

Preparazione e caratterizzazione di liposomi e fitosomi per applicazioni agronomiche



**Maria
Correale**



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

**PREPARAZIONE E
CARATTERIZZAZIONE DI LIPOSOMI E
FITOSOMI PER APPLICAZIONI
AGRONOMICHE**

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Ing. Anna Angela Barba

Candidata:

Maria Correale

matricola 0612201721

Correlatore:

Ing. Annalisa Dalmoro

Anno Accademico 2017/2018

*Mai nulla di splendido è stato realizzato se non da chi ha osato
credere che dentro di sé ci fosse qualcosa di più grande delle
circostanze.*

Bruce Barton

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman
La data prevista per la discussione della tesi è il 20 Dicembre 2018
Fisciano, 15 Dicembre 2018

Sommario

Sommario.....	I
Indice delle figure.....	V
Indice delle tabelle	VII
Abstract.....	IX
Introduzione	1
1.1 Sistemi di rilascio a base lipidica, liposomi e fitosomi __	2
1.1.1 Proprietà chimico-fisiche	2
1.1.2 Classificazione delle vescicole	5
1.1.3 Vantaggi e svantaggi nell'uso di liposomi e fitosomi	6
1.1.4 Principali applicazioni di liposomi e fitosomi	6
1.2 Applicazioni di nanovettori in campo agronomico _____	7
1.2.1 Agronomia: aspetti generali	7
1.2.2 Importanza dei nanovettori in campo agronomico	8
1.3 Complesso del disseccamento rapido dell'olivo (CoDiRO)10	
1.3.1 La malattia	10
1.3.2 Il batterio	11
1.3.3 I danni	13

1.4	Stato dell'arte relativo ai provvedimenti adottati contro <i>Xylella fastidiosa</i>	13
1.4.1	Misure di emergenza decretate dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali	13
1.4.2	Trattamenti fitosanitari autorizzati contro il vettore	15
1.4.3	Trattamenti sperimentali contro il batterio <i>Xylella fastidiosa</i> [19]	17
1.4.4	Strategie alternative	18
1.5	Obiettivi della tesi	20

Materiali, metodi e apparecchiature23

2.1	Materiali	24
2.1.1	L- α -fosfatidilcolina di tuorlo d'uovo (PC-1) e di soia (PC-2).	24
2.1.2	Roxitromicina (RXT)	25
2.1.3	Etanolo	26
2.1.4	Acqua deionizzata	26
2.1.5	Molecole impiegate per la determinazione colorimetrica della Roxitromicina	26
2.1.6	Materiali impiegati per esperimenti di fitotossicità	27
2.2	Apparecchiature	27
2.2.1	Set up sperimentale utilizzato per la produzione di liposomi e fitosomi	28
2.2.2	Nano Zeta Sizer	30
2.2.3	Ultracentrifuga	31
2.2.4	Spettrofotometro	32
2.3	Metodi	33
2.3.1	Produzione di liposomi e fitosomi carichi e non mediante il metodo simil-microfluidico	33

Sommario e indici.	Pag. III
2.3.2 Caratterizzazione dei nanovettori lipidici	34
2.3.3 Test di stabilità	40
2.3.4 Test di fitotossicità	40
Risultati e discussione.....	43
3.1 Caratterizzazione di liposomi e fitosomi vuoti _____	44
3.1.1 Size e PZ	44
3.1.2 Test di stabilità	45
3.2 Caratterizzazione di liposomi e fitosomi incapsulanti Roxitromicina_____	47
3.2.1 Efficienza di incapsulamento	47
3.2.2 Size e PZ	50
3.1.3 Test di stabilità	51
3.3 Test di fitotossicità _____	54
Conclusioni	59
1.1 Conclusioni _____	60
Bibliografia	63

Indice delle figure

Figura 1. Struttura chimica fosfatidilcolina (A), schematizzazione di un fosfolipide (B) e disposizione a doppio strato (C) [5].....	3
Figura 2. Geometrie delle molecole lipidiche e configurazioni possibili [3].....	4
Figura 3. Schematizzazione delle tipologie di vescicole [7].....	6
Figura 4. Fattori che influenzano l'assorbimento, la diffusione, il trasporto e la penetrazione di nanoparticelle nelle piante. A) Tipologie diverse di nanoparticelle. B) Modalità di applicazione. C) Percorso apoplastico e simplastico per il movimento attraverso la pianta. D) Modalità di penetrazione nella cellula vegetale [14].	9
Figura 5. Struttura chimica della fosfatidilcolina [21].....	24
Figura 6. Struttura chimica della Roxitromicina [6].	25
Figura 7. Struttura chimica della vanillina [6].	27
Figura 8. Schematizzazione del set up sperimentale finalizzato alla produzione di nanovesicole [4].	29
Figura 9. Foto del set up sperimentale utilizzato per la produzione di liposomi e fitosomi [3].....	29
Figura 10. Grafico del potenziale zeta [3].....	31
Figura 11. Spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer [3].....	32
Figura 12. Schema di reazione. In presenza di HCl 3.6 M in solvente costituito da acido acetico, la RXT subisce idrolisi portando alla formazione di desosamine. Successivamente, procedono reazioni di	

disidratazione dello zucchero con eliminazione di acqua che dalla forma a catena aperta (I) portano alla β -dimetilamminoaldeide insatura (II). La posizione attiva del carbonio 2 in II può essere coinvolta in reazioni di condensazione con aldeidi aromatiche come vanillina, fornendo il prodotto colorato corrispondente [23].	38
Figura 13. Grafico dell'evoluzione nel tempo della <i>Z-average</i> per liposomi e fitosomi.	45
Figura 14. Grafico dell'evoluzione nel tempo dell'indice di polidispersità per liposomi e fitosomi.	45
Figura 15. Grafico dell'evoluzione nel tempo della <i>size</i> numerica per liposomi e fitosomi.	46
Figura 16. Grafico dell'evoluzione nel tempo del potenziale zeta per liposomi e fitosomi.	46
Figura 17. Retta di taratura della Roxitromicina.	47
Figura 18. Conformazione probabile della Roxitromicina all'interfaccia lipide-acqua, individuata dalla linea orizzontale. A sinistra vi è la forma non protonata, a destra la forma protonata. Il numero, 3', indica l'ammina terziaria portata dalla β -D-desosamina [26].	48
Figura 19. Grafico dell'evoluzione nel tempo della <i>Z-average</i> per liposomi e fitosomi incapsulanti Roxitromicina.	51
Figura 20. Grafico dell'evoluzione nel tempo dell'indice di polidispersità per liposomi e fitosomi incapsulanti Roxitromicina.	52
Figura 21. Grafico dell'evoluzione nel tempo della <i>size</i> numerica per liposomi e fitosomi incapsulanti Roxitromicina.	52
Figura 22. Grafico dell'evoluzione nel tempo del potenziale zeta per liposomi e fitosomi incapsulanti Roxitromicina.	53
Figura 23. Grafico dell'evoluzione nel tempo dell'efficienza di incapsulamento per liposomi e fitosomi incapsulanti Roxitromicina.	53

Indice delle tabelle

Tabella 1. Sottospecie di <i>Xylella fastidiosa</i> , origine e ospiti principali [15].	12
Tabella 2. Sostanze ad attività insetticida utilizzate contro il <i>Philaenus spumarius</i> [16].	16
Tabella 3. Quadro comparativo delle L- α -Fosfatidilcolina impiegate.	25
Tabella 4. Proprietà della Roxitromicina.	26
Tabella 5. Carichi teorici di Roxitromicina impiegati nell'attività sperimentale.	33
Tabella 6. Schema delle condizioni operative adottate per la produzione di vescicole caricate con Roxitromicina.....	34
Tabella 7. <i>Z-average</i> , Pdl, <i>size</i> numerica e potenziale zeta di liposomi e fitosomi vuoti.	44
Tabella 8. Efficienza di incapsulamento di liposomi e fitosomi caricati con tre carichi di Roxitromicina.....	48
Tabella 9. Quantità di RXT incapsulata per mg di PC di liposomi e fitosomi caricati con tre carichi di Roxitromicina.....	49
Tabella 10. <i>Z-average</i> , Pdl, <i>size</i> numerica e potenziale zeta di liposomi e fitosomi incapsulanti Roxitromicina, confrontati con i corrispondenti vuoti.	50
Tabella 11. Risultati dei test di fitotossicità per semi di carota dopo 7 giorni.	55

Tabella 12. Risultati dei test di fitotossicità per semi di carota dopo due settimane.	56
Tabella 13. Foto di semi di carota imbibiti con la sospensione di fitosomi incapsulanti Roxitromicina a 0, 7 e 14 giorni	57
Tabella 14. Risultati dei test di fitotossicità per semi di lattuga dopo due settimane.	57

Abstract

Nanocarriers have two remarkable advantages in drug therapies: the nanometric size and the protection capacity of the active molecules, which allows the achievement of the target, limiting the side effects associated with the administration of the molecule in an unencapsulated form. For this reason, they can be considered as a possible solution for the problem of the Xylella bacterium. Xylella fastidiosa is a Gram-negative bacterium that is the main cause of “Olive quick decline syndrome”, phytopathology that provokes severe damages to the olive trees in Salento (Apulia, Italy). Current solutions are mainly focused to reduce xylem sap-feeding leafhoppers, Philaenus spumarius, vector of the disease, but there is not evidence on the elimination of the bacterium from infected plants yet. Xylella fastidiosa is distributed along the xylem vessels, where it forms biofilms that produce a cap responsible of leaves drying. Therefore, to be effective against Xylella fastidiosa, a compound should make direct contact with the bacterium and this is more likely to occur with injected formulations in trunk, that is an invasive technique. For this purpose, the general idea is to apply a suspension of lipid nanovectors to the roots of the olive tree, overcoming the invasive technique of the trunk injections, and to exploit both the nanometric dimensions and membrane-mimetic properties of such systems to ensure their penetration into xylematic vessels and the release of the active molecule only at the site of action of the bacterium. Therefore, in this thesis lipid nanovectors have been produced using a simil-microfluidic set up, which consists of a contact between two flows, lipid solutions and water solutions, inside a millimetric tubular device, where interdiffusion phenomena allow the formation of lipid vesicles, which are made up of a bilayer of phospholipids surrounding an aqueous core. The lipid solution is made of ethanol, hydrophobic drug (Roxithromycin) and phosphatidylcholine, a phospholipid. Two types of phosphatidylcholine have been used, the first one, the L- α -phosphatidylcholine from egg yolk, was used to produce liposomes and the second one, L- α -

phosphatidylcholine from soybean, was used to produce phytosomes. Unloaded vesicles and Roxithromycin encapsulating vesicles have been made. Roxithromycin is a semi-synthetic macrolide antibiotic, which is effective against Gram-negative and Gram-positive bacteria. A comparison in terms of vesicles final properties (mean diameter size, polydispersity index, zeta potential, charge and encapsulation efficiency) was realized between unloaded liposomes, unloaded phytosomes, Roxithromycin encapsulating liposomes and Roxithromycin encapsulating phytosomes, obtained at the same conditions. As regards unloaded vesicles, the results have revealed that the type of phosphatidylcholine does not affect the dimensions, but it affects the polydispersity index, in fact, the liposomes had dimensions more homogeneous than phytosomes' one because of the L- α -phosphatidylcholine's higher purity. The zeta potential results have shown a greater phytosome's stability. Finally, stability tests have shown a constancy in terms of size and PDI for both vesicles, but a decrease in terms of the zeta potential. For the production of encapsulating Roxithromycin vesicles, three antibiotic loads have been used, among which a theoretical load of 9% has been chosen for the characterization and stability tests, which has led to an encapsulation efficiency of 35% for phytosomes and 17% for liposomes. The greater interaction between phytosomal vesicles and Roxithromycin has also been confirmed by a considerable variation of the zeta potential. In general, the presence of Roxithromycin in the loaded vesicles (both liposomes and phytosomes) does not significantly alter their size, PDI and time stability.

*Moreover, phytotoxicity tests have been carried out on carrot and lettuce seeds selected as model crops, to evaluate vesicles – vegetal cells interaction. For this purpose, carrot and lettuce seeds have been irrigated with five solutions: pure antibiotic, unloaded liposomes, unloaded phytosomes, Roxithromycin encapsulating liposomes and Roxithromycin encapsulating phytosomes. Phytotoxicity tests have shown that: thanks to vegetal origin, phytosomes are better than liposomes for conveying Roxithromycin into plant cells; vesicles and their constituents do not cause an inhibition, but they cause just a delay in seed germination and root elongation. The results obtained in this thesis lay the foundations for the development of vegetal lipid-based nanosystems to be applied in the agronomic field for the delivery of an active powerful ingredient against *Xylella fastidiosa*.*

Bibliografia

1. www.gruppotpp.unisa.it
2. D'Agostinis G., Mignini E., "Manuale del Cosmetologo", Tecniche Nuove, Milano (2007).
3. Recupido F., "Produzioni di nanoliposomi per applicazioni nutraceutiche mediante un approccio simil-microfluidico", Tesi di laurea in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno, (2016).
4. Bochicchio S., "Nanostructured vectors for the transport of active molecules through biological membranes for pharmaceutical and nutraceutical applications", PhD in Industrial Engineering at University of Salerno, (2014).
5. www.chimica-online.it
6. www.wikipedia.org
7. www.irannano.org
8. Guidotti M., www.dctf.uniroma1.it
9. Reza Mozafari M., et al., "Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology", *Journal of Liposomes Research*, 18 309-327 (2008).
10. Law B. A., King J.S., "Use of Liposomes for proteinase addition to cheddar cheese", *Journal of Dairy Research*, 52 183-188 (1985).
11. Bochicchio S., et al., "Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation", *LWT - Food Science and Technology*, 69 , pp. 9-16, (2016).
12. Santonoceto C., "AGRONOMIA: DEFINIZIONE E COMPITI", Dipartimento di Agraria, (2017).
13. Avishai K., et al., "Therapeutic nanoparticles penetrate leaves and deliver nutrients to agricultural crops", *Scientific reports*, 8:7589 (2018).
14. Perez-de-Luque A., "Interaction of Nanomaterials with Plants: What Do We Need for Real Applications in Agriculture?", *Frontiers in Environmental Science*, 5: 12 (2017).

15. Martelli G.P., "Il disseccamento rapido dell'olivo: stato delle conoscenze", Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi Aldo Moro – Bari, (2015).
 16. Decreto ministeriale, Gazzetta Ufficiale Della Repubblica Italiana, (febbraio 2018)
 17. Catalano L., "Xylella fastidiosa la più grave minaccia dell'olivicoltura italiana", Difesa delle colture, (2015).
 18. Allegato I, AI della Direttiva del Consiglio 2000/29/CE.
 19. EFSA Panel on Plant Health, "Treatment solutions to cure Xylella fastidiosa diseased plants", (2016)
 20. Bleve G., et al., "In vitro activity of antimicrobial compounds against Xylella fastidiosa, the causal agent of the olive quick decline syndrome in Apulia (Italy)", *FEMS Microbiology Letters*, 365, (2018).
 21. www.sigma-aldrich.com
 22. Nief R. A., Aseel N. J., "New spectrophotometric determination of roxithromycin in pharmaceutical preparations and environmental samples" Department of Environmental Technology, College of Environment, University of Mosul, The State Company for Drug Industries and Medical Appliances Mosul-Iraq, 51,360-368 (2013).
 23. Sastry C.S.P., et al., "Spectrophotometric Procedures for the Determination of Roxithromycin in Pharmaceutical Formulations", *Mikrochim. Acta* 122, 53-60 (1996).
 24. Min Pan, Chu L.M., "Phytotoxicity of veterinary antibiotics to seed germination and root elongation of crops", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126 228-237 (2016).
 25. Kuzina, L, et al., "In vitro activities of antibiotics and antimicrobial peptides against the plant pathogenic bacterium Xylella fastidiosa". *Letters in applied microbiology*, 42 (5) 514-520 (2006).
 26. Minden V., et al., "Antibiotics impact plant traits, even at small concentrations", *AoB Plants*, 9 (9) 1-19 (2017).
 27. Montenez, J.-P., et al., "Interactions of Macrolide Antibiotics (Erythromycin A, Roxithromycin, Erythromycylamine [Dirithromycin], and Azithromycin) with Phospholipids: Computer-Aided Conformational Analysis and Studies on Acellular and Cell Culture Models", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156 129–140 (1999).
-

Ringraziamenti

Alla conclusione di questo capitolo della mia vita sento necessari i seguenti ringraziamenti.

Il grazie più importante va alla mia famiglia, a mio padre e a mia madre che mi hanno dato la possibilità di scegliere e di realizzare i miei obiettivi, e a mio fratello, che non ha mai smesso di motivarmi.

Ringrazio il professore Gaetano Lamberti e la professoressa Anna Angela Barba, per la conoscenza donatami e l'accuratezza con cui mi hanno seguito in questo percorso. Nessun'altra scelta sarebbe stata più giusta.

Ringrazio Annalisa per essere stata la migliore guida che si potesse avere, e Veronica, per la sua simpatia. È stato un onore condividere con voi il "vostro" laboratorio. Vi auguro il meglio.

Ringrazio i miei compagni di corso, Federica, Laura, Maria, Mirco e Tarek, per avermi regalato attimi di spensieratezza al momento giusto.

Un grazie speciale va a Loredana, per avermi sempre supportata ed incoraggiata. Senza di te gli ostacoli da superare sarebbero sembrati insormontabili.

Ringrazio Mirko, che con la sua simpatia ha colorato i momenti più bui.

Grazie a Anna, con cui ho iniziato questo percorso e senza la quale non sarei arrivata dove sono, e a Giuseppe, la persona più buona che conosca. Siete i migliori amici che a chiunque auguro di incontrare.

Infine, ringrazio Salvatore per far parte della mia vita. Sei la mia forza.

