



Unione Europea



Ministero dell'Istruzione,  
dell'Università e della Ricerca



UNIVERSITÀ DEGLI  
STUDI DI SALERNO

**FONDO SOCIALE EUROPEO**  
**Programma Operativo Nazionale 2007/2013**  
**“Ricerca Scientifica, Sviluppo Tecnologico, Alta Formazione”**  
**Regioni dell’Obiettivo 1 – Misura III.4**  
**“Formazione superiore ed universitaria”**

***Department of Industrial Engineering***

*Ph.D. Course in:*  
*Scienza e tecnologie per l’industria Chimica, Farmaceutica ed*  
*Alimentare*  
*(XI Cycle-New Series)*

**SUPERCRITICAL ASSISTED PROCESSES FOR THE  
PRODUCTION OF BIOPOLYMERIC MICRO AND  
NANOCARRIERS**

**Supervisor**

*Prof. Ernesto Reverchon*

**Ph.D. student**

*Roberta Campardelli*

**Scientific Referees**

*Dr. Giovanna Della Porta*

*Prof. Libero Sesti Osseo*

*Prof. Jesus Santamaria*

*Prof. Silvia Irusta*

**Ph.D. Course Coordinator**

*Prof. Paolo Ciambelli*

**Anno Accademico 2012/2013**

## Abstract

This work provides an innovative point of view on obtaining nanoparticles by supercritical fluids. Supercritical fluids have already been exploited in the production and processing of micro or sub-micro particles, but the production of nanoparticles is still more ambitious, requiring a deep understanding of the thermodynamic of multiphase systems involved and of the fluid dynamics and mass transfer of the process.

This thesis focused on the development of supercritical assisted process for the production of biopolymeric micro and nanocarrier for pharmaceutical and biomedical applications. After a wide study of the state of the, two different processes have been focused on the production of different kind of devices:

- 1) Supercritical Emulsion Extraction process (SEE) for the production of multifunctional nanodevices;
- 2) Supercritical Assisted Injection in Liquid Antisolvent process (SAILA) for the production of stabilized nanoparticle water suspensions.

Supercritical Emulsion Extraction (SEE) has been recently proposed in the literature for the production of drug/polymer microspheres with controlled size and distribution, starting from *oil-in-water (o-w)* and *water-in-oil-in-water (w-o-w)* emulsions. This process uses supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) to extract the “oil” phase of emulsions, leading to near solvent-free microparticles. SEE offers the advantage of being a one-step process and is superior to other conventional techniques for the better particle size control, higher product purity and shorter processing times; the SEE process has been proposed in the continuous layout, using a high pressure packed tower. However, monodisperse sub-micro, nanoparticles of biopolymer suitable for pharmaceutical formulations have not been produced until now by SEE.

Therefore, this part of the work was performed on the production of monodisperse biopolymer nanoparticles. Particularly, emulsion formulation parameters have been tested, such as, different surfactant concentrations and biopolymer percentages in the oily phase, and several emulsification techniques (ultrasound or high speed emulsification) and their interactions with SEE processing have been tested to obtain small droplets dimensions from the micro size to the nano size range. *Poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA)*, *poly-lactic acid (PLA)* and *poly-caprolactone (PCL)* were the polymers selected to produce micro and nano devices, relative results are shown in Chapter 7.

Then, after the optimization of the process conditions for the production of monodisperse sub-micro and nanoparticles encapsulation of drugs, proteins, peptides and metals has been carried out. For the encapsulation study the SEE technique starting from single or double emulsions was used for the production of nanospheres.

The SEE technology has a great potential regarding the field of protein encapsulation thanks to the mild extraction condition and the short process time, and mainly thanks to the possibility to use multiple emulsions. For this reason, the SEE has been applied to the production of biopolymeric micro and nanoparticles of PLA and PLGA encapsulating peptides and proteins starting from double emulsion. Results are shown in Chapter 8. Bovine serum albumin (BSA) has been selected as protecting protein for growth factor, such as Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Bone Morphogenetic Proteins (BMP). Both micro and nanoparticles were produced; the effect of size of particles on protein loading and release has been evaluated. PLGA microspheres loaded with GFs were charged inside a bioactive alginate scaffold to monitor the effect of the local release of these biosignals on cells differentiation. Human Mesenchymal Stem Cells (h-MSC), where used in view of the fact that they are a promising cell source for bone tissue engineering. Good cells differentiation indicates that the SEE process was successful in the encapsulation of proteins and peptides, preserving the functional structure of the proteins, thanks to the mild operating conditions used.

Another important challenge that has been managed is also the production of nanocomposite biopolymeric particles encapsulating metal nanoparticles for the production of light sensitive drug delivery devices. The encapsulation of TiO<sub>2</sub> and Au nanoparticles has been performed for different biomedical applications (Chapter 9 and 10).

In this work PLA/nano-TiO<sub>2</sub> microparticles have been produced using SEE for photodynamic therapy of cells and bacteria. Anatase type nano-TiO<sub>2</sub> ethanol stabilized suspension has been synthesized by precipitation from solutions of titanium alcoxides and directly used as the water internal phase a of double emulsion *water in oil in water* and also TiO<sub>2</sub> fine powder was produced and used for encapsulation experiments using a *solid in oil in water emulsion*. Both micro and sub-microparticles have been produced.

High TiO<sub>2</sub> encapsulation efficiencies have been obtained. PLA/nano-TiO<sub>2</sub> particles have been characterized by TEM, TGA and XPS to investigate the dispersion of the metal oxide in the polymeric matrix. Photocatalytic activity of the produced nanostructured microparticles has been also investigated using bacterial killing assay (*Staphylococcus Aureus*) under UV light. Pure TiO<sub>2</sub> nanoparticles and PLA/nano-TiO<sub>2</sub> particles showed the same photocatalytic activity.

Stimuli-responsive drug delivery systems were produced dispersing hollow gold nanoshells (HGNs) in PLA particles encapsulating Rhodamine to obtain the photothermal controlled delivery of the model drug under near infrared irradiation (NIR). HGNs were synthesized via galvanic replacement of Cobalt with Gold using PVP as template stabilizer. HGNs with a mean diameter of 20 nm were produced; the maximum absorption coefficient was located in the optimal NIR region desired for biomedicine, 800 nm wavelength. PLA-HGNs nanocomposite particles encapsulating Rhodamine were produced using the SEE technique. Rhodamine was dissolved in the water internal phase of a double *water-in-oil-in-water* emulsion, whereas HGNs were dispersed in the polymeric solution of the oil phase. Thanks to the fast and efficient extraction of the solvent of the oily phase obtained by supercritical CO<sub>2</sub>, non coalescing and spherical PLA-HGNs nanostructured particles were obtained, with a mean dimension around 200 nm. Particles were characterized by SEM, TEM and EDX analysis, HGNs loading was estimated by ICP. Rhodamine release from PLA-HGN nanostructured particles was evaluated under different NIR irradiation conditions demonstrating that release rate is controllable externally, depending of NIR expositions. A pulsatile Rhodamine release was obtained with NIR irradiation.

The SEE plant was also used for the solvent removal from biopolymeric nanoparticles suspensions produced by nanoprecipitation (Chapter 11). Nanoprecipitation is a simple and effective process for the production of biopolymer nanoparticle suspensions. However, until now only a marginal attention has been given to the problem of the solvents elimination from the prepared suspensions. This part of the process is very important in pharmaceutical/medical applications, since even some parts per million (ppm) of these residues can hinder the application of the produced nanoparticles. A new approach to the problem of acetone and acetone/ethanol mixtures removal, from the suspension of nanoparticles has been proposed, using the SEE apparatus for the continuous counter-current extraction of the organic solvent from water based suspensions. The operating parameters (pressure, temperature and liquid to gas ratio) were optimized. Nanoprecipitation process assisted by supercritical solvent elimination has been tested on PLGA and PCL. Part of this PhD thesis was also focused on the development of a new supercritical assisted technique for the production of nanoparticles stabilized water suspensions, Chapter 12, 13,14. In this part of PhD thesis it has been proposed a novel supercritical assisted process for nanoparticle production, called Supercritical Assisted Injection in a Liquid Antisolvent (SAILA). In this process, an expanded liquid solution formed by supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) and an organic, water miscible solvent, is produced, in which a solid solute is solubilised. Then, the solution is depressurized into a water solution in which the solute is not soluble: the water based solution works as a liquid antisolvent and nanoparticles are produced. In the SAILA process liquid-liquid antisolvent precipitation is obtained when the processed compound is soluble in the solvent and not soluble in the antisolvent; the particles size of the precipitates depends on the efficiency of the micromixing between the two liquids that, in turn, is related to their surface tension. The continuous injection of an expanded liquid solution improves the mixing with the antisolvent thanks to the reduced surface tension of the expanded liquid, thus producing smaller particles.

The process has been proved to be successful in the production of nanoparticles of PCL, selected as model compound. The effect of the process parameters on nanoparticle diameter has been studied; it decreases increasing the gas to liquid ratio, the water to solvent flow rate ratio, the saturator temperature and decreasing the polymer concentration. Nanoparticles with a mean diameter down to 64 nm have been obtained. Nanoparticle formation mechanism seems to be guided by the micromixing between the expanded liquid solution and the receiving water solution, followed by nucleation and growth of nanoparticles. The presence of surfactants in the water receiving solution avoids nanoparticles coalescence. Furthermore the SAILA process has been applied successfully to the production of stabilized nanoparticles suspensions of poorly water soluble drugs, several different compounds have been processed in order to extend the range of applicability of this process not only to the polymer but also active principles.

In conclusion, in this PhD thesis, innovative supercritical assisted processes have been applied successfully to the production of nanoparticles. The SEE process conditions were optimized to produce biopolymeric monodisperse submicro or nanoparticles; the encapsulation of several challenging compounds

were carried out using the double emulsion technique. The SEE process reveals to be a powerful and robust technique for the production of multifunctional nanodevices for nanomedicine applications. The nanoprecipitation process assisted by supercritical fluid for the extraction of the organic solvent has also been proved to be a valid alternative to the SEE technique for the production of biopolymeric monodisperse nanoparticles suspensions. A new supercritical assisted process has been developed and proposed in this thesis work named Supercritical Assisted Injection in a Liquid Antisolvent (SAILA). It has been demonstrated that the idea is original and innovative in the field of supercritical fluid processes and successful in the production of nanoparticles stable aqueous suspensions.

## Abstract

Questo lavoro fornisce un punto di vista innovativo su come ottenere nanoparticelle utilizzando i fluidi supercritici. I fluidi supercritici sono già stati sfruttati per la produzione di micro o sub-microparticelle, ma la produzione di nanoparticelle è un obiettivo ambizioso, poiché richiede una profonda comprensione della termodinamica dei sistemi multifase coinvolti nei processi basati sui fluidi supercritici e dei fenomeni fluidodinamici e di trasferimento di massa che hanno luogo durante il processo produttivo.

Per questo motivo, questa tesi è focalizzata sullo sviluppo di processi assistiti da fluidi supercritici per la produzione di nanocarrier di biopolimeri per applicazioni biomediche e farmaceutiche. Dopo un ampio studio dello stato dell'arte, si è scelto di studiare due differenti processi utilizzati per la produzione di diversi tipi di dispositivi:

- 1) il processo di estrazione supercritica di emulsioni (Supercritical Emulsion Extraction, SEE) per la produzione di nanodispositivi multifunzionali;
- 2) l'iniezione assistita da fluidi supercritici in un antisolvente liquido (Supercritical Assisted Injection in a Liquid Antisolvent, SAILA) per la produzione di nanosospensioni di particelle stabili in acqua.

Il processo di estrazione supercritica di emulsioni (SEE) è stato recentemente proposto in letteratura per la produzione di microsferi farmaco/polimero di dimensione e distribuzione controllata, partendo da emulsioni del tipo olio-in-acqua (o/w) e acqua-in-olio-in-acqua (w/o/w). Questo processo utilizza l'anidride carbonica supercritica (SC-CO<sub>2</sub>) per estrarre la fase "olio" dalla fase interna delle emulsioni, portando alla produzione di microparticelle senza residui solvente. Il processo SEE offre il vantaggio di essere un processo continuo che offre risultati migliori rispetto alle altre tecniche convenzionali per quanto riguarda il migliore controllo della granulometria, maggiore purezza del prodotto e tempi di processo più brevi. Tuttavia, con il processo SEE non sono ancora state ottenute particelle sub-micrometriche e nanometriche con distribuzioni granulometriche monodisperse.

Pertanto, una prima parte, del presente lavoro di tesi di dottorato, è stata focalizzata sulla produzione di nanoparticelle monodisperse a base di polimeri biocompatibili e biodegradabili. In particolare, sono stati studiati differenti parametri di formulazione dell'emulsione, come ad esempio, diverse concentrazioni di tensioattivi e percentuali di biopolimero nella fase oleosa, e diverse tecniche di emulsione e le loro interazioni con il processo SEE. L'obiettivo di questa fase di ottimizzazione dei parametri operativi è stato quello di ridurre la dimensione delle goccioline della fase oil dell'emulsione di partenza. I polimeri selezionati per la produzione dei nanocarrier sono stati: *Poli-lattico-co-glicolico* (PLGA), *poli-lattico* (PLA) e *poli-caprolattone* (PCL), i risultati relativi sono riportati nel capitolo 7.

A seguito dell'ottimizzazione delle condizioni di processo per la produzione di nanoparticelle monodisperse, è stato effettuato uno studio per l'incapsulamento di farmaci, proteine, peptidi e nanoparticelle metalliche. Per lo studio di incapsulamento attraverso la tecnica SEE sono state prodotte sia emulsioni singole che doppie.

La tecnologia SEE ha un grande potenziale per quanto riguarda il campo dell'incapsulamento di proteine grazie alle condizioni miti di estrazione e al breve tempo di processamento, e soprattutto grazie alla possibilità di utilizzare più tipologie di emulsioni. Per questo motivo, il processo SEE è stato applicato alla produzione di micro e nanoparticelle di PLA e PLGA per l'incapsulamento di peptidi e proteine a partire da una doppia emulsione. I risultati sono riportati nel capitolo 8. L'albumina da siero bovino (BSA) è stata selezionata come proteina modello e anche come proteina aggiunta per proteggere i fattori di crescita che si è deciso di incapsulare quali il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) e il Bone Morphogenetic Protein

(BMP). Per questo studio, sono state prodotte sia micro che nanoparticelle; è stato valutato l'effetto delle diverse dimensioni delle particelle sull'efficienza di incapsulamento delle proteine e sulle cinetiche di rilascio. Le particelle di PLGA caricate con i fattori di crescita sono state caricate in scaffold bioattivi a base di alginato per monitorare l'effetto del rilascio locale di questi biosegnali sulla differenziazione delle cellule staminali mesenchimali umane (h-MS). Il risultato ottenuto ha evidenziato una buona differenziazione cellulare che indica che il processo SEE è riuscito ad incapsulare con successo i fattori di crescita mantenendo la struttura funzionale di tali proteine.

In questa tesi di dottorato sono inoltre stati prodotti e testati nanocompositi polimerici caricati con nanoparticelle metalliche per la produzione di dispositivi fotosensibili per somministrazione dei farmaci *on-demand*. L'incapsulamento di nanoparticelle di TiO<sub>2</sub> e Au è stato studiato per diverse applicazioni biomediche (Capitolo 9 e 10).

In particolare, utilizzando il processo SEE sono state prodotte nanoparticelle di PLA al cui interno è stato caricato l'ossido di titanio nanoparticellare (nano-TiO<sub>2</sub>), queste nanoparticelle composite sono state sviluppate e testate per la terapia fotodinamica di cellule e batteri. La sospensione etanolica di nano-TiO<sub>2</sub>, di tipo anatase, è stata sintetizzata per precipitazione da soluzioni di alcossidi di titanio ed utilizzata direttamente come fase interna di una doppia emulsione acqua-in-olio-in-acqua; a scopo di confronto anche TiO<sub>2</sub> in polvere nanometrica è stato prodotto e utilizzato per esperimenti di incapsulamento, disperdendo direttamente la polvere nanometrica nella fase oil dell'emulsione (solido-in-olio-in-acqua). Sono state prodotte sia micro che sub-microparticelle. Le particelle nanocomposite prodotte attraverso la tecnica SEE hanno mostrato un'alta efficienza di incapsulamento dell'ossido di titanio. Le particelle sono state caratterizzate attraverso analisi TEM, TGA e XPS per indagare la dispersione dell'ossido di titanio nella matrice polimerica. L'attività fotocatalitica delle microparticelle nanostrutturate prodotte è stata inoltre studiata attraverso un bacterial killing test (su *Staphylococcus Aureus*) in presenza di luce UV. Le nanoparticelle di PLA/TiO<sub>2</sub> hanno mostrato un'elevata attività fotocatalitica, portando alla totale inattivazione batterica.

Inoltre sono stati prodotti e testati sistemi di *drug delivery stimuli-responsive* disperdendo nanoshells d'oro (Hollow Gold Nanoshell, HGN), in particelle di PLA caricate con rodamina. Il rilascio attivato da luce infrarossa (NIR) della rodamina è stato quindi studiato. I nanoshell HGN sono stati sintetizzati tramite sostituzione galvanica di cobalto con oro con PVP usato come stabilizzante, ottenendo HGN con un diametro medio di 20 nm con un coefficiente di assorbimento massimo nella regione ottimale della radiazione infrarossa per la biomedicina, 800 nm di lunghezza d'onda. Le particelle nanocomposite PLA-HGN caricate con rodamina sono state prodotte utilizzando la tecnica SEE nelle condizioni ottimizzate in precedenza. In particolare, la rodamina è stata sciolta nella fase interna acquosa di una doppia emulsione acqua-in-olio-in-acqua, i nanoshell d'oro, HGN, sono stati dispersi invece nella soluzione polimerica della fase oleosa. Grazie alla estrazione rapida ed efficiente del solvente della fase nella fase oleosa, ottenuta mediante CO<sub>2</sub> supercritica, si è ottenuta la produzione di particelle sferiche non coalescenti, con una dimensione media di circa 200 nm. Le particelle ottenute sono state caratterizzate da SEM, TEM e analisi EDX, l'efficienza di incapsulamento dei nanoshell d'oro è stata stimata tramite analisi ICP. Il rilascio della rodamina dalle particelle nanostrutturate PLA-HGN è stato valutato in diverse condizioni di irraggiamento NIR; i risultati ottenuti dimostrano il tasso di rilascio è controllabile dall'esterno, a seconda delle esposizioni NIR. In questo modo è stato ottenuto un rilascio pulsato di rodamina attivato dall'esterno attraverso irradiazione a luce infrarossa.

L'impianto SEE è stato utilizzato anche per la rimozione del solvente da sospensioni di nanoparticelle di biopolimeri prodotte attraverso la tecnica della nanoprecipitazione (capitolo 11). La nanoprecipitazione è un processo semplice ed efficace per la produzione di sospensioni di nanoparticelle biopolimeriche. Tuttavia, finora solo marginalmente è stata affrontata la problematica dell'eliminazione dei solventi dalle sospensioni preparate. Questa parte del processo è molto importante in applicazioni farmaceutiche/mediche, poiché anche alcune parti per milione (ppm) di residui solvente possono impedire l'applicazione delle nanoparticelle prodotte. È stato proposto un nuovo approccio al problema della rimozione dei solventi da nanosospensioni utilizzando l'impianto SEE, ottenendo un' estrazione continua del solvente organico da sospensioni a base acquosa operando in controcorrente. I parametri di funzionamento (pressione, temperatura e liquidi rapporto gas) sono stati ottimizzati. Il processo di nanoprecipitazione assistito da fluidi supercritici ha consentito la rimozione dei solventi (acetone, etanolo e miscele di questi) con elevata efficienza di separazione, mantenendo inalterate le proprietà delle nanosospensioni di PLGA e PCL.

Parte di questa tesi di dottorato è inoltre stata dedicata sullo sviluppo di una nuova tecnica assistita da fluidi supercritici per la produzione di nanoparticelle stabilizzate in sospensioni acquose, Capitolo 12, 13,14. In

questa parte della tesi di dottorato è stato infatti proposto un nuovo processo assistito da fluidi supercritici per la produzione di nanoparticelle in sospensione acquosa, chiamato iniezione assistita da fluidi supercritici in un antisolvente liquido (Supercritical Assisted Injection in a Liquid Antisolvent, SAILA). In questo processo, viene prodotto un liquido espanso formato da anidride carbonica supercritica e da un solvente organico miscibile con l'acqua; in questa miscela supercritica viene sciolto un soluto. Questa soluzione viene poi depressurizzata in una soluzione acquosa in cui il soluto non è solubile: la soluzione a base di acqua funziona come antisolvente liquido e quindi vengono prodotte le nanoparticelle. Nel processo SAILA viene ottenuta una precipitazione liquido-liquido quando il composto da processare è solubile nel solvente e non solubile nel antisolvente; le dimensioni delle particelle dei precipitati dipendono dall'efficienza del micromixing tra i due liquidi che, a sua volta, è legato alla loro tensione superficiale. In questo processo, l'iniezione continua di un liquido espanso migliora la miscelazione con l'antisolvente grazie alla ridotta tensione superficiale del liquido espanso, portando quindi alla produzione di particelle più piccole. Il processo si è dimostrato efficace nella produzione di nanoparticelle di PCL, selezionato come composto modello. Una parte dello studio sperimentale è stato rivolto all'analisi dell'effetto dei parametri di processo sul diametro delle nanoparticelle; da questo studio si è potuto osservare che la dimensione media delle particelle si riduce aumentando il rapporto gas/liquido, il rapporto antisolvente/solvente, la temperatura del liquido espanso e diminuendo la concentrazione del polimero. Nanoparticelle con un diametro medio inferiore a 64 nm sono state prodotte. Il meccanismo di formazione di nanoparticelle sembra essere guidato dal micromixing tra il liquido espanso e la soluzione di acqua ricevente, seguita da nucleazione e la crescita di nanoparticelle. La presenza di tensioattivi nelle acqua ricevente evita che le nanoparticelle coalescano. Inoltre, il processo SAILA è stato applicato con successo per la produzione di nanosospensioni stabili di farmaci scarsamente solubili in acqua, allo scopo di aumentare la biodisponibilità di questi farmaci. In conclusione, in questa tesi di dottorato, sono stati sviluppati e testati con successo nuovi processi basati sull'utilizzo dei fluidi supercritici per la produzione di nanoparticelle e nanocarriers. Le condizioni di processo sono state ottimizzate per produrre nanoparticelle con una distribuzione granulometrica stretta e controllata attraverso il processo SEE; è stato dimostrato l'efficiente incapsulamento di composti difficili da processare utilizzando la tecnica della doppia emulsione. I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi hanno dimostrato che il processo SEE è una tecnica efficiente e riproducibile per la produzione di nanodispositivi multifunzionali per applicazioni in nanomedicina. Un nuovo processo assistito da fluidi supercritici è stato inoltre sviluppato e proposto in questo lavoro di tesi, il processo SAILA. È stato dimostrato che l'idea alla base di questo processo è originale e innovativa nel campo dei processi che sfruttano le proprietà dei fluidi supercritici e che attraverso questo nuovo processo è possibile produrre sospensioni acquose di nanoparticelle stabili nel tempo.