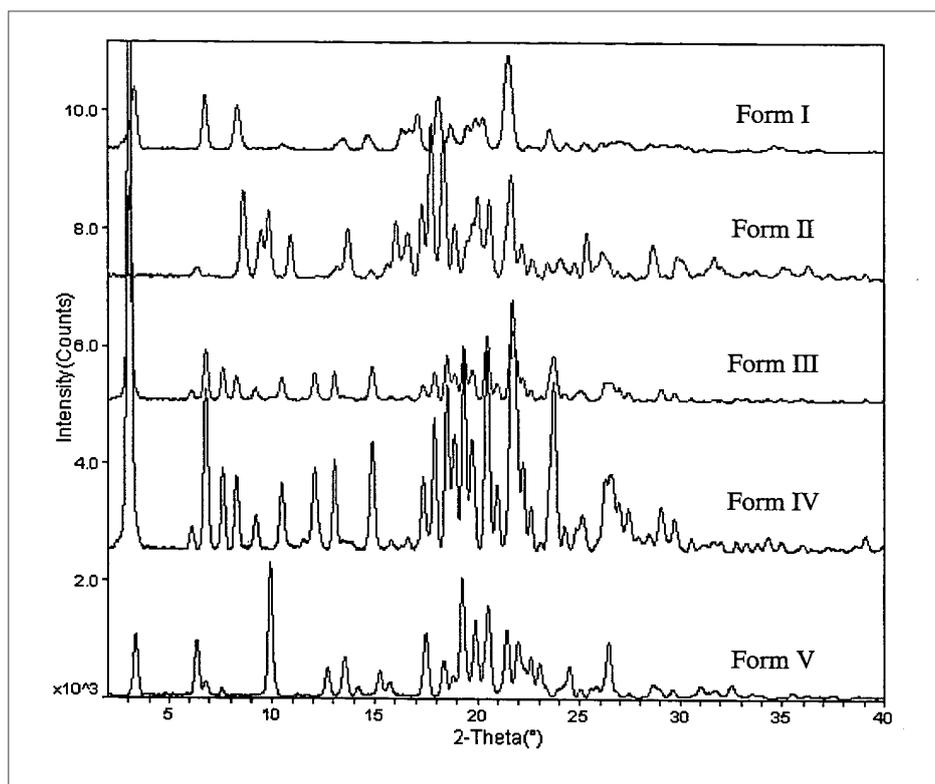


Fig. 2 - Polimorfismo del Ritonavir - pattern XRPD (Brevetto US 2004/0024031 A1)

Quindi lo studio del polimorfismo di un dato principio attivo farmaceutico è un punto fondamentale nello sviluppo di un farmaco in quanto le caratteristiche della forma selezionata hanno implicazioni a 360 gradi.

Spesso il "Problema della Forma" è percepito principalmente come un problema di difesa della proprietà intellettuale per le cause brevettuali che hanno scosso il mercato dei generici (ranitidina cloridrato, terazosin, etc.), ma il caso del Ritonavir dimostra invece quanto il polimorfismo sia in primo luogo un problema etico con ricadute che possono essere gravi sui pazienti che fanno affidamento su una determinata terapia quando questa dovesse inaspettatamente rendersi inefficace.

Il metodo della diffrazione di raggi X da polveri (X-Rays Powder Diffraction, XRPD) è la tecnica analitica sperimentale principe per dare una risposta al "problema della forma" nel campo dello sviluppo farmaceutico.

È il metodo standard di determinazione e quantificazione delle varie forme solide (polimorfi, solvati, idrati, amorfo, sali, co-cristalli, etc.) in un principio attivo farmaceutico, dove conoscere l'esatta natura del composto che si intende sviluppare è cruciale per tutte quelle diverse proprietà che le varie forme possono avere e che vanno studiate a fondo.

Basti pensare che, ad esempio, l'European Patent Office (EPO) impone, a chi deposita un brevetto su un farmaco che si presenta sotto forma di polvere cristallina, una caratterizzazione per diffrazione di raggi X.

La Fig. 2 mostra i pattern di diffrazione di raggi X per polveri del Ritonavir (non solo il polimorfo I e II ma anche altre forme scoperte successivamente).

L'interazione tra i raggi X e la materia permette di studiare le proprietà strutturali e microstrutturali di un composto allo stato solido: c'è una diretta ed univoca relazione tra il pattern di diffrazione da raggi X per polveri e l'ordine/disordine strutturale di un dato materiale. La posizione e l'intensità

relativa dei picchi che si notano in un pattern (picchi di Bragg) riflettono la simmetria della cella cristallografica della forma in esame. In caso di miscele, gli stessi picchi (anche detti riflessi) possono essere utilizzati per quantificare il rapporto in massa tra le diverse forme cristalline presenti nella miscela. In più, la forma e la larghezza dei riflessi stessi portano informazioni microstrutturali del materiale.

In generale, un pattern di diffrazione da raggi X per polveri di un materiale cristallino è una sorta di "fingerprint" di un dato composto in una data forma. A tal motivo un numero crescente di database raccolgono sempre più composti e relativi polimorfi per facilitare l'identificazione strutturale del campione in esame e la quantificazione di miscele (citiamo a titolo di esempio il database PDF/4-Organics gestito dall'ICDD, International Center for Diffraction Data, che conta più di mezzo milione di record).

Il metodo di diffrazione da polveri è stato introdotto nel 1916 da Debye e Scherrer e per circa cinquant'anni è stato utilizzato per analisi qualitative (identificazione delle diverse forme presenti nel campione in esame) o semi-quantitative.

Nel 1969 Hugo Rietveld (recentemente scomparso, [2]) ha introdotto una nuova metodologia [3] di raffinamento strutturale basata sull'uso dell'intero pattern di diffrazione (non solo quindi sulle singole



posizioni ed intensità relative dei riflessi di Bragg) che ha riscosso un enorme successo, ampliando l'uso dei dati XRPD all'analisi quantitativa del rapporto in massa delle varie forme presenti nella polvere in esame.

L'introduzione del metodo di Rietveld è stato talmente rilevante che la comunità scientifica ha omaggiato *post mortem* l'autore dando ad un nuovo minerale il suo nome: la rietveldite [4].

Negli ultimi venticinque anni, l'avvento del computer con la sua enorme capacità di calcolo e i significativi progressi nel campo della modellizzazione teorica dei profili di diffrazione hanno permesso di utilizzare dati da polveri per la cosiddetta risoluzione strutturale, applicazione tradizionalmente riservata alla diffrazione di raggi X da cristallo singolo.

A supporto di questi progressi, la tecnologia costruttiva dei diffrattometri per polveri da laboratorio ha fatto passi da gigante, garantendo la generazione di dati a sempre più alta risoluzione (vedi Fig. 3).

L'affinamento delle geometrie di raccolta (riflessione, trasmissione, capillare), l'introduzione di ottiche raffinate come monocromatori, specchi focalizzanti, slitte automatiche e rivelatori a stato solido particolarmente sensibili e veloci (bi-dimensionali) hanno consentito l'acquisizione di pattern di diffrazione per polveri in maniera routinaria con risoluzione angolare sufficiente all'analisi quantitativa dei dati generati con i più moderni metodi matematici di affinamento e modellizzazione [5]. In più, la risoluzione sempre maggiore ottenibile nello spazio reale ha permesso l'uso di questi dati per la determinazione di strutture nano-cristalline e amorfe [6].

In questo modo, lo screening di polimorfismo in campo farmaceutico ha trovato spazio nei laboratori di ricerca delle industrie del settore. La tecnica di diffrazione di raggi X per polveri è quindi diventata uno strumento imprescindibile per l'identificazione di diversi polimorfi (forme) di un dato principio attivo farmaceutico e della quantificazione di miscele.

La possibilità di effettuare esperimenti di diffrazione di raggi X per polveri in condizioni non ambientali ha permesso poi di determinare in maniera efficiente i pattern di intercon-

versione tra un polimorfo ed un altro, i campi di esistenza di forme idrate/forme anidre, la presenza di forme metastabili in condizioni estreme. Questo grazie alla possibilità di utilizzare camere *ad hoc* nei diffrattometri da laboratorio dove possono essere controllate la temperatura (dalla temperatura dell'elio o azoto liquido fino a 1.000 °C), l'umidità relativa e la pressione (vuoto e alte pressioni), permettendo la costruzione di diagrammi di fase e studi cinetici di interconversione *in situ* (point focus, 2D scan).

Ancora, tecniche di interazione tra la materia e la radiazione X non di classica diffrazione di Bragg, ma bensì di diffusione della luce incidente, come small/wide angle scattering (WAXS, SAXS) e grazing-incidence small-angle scattering (GISAS) hanno permesso lo studio dei materiali a livello nanostrutturale e in film sottile.

A seguito di uno screening di polimorfismo, identificata la forma cristallina voluta per lo sviluppo del prodotto finito (in quanto rispondente a requisiti di stabilità termodinamica, solubilità, efficacia, potenza, etc.) e quindi risolto il "problema della forma", assume oggi sempre più importanza la capacità di garantire con un livello di accuratezza elevato la "purezza della forma" allo stato solido. In altre parole è necessario abbassare sempre più il limite di rilevabilità (LoD) di una forma cristallina in un'altra, per garantirne l'aderenza a quanto voluto e dichiarato anche da un punto di vista regolatorio.

L'alta risoluzione dei diffrattometri da laboratorio (basati sulla generazione di raggi X da catodo di rame, molibdeno o argento) spinge tipicamente l'LoD a pochi % (in massa) di una fase rispetto ad un'altra.

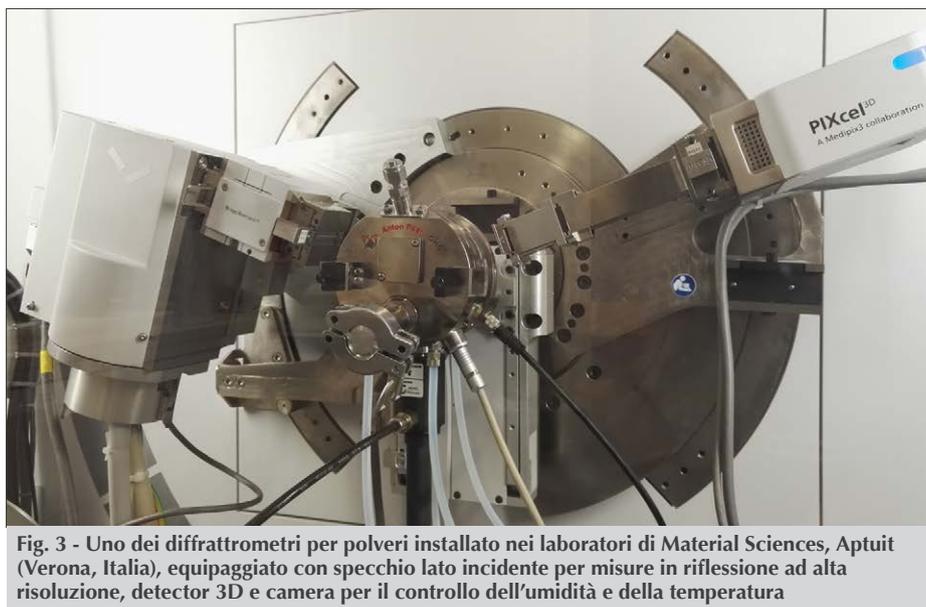


Fig. 3 - Uno dei diffrattometri per polveri installato nei laboratori di Material Sciences, Aptuit (Verona, Italia), equipaggiato con specchio lato incidente per misure in riflessione ad alta risoluzione, detector 3D e camera per il controllo dell'umidità e della temperatura



Fig. 4 - La sede di Aptuit a Verona

Ci sono comunque casi in cui la pur ottima risoluzione dei diffrattometri da laboratorio non è sufficiente e si rivela necessario trovare metodologie alternative per abbassare il limite di rilevabilità di un polimorfo in un altro. I raggi X prodotti da un sincrotrone (la cosiddetta luce di sincrotrone), data la loro alta energia e intensità, accoppiata a rivelatori a stato solido multidimensionali molto veloci, permettono di raccogliere dati di diffrazione da polveri ad altissima risoluzione, utilizzando lunghezze d'onda variabili e tempi di acquisizione molto brevi (per minimizzare il danno da radiazione), abbassando tipicamente l'LoD ben sotto lo 0,5% in massa [7], e in alcuni casi perfino a 0,01% in massa [8], dopo attento "fine-tuning" del set up sperimentale. Altre tecniche non convenzionali per lo studio strutturale dei solidi cristallini sono la diffrazione dei neutroni, dei muoni e l'utilizzo di sorgenti X-FEL (x-rays free electron laser), che troveranno nel futuro sempre maggiori applicazioni in campo farmaceutico.

## Conclusioni

In conclusione, la diffrattometria a raggi X per polveri (XRPD) è di certo la tecnica principe per l'approccio analitico al problema della forma in campo farmaceutico, spesso accoppiata ad altre tecniche sperimentali come spettroscopia Raman, spettroscopia IR, calorimetria a scansione differenziale (DSC) e microscopia a scansione elettronica (SEM) che oggi trovano posto nei più moderni laboratori delle industrie farmaceutiche che affrontano problematiche di stato solido (Fig. 4).

## BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Bauer *et al.*, *Pharm. Res.*, 2001, **6**, 859.
- [2] A. Hewat *et al.*, *J. Appl. Crystallogr.*, 2016, **49**, 1394.
- [3] H.M. Rietveld, *J. Appl. Crystallogr.*, 1969, **2**, 65.

- [4] A.R. Kampf *et al.*, *CNMNC Newsletter*, 2016, **34**, 132 e *Mineralogical Magazine*, 2016, **80**, 131.
- [5] I. Ivanisevic *et al.*, *Uses of X-Ray Powder Diffraction in the Pharmaceutical Industry*, *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development and Manufacturing*, edited by Shayne C. Gad, 2010, p. 1-42.
- [6] T. Davis *et al.*, *Cryst. Growth Des.*, 2013, **13**, 4239.
- [7] F. Gozzo, PPXRD-12 Conference, 2013, Chinese Academy of Science, Beijing, China (see: <http://www.icdd.com/ppxrd/12/presentations/index.htm>).
- [8] F. Gozzo, private communication (see also <https://www.parkinnovaare.ch/pharmaceutical-mixtures-excelsus-achieves-an-unprecedented-level-of-detection>).

## RISORSE

- S.R. Byrn, R.R. Pfeiffer, Joseph G. Stowell, *Solid State Chemistry of Drugs*, 2<sup>nd</sup> Edition, 1999.
- R. Hilfiker, *Polymorphism in the Pharmaceutical Industry*, 2006.
- J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals*, 2002.
- H. Brittain, *Polymorphism in Pharmaceutical Solids*, 1999.

### The X-Rays Powder Diffraction (XRPD) and the "Form Selection Process" in the Pharmaceutical Industry

Active Pharmaceutical Ingredients (API) shows the tendency to get order and crystallize as solids in different structures (forms). This phenomenon is known as polymorphism. In general, different polymorphs show different physicochemical characteristics and properties. Therefore, the selection of the API form for drug product (DP) development is more than critical because the API form itself has a great impact on the properties of the final DP: the form selection problem has ethic, therapeutics, commercial and economic implications. The X-Rays Powder Diffraction (XRPD) is the essential technique for the determination and quantification of polymorphic (or pseudo-polymorphic) forms in a given API in order to effectively support the form selection process.



Italy  
Section



AIS-ISA Italy CONFERENCE AND EXHIBITION | COINCIDING WITH 4TH ISA EMEA

# AUTOMATION INSTRUMENTATION SUMMIT



**JULY 5/6 2017**  
CASTELLO DI BELGIOIOSO  
PAVIA | ITALY

## CALL FOR PAPERS

SUBMIT AN ABSTRACT FOR AIS-ISA Italy CONFERENCE 2017  
ABSTRACT SUBMISSION DEADLINE:  
FRIDAY, APRIL 28 2017

Promoted by AIS-ISA Italy



Organised and hosted by



Golden sponsor



Main Italy Editor



Under the patronage of





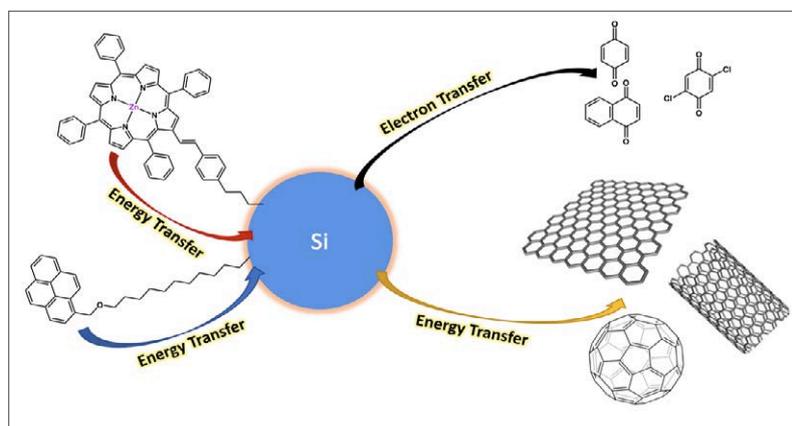
RAFFAELLO MAZZARO  
PHOTONANOLAB, DIPARTIMENTO DI CHIMICA "G. CIAMICIAN", UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CNR-IMM, BOLOGNA  
RAFFAELLO.MAZZARO2@UNIBO.IT

# NANOCRISTALLI DI SILICIO: UNA PIATTAFORMA FUNZIONALE PER LA COSTRUZIONE DI NANOSTRUTTURE IBRIDE PER LA CONVERSIONE DI ENERGIA

*L'articolo riassume l'attività di ricerca condotta dal nostro gruppo riguardo lo studio di processi di conversione di energia attuati da nanocristalli di silicio funzionalizzati con cromofori organici, per l'applicazione in dispositivi fotovoltaici ed optoelettronici.*

Il silicio è il secondo elemento più abbondante sulla crosta terrestre, ma certamente la prima scelta per l'industria microelettronica. Questo elemento ha svolto infatti la funzione di capostipite dell'industria dei semiconduttori, permettendo la miniaturizzazione dei componenti elettronici e il loro utilizzo in un numero incredibilmente vasto di applicazioni.

La riduzione delle dimensioni di tali strutture all'interno di chip e transistor ha rappresentato il *leit-motiv* dell'industria elettronica, seguendo la previsione fatta dalla legge di Moore nel 1965 [1], secondo il quale il numero di transistor all'interno di un circuito integrato è destinato a raddoppiare ogni anno. Tale legge è stata nel tempo ridimensionata [2], anche grazie all'osservazione che la miniaturizzazione di strutture a semiconduttori al di sotto della decina di nanometri porta a drastiche modifiche delle proprietà ottiche ed elettriche del materiale, grazie al cosiddetto effetto di confinamento quantico



[3]. Questo effetto può risultare però di grande interesse per applicazioni alternative alla microelettronica convenzionale, come ad esempio lo sviluppo di sistemi fotovoltaici ibridi, sorgenti di luce di tipo led o sensori luminescenti per ambiente biologico.

I nanocristalli di silicio, nello specifico, rappresentano una nuova classe di materiali luminescenti dotati di un'elevata resa quantica di emissione e uno spettro caratteristico la cui lunghezza d'onda risulta essere direttamente correlata alle dimensioni del nanocristallo stesso, secondo i dettami dell'effetto di confinamento quantico [4].

In aggiunta, essendo il silicio un semiconduttore a *band gap* indiretto, i nanocristalli a base di tale materiale sono caratterizzati da un tempo di vita dello stato eccitato dell'ordine delle centinaia di microsecondi, il quale, in contrasto alla maggior parte dei fluorofori organici, risulta essere indipendente dalla presenza di os-



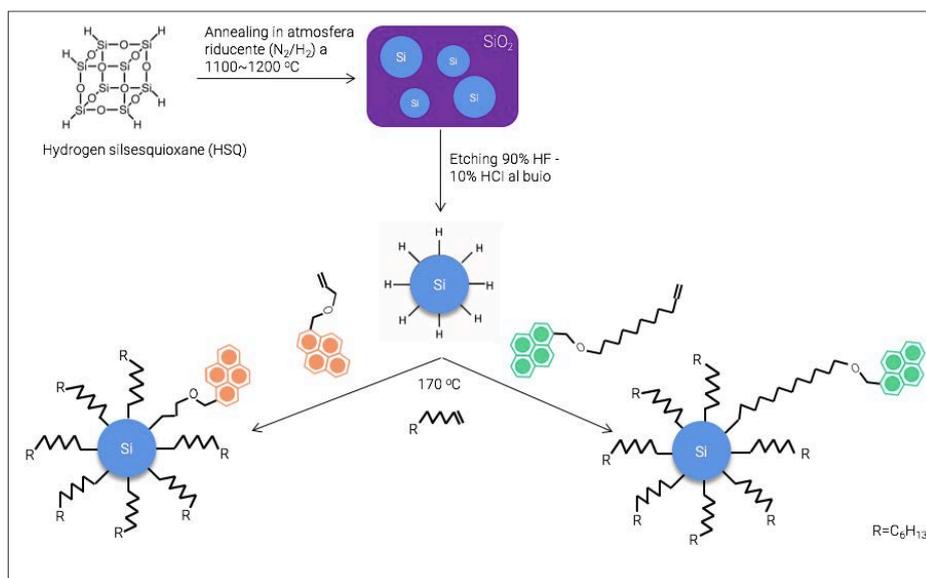
sigeno. Tale proprietà rappresenta un vantaggio considerevole in applicazioni di conversione di energia luminosa e bioimaging, ma al contempo è accompagnata da un basso coefficiente di assorbimento nell'intervallo di lunghezze d'onda dello spettro solare.

In questo contesto la comprensione dei fenomeni di decadimento radiativo e non radiativo dello stato eccitato dei nanocristalli di silicio è di fondamentale importanza per l'ottimizzazione delle proprietà ottiche ed elettroniche e l'effettivo utilizzo nelle applicazioni sopracitate. Inoltre, il silicio è un materiale notoriamente biocompatibile, a differenza dei componenti frequentemente utilizzati per la sintesi di nanocristalli a semiconduttori, quali cadmio e piombo, e la stessa proprietà è stata verificata anche per il materiale in forma nanometrica, permettendone l'utilizzo in campo biologico [5-7].

In questo articolo verrà quindi passata in rassegna l'attività svolta dal nostro gruppo nel contesto di un progetto europeo ERC StG (PhotoSi, PI: Prof. Paola Ceroni), il cui obiettivo consiste nello sviluppo di sistemi antenna basati su nanocristalli di silicio funzionalizzati con leganti organici.

### Sintesi

Vi sono diverse metodologie di sintesi proposte per la preparazione di nanocristalli di silicio fra cui sintesi in plasma [8], riduzione di clorosilani in micelle inverse [9], pirolisi laser [10] e disproporzione termica di silossiani [11]. Di queste, l'ultima metodologia permette di ottenere una morfologia e una distribuzione dimensionale controllata. La sintesi in questione prevede un primo step di preparazione di un precursore a base di ossido di silicio non stechiometrico, l'idrogeno silsesquiosano [12]. Una volta prodotto, esso può essere sottoposto a un trattamento termico in atmosfera riducente al fine di ottenere una matrice di ossido di silicio all'interno della quale sono già presenti i nanocristalli di silicio. La dimensione degli stessi può essere controllata in funzione della temperatura di lavoro, in genere compresa fra 1100 °C e 1200 °C, in grado di produrre rispettivamente nanocristalli con diametro medio pari a 3 e 5 nm. Questi possono essere quindi liberati me-



**Fig. 1 - Schema sintetico relativo alla preparazione di nanocristalli di silicio colloidali. Come esempio è stata riportata la co-funzionalizzazione mediante idrosililazione termica di nanocristalli terminati idruro con derivati pirenici in presenza di 1-dodecene, avente funzione di agente passivante**

diante etching con acido fluoridrico, ottenendo così nanocristalli terminati idruro, altamente instabili in atmosfera aerata. Essi quindi possono essere funzionalizzati mediante reazione di idrosililazione con alcheni e alchini terminali iniziata termicamente, ottenendo un guscio organico covalente dotato di grande stabilità e in grado di fornire diverse funzioni al nanocristallo stesso (Fig. 1).

### Sensibilizzazione dei nanocristalli

Come anticipato in precedenza, un limite per l'applicazione dei nanocristalli di silicio nella conversione di energia è rappresentato dal basso coefficiente di assorbimento nello spettro visibile. I nanocristalli di silicio presentano infatti, indipendentemente dalle dimensioni del nanocristallo, uno spettro di assorbimento non strutturato la cui intensità segue un andamento esponenziale al diminuire della lunghezza d'onda (Fig. 2). Proporzionalmente alle dimensioni del cristallo stesso, tale andamento può essere spostato a lunghezze d'onda maggiori, mantenendo però un contributo relativamente ridotto nella regione visibile. Pertanto, nonostante le ottime proprietà di luminescenza dei nanocristalli, ciò ne limita la brillantezza, ovvero il prodotto fra coefficiente di assorbimento e rendimento quantico di luminescenza. Per incrementare il contributo alla brillantezza dovuto alla quantità di luce assorbita, è possibile decorare la superficie del nanocristallo di silicio con cromofori in grado di assorbire la radiazione luminosa e trasferire l'energia accumulata al nanocristallo, secondo il principio di funzionamento dei cosiddetti

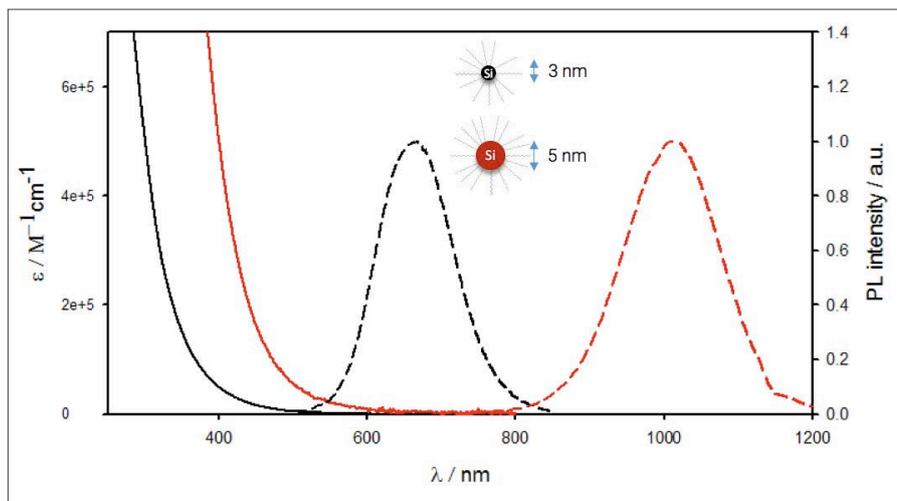


Fig. 2 - Spettri di assorbimento (linee continue) espressi in termini di coefficiente di assorbimento molare  $\epsilon$ , e spettri di emissione (linee tratteggiate,  $\lambda_{exc}=450$  nm) normalizzati sul massimo di intensità, relativi a nanocristalli di silicio passivati con leganti alchilici aventi rispettivamente diametro medio di 3 e 5 nm

sistemi antenna. Nello specifico, un sistema antenna è un sistema organizzato multi-componente nel quale diverse unità cromoforiche, denominate donatrici, sono in grado di trasferire l'energia di eccitazione a una specie accettrice, nel nostro caso il nucleo di silicio. Questo concetto ha origine dall'osservazione di un fenomeno naturale quale la fotosintesi, dove il fotosistema II si comporta esattamente come un sistema antenna. Tale sistema deve avere in genere alcuni pre-requisiti, quali un buon coefficiente di assorbimento del donatore, un rapporto fra numero di donatori ed accettori sbilanciato verso il primo, elevata stabilità chimica e fotochimica, ma soprattutto un elevato grado di organizzazione spaziale, temporale ed energetica. In particolare, l'energia dello stato eccitato dell'accettore deve essere uguale o inferiore a quella del donatore e le due specie devono essere a distanze ed orientazioni relative tali da massimizzare i processi di trasferimento energetico allo stato eccitato. Il vantaggio fornito da tale approccio risiede nella possibilità di sfruttare come donatore un numero elevato di specie con elevato coefficiente di assorbimento in diverse zone dello spettro UV-Visibile, incrementando in questo modo la percentuale di luce assorbita e di conseguenza la brillantezza della specie accettrice.

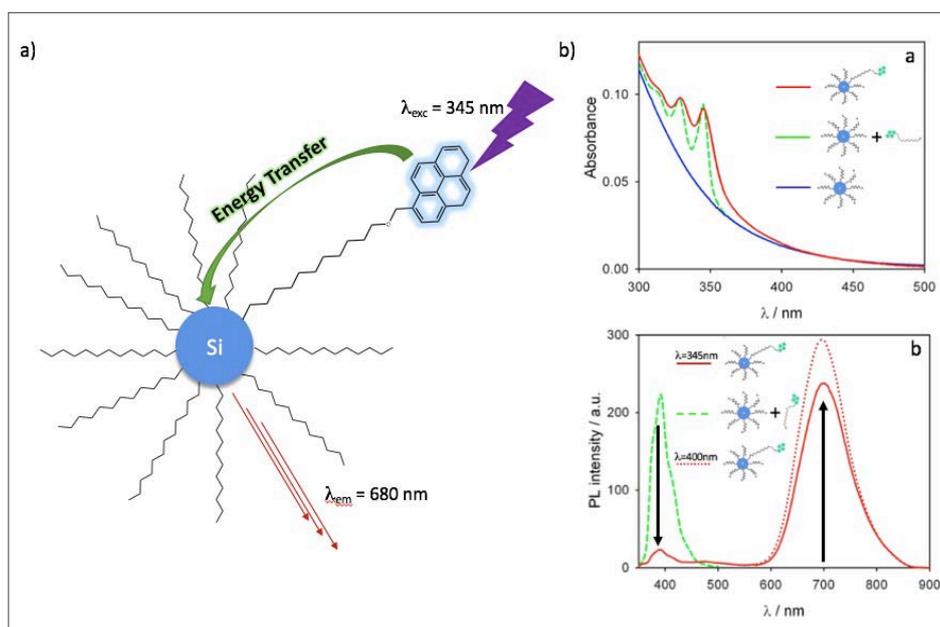
Nel nostro caso l'accettore è appunto il nanocristallo, mentre il donatore, detto anche sensibilizzatore, può essere scelto in una vasta gamma di fluorofori organici e organometallici, in base alle proprietà ottiche e funzionali di interesse [13].

Come primo prototipo di sensibilizzatore il nostro gruppo ha rivolto la propria attenzione sul pirene. Il pirene è un fluoroforo organico in grado di assorbire

nella regione del vicino ultravioletto ( $\lambda_{max}=330$  nm, 345 nm) ed emettere nel visibile con una colorazione blu-azzurra ( $\lambda_{em}=400-450$  nm). Tale fluoroforo è noto per l'ottima stabilità termica e sotto irradiazione, la buona solubilità in solventi organici, il rendimento quantico relativamente elevato e la formazione controllata di dimeri allo stato eccitato (denominati eccimeri). La funzionalizzazione dei nanocristalli di silicio con derivati pirenici è stata effettuata previa preparazione di diversi derivati alchenici composti dal gruppo funzionale, una catena alchilica, e il cromoforo stesso [14, 15]. Come anticipato

in Fig. 1, nello studio effettuato sono stati preparati due derivati pirenici dotati di catene alchiliche di diverse lunghezze, al fine di studiare l'effetto della variazione della distanza fra donatore organico ed accettore inorganico nel processo di trasferimento di energia. La reazione di funzionalizzazione, inoltre, è stata effettuata in presenza di un secondo legante, l'1-dodecene, il quale ha la funzione di passivare i siti reattivi della superficie del nanocristalli che non abbiano reagito con il legante cromoforico, limitando così la possibilità di ossidazione del nucleo siliceo e incrementandone la solubilità in solventi organici. Il numero di leganti per particella è stato ottenuto mediante analisi spettrofotometrica ed è compreso fra 3 e 8 unità per le particelle da 3 nm, mentre fra 50 e 60 unità per quelle da 5 nm. Come riportato in precedenza, l'elevato numero di leganti organici per nanocristallo è un fattore fondamentale per ottenere l'amplificazione necessaria ad ottenere un sistema antenna.

Come riportato in Fig. 3, l'efficienza di trasferimento energetico, o sensibilizzazione, si è rivelata essere dipendente sia dalle dimensioni dei nanocristalli che dalla lunghezza del ponte alchilico fra donatore e accettore. Incrementando le dimensioni del nucleo cristallino da 3 a 5 nanometri è stato infatti osservato un calo dell'efficienza di sensibilizzazione vicino al 35%. Certamente più interessante è però la dipendenza della costante di trasferimento di energia in funzione della catena alchilica. Indipendentemente dalle dimensioni del nanocristallo, infatti, la resa di trasferimento subisce un forte calo all'aumentare del numero di unità carboniose che compongono il ponte alchilico, precisamente da 3 a 11 atomi di carbonio. Inoltre, la maggiore



**Fig. 3 - a) Rappresentazione schematica del processo di sensibilizzazione di nanocristalli di silicio a carico di derivati pirenici e b) relativa caratterizzazione fotofisica consistente in spettri di assorbimento (a) ed emissione (b) di nanocristalli aventi diametro medio pari a 3 nm. In blu e verde sono rispettivamente riportati gli spettri di confronto di nanocristalli di silicio funzionalizzati dodecene e una miscela di legante libero e nanocristalli di silicio funzionalizzati dodecene, isoassorbente al campione di interesse (in rosso). Immagine riadattata con autorizzazione da [15]**

lunghezza della catena alchilica ha permesso la formazione di eccimeri del legante poiché l'unità pirenica risulta essere libera di interagire con altre unità legate allo stesso nanocristallo, mentre ciò non avviene nel caso del legante con catena alchilica più corta a causa dell'ingombro sterico dovuto al legante passivante. Questo studio ha quindi dimostrato per la prima volta come sia possibile controllare la fotofisica dei nanocristalli di silicio attraverso la funzionalizzazione con diverse unità fotoattive, sfruttando processi di trasferimento di energia e ottenendo un incremento di brillantezza complessiva fino ad oltre il 300%. Benché tali risultati abbiano dimostrato la possibilità di sfruttare processi di trasferimento di energia per ottenere sistemi antenna in grado di raccogliere e focalizzare la luce assorbita dai leganti organici sul cuore inorganico, l'intervallo spettrale di assorbimento di tale legante risiede nel vicino ultravioletto. Essi hanno quindi scarso interesse per l'utilizzo per applicazioni di conversione di luce solare, poco intensa in questa zona dello spettro, e in ambiente biologico, dove i tessuti sono noti essere tipicamente non trasparenti. Per questo motivo, lo studio di processi di sensibilizzazione di nanocristalli di silicio con cromofori dotati di un buon coefficiente di assorbimento nel visibile è certamente fonte di interesse. Ad esso bisogna aggiungere l'interesse per specie luminescenti dotate di uno spettro caratteristico nel vicino infrarosso e tempi di vita di emissione elevati, per

applicazioni di bioimaging. Per tali scopi è infatti importante che la luce sia in grado di raggiungere la specie emittente ed essere nuovamente trasmessa al rivelatore; è quindi necessario che sia l'assorbimento che la luminescenza avvengano nella finestra di maggior trasparenza per i tessuti biologici, situata nell'intervallo fra 600 e 1000 nm [16]. Un'ulteriore vantaggio, in termini di rapporto segnale-rumore, può essere ottenuto filtrando il contributo al segnale complessivo fornito dalla luminescenza delle specie biologiche, detto auto-luminescenza. Essa è caratterizzata da tempi di vita brevi, essendo dovuta a un meccanismo di fluorescenza, di conseguenza per evitarne la rivelazione è

vantaggioso lavorare imponendo un ritardo alla rivelazione del segnale di luminescenza della sonda [17]. Perché vi sia un buon segnale è quindi necessario che la sonda sia dotata da tempi di vita di luminescenza di ordini di grandezza superiori a quelli tipici dell'auto-luminescenza, dell'ordine di pochi nanosecondi. L'insieme di queste proprietà può essere raccolto in una singola specie attraverso la funzionalizzazione di cristalli di silicio con Zn(II) tetrafenilporfirine [18], dotate di uno spettro di assorbimento caratterizzato da due bande intense centrate rispettivamente a 426 and 560 nm e uno spettro di emissione piccato attorno a 605 nm. In questo caso, contrariamente a quanto accadeva nei nanocristalli funzionalizzati pirene, la funzionalizzazione di nanocristalli con diametro pari a 3 nm è di scarso interesse fotofisico, a causa della sovrapposizione delle bande di luminescenza di porfirina e nanocristallo (670 nm). Al contrario, essa risulta essere decisamente più interessante se effettuata su nanocristalli di dimensioni superiori, attorno ai 5 nm, i quali emettono tipicamente nel vicino infrarosso, attorno a 950 nm. In tal caso è infatti stata dimostrata la possibilità di trasferire con un'efficienza di circa il 50% l'energia assorbita dal legante porfirinico nella regione spettrale visibile al nucleo di silicio, dove il nanocristallo ha un coefficiente di assorbimento trascurabile (Fig. 4b). Il tempo di vita di luminescenza del nanocristallo funzionalizzato è stato osservato essere inferiore rispetto a

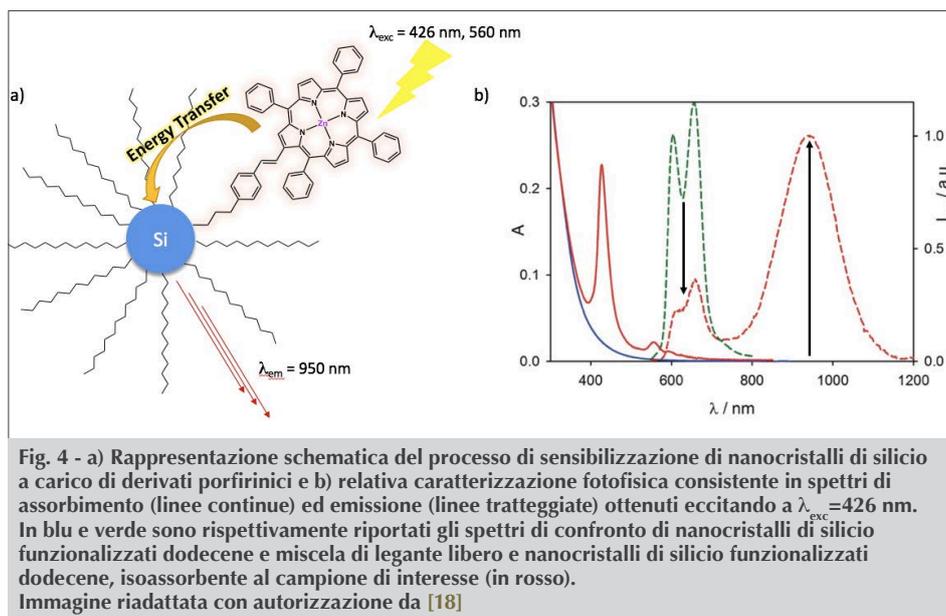


Fig. 4 - a) Rappresentazione schematica del processo di sensibilizzazione di nanocristalli di silicio a carico di derivati porfirinici e b) relativa caratterizzazione fotofisica consistente in spettri di assorbimento (linee continue) ed emissione (linee tratteggiate) ottenuti eccitando a  $\lambda_{exc} = 426$  nm. In blu e verde sono rispettivamente riportati gli spettri di confronto di nanocristalli di silicio funzionalizzati dodecene e miscela di legante libero e nanocristalli di silicio funzionalizzati dodecene, isoassorbente al campione di interesse (in rosso). Immagine riadattata con autorizzazione da [18]

quello del nanocrystallo di confronto, rispettivamente pari a 100 e 140  $\mu$ s. Allo stesso modo, anche la resa quantica di emissione del nanocrystallo stesso è affetta dalla presenza del legante porfirinico, indicando la possibilità che vi sia l'insorgenza di un nuovo cammino non radiativo dovuto alla presenza di processi di trasferimento elettronico o alla presenza di stati trappola superficiali. Benché non sia possibile discernere fra i diversi contributi, ciò indica come sia fondamentale una comprensione profonda dell'energetica del sistema antenna, in termini di energia degli stati come anche di potenziali redox, al fine di poter minimizzare effetti deleteri sulle proprietà di emissione del crystallo stesso.

## Processi di trasferimento di energia ed elettroni fotoindotti

Lo studio dei processi di sensibilizzazione di nanocristalli di silicio ha una particolare rilevanza soprattutto ai fini dell'effettiva applicazione in processi di conversione di energia solare. Una volta compreso come incrementare la quantità di energia assorbita dai nanocristalli, l'ovvio quesito che ne deriva è: come estrarre l'energia accumulata dal nanocrystallo mediante l'assorbimento di luce e incanalarla secondo le nostre necessità? Ciò infatti può avvenire sfruttando l'elevato contenuto energetico dello stato eccitato, detto anche eccitone, caratterizzato da una separazione di cariche all'interno del nanocrystallo. Esso può trasferire tali cariche a un determinato accettore, o agire a sua volta come sensibilizzatore attraverso un secondo processo di trasferimento di energia. La probabilità che avvenga uno di questi processi dipende *in primis* dalla specie

messata in contatto con il nanocrystallo stesso, la quale può essere in grado di subire solo uno dei processi descritti. Essa è però affetta anche dalle specifiche proprietà elettroniche dei nanocristalli, quali i potenziali redox dello stato eccitato, l'energia e la molteplicità dello stesso, e il coefficiente di trasmissione elettronica per i trasferimenti di carica.

Queste proprietà sono per lo più sconosciute per i nanocristalli di silicio, di conseguenza una parte considerevole della nostra attività ha riguardato proprio la comprensione e lo

sfruttamento di questi processi fotoindotti per l'applicazione di questa classe innovativa di nanocristalli per la conversione di energia.

In un primo momento la nostra attenzione ha riguardato i processi fotoindotti fra nanocristalli di silicio e allotropi del carbonio [15], fra cui fullerene  $C_{60}$ , nanotubi di carbonio e grafene ricoprono un ruolo fondamentale nello sviluppo di materiali innovativi per l'elettronica e il solare.

Tali specie presentano proprietà elettroniche differenti senza variare la composizione del materiale stesso, carbonio ibridizzato  $sp^2$  in tutti i casi. Essi infatti si possono comportare come materiali semiconduttori (nanotubi di carbonio a singolo wall), conduttori (grafene e ancora nanotubi) o avere spiccate proprietà di elettrone-accettore ( $C_{60}$ ). In tutti i casi, benché il processo fotoindotto a queste specie di maggiore interesse consista nel trasferimento di carica, vi può essere la contemporanea presenza di processi di trasferimento di energia.

Per questo motivo la nostra attenzione si è rivolta allo studio dell'influenza dell'interazione fra nanocristalli di silicio e tali allotropi di carbonio sulle proprietà fotofisiche dei nanocristalli stessi. Tale studio è stato condotto sui nanocristalli funzionalizzati con leganti pirenici al fine di promuoverne l'interazione con gli allotropi di carbonio grazie alla nota formazione di legami non-covalenti di tipo  $\pi$  fra pirene a superficie degli stessi.

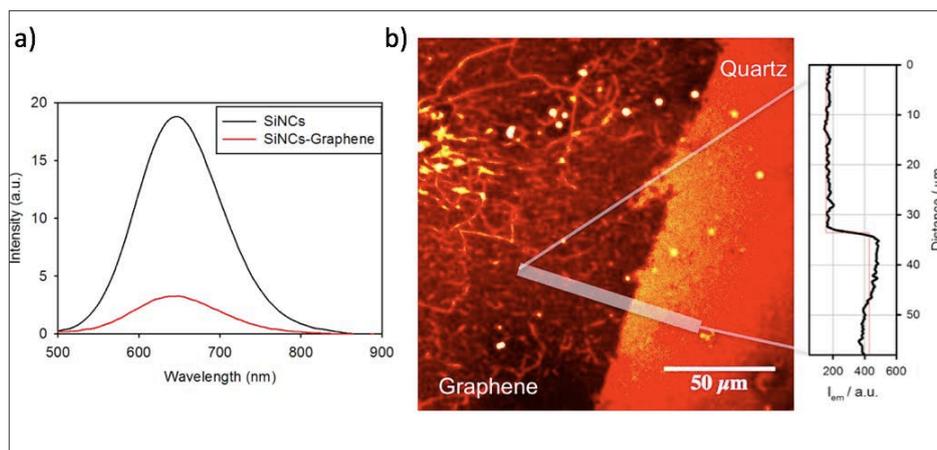
L'aggiunta degli allotropi di carbonio a soluzioni di nanocristalli, ove possibile, ovvero nel caso di fullerene  $C_{60}$  e nanotubi, ha in tutti i casi provocato uno spegnimento della luminescenza dovuto all'insorgere di un nuovo cammino non radiativo di decadimento dello



stato eccitato, consistente con la presenza di fenomeni di trasferimento di carica o energia da questo stato all'allotropo. Nel caso del fullerene, questo spegnimento è stato verificato essere dinamico, ovvero risultante dall'interazione di un nanocristallo allo stato eccitato e il  $C_{60}$ , senza pre-associazione allo stato fondamentale. Il meccanismo opposto è stato invece osservato in presenza di nanotubi di carbonio, dove la presenza del legante pirenico garantisce una forte interazione in soluzione e la conseguente decorazione dei nanotubi con i nanocristalli stessi, come dimostrato mediante microscopia elettronica in trasmissione. È stato possibile inoltre determinare che lo spegnimento dovuto all'interazione con  $C_{60}$  è in parte dovuto a trasferimento di energia allo stato di tripletto dell'allotropo, mentre non è stato possibile determinare la natura della restante componente benché, alla luce di misure successive, si possa affermare che molto probabilmente essa sia dovuta a processi di trasferimento di elettroni.

Infine abbiamo studiato la fotofisica di nanocristalli di silicio depositati su superficie di grafene. Mediante microscopia a fluorescenza è stato possibile nuovamente determinare un sensibile calo della luminescenza dei nanocristalli sulla superficie della membrana di grafene depositata mediante tecnica di deposizione chimica in fase vapore (Fig. 5). Ancora una volta però non è stato possibile determinare la natura di tale spegnimento data l'assenza di segnali specifici rilevabili. Nonostante quindi il grande interesse nell'interazione fra nanocristalli di silicio e allotropi di carbonio per l'applicazione in celle solari e photodetector, lo studio delle proprietà fotofisiche non ha permesso di determinare con certezza se vi sia un processo di trasferimento di carica generato dallo stato eccitato dei nanocristalli. Benché infatti in tutti i casi sia stata determinata una rilevante interazione fotofisica, la possibilità di una simultanea presenza di processi di trasferimento di carica ed energia ne rende impossibile il discernimento.

Per questo motivo è stata studiata l'interazione fotofisica dei nanocristalli di silicio con molecole organiche note per le proprietà elettron-donatrici o accettrici [19]. Per tali molecole è infatti possibile escludere la presenza di processi di trasferimento di energia a cau-

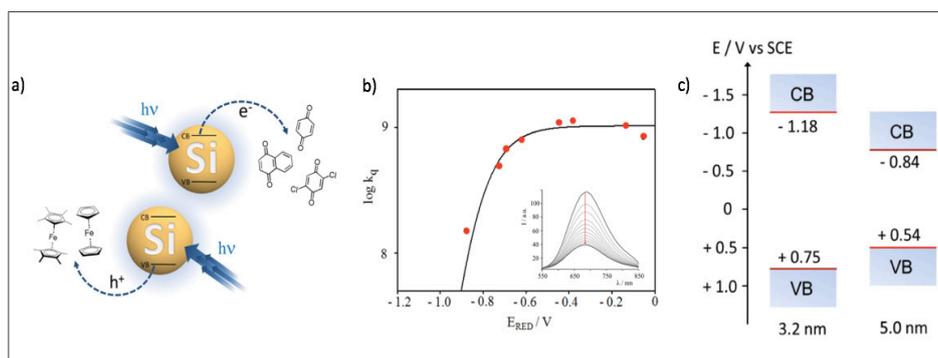


**Fig. 5 - a) Spettri di emissione nell'intervallo tipico dei nanocristalli di silicio (3 nm) registrati rispettivamente all'interno dell'area ricoperta da membrana di grafene (rosso) e su supporto di riferimento in quarzo (nero); b) immagine di microscopia a fluorescenza centrata su un bordo della membrana di grafene sulla cui superficie sono stati depositati i nanocristalli di silicio e relativo profilo di intensità all'interfaccia grafene-substrato di quarzo. Immagine riadattata con autorizzazione da [15]**

sa della mancanza di sovrapposizione spettrale dei nanocristalli, indipendentemente dalla molteplicità di spin. In particolare, diversi chinoni sostituiti sono stati utilizzati come accettori di elettroni con potenziale di riduzione variabile a seconda dei sostituenti sull'anello chinonico, mentre ferroceni derivati sono stati utilizzati per testare la via di spegnimento ossidativa. Anche in questo caso, all'aggiunta degli accettori o dei donatori organici, è stato verificato uno spegnimento dell'emissione dei nanocristalli, la cui entità, valutabile sotto forma della costante di spegnimento, è stata posta in funzione del potenziale di riduzione dell'accettore.

In Fig. 6b è possibile riconoscere l'andamento tipico dei processi di trasferimento elettronico limitati dalla diffusione, i quali sono stati interpretati secondo la teoria di Marcus. In primo luogo, ciò ha permesso di dimostrare per la prima volta e in modo rigoroso, l'occorrenza di processi di trasferimento di carica fotoindotti da nanocristalli di silicio ad accettori organici.

In aggiunta, la trattazione di Marcus è stata utilizzata per effettuare una stima della posizione delle bande di valenza e conduzione dei nanocristalli, riportata in Fig. 6c. Tale proprietà è in genere piuttosto semplice da definire per i semiconduttori bulk, mediante tecniche di ciclovoltammetria. Al contrario, la loro determinazione ha finora comportato una serie di complicazioni in soluzioni di nanoparticelle degli stessi semiconduttori, in particolare se la superficie degli stessi è passivata con uno strato di molecole organiche generalmente isolanti, come nel nostro caso l'1-dodecene. Lo studio sistematico dei processi di trasferimento elettronico fotoindotti ha quindi permesso di ottenere informazioni di fondamentale importanza riguardo l'energetica di



**Fig. 6 - a)** Rappresentazione schematica dei processi di trasferimento elettronico fotoindotto da nanocristalli di silicio ad accettori organici in soluzione; **b)** grafico riportante i valori di costante di spegnimento ottenuti mediante titolazione spettrofluorimetrica di nanocristalli da 3 nm con diversi derivati chinonici in funzione del potenziale di riduzione dell'accettore organico; **c)** diagramma energetico riportante la posizione delle bande di valenza e conduzione dei nanocristalli di silicio da 3,2 e 5,0 nm. Esse sono state ottenute mediante analisi di Marcus delle curve ottenute mediante fitting delle costanti di spegnimento riportate ad esempio in figura b). Immagine adattata con autorizzazione da [19]

tali nanocristalli, aprendo la strada all'utilizzo di tali materiali in celle solari e photodetector, come anche in processi di fotocatalisi organica ed inorganica.

## Conclusioni

In questo articolo sono riportati i principali avanzamenti condotti dal nostro gruppo nello studio dei processi di conversione di energia in nanocristalli di silicio funzionalizzati con cromofori organici. Abbiamo mostrato l'efficacia di tale approccio al fine di incrementare le proprietà intrinseche di assorbimento e luminescenza dei nanocristalli stessi mediante funzionalizzazione con derivati pirenici e porfirinici.

Sono stati inoltre studiati in modo approfondito per la prima volta i processi di trasferimento energetico ed elettronico dai nanocristalli stessi ad accettori organici ed allotropi di carbonio, dimostrando la possibilità di sfruttare l'energia accumulata all'interno del nucleo di silicio mediante tali processi e schiudendone quindi le possibilità di utilizzo all'interno di dispositivi fotovoltaici ed optoelettronici. In prospettiva futura, riteniamo di fondamentale importanza lo sviluppo di nanocristalli solubili in ambiente acquoso e bio-compatibili mediante la funzionalizzazione con leganti polari, come anche il design di leganti in grado di influenzare positivamente fenomeni di trasferimento di carica dai nanocristalli ad accettori esterni.

**Ringraziamenti:** Questa ricerca è supportata dal progetto della Commissione Europea ERC Starting Grant (PhotoSi, 278912).

Si ringrazia la Prof. Paola Ceroni per il contributo dato nella progettazione degli esperimenti e nella stesura del manoscritto.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] G.E. Moore, *IEEE Solid-State Circuits Newsletter*, 2006, **20**, 33.
- [2] <http://www.economist.com/technology-quarterly/2016-03-12/after-moores-law>, The Economist, 2016.
- [3] A.G. Cullis, L.T. Canham, *Nature*, 1991, **353**, 335.
- [4] X. Cheng *et al.*, *Chemical Society reviews*, 2014, **43**, 2680.
- [5] S. Chinnathambi *et al.*, *Advanced Healthcare Materials*, 2014, **3**, 10.
- [6] F. Erogbogbo *et al.*, *ACS Nano*, 2008, **2**, 873.
- [7] B.F.P. McVey, R.D. Tilley, *Accounts of chemical research*, 2014, **47**, 3045.
- [8] L. Mangolini, U. Kortshagen, *Advanced Materials*, 2007, **19**, 2513.
- [9] J. Wilcoxon *et al.*, *Physical Review B*, 1999, **60**, 2704.
- [10] M.B. Gongalsky *et al.*, *Scientific reports*, 2016, **6**, 24732.
- [11] J.A. Kelly *et al.*, *Chemical Communications*, 2010, **46**, 8704.
- [12] C.M. Hessel *et al.*, *Chemistry of Materials*, 2006, **18**, 6139.
- [13] F. Romano *et al.*, *Topics in Current Chemistry*, 2016, **374**.
- [14] M. Locritani *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2014, **5**, 3325.
- [15] R. Mazzaro *et al.*, *Chemistry of Materials*, 2015, **27**, 4390.
- [16] E.J. Henderson *et al.*, *Small*, 2011, **7**, 2507.
- [17] J. Joo *et al.*, *ACS Nano*, 2015, **9**, 6233.
- [18] A. Fermi *et al.*, *Faraday discussions*, 2015, **185**, 481.
- [19] A. Arrigo *et al.*, *Chemistry of Materials*, 2016, **28**, 6664.

## Silicon Nanocrystals: a Functional Platform for Construction of Hybrid Nano Structures For Energy Conversion

The present paper is summarizing the research activity carried out by our group on the investigation of energy conversion processes performed by silicon nanocrystals functionalized with photoactive molecules, for the application in photovoltaic and optoelectronic devices.

# SAVE

- ✓ Sistemi di controllo (DCS, PLC, PC industriali)
- ✓ Strumentazione industriale di misura e controllo
- ✓ Interfacciamento HMI
- ✓ Sensoristica
- ✓ Quadri e regolatori
- ✓ Software per l'industria
- ✓ SCADA, telecontrollo e reti tecnologiche
- ✓ Strumentazione da laboratorio
- ✓ Valvole e attuatori
- ✓ Efficienza energetica
- ✓ Motion control
- ✓ Fieldbus e comunicazione
- ✓ IoT per l'industria

**Fiera di Verona**  
**18-19 ottobre 2017**

Organizzato da

EIO



Sponsored by



**BECKHOFF**

**KEYENCE**

Supported by



GISI riconosce SAVE quale evento italiano di riferimento per automazione, strumentazione, sensoristica

Partner ufficiale



Registrazione gratuita per gli operatori professionali



11

edizioni di successo



7.000

operatori previsti



+200

aziende rappresentate



20

convegni plenari



+50

workshop





LUCA CAPALDO, SILVIA GARBARINO, STEFANO PROTTI, MAURIZIO FAGNONI, DAVIDE RAVELLI  
 PHOTOGREEN LAB, DIPARTIMENTO DI CHIMICA, UNIVERSITÀ DI PAVIA  
 DAVIDE.RAVELLI@UNIPV.IT

# PROCESSI FOTOCATALITICI VIA ANIONE DECATUNGSTATO PER LA SINTESI ORGANICA

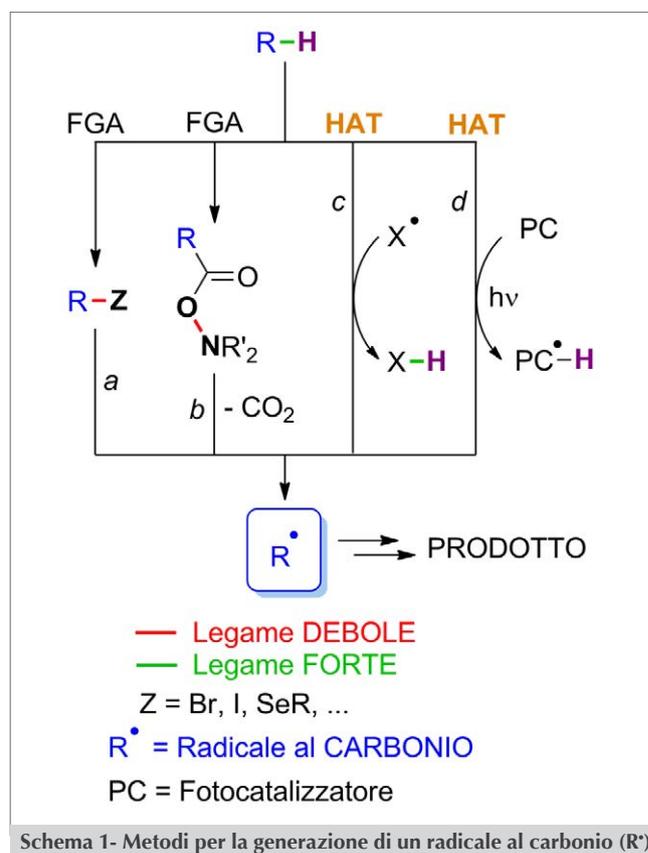
*Questo articolo riporta gli sviluppi più recenti sull'uso dell'anione decatungstato  $[W_{10}O_{32}]^{4-}$  come fotocatalizzatore in sintesi organica, ponendo particolare enfasi sulla peculiare via di attivazione che questo derivato è in grado di offrire: il trasferimento di atomo di idrogeno (Hydrogen Atom Transfer - HAT).*



La generazione di intermedi altamente reattivi in condizioni blande è un tema di ricerca di grande attualità in sintesi organica, anche a fronte della crescente importanza che i principi generali della Chimica Verde hanno assunto in questo campo. L'impiego di specie radicaliche, ad esempio, risulta compatibile con un'ampia gamma di gruppi funzionali ed evita il ricorso a passaggi di protezione/deprotezione indesiderati, solitamente richiesti nelle reazioni basate su meccanismi di tipo ionico.

La principale problematica delle reazioni radicaliche è legata alla necessità di impiegare substrati attivati aventi un legame debole R-Z (ad esempio C-I, C-Br o C-Se), per cui la generazione dell'intermedio

di interesse avvenga in maniera semplice e selettiva. Spesso questa strategia rende inoltre necessaria la presenza di derivati organometallici tossici, quali gli organo-stagno, al fine di promuovere il processo radicalico desiderato (Schema 1, via a). Un approccio





simile coinvolge legami labili N-O, come nel caso degli esteri di Barton (Schema 1, via *b*). Un'alternativa più appetibile consisterebbe nella rottura omolitica diretta di un legame C-H tramite il trasferimento di un atomo di idrogeno (*Hydrogen Atom Transfer* - HAT). In questo modo, infatti, non vi sarebbe la necessità di convertire preliminarmente il legame C-H da rompere in uno più reattivo tramite l'aggiunta di un gruppo funzionale (*Functional Group Addition* - FGA). Data l'elevata forza del legame C-H, tuttavia, tale processo di HAT risulterebbe percorribile solo tramite l'intervento di una specie altamente reattiva, tipicamente un altro radicale (ad esempio  $X^\bullet$  nello Schema 1, via *c*). Nel processo risultante, l'energia necessaria a rompere il legame C-H verrebbe così controbilanciata dalla formazione di un legame X-H altrettanto forte. Questo approccio ha dato vita ad una famiglia di processi basati sull'impiego di perossidi. Questi, nelle condizioni di reazione, generano radicali di tipo alcossi ( $X^\bullet = R-O^\bullet$ ) in grado di promuovere efficientemente il passaggio di HAT desiderato. Bisogna tuttavia sottolineare come spesso questi metodi richiedano l'impiego di un eccesso di perossido (in alcuni casi, esplosivo) e alte temperature [1].

Le reazioni fotocatalitiche, una particolare classe di reazioni fotochimiche, potrebbero rappresentare la soluzione ideale. Questi processi prevedono infatti l'intervento di un fotocatalizzatore (PC), responsabile dell'assorbimento della radiazione luminosa e, una volta nello stato eccitato, dell'attivazione dei substrati [2]. Ad ogni ciclo catalitico, PC interagisce con i partner di reazione, promuovendo la generazione di intermedi reattivi e venendo in ultima istanza ripristinato allo stato originale. In seguito all'assorbimento di un fotone, il fotocatalizzatore può quindi interagire con i substrati attraverso un trasferimento elettronico (*Electron Transfer* - ET), oppure un trasferimento di atomo di idrogeno (HAT; Schema 1, via *d*). Negli ultimi anni vi è stata una vera e propria esplosione di interesse nei confronti dei processi di tipo ET, con l'impiego di complessi a base di Ru o Ir (come  $Ru^{II}(bpy)_3^{2+}$  o  $Ir^{III}(ppy)_3$ ; *bpy* = 2,2'-bipiridina; *ppy* = 2-fenilpiridina), come pure di coloranti organici (Eosina Y, Blu di metilene) o semiconduttori ( $C_3N_4$ ), nel ruolo di fotocatalizzatori. Questa area di ricerca è oggi nota come "*photoredox catalysis*" [3]. Al contrario, lo sviluppo di processi fotocatalitici che coinvolgono l'attivazione dei substrati attraverso un fenomeno di tipo HAT è fortemente limitato dal numero esiguo di fotocatalizzatori in grado di

operare secondo questo meccanismo. Finora solo poche specie organiche (chetoni aromatici) e inorganiche (poliossometallati, quali l'anione decatungstato  $[W_{10}O_{32}]^{4-}$ , o il catione uranile  $[UO_2]^{2+}$ ) si sono dimostrate efficaci in questi processi. È importante sottolineare come tutti gli esempi sopra riportati presentino una caratteristica comune, ovvero la presenza di un sito di formula generale  $X=O$  (con  $X = C, W, U$ ), che nello stato eccitato assume un carattere parzialmente radicalico sull'atomo di ossigeno, conferendo alla molecola una reattività simile a quella di un alcossi radicale ( $X-O^\bullet$ ), prototipo degli H-estrattori [1]. La reattività di tipo HAT dei chetoni aromatici (benzofenone, antrachinone, fluorenone...) è nota da lungo tempo, tuttavia questi composti presentano in alcuni casi degli svantaggi, tra cui lo scarso *turn-over*

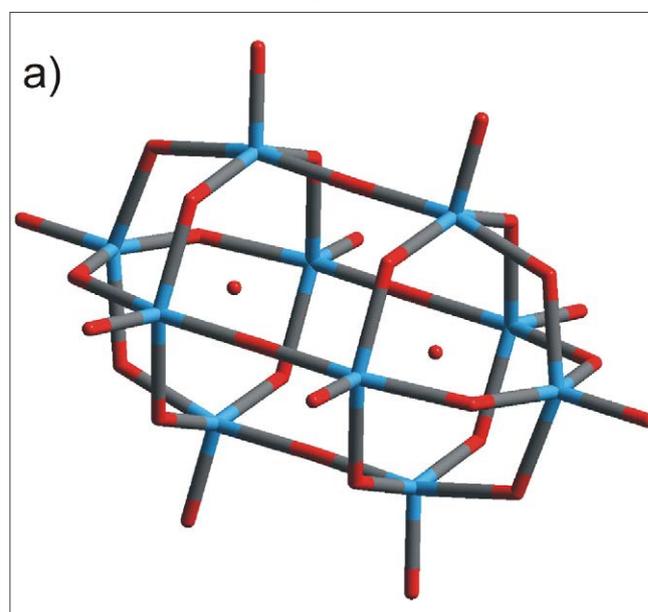
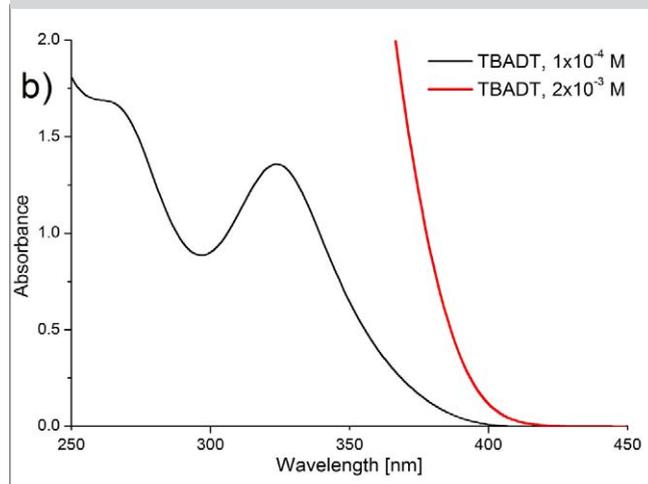
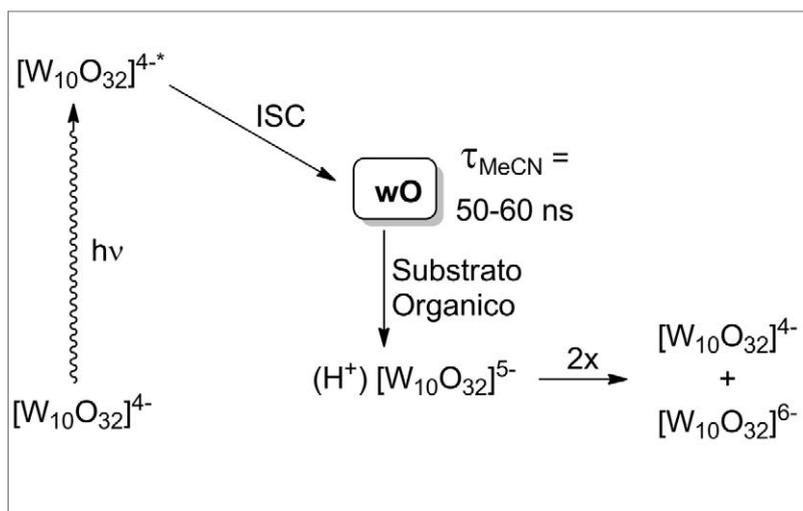


Fig. 1 - a) Struttura dell'anione decatungstato (in blu sono indicati gli atomi di tungsteno e in rosso quelli di ossigeno); b) spettro di assorbimento di due soluzioni ( $1 \cdot 10^{-4}$  M, linea nera;  $2 \cdot 10^{-3}$  M, linea rossa) di TBADT in acetonitrile





Schema 2 - Eventi coinvolti nell'eccitazione dell'anione decatungstato

number (TON), la necessità di un impiego in quantità elevata e le complesse procedure di isolamento del prodotto desiderato.

### Fotocatalisi via decatungstato

L'anione decatungstato  $[W_{10}O_{32}]^{4-}$ , la cui struttura è riportata in Fig. 1a, è un cluster inorganico appartenente alla famiglia dei poliossometallati (POM) ed in genere viene sintetizzato come sale di sodio o di tetrabuttilammonio (TBADT). La preparazione del TBADT è molto semplice ed economica ed è basata sulla oligomerizzazione a pH controllato di ioni tungstato  $[WO_4]^{2-}$  a dare il derivato  $[W_{10}O_{32}]^{4-}$ , seguita da una precipitazione in presenza di tetrabuttilammonio bromuro. Il sale risultante si presenta come solido bianco, perfettamente solubile in solventi organici polari, come ad esempio l'acetonitrile. Lo spettro di assorbimento di questo fotocatalizzatore presenta una banda caratteristica a 324 nm ( $\epsilon_{324} = 14.100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) e nelle condizioni di lavoro (tipicamente  $1\text{-}5\cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) interessa l'intera zona UV, estendendosi fino a 400 nm, a ridosso del visibile.

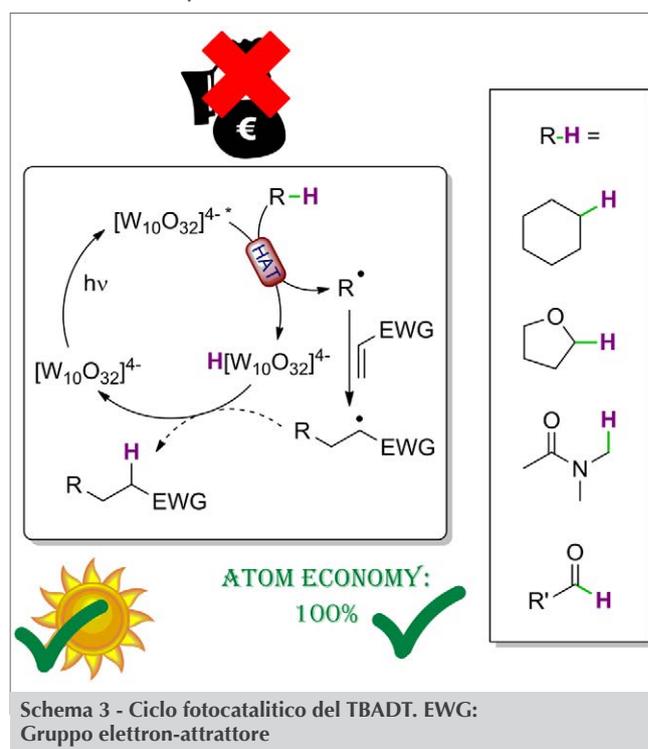
Gli eventi che interessano l'anione decatungstato in seguito ad assorbimento di un fotone sono stati studiati dettagliatamente, anche con l'aiuto di tecniche spettroscopiche risolte nel tempo (Schema 2). L'irraggiamento di questo cluster porta alla popolazione di uno stato eccitato caratterizzato da una transizione di tipo LMCT (*Ligand-to-Metal Charge Transfer*): la densità elettronica si sposta infatti da un orbitale localizzato sugli ossigeni a ponte verso i centri metallici. Questo primo stato eccitato non è tuttavia responsabile della reattività osservata, in quanto evolve in poche decine di ps attraverso un processo di *Inter-System Crossing* (ISC) ad uno stato di triplet-

to. Tale stato, denominato in letteratura come wO, è caratterizzato da un tempo di vita di circa 50-60 ns in acetonitrile ed è l'effettivo responsabile dell'attivazione dei substrati organici tramite ET oppure HAT. In seguito all'interazione con il derivato organico, si ha la formazione della specie monoridotta  $(H^+)[W_{10}O_{32}]^{5-}$ , che disproporziona a dare il cluster originale  $[W_{10}O_{32}]^{4-}$  e la forma bi-ridotta  $[W_{10}O_{32}]^{6-}$  [4].

I primi dati relativi all'attività fotocatalitica dell'anione decatungstato risalgono agli anni Ottanta-Novanta e hanno evidenziato la sua efficacia nell'attivazione di una vasta gamma di composti organici

tramite un processo di HAT. A partire da queste prime evidenze sperimentali, sono state poi riportate svariate applicazioni sintetiche volte alla costruzione di legami C-C, C-N, C-F, nonché alla promozione di reazioni di ossidazione o ancora alla degradazione di inquinanti organici [5].

Il laboratorio di Pavia è attivo da diversi anni su questo filone di ricerca ed è impegnato nell'applicazione del TBADT per l'attivazione di legami  $C(sp^3)\text{-H}$  in alcani, alcoli, eteri, acetali, cicloalcanoni e nitrili alifatici, nonché  $C(sp^2)\text{-H}$  in aldeidi alifatiche e aromatiche, o  $Si\text{-H}$  in silani trisostituiti [6]. L'approccio fotocatalitico permette la formazione di una vasta



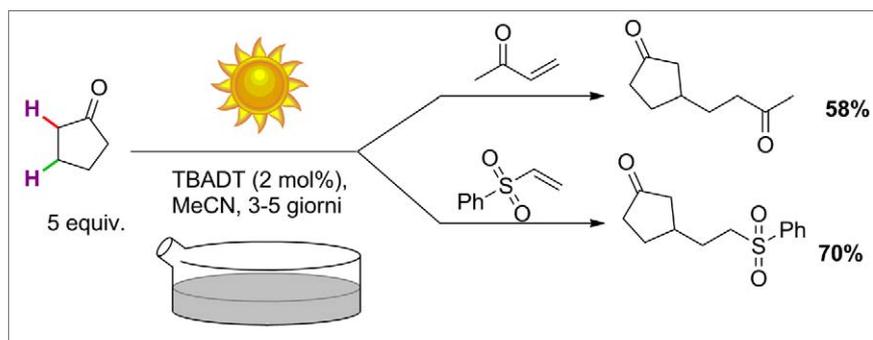
Schema 3 - Ciclo fotocatalitico del TBADT. EWG: Gruppo elettron-attrattore



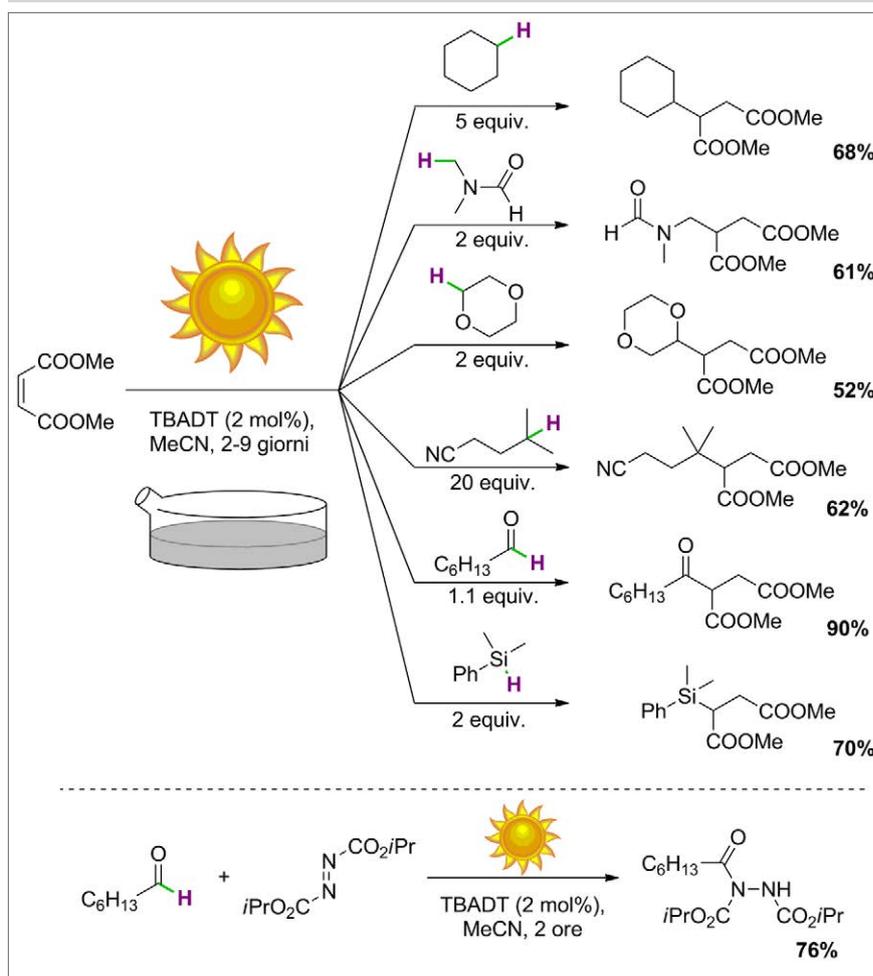
gamma di radicali, che sono poi sfruttati in reazioni di addizione coniugata su olefine elettron-povere (Schema 3). Il radicale addotto risultante dall'addizione sul doppio legame fornisce il prodotto desiderato tramite un processo di back-HAT, risultando in un processo caratterizzato da una *Atom Economy* del 100% e permettendo al contempo la chiusura del ciclo catalitico (linea tratteggiata, Schema 3).

Tra i valori aggiunti di questo fotocatalizzatore, vi è la possibilità di sfruttare la luce solare. Il processo può essere così condotto semplicemente esponendo la miscela di reazione posta in un contenitore di vetro (vedi foto di apertura) sul davanzale di una finestra (Schemi 4 e 5). In questi anni sono stati messi a punto diversi protocolli di sintesi basati su questa chimica. Le reazioni sono state condotte in presenza di una quantità catalitica di fotocatalizzatore (2-4 mol%) e hanno richiesto tempi di irraggiamento di pochi giorni (8 ore/giorno), anche con cielo nuvoloso [6].

Lo stato reattivo  $wO$  del catalizzatore ha un forte carattere elettrofilo e mostra una spiccata preferenza nei confronti dei legami C-H nucleofili. Di conseguenza, nel caso del ciclopentanone si osserva l'attivazione selettiva del legame C-H in posizione  $\beta$  (più forte, in verde nello Schema 4), rispetto a quello in  $\alpha$  (più debole, in rosso), a causa degli effetti polari esercitati dal gruppo carbonilico. Il radicale risultante è stato quindi sfruttato in reazioni di addizione coniugata su una varietà di olefine elettron-povere, tra cui chetoni, nitrili o solfoni  $\alpha,\beta$ -insaturi (Schema 4) [6]. Altri esempi riguardano il dimetil maleato, spesso usato come olefina elettron-povera di riferimento, che è stato funzionalizzato in presenza di una svariata gamma di donatori di idrogeno, quali cicloesano, DMF e 1,4-diossano, a dare i corrispondenti derivati idroalchilati in buone rese (50-70%). Come nel caso del ciclopentanone, anche l'isocapronitrile

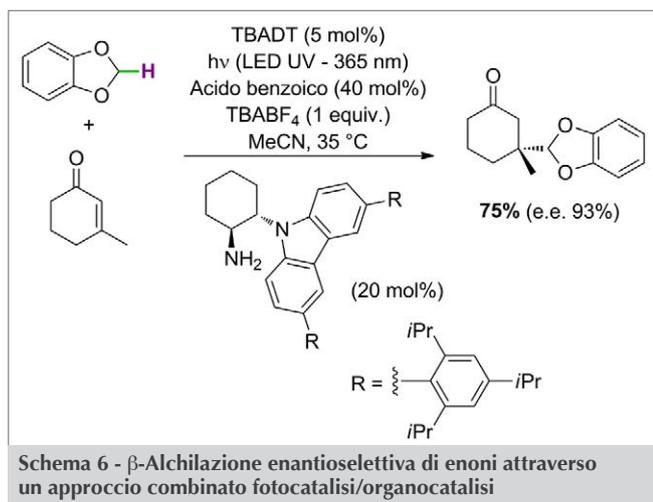


Schema 4 - Funzionalizzazione regioselettiva del ciclopentanone



Schema 5 - Applicazioni sintetiche della fotocatalisi via TBADT promosse dalla luce solare

è stato attivato selettivamente sulla posizione metinica e ha dato il corrispondente addotto in buone rese (62%; Schema 5). Le aldeidi alifatiche rappresentano il substrato d'elezione per il decatungstato e permettono di ottenere chetoni asimmetrici come prodotto finale. Nel caso dell'eptanale, ad esempio, è stato possibile utilizzare una soluzione (100 mL) quasi equimolare dei due reagenti a concentrazione elevata (0,5 M), portando all'isolamento del prodotto di idroalchilazione con un'ottima resa (90%) e su una



scala di ca. 10 g (Schema 5) [6]. Oltre ai legami C-H, il TBADT è in grado di attivare anche altri tipi di legami, come il legame Si-H. Il dimetilfenilsilano è stato quindi impiegato per la idrosilazione del dimetil maleato in buone rese. Anche in questo caso, l'attivazione è stata selettiva e ha riguardato il solo legame Si-H, senza interessare i gruppi metilici (Schema 5) [6]. La fotocatalisi solare via decatungstato è stata impiegata inoltre per la formazione di legami C-N attraverso intrappolamento dei radicali fotogenerati con un azoderivato, come il diisopropil azodicarbosilato (DIAD). Nel caso della reazione tra eptanale e DIAD, il prodotto desiderato è stato ottenuto con brevi tempi di irraggiamento (2 ore), anche grazie al marcato carattere elettrofilo della trappola impiegata (Schema 5) [6].

L'elevata versatilità del decatungstato è dimostrata anche dalle sue molteplici applicazioni. Nel campo dei nanomateriali, ad esempio, il TBADT ha permesso l'aggiunta dei radicali generati tramite H-estrazione da catene di polietilenglicole (PEG) su nanotubi al carbonio, sempre tramite irraggiamento con luce solare. La funzionalizzazione della superficie dei nanotubi con catene a base di PEG (PEGilazione) ha così permesso di ottenere un materiale caratterizzato da una migliore disperdibilità in acqua [6].

Il laboratorio di Pavia, in collaborazione con altri gruppi di ricerca internazionali, ha esplorato la possibilità di combinare la chimica via decatungstato ad altri approcci sintetici. Un esempio riguarda la collaborazione con il gruppo del prof. Ryu (Osaka Prefecture University,

Giappone), incentrata sulla messa a punto di processi multi-componente in presenza di CO e basata sulla spiccata reattività del monossido di carbonio nei confronti degli intermedi radicalici [7]. Insieme al gruppo del prof. Melchiorre (ICIQ, Tarragona, Spagna), è stato invece sviluppato un metodo sintetico per la formazione di carboni quaternari asimmetrici (eccessi enantiomerici fino al 97%; Schema 6) a partire da 1,3-benzodiossolo ed enoni  $\beta$ -sostituiti in presenza di TBADT e un'ammina primaria chirale, rispettivamente, nel ruolo di foto- e organo-catalizzatore [8].

Un altro importante sviluppo, questa volta incentrato sull'ottimizzazione del processo fotocatalitico, è inteso all'adattamento delle vie sintetiche riportate in condizioni di flusso. Questa tematica ha conosciuto un'ampia diffusione solo in tempi relativamente recenti, ma ha subito trovato nella fotochimica un campo di applicazione privilegiato. Nei reattori impiegati a tale scopo, la soluzione contenente la miscela di reazione fluisce all'interno di tubi di materiale, diametro e lunghezza variabili. Il diametro interno (D) denota le tipologie di reattore, che si distinguono in micro-reattori ( $D < 1$  mm) oppure meso-reattori ( $D > 1$  mm). La scelta del materiale è dettata dal tipo di processo, per cui l'attenzione viene focalizzata sulla resistenza chimica e/o meccanica e, nel caso delle reazioni fotochimiche, sulla trasparenza alla radiazione impiegata; materiali tipici sono, ad esempio, polimeri fluorurati, quali il PFA (*perfluoroalkoxyalkane*), il FEP (*fluorinated ethylene propylene*) o il PTFE (*polytetrafluoroethylene*).

Uno dei principali vantaggi associati alla fotochimica in flusso, tale da giustificare l'assemblaggio di reattori dedicati, consiste nella drastica diminuzione dei tempi di reazione. Questo aspetto è legato ad una migliore penetrazione della radiazione elettromagnetica all'interno dei canali del reattore, che ne consente uno sfruttamento più efficace. In particolare, presso il nostro laboratorio sono stati sviluppati nel corso degli anni due meso-reattori concettualmente analoghi, ma differenti nelle caratteristiche tecniche, come si evince dalla Tab. 1.

	Flusso 1	Flusso 2
Materiale tubi	PTFE	FEP
Diametro esterno/interno tubi [mm]	1,6/1,3	3,18/2,1
Volume reattore [mL]	12	50
Sorgente radiazione	Lampada vapori Hg 125 W	Lampada vapori Hg 500 W

Tab. 1 - Caratteristiche tecniche dei due meso-reattori fotochimici assemblati



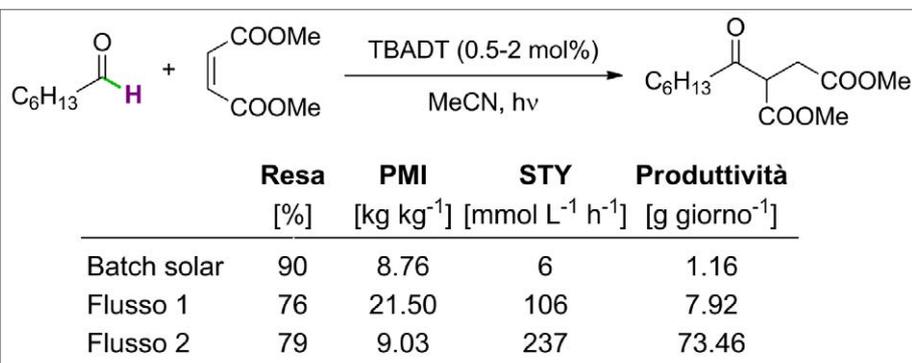
Fig. 2 - Immagine del reattore fotochimico di tipo "Flusso 1"

Entrambi i reattori sono ispirati al modello proposto dal prof. Booker-Milburn [9] e sono costituiti da un segmento di tubo di volume interno definito, avvolto attorno alla camicia di raffreddamento di una lampada a vapori di mercurio. Tale camicia può essere in materiali differenti, generalmente in Pyrex o in quarzo, in funzione del tipo di reazione coinvolta. Il sistema prevede inoltre l'impiego di una *syringe pump* (o una pompa HPLC) per far fluire la miscela di reazione all'interno del reattore e di un regolatore di *back-pressure*, ne-

cessario a garantire una velocità di flusso costante all'interno dei tubi (Fig. 2).

L'idroacilazione del dimetil maleato da parte dell'epitanale è stata impiegata come reazione modello (Schema 7) per valutare come i parametri del processo vengano modificati nel passaggio dalla modalità in batch (si consideri ad esempio l'alternativa riportata nello Schema 4) a quella in flusso (cfr. alternative in Tab. 1) [10].

Le rese isolate sono in ogni caso soddisfacenti e si attestano sul 90% per il *batch* vs 76-79% nel caso dei due approcci in flusso. Il panorama cambia drasticamente, tuttavia, quando si comparano i due processi attraverso parametri in grado di definirne con più accuratezza le prestazioni. In particolare, l'intensità di massa del processo (PMI, *process mass intensity*), grandezza che viene calcolata come la massa di materiali necessaria per produrre un'unità di massa del prodotto desiderato, oscilla tra i 10 kg·kg<sup>-1</sup> (per le modalità batch e "Flusso 2") e i 20 kg·kg<sup>-1</sup> (per la modalità "Flusso 1"), evidenziando come questo parametro non sia strettamente correlabile alle modalità con cui viene condotta la reazione. Al contrario, parametri come la produttività, ovvero la quantità di prodotto sintetizzato nell'unità di tempo, e la resa spazio-tempo (STY, *space-time-yield*), intesa come la quantità di prodotto sintetizzato per unità di volume del reattore per unità di tempo, subiscono degli incrementi significativi nel passaggio dalla modalità batch a quella in flusso. Nello specifico, si osserva un drastico aumento (circa 40 volte) del valore di STY, che arriva ad un valore massimo di 237 mmol·L<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> nel caso del reattore di tipo "Flusso 2" e lo stesso vale per la produttività, che si attesta su un valore massimo di 73,46 g al giorno, sempre per il medesimo reattore (Schema 7). Globalmente si ha quindi un miglioramento delle prestazioni del sistema, a



Schema 7 - Confronto tra le prestazioni offerte dalla modalità in *batch* vs quelle in flusso nell'acilazione del dimetil maleato da parte dell'epitanale

conferma dell'effettivo vantaggio connesso con l'adozione dell'approccio in flusso [10].

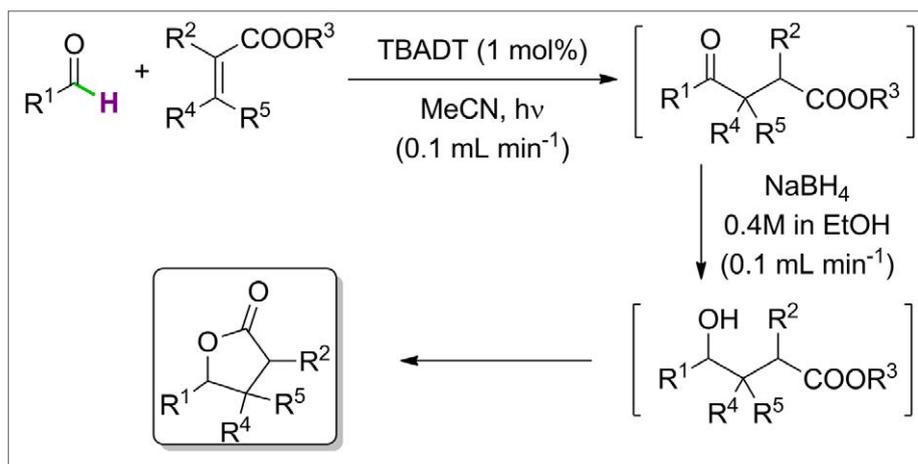
In una collaborazione con l'Università di Camerino, i sistemi così ottimizzati sono stati implementati per condurre processi *multi-step* in flusso, quali ad esempio la sintesi di  $\gamma$ -lattoni, come illustrato nello Schema 8. In particolare, la strategia sintetica prevede di effettuare una prima acilazione fotocatalitica di un estere  $\alpha,\beta$ -insaturo adottando il sistema "Flusso 1" a dare un chetoestere intermedio. Il tubo in uscita dal reattore fotochimico è stato quindi miscelato tramite un'opportuna giunzione a T con una soluzione di sodio boroidruro in etanolo, così da promuovere la riduzione del gruppo carbonilico a dare l'idrossi-derivato corrispondente, che ha fornito il lattone desiderato attraverso una ciclizzazione spontanea (Schema 8) [11].

## Conclusioni

La ricerca nel campo della fotocatalisi via decatungstato e delle sue applicazioni in ambito sintetico è ancora attiva e altamente stimolante, vista l'unicità di questo fotocatalizzatore nell'attivazione tramite HAT di svariati derivati organici; è tuttavia necessario evidenziare un limite di tale approccio. Nonostante il decatungstato si sia rivelato molto efficiente anche sotto irraggiamento con luce solare, questo derivato è in grado di sfruttarne esclusivamente la componente UV, che è una frazione minoritaria dell'intero spettro di emissione solare. Uno degli obiettivi principali della ricerca in questo settore è quindi quello di promuovere il processo HAT impiegando una radiazione meno energetica, quale la luce visibile. Nel campo della *photoredox catalysis* questo è reso possibile grazie all'impiego di derivati colorati, quali i già menzionati complessi a base di Ru o Ir, oppure coloranti organici di diversa natura. La ricerca di possibili sostituti del decatungstato nel ruolo di fotocatalizzatori colorati per reazioni via HAT è stata intrapresa di recente nel nostro laboratorio con l'obiettivo finale di aumentare la sostenibilità di questi promettenti processi fotocatalitici.

## BIBLIOGRAFIA

[1] S. Protti, M. Fagnoni, D. Ravelli, *ChemCatChem*, 2015, **7**, 1516.



Schema 8 - Sintesi di  $\gamma$ -lattoni tramite l'accoppiamento di un'acilazione fotocatalitica seguita da una riduzione con sodio boroidruro

- [2] D. Ravelli, S. Protti, M. Fagnoni, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 9850.
- [3] M.H. Shaw, J. Twilton, D.W.C. MacMillan, *J. Org. Chem.*, 2016, **81**, 6898.
- [4] V.D. Waele *et al.*, *ACS Catal.*, 2016, **6**, 7174.
- [5] M.D. Tzirakis, I.N. Lykakis, M. Orfanopoulos, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2609.
- [6] D. Ravelli, S. Protti, M. Fagnoni, *Acc. Chem. Res.*, 2016, **49**, 2232.
- [7] I. Ryu *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, **50**, 1869.
- [8] J.J. Murphy *et al.*, *Nature*, 2016, **532**, 218.
- [9] M. Bergami *et al.*, *Adv. Synth. Catal.*, 2016, **358**, 1164.
- [10] J.P. Knowles *et al.*, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2012, **8**, 2025.
- [11] M. Fagnoni *et al.*, *Adv. Synth. Catal.*, 2014, **356**, 753.

**Ringraziamenti:** Silvia Garbarino e Davide Ravelli ringraziano il progetto SIR "Organic Synthesis via Visible Light Photocatalytic Hydrogen Transfer" (RB-SI145Y9R).

## Photocatalytic Processes via Decatungstate Anion Applied to Organic Synthesis

Recent advances on the use of the decatungstate anion  $[W_{10}O_{32}]^{4-}$  as a photocatalyst applied to organic synthesis have been reported. Particular emphasis has been devoted to the peculiar activation mode of organic derivatives offered by this unique photocatalyst: a Hydrogen Atom Transfer (HAT) step.



**POWERING YOUR COMPANY**

[WWW.AGICOM.IT](http://WWW.AGICOM.IT)

FILIPPO MANGOLINI<sup>1</sup>, JOHN BRANDON MCCLIMON<sup>2</sup>, ROBERT W. CARPICK<sup>3</sup><sup>1</sup>INSTITUTE OF FUNCTIONAL SURFACES, SCHOOL OF MECHANICAL ENGINEERING, UNIVERSITY OF LEEDS (UK)<sup>2</sup>DEPARTMENT OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING, UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, PHILADELPHIA (USA)<sup>3</sup>DEPARTMENT OF MECHANICAL ENGINEERING AND APPLIED MECHANICS, UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA, PHILADELPHIA (USA)

F.MANGOLINI@LEEDS.AC.UK

# DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DELLO STATO D'IBRIDIZZAZIONE DEL CARBONIO TRAMITE SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO DI RAGGI X

*La spettroscopia di assorbimento di raggi X (near edge X-ray absorption fine structure, NEXAFS) è una delle tecniche analitiche di superficie più utilizzate per la caratterizzazione dallo stato di legame e ordine strutturale del carbonio nei materiali carboniosi. Il lavoro qui presentato costituisce un'analisi della metodologia comunemente utilizzata per la valutazione quantitativa dello stato d'ibridizzazione del carbonio tramite spettroscopia NEXAFS.*

I materiali a base di carbonio (grafene, fullereni, nanotubi, carbonio amorfo) sono recentemente diventati d'interesse strategico per numerose applicazioni tecnologicamente avanzate [1, 2]. Alla luce della forte dipendenza delle proprietà di tali materiali dallo stato d'ibridizzazione, ordine strutturale locale, e grado d'idrogenazione del carbonio, la caratterizzazione di questi materiali necessita metodi analitici quantitativi accurati [3].

Fra le tecniche di analisi di superficie, la spettroscopia fotoelettronica di raggi X (XPS) [4-14], la spettroscopia di perdita di energia (EELS) [15-18], e la spettroscopia di assorbimento di raggi X (NEXAFS) [9, 19-26] sono largamente utilizzate per la caratterizzazione dei materiali carboniosi [3].

La spettroscopia XPS permette l'identificazione degli elementi negli strati superficiali dei materiali, la determinazione del loro stato di legame e la quantificazione della loro concentrazione atomica percentuale [27]. Nel caso dei materiali a base di carbonio, la caratterizzazione XPS dello stato d'ibridizzazione del carbonio è normalmente eseguita tramite l'impiego di procedure di *curve-fitting* del segnale fotoelettronico del carbonio 1s (C1s)

ed utilizzando due componenti distinte per il carbonio  $sp^3$  e  $sp^2$  [4-8, 14, 28, 29]. Tuttavia, l'analisi accurata di campioni di riferimento (grafite e diamante) ha recentemente evidenziato che la posizione dei segnali fotoelettronici C1s per il carbonio  $sp^3$  e  $sp^2$  non è significativamente differente [4, 5]. La determinazione della frazione di atomi di carbonio ibridizzati  $sp^2$  può comunque essere effettuata tramite la spettroscopia XPS utilizzando il segnale Auger del carbonio (KLL) [4, 5, 10, 11, 13, 29].

La spettroscopia EELS è attualmente il metodo di maggiore utilizzo in ambiente di ricerca per ricavare la frazione di atomi di carbonio in stato  $sp^2$ . Anche se la spettroscopia EELS permette la determinazione dello stato d'ibridizzazione del carbonio tramite l'analisi della regione "low loss" (fra 0 e 40 eV) e la regione "high loss" (acquisizione del segnale C1s) [3, 15-18], questo metodo analitico necessita la rimozione del film dal substrato e la preparazione di lamelle in cross-section. Inoltre, l'acquisizione del segnale C1s viene effettuata con bassa risoluzione in energia (~0,5 eV) [3, 30].

La spettroscopia NEXAFS non soffre dei due limiti

Il dott. Mangolini è stato insignito del "Premio Mazzucotelli" durante il convegno ISA2016 svoltosi a Matera dal 29 maggio al 1° giugno 2016.



sperimentali della spettroscopia EELS poiché non richiede metodi avanzati per la preparazione dei campioni e l'acquisizione dei segnali C1s è eseguita con una risoluzione in energia di circa 0,1 eV. L'adeguatezza della spettroscopia NEXAFS per lo studio della configurazione di legame e dello stato d'ibridizzazione del carbonio negli strati superficiali dei materiali carboniosi deriva dalla possibilità di risolvere efficacemente picchi corrispondenti alla promozione di elettroni appartenenti ad orbitali atomici 1s in diversi orbitali di antelegame ( $\pi^*$  e  $\sigma^*$ ) [19, 20, 31-40]. Inoltre, l'analisi della dipendenza dell'intensità di tali picchi dall'angolo d'incidenza della radiazione polarizzata permette lo studio dell'orientazione di nanomateriali [41-43] e molecole assorbite [44].

Tuttavia, l'acquisizione e l'elaborazione dei dati NEXAFS è particolarmente difficoltosa nel caso dei materiali a base di carbonio. In aggiunta alle problematiche connesse alla calibrazione dell'energia dei fotoni X incidenti, alla normalizzazione dell'intensità spettrale e alla rimozione della funzione di trasmissione della linea di luce e degli effetti dovuti a instabilità del fascio X [45-47], l'analisi accurata degli spettri NEXAFS C1s necessita la rimozione degli artefatti spettrali dovuti alla presenza di contaminazione carboniosa sugli elementi ottici delle linee di luce [46], nonché la rimozione del contributo della contaminazione presente sulla superficie dei materiali da esposizione all'atmosfera [9]. Numerosi metodi per l'elaborazione degli spettri NEXAFS sono stati riportati in letteratura e permettono efficacemente la rimozione degli artefatti sopra elencati [9, 45-47]. Nonostante il vasto utilizzo della spettroscopia NEXAFS per lo studio dei materiali carboniosi, la metodologia comunemente utilizzata per la valutazione quantitativa dello stato d'ibridazione del carbonio tramite spettroscopia NEXAFS non è stata mai analizzata in dettaglio. Nella comunicazione recentemente pubblicata in *Analytical Chemistry* (2016, **88**(5), 2817), gli autori del presente lavoro hanno esaminato il metodo analitico per la determinazione della frazione di carbonio  $sp^2$  e analizzato le sorgenti d'incertezza ed errore nell'analisi quantitativa.

La metodologia per la determinazione quantitativa dello stato d'ibridazione del carbonio tramite spettroscopia NEXAFS si basa sull'intensità relativa

dei picchi  $C1s \rightarrow \pi^*$  e  $C1s \rightarrow \sigma^*$ . La procedura è illustrata in Fig. 1 per un campione di carbonio amorfo idrogenato (a-C:H): l'intensità del picco  $C1s \rightarrow \pi^*$  viene ottenuta tramite *fitting* con una gaussiana [9, 33], mentre l'intensità del segnale  $C1s \rightarrow \sigma^*$  viene ricavata integrando numericamente lo spettro in un intervallo energetico ( $x_1-x_2$ ). La frazione di carbonio  $sp^2$  nel campione in studio ( $f_{sp^2}$ ) è calcolata confrontando il rapporto di tali aree con quello ottenuto da un campione di riferimento con percentuale di carbonio  $sp^2$  noto (solitamente grafite pirolitica altamente orientata, HOPG) [9, 21, 33, 38]:

$$f_{sp^2} = [I_{sam}^{\pi^*} / I_{sam}^{\sigma^*} (DE)] / [I_{ref}^{\pi^*} / I_{ref}^{\sigma^*} (DE)] \quad (1)$$

dove  $I_{sam}^{\pi^*}$  e  $I_{ref}^{\pi^*}$  sono, rispettivamente, le aree dei picchi  $C1s \rightarrow \pi^*$  per il campione in studio e per il

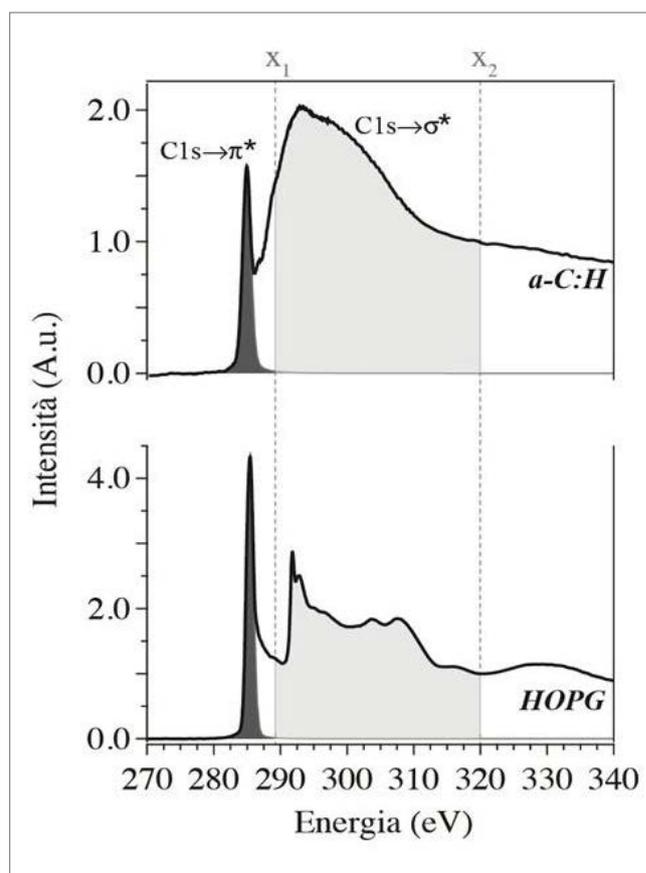


Fig. 1 - Spettri NEXAFS del livello C1s per un campione di carbonio amorfo idrogenato (a-C:H) e grafite pirolitica altamente orientata (HOPG). La determinazione quantitativa della frazione di carbonio in stato di ibridazione  $sp^2$  si basa sull'intensità relativa dei picchi  $C1s \rightarrow \pi^*$  e  $C1s \rightarrow \sigma^*$ . L'intensità del picco  $C1s \rightarrow \pi^*$  viene ottenuta tramite *fitting* con una gaussiana [9, 33], mentre l'intensità del segnale  $C1s \rightarrow \sigma^*$  viene ricavata integrando numericamente lo spettro in un intervallo energetico ( $x_1-x_2$ )

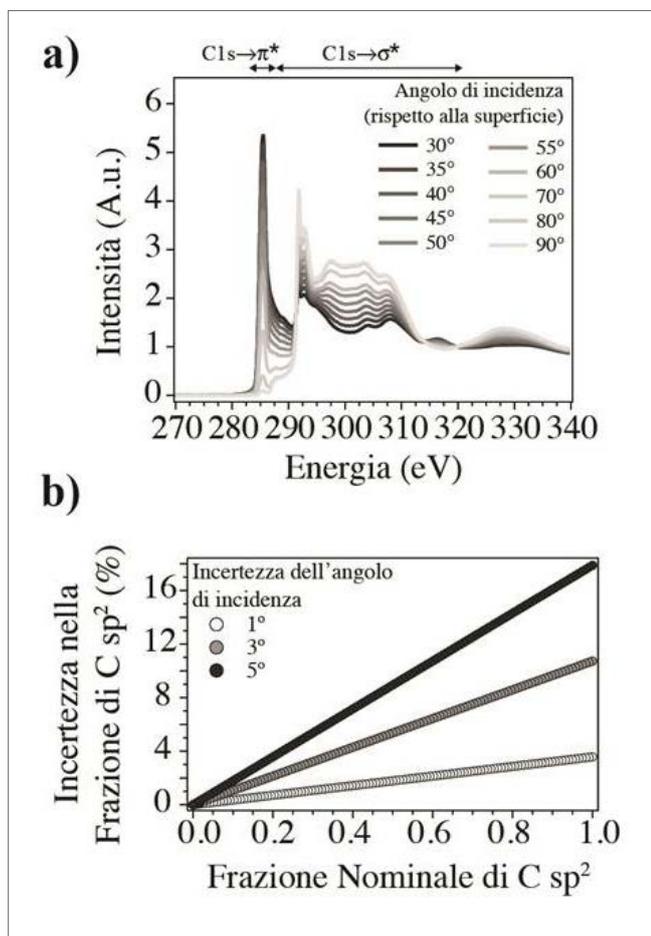


Fig. 2 - a) Spettri NEXAFS del livello C1s per un campione di grafite pirolitica altamente orientata (HOPG) acquisiti a differenti angoli d'incidenza dei fotoni X (rispetto alla superficie); b) incertezza nella frazione di carbonio  $sp^2$  dovuta ad incertezze nella posizione angolare del campione di riferimento (HOPG) in funzione del frazione nominale di carbonio  $sp^2$  nel campione in studio

campione di riferimento, mentre  $I_{sam}(DE)$  e  $I_{ref}(DE)$  sono le aree ottenute integrando lo spettro del campione in studio e del campione di riferimento fra due limiti ( $x_1$  e  $x_2$ ).

L'analisi della letteratura ha evidenziato inconsistenze nella definizione dei limiti di integrazioni ( $x_1$ - $x_2$ ) utilizzati per la determinazione dell'area del segnale C1s→ $\sigma^*$  (289-295 eV [48], 294-301 eV [24, 25], 293-302 eV [21], 288,6-325 eV [33], 289-325 eV [32], and 288,6-320 eV [9]), nonché nelle condizioni sperimentali utilizzate durante l'acquisizione dello spettro della grafite pirolitica altamente orientata (in particolare, l'angolo d'incidenza del fascio X, e.g., 55° rispetto alla superficie [33] o 45° [9, 21]). La definizione dell'angolo d'incidenza dei fotoni X è di particolare importanza

nel caso della grafite pirolitica altamente orientata a causa della dipendenza dell'intensità relativa dei picchi C1s→ $\pi^*$  e C1s→ $\sigma^*$  dalla direzione del vettore del campo elettrico del fascio di raggi X (Fig. 2a) [47].

La derivazione teorica delle condizioni sperimentali per l'acquisizione dello spettro NEXAFS della grafite HOPG ha permesso la determinazione dell'angolo d'incidenza dei raggi X (rispetto alla superficie) in corrispondenza del quale i picchi  $\pi^*$  e  $\sigma^*$  contribuiscono equamente allo spettro NEXAFS:

$$\theta_c = \cos^{-1}(1/2P)^{1/2} \quad (2)$$

dove P è il fattore di polarizzazione del fascio di raggi X ( $P = |E_{||}|^2 / (|E_{||}|^2 + |E_{\perp}|^2)$ ) [47] ( $P=0,85$  nel caso delle linee di luce utilizzate nel lavoro presente [44, 49]). Nel caso di raggi X polarizzati linearmente ( $P=1$ ),  $\theta_c$  risulta uguale a 45°, mentre nel caso di raggi X polarizzati ellitticamente con un fattore di polarizzazione di 0.85,  $\theta_c$  risulta uguale a 40°. Tale risultato evidenzia che le condizioni sperimentali utilizzate in molti lavori pubblicati in letteratura per l'acquisizione dello spettro di riferimento HOPG, in cui l'angolo d'incidenza dei raggi X è 55° rispetto alla superficie della grafite, non sono corrette.

La marcata dipendenza dell'intensità relativa dei picchi C1s→ $\pi^*$  e C1s→ $\sigma^*$  dalla direzione del vettore del campo elettrico del fascio di raggi X nel caso dello spettro del campione di riferimento (HOPG) pone ulteriori problemi per la determinazione della frazione del carbonio  $sp^2$  per i materiali a base di carbonio. Infatti, incertezze nella posizione angolare della grafite pirolitica altamente orientata rispetto alla direzione del fascio di raggi X possono risultare in incertezze nell'analisi quantitativa. L'acquisizione di spettri HOPG a differenti angoli d'incidenza ( $\theta$ ) del fascio X (Fig. 2a) ha permesso la derivazione di un'espressione analitica per la dipendenza dell'intensità relativa dei picchi C1s→ $\pi^*$  e C1s→ $\sigma^*$  dall'angolo  $\theta$ . Tale espressione è stata in seguito utilizzata per la valutazione dell'incertezza nella frazione di carbonio  $sp^2$  in funzione dell'incertezza dell'angolo di incidenza ( $\theta$ ). Nel caso di un'incertezza di 1° in  $\theta$ , l'incertezza nella frazione di carbonio in stato d'ibridizzazione  $sp^2$  aumenta linearmente con la frazione nominale di carbonio  $sp^2$  fino a un valore di 3,6% nel caso di un rivestimento



con una frazione di carbonio  $sp^2$  di 1,0 (Fig. 2b). Come riportato in precedenza, l'intensità del segnale  $C1s \rightarrow \sigma^*$  viene ricavata integrando numericamente lo spettro in un intervallo energetico ( $x_1$ - $x_2$ ). Alla luce dell'utilizzo di differenti limiti d'integrazione in letteratura, l'effetto di tali limiti sull'analisi quantitativa della frazione di carbonio  $sp^2$  è stato studiato nel caso di un campione di carbonio amorfo idrogenato. I risultati hanno evidenziato che la variazione del limite inferiore di integrazione ( $x_1$ ) fra 286,6 eV e 295 eV (tenendo il limite di integrazione superiore fisso a 320 eV) non comporta variazioni significative nella frazione di carbonio  $sp^2$  calcolata. Al contrario, la variazione del limite superiore d'integrazione ( $x_2$ ) (tenendo il limite di integrazione inferiore fisso a 286,6 eV) ha mostrato una variazione significativa dei risultati per valori di  $x_2$  inferiori a 310 eV. Questi risultati dimostrano che, per la quantificazione dello stato d'ibridazione del carbonio tramite spettroscopia NEXAFS, l'intensità del segnale  $C1s \rightarrow \sigma^*$  deve essere ottenuta con un limite d'integrazione inferiore ( $x_1$ ) arbitrario fra 286,6 eV e 295 eV, mentre il limite di integrazione superiore ( $x_2$ ) non deve essere fissato ad energie inferiori a 310 eV.

La caratterizzazione di un rivestimento amorfo carbonioso tramite spettroscopia NEXAFS, XPS e Raman ha infine evidenziato un accordo fra i risultati NEXAFS ottenuti con uno spettro di riferimento acquisito ad un angolo di incidenza di  $40^\circ$  ( $f_{sp^2} = 0,44 \pm 0,03$ ) e i risultati ottenuti tramite spettroscopia XPS ( $f_{sp^2} = 0,48 \pm 0,02$ ) [5] e Raman ( $f_{sp^2} = 0,45 \pm 0,01$ ) [50]. Al contrario, l'acquisizione dello spettro HOPG ad un angolo di incidenza di  $55^\circ$  risulta in differenze significative: la frazione di carbonio  $sp^2$  ottenuta dai risultati NEXAFS ( $f_{sp^2} = 0,77 \pm 0,03$ ) è notevolmente superiore a quella ottenuta dalla spettroscopia XPS e Raman. Questi risultati evidenziano l'importanza dell'utilizzo del corretto angolo d'incidenza del fascio X per l'acquisizione dello spettro di riferimento HOPG.

In conclusione, il presente lavoro ha rivisitato la metodologia per la valutazione quantitativa dello stato d'ibridazione del carbonio tramite spettroscopia NEXAFS, la quale è basata sull'analisi di un campione di riferimento (solitamente grafite pirolitica altamente orientata HOPG) oltre al campione in studio. Inconsistenze nell'utilizzo di tale metodologia sono state evidenziate nella letteratura.

La derivazione teorica delle condizioni sperimentali per l'acquisizione dello spettro di riferimento NEXAFS (HOPG) ha fornito un metodo specifico per l'uso della spettroscopia NEXAFS per la determinazione dello stato di legame del carbonio e permesso lo studio delle sorgenti d'incertezza nell'analisi quantitativa. La caratterizzazione di un rivestimento amorfo carbonioso tramite spettroscopia NEXAFS ha evidenziato un accordo fra i risultati NEXAFS e quelli ottenuti tramite spettroscopia fotoelettronica a raggi X e spettroscopia Raman.

*Per ulteriori informazioni:* F. Mangolini, J.B. McClimon, R.W. Carpick, *Analytical Chemistry*, 2016, **88**(5), 2817, DOI 10.1021/acs.analchem.5b04525.

### Ringraziamenti

F.M. ringrazia il Gruppo di Spettroscopia Analitica della Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Italiana per il Premio Ambrogio Mazzucottelli. Un particolare ringraziamento va agli organizzatori dell'Incontro di Spettroscopia Analitica 2016 svoltosi a Matera per l'opportunità di presentare il lavoro e l'invito alla stesura di questo articolo.

### BIBLIOGRAFIA

- [1] Tribology of Diamond-Like Carbon Films, C. Donnet, A. Erdemir (Eds.), Springer, New York, 2008.
- [2] C. Donnet, A. Erdemir, Tribology of Diamond, Diamond-Like Carbon, and Related Films, CRC Press, 2001.
- [3] J. Robertson, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2002, **37**(4-6), 129.
- [4] S. Kaciulis, *Surface and Interface Analysis*, 2012, **44**(8), 1155.
- [5] F. Mangolini *et al.*, *Applied Physics Letters*, 2013, **103**(16), 161605.
- [6] A. Mezzi, S. Kaciulis, *Surface and Interface Analysis*, 2010, **42**(6-7), 1082.
- [7] J.C. Lascovich *et al.*, *Applied Surface Science*, 1999, **152**(1-2), 10.
- [8] J. Filik *et al.*, *Diamond and Related Materials*, 2003, **12**(3-7), 974.
- [9] F. Mangolini *et al.*, *Anal Chem.*, 2014, **86**(24), 12258.
- [10] S. Kaciulis *et al.*, *Surface and Interface Analysis*, 2014, **46**(10-11), 966.
- [11] B. Lesiak *et al.*, *Physica Status Solidi (b)*,

- 2010, **247**(11-12), 2838.
- [12] G. Speranza *et al.*, *Diamond and Related Materials*, 2004, **13**(3), 445.
- [13] J. Zemek *et al.*, *Applied Surface Science*, 1998, **133**(1-2), 27.
- [14] J. Diaz *et al.*, *Physical Review B*, 1996, **54**(11), 8064.
- [15] A.C. Ferrari *et al.*, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2000, **266-269**, 765.
- [16] S.D. Berger *et al.*, *Philosophical Magazine Letters*, 1988, **57**(6), 285.
- [17] J. Kulik *et al.*, *Physical Review B*, 1995, **52**(22), 15812.
- [18] Y. Wang *et al.*, *Journal of Materials Research*, 1990, **5**(11), 2378.
- [19] D.S. Grierson *et al.*, *Journal of Applied Physics*, 2010, **107**(3), 033523.
- [20] C. Lenardi *et al.*, *Journal of Applied Physics*, 1999, **85**(10), 7159.
- [21] S. Osswald *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, 2006, **128**(35), 11635.
- [22] F.L. Coffman *et al.*, *Applied Physics Letters*, 1996, **69**(4), 568.
- [23] J. Díaz *et al.*, *Physical Review B*, 2001, **64**(12), 125204.
- [24] R. Gago *et al.*, *Surface Science*, 2001, **482-485**, 530.
- [25] R. Gago *et al.*, *Journal of Applied Physics*, 2000, **87**(11), 8174.
- [26] C. Lenardi *et al.*, *The European Physical Journal B - Condensed Matter and Complex Systems*, 2005, **46**(3), 441.
- [27] Surface Analysis by Auger and X-Ray Photoelectron Spectroscopy, D. Briggs, J.T. Grant (Eds.), IM Publications, 2003.
- [28] Y. Mizokawa *et al.*, *Surface Science*, 1987, **182**(3), 431.
- [29] Y. Mizokawa *et al.*, *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 1987, **5**(5), 2809.
- [30] R.F. Egerton. An Introduction to EELS, Springer, 2011, p. 1.
- [31] A.R. Konicek *et al.*, *Tribology Letters*, 2011, **44**(1), 99.
- [32] A.R. Konicek *et al.*, *Physical Review Letters*, 2008, **100**(23), 235502.
- [33] A.V. Sumant *et al.*, *Diamond and Related Materials*, 2007, **16**(4-7), 718.
- [34] A.V. Sumant *et al.*, *Advanced Materials*, 2005, **17**(8), 1039.
- [35] Y.S. Li *et al.*, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2010, **2**(2), 335.
- [36] J. Diaz *et al.*, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 1999, **101-103**, 545.
- [37] R. Gago *et al.*, *Journal of Applied Physics*, 2000, **87**(11), 8174.
- [38] A. Saikubo *et al.*, *Diamond and Related Materials*, 2008, **17**(7-10), 1743.
- [39] B.J. Schultz *et al.*, *Nat. Commun.*, 2011, **2**, 372.
- [40] D. Pacilé *et al.*, *Physical Review Letters*, 2008, **101**(6), 066806.
- [41] T. Hemraj-Benny *et al.*, *Small*, 2006, **2**(1), 26.
- [42] T. Maruyama *et al.*, *Diamond and Related Materials*, 2011, **20**(10), 1325.
- [43] A.D. Winter *et al.*, *Langmuir*, 2013, **29**(51), 15822.
- [44] J. Genzer *et al.*, *Journal of Applied Physics*, 2002, **92**(12), 7070.
- [45] A. Schöll *et al.* *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2003, **129**(1), 1.
- [46] B. Watts *et al.*, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, 2006, **151**(2), 105.
- [47] J. Stohr, NEXAFS Spectroscopy, Springer-Verlag, 1992.
- [48] R. Gago *et al.*, *Physical Review B*, 2005, **72**(1), 014120.
- [49] K.E. Sohn *et al.*, *Langmuir*, 2009, **25**(11), 6341.
- [50] F. Rose *et al.*, *Journal of Applied Physics*, 2014, **116**(12), 123516.

## Quantitative Evaluation of the Carbon Hybridization State by X-ray Absorption Spectroscopy

Near edge X-ray absorption fine structure (NEXAFS) spectroscopy is one of the mostly widely used surface-analytical techniques for the characterization of the local bonding configuration of carbon in carbon-based materials. The present work critically assesses the common methodology for quantitatively evaluating the carbon hybridization state using NEXAFS measurements.



Società Chimica Italiana

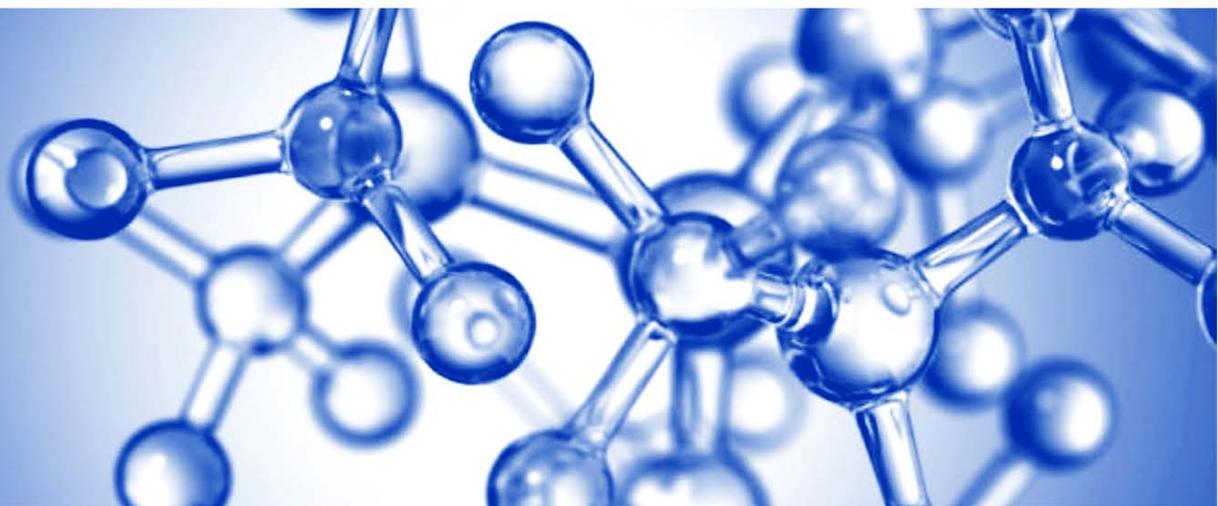


# ***SOCIETÀ CHIMICA ITALIANA***

## **XXVI**

# **Congresso Nazionale**

**10-14 Settembre 2017**



- ❖ **Chimica per la tutela dell'ambiente e del patrimonio culturale**
- ❖ **Chimica per l'economia circolare**
- ❖ **Chimica per la salute**
- ❖ **Produzione sostenibile e sviluppo economico**
- ❖ **Sessioni tematiche delle Divisioni Scientifiche con la partecipazione dei Gruppi Interdivisionali**
- ❖ **Attività del Gruppo Giovani: *Premio Levi***
- ❖ **Attività del Gruppo Senior: *Chimica e Sport***
- ❖ **Eventi satellite di interesse industriale:**
  - ◆ ***Grafene e sue possibili applicazioni industriali***
  - ◆ ***Formulazioni nell'industria chimica e farmaceutica***

**Centro Congressi dell'Hotel Ariston**

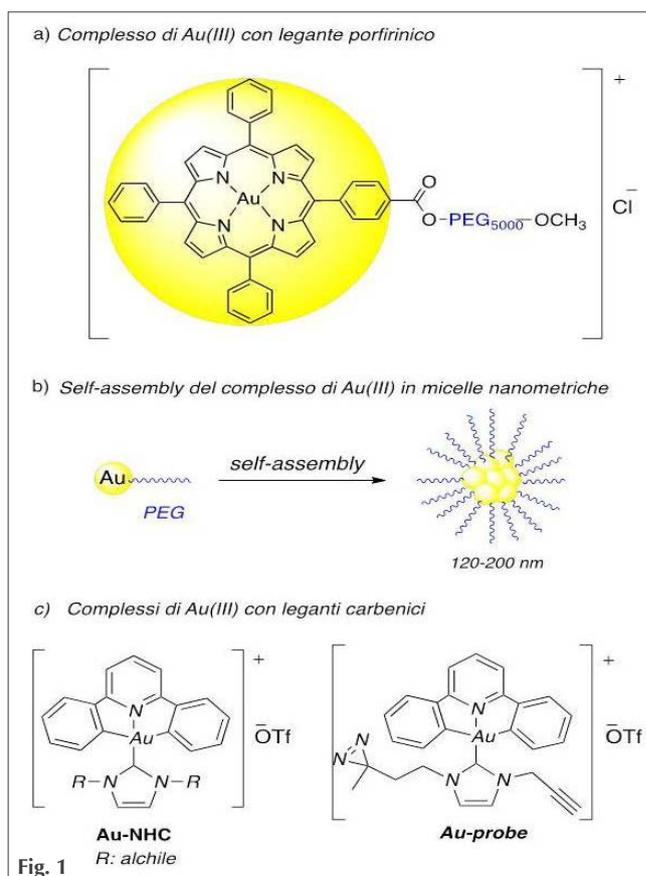
**Via Laura 13, Paestum, Salerno**

**[www.sci2017.org](http://www.sci2017.org)**



## Complessi di oro quali nuovi agenti antineoplastici

L'oro è tra i metalli più interessanti e studiati nella chimica organometallica, soprattutto grazie alle numerose applicazioni che i suoi complessi trovano in catalisi e, più recentemente, in ambito biomedico. La letteratura di questi ultimi mesi riporta in particolare alcuni promettenti sviluppi sull'impiego di complessi di Au(III) come potenziali agenti antineoplastici. I complessi di Au(III) mostrano infatti una maggiore attività rispetto a quelli di Au(I), sebbene risultino generalmente più tossici e meno stabili in condizioni fisiologiche a causa del loro maggiore potere ossidante e dell'elevata velocità di idrolisi. Un'eccezione è rappresentata dai complessi di Au(III) contenenti leganti porfirinici, i quali mostrano una buona stabilità in condizioni fisiologiche: tale stabilità garantisce a questi complessi un'elevata attività anticancro *in vivo* nei confronti di diversi tipi di carcinoma. Purtroppo però, la scarsa biodisponibilità e l'elevata tossicità nelle cellule sane sono ancora tra i maggiori ostacoli per uno sviluppo in fase clinica di questi complessi. Tra i diversi approcci utilizzati per superare questi problemi, la nano-formulazione sembra essere una delle soluzioni più promettenti, soprattutto per complessi metallici con azione antineoplastica. Recentemente, un gruppo di ricercatori di Hong Kong [C.-M. Che *et al.*, *Chem. Sci.*, 2017, **8**, 1942] ha messo a punto un sistema nanoconiugato multifunzionale a base di un complesso porfirinico di Au(III) coniugato a glicole polietilenico (Fig. 1a). L'impiego del PEG, che è un ben noto polimero a carattere idrofilico approvato dall'FDA per la formulazione di farmaci, oltre a rendere il complesso di Au(III) maggiormente solubile in acqua, minimizza le interazioni del complesso con proteine o altre biomolecole presenti nell'ambiente biologico, preservando il complesso da processi di decomposizione. Inoltre, il PEG conferisce un elevato carattere anfifilico al complesso, che è così in grado di riarran-



giarsi in ambiente acquoso in micelle di dimensioni nanometriche (ca. 120-200 nm, Fig. 1b). Tale nanoconiugato presenta un'elevata tossicità *in vitro* nei confronti di numerose linee di cellule tumorali umane, comprese alcune linee cellulari resistenti al cisplatino e alla doxorubicina, e dimostra, inoltre, una buona selettività d'azione verso le cellule tumorali rispetto a quelle sane. Buoni risultati sono stati ottenuti anche in esperimenti *in vivo*, osservando una bassa tossicità sistemica, accompagnata da un'inibizione nella crescita di tumori, compresi anche quelli resistenti al cisplatino. Il gruppo di Che ha sviluppato anche una nuova classe di derivati organometal-



lici ad elevata attività antitumorale sia *in vitro* che *in vivo* [C.-M. Che *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, **56**(14), 3892], costituiti da complessi ciclo metallati di Au(III) contenenti leganti di natura carbenica (**Au-NHC**, Fig. 1c). Una semplice modifica strutturale di questi complessi ha permesso di ottenere un utilissimo *probe* chimico (**Au-probe**, Fig. 1c), in grado di formare addotti covalenti con la proteina tramite irraggiamento sfruttando il pendaglio diazirinico, e di legarsi ad un fluoroforo attraverso *click-chemistry* sfruttando il pendaglio alchilico. **Au-probe** ha permesso di evidenziare che i complessi Au-NHC sono agenti anticancro *multi-target*, capaci di legarsi specificatamente a ben sei diverse *cellular proteins*, tutte considerate potenziali target anticancro. Questa caratteristica risulta molto interessante, soprattutto nel contrastare il fenomeno della resistenza ai farmaci antitumorali, che si verifica generalmente con agenti antitumorali *single-target*, come conseguenza di mutazioni genetiche del DNA molto frequenti nelle cellule tumorali. I complessi **Au-NHC** rappresentano quindi degli ottimi candidati nello sviluppo di antitumorali *multi-target*, caratterizzati da una potenziale *low drug resistance*.

### Determinazione della struttura 3D di aptameri *single-strand* di DNA

Gli aptameri sono oligonucleotidi capaci di legarsi a specifici *targets* cellulari. Data la versatilità e semplicità del loro utilizzo come biosensori, stanno diventando una valida alternativa ai comuni *probes* basati su anticorpi. Formati da brevi sequenze di acidi nucleici, sono molto stabili, selettivi e possono essere utilizzati per diverse applicazioni in campo biomedico visto che riconoscono ioni, piccole molecole, co-fattori, RNA, proteine e oligosaccaridi o altri componenti cellulari compresi i batteri. La tecnica per la selezione degli aptameri è chiamata *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) e

si basa su un processo a più stadi in cui vengono selezionati aptameri di 20-25 nucleotidi da un insieme di sequenze *randomized* di RNA o DNA. La determinazione della struttura 3D di un aptamero, e quindi dell'interazione con un target proteico, potrebbe migliorare la selettività del bio-sensore e, di conseguenza, le sue potenzialità applicative. Inoltre, nota a livello molecolare l'interazione tra aptameri immobilizzati sulla superficie del bio-sensore si potrebbero progettare *probes* più selettivi e sensibili. Ad oggi i *tools* computazionali per la predizione strutturale di aptameri sono limitati alle sequenze *single-strand* di RNA mentre mancano per i sistemi più stabili ssDNA, di cui esistono poche strutture sperimentali. In questo lavoro [I. Jeddi, *Scientific Reports*, 2017, 1178], gli autori propongono una *pipeline* computazionale basata su quattro passaggi principali (Fig. 2) in cui diversi *tools* strutturali 2D e 3D vengono applicati per determinare la struttura di aptameri ssDNA. Nel primo passaggio si genera una struttura secondaria dell'aptamero a partire dalla sequenza di nucleotidi, in seguito (step 2) si genera un modello 3D equivalente di RNA, nel terzo step il modello 3D di RNA è trasferito in un modello 3D di DNA e nel passaggio finale (step 4) la struttura viene minimizzata.

Il metodo è stato valutato selezionando 24 ssDNA con una struttura nota ottenendo dei buoni risultati soprattutto per strutture di DNA di tipo hairpin.

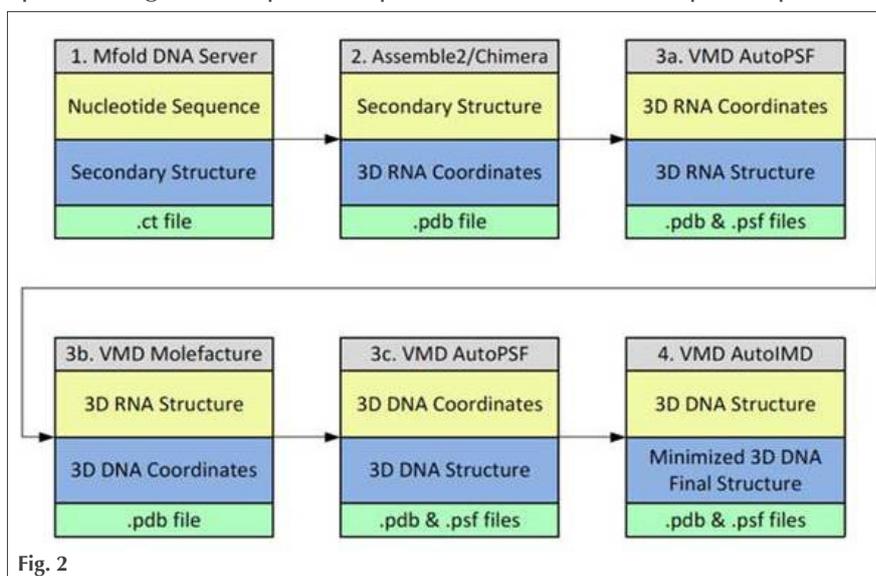


Fig. 2



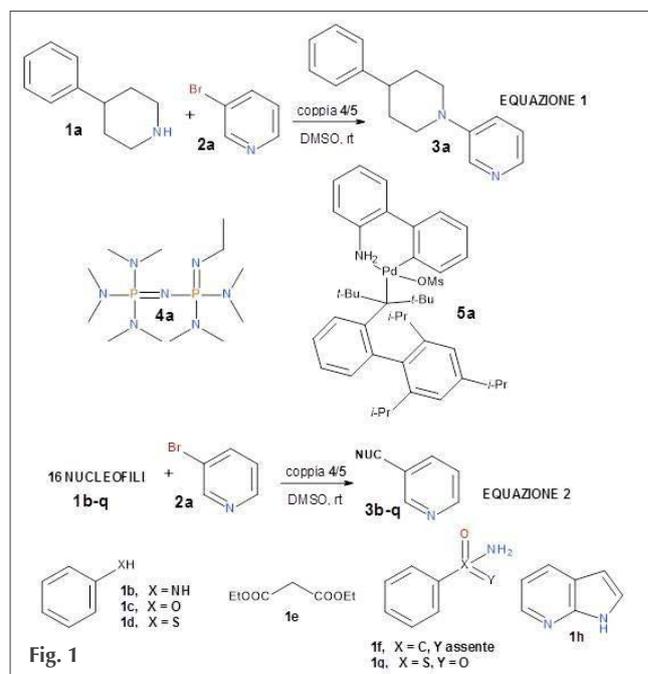
A CURA DI PIERFAUSTO SENECI  
 DIPARTIMENTO DI CHIMICA  
 UNIVERSITÀ DI MILANO  
 PIERFAUSTO.SENECI@UNIMI.IT

Questo mese parliamo di *nanoscale organic synthesis*, di *high throughput experimentation*, e di ottimizzazione di composti attivi da *high throughput screening/HTS*; per farlo useremo due recenti lavori di un gruppo di chimici della multinazionale Merck, ad assicurarci della rilevanza applicativa del loro approccio.

Nel 2015 [A. Buitrago Santanilla *et al.*, *Science*, 2015, **347**, 49] è stata pubblicata la sintesi ad alta capacità miniaturizzata, applicata a trasformazioni chimiche complesse e di rilevanza farmacologica. Analizzando il Database Merck riguardo a reazioni conclusive di “assemblaggio” di molecole finali da due intermedi avanzati e costosi per accoppiamento C-N, gli autori riportano che il 55% (più della metà!) di tali *coupling* fallisce. In altre parole, reazioni ottimizzate su substrati semplici falliscono spesso quando applicate a substrati complessi.

I ricercatori hanno scelto un C-N *coupling* standard (eq. 1, Fig. 1), e ne hanno ottimizzato le condizioni sperimentali usando 96 combinazioni fra 6 basi organiche (solubili in molti solventi) e 16 complessi catalitici Pd-ligando (scelti anche per l'ingombro, a schermare il Pd da complessazione con solventi coordinanti). Le 96 reazioni sono state condotte prima in micropiastra (*microscala*) a 96 pozzetti, contenenti una *vial* di vetro, con  $\approx 1$  mg di composto in 25  $\mu$ L di DMSO (solvente “universale”) a temperatura ambiente; in seguito in nanopiastra (*nanoscala*) a 1536 pozzetti di plastica, con  $\approx 20$   $\mu$ g di composto in  $\approx 1$   $\mu$ L. In ambo i casi, con l'appropriata automazione e miniaturizzazione, si è eseguita la reazione, si è valutata la resa e si sono caratterizzati i prodotti; la coppia base **4a**/complesso catalitico **5a** ha dato i migliori risultati in resa di **3a** (Fig. 1). La scala nano/1536 pozzetti ha permesso di ripetere lo schema a 96 combinazioni per il coupling fra l'aril bromuro **2a** e 16 diversi nucleofili (**1b-q**, eq. 2; alcu-

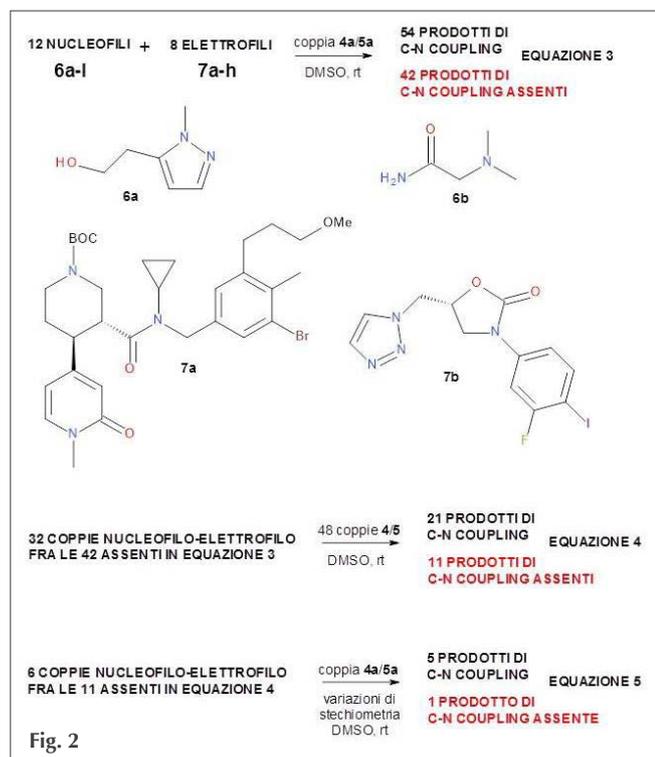
ni esempi di nucleofili/**1b-g** sono mostrati in Fig. 1); si sono identificate alcune coppie base-complesso catalitico a dare il prodotto di reazione per la maggioranza dei 16 composti **3b-q**.



Gli autori hanno poi affrontato un set di composti complesso: 12 nucleofili (fra cui **6a** e **6b**) e 8 elettrofili (fra cui **7a** e **7b**, eq. 3, Fig. 2). Le 96 combinazioni sono state testate usando in micropiastra/96 pozzetti la coppia base **4a**/complesso catalitico **5a** e le migliori condizioni sperimentali. 54 dei 96 prodotti attesi si sono formati, con rese variabili; ben 42 ( $\approx 45\%$ ), a dimostrazione della poca “universalità” di reattività per substrati diversi, non sono stati ottenuti. Gli autori hanno scelto 32 fra i 42 *coupling* “falliti”, e li hanno effettuati in nanopiastra/1536 pozzetti in 48 condizioni di reazione diverse (eq. 4, 8 basi, 6 complessi catalitici), ottenendo 21 fra i 32 composti

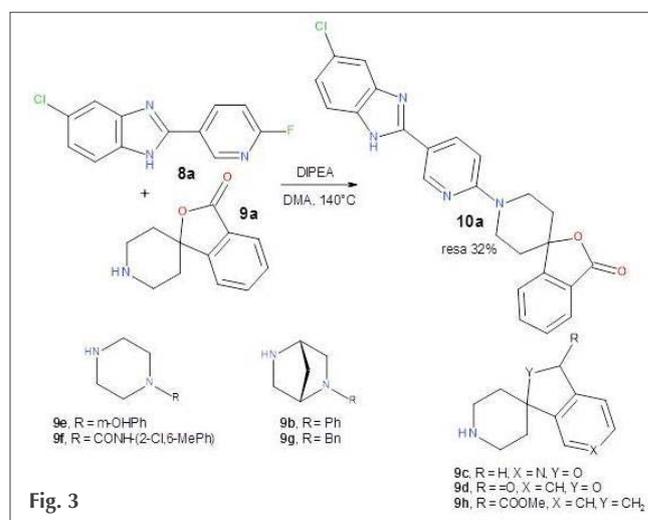


attesi; infine, scegliendo 6 degli 11 *coupling* ancora "falliti" e sottoponendoli a 48 condizioni diverse (eq. 5, diverse stechiometrie di reagenti, basi e catalizzatori, Fig. 2) in 3 micropiastre/96 pozzetti, 5 fra i 6 prodotti attesi sono stati ottenuti.

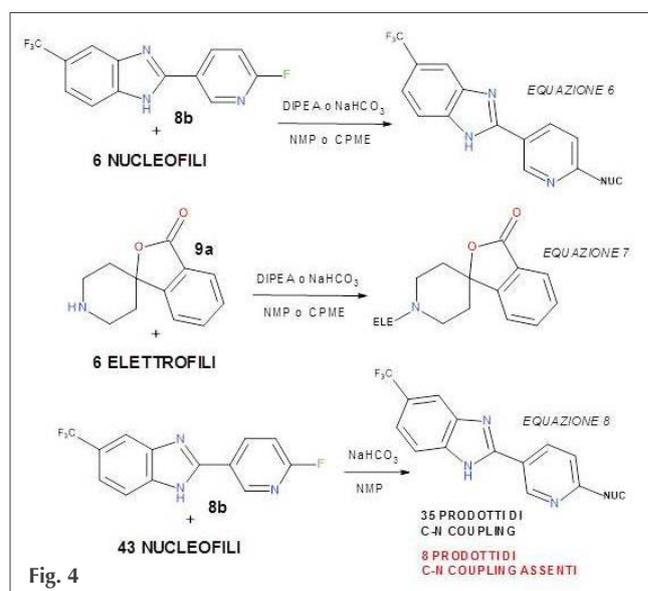


Bassissimo consumo di reattivi, rapida messa a punto di condizioni di reazione, librerie di analoghi per acquisire relazioni struttura-attività per una classe di composti. Quest'ultimo punto in particolare è l'argomento di un recentissimo lavoro dello stesso gruppo [T. Cernak *et al.*, *J. Med. Chem. ASAP Articles*, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01543] in cui la metodologia (in versione micropiastre,  $\approx 1$  mg scala di reazione) è applicata ad un progetto *hit-to-lead*. A partire dal benzimidazolo **10a** (Fig. 3), inibitore della diacilglicerolo ariltransferasi 1 (DGAT1) sintetizzato dall'aril cloruro **8a**/elettrofilo e dalla spiroiperidina **9a**/nucleofilo, gli autori hanno il nucleofilo (sette composti **9b-g**, Fig. 3); utilizzando le condizioni di sintesi usate per **10a** (dimetilacetammide/DPA come solvente, DIPEA come base). Ben 4 reazioni su 7 (composti **9d-f**) non hanno prodotto il composto desiderato, impedendo l'acquisizione di una SAR preliminare.

L'uso di *high throughput experimentation* su scala micropiastre/96 pozzetti ha permesso di identifica-



re le migliori condizioni di reazione attraverso 48 esperimenti (elettrofilo **8b** + 6 nucleofili **9i-n**, eq. 6, Fig. 4; nucleofilo **9a** + 6 elettrofili **8a,8c-g**, eq. 7; 4 coppie solvente-base per ogni esperimento), con solo due reazioni fra **9a** e due elettrofili fallite sulle 12 effettuate. La coppia N-Me-pirrolidone (NMP)-sodio bicarbonato è stata poi usata per ottenere una libreria di analoghi con buon successo (35 prodotti ottenuti su 43 previsti, 30 mg di composto **8a** usati in totale, eq. 8, Fig. 4); la loro caratterizzazione ha permesso agli autori di ottimizzare strutturalmente la serie degli inibitori benzimidazolici di DGAT1, fino a giungere alla struttura del *lead* **10b** (Fig. 4), dotato di attività *in vivo* ed in corso di caratterizzazione ulteriore.





## QUESTIONI DI SICUREZZA

Tutto sommato il mondo della sicurezza sul lavoro è entrato precocemente nella mia vita; prima attraverso mia moglie, che è una chimica, e che per parecchio tempo ha lavorato come ispettore del lavoro. Ne abbiamo discusso spesso, ma devo confessare che finché non sono entrato “di persona” nel mondo della sicurezza, nel momento in cui ho casualmente accettato di svolgere il ruolo di RLS (Rappresentante lavoratori per la sicurezza) previsto dalla legge 81/08, non mi sono mai sentito parte integrante di questo mondo così complesso. Non dico che ho sottovalutato le cose, ma certo la “percezione” del rischio ha avuto una parte ridotta nel mio lavoro. Me ne sono reso conto soltanto dopo, solo dopo essere entrato a pieno titolo dentro le problematiche. Solo oggi dopo oltre due anni come RLS nella mia università, dopo aver accettato quest’anno di svolgere anche un corso sul tema della sicurezza e di far parte della squadra prevenzione incendi, ho l’impressione di avere acquisito per la prima volta una visione più chiara di quanto la sicurezza sia importante non solo nella nostra attività lavorativa.

Questo mi fa riflettere sul fatto che probabilmente sarebbe assolutamente necessario che queste idee, questi concetti divenissero parte integrante del curriculum del chimico, fossero aggiunte nel suo background, allo stesso modo dell’analisi matematica, della meccanica quantistica o di qualunque altro insieme di idee e concetti chiave. Un corso base di sicurezza di alcune ore sarebbe anche necessario non solo per la frequenza ai laboratori di chimica dove lo studente che frequenta è da considerarsi un vero e proprio lavoratore, soggetto alle norme della 81/08, ma anche dopo, nell’attività lavorativa, dove il datore di lavoro di un chimico avrà necessità di fargli frequentare un corso di quel tipo. La situazione mi appare a macchia di leopardo, nel senso che alcuni corsi e alcune sedi universitarie si sono già attrezzate,

mentre altre latitano; la mia sede è nel guado, per esempio, anche perché non si tratta solo degli studenti di chimica, ma anche di tutti gli studenti che frequentano attività di laboratorio (fisica, biologia, ingegneria, etc.); non solo, anche l’uso delle postazioni di videoterminale è soggetto a controlli; e secondo le normative UE (sentenza 12-12-96) anche in questo caso, indipendentemente da chi usi il videoterminale, se supera o meno le 20 ore settimanali e possa essere considerato un videoterminale, la postazione come tale deve essere a norma.

La maggior parte di noi sono “preposti” nei confronti degli studenti, dei laureandi, dei dottorandi e dei post-doc: tutti costoro (compresi noi e i “dirigenti”, ossia direttori di dipartimento e Rettore, che è il datore di lavoro) dovrebbero seguire un più o meno breve corso di formazione e non di sola informazione; la differenza sta nella verifica dell’apprendimento e in chi eroga il corso.

Diversamente dall’industria e dai servizi, dove queste tematiche sono state al centro da parecchio, e dove però la gravità e complessità delle cose non ha impedito l’accadimento di gravi incidenti anche recenti, pur riducendone sia il numero assoluto che la frequenza rispetto al numero di ore lavorate, il settore universitario vede meno attenzione; eppure anche qui ci sono stati casi eclatanti (caso Catania).

La buona notizia è che secondo la CGIA di Mestre (2017): *Negli ultimi 45 anni il numero dei decessi e degli infortuni nei cantieri e nelle fabbriche è crollato: se all’inizio degli anni ’70 gli eventi infortunistici sfioravano quota 1,6 milioni, nel 2016 sono scesi al minimo storico di poco superiore a 630.000 unità. Sempre nello stesso arco temporale, i morti, invece, sono passati da poco più di 3.650 a poco più di un migliaio. Da un punto di vista statistico, correttezza impone di fare riferimento all’indice di frequenza degli incidenti: un parametro che viene calcolato rap-*



portando il numero degli infortuni alle ore lavorate. Ebbene, tra il 2011 e il 2016 l'indice di frequenza degli infortuni è in costante diminuzione e nell'ultimo anno è sceso addirittura dell'1,3 per cento.

Tuttavia malgrado il miglioramento rimane la questione base; ogni anno almeno 1.000 persone in Italia muoiono di lavoro: 3 al giorno, una ogni 8 ore, una ogni "giorno" di lavoro.

A questo dobbiamo aggiungere la questione rifiuti: come si smaltiscono i rifiuti di laboratorio? Spesso in modo inopportuno. In questo caso non ci sono morti o persone che si lamentano, ma l'ambiente ci chiede il conto o prima o poi.

La questione si potrebbe forse porre più facilmente chiedendo a noi stessi un po' di cose, note che nascono dalle banali osservazioni quotidiane:

- le vostre cappe sono verificate semestralmente? Al di là della verifica della cappa come elettrodomestico se aspirate da una cappa e le altre sono chiuse l'impianto vi garantisce che i fumi e i vapori, spesso non rilevabili, non ricadano in cappe adiacenti? Le vostre cappe lavorano per diluizione o per filtrazione? Se lavorano per diluizione (come nella maggior parte dei casi) i prodotti della emissione vengono espulsi in quali condizioni? Lontano dagli aspira-

- tori del vostro edificio? Nella direzione dei venti dominanti? Lontano da case o altre zone abitate?
- esiste un documento di valutazione del rischio del vostro laboratorio (DVR)? Ne siete a conoscenza? Lo usate come base della formazione degli studenti e dottorandi che lo frequentano? Esiste un piano di emergenza antincendio? Lo avete mai letto? Fate le prove antincendio? Sapete dove è il più vicino estintore e come si usa? Sapete se è un estintore a polvere, idrico o a CO<sub>2</sub>? Avete mai usato un estintore?
  - chi sono i rappresentanti per la sicurezza nel vostro posto di lavoro? Conoscete i loro nomi? Chi sono i membri della squadra antincendio?
  - come vi liberate dei residui di laboratorio? Esiste un piano per i rifiuti? Quando li consegnate all'addetto o li mettete nel deposito in attesa di smaltimento usate dei contenitori e delle etichette adeguati con le indicazioni di legge?

Se avete risposto senza problemi a tutte queste domande non avrete nessun premio, solo buona coscienza; se invece avete avuto problemi a rispondere a qualcuna di queste domande, queste pagine saranno state utili e vi invitano a fare qualcosa per cambiare la situazione.

Buon lavoro.

Nuovo pittogramma	Note	Vecchio pittogramma
	Questi prodotti possono esplodere a seguito del contatto, per esempio, con una sorgente di innesco o di urti. Comprendono quindi sostanze e miscele autoreattive ed alcuni perossidi organici.	
	Questi prodotti possono infiammarsi se: <ul style="list-style-type: none"> <li>• a contatto con sorgenti di innesco (scintille, fiamme, calore...)</li> <li>• a contatto dell'aria</li> <li>• a contatto dell'acqua (se c'è sviluppo di gas infiammabili)</li> </ul> Oltre alle sostanze infiammabili comprendono sostanze e miscele autoreattive ed autoriscaldanti, sostanze piroforiche ed alcuni perossidi organici.	
	Questi prodotti, tutti i combustibili, possono provocare o aggravare un incendio o anche una esplosione se in presenza di prodotti infiammabili.	
	Questi prodotti sono gas sotto pressione contenuti in un recipiente. Possono esplodere a causa del calore. I gas liquefatti refrigeranti possono causare ferite e ustioni criogeniche. Comprendono gas compressi, liquefatti, liquefatti refrigeranti e disciolti.	<b>Non presente</b>
	Questi prodotti sono corrosivi e comprendono quelli che: <ul style="list-style-type: none"> <li>• possono attaccare i metalli</li> <li>• possono provocare corrosione cutanea o gravi lesioni oculari</li> </ul>	
	Questi prodotti avvelenano rapidamente anche a piccole dosi, causano cioè tossicità acuta. Gli effetti sono molto vari dalle nausea alla perdita di conoscenza fino alla morte.	
	Questi prodotti possono provocare uno o più dei seguenti effetti: <ul style="list-style-type: none"> <li>• avvelenamento ad alte dosi</li> <li>• irritazione agli occhi, la pelle o le vie respiratorie</li> <li>• sensibilizzazione cutanea (es. allergie o eczemi)</li> <li>• sonnolenza o vertigini</li> </ul>	
	Questi prodotti possono rientrare in una o più delle seguenti categorie: <ul style="list-style-type: none"> <li>• cancerogeni</li> <li>• mutageni: modificazioni del DNA con danni sulla persona esposta o sulla sua discendenza</li> <li>• tossici per la riproduzione: effetti negativi sulle funzioni sessuali, diminuzione della fertilità, morte del feto o malformazioni</li> <li>• prodotti con tossicità specifica per organi bersaglio (es. fegato o sistema nervoso) sia per esposizioni singole che ripetute</li> <li>• prodotti con gravi effetti sui polmoni, anche mortali, se penetrano attraverso le vie respiratorie (anche a seguito di vomito)</li> <li>• prodotti che possono provocare allergie respiratorie (es. asma)</li> </ul>	
	Questi prodotti sono pericolosi per l'ambiente acquatico (es. pesci, crostacei, alghe o piante acquatiche)	



Società Chimica Italiana

La *Società Chimica Italiana*, fondata nel 1909 ed eretta in Ente Morale con R.D. n. 480/1926, è un'associazione scientifica che annovera quasi quattromila iscritti. I Soci svolgono la loro attività nelle università e negli enti di ricerca, nelle scuole, nelle industrie, nei laboratori pubblici e privati di ricerca e controllo, nella libera professione. Essi sono uniti, oltre che dall'interesse per la scienza chimica, dalla volontà di contribuire alla crescita culturale ed economica della comunità nazionale, al miglioramento della qualità della vita dell'uomo e alla tutela dell'ambiente.

La *Società Chimica Italiana* ha lo scopo di promuovere lo studio ed il progresso della Chimica e delle sue applicazioni. Per raggiungere questi scopi, e con esclusione del fine di lucro, la *Società Chimica Italiana* promuove, anche mediante i suoi Organi Periferici (Sezioni, Divisioni, Gruppi Interdivisionali), pubblicazioni, studi, indagini, manifestazioni.

Le Sezioni perseguono a livello regionale gli scopi della Società. Le Divisioni riuniscono Soci che seguono un comune indirizzo scientifico e di ricerca. I Gruppi Interdivisionali raggruppano i Soci interessati a specifiche tematiche interdisciplinari.

La Società organizza numerosi convegni, corsi, scuole e seminari sia a livello nazionale che internazionale. Per divulgare i principi della scienza chimica nella scuola secondaria superiore organizza annualmente i *Giochi della Chimica*, una competizione che consente ai giovani di mettere alla prova le proprie conoscenze in questo campo e che seleziona la squadra nazionale per le *Olimpiadi Internazionali della Chimica*.

Rilevante è l'attività editoriale con la pubblicazione, congiuntamente ad altre Società Chimiche Europee, di riviste scientifiche di alto livello internazionale. Organo ufficiale della Società è la rivista *La Chimica e l'Industria*.

### **Nuova iscrizione**

Per la prima iscrizione il Candidato Socio deve essere presentato, come da Regolamento, da due Soci che a loro volta devono essere in regola con l'iscrizione. I Soci Junior (nati nel 1987 o successivi) laureati con 110/110 e lode (Laurea magistrale e Magistrale a ciclo unico) hanno diritto all'iscrizione gratuita e possono aderire - senza quota addizionale - a due Gruppi Interdivisionali.

#### **Contatti**

*Sede Centrale*

Viale Liegi 48c - 00198 Roma (Italia)

Tel +39 06 8549691/8553968

Fax +39 06 8548734

Ufficio Soci Sig.ra Maria Carla Ricci

E-mail: [ufficiosoci@soc.chim.it](mailto:ufficiosoci@soc.chim.it)

Segreteria Generale Sig.ra Paola Cerrini

E-mail: [segreteria@soc.chim.it](mailto:segreteria@soc.chim.it)

Amministrazione Rag. Simone Fanfoni

E-mail: [simone.fanfoni@soc.chim.it](mailto:simone.fanfoni@soc.chim.it)

Congressi Sig.ra Manuela Mostacci

E-mail: [ufficiocongressi@soc.chim.it](mailto:ufficiocongressi@soc.chim.it)

#### **Supporto Utenti**

Tutte le segnalazioni relative a malfunzionamenti del sito vanno indirizzate a [webmaster@soc.chim.it](mailto:webmaster@soc.chim.it)

Se entro 24 ore la segnalazione non riceve risposta dal webmaster si prega di reindirizzare la segnalazione al coordinatore WEB [giorgio.cevasco@unige.it](mailto:giorgio.cevasco@unige.it)

#### **Redazione "La Chimica e l'Industria"**

*Organo ufficiale della Società Chimica Italiana*

Anna Simonini

P.le R. Morandi, 2 - 20121 Milano

Tel. +39 345 0478088

E-mail: [anna.simonini@soc.chim.it](mailto:anna.simonini@soc.chim.it)