

Università di Salerno



Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Dottorato in Ingegneria Industriale

Curriculum in Ingegneria Chimica - XXXI Ciclo

Ottimizzazione di un processo assistito da fluidi supercritici per la produzione di liposomi per applicazioni industriali

Supervisor

Prof. Ernesto Reverchon

PhD student

Paolo Trucillo

Scientific Referees

Ing. Roberta Campardelli

Prof. Elisabeth Badens

Prof. José Coelho

PhD Course Coordinator

Prof. Ernesto Reverchon

Abstract

I liposomi sono vescicole sferiche costituite da un doppio strato lipidico che circonda un nucleo interno acquoso. Numerosi metodi di produzione dei liposomi sono stati sviluppati negli ultimi decenni. Tali metodi sono però caratterizzati da diverse problematiche, quali la bassa riproducibilità, configurazioni discontinue di processo, basse efficienze di incapsulamento di composti idrofili, difficoltà nel controllo della distribuzione granulometrica dei campioni ed elevato solvente residuo, il che va a ridurre significativamente il potenziale industriale di questi sistemi di trasporto di farmaci.

Alcune tecnologie assistite da fluidi supercritici sono state proposte per risolvere le problematiche relative ai processi di produzione convenzionali di particelle micronizzate, coprecipitati e nanocompositi polimerici. Recentemente, alcune tecniche basate sull'uso dell'anidride carbonica supercritica sono state proposte per la produzione di liposomi. Tuttavia, le metodiche più recenti mostrano ancora problematiche relative al controllo delle dimensioni medie delle vescicole prodotte e alle efficienze di incapsulamento ancora basse rispetto alla spendibilità industriale. La maggiore difficoltà relativa ai processi convenzionali e supercritici è dovuta alla fase di idratazione dello strato lipidico. Durante questa fase, solo una parte dell'acqua usata per l'idratazione viene effettivamente intrappolata nei liposomi, causando una bassa efficienza di incapsulamento.

Per i motivi elencati sopra, l'obiettivo principale di questa tesi di Dottorato consiste nello sviluppo di una tecnologia assistita da anidride carbonica supercritica per la produzione di liposomi in maniera controllata, a livello micrometrico o nanometrico, a seconda del tipo di applicazione richiesta. La tecnica proposta è chiamata "Supercritical assisted Liposome formation (SuperLip)". In questo processo, le gocce d'acqua vengono prodotte attraverso uno spray; quasi simultaneamente, esse sono rapidamente coperte dai fosfolipidi.

Durante il primo anno di questo progetto di Dottorato, l'effetto di molti parametri di processo è stato studiato nell'impianto SuperLip. In particolare, è stato analizzato l'effetto della variazione della portata d'acqua alimentata al sistema, del diametro dell'iniettore per lo spray delle gocce d'acqua, della pressione del sistema e del *Gas to Liquid Ratio* del Liquido Espanso, ovverosia il rapporto fra le portate di alimentazione di anidride carbonica e di etanolo. Inoltre, la composizione dei liposomi è stata modificata, variando la concentrazione di fosfolipidi e aggiungendo lipidi di altra natura nel doppio strato fosfolipidico, come ad esempio il colesterolo e la fosfatidiletanolamina. In questo modo, è stato possibile produrre vescicole con un buon controllo delle dimensioni medie e dell'efficienza di incapsulamento (fino al 99 % sia per composti idrofili che lipofili). La diminuzione della portata d'acqua ha causato un incremento dell'efficienza di incapsulamento, specialmente nel caso di antibiotici; inoltre, l'uso di un iniettore di diametro maggiore ha portato alla produzione di gocce d'acqua più grandi e, quindi, di liposomi di dimensioni maggiori. La concentrazione di fosfolipidi non ha alterato le dimensioni medie dei liposomi e neanche l'efficienza di incapsulamento, ma ha causato un ritardo nel rilascio di farmaco, dovuto alla formazione di numerose lamelle di fosfolipidi attorno al nucleo acquoso. Il colesterolo è stato inoltre responsabile di un maggiore compattamento della struttura lipidica. Da studi precedenti, l'aumento della pressione ha causato la formazione di gocce d'acqua più piccole e quindi di liposomi di diametro inferiore. I meccanismi di produzione delle vescicole coinvolti nel sistema SuperLip sono inoltre stati studiati per verificare l'ipotesi proposta in questo processo.

Durante il secondo anno di studio, molte formulazioni a base di liposomi sono state prodotte, utilizzando i parametri operativi già ottimizzati durante il primo anno: antibiotici per somministrazione oculare; proteine e *markers* per applicazioni farmaceutiche; nella cosmesi, intrappolamento di composti antiossidanti di natura idrofila, lipofila e anfifilica. In particolare, un composto anfifilico (eugenolo) è stato intrappolato sia nel nucleo acquoso dei liposomi che nel doppio strato lipidico, per studiare la diversa riduzione del potere antiossidante, al variare del compartimento di incapsulamento nei liposomi. Sono stati inoltre incapsulati additivi alimentari per applicazioni nutraceutiche, con lo scopo di valorizzare i sottoprodotti derivanti da scarti agricoli, che normalmente vengono trasformati in biomassa per ricavarne energia. Un'altra applicazione studiata è quella relativa al trattamento delle superfici delle pelli animali per la deposizione di coloranti idrofili tramite liposomi.

Durante il terzo anno di questo progetto di Dottorato, sono stati realizzati degli studi antibatterici di liposomi caricati con un antibiotico (amoxicillina), messi a contatto con *Escherichia Coli*, dimostrando anche SuperLip può essere impiegato per la produzione di agenti anti-batterici. A conclusione del lavoro di

Dottorato, è stata proposta su SuperLip un'analisi economica. Il processo in esame ha un TRL (Technology Readiness Level) di 6/7, dal momento che è stato progettato in configurazione continua, con la possibilità di scalarlo dal livello di laboratorio fino a quello industriale. Il processo SuperLip ha la possibilità di produrre fino a 5 litri di sospensione di liposomi al giorno. L'idea alla base del processo è già stata validata attraverso lo sviluppo di prodotti e campioni per applicazioni e scopi differenti. Il potenziale di SuperLip è stato riconosciuto da clienti esterni, potenzialmente interessati alla produzione di liposomi *on demand*. Un Business Plan per la commercializzazione dei prodotti derivanti da SuperLip è stato proposto per verificare se fosse possibile produrre liposomi con un processo economicamente vantaggioso rispetto alle alternative presenti sul mercato. Un modello di Business B2B è stato proposto e una stima dei costi operativi e dei costi di investimento è stata realizzata su una prospettiva di 5 anni (2018-2022).