



PAOLO TRUCILLO
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
WWW.SUPERCRITICALFLUIDGROUP.UNISA.IT
WWW.NANOTECHLIPOSOMES.COM
PTRUCILLO@UNISA.IT

NANOSOMI: UN NUOVO TRAGUARDO

Durante il mio dottorato ho sviluppato un processo di produzione di liposomi innovativo, versatile, economico, con efficienze di incapsulamento di farmaci superiori al 95%, che lavora in modo continuo e replicabile. Con questo processo si producono liposomi di dimensioni nanometriche, in grado di essere assorbiti in molti tessuti organici, riducendo il rischio di rigetto.

Liposomi: case study

I liposomi sono *drug carriers* caratterizzati da un nucleo acquoso interno circondato da un doppio strato esterno di fosfolipidi. In queste vescicole è possibile intrappolare composti di natura idrofila o lipofila per veicarli all'interno delle cellule, poiché la loro struttura è biocompatibile con quella delle barriere cellulari. I fosfolipidi sono composti anfoteri, in quanto costituiti da una testa idrofila e una doppia coda lipofila. Questa è la ragione per cui vengono considerati surfattanti, poiché possono porsi all'interfaccia fra una fase idrofila e una lipofila. Altra caratteristica peculiare dei fosfolipidi è quella di potersi spontaneamente arrangiare in strutture sferiche cave (liposomi), se posti a contatto con un mezzo acquoso. I liposomi si dividono essenzialmente in SUV (Small Unilamellar Vesicles), LUV (Large Unilamellar Vesicles) e GUV (Giant Unilamellar Vesicles), con riferimento alle dimensioni, incluse fra un minimo di 20 nm e un massimo di 100 µm. I liposomi, però, possono contenere anche più di un doppio strato lipidico (lamella); vescicole di questo tipo sono chiamate multi-lamellari; altre, contenenti lamelle disgiunte, sono detti multi-vescicolari. In generale, più lamelle sono contenute nei liposomi, maggiore è il ritardo nel rilascio di farmaco, il che può essere un vantaggio, a seconda del tipo di applicazione prevista. I meccanismi di rilascio di liposomi possono essere naturali (per fusione con la cellula bersaglio) o artificiali (se indotta da stimoli esterni, quali incremen-

to di temperatura, variazione del pH o applicazione di ultrasuoni). Anche in questo caso, il rilascio indotto da agenti esterni può essere utile a seconda del tipo di applicazione (*release on demand*).

I liposomi sono utilizzati in formulazioni di molti prodotti attualmente sul mercato farmaceutico, cosmetico e alimentare. Nel primo settore, si incapsulano antibiotici, proteine, materiale genetico, vitamine e antitumorali; in campo alimentare, i liposomi vengono usati per stabilizzare componenti dei cibi, ritardandone la degradazione, o per schermare sapori. Nell'industria cosmetica si usano all'interno di pomate anti-età, ma anche per rossetti e altre forme di *make-up*. Ma il vero vantaggio derivante dall'uso dei liposomi è la possibilità di un *target delivery*, ovvero programmare la vescicola con antigeni dedicati che indirizzino il rilascio direttamente sul tessuto bersaglio, evitando effetti collaterali di tossicità.

Limiti delle tecniche tradizionali

I metodi tradizionali per la produzione di liposomi consistono, generalmente, nella formazione di un *layer* lipidico piano, seguita da una fase di idratazione, con la quale si ottiene la spontanea formazione delle vescicole. Tuttavia, questi metodi sono causa di problematiche, fra cui la difficile scalabilità e riproducibilità, poiché sono processi che non lavorano in continuo. I liposomi prodotti sono, in generale, di dimensioni micrometriche; si riscontrano spesso difficoltà nella ri-

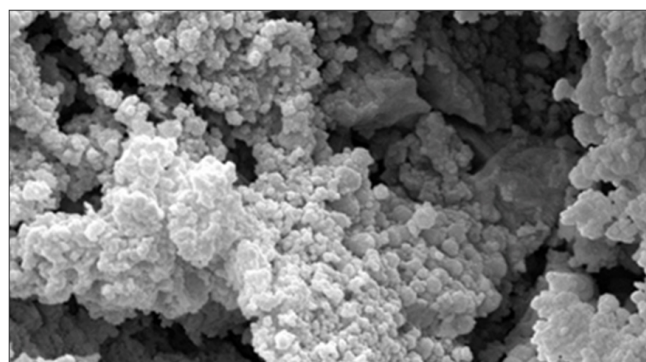
mozione del solvente organico impiegato e, infine, le efficienze di incapsulamento sono piuttosto basse (20-30%). A volte, per ottenere un miglior controllo della granulometria, si ricorre a processi supplementari quali estrusione o esposizione a vibrazioni ultrasoniche, che possono causare degradazione dei lipidi e disgregazione delle vescicole, con conseguente perdita del composto incapsulato.

Realizzazione di un processo innovativo

Il mio dottorato, supervisionato dall'ing. Roberta Camparelli, è partito dall'idea di realizzare un processo innovativo per la produzione di liposomi, risolvendo le principali problematiche dei metodi tradizionali. La tecnica, attualmente in fase di brevettazione, è stata sviluppata nel gruppo di fluidi supercritici, coordinato dal prof. Ernesto Reverchon, ordinario di impianti chimici presso il Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Salerno. Non entrando nel dettaglio, essa consiste nell'inversione delle fasi di produzione dei liposomi. Usando un iniettore micrometrico, è possibile produrre gocce d'acqua che, in un secondo momento, vengono ricoperte da un doppio strato lipidico. Il fenomeno della ricopertura della goccia viene facilitato dall'uso di anidride carbonica in condizioni supercritiche (pressione superiore a 73 bar e temperatura superiore a 31,1 °C). È un processo *green*, dal momento che l'anidride carbonica è atossica e non è infiammabile, e inoltre può produrre liposomi in continuo, garantendo la riproducibilità del prodotto. Il mio progetto di dottorato parte da una prima fase di realizzazione dell'impianto su scala di laboratorio. Dopo la fase di validazione della tecnica e di ottimizzazione dei parametri operativi, è stata avviata la fase

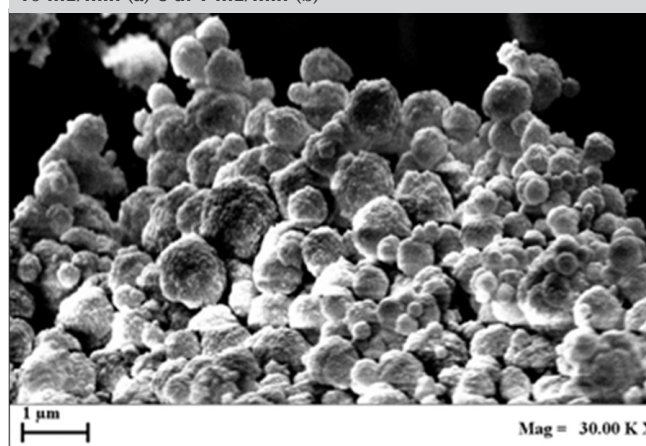
Portata d'acqua [mL/min]	Diametro medio [nm±SD]
1	1760±792
2	670±235
4	331±134
8,5	325±62
10	281±54

Tab. 1 - Dimensioni medie dei liposomi prodotti al variare della portata d'acqua



1 µm Mag = 30.00 K X

Fig. 1 - Immagini ottenute al microscopio a scansione elettronica riguardanti liposomi prodotti con la portata d'acqua di 10 mL/min (a) e di 1 mL/min (b)



1 µm Mag = 30.00 K X

sperimentale di incapsulamento di prodotti farmaceutici, cosmetici e nutraceutici, con lo scopo di verificare la versatilità del processo.

Validazione della tecnica

Per comprendere i meccanismi di funzionamento del processo, è stato studiato l'effetto di alcuni parametri operativi. Aumentando la pressione da un minimo di 100 bar a un massimo di 175 bar, è stato studiato il fenomeno del *jet break up*, responsabile della rottura del getto e della formazione delle gocce d'acqua. Questo ha consentito di produrre liposomi di dimensioni inferiori, con un migliorato controllo delle curve di distribuzione dei campioni prodotti. Per quanto riguarda l'incremento della temperatura, essa ha favorito l'incapsulamento di principi attivi di natura idrofila, ma la *range* di operabilità è più limitato. Infatti, il limite è la temperatura di transizione (52 °C), oltre la quale i fosfolipidi naturali tendono a denaturare, perdendo le loro proprietà fisico-chimiche che li contraddistinguono. Altri parametri operativi studiati sono il diametro dell'iniettore per la produzione delle gocce d'acqua e la concentrazione di lipide sciolta nella soluzione di partenza. Nel primo caso, riducendo il diametro,

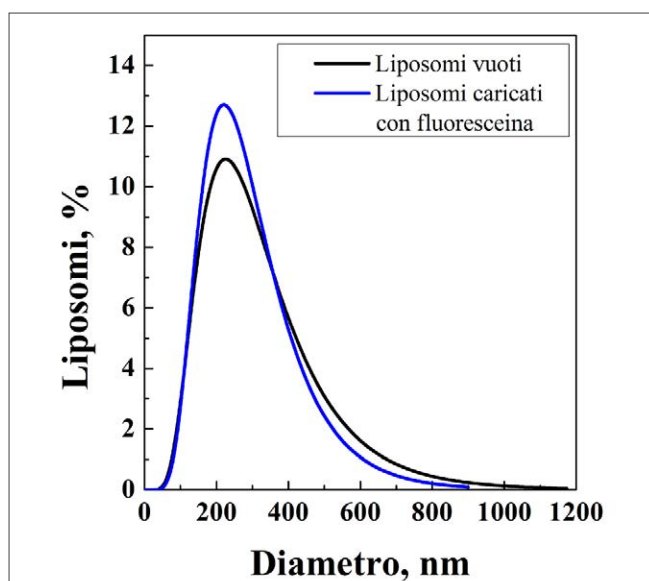


Fig. 2 - Confronto fra la curva granulometrica di liposomi vuoti e quella relativa a liposomi caricati con fluoresceina

sono state ottenute gocce d'acqua progressivamente più piccole. Nel secondo caso, l'aumento della concentrazione di lipide non ha avuto alcun effetto sulla dimensione media dei liposomi prodotti. Per quanto riguarda l'effetto della variazione della portata d'acqua si riportano in Tab. 1 alcuni risultati.

Aumentando la portata d'acqua per l'atomizzazione delle gocce, sono stati ottenuti liposomi di dimensioni progressivamente inferiori, riducendo in questo modo il tempo di contatto fra le molecole d'acqua e i lipidi. Il *trend* è verificato anche tramite analisi al microscopio a scansione elettronica (SEM), riportate in Fig. 1 a,b.

I principi attivi incapsulati con successo nei liposomi prodotti con il processo da noi sviluppato sono di natura diversa [1]: coloranti [2], antibiotici [3, 4], antiossidanti [5, 6] e proteine [7] sono stati selezionati e proposti per l'intrappolamento nelle vescicole lipidiche. A titolo di esempio, sono riportate in Fig. 2 le curve granulometriche di liposomi vuoti e caricati con fluoresceina.

Concentrazione iniziale di farmaco [p/p, %]	Diametro medio [nm]±SD [%]	PDI	EE
10	123±25	0,20	62,5
30	145±32	0,22	83,5
60	245±74	0,30	93,9

Tab. 2 - Dimensioni medie, indici di polidispersione (PDI) ed efficienze di incapsulamento (EE) di liposomi caricati con albumina da siero bovino (BSA)

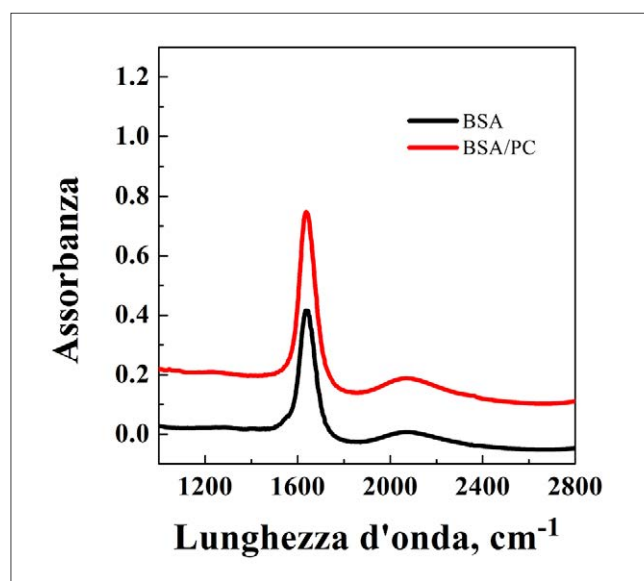


Fig. 3 - Confronto fra gli spettri IR relativi alla proteina BSA tal quale e processata

Dal confronto fra la curva di distribuzione relativa ai liposomi vuoti e quella dei liposomi caricati con fluoresceina, si evince che la presenza del farmaco all'interno del liposoma non influenza in modo significativo le loro dimensioni medie.

È stato studiato l'effetto della variazione della concentrazione di farmaco da intrappolare in liposomi. Ad esempio, viene riportato in Tab. 2 l'effetto dell'aumento della concentrazione di albumina da siero bovino (BSA) sulla granulometria e sull'efficienza di incapsulamento (EE) dei liposomi prodotti con il nostro processo.

L'efficienza di incapsulamento aumenta all'aumentare della concentrazione di principio attivo sciolto nella soluzione di partenza. Le dimensioni medie sono inferiori ai 300 nm e le distribuzioni sono monodisperse (PDI<0,30). Inoltre, il farmaco risulta essere preservato durante la fase di incapsulamento nel processo, come mostrato dallo spettro IR (*Infrared Spectroscopy*) mostrato in Fig. 3.

La curva in rosso, relativa alla BSA processata, è sovrapponibile con la curva in nero, rappresentante invece la BSA tal quale, non sottoposta a incapsulamento in liposomi. Si può dedurre quindi che, nonostante la turbolenza presente nella camera di formazione, il principio attivo viene preservato dal punto di vista chimico per tutto il tempo di prova.

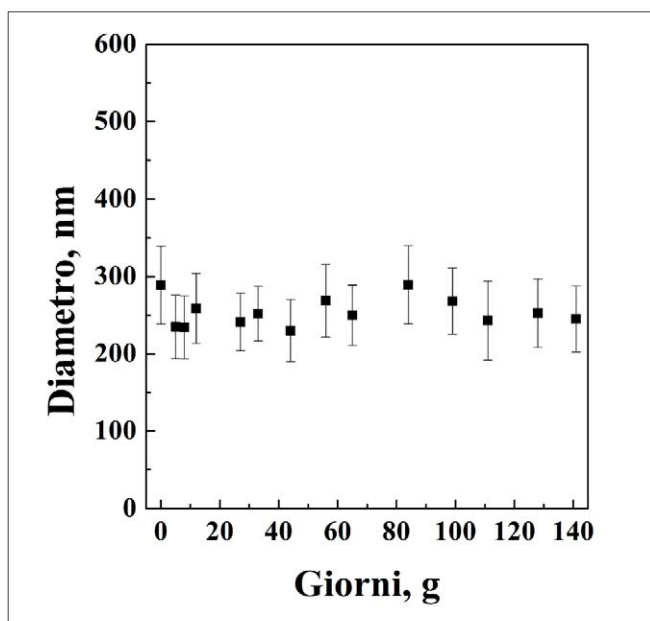


Fig. 4 - Studio di stabilità delle dimensioni medie di liposomi caricati con BSA

Uno studio di stabilità, riportato in Fig. 4, è stato effettuato su un campione di liposomi carichi con BSA per un periodo di oltre 4 mesi. Con questo studio è stato dimostrato che le dimensioni medie dei liposomi prodotti sono stabili per un tempo di almeno 4 mesi, a meno di trascurabili fenomeni di aggregazione e disaggregazione delle vescicole.

Sono state condotte delle ulteriori analisi con il microscopio a trasmissione elettronica (Fig. 5).

Osservando la sezione trasversale dei liposomi, è possibile individuare sia il compartimento acquoso che quello lipidico dei liposomi. Sono state inoltre verificate sia la forma sferica delle vescicole che le dimensioni nanometriche di campioni prodotti.

Un processo versatile

Il processo proposto ha riscontrato notevole successo nell'incapsulamento di composti di natura differente: dagli antibiotici ai coloranti alimentari, dall'estratto di sansa di olive alle proteine e vitamine. In tutti i casi, dopo ottimizzazione dei parametri operativi, l'efficienza di incapsulamento ha raggiunto valori superiori al 95%. A valle di studi di fattibilità, nell'ambito di questo percorso di dottorato, è stata proposta la produzione di tre diverse formulazioni di liposomi, una per ogni macrosettore di pertinenza (terapeutico, cosmetico, nutraceutico), con lo scopo di individuare il segmento di mercato di nostro maggiore interesse. In particolare, è nostra intenzione provare a sviluppare un prodotto per ciascuno di questi macrosettori di applicazione. Nell'ambito terapeutico è nostro interesse proporre un

prodotto a base di liposomi adatto alla cura delle piaghe da decubito (*bedsores*), uno degli effetti collaterali che colpisce pazienti allettati per lunghi periodi. Essa consiste nella formazione di ferite cutanee, che possono arrivare a distruggere progressivamente non solo lo strato superficiale, ma anche quello sottocutaneo, poi quello lipidico e muscolare, per arrivare, nei casi più gravi, a quello osseo.

Altro prodotto di nostro interesse nasce dall'idea di incapsulare antiossidanti nei liposomi, preservando la molecola dall'ossidazione, riducendone gli effetti tossici e migliorandone la biodisponibilità. A titolo di esempio, in Tab. 3 viene riportata una parte degli esperimenti esplorativi effettuati per il caricamento di eugenolo, al variare della temperatura di lavoro e del compartimento in cui questa molecola anfotera è stata incapsulata. Nel dettaglio, si è specificato, per ogni compartimento interessato dall'incapsulamento, la temperatura operativa, il caricamento del farmaco, il diametro medio, l'indice di polidispersione del campione (PDI), l'efficienza di incapsulamento (EE) e la diminuzione di inibizione del potere antiossidante.

L'eugenolo è stato incapsulato nel nucleo acquoso e nel compartimento lipidico, e in entrambi i casi sono stati ottenuti liposomi di dimensioni nanometriche. L'aumento della temperatura da 35 °C a 40 °C ha consentito di migliorare le efficienze di incapsulamento. Le dimensioni medie dei liposomi sono comprese fra i 100 nm e i 300 nm, mentre le efficienze di incapsulamento sono superiori all'80% in tutti i casi, fino a un massimo del 94,2%. Inoltre appare evidente che il potere antiossidante viene preservato meglio nel caso di intrappolamento nel nucleo acquoso del liposoma. Infine, un terzo possibile campo di applicazione è nell'ambito *food industry* e consiste nell'incapsulamento di composti polifenolici contenuti nell'estratto

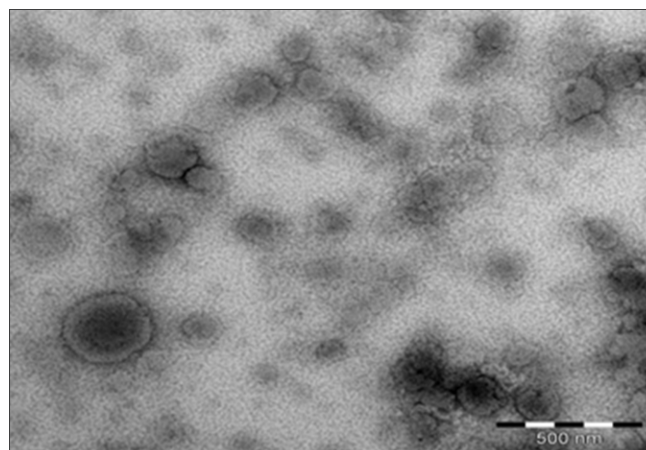


Fig. 5 - Immagine ottenuta al microscopio a trasmissione elettronica di un campione di liposomi



Caricamento farmaco [%, p/p]	Diametro medio [nm±SD]	PDI	EE [%]	PDI	Inibizione del potere antiossidante [%]
35 °C Nucleo acquoso	10	224±81	0,36	84,3	8,2
	20	151±69	0,46	86,2	6,4
	30	139±69	0,50	84,1	7,5
40 °C Nucleo acquoso	10	260±91	0,35	80,4	10
	20	196±76	0,39	92,5	9,6
	30	188±113	0,60	94,2	10,7
40 °C Layer lipidico	10	255±122	0,48	83,9	10,6
	20	234±101	0,43	86,3	22,2
	30	230±96	0,42	84,9	41,9

Tab. 3 - Esempi di caratterizzazioni di campioni di liposomi caricati con eugenolo

di sansa di olive. Questo studio è stato effettuato in collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale dell'Università di Genova. I polifenoli vengono spesso impiegati come additivi in alimenti (*functional food*) per prevenire malattie cardiovascolari, diabete, e sfruttandone gli effetti antimicrobici. Il trasporto tramite liposomi può migliorare la loro efficacia nutritiva, in quanto la barriera lipidica ne preserva la stabilità e la biodisponibilità. Inoltre, il trasporto liposomiale protegge i polifenoli da calore, luce e fenomeni di ossidazione.

Sviluppi futuri

Un ulteriore sforzo che compiremo in chiusura di questo progetto di dottorato sarà collegato alla produzione di liposomi *triggered, drug carriers* lipidici in grado di rilasciare il proprio contenuto "on demand", in seguito a prefissati stimoli esterni.

BIBLIOGRAFIA

- [1] P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon, in *Advances in Bionanomaterial*, S. Piotto *et al.* (Eds.), Springer, 2016, p. 23.
- [2] R. Campardelli, P. Trucillo, E. Reverchon, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2016, **55**, 5359.

- [3] P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon, *Journal of CO₂ utilization*, 2017, **18**, 181.
- [4] R. Campardelli, P. Trucillo, E. Reverchon, *Supercritical assisted process for the production of liposomes for ocular delivery*, submitted.
- [5] P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon, *Powder Technology*, 2018, **323**, 155, <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.10.007>.
- [6] P. Trucillo, R. Campardelli *et al.*, *Supercritical assisted process for the encapsulation of olive pomace extract into liposomes*, submitted.
- [7] P. Trucillo, R. Campardelli, E. Reverchon, *Chemical Engineering Transactions*, 2017, **57**, 799.

Nanosomes: a New Goal

During my Ph.D. course, I worked in a team for the development of a supercritical fluid assisted process for the production of liposomes with an innovative, versatile and economic technique. The results were particularly challenging because we managed to produce nanometrical lipidic vesicles, with encapsulation efficiencies of compounds up to 95% and an improved drug bioavailability.