



*Ministero delle Imprese e del Made in Italy*  
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

# UIBM

<b>DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO</b>	<b>102022000021093</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>13/10/2022</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>13/04/2024</b>

Classifiche IPC

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
A	61	K	9	51

Titolo

Metodo per ottenere nanoparticelle lipidiche solide a partire da saponi naturali

## **Metodo per ottenere nanoparticelle lipidiche solide a partire da saponi naturali**

\* \* \* \* \*

### Campo tecnico

5           La presente invenzione è relativa ad un metodo per preparare nanoparticelle lipidiche solide, cosiddette “green”, a partire da saponi naturali, ottenuti per saponificazione di trigliceridi naturali, in forma di burri e grassi, aventi cioè una consistenza solida e semisolida a temperatura ambiente.

10

### Arte nota

          Le nanoparticelle lipidiche solide (SLN) sono ampiamente proposte nel campo dei prodotti *healthcare-related*, inclusi i farmaci, i cosmetici e gli integratori alimentari, per la veicolazione di principi attivi e sostanze  
15 funzionali, grazie alla loro elevata biocompatibilità e facilità di produzione su larga scala.

          In questo campo sono noti diversi metodi di preparazione (Battaglia L, Ugazio E, J Nanomat 2019, 2834941). Tuttavia, questi metodi presentano degli svantaggi. Ad esempio, il più comune, è il metodo di  
20 omogeneizzazione a caldo, che richiede l'utilizzo di temperature elevate e macchinari costosi, che sono associati alla formazione di notevoli forze di cavitazione. Questo può nuocere alla stabilità dei principi attivi caricati, ed essere scarsamente riproducibile su piccola scala, in laboratorio (Battaglia L, Gallarate M, Exp Opin Drug Del Formul 2012, 9(5):497-508).  
25 In questo contesto recentemente è stato ideato un metodo di preparazione alternativo, completamente *solvent-free*, che non necessita dell'utilizzo di macchinari, e consente di modulare la temperatura operativa. Esso permette di ottenere nanoparticelle costituite da acidi grassi a partire dai

loro sali alcalini (saponi di sintesi), a seguito di scambio protonico (PCT/IB2008/001463).

5 Le nanoparticelle lipidiche solide (SLN) degli acidi grassi (FA) sono quindi ottenute con una tecnica priva di solventi basata sulla precipitazione degli FA dalle loro micelle di sale sodico/potassico in presenza di tensioattivi polimerici non ionici: questa tecnica è chiamata "coacervazione" ed è molto usata per trattare matrici lipidiche contenenti singoli acidi grassi (FA) di sintesi o provenienti da processi di separazione e purificazione. Ad esempio sono impiegati acido miristico, palmitico,  
10 stearico, arachidico e behenico. A partire da questi acidi grassi singoli (puri o purificati) con la coacervazione si possono ottenere nanoparticelle di forma sferica con diametri medi compresi tra 250 e 500 nm che presentano una buona efficienza di incapsulamento di principi attivi, per preparare nanoparticelle per scopi di somministrazione di farmaci.

15 Tuttavia, oggi i principali *trend* di mercato, nonché le esigenze di ecosostenibilità, indirizzano verso i prodotti cosiddetti "green", basati sull'utilizzo di prodotti di origine naturale. Infatti, negli ultimi 20 anni si sono moltiplicati gli studi riguardanti l'utilizzo di lipidi naturali per la formulazione di nanoparticelle lipidiche solide, anche se, nonostante il numero rilevante  
20 di documenti brevettuali inerenti tali formulazioni, esse sono commercializzate principalmente come prodotti cosmetici, e non farmaceutici (Dobrev M, Stefanov S, Andonova V, Curr Pharm Des 2020;26(36):4524-4535). Il motivo di ciò risiede nel minore *time-to-market* dei cosmetici rispetto ad altri prodotti *healthcare-related*. Tuttavia,  
25 sebbene siano state già ottenute nanoparticelle lipidiche solide costituite da burri e grassi vegetali, il metodo con cui sono state formulate, la suddetta omogeneizzazione a caldo, non permette di conservare pienamente la stabilità e la bioattività dei costituenti della componente insaponificabile e dei lipidi insaturi, a causa delle temperature operative  
30 elevate (comprese tra 60° e 90°C).

A questo proposito, bisogna ricordare che i trigliceridi vegetali sono la materia prima utilizzata per la preparazione dei saponi naturali, un prodotto antico, utilizzato tradizionalmente nella detergenza.

5 In particolare, i burri e i grassi vegetali, di consistenza solida e semisolida a temperatura ambiente, contengono molti lipidi solidi, dai quali è possibile ricavare saponi, attraverso processi tradizionali di saponificazione con idrossidi alcalini (di sodio o di potassio). Tali saponi si presentano come una miscela di componenti, che varia a seconda del periodo balsamico e del luogo di origine della droga vegetale, da cui tali  
10 burri sono ricavati. Tali saponi naturali sono costituiti da sali alcalini di diversi acidi grassi, sia saturi (solidi) che insaturi (liquidi).

Questi ultimi includono sia gli acidi grassi monoinsaturi (come l'acido oleico), che si comportano come promotori di permeazione sulla pelle e sulle membrane biologiche (ad esempio mucosa nasale ed orale), sia gli  
15 acidi grassi poliinsaturi, caratterizzati da interessanti proprietà biologiche. Tra questi ultimi, gli acidi grassi omega-6 (es. acido linoleico) hanno proprietà benefiche per il sistema vascolare, il sistema immunitario e per lo sviluppo mentale e cognitivo, sulla pelle hanno azione antiacne e idratante. Inoltre, è noto che la compresenza di lipidi liquidi e solidi nelle  
20 nanoparticelle lipidiche solide è anche vantaggiosa per quanto riguarda la possibilità di implementare la quantità e la stabilità dei principi attivi, che possono venire incapsulati nelle nanoparticelle (Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Adv Drug Deliv Rev. 2002 Nov 1;54 Suppl 1:S131-55).

Il prodotto di saponificazione dei burri e grassi vegetali include anche  
25 il glicerolo, ad azione idratante sulla cute, e la componente cosiddetta insaponificabile, che arricchisce di funzionalità biologiche il sapone in sé. Esso è costituito principalmente da una parte estremamente lipofila, che può essere quantificata dopo estrazione con etere dal sapone stesso. Questa frazione contiene idrocarburi (es. squalene), ma anche fitosteroli,  
30 tocoferoli, carotenoidi, alcoli triterpenici, dotati di proprietà antiossidanti e

vasoprotettive (Akihisa T, Kojima N, Katoh N, Ichimura Y, Suzuki H, Fukatsu M, Maranz S, Masters ET. *J Oleo Sci.* 2010;59(7):351-60; Dhara R, Bhattacharyya DK, Ghosh M. *J Oleo Sci.* 2010;59(4):169-76).

5 Nel caso dei burri non raffinati, cioè non sottoposti a purificazione tramite estrazione con solventi organici, l'insaponificabile include anche componenti più idrofili, come i flavonoidi, dotati di variegata proprietà biologiche (Maranza S, Wiesman Z, Garti N. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51:6268-6273). È degno di nota il fatto che i singoli componenti presenti in tali miscele complesse naturali sono a volte difficilmente  
10 riproducibili tramite metodi sintetici, dal momento che richiedono processi complessi e costosi. Ad esempio, l'alfa-tocoferolo naturale, presente nella frazione insaponificabile dei burri, è il suo enantiomero RRR puro, il quale è associato ad un migliore potere antiossidante rispetto al racemo, che si ottiene per sintesi (Klaczko G, Anuszevska EL. *Acta Pol Pharm.* 2008  
15 Nov-Dec;65(6):715-21). Di contro, isolare l'enantiomero RRR dal racemo di sintesi richiederebbe un processo molto complesso e costoso, difficilmente riproducibile su larga scala.

In pratica, i saponi naturali, quelli cioè ottenuti da burri e grassi di origine totalmente vegetale, a differenza dei saponi di sintesi, si  
20 presentano come una miscela complessa e variabile di composti, dalla proprietà biologiche innovative e tra di loro sinergiche, che potrebbero essere trasferite alle nanoparticelle ottenute dai medesimi a seguito di scambio protonico.

Tuttavia, formulare nanoparticelle lipidiche solide a partire da saponi  
25 naturali è molto più difficile rispetto a ottenerle da saponi di sintesi, a causa della complessa composizione dei primi, la quale può risentire anche del periodo balsamico di raccolta della droga vegetale, da cui viene ricavato il burro. Infatti, il processo di scambio protonico deve essere ottimizzato a seconda degli acidi grassi presenti (Battaglia L, Gallarate M, Cavalli R,  
30 Trotta M. *J Microencapsul* 2010; 27(1): 78–85).

Senza contare che sarebbe estremamente complicato e costoso formulare le nanoparticelle lipidiche solide a partire da tutti i singoli componenti presenti nella miscela complessa del sapone naturale, utilizzando i corrispondenti composti di sintesi.

5 In più, qualora si riuscisse a mettere a punto il processo di preparazione, la tecnica di coacervazione permetterebbe di lavorare a temperature intermedie (comprese tra 40° e 60° C), più idonee ad evitare fenomeni di degradazione e isomerizzazione dei componenti della frazione insaponificabile.

10 Infine, rispetto al metodo noto dell'omogeneizzazione a caldo dei trigliceridi naturali (Dobrev M, Stefanov S, Andonova V, Curr Pharm Des 2020;26(36):4524-4535), le nanoparticelle ottenute dai saponi naturali per scambio protonico sarebbero costituite non più da trigliceridi, ma da acidi grassi liberi, tra i quali quelli mono- e poliinsaturi, eserciterebbero le loro  
15 specifiche funzioni biologiche in maniera più efficiente rispetto a quando sono in forma esterificata, come trigliceridi.

In questo contesto, si può notare come, recentemente, nel mercato cosmetico, c'è una tendenza notevole a valorizzare prodotti *green*, che stanno gradualmente occupando una fetta sempre più larga di mercato.  
20 Sebbene a livello legislativo non esista una definizione univoca di cosmetico naturale, la normativa ISO 16128 adotta criteri quantitativi per indicare il contenuto in componenti naturali o biologici di qualsiasi prodotto cosmetico e il grado di naturalità dei suoi ingredienti. La norma, tuttavia, non entra nel contesto della classificazione degli ingredienti (accettabili o  
25 meno per un prodotto naturale), non adottando il concetto di valori minimi di soglia. In pratica, la ISO 16128 non definisce nello specifico quali ingredienti siano ammessi nei cosmetici naturali ed i loro contenuti minimi nel prodotto finito. Nonostante questo molte aziende produttrici di cosmetici naturali utilizzano *claims* (quali "natural", "eco", "bio", "green" o  
30 "organic") grazie ai numerosi enti certificatori (come Icea, Ecocert, CCPB,

Demeter), che utilizzano standard europei (come Cosmos e Natrue) di verifica e controllo dell'ingredientistica e di altri aspetti legati alla produzione dei cosmetici naturali, sulla base di specifici disciplinari (Bozza A, Campi C, Garelli S, Ugazio E, Battaglia L. Sustainable Chemistry and Pharmacy *in press*).

Pertanto, esiste l'esigenza di avere a disposizione nanoparticelle lipidiche solide ottenibili a partire da saponi naturali, a loro volta ottenibili da burri e grassi di origine totalmente vegetale. I saponi naturali sono infatti un ingrediente cosmetico con un elevato grado di naturalità in base alla norma ISO 16128, e le nanoparticelle da essi ottenute potrebbero essere certificate come naturali in ambito cosmetico, in base ai disciplinari esistenti.

Se non specificatamente escluso nella descrizione di dettaglio che segue, quanto descritto nel presente capitolo è da considerarsi come parte integrante della descrizione di dettaglio.

### Sommario dell'Invenzione

La presente invenzione risolve le problematiche dell'arte nota ed ha lo scopo di ottenere micro e nanoparticelle lipidiche solide a partire da saponi naturali, a loro volta ottenibili da burri e grassi di origine totalmente vegetale.

Altro scopo dell'invenzione è quello di mettere a disposizione formulazioni cosmetiche (tutte derivanti da prodotti naturali conformi alla norma ISO 16128), e farmaceutiche e da utilizzare anche come integratori alimentari in mammiferi (specialmente in soggetti umani).

In particolare l'invenzione si riferisce a composizioni per uso nel trattamento delle affezioni che traggono giovamento dall'assunzione di composti biologicamente attivi.

L'invenzione è anche relativa al trattamento di patologie cerebrovascolari, dismetaboliche e cutanee

Ulteriori scopi, forme di realizzazione e vantaggi della presente invenzione sono esposti nel seguito della descrizione dell'invenzione e nelle rivendicazioni allegate.

#### Breve descrizione delle figure

5           **Figura 1.** microscopia elettronica delle nanoparticelle lipidiche solide "green" FE-SEM: (a) SLN Karité; (b) SLN Mango; TEM: (c) SLN Karité (d) SLN Mango.

**Figura 2.** cromatogrammi GC-MS di esempio del pellet delle nanoparticelle lipidiche solide "green".

10           **Figura 3.** calorimetria a scansione differenziale delle matrici lipidiche.

**Figura 4.** calorimetria a scansione differenziale delle SLN.

#### Descrizione dettagliata dell'invenzione

15           Nell'ambito della presente invenzione con la dicitura "sapone naturale" o "sapone vegetale" si intende il prodotto ottenuto a seguito di saponificazione tradizionale, utilizzando idrossido di sodio, oppure idrossido di potassio, e lavorando a caldo oppure a freddo, le due diciture essendo sinonimi.

20           Nell'ambito della presente invenzione con la dicitura "grasso vegetale" o "burro vegetale" si intende il prodotto, costituito principalmente da trigliceridi, ottenuto da una droga vegetale, tramite utilizzo di mezzi meccanici, le due diciture essendo sinonimi.

25           Nell'ambito della presente invenzione con la dicitura "materiale insaponificabile" o semplicemente "insaponificabile" si intende quella parte del "grasso vegetale" o "burro vegetale", che, a seguito di saponificazione, non viene trasformata in glicerolo e sali alcalini di acidi grassi liberi.

Nell'ambito della presente invenzione con la dicitura "burri e grassi solidi a temperatura ambiente" si intendono quei burri e grassi vegetali che presentano un range di temperatura di fusione, compreso tra 40 e 60° C.

5            Nell'ambito della presente invenzione la dicitura "biocompatibile" è nota all'esperto del ramo.

          Il Krafft point è definito come la temperatura al di sopra della quale una dispersione di tensioattivo e acqua si trasforma in una soluzione limpida. Nella presente invenzione il Krafft point identifica la temperatura  
10            alla quale la miscela dei sali alcalini di acidi grassi ottenuta dal sapone naturale diventa limpida in acqua, ragionevolmente compreso tra 40° e 60° C, preferibilmente tra 45° e 55°C.

          Le principali difficoltà incontrate nel mettere a punto il processo dell'invenzione sono derivate dal fatto che il materiale di partenza non era  
15            costituito da acidi grassi singolarmente puri solidi. Infatti i materiali di partenza naturali sono miscele di acidi grassi solidi e liquidi le cui quantità relative variano a seconda del burro/grasso di partenza, senza contare la presenza, già dal materiale vegetale di partenza, della glicerina e della  
20            componente insaponificabile (quella parte di lipidi/composti che non diventano sali alcalini di acidi grassi dopo saponificazione) che sono principi attivi a tutti gli effetti, che non vengono scartati dal metodo e che contribuiscono ad arricchire e funzionalizzare la matrice. Gli  
          insaponificabili contengono soprattutto antiossidanti, come polifenoli e tocoferoli con azione vasoprotettiva e antiossidante. Inoltre gli acidi oleico  
25            e linolenico (che sono i principali componenti oleosi liquidi) e altri composti lipofili liquidi, non vengono scartati in quanto anch'essi hanno un'attività biologica (l'acido linoleico-omega 6. Ha azione antiinfiammatoria e vasoprotettiva, l'acido oleico agisce come promotore della penetrazione  
          dei farmaci nelle membrane biologiche, promuovendo l'assorbimento  
30            sulla pelle e sulle mucose (nasale, intestinale)).

Tutto questo permette che le SLN ottenute a partire da prodotti naturali vengano qualificate come “cosmetici naturali” o “biologici” secondo la norma ISO 16128, tuttavia pone ostacoli notevoli alla loro preparazione, ostacoli che sono stati superati dall’invenzione individuando  
5 una condizione specifica dei grassi e burri naturali che, per essere processati per l’ottenimento di SLN, prevede necessariamente che essi abbiano un Krafft point compreso tra 40° e 60°C, in modo da preservare la stabilità delle componenti termolabili dell’insaponificabile e degli acidi grassi insaturi

10 Infatti, rispetto alla lavorazione dei prodotti di sintesi, quella dei prodotti naturali è molto più difficile, poiché essi sono delle miscele anche molto variabili fra loro, per le quali non è per nulla banale trovare le condizioni operative unificanti, idonee per ottenere il prodotto finale a partire da burri di diversa natura.

15 Scopo della presente invenzione è quindi la preparazione di micro e nanoparticelle lipidiche solide, costituite da miscele di acidi grassi, a seguito di scambio protonico con una soluzione acida in presenza di opportuni stabilizzanti, a partire dai saponi naturali, ottenuti per saponificazione di burri e grassi solidi a temperatura ambiente.

20 Per raggiungere questo obiettivo sono fondamentali le caratteristiche del trigliceride di partenza, che viene saponificato. Bisogna, infatti, che esso sia solido a temperatura ambiente, con un range di temperatura di fusione, compreso tra 40 e 60° C, come ad esempio accade per il burro di mango, di karitè, di cacao, di sal e di illipè, ricavati  
25 generalmente da droghe vegetali (semi, frutti) attraverso metodi meccanici. Lo stato solido del burro garantisce che il prodotto di saponificazione contenga una quantità rilevante di saponi saturi (sodio stearato, sodio palmitato), i quali, dopo acidificazione consentiranno di ottenere nanoparticelle allo stato solido. Questo non è però un requisito  
30 sufficiente per ottenere delle nanoparticelle lipidiche solide adeguate agli

usi proposti dalla presente invenzione. È infatti necessario che il prodotto di saponificazione sia solubile in acqua soltanto al di sopra di una certa temperatura, superiore a quella ambiente, definita Krafft point, alla quale deve avvenire lo scambio protonico tra il sapone e la soluzione acquosa di un acido (organico od inorganico), che viene utilizzata per far precipitare l'acido grasso in forma di nanoparticelle.

L'ulteriore requisito necessario per ottenere le micro e nanoparticelle lipidiche solide (SLN) secondo l'invenzione è che il Krafft point dei saponi ottenuti dai suddetti burri naturali sia compreso tra 40 e 60°C, preferibilmente tra 45° e 55°C.

Ad esempio, l'olio di cocco, benchè solido a temperatura ambiente, non è adatto in quanto composto principalmente da trigliceridi dell'acido laurico. Il sodio laurato, che si ottiene per saponificazione, sebbene sia saturo, è solubile in acqua a temperatura ambiente, e quindi non è idoneo per ottenere nanoparticelle a seguito di scambio protonico.

In generale, la composizione in acidi grassi di un sapone naturale è variabile, a seconda del burro o grasso di partenza utilizzato per la preparazione del sapone, nonché del periodo balsamico e dell'area di raccolta della droga di partenza. In generale, però, è stato sperimentalmente verificato che la percentuale degli acidi grassi saturi solidi deve essere compresa tra il 20% ed il 70% p/p del totale, la percentuale di acidi grassi monoinsaturi liquidi deve essere compresa tra il 20% e il 70% p/p del totale, e la percentuale di acidi grassi poliinsaturi liquidi deve essere compresa tra lo 0.5 e il 10% p/p.

Nel seguito, con il termine "soluzione acquosa micellare" si intende una soluzione acquosa contenente saponi in forma colloidale; con il termine "nanoparticelle" si intendono particelle con un diametro compreso tra 1 e 1000 nm; con il termine "microparticelle" si intendono particelle con un diametro compreso tra 1 µm e 1000 µm; con il termine "biocompatibile" si intende una sostanza biologicamente compatibile con tessuti, organi e

funzioni dell'organismo e che non provoca risposte tossiche o immunologiche nello stesso; con il termine "soluzione acida" si intende una soluzione di un acido biocompatibile con un pH compreso tra 1 e 7.

5 Vantaggiosamente, il metodo secondo la presente invenzione permette la preparazione di nano e microparticelle lipidiche solide (SLN) mediante la miscelazione di una soluzione acida, in presenza di un agente stabilizzante anfifilico non ionico e biocompatibile, con una soluzione micellare di saponi naturali.

10 In pratica la produzione di SLN degli acidi grassi contenuti nella materia vegetale di partenza passa attraverso lo stadio di acidificazione di una soluzione micellare dei corrispondenti sali alcalini. Cioè, quando il pH si abbassa, gli acidi grassi precipitano per scambio di protoni tra la soluzione acida e il sapone (coacervazione).

15 Nello specifico il processo dell'invenzione comprende gli stadi fondamentali seguenti:

- (i) Preparare un'aliquota di una pasta di sapone a partire da grassi e burri vegetali mantenendo nella pasta la frazione di glicerolo e di insaponificabili formatasi durante la reazione saponificazione;
- 20 (ii) Far stagionare la pasta di sapone mantenendola in ambiente ad umidità e temperatura controllate, tipicamente umidità pari al 35% e temperatura pari a 23°C per un tempo minimo di 21 giorni, in modo da eliminare l'acqua residua
- (iii) Frantumare il sapone e preparare una soluzione micellare aggiungendo il sapone frantumato ad un'aliquota di acqua alla  
25 temperatura di 40-60°C, fino ad ottenere una soluzione limpida; tipicamente le quantità di sapone, che dipendono dalla natura dei prodotti di partenza possono essere di circa 10-50 mg/mL

(iv) Aggiungere alla soluzione micellare così ottenuta un'aliquota di agente stabilizzante, e successivamente la soluzione acida (pH 1-7). Preferibilmente l'aggiunta viene fatta lentamente in modo da favorire la precipitazione delle particelle in forma di nanoparticelle lipidiche solide (SLN). Preferibilmente, nel caso dei saponi ottenuti per saponificazione a freddo, poco prima dell'aggiunta, l'agente stabilizzante viene miscelato con la soluzione acida e, sotto continua agitazione, si addiziona goccia a goccia la miscela ottenuta alla soluzione micellare, in modo da indurre la precipitazione delle nanoparticelle lipidiche. Nel caso dei saponi ottenuti per saponificazione a caldo, l'agente stabilizzante viene addizionato alla soluzione micellare e le nanoparticelle vengono precipitate dalla miscela ottenuta, aggiungendo successivamente la soluzione acida. Anche in questo stadio, le quantità dipendono dalla natura del sapone in trattamento.

(v) La sospensione di nanoparticelle viene poi raffreddata in ghiaccio. Le SLN ottenute sono pronte all'utilizzo come tali, senza necessità di purificazione

I grassi e burri vegetali sono ottenuti con metodi tradizionali di spremitura meccanica a partire da droghe vegetali, come la polpa e i semi, e con il processo dell'invenzione mantengono le proprietà fitocosmetiche e fitofarmaceutiche derivanti dai vegetali d'origine, ivi compresi il glicerolo (9-11% p/p) e il materiale insaponificabile.

Il sapone vegetale viene ottenuto con processi tradizionali scelti fra la saponificazione a caldo e a freddo a partire da burri e grassi vegetali.

I metodi di saponificazione tradizionale a caldo sono eseguibili a una temperatura massima inferiore a 100°C, tipicamente 90-98°C. I metodi di saponificazione tradizionale a freddo sono eseguibili a una temperatura massima inferiore a 50°C, tipicamente 30-40°C. In entrambi

i metodi (a caldo e a freddo) i grassi vegetali vengono inseriti a temperatura ambiente all'interno di un reattore e portati alla succitata temperatura ottenendone lo scioglimento. Viene quindi introdotto sotto continua agitazione l'agente alcalino (tipicamente idrossido di sodio o di potassio) in opportuna diluizione in modo da non provocare l'effetto di ammassamento del composto. I tempi di saponificazione sono variabili in funzione del metodo di saponificazione (caldo o freddo) ed in funzione delle quantità di grassi vegetali impiegati.

La concentrazione del sapone naturale nella soluzione micellare acquosa è compresa tra 0.1 e 30% p/p, preferibilmente tra 1 e 5%. L'agente stabilizzante, presente in concentrazione compresa tra 0.1 e 30%, preferibilmente tra 1 e 5%, è selezionato nel gruppo costituito da polivinil acetato parzialmente idrolizzato, copolimeri poliossietilene/poliossipropilene, poliacrilamidi, polivinilpirrolidone, copolimeri vinil alcool/metacrilato, derivati polisaccaridici non ionici e relative miscele.

La soluzione acida utilizzata nel presente metodo comprende almeno un acido selezionato nel gruppo costituito da acido cloridrico, acido nitrico, acido solforico, acido fosforico, sali di ammonio, acido acetico, acido lattico, acido citrico, acido glicolico, acido tartarico, acido maleico, acido piruvico, acido malico, acido succinico, aminoacidi, peptidi, polimeri comprendenti gruppi acidi, preferibilmente ad una concentrazione compresa tra 0.01 e 5 M.

La temperatura di miscelazione tra la soluzione micellare del sapone naturale e la soluzione acida (stadio iv) è compresa preferibilmente tra 40° e 60°C.

Vantaggiosamente il metodo della presente invenzione consente l'incorporazione o l'adsorbimento superficiale da parte delle micro e nanoparticelle SLN di un principio attivo ad uso terapeutico, diagnostico, cosmetico o alimentare. Preferibilmente il principio attivo è selezionato nel

gruppo costituito da antitumorali, antiossidanti, peptidi e proteine, immunosoppressori, antiangiogenici, diuretici, steroidi, oli essenziali. Tale principio attivo può essere disciolto direttamente nella soluzione acquosa micellare nello stadio (iii), come tale o pre-disciolto in un piccolo volume di solvente biocompatibile e miscibile con acqua, come ad esempio l'etanolo.

Alternativamente, il principio attivo può essere addizionato dopo la miscelazione della soluzione acquosa micellare con la soluzione acida nello stadio (iv), come tale o pre-disciolto in un piccolo volume di solvente biocompatibile e miscibile con acqua, come ad esempio l'etanolo.

In generale, le SLN ottenute per coacervazione dai saponi naturali presentano delle caratteristiche innovative rispetto a quelle ottenute dai saponi di sintesi. Le seconde, infatti, sono costituite da acidi grassi puri, i quali, pur essendo matrici biocompatibili, considerate GRAS (Generally Considered As Safe) dalla Federal Drug Administration (FDA) americana, sono dotate di un certo effetto pro-infiammatorio (Gallarate M, Serpe L, Foglietta F, Zara GP, Giordano S, Peira E, Chirio D, Battaglia L, Protein and Peptide Letters 2014; 21(11): 1157-62). Fa eccezione a questo comportamento l'acido beenico, il quale, però, a causa del suo Krafft point, deve essere lavorato ad una temperatura più elevata rispetto agli altri acidi grassi (>75°C). Questo si traduce in una leggera citotossicità nei saggi di vitalità cellulare, quando questi vengono protratti per almeno 72 ore. Vantaggiosamente, le SLN ottenute da saponi naturali, probabilmente a causa della loro composizione complessa, che va oltre gli acidi grassi puri, non mostrano alcun effetto citotossico, nelle stesse condizioni. Le SLN dell'invenzione possono essere impiegate in campo farmaceutico e cosmetico e possono essere usate come integratori alimentari.

Le SLN possono essere formulate come creme, gel, paste, sospensioni emulsioni, in combinazione con agenti farmaceuticamente e

cosmeticamente accettabili come adiuvanti, veicolanti, eccipienti e stabilizzanti in sé noti.

I veicolanti per forme topiche o in gel includono polisaccaridi come carbossimetilcellulosa o metilcellulosa, polivinilpirrolidone, poliacrilati, polimeri a blocchi di etilene-propilene, PEG e cere.

Per tutte le somministrazioni, vengono opportunamente utilizzati le forme convenzionali note. Tali forme includono, ad esempio, pastiglie, compresse, microcapsule, nano-capsule, cerotti.

Con particolare riferimento agli usi farmaceutici, le proprietà della frazione insaponificabile rendono le micro e nanoparticelle lipidiche solide, ottenute da saponi naturali, potenzialmente vantaggiose per il trattamento delle patologie cerebrovascolari, in particolare per gli angiomi cavernosi. A tale scopo, le micro e nanoparticelle possono essere caricate con farmaci attivi sui meccanismi eziopatogenetici e fattori di rischio di tali patologie, quali i farmaci antiangiogenici (bevacizumab), e gli inibitori di mTOR, che riattivano l'alterata autofagia (rapamicina).

Le micro e nanoparticelle lipidiche solide ottenute da saponi naturali sono vantaggiose per il trattamento dell'idrocefalo normoteso, patologia neurologica di origine cerebrovascolare. A tale scopo la secrezione di liquor può essere controllata caricando nelle nanoparticelle l'inibitore del co-trasportatore sodio-potassio-cloruro 2, mentre l'edema cerebrale caricando un farmaco cortisonico (desametasone).

Nel caso delle suddette patologie cerebrovascolari, le SLN possono essere vantaggiosamente somministrate per via intranasale, allo scopo di favorire la permeazione degli attivi caricati direttamente al sistema nervoso centrale, anche grazie alla presenza di acidi grassi monoinsaturi (oleico), che agiscono come promotori di permeazione a livello della mucosa nasale.

Inoltre tale azione delle SLN sulle mucose è particolarmente vantaggiosa per la veicolazione di insulina. Infatti, a causa del suo elevato peso molecolare essa è scarsamente assorbita dalla mucosa intestinale, cosa che rende necessaria, nei soggetti diabetici, la somministrazione sottocutanea quotidiana. Perciò, le SLN, agendo sulla mucosa intestinale, possono essere in grado di favorire l'assorbimento orale di insulina. Inoltre, le medesime possono alternativamente essere utilizzate come veicolo per la somministrazione intranasale del medesimo farmaco, in quanto possono favorirne l'assorbimento sistemico tramite la mucosa nasale.

Le micro e nanoparticelle lipidiche solide ottenute da saponi naturali sono quindi vantaggiose per la somministrazione orale di insulina, perché ne proteggono la degradazione da parte degli enzimi gastrointestinali, e contemporaneamente, ne favoriscono l'assorbimento, grazie all'azione degli acidi grassi monoinsaturi sulla mucosa intestinale.

Con particolare riferimento agli usi cosmetici, le nanoparticelle lipidiche solide ottenute da saponi naturali possono essere utilizzate vantaggiosamente nei cosmetici anti-age, grazie alle funzioni cosmetiche della frazione insaponificabile e degli acidi grassi poliinsaturi, che giovano alle pelli poco idratate e a tendenza acneica. Inoltre, gli acidi grassi monoinsaturi agiscono come promotori di permeazione, favorendo l'accumulo delle sostanze funzionali al derma profondo. A tale scopo le nanoparticelle possono essere ulteriormente caricate con antiossidanti (alfa-tocoferolo), che proteggono il derma dall'invecchiamento mediato dai radicali liberi.

Con riferimento ai campi sia farmaceutico e sia cosmetico, si possono preparare micro e nanoparticelle lipidiche solide cationiche a partire da saponi naturali. La carica positiva presente su tali micro e nanoparticelle può potenzialmente permettere la complessazione con

acidi nucleici (di carica opposta) e favorire il superamento delle membrane cellulari.

Gli esempi presenti sono forniti ad illustrazione dell'invenzione e non sono da considerare limitativi della relativa portata. Tutte le % devono  
5 intendersi come % in peso, a meno dove sia diversamente indicato.

*Esempio 1: nanoparticelle lipidiche solide ottenute da saponi naturali*

Ottenimento dei saponi naturali (mango, Karité) con due distinti  
metodi di saponificazione tradizionale non in continuo: saponificazione a  
caldo ( $T^{\circ}$  max raggiunta dalla pasta di sapone =  $98^{\circ}\text{C}$ ) e saponificazione  
10 a freddo ( $T^{\circ}$  max raggiunta dalla pasta di sapone =  $35^{\circ}\text{C}$ ). In entrambi i  
metodi i grassi vegetali vengono inseriti a temperatura ambiente all'interno  
del reattore e portati alla suddetta specifica temperatura ottenendone lo  
scioglimento. Viene quindi introdotto sotto continua agitazione l'agente  
alcalino (idrossido di sodio) in opportuna diluizione in modo da non  
15 provocare l'effetto di ammassamento del composto. I tempi di  
saponificazione sono variabili in funzione del metodo di saponificazione  
(caldo o freddo) ed in funzione delle quantità di grassi vegetali impiegati.  
Successivamente all'ottenimento della pasta di sapone naturale, alla  
quale non viene sottratta la frazione di glicerolo formatasi durante la  
20 reazione, si procede alla fase di cura e stagionatura del sapone che  
perdura dai 2 giorni per il metodo a caldo ai 21 giorni per il metodo a  
freddo (o lento). Durante tale periodo il sapone va mantenuto in ambiente  
ad umidità pari al 35% e temperatura pari a  $23^{\circ}\text{C}$ .

L'acqua distillata viene fatta scaldare su piastra a circa  $70^{\circ}\text{C}$ . Il  
25 sapone, finemente frantumato in precedenza, viene aggiunto poco alla  
volta nell'acqua calda fino a soluzione limpida ( $12\text{ mg/mL}$ , corrispondenti  
a circa l'1% di lipide). Si regola la temperatura a circa  $50^{\circ}\text{C}$ .  
Successivamente, nel caso dei saponi ottenuti per saponificazione a  
freddo, poco prima dell'aggiunta, si miscelano l'agente stabilizzante,  
30 costituito dal polivinil acetato idrolizzato all'80% PM 9000-10000 (PVA), di

cui si è preparata una soluzione al 10% (1 g in 10 ml di acqua distillata – 100 µL ogni 12 mg di sapone), e l'acido fosforico 1 M (50 µL ogni 12 mg di sapone). Poi, sotto continua agitazione, si aggiunge goccia a goccia la miscela ottenuta alla soluzione micellare, in modo da indurre la precipitazione delle nanoparticelle lipidiche. Nel caso dei saponi ottenuti per saponificazione a caldo, la soluzione al 10% di PVA viene addizionata alla soluzione micellare e le nanoparticelle vengono precipitate dalla miscela ottenuta, aggiungendo successivamente acido fosforico 1 M (50 µL ogni 12 mg di sapone). La concentrazione finale di PVA in sospensione è dell'1%. Quindi, la sospensione di nanoparticelle si fa raffreddare in ghiaccio. Le sospensioni ottenute sono state analizzate al Dynamic Light Scattering (90 Plus, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA), per la dimensione media e l'indice di polidispersione. I dati ottenuti sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1: dimensione media e polidispersione

	Saponificazione a freddo		Saponificazione a caldo	
	Dimensione media (nm)	Polidispersione	Dimensione media (nm)	Polidispersione
SLN Karité	290.6	0.239	151.4	0.169
SLN Mango	237.8	0.193	155.3	0.232

A titolo di esempio, sono mostrate alcune foto di campioni di nanoparticelle essiccate all'aria al Microscopio Elettronico a Trasmissione (High Resolution 300 kV, JEOL, Tokyo, Japan), dopo contrasto con tetrossido di osmio al 2%, e al Microscopio Elettronico a Scansione ad Emissione di Campo (S9000G FIB-SEM. Tescan, Brno, Czech Republic), dopo doratura (Figura 1).

Di seguito è mostrata la composizione in acidi grassi di alcune delle nanoparticelle lipidiche ottenute (Tabella 2). A tale scopo, le

nanoparticelle sono state centrifugate a 26.000 rpm (Allegra 64R centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), il pellet ottenuto essiccato sotto vuoto, disciolto in metanolo ed iniettato in GC-MS (6890 GC unit coupled to an Agilent 5975 MSD, Agilent, Little Falls, DE, USA). I relativi cromatogrammi sono mostrati in Figura 2. Si può notare come il metodo di saponificazione influisce sulla presenza di monogliceridi residui.

Tabella 2: composizione chimica della matrice lipidica delle nanoparticelle

	% Composizione della matrice lipidica			
	Saponificazione a freddo		Saponificazione a caldo	
	Pellet Karité	Pellet Mango	Pellet Karité	Pellet Mango
Gliceril palmitato	0.32 % (rsd%:26.9%)	0.28 % (rsd%:9.6%)	<0.25% (~0.12 %) (rsd%:34.2%)	<0.25% (~0.24 %) (rsd%:30.4%)
Gliceril oleato	5.24 % (rsd%:18.7%)	7.30 % (rsd%:12.8%)	1.59 % (rsd%:36.3%)	3.52 % (rsd%:22.8%)
Gliceril stearato	4.61 % (rsd%:17%)	6.48 % (rsd%:18.6%)	1.61 % (rsd%:37.3%)	3.48 % (rsd%:19.8%)
Acido palmitico	6.84 % (rsd%:10.8%)	3.31 % (rsd%:10.5%)	2.83 % (rsd%:33.2%)	3.84 % (rsd%:11.7%)
Acido linoleico	3.49 % (rsd%:18.3%)	3.94 % (rsd%:1.2%)	0.37 % (rsd%:39%)	2.54 % (rsd%:25.6%)
Acido oleico	35.99 % (rsd%:12.2%)	36.81 % (rsd%:8.3%)	30.84 % (rsd%:21%)	54.53 % (rsd%:11%)
Acido stearico	24.87 % (rsd%:11.4%)	25.68 % (rsd%:10.7%)	24.69 % (rsd%:27.3%)	26.98 % (rsd%:3.6%)
Acido arachidico	0.97 % (rsd%:8.1%)	0.91 % (rsd%:18.7%)	2.65 % (rsd%:9.4%)	0.84 % (rsd%:6.6%)
<b>% lipidi nel pellet</b>	<b>82.33</b>	<b>84.71</b>	<b>64.70</b>	<b>95.97</b>
<b>% lipidi solidi / lipidi totali</b>	<b>45.68</b>	<b>43.27</b>	<b>49.30</b>	<b>36.86</b>
<b>% monogliceridi / lipidi</b>	<b>12.35</b>	<b>16.59</b>	<b>5.13</b>	<b>7.54</b>

La frazione insaponificabile presente nei burri di Mango e di Karité è stata stabilita tramite la procedura standardizzata in cui la sostanza grassa in esame viene saponificata con potassio idrossido in soluzione idroalcolica. Dopo raffreddamento e diluizione con acqua, dalla soluzione dei saponi si estrae l'insaponificabile con etere etilico. L'estratto è quindi portato a secco e pesato. I risultati sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3: quantificazione della frazione insaponificabile

Grasso vegetale	% ins medio	% ins max
Burro Mango	1.2	1.4
Burro Karité	1.5	1.9

Il glicerolo sviluppato dalla saponificazione è invece stimato nel 9,89% del peso totale.

Lo stato solido delle nanoparticelle lipidiche è stato determinato attraverso analisi calorimetria differenziale (Perkin Elmer DSC 7, Waltham, MA, USA). A tale scopo, le nanoparticelle lipidiche sono state centrifugate a 26.000 rpm (Allegra 64R centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), il pellet ottenuto essiccato sotto vuoto, introdotto nella cella del calorimetro tramite navicelle convenzionali di alluminio e sottoposto a scansione nell'intervallo di temperatura che va da 30 °C a 80 °C con una velocità di 2 °C al minuto (Tabella 4, Figura 3).

Tabella 4: calorimetria a scansione differenziale (T fusione ed entalpia)

	T <sub>onset</sub>	T <sub>peak</sub>	Entalpia (J/g)
SLN Mango	54.06	59.61	21.29
Acidi grassi Mango	56.66	59.61	11.38
SLN Karité	44.72	53.81	17.28
Acidi grassi Karité	45.69	52.70	22.98
Acido palmitico	59.64	63.59	195.23
Acido stearico	68.06	69.17	188.61
Acido stearico (coacervazione)	51.80	54.71	165.43
Acido arachidico	70.71	71.83	202.94

Come si può notare l'acido stearico ottenuto per coacervazione (scambio protonico dal sapone) si trova nella forma cristallina B, che fonde a circa 55°C. Le miscele di acidi grassi derivanti dal sapone di mango e di karitè per coacervazione (scambio protonico) fondono rispettivamente a 46°C a 54°C. Inoltre, essi sono caratterizzati da una entalpia molto più bassa, che corrisponde a picchi di fusione più allargati (Figura 3). Ciò può essere dovuto sia alla presenza di acidi grassi liquidi (oleico, linoleico, etc.) nella miscela, sia al fatto che si tratta di una struttura più amorfa rispetto agli acidi grassi puri. Inoltre, vi è corrispondenza tra le temperature di fusione e le entalpie delle SLN rispetto alle materie prime (Figura 4). Questo indica che le SLN si trovano in forma solida, dal momento che la loro temperatura di fusione è superiore a quella ambiente, quindi non sono presenti dei "supercooled melts".

*Esempio 2: nanoparticelle lipidiche solide "green" caricate con farmaci attivi sulle patologie cerebrovascolari*

Le proprietà della frazione insaponificabile rendono le nanoparticelle lipidiche solide, ottenute da saponi naturali, potenzialmente vantaggiose per il trattamento delle patologie cerebrovascolari, in particolare per gli angiomi cavernosi. A tale scopo, le nanoparticelle possono essere caricate con farmaci attivi sui meccanismi eziopatogenetici e fattori di rischio di tali patologie, quali i farmaci antiangiogenici (bevacizumab), e gli inibitori di mTOR, che riattivano l'alterata autofagia (rapamicina).

Procedura operativa. Si fanno scaldare 603 µL di acqua distillata e 107 µL soluzione di sodio docusato (AOT) 4.5 mg/mL su piastra a circa 70 °C, quindi si aggiungono poco alla volta 12 mg di sapone (di Mango o di Karité) ottenuto nell'Esempio 1, in modo da ottenere una soluzione limpida prima dell'aggiunta di 200 µL di soluzione di PVA al 10%. La soluzione è stata portata a 50°C, dopodiché si aggiungono 40 µL di Avastin® (corrispondenti a 1 mg di Bevacizumab) e 0.5 mg di Rapamicina sciolti in 40 µL di etanolo (12.5 mg/mL). In questo modo si è ottenuto un

rapporto di 150:1 AOT/Bevacizumab. La precipitazione delle nanoparticelle si ottiene con l'aggiunta di 50  $\mu$ L di acido fosforico 1M. A precipitazione completa sono state fatte raffreddare in bagno di acqua. In tal modo sono state ottenute nanoparticelle all'1%, con PVA9000 2%,  
5 Bevacizumab 1 mg/mL Rapamicina 0.5 mg/mL.

La quantificazione dei farmaci caricati è stata fatta come segue. La recovery è stimata come rapporto tra il titolo rispetto al peso di farmaco effettivamente utilizzato per la preparazione. Il titolo totale dei farmaci viene calcolato prelevando 50  $\mu$ L di sospensione di nanoparticelle ed  
10 estraendo prima con 100  $\mu$ L di acetonitrile, seguito da centrifugazione (14.000 rpm per 5 minuti), e poi, sul precipitato residuo, con 100  $\mu$ L di acido acetico e 50  $\mu$ L di acqua distillata, seguito di centrifugazione (14.000 rpm per 5 minuti). L'efficienza di inglobamento (EE%) è stata calcolata, dopo ultracentrifugazione della sospensione di nanoparticelle a 26.000  
15 rpm per 15 minuti (Allegra 64R centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), come il rapporto tra il farmaco inglobato, ritrovato nel pellet, e la quantità di farmaco totale, ritrovato nel surnatante e nel pellet. In breve, 100  $\mu$ L di sospensione di nanoparticelle sono stati diluiti con 100  $\mu$ L di acqua depurata e centrifugati a 26.000 rpm. Il farmaco non inglobato è  
20 stato quantificato nel surnatante. La quantificazione del farmaco inglobato è stata effettuata a seguito di estrazione dalla matrice lipidica: nel caso della Rapamicina, essa è stata estratta con 200  $\mu$ L di acetonitrile, seguita da precipitazione del lipide con 100  $\mu$ L di acqua (centrifugazione a 14.000 rpm per 5 minuti). Nel caso del Bevacizumab, esso è stato estratto con  
25 200  $\mu$ L di acido acetico, a cui è seguita precipitazione del lipide con 100  $\mu$ L di acqua (centrifugazione a 14.000 rpm per 5 minuti).

L'analisi dei composti dopo estrazione è stata realizzata con HPLC a fase inversa tramite eluizione a gradiente (tabella 5). È stata impiegata una colonna C8 a pori larghi per proteine (Tecnokroma Tracer Excel  
30 25x0.4 cm); la velocità del flusso della fase mobile è stato impostato a 1

mL/min. È stato usato un rivelatore a serie di fotodiodi (PDA) per rilevare gli analiti alle lunghezze d'onda di 220 nm per il Bevacizumab e 278 nm per la Rapamicina. Il gradiente è stato realizzato tra l'eluente A (TFA 0.1%) e l'eluente B (70% isopropanolo, 20% acetonitrile, 10% acqua, 0.1% TFA).

Tabella 5: Gradiente HPLC per analisi bevacizumab-rapamicina

Tempo (min)	TFA 0.1%	79% isopropanolo, 20% acetonitrile, 10% acqua, 0.1% TFA
0	90	10
15	40	60
20	40	60
21	90	0
26	90	0

Il tempo di ritenzione del bevacizumab è di 10.0 minuti, quello della rapamicina è di 16.4 minuti.

Tabella 6: caratterizzazione nanoparticelle lipidiche solide "green" caricate con farmaci attivi sulle patologie cerebrovascolari

	Dimensione media (nm)	Polidispersione	EE%	Recovery%
SLN Karité	356.0	0.185	Rapamicina 74	Rapamicina 71
			Bevacizumab 68	Bevacizumab 95
SLN Mango	341.6	0.134	Rapamicina 58	Rapamicina 127
			Bevacizumab 54	Bevacizumab 107

Esempio 3: nanoparticelle lipidiche solide "green" caricate con farmaci attivi su idrocefalo

Le proprietà di cui all'esempio 2 rendono nanoparticelle lipidiche solide ottenute da saponi naturali potenzialmente vantaggiose per l'idrocefalo normoteso, patologia neurologica di origine cerebrovascolare. A tale scopo la secrezione di liquor può essere controllata caricando nelle nanoparticelle l'inibitore del co-trasportatore sodio-potassio-cloruro 2, mentre l'edema cerebrale caricando un farmaco cortisonico (desametasone).

Procedura operativa. Si fanno scaldare 1.7 mL di acqua distillata su piastra a circa 70 °C, quindi si aggiungono poco alla volta 24 mg di sapone (di Mango o di Karité), in modo da ottenere una soluzione limpida. La soluzione è stata portata a 50 °C, dopodiché è stata aggiunta la miscela di farmaci: vengono pesati 1 mg di desametasone e 2 mg di bumetanide, che vengono sciolti in 80 µL di etanolo. Questa soluzione viene aggiunta alla soluzione micellare di sapone. La precipitazione delle nanoparticelle è stata ottenuta addizionando goccia a goccia 100 µL di acido lattico 1 M in miscela con 200 µL di soluzione al 10% di PVA. Dopodiché la sospensione è stata fatta raffreddare in bagno di ghiaccio. In questo modo si ottengono nanoparticelle all'1%, con PVA 1%, 0.5 mg/mL di desametasone e 1 mg/mL di bumetanide.

La quantificazione dei farmaci caricati è stata fatta come segue. La recovery è stimata come rapporto tra il titolo rispetto al peso di farmaco effettivamente utilizzato per la preparazione. 500 µL di sospensione di nanoparticelle vengono diluiti in 1 mL di metanolo poi centrifugati a 14000 rpm per 5 minuti. L'efficienza di inglobamento (EE%) è stata calcolata, dopo ultracentrifugazione della sospensione di nanoparticelle a 26.000 rpm per 15 minuti (Allegra 64R centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), come il rapporto tra il farmaco inglobato, ritrovato nel pellet, e la quantità di farmaco totale, ritrovato nel surnatante e nel pellet. In breve, 500 µL di SLN sono state diluite con 500 µL di acqua e centrifugati a 26.000 rpm per 15 minuti. Il pellet è stato sciolto in 1 mL di metanolo, a

cui si sono stati aggiunti 500  $\mu$ L di acqua distillata per precipitare il lipide, segue centrifugazione a 14.000 per 5 minuti.

L'analisi dei composti dopo estrazione è stata realizzata tramite HPLC a fase inversa. Per l'analisi HPLC si prepara un tampone fosfato 0.05 M a pH=5.8. Tale tampone verrà poi utilizzato per la preparazione degli eluenti. L'analisi dei composti è stata realizzata tramite HPLC a fase inversa tramite eluizione a gradiente (Tabella 6). È stata impiegata una colonna C18 (Tecnokroma Mediterranea Sea 15x0.46cm); la velocità del flusso della fase mobile è stato impostato a 1 mL/min. È stato usato un rivelatore per gli analiti alle lunghezze d'onda di 254 nm per la bumetanide e 241 nm per il desametasone. Il gradiente è stato realizzato tra l'eluente A (tampone fosfato 92%) e l'eluente B (35% tampone fosfato, 65% metanolo): per l'eluente A sono stati addizionati 97 mL di tampone fosfato 0,05 M con 8 mL di MeOH; per l'eluente B invece 35 mL di tampone fosfato 0.05 M con 65 mL di MeOH.

Tabella 7: gradiente HPLC per analisi bumetanide-desametasone

Tempo (min)	Tampone fosfato 92%, 8% metanolo	35% tampone fosfato, 65%metanolo
0	100	0
10	0	100
15	0	100
18	100	0
20	100	0

Il tempo di ritenzione della bumetanide è di 12.5 minuti, quello del desametasone è di 14.5 minuti.

Tabella 8: caratterizzazione nanoparticelle lipidiche solide “green”  
caricate con farmaci attivi su idrocefalo

	Dimensione media (nm)	Polidispersione	EE%	Recovery%
SLN Karité	201.1	0.108	Bumetanide: 80	Bumetanide: 67
			Desametasone: 16	Desametasone: 68
SLN Mango	228.5	0.226	Bumetanide: 67	Bumetanide: 72
			Desametasone: 13	Desametasone: 78

5 Esempio 4: nanoparticelle lipidiche solide “green” caricate con insulina

Le nanoparticelle lipidiche solide ottenute da saponi naturali sono potenzialmente vantaggiose per la somministrazione orale di insulina, perché potrebbero proteggerla dalla degradazione da parte degli enzimi gastrointestinali, e contemporaneamente, favorirne l'assorbimento, grazie  
10 all'azione degli acidi grassi monoinsaturi sulla mucosa intestinale.

Procedura operativa. Si pesano 2 mg di insulina glargine (analogo dell'insulina), che vengono scolti in 560  $\mu$ L di HCl 0.1 M. Quindi, si  
15 addizionano 800  $\mu$ L di sodio dodecilsolfato (SDS) 1 mg/mL e si osserva intorbidamento; si centrifuga a 10.000 rpm per 5 minuti. Il surnatante viene eliminato e il precipitato viene sciolto in 160  $\mu$ L di etanolo (12 mg/ml). Per preparare 2 mL di sospensione di nanoparticelle si fanno scaldare 1.6 mL di acqua distillata su piastra a circa 70 °C e addizionano poco alla volta 24 mg di sapone (Mango o Karité), fino ad avere una soluzione limpida. L'aggiunta di 100  $\mu$ L di soluzione al 10% di PVA è stata fatta alla soluzione  
20 micellare (0.5%). La soluzione è stata portata a 50 °C, dopodiché sono stati aggiunti 80  $\mu$ L di insulina glargine - SDS in etanolo, in modo tale da ottenere una concentrazione finale di 0.5 mg/mL. La precipitazione delle nanoparticelle è stata ottenuta addizionando goccia a goccia acido fosforico 1 M. A precipitazione completa le SLN sono state fatte

raffreddare in bagno di ghiaccio. In tal modo sono state ottenute nanoparticelle PVA allo 0.5% e insulina glargine 0.5 mg/mL.

La quantificazione dell'insulina glargine caricata è stata fatta come segue. La recovery è stimata come rapporto tra il titolo rispetto al peso di farmaco effettivamente utilizzato per la preparazione. Il titolo della  
5 sospensione viene determinato nel seguente modo: 50  $\mu$ L di sospensione di nanoparticelle vengono sciolti in 100  $\mu$ L di etanolo, poi si aggiungono 50  $\mu$ L di acqua distillata per precipitare i lipidi, che vengono centrifugati a 14.000 rpm per 5 minuti. L'efficienza di inglobamento (EE%) è stata  
10 calcolata dopo ultracentrifugazione della sospensione di nanoparticelle a 26.000 rpm per 15 minuti (Allegra 64R centrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA), e lavaggi, alternativamente con tampone fosfato pH=8.0 0.1 M (per solubilizzare la coppia insulina glargine-SDS non inglobata), e HCl 0.1 M (per solubilizzare l'insulina glargine non inglobata); essa è stata  
15 espressa come il rapporto tra il farmaco inglobato, ritrovato nel pellet, e la quantità di farmaco totale, ritrovato nel surnatante, nei lavaggi e nel pellet. Per determinare l'EE%, 500  $\mu$ L di nanoparticelle vengono diluiti con 500  $\mu$ L di acqua e centrifugati a 26.000 rpm per 15 minuti. Il pellet è lavato  
20 alternativamente con 500  $\mu$ L di HCl 0.1M o con 500  $\mu$ L di tampone fosfato a pH=8.0 0.1 M; poi si centrifuga a 14.000 rpm per 5 minuti. I pellet risultanti vengono sciolti in 300  $\mu$ L di etanolo, a cui si sono stati aggiunti 200  $\mu$ L di acqua distillata per precipitare il lipide, segue centrifugazione a 14.000 per 5 minuti.

L'analisi dei composti dopo estrazione è stata realizzata tramite  
25 HPLC a fase inversa. tramite eluizione a gradiente (Tabella 7). È stata impiegata una colonna C8 (Zorbax XDB per proteine); la velocità del flusso della fase mobile è stato impostato a 1 mL/min. È stato usato un rivelatore UV alla lunghezza d'onda di 220 nm.

Tabella 9: gradiente HPLC per analisi insulina glargine.

Tempo (min)	Acido trifluoroacetico (TFA) 0.1% in acqua	Acetonitrile
0	100	0
15	40	60
5	40	60
2	100	0
1	100	0

Il tempo di ritenzione dell'insulina glargine è 11.1 minuti.

Tabella 10: caratterizzazione nanoparticelle lipidiche solide "green" caricate con farmaci attivi su idrocefalo

5

	Dimensione media (nm)	Polidispersione	EE%	Recovery%
SLN Karité	456.1	0.106	pH=8 30	0.1M 87
			HCl 0.1M 53	

**Esempio 5: nanoparticelle lipidiche solide "green" marcate con 6-cumarina**

Il destino biologico delle nanoparticelle lipidiche solide ottenute da saponi naturali può essere seguito nei modelli cellulari, di organo isolato ed animali, marcando le nanoparticelle con il colorante lipofilo 6-cumarina, solidale con la matrice lipidica.

Procedura operativa. 8.5 mL di acqua distillata vengono fatti scaldare su piastra a circa 70°C. 120 mg di sapone (Mango o Karité), finemente frantumato in precedenza, vengono aggiunti poco alla volta nell'acqua calda fino a soluzione limpida. Si regola la temperatura a circa 50°C. Successivamente, 1 mL di soluzione al 10% di PVA viene addizionato alla soluzione micellare, e le nanoparticelle vengono precipitate dalla miscela ottenuta, aggiungendo successivamente 500 µL di acido fosforico 1 M. 0.5 mg di 6-cumarina, precedentemente disciolta in 100 µL di DMSO, vengono addizionati alla sospensione di nanoparticelle

20



sospensione viene raffreddata in bagno di ghiaccio. In tal modo si ottengono nanoparticelle al 4%, PVA 4%, alfa-tocoferolo 0.5-0.75%.

Tabella 12: caratterizzazione nanoparticelle lipidiche solide “green” con funzione di cosmetico anti-age

	Alfa-tocoferolo 0.5%		Alfa-tocoferolo 0.75%	
	Dimensione media (nm)	Polidispersione	Dimensione media (nm)	Polidispersione
SLN Mango	314.2	0.106	263.4	0.205

5

Esempio 7: nanoparticelle lipidiche solide “green” cationiche

Possono essere preparate nanoparticelle lipidiche solide cationiche a partire da saponi naturali. La carica positiva presente su tali nanoparticelle può potenzialmente permettere la complessazione con acidi nucleici (di carica opposta) e favorire il superamento delle membrane cellulari.

Procedura operativa. 6,55 mL di acqua distillata vengono fatti scaldare su piastra a circa 70 °C. 120 mg di sapone (Mango o Karité), finemente frantumato in precedenza, vengono aggiunti poco alla volta nell’acqua calda fino a soluzione limpida. Si regola la temperatura a circa 50°C. Successivamente, 1 mL di soluzione al 10% di PVA viene addizionato alla soluzione micellare. Quindi si disciolgono 32 mg di destrano dietilaminoetile (DEAE) in 1,5 mL di acqua e si addizionano alla soluzione micellare. La precipitazione delle nanoparticelle viene completata aggiungendo successivamente 450 µL di acido fosforico 1 M.

La carica positiva delle nanoparticelle ottenute viene misurata con il Potenziale Z (90 Plus, Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA).

Tabella 13: caratterizzazione nanoparticelle lipidiche solide “green”  
cationiche

	Dimensione media (nm)	Polidispersione	Potenziale Z	err. ST
SLN Karité	214.6	0.151	16.49	2.18
SLN Mango	282.8	0.137	7.87	1.4

5 Esempio 8: citotossicità delle SLN da saponi naturali e di sintesi

Sono state preparate, tramite tecnica di coacervazione, le SLN all'1% di lipide e stabilizzate dall'1% di PVA9000, ottenute rispettivamente da: sodio miristato, sodio palmitato, sodio stearato, sodio arachidato, sodio beenato puri (Battaglia L, Gallarate M, Cavalli R, Trotta M. J  
10 Microencapsul 2010; 27(1): 78–85); sapone di Karité, sapone di Mango (come da Esempio 1).

Tali formulazioni sono state incubate con colture cellulari (linea cellulare endoteliale HUVEC, ottenuta da cordoni ombelicali, secondo protocollo n° 263-07/NF (A.S.L. 2 REGIONE PIEMONTE)), per 72 ore,  
15 utilizzando 2 diverse diluizioni nel pozzetto di coltura (1:500 e 1:1000). Dopodichè le cellule sono state testate tramite il saggio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) per la vitalità cellulare (Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Acta Histochem. 2018; 120(3): 159-167).

20 Le SLN ottenute da saponi di sintesi mostrano un lieve effetto di inibizione della vitalità cellulare, che è dose dipendente. Le SLN di acido beenico mostrano un effetto meno marcato. Le SLN ottenute da saponi naturali di Mango e Karité non mostrano invece alcun effetto inibitorio (vitalità cellulare > 80% del controllo)

25 Sebbene i vari aspetti dell'invenzione siano stati illustrati sopra con riferimento ad esempi e forme di realizzazione preferite, si apprezzerà che

l'ambito dell'invenzione è definito non solo dalla descrizione precedente ma anche dalle varianti che risultano evidenti all'esperto del ramo,

### **Rivendicazioni**

1. Metodo per la preparazione di micro e nanoparticelle lipidiche solide comprendente la fase di miscelare una soluzione acida ad una soluzione acquosa micellare ottenuta disciogliendo in acqua un sapone naturale, in presenza di un agente stabilizzante anfifilico non ionico e biocompatibile.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto sapone naturale presenta un Krafft point compreso tra 40 e 60°C, preferibilmente tra 45 e 55°C ed è ottenuto da uno o più burri e grassi naturali sottoposti ad un processo di saponificazione scelto fra la saponificazione a caldo e la saponificazione a freddo, il sapone naturale essendo preferibilmente ottenuto da burri di mango, di karitè, di cacao, di sal, e di illipè.

3. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui la temperatura di miscelazione tra la soluzione micellare del sapone naturale e la soluzione acida è compresa tra 40° e 60°C.

4. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui la percentuale dei sali di acidi grassi saturi nel sapone naturale è compresa tra 20% e 70% in peso, la percentuale di acidi grassi monoinsaturi è compresa tra 20% e 70% in peso, la percentuale di acidi grassi poliinsaturi è compresa tra 0.5 e 10% in peso, la percentuale di glicerolo è compresa tra 9 e 11%, la percentuale di componenti insaponificabili è compresa tra 0.5% e 5% in peso.

5. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, in cui il sapone ottenuto dal processo di saponificazione è fatto stagionare in modo da eliminare l'acqua residua ed è frantumato e aggiunto ad un'aliquota di acqua alla temperatura di 40-60°C per ottenere la soluzione micellare.

6. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui la concentrazione del sapone naturale nella soluzione micellare acquosa è compreso tra 0.1 e 30% in peso, preferibilmente tra 1 e 5% in peso.

5 7. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui la soluzione acida è aggiunta alla soluzione micellare dopo l'aggiunta dell'agente stabilizzante, per favorire la precipitazione delle particelle in forma di sospensione di micro e nanoparticelle lipidiche solide.

10 8. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, in cui l'agente stabilizzante viene preventivamente miscelato con la soluzione acida e successivamente la miscela così preparata viene addizionata alla soluzione micellare per favorire la precipitazione delle particelle in forma di sospensione di micro e nanoparticelle lipidiche solide.

15 9. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 7-8, in cui la sospensione di micro e nanoparticelle lipidiche solide viene raffreddata in ghiaccio per favorire la precipitazione delle particelle.

20 10. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9, in cui l'agente stabilizzante, è selezionato nel gruppo costituito da polivinil acetato parzialmente idrolizzato, copolimeri poliossietilene-poliossipropilene, poliacrilamidi, polivinilpirrolidone, copolimeri vinil alcool-metacrilato, derivati polisaccaridici non ionici, e relative miscele, preferibilmente ad una concentrazione compresa tra 0.1 e 30% in peso, più preferibilmente tra 1 e 5% in peso.

25 11. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10, in cui la soluzione acida comprende almeno un acido selezionato nel gruppo costituito da acido cloridrico, acido nitrico, acido solforico, acido fosforico, sali di ammonio, acido acetico, acido lattico, acido citrico, acido glicolico, acido tartarico, acido maleico, acido piruvico, acido malico, acido succinico, aminoacidi, peptidi, polimeri comprendenti gruppi acidi,

preferibilmente con una concentrazione compresa tra 0.01 e 5 M, il pH della soluzione acida essendo compreso preferibilmente fra 1 e 7.

5 12. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 2-11, in cui detti burri e grassi di origine naturale sono solidi o semisolidi a temperatura ambiente, con una temperatura di fusione compresa tra 40 e 60°C.

13. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12, in cui la soluzione acquosa micellare comprende uno o più principi attivi ad uso terapeutico, diagnostico, cosmetico o alimentare.

10 14. Metodo secondo la rivendicazione 13, in cui il principio attivo è selezionato nel gruppo costituito da composti antitumorali, antiossidanti, peptidi e proteine, immunosoppressori, antiangiogenici, diuretici, steroidi, oli essenziali, acidi nucleici.

15 15. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13-14, in cui il principio attivo è aggiunto alla soluzione acquosa micellare prima della soluzione acida, oppure dopo la miscelazione della soluzione acquosa micellare con la soluzione acida oppure il principio attivo è adsorbito sul sapone naturale.

20 16. Micro e nanoparticelle lipidiche solide direttamente ottenibili con il processo secondo le rivendicazioni 1-15 che sono conformi alla norma ISO 16128.

17. Micro e nanoparticelle lipidiche solide secondo la rivendicazione precedente che non inducono riduzione della vitalità cellulare quando incubate con cellule endoteliali HUVEC.

25 18. Nanoparticelle secondo la rivendicazione precedente in cui la vitalità cellulare è analizzata mediante la misurazione dell'attività metabolica cellulare e in particolare mediante il saggio MTT.

19. Composizioni alimentari e/o nutraceutiche comprendenti le micro e nanoparticelle lipidiche solide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-18.

5 20. Prodotto cosmetico comprendente le micro e nanoparticelle lipidiche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-18 e agenti cosmeticamente accettabili.

21. Prodotto cosmetico secondo la rivendicazione precedente formulato come crema, gel, paste, sospensioni, microcapsule, cerotti, spray.

10 22. Prodotto cosmetico secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 20-21 comprendente ulteriormente agenti antiossidanti come l'alfa-tocoferolo e agenti che proteggono il derma dall'invecchiamento mediato dai radicali liberi.

15 23. Micro e nanoparticelle lipidiche solide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-18 e prodotto cosmetico secondo le rivendicazioni 20-22 per il trattamento delle pelli poco idratate e delle pelli a tendenza acneica e per il trattamento anti-age della pelle.

24. Composizioni comprendenti le micro e nanoparticelle lipidiche solide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-18.

20 25. Composizioni secondo la rivendicazione precedente comprendenti ulteriormente uno o più additivi farmaceuticamente accettabili scelti fra coadiuvanti, eccipienti e stabilizzanti, conservanti, veicolanti.

25 26. Composizioni secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 24-25 in forma di creme, gel, paste, sospensioni, emulsioni, microcapsule, cerotti, spray, compresse, capsule.

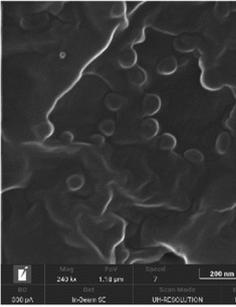
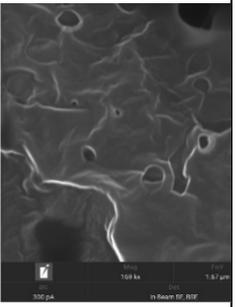
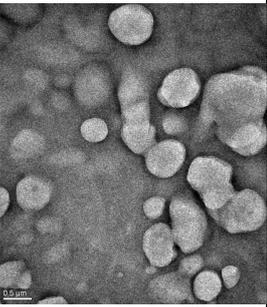
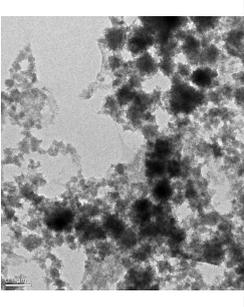
27. Composizioni secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 24-26 formulate per uso topico e mucosale, in particolare le mucose nasale e intestinale, per somministrazione orale, intranasale.

5 28. Composizioni secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 24-27 in cui le composizioni comprendono ulteriormente agenti terapeutici aggiuntivi come farmaci antiangiogenici, come ad esempio il bevacizumab, inibitori di mTOR, che riattivano l'alterata autofagia, come ad esempio la rapamicina, inibitori del co-trasportatore sodio-potassio-cloruro 2, farmaci cortisonici, come ad esempio il desametasone,  
10 antidiabetici come ad esempio insulina e glargine.

29. Micro e nanoparticelle lipidiche solide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-18 e composizioni secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 24-28 per uso medico nell'uomo e nell'animale.

15 30. Micro e nanoparticelle lipidiche solide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-18 e composizioni secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 24-29 per uso nel trattamento di patologie cerebrovascolari, dismetaboliche e cutanee, in particolare gli angiomi cavernosi, l'idrocefalo normoteso, l'iperglicemia e il diabete.

20 31. Micro e nanoparticelle lipidiche solide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 16-18 e composizioni secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 24-29 per uso nel trattamento dell'iperglicemia e del diabete per via orale.

FE-SEM		TEM	
(a) SLN Karité	(b) SLN Mango	(c) SLN Karité	(d) SLN Mango
			

**Figura 1**

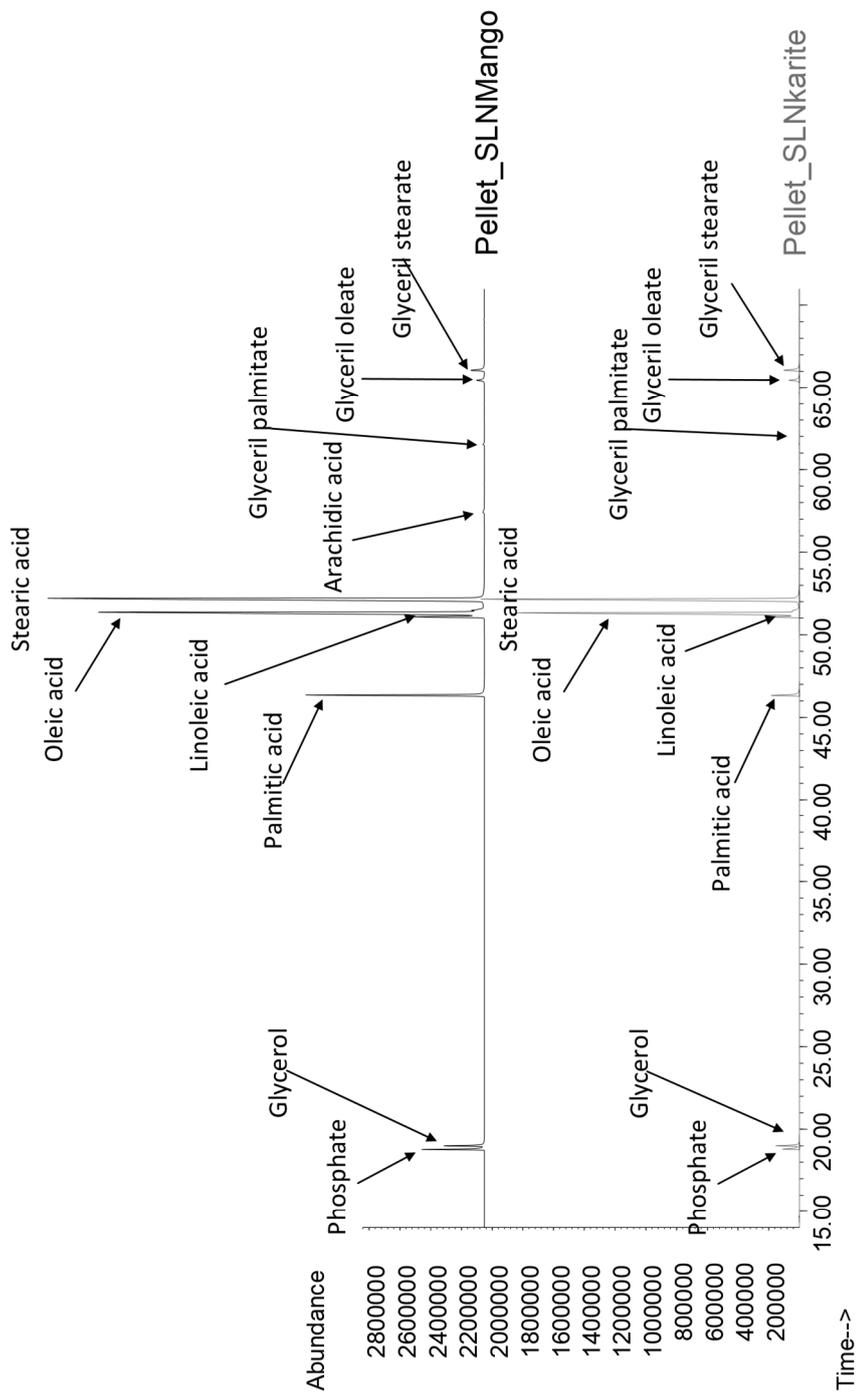


Figura 2

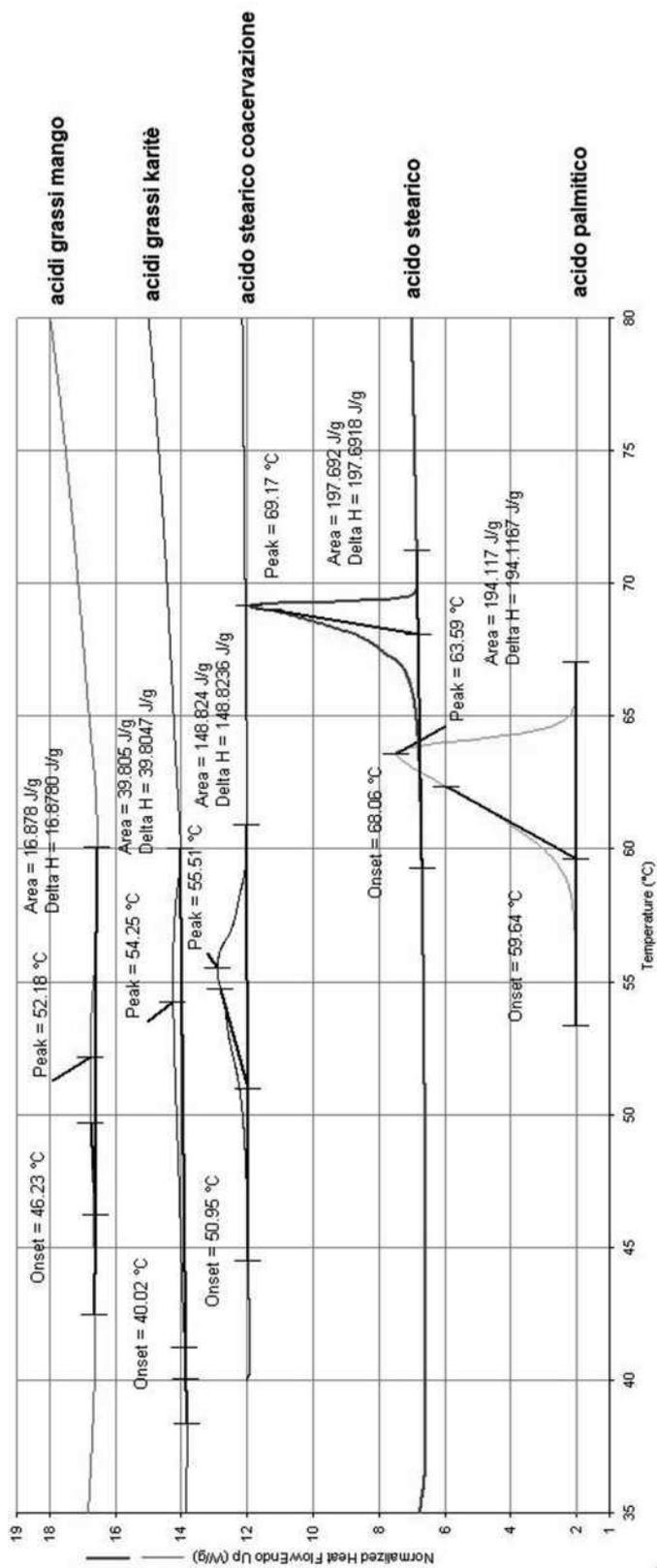


Figura 3

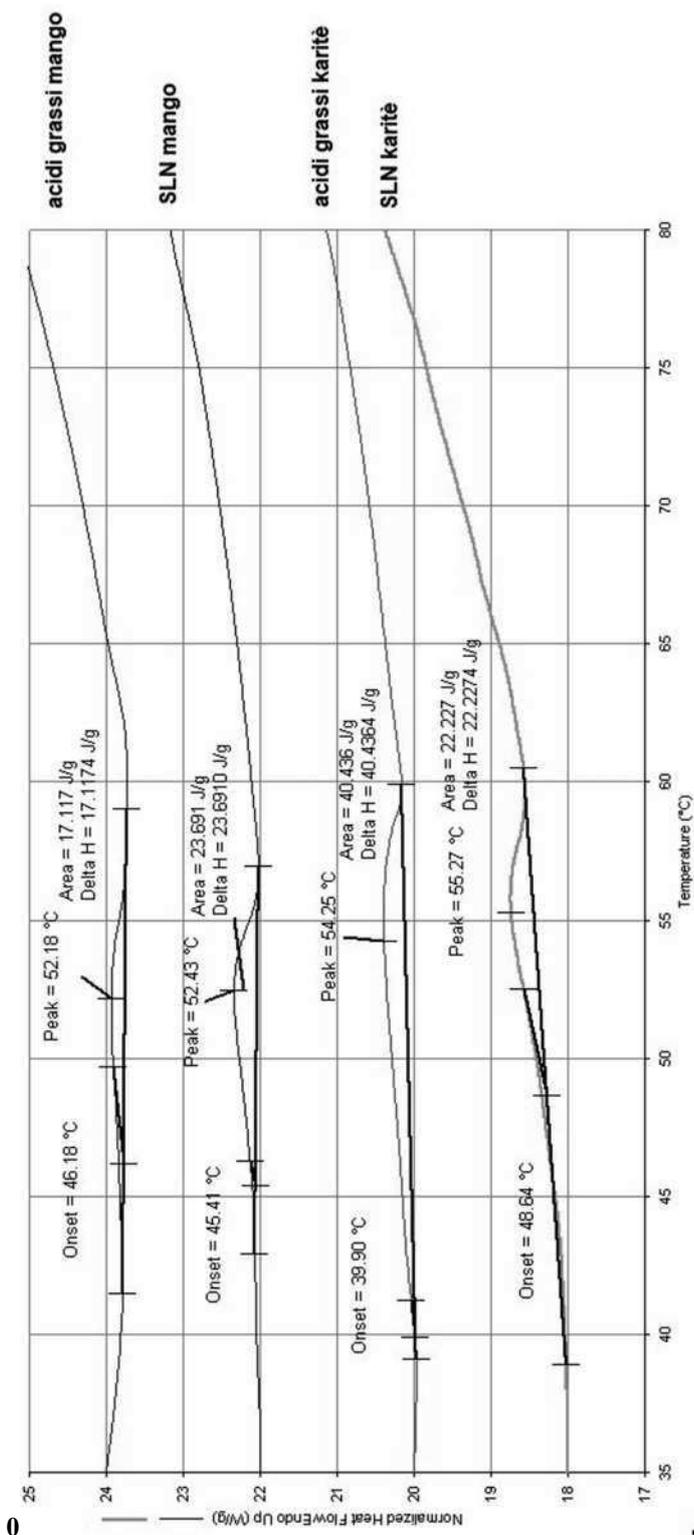


Figura 4