



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica

**Studio del processo di filtrazione tangenziale per
la concentrazione di sospensioni liposomiali**

Tesi in
Fenomeni di trasporto

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Dott.Ing. Diego Caccavo

Ing. Marco Iannone

Candidato:

Vittorio Romaniello

matricola 0622200953

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 14/12/2020

Fisciano, 04/12/2020

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	V
Indice delle tabelle	IX
Abstract	XI
Introduzione.....	1
1.1 I liposomi _____	2
1.1.1 Struttura e composizione	2
1.1.2 Applicazioni in ambito farmaceutico	5
1.1.3 Meccanismo di formazione	6
1.2 Produzione e Classificazione dei Liposomi _____	8
1.2.1 Classificazione dei liposomi	8
1.2.2 Metodi di produzione dei liposomi	10
1.2.3 Tecniche micro-fluidiche	12
1.2.4 L'approccio simil-microfluidico	14
1.3 Stato dell'arte _____	15
1.3.1 Metodo della filtrazione gel	15
1.3.2 Dialisi	17
1.3.3 Centrifugazione e microcentrifugazione	18
1.3.4 Ultrafiltrazione	19
1.3.5 Filtrazione tangenziale	20
1.7 Obiettivi _____	22

Materiali, apparecchiature e metodi..... 23

2.1 Materiali _____	24
2.1.1 L- α fosfatidilcolina di soia	24
2.1.2 Colecalciferolo (Vitamina D3)	25
2.1.3 Ferro	26
2.1.4 Colesterolo	26
2.1.5 Solventi e reagenti	27
2.2 Apparecchiature _____	28
2.2.1 Set-up sperimentale per la concentrazione di liposomi caricati	28
2.2.2 Nano Zetasizer	32
2.2.3 Ultracentrifuga	34
2.2.4 Spettrofotometro	35
2.2.5 Sonicator	36
2.2.6 Set-up sperimentale per la produzione di liposomi caricati	37
2.3 Metodi _____	38
2.3.1 Valutazione condizioni di lavoro ottimali	38
2.3.2 Concentrazione della sospensione liposomiale	41
2.3.3 Valutazione del carico di D3 nei liposomi	45
2.3.4 Calcolo delle dimensioni e del potenziale zeta	47
2.3.5 Analisi alcolometriche	48
2.3.6 Concentrazione liposomi caricati con ferro	50
2.3.7 Procedura per la quantificazione del ferro	50

Risultati e discussione..... 53

3.1 Condizioni di lavoro ottimali _____	54
3.2 Risultati della concentrazione _____	56
3.2.1 Valutazione dell'influenza del grado di concentrazione	58
3.3 Analisi sui campioni a diverse concentrazioni _____	60
3.3.1 Variazione della dimensione	60
3.3.2 Analisi dell'efficienza di incapsulamento e di eventuali perdite di principio attivo	68

Sommario e indici.	Pag. III
3.3.3 Analisi sul filtrato	70
3.3.4 Analisi al TEM	71
3.4 Risultati della concentrazione di liposomi caricati con ferro _____	72
3.4.1 Concentrazione 1:2	72
3.4.2 Concentrazione 1:8	74
Conclusioni.....	77
4.1 Conclusioni _____	78
Bibliografia.....	79

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. [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[1]	4
Figura 3. Rappresentazione della fase cristallina e liquido cristallina di una membrana liposomiale[1]	7
Figura 4. vescicole multilamellari (MLV); vescicole oligolamellari (OLV); vescicole unilamellari piccole (SUV); vescicole unilamellari grandi (LUV); vescicole multivicolari (MVV)[1]	9
Figura 5. Schema rappresentativo del set up sperimentale per la produzione di Liposomi[2]	14
Figura 6. Schema filtrazione gel[4]	16
Figura 7. Meccanismo Dialisi[4]	17
Figura 8. Schema metodo della Centrifugazione[4]	18
Figura 9. Schema Ultrafiltrazione[4]	19
Figura 10. Illustrazione filtrazione tangenziale[6]	20
Figura 11. 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.[1]	24
Figura 12. Rappresentazione strutturale della molecola di colecalciferolo (Vitamina D3)[1]	25
Figura 13. Struttura chimica del colesterolo.[2]	26
Figura 14. Minimate TFF Capsule w/ 300Kd Omega[9]	28
Figura 15. Schema e componenti consigliati dal manuale[9]	28
Figura 16. Configurazione di lavoro	29

Figura 17. Configurazione in lavaggio controcorrente	30
Figura 18. Foglio di calcolo per l'acquisizione dati	31
Figura 19. Potenziale zeta[1]	33
Figura 20. Ultracentrifuga[1].....	34
Figura 21. Spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer [1].....	35
Figura 22.Sonicator da laboratorio[1].....	36
Figura 23. Impianto produzione liposomi con tecnica simil-microfluidica	37
Figura 24. Configurazione in riciclo totale[10]	39
Figura 25. Processo di filtrazione diretta[11]	41
Figura 26. Processo di filtrazione tangenziale[11].....	42
Figura 27. Schema logico adottato per valutare l'influenza del <i>fouling</i> sul processo	44
Figura 28. Picnometro da laboratorio	48
Figura 29. Coefficienti delle tabelle alcolimetriche[13]	49
Figura 30. Curve di lavoro parametriche con la portata di alimentazione	54
Figura 31. Campioni a varie concentrazioni (da sinistra verso destra rispettivamente: 80,40,20,10 e 5 g/L).....	56
Figura 32. Flusso di permeato contro concentrazione della sospensione	57
Figura 33. Resistenza totale contro concentrazione sospensione.....	58
Figura 34. Dimensione media contro concentrazione sospensione.....	60
Figura 35. Indice di polidispersità contro concentrazione sospensione	61
Figura 36. <i>Zeta Potential</i> contro concentrazione sospensione.....	62
Figura 37. Analisi DLS campione a concentrazione di 5 g/L	63
Figura 38. Analisi DLS campione a concentrazione di 10 g/L	64
Figura 39. Analisi DLS campione a concentrazione di 20 g/L	65
Figura 40. Analisi DLS campione a concentrazione di 40 g/L	66
Figura 41. Analisi DLS campione a concentrazione di 80 g/L	67
Figura 42. Massa di D3 persa contro concentrazione sospensione	69
Figura 43. Analisi spettrofotometrica sui campioni di filtrato	70
Figura 44. Immagine al TEM campione tal quale	71
Figura 45. Immagine al TEM campione concentrato 1:16	71

Indice delle tabelle

Tabella 1. Campi di applicazione dei liposomi. [1].....	5
Tabella 2. Requisiti che soddisfano specifici metodi di produzione delle vescicole[2]	13
Tabella 3. Valori portata di alimentazione	40
Tabella 4. Valori TMP.....	40
Tabella 5. Diluizioni campioni di surnatante.....	46
Tabella 6. Primo ciclo di diluizione.....	46
Tabella 7. Secondo ciclo di diluizione.....	47
Tabella 8. Step di concentrazione.....	56
Tabella 9 Qualità della sospensione colloidale in base al potenziale zeta[14]	62
Tabella 10. Valore dei picchi campione 5g/L.....	63
Tabella 11. Valore dei picchi campione 10g/L.....	64
Tabella 12. Valore dei picchi campione 20g/L.....	65
Tabella 13. Valore dei picchi campione 40g/L.....	66
Tabella 14. Valore dei picchi campione 80g/L.....	67
Tabella 15. Campioni non ultracentrifugati.....	68
Tabella 16. Campioni ultracentrifugati.....	68
Tabella 17. Analisi spettrofotometriche sulla <i>cake</i>	69
Tabella 18. Risultati analisi alcolometriche.....	70
Tabella 19. Risultati spettrofotometria campione tal quale	72
Tabella 20. Composizione sospensione liposomiale tal quale.....	72
Tabella 21. Distribuzione massa di ferro sospensione tal quale	72
Tabella 22. Risultati spettrofotometria campione a concentrazione 1:2	73
Tabella 23. Distribuzione massa di ferro sospensione 1:2.....	73

Tabella 24. Composizione sospensione liposomiale concentrata 1:2	73
Tabella 25. Distribuzione massa di ferro sospensione tal quale	74
Tabella 26. Risultati spettrofotometria campione a concentrazione 1:8	74
Tabella 27. Distribuzione massa di ferro sospensione 1:8	74
Tabella 28. Composizione sospensione liposomiale concentrata 1:8	75

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. The methods used for the production of liposomes result in a very diluted product, so it is necessary a post treatment to eliminate solvents and non-trapped drugs in order to achieve a good quality of the liposomal product.

Currently, the methods used for the concentration are based on separation by density, such as: dialysis, centrifugation or gel filtration. Since the molecular weight of most solvents and / or active ingredients is much lower than that of liposomes. Although these methods are useful for the purification of liposomes, they need long time process and also decrease the yield or integrity of the product, therefore making them not very effective for large-scale application.

In this thesis work an optimized procedure was developed and tested to concentrate liposomal suspensions loaded with, either a hydrophobic and a hydrophilic drug, via a crossflow membrane filter. Crossflow membrane filtration technologies are separative techniques based on the use of semi-permeable filters through which, under a pressure gradient, it is possible to obtain the separation of suspended or solution components according to their dimensional and / or chemical-physical characteristics.

In the first part of this thesis a control system has been designed and built around the filter that effectively allowed us to evaluate all the parameters involved in this process. It has been fixed, through a specific procedure, the optimal working condition, in term of TMP (trans-membrane pressure) and feed flux. To do so, was used a

liposomal suspension loaded with D3 produced by the microfluidic-like plant, designed and built by TPP group.

Then, with these fixed parameters, was concentrated the liposomal suspension loaded with D3, an hydrophobic drug, to evaluate the influence of the grade of concentration and fouling on the permeate rate. A fitting equation was generated that link the resistance to transport with the concentration of the suspension.

The DLS analysis on the samples with different concentration showed an improvement in the heterogeneity of the suspension. Infact it has seen a grown of the PDI (polydispersity index) and a reduction of the dimensional average of the particles compared to the non-concentrated sample. Through spectrophotometric analyzes it was possible to state that there was no degradation of the liposomal structure, reduction of the encapsulation efficiency and no amount of D3 passed through the membrane.

A liposomal suspension loaded with iron, a hydrophilic drug, was concentrated to evaluate if it was possible to improve the encapsulation efficiency that with the currently methods of production are very low. It has seen that the iron passed through the membrane reducing the amount of iron non-encapsulated. The improvement in the encapsulation efficiency was significant only for the 1:2 concentration while at higher concentrations the variation was negligible.

In conclusion, with the experimental activities carried out in this study it is possible to affirm that this method does not damage or compromise the liposomal structure, improves the size distribution of the particles and increases the encapsulation efficiency. All these aspects confirm the technical feasibility of the Crossflow membrane filtration technology applied to the concentration of liposomal suspensions.

Bibliografia

1. Cacace, M., *Stabilizzazione tramite spray drying di sospensioni liposomiali*. 2020: Università degli studi di salerno.
2. Califano, B., *Produzione di nanoliposomi bioadesivi mediante tecnica simil-microfluidica*. 2020: Università degli studi di Salerno.
3. Bozenhardt, E.H. and H.F. Bozenhardt. *An Introduction To Liposome Processing For Drug Delivery* 2020; Available from: <https://www.pharmaceuticalonline.com/doc/an-introduction-to-liposome-processing-for-drug-delivery-0001>.
4. Lin, M. and X.-R. Qi. *Purification Method of Drug-Loaded Liposome*. 2019; Available from: https://www.researchgate.net/publication/329891584_Purification_Method_of_Drug-Loaded_Liposome.
5. Alves, N.J., et al. *Functionalized liposome purification via Liposome Extruder Purification* 2013 Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2013/an/c3an00680h#!divAbstract>.
6. Leone, G.P. and C. Russo. *Tecnologie di filtrazione tangenziale a membrana e applicazioni per l'industria agroalimentare*. 2015; Available from: https://www.researchgate.net/publication/279525364_Tecnologie_di_filtrazione_tangenziale_a_membrana_e_applicazioni_per_l'industria_agro-alimentare.
7. Dimov, N., et al., *Formation and purification of tailored liposomes for drug delivery using a module-based micro continuous-flow system*. 2017.
8. Paolucci, A.M. *Universo del Corpo*. 1999; Available from: https://www.treccani.it/enciclopedia/ferro_%28Universo-del-Corpo%29/.

9. Pall. *PALL_MinimateTFF_Capsule_DataSheet*. Available from:
<https://shop.pall.com/us/en/products/zidOA300C12?CategoryName=ID16&CatalogID=Laboratory>.
 10. Millipore, E., *A Hands-on Guide to Ultrafiltration. Diafiltration Optimization using Pellicon® Cassettes*.(accessed May 1, 2017), 2013.
 11. Schwartz, L. and K. Seeley, *Introduction to tangential flow filtration for laboratory and process development applications*. Pall Scientific & Technical Report, PN, 2002. **33213**.
 12. Radoniqi, F., et al., *Computational fluid dynamic modeling of alternating tangential flow filtration for perfusion cell culture*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018. **115**(11): p. 2751-2759.
 13. Ciro, S., *Ottimizzazione di uno strumento innovativo per la determinazione del grado alcolico e la sua applicazione ad un processo di crioconcentrazione della birra* 2018, Laurea in Ingegneria Chimica: Università degli studi di Salerno.
 14. contributors, W. *Zeta potential*. Available from:
https://en.wikipedia.org/wiki/Zeta_potential.
-

