

SPETTROSCOPIA RAMAN E POLIMORFISMO: IL RUOLO DEI FONONI

PER QUANTO LA SPETTROSCOPIA RAMAN SIA UNA TECNICA CONSOLIDATA NELLO STUDIO DEL POLIMORFISMO, L'ATTENZIONE ALLA ZONA SPETTRALE DEI MODI RETICOLARI (FONONI OTTICI) NON HA ANCORA ASSUNTO IL RILIEVO CHE MERITA LA SUA POTENZIALITÀ DI INDAGINE. IN QUESTO ARTICOLO SI ILLUSTRABREMENTE LO STATO DELL'ARTE AL RIGUARDO, CON RILEVANTI APPLICAZIONI NEL CAMPO DELLA TECNOLOGIA E DELLA FARMACEUTICA

Nella prefazione al suo libro sul polimorfismo nei cristalli molecolari [1] Joel Bernstein ricorda il fascino che aveva provato da giovane studente all'idea che una stessa molecola potesse cristallizzare in strutture differenti. Durante i successivi decenni di appassionato lavoro, questo interesse non avrebbe più abbandonato né lui, né quanti, avvicinati a tale tematica, ne hanno poi subito l'inevitabile seduzione scientifica. Certamente l'interesse del polimorfismo non può essere disgiunto dalle implicazioni commerciali, la maggior parte delle quali nel ramo farmaceutico [2]; e tuttavia, tale fascinazione trova le sue radici nella intrigante combinazione tra i rigorosi principi teorici alla base del polimorfismo e la frenetica attività sperimentale, legata a sofisticati metodi di cristallizzazione i cui esiti tuttavia, spesso erratici, non di rado sono legati a situazioni di serendipità e al limite dell'esoterismo [3-4].

Per la sua stessa natura, l'approccio al polimorfismo non può che essere interdisciplinare, non essendo possibile con una singola tecnica affrontare la complessità di questo problema. Lo scopo di questo articolo è di

illustrare l'impiego di una tecnica di spettroscopia Raman destinata, secondo la nostra opinione, ad assumere una sempre maggiore rilevanza nel riconoscimento strutturale dei cristalli molecolari.

Quando si parla di spettroscopia Raman e delle sue applicazioni, nella maggior parte dei casi la sua valenza analitica è limitata allo studio delle vibrazioni molecolari, con riferimenti e complementarità alle analoghe tradizionali indagini della spettroscopia infrarossa [5]. Eppure, nello studio dei numerosi campi applicativi dei materiali funzionali e degli API (Ingredienti Farmaceuticamente Attivi), le vibrazioni molecolari (modi intra-molecolari, zona spettrale $200-4.000\text{ cm}^{-1}$) rappresentano solo una parte delle potenzialità di indagine che la spettroscopia Raman può offrire [6]. In effetti, allo stato solido, esistono ulteriori modi normali di vibrazione, caratteristici del reticolo cristallino, che originano da movimenti collettivi, traslazionali e rotazionali, delle molecole nella cella elementare e che producono deformazioni dinamiche del reticolo cristallino. Questi modi vengono chiamati vibrazioni reticolari o *fononi reticolari*,

le cui frequenze cadono nella zona spettrale $10-150\text{ cm}^{-1}$. I fononi, sondando le interazioni inter-molecolari, si rivelano pertanto sensibili anche a piccole differenze nell'impacchettamento del solido cristallino.

Parallelamente, come il pattern della diffrazione a raggi X rappresenta la geometria di una struttura cristallina, così i fononi reticolari ne rappresentano la dinamica e poiché ogni struttura cristallina possiede una sua propria dinamica si può stabilire una stretta relazione tra struttura a raggi X e spettro Raman dei fononi reticolari.

Questi ultimi, rappresentando uno strumento ottimale per lo studio delle interazioni intermolecolari si rivelano conseguentemente un potente metodo di indagine nello studio di una varietà di fenomeni dello stato solido, tra i quali, appunto, il polimorfismo. Un esempio della relazione tra struttura cristallina e spettroscopia Raman nella zona dei fononi reticolari è schematizzato nella Fig. 1, nello specifico caso dei polimorfi LT e HT (bassa e alta temperatura di deposizione, rispettivamente) del semiconduttore organico pentacene.

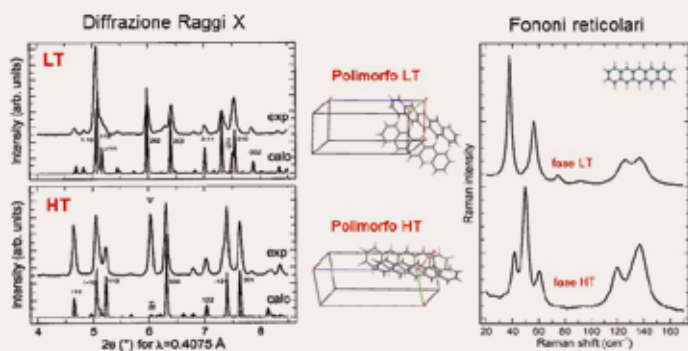


Fig. 1
Confronto tra la diffrazione a raggi X e lo spettro Raman nella zona dei fononi reticolari dei due polimorfi, LT e HT, di un cristallo singolo di pentacene. Nella parte centrale della figura sono rappresentate le due celle elementari

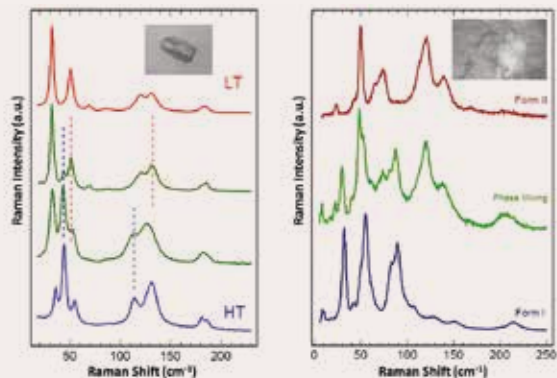


Fig. 2
Phase mixing del cristallo di pentacene (a sinistra) e di paracetamolo (a destra). I profili rossi e blu sono i riferimenti dei polimorfi fisicamente puri; le tracce verdi mostrano diverse situazioni di mescolamento di fase in particolari domini cristallini dei campioni

Una volta stabilita questa correlazione, il passo successivo consiste nello sfruttare le potenzialità che la microscopia Raman offre nelle sue varie configurazioni strumentali e con diversi livelli di approccio di tipo analitico. La possibilità, per esempio, di interfacciare un microscopio ottico allo spettrometro permette di rendere lo strumento confocale, scalan-

do in dimensione la regione spaziale del campione da investigare, fino ad aree superficiali di dimensioni inferiori al μm^2 , aprendo nuovi scenari nello studio della scienza dei materiali. Infatti, oltre al rapido e non distruttivo riconoscimento *in situ* dei singoli polimorfi, è possibile anche identificare impurezze fisiche, cioè disomogeneità di fase, su scala

micrometrica. Questo effetto è illustrato in Fig. 2, ove vengono mostrati diversi gradi di mescolamento di fasi che coesistono in domini cristallini di un campione apparentemente omogeneo di un semiconduttore organico (pentacene) e di un noto composto farmaceutico (paracetamolo).

In effetti, la conseguenza delle spesso piccole differenze energetiche tra due polimorfi di un materiale organico, può effettivamente produrre questo fenomeno di coesistenza di fase, indicato come “*phase mixing*” [7-8]. Il problema del phase mixing è stato spesso trascurato nei materiali organici, ove lo sforzo nella preparazione del campione era prevalentemente concentrato sull’eliminazione delle impurezze chimiche.

In realtà, nel campo emergente dell’elettronica organica, confini di fase tra domini di polimorfi diversi costituiscono una intrinseca sorgente di disordine, causando un ostacolo alla propagazione delle cariche, con conseguente impoverimento della prestazione del dispositivo [9].

Anche nel campo dell’industria farmaceutica il fenomeno del polimorfismo è riconosciuto come problema cruciale nello sviluppo di composti attivi. Variazioni nell’impacchettamento delle molecole allo stato solido degli API possono generare cambiamenti nelle proprietà chimico-fisiche, le quali hanno un impatto significativo sull’efficacia terapeutica e sulla biodisponibilità e processabilità del prodotto.

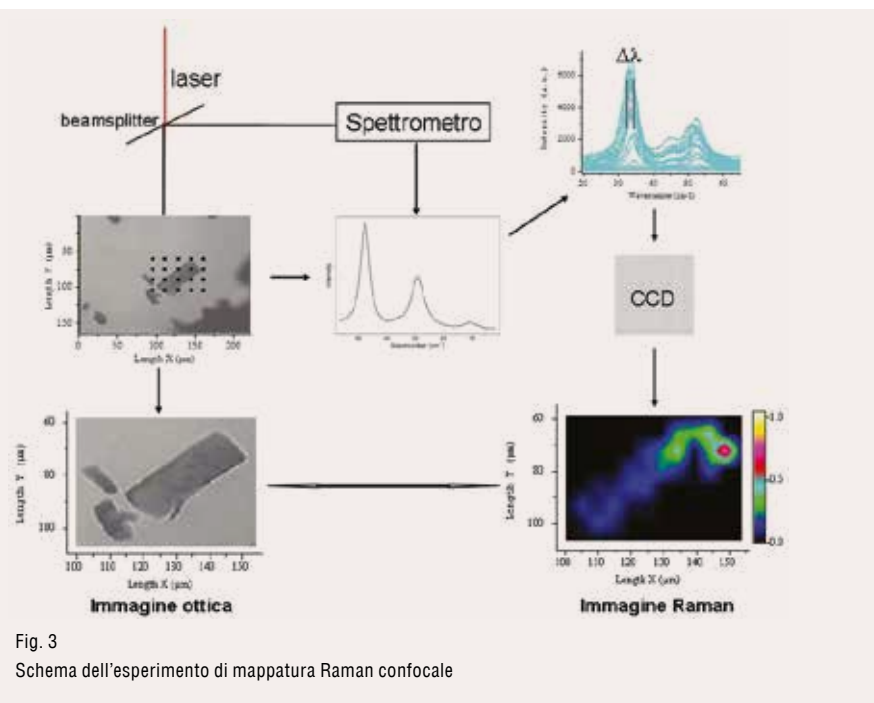


Fig. 3
Schema dell’esperimento di mappatura Raman confocale

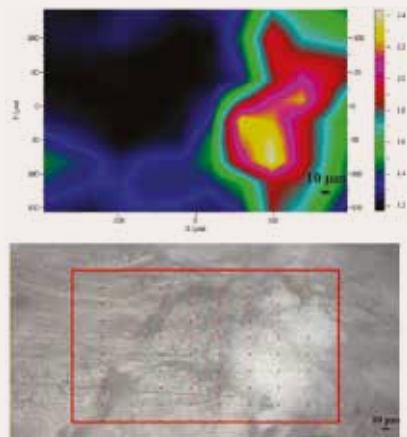


Fig. 4
Mappatura Raman di un campione di paracetamolo e sua immagine ottica. Il rapporto quantitativo (forma I/forma II) aumenta nel passaggio di colore dal blu al giallo

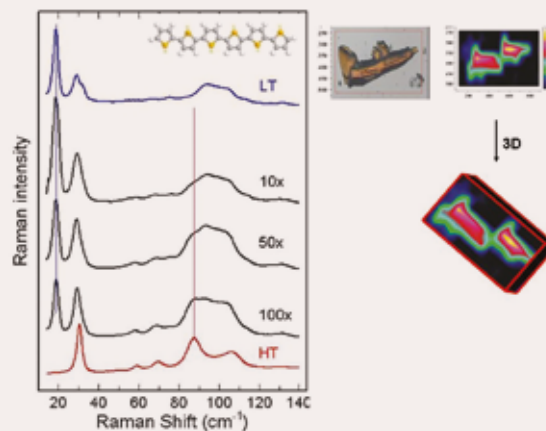


Fig. 5
Effetto della profondità di campo della radiazione laser per il campione di T6 le cui immagini ottica e Raman appaiono nella parte destra della figura. La rappresentazione schematica tridimensionale illustra qualitativamente la localizzazione della fase meno stabile nella parte superficiale del campione

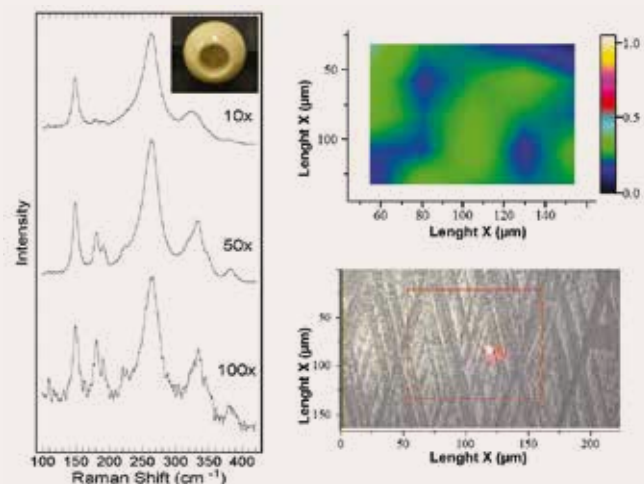


Fig. 6
Parte sinistra: effetto della profondità di campo sulla protesi di testa di femore a base zirconia, riportata nell'inserto. La fase monoclinica prodotta dallo stress superficiale diminuisce, fino a scomparire, man mano che lo scattering Raman passa dalla superficie (traccia inferiore) al bulk (traccia superiore). Parte destra: mappatura Raman (verde: monoclinico; blu: tetragonale) e immagine ottica di una zona campione della corona

Inoltre la forma cristallina di uno specifico API è un fattore chiave nella definizione dei parametri di protezione nel brevetto di un prodotto commerciale [10]. È quindi molto importante determinare un metodo che possa rapidamente costituire un test significativo, nello stesso tempo, sia del riconoscimento della fase di un solido cristallino che della sua omogeneità fisica. Tale risultato si ottiene usando la mappatura Raman confocale

(CRM) nella regione dei fononi reticolari [8]. Scansionando selezionate regioni del campione, tipicamente alcune decine di μm in ampiezza e lunghezza, è possibile registrare punto per punto una serie di spettri fononici che, attraverso un opportuno trattamento di grafica digitale, producono alla fine una mappa in colori convenzionali che viene confrontata alla rispettiva immagine ottica della regione esaminata del campione, per evidenziarne

eventuali disomogeneità di fase. Questo procedimento fornisce informazioni cruciali sulla topografia dei cristalli esaminati, con il vantaggio della immediatezza di un'immagine a colori facilmente interpretabile (Fig. 3).

L'applicazione riportata in Fig. 4 riguarda il phase mixing in un dominio cristallino di un campione di paracetamolo ottenuto per fusione. La paletta a colori convenzionali indica il rapporto della forma I rispetto alla II, in valori crescenti dal blu al giallo. È evidente che le due fasi, in queste condizioni di crescita, sono parzialmente compenstrate, specialmente nella zona più chiara del campione.

L'uso della confocalità in un microspettrometro Raman non è limitato alla mappatura superficiale del campione cristallino, ma può essere estesa alla determinazione dell'omogeneità di fase in domini a diversa profondità del campione in esame. Ciò si ottiene usando obiettivi del microscopio a diversa apertura numerica (NA), variando, in questo modo, la penetrazione del laser tipicamente da un valore teorico di $7,5 \mu\text{m}$ (100x, 0,90 NA) a $25 \mu\text{m}$ (50x, 0,75 NA) fino a un valore di circa $450 \mu\text{m}$ (10x, 0,25 NA). L'esempio riportato in Fig. 4 si riferisce ad un cristallo singolo di un altro semiconduttore organico, il sextiofene (T6) nel quale la fase meno stabile (HT) è prevalentemente localizzata sulla parte superficiale del campione.

Man mano che la radiazione penetra nel bulk del cristallo (da 100x a 10x) la struttura che

emerge è quella della fase termodinamicamente più stabile (LT).

Applicazioni di questa tecnica non sono limitate al campo dell'elettronica organica e possono essere estese a qualunque caso che richieda un'analisi strutturale che monitori la fase cristallina oltre la superficie. Un esempio al riguardo è riportato nella Fig. 6 e riguarda il polimorfismo in un materiale biocompatibile a base zirconia, ovvero la trasformazione di fase da tetragonale a monoclina indotta dallo stress meccanico rilevata sulla superficie sferica di una protesi di testa di femore espantata (analisi ex post). Considerato che a questa trasformazione di fase corrisponde un deterioramento delle proprietà meccaniche del materiale diventa rilevante poter disporre di una tecnica analitica che possa mettere in evidenza differenze tra la superficie e il bulk di componenti strutturali. La parte sinistra della figura mostra l'effetto della profondità di campo della eccitazione Raman in punti generici sulla superficie liscia del campione. Il risultato è esemplare: lo stress meccanico, determinato dall'usura della protesi nel tempo, è, come atteso, essenzialmente localizzato sulla superficie. Man mano che il laser penetra nel campione (passaggio da 100x a 10x) la fase monoclina, rappresentata dalle intense bande nell'intervallo 170-200 cm^{-1} , tende a diminuire, fino a praticamente scomparire nell'interno del campione. La parte destra della Fig. 6 mostra invece una mappatura della zona della corona, immediatamente vicina alla zona dell'innesto nel collo del femore. In questa zona, l'effetto della usura è documentato dalla presenza della fase monoclina (verde nella figura) mescolata alla fase tetragonale (colore blu), caratteristica della protesi pristina. Questo risultato rappresenta un veloce test per una *analisi qualità* di protesi biocompatibili a base di materiali ceramici.

Conclusioni

In questo articolo sono stati presentati alcuni esempi dell'applicazione della microscopia Raman confocale a rilevanti problemi legati al polimorfismo dei materiali molecolari nel campo farmaceutico, ortopedico ed in quello della elettronica organica. Nella maggior parte dei casi si è mostrato come l'uso dei fononi reticolari nella spettroscopia Raman, rappresenti un potente e versatile mezzo di

indagine che completa in modo ottimale le informazioni strutturali derivanti dall'analisi della diffrazione dei raggi X. La ridotta scala spaziale che si può raggiungere in microscopia Raman confocale permette di ottenere in modo relativamente semplice e in tempi brevi mappature Raman di singoli campioni per il controllo della fase cristallina e della sua omogeneità fisica.

Gli spettri fononici costituiscono, a nostro parere, l'assistenza migliore nei processi di ottimizzazione della crescita dei cristalli, laddove il controllo di fase richiede una rapida risposta. La versatilità del metodo ne permette l'estensione in vari campi della chimica-fisica dello stato solido, dal polimorfismo alle transizioni di fase indotte da pressione e temperatura, fino alla caratterizzazione di reazioni cristallo-cristallo [11]. La sfida al polimorfismo, e al suo crescente ruolo nella scienza dei materiali, continua.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Bernstein, *Polymorphism in Molecular Crystals*, Oxford University Press, Oxford, 2002.
- [2] F. Trifirò, *Chimica e Industria*, 2012, **94**(6), 36.
- [3] J. Dunitz, J. Bernstein, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 193.
- [4] R.J. Davey, *Chem. Comm.*, 2003, 1463.
- [5] N.B. Colthup, L.H. Daly, S.E. Wiberley, *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*, Academic Press, 1975.
- [6] *Handbook of Raman Spectroscopy*, I.R. Lewis, H.G.M. Edwards (Eds.), Marcel Dekker Inc., 2002.
- [7] A. Brillante *et al.*, *CrystEngComm.*,

Highlight, 2008, **10**, 937.

- [8] A. Brillante *et al.*, *Adv. Mater.*, 2005, **17**, 2549.
- [9] M. Mas-Torrent, C. Rovira, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 4883.
- [10] D. Braga, *Chimica e Industria*, 2006, **88**(4), 48.
- [11] T. Salzillo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 17671.

Raman Spectroscopy and Polymorphism: the Role of Phonons

Polymorphism is a common occurrence in molecular crystals with relevant implications in technological and pharmaceutical applications. In this paper we show how polymorphism can be successfully recognized by using Raman spectroscopy in the region of lattice phonons, whose frequencies probe the inter-molecular interactions and turn out to be very sensitive to even slight differences in the molecular packing. Distinctive spectral patterns, consistent with the different X-ray diffraction data, are readily obtained. In the presence of polymorphism, phase mixing is a common occurrence and physical inhomogeneities may be present both at surfaces and in the bulk. This becomes a crucial issue in structured organic materials tailored for applications such as molecular electronics or pharmaceuticals, where a good phase homogeneity is required for the optimal performance of the material. We propose confocal phonon Raman mapping as a powerful technique to probe *phase recognition and phase purity*. This method is fast, reliable and capable to monitor *in situ* physical modifications and phase inhomogeneities in crystal domains at the micrometer scale. Comparison of optical images and Raman maps yields crucial information on crystal topography with the advantage of the immediacy of an user friendly color image. Examples are shown for some typical organic semiconductors, a pharmaceutical compound (paracetamol) and a zirconia-based femoral head.

TOMMASO SALZILLO^a - ARIANNA RIVALTA^a -
ELISABETTA VENUTI^a -
GIUSEPPE MAGNANI^b - ALDO BRILLANTE^a

ADIPARTIMENTO DI CHIMICA INDUSTRIALE
"TOSO MONTANARI"
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
BLABORATORIO DI RICERCA DI FAENZA
ENEA - FAENZA (RA)

ALDO.BRILLANTE@UNIBO.IT

*Gli esperimenti riportati in questo articolo sono stati condotti con il triplo monocromatore della Horiba Jobin-Yvon T64000, interfacciato con un microscopio ottico BX40 della Olympus. Per i dettagli degli esperimenti si rimanda alla ref. [7].



NERI NICCOLAI

DOI: [HTTP://DX.MEDRA.ORG/10.17374/CI.2015.97.5.55](http://dx.medra.org/10.17374/CI.2015.97.5.55)

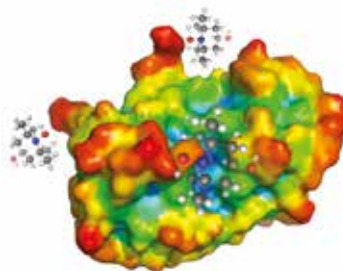
UNA PICCOLA SONDA PARAMAGNETICA PER IDENTIFICARE SITI ATTIVI IN PROTEINE (A CACCIA DI *HOT SPOT* PROTEICI)

STUDI NMR DI **PROTEINE** IN SOLVENTI RESI PARAMAGNETICI DALLA PRESENZA DI RADICALI LIBERI STABILI E NEUTRI, COME IL **TEMPOLO**, PERMETTONO DI ACQUISIRE INFORMAZIONI SULLA DISTRIBUZIONE DEGLI **HOT SPOT** SULLA SUPERFICIE PROTEICA, FORNENDO UN FILTRO SPERIMENTALE A STUDI DI **SCREENING VIRTUALE** DI FARMACI

Che la Vita sia, se osservata alla risoluzione dell'atomo, nient'altro che un intricato dialogo tra molecole grandi e piccole, è da molto tempo del tutto noto. Ciò nonostante, meno noti sono i modi con i quali tale dialogo avviene, specialmente a media e lunga distanza. D'altra parte, in una situazione di affollamento di molecole, quale quello esistente all'interno delle cellule, tali meccanismi devono essere sufficientemente specifici per minimizzare il ruolo della casualità come fattore determinante per gli incontri intermolecolari che sono alle base dei processi biologici.

La possibilità, quindi, di interferire con tale dialogo molecolare, alterando la rete delle interazioni chimiche all'interno del vitale miscuglio molecolare caratterizzante ciascun organismo, costituisce una fase fondamentale dalla quale fare emergere strategie farmacologiche innovative.

Nella cosiddetta attuale "era post-genomica" della ricerca, la nostra capacità di caratterizzare, anche strutturalmente, i singoli componenti del citato miscuglio molecolare è aumentata in modo enorme, suggerendo ottimistiche previsioni per significativi progressi nella cura di molte patologie, dal cancro alle infezioni batteriche e virali. Infatti, abbiamo a



disposizione un esteso repertorio strutturale per indagare quale siano le caratteristiche molecolari che stabilizzano l'associazione tra biopolimeri o tra questi e le piccole molecole organiche, PMO, tramite il pubblico accesso alla *Protein Data Bank* [1]. Così, oltre 100.000 strutture di proteine libere o legate ad altre specie molecolari sono adesso disponibili, costituendo una solida base per fare predizioni sui possibili siti di interazione delle superfici proteiche [2]. A questo proposito è da notare che la distribuzione delle regioni della superficie proteica che possono essere rilevanti per l'interazione intermolecolare è stata a lungo considerata a partire da strutture proteiche statiche. Solo nell'ultimo decennio la presenza sulla superficie proteica di siti transienti in grado di legare PMO, è stata messa

in evidenza principalmente per mezzo di studi NMR in presenza di sonde paramagnetiche legate covalentemente alla proteina [3] o presenti come co-soluto [4].

La marcata variabilità degli incrementi paramagnetici al rilassamento, PRE, osservati in presenza della sonda paramagnetica come co-soluto nei sistemi fino ad oggi studiati, suggerisce come l'interazione tra lo spin elettronico ed i circostanti spin nucleari possa seguire un meccanismo a "sfera interna", pur in presenza di deboli interazioni proteina-sonda. In questo caso, i PRE misurati possono essere analizzati mediante le equazioni di Solomon e Bloembergen [5].

Come mostrato in Eq. (1), le velocità di rilassamento osservate in presenza della sonda paramagnetica, libera o legata, $(1/T_1)_{para}$ sono date dalla somma di due contributi $(1/T_1)_{el}$ e $(1/T_1)_{nuc}$, rispettivamente derivanti dall'interazione scalare e dipolare tra gli spin elettronici e nucleari e dall'interazione dipolare tra gli spin nucleari che determina il rilassamento nel sistema diamagnetico.

Se le condizioni $\omega_{I_{TC}} \ll 1$, $\omega_{S_{TC}} \gg \omega_{I_{TC}}$, e $J(\omega_S \pm \omega_I) \approx J(\omega_S)$ sono soddisfatte, il contributo paramagnetico alle velocità di rilassamento nucleare è dato dalle Eq 2, 3, secondo