



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Facoltà di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria Industriale
Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

Stabilizzazione tramite spray drying di sospensioni liposomiali

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Ing. Anna Angela Barba

Correlatore:

Ing. Annalisa Dalmoro

Candidato:

Mirco Cacace

matricola 0612201625

Anno Accademico 2019/2020

Alla mia famiglia

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman

La data prevista per la discussione della tesi è il 20/07/2020

Fisciano.

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure.....	V
Indice delle tabelle.....	VII
Abstract	IX
Introduzione.....	1
1.1 Il liposoma _____	2
1.1.1 Strutture e caratteristiche dei liposomi	2
1.1.2 I fosfolipidi	3
1.1.3 Impiego dei liposomi	4
1.1.4 Meccanismo alla base della formazione di liposomi	5
1.1.5 Importanza del colesterolo per i liposomi	7
1.2 Produzione e Classificazione di Liposomi _____	8
1.2.1 Classificazione di Liposomi	8
1.2.2 Tecniche per la preparazione di liposomi	9
1.2.3 Efficienza di incapsulamento	11
1.3 Stabilizzazione di una sospensione liposomiale tramite <i>spray drying</i> _____	12
1.3.1 Lo spray drying	13
1.3.2 Lo spray drying di sospensioni liposomiali	14
1.3.3 Importanza dell'utilizzo degli eccipienti	14
1.3.4 Problemi con la reidratazione	15

1.4 Obiettivi di tesi _____	17
Materiali e metodi.....	19
2.1 Materiali _____	20
2.1.1 L- α fosfatidilcolina di soia (PC)	20
2.1.2 Colesterolo	21
2.1.3 Colecalciferolo (Vitamina D3)	21
2.1.4 Maltodestrina	22
2.1.5 Altri materiali	23
2.2 Apparecchiature _____	24
2.2.1. Set up sperimentale utilizzato per la produzione di liposomi	24
2.2.2. Sonicatore	25
2.2.3 Spray dryer	26
2.2.4 Spettrofotometro	27
2.2.5 Ultracentrifuga e centrifuga	29
2.2.6 Nano Zetasizer	31
2.2.7 Rotavapor	32
2.2.8 Microscopio ottico	34
2.2.9 Altri apparecchi utilizzati	35
2.3 Metodi _____	35
2.3.1 Preparazione dei liposomi contenenti vitamina D3	35
2.3.2 Carico ed efficienza di incapsulamento dei liposomi	36
2.3.3 Calcolo delle dimensioni e del potenziale zeta	38
2.3.4 Concentrazione della sospensione liposomiale	38
2.3.5 Stabilizzazione della soluzione liposomiale	39
2.3.6 Valutazione di D3 nelle polveri e analisi al microscopio ottico	40
Risultati e discussione.....	43
3.1 Caratterizzazione delle sospensioni liposomiali incapsulanti vitamina D3 _____	44
3.1.1 Calcolo dell'efficienza di incapsulamento	44

Sommario e indici.	Pag. III
3.1.2 Dimensioni e potenziale zeta	44
3.1.3 Calcolo dell'efficienza di incapsulamento di una soluzione liposomiale a concentrazione doppia	45
3.1.4 Dimensioni e potenziale zeta di una soluzione liposomiale a concentrazione doppia	46
3.2 <i>Spray drying</i> delle soluzioni liposomiali contenenti maltodestrina	46
3.2.1 Valutazione del quantitativo di D3 nei sistemi dopo spray drying	46
3.2.2 Analisi al microscopio ottico	48
Conclusioni	52
4.1 Conclusioni	53
Bibliografia	55

Indice delle figure

Figura 1. Rappresentazione schematica di vescicole unilamellari cationiche con il farmaco idrofilico incapsulato all'interno del core acquoso e il farmaco idrofobico intrappolato nel doppio strato fosfolipidico. Il DOTAP (1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane) è un tensioattivo cationico, cioè un componente che abbassa la tensione superficiale tra due fasi in grado di conferire carica positiva al liposoma (favorendo specifiche interazioni) [1].	2
Figura 2. Diversi gruppi di testa di glicerofosfolipidi (notiamo invariata sempre la presenza dei due acidi grassi, del glicerolo e dell'acido fosforico): PA = acido fosfatidico; PI = fosfatidilinositolo; PS = fosfatidilserina; PE = fosfatidiletanolamina; PC = fosfatidilcolina [3].	4
Figura 3. Rappresentazione della fase cristallina e liquido cristallina di una membrana liposomiale [5,4].	6
Figura 4. Struttura della membrana liposomiale in presenza di colesterolo [5].	8
Figura 5. vescicole multilamellari (MLV); vescicole oligolamellari (OLV); vescicole unilamellari piccole (SUV); vescicole unilamellari grandi (LUV); vescicole multivicolari (MVV) [6].	9
Figura 6. Fenomeni conseguenziali di instabilità fisica delle vescicole [7].	10
Figura 7. Comportamento termotropico del doppio strato di fosfolipidi in un mezzo acquoso. T_p (temperatura di pre-transizione), T_m (temperatura di transizione di fase) [13].	16
Figura 8. Struttura della L- α -fosfatidilcolina di soia: in rosso è rappresentata la colina e il gruppo fosfato, in nero il glicerolo, in verde l'acido grasso insaturo e in blu l'acido grasso saturo.	20
Figura 9. Struttura del colesterolo	21
Figura 10. Rappresentazione strutturale della molecola di colecalciferolo (Vitamina D3) [16].	22
Figura 11. Struttura della Maltodestrina con, in basso, la rappresentazione del legame 1-4 α glicosidico tra le due molecole di α -D-glucosio [19,20].	23
Figura 12. Schema rappresentativo del set up sperimentale per la produzione di liposomi [23]	24

Figura 13. Sonicatore utilizzato nel lavoro di tesi	26
Figura 14. Immagine e schema rappresentativo dello <i>spray dryer</i> : 1) entrata gas(aria), 2) riscaldamento del gas, 3) atomizzatore (B=entrata acqua di raffreddamento, A=entrata liquido di alimentazione), 4) cilindro di atomizzazione, 5) collegamento tra cilindro di atomizzazione e ciclone, 6) ciclone, 7) uscita dei gas con apposito filtro in poliestere (non rappresentato) per la prevenzione del danneggiamento dell'aspiratore dalle polveri sottili e per la pulizia dei gas di uscita verso l'ambiente , 8) recipiente di raccolta [24]......	27
Figura 15. Figura rappresentativa di uno spettrofotometro [25].	28
Figura 16. Ultracentrifuga.	30
Figura 17. Figura rappresentativa della centrifuga utilizzata.....	30
Figura 18. Potenziale zeta.....	32
Figura 19. Rotavapor.	33
Figura 20. Immagine rappresentativa di un microscopio. Tale strumento è stato collegato ad una fotocamera digitale e ad uno schermo (non rappresentati in quest'immagine).	35
Figura 21. Foto dei campioni analizzati al microscopio ottico. Da sinistra, LIPO - 10% MX, LIPO - 20% MX, LIPO - 40% MX, D3 - 40%.	49
Figura 22. Foto al microscopio ottico (ingrandimento 10X) della soluzione dopo scioglimento della maltodestrina (terzo step) di: liposomi con D3 in MX 10 (A); liposomi con D3 in MX 20 (B); liposomi con D3 in MX 40 (C), D3 pura in MX 40 (D).....	50

Indice delle tabelle

Tabella 1. Campi di applicazione dei liposomi.	5
Tabella 2. Requisiti che soddisfano specifici metodi di produzione delle vescicole [7].	11
Tabella 3. Soluzioni spruzzate con lo <i>spray dryer</i> . Il campione 4 ha lo stesso contenuto di maltodestrina (MX) del campione 3, ma è costituito da una soluzione contenente D3 pura, quindi in assenza di liposomi	39
Tabella 4. Parametri di funzionamento impostati su <i>spray dryer</i>	40
Tabella 5. Efficienza di incapsulamento (EE%), carico effettivo e teorico della soluzione liposomiale.	44
Tabella 6. Caratteristiche dimensionali della sospensione liposomiale.	45
Tabella 7. Efficienza di incapsulamento (EE%) della soluzione liposomiale a concentrazione doppia.	45
Tabella 8. Caratteristiche dimensionali della sospensione liposomiale a concentrazione doppia.	46
Tabella 9. Fase 1, confronto tra D3 teorica (DT) e D3 effettiva (DD) in 100 mg di polvere finale e rapporto DD/DT %	47
Tabella 10. Valutazione, tramite Fase 2, della D3 più accessibile in 100 mg di polvere con maltodestrina al 10%, 20%, 40%. L'ultima riga rappresenta la serie di dati ottenuti per un prodotto aggiuntivo con maltodestrina al 40% e D3 pura	48

Abstract

Liposomes are closed structural vesicles made up of one or more lipid layers. They are formed from the dispersion of some polar lipids in an aqueous solvent. They can be used in a vast array of industrial applications such as in food, cosmetic and diagnostic fields due to their property of excellent delivery systems. Phospholipids, that are the main components of the liposomal membrane, especially if dispersed in water, can be slowly subjected to oxidation or hydrolysis phenomena. This could result in the leakage of the compound loaded inside and therefore in a worsening of the product. To avoid long-term stability problems, the production of a stabilized form of the liposomal suspension is of great interest. In this study, the stabilization of liposomal suspensions was tested using the spray drying technique. In this regard, a lipid solution was prepared by introducing soy L- α -phosphatidylcholine, a hydrophobic active ingredient (vitamin D3) and cholesterol in ethanol. The lipid solution was fed in parallel to a flow of deionized water to a microfluidic-like plant, designed and built by TPP group, able to produce vesicles in reduced times and to improve the final yield of the product. Later, the liposomal suspension was subjected to solvent evaporation in a Rotavapor to obtain a double concentration of lipids. The characterizations performed on liposomes, before and after concentration, put in evidence that both had nanometric dimensions, with acceptable PDI and zeta potential and high encapsulation efficiency values of vitamin D3, greater than 80%. Thus the liposomes concentration step by solvent evaporation did not cause alterations on liposomes features.

Subsequently, the liposomal suspension with double concentration was subjected to a stabilization process using the spray drying technique. The solution proved inadequate if subjected to such a process without the presence of an excipient; but, by subjecting the liposomal suspension to the same procedure, with the addition of

maltodextrin (stabilizing excipient) it is possible to obtain stable powder products. Three formulations with different concentrations of maltodextrin (10% MX, 20% MX, 40% MX) have been used and it has been observed that the protective action, assessed through the conservation of the D3 load, is effective, in equal measure, for all tested concentrations. Finally, the observation of the dissolution samples (powders in water) also highlighted the maintenance of the liposomal structural integrity.

In conclusion, the experimental activities carried out in this study, confirm the technical feasibility relating to the use of the spray drying process for the stabilization of liposomal suspensions.

Bibliografia

1. <http://gruppotpp.unisa.it/sistemi-di-rilascio-basati-sui-liposomi/>
2. Carugo, D., Bottaro, E., Owen, J. *et al.* Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Sci Rep* **6**, 25876 (2016).
3. Julia Staudenecker, *Studies on the Manufacture & Spray drying of Liposomes and Membrane Lipids.*
4. Modulo di tecniche e forme farmaceutiche, anno accademico 2004-2005, Seminario sui liposomi.
5. <https://it.wikipedia.org/wiki/Fosfolipide>.
6. Prof. Luigi CattelDip. di Scienza e Tecnologia del FarmacoUniversità di Torino, i farmaci con incapsulazione liposomiale in oncologia dall'innovazione tecnologica all'impiego clinico.
7. Dirk van Swaay, Andrew deMello, Microfluidic methods for forming liposomes, Institute for Chemical and Bioengineering, ETH Zurich, Wolfgang-Pauli-Str. 10, 8093 Zurich, Switzerland.
8. Kotouček, J., Hubatka, F., Mašek, J. *et al.* Preparation of nanoliposomes by microfluidic mixing in herring-bone channel and the role of membrane fluidity in liposomes formation. *Sci Rep* **10**, 5595 (2020).
9. Cordin Arpagaus, Andreas Collenberg, David Rütli, Elham Assadpour, Seid Mahdi Jafari, Nano *spray drying* for encapsulation of pharmaceuticals, *International Journal of Pharmaceutics* Volume 546, Issues 1–2, 30 July 2018, Pages 194-214.
10. Burcu Guldikena, Annika Linkec, Esra Capanoglua, Dilek Boyacioglua, Reinhard Kohlusc, Jochen Weissb, Monika Gibisb, Formation and characterization of spray dried coated and uncoated liposomes with encapsulated black carrot extract, *Journal of food engineering* **246** (2019) 42-50.
11. M. Fuchs, C., Turchiuli, M. Bohin, M.E. Cuvelier, C. Ordonnaud, M.N. Peyrat-Maillard, E. Dumoulin, Encapsulation of oil in powder using *spray drying* and fluidised bed agglomeration, *Journal of Food Engineering* **75** (2006) 27–35.

12. Jolanda M.van den Hoven, Josbert M.Metselaar, Gert Storm, Jos H.Beijnen, Bastiaan Nuijen, Cyclodextrin as membrane protectant in spray-drying and freeze-drying of PEGylated liposomes, International Journal of Pharmaceutics Volume 438, Issues 1–2, 15 November 2012, Pages 209-216.
 13. Silvia Franzé, Francesca Selmin, Elena Samaritani, Paola Minghetti, Francesco Cilurzo, Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging, Department of Pharmaceutical Sciences, Università degli Studi di Milano.
 14. Bilal Khan Niazi, Mark Zijlstra, Antonius A. Broekhuis, *Spray drying* thermoplastic starch formulations: Need for processing aids and plasticizers?, European Polymer Journal, Volume 49, Issue 7, July 2013, Pages 1861-1870.
 15. Mansour, H.M.; Zografis, G. The relationship between water vapor absorption and desorption by phospholipids and bilayer phase transitions. J. Pharm. Pharm. Sci. 2007, 96, 377–396.
 16. <https://it.wikipedia.org/wiki/Colecalciferolo>
 17. Andrea Giusti, Giuseppe Girasole, Dario Camellino, Gerolamo Bianchi, confronto clinico tra i metaboliti della vitamina, SC Reumatologia, Dipartimento dell'Apparato Locomotore, "La Colletta" ASL3 Genovese, Genova.
 18. Francesco Totoda, lezioni di principi di nutrizione e alimentazione animale, A.A 2015-2016.
 19. <https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/sostanze-attive/maltodestrina/825>
 20. <https://www.chimicamo.org/chimica-organica/legame-c-glicosidico.html/2>
 21. Muhammad Bilal Khan Niazia, Mark Zijlstraab, Antonius A.Broekhuisa, *Spray drying* thermoplastic starch formulations: Need for processing aids and plasticizers?, department of Chemical Engineering, Institute for Technology and Management, University of Groningen, The Netherlands.
 22. L. Medina-Torres, F. Calderas, D. M. Nuñez Ramírez, E. E. Herrera-Valencia, M. J. Bernad Bernad & O. Manero, *Spray drying* egg using either maltodextrin or nopal mucilage as stabilizer agents, Journal of Food Science and Technology volume 54, pages4427–4435(2017).
 23. 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).
 24. <https://it.wikipedia.org/wiki/Atomizzatore>
 25. https://www.perkinelmer.com/cmsresources/images/44-74448bro_lambda.pdf
-

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Gaetano Lamberti per avermi concesso la possibilità di accedere ad uno dei laboratori del suo gruppo di ricerca, permettendomi di arricchire ulteriormente le mie conoscenze. Ringrazio la Prof.ssa Anna Angela Barba per la sua gentilezza, per il suo aiuto e per tutte le attenzioni che mi ha dedicato.

Ringrazio la mia correlatrice, l'Ing. Annalisa Dalmoro, per avermi seguito passo dopo passo e con singolare precisione, durante le sperimentazioni in laboratorio. Bisogna ammettere che non è riuscita a farmi desistere dalla tentazione di chiamare le attrezzature con i nomi più assurdi, ma con la sua frequente tendenza a parlare al futuro credo che in fin dei conti, nonostante la mia sfiducia, un poco di fortuna me l'abbia portata. Con lei, ringrazio anche Veronica e Giuseppe per la compagnia in laboratorio.

Ringrazio i miei genitori per la famiglia che hanno creato e per il modo in cui sono stati capaci di crescermi e guidarmi. Ringrazio i miei fratelli, gli zii, i miei cugini e i miei nonni per l'affetto che mi hanno sempre dato.

Ringrazio la mia fidanzata Rosaria per essere colei che dà un senso alle mie giornate. Tutto il resto è solo l'attesa di rivederla, perché solo con lei posso sentirmi davvero felice. È stato difficile lasciarmi alle spalle tutte le mie brutte abitudini, ma è ciò che rifarei infinite volte pur di rimpiazzarle con le nostre. Ora vedo attraverso lei qualcosa che in fondo ho sempre atteso, un sentimento che non è razionale, un coraggio che mi spinge oltre. Sono certo che sarà sempre lei a non smettere mai di ispirarmi. È tutto ciò che mi spinge a lottare.

Ringrazio mia cugina Laura. Una presenza unica per la quale nutro una tale affezione da averla resa parte integrante di tutte le mie giornate, nonostante la notevole distanza che ci separa. Spero che non finirà mai la voglia di condividere le nostre ansie, i nostri successi e le stupidaggini che ci fanno così tanto divertire. Ringrazio anche Matteo che la sopporta.

Ringrazio tutti i compagni del mio gruppo di uscite: Roberto, Lilia, Roberta, Peppe, Simone e Vittoria (Lilia un poco di meno perché non mi ha nominato nei suoi ringraziamenti di laurea), per aver condiviso con me viaggi, feste e serate di pura follia in bilico tra l'attacco di panico e la spensieratezza più assoluta. In particolar modo ringrazio Mimmo e zio Ernesto, altri due componenti del mio gruppo, per le intere notti trascorse a parlare. Per anni mi sono chiesto quale fosse il fenomeno fisico per cui, durante quelle intere notti, il tempo scorresse così velocemente. Solo ora capisco che eravamo noi a muoverci in luoghi lontani e a viaggiare più velocemente della luce, anche se solo con il pensiero.

Ringrazio Marco per aver passato con me tutte le avventure in biblioteca a fingere di studiare.

Infine, ringrazio Maria, Anna e Tarek per la compagnia datami durante le intere giornate passate a seguire i corsi di ingegneria chimica. In particolare, ringrazio Tarek per avermi permesso di insegnargli solo le parole più inutili della lingua italiana.
