

An abstract painting featuring a white background with a large, dark, textured rectangular block on the left and a large, vibrant red rectangular block on the right. The white background is filled with various textures and colors, including grey, yellow, and brown, suggesting a complex, layered composition. The overall style is expressive and gestural.

**Co-polimeri random di PLA e PCL
per il rilascio di farmaci:
studio dei fenomeni di cessione**

Co-polimeri random di PLA e PCL per il rilascio di farmaci: studio dei fenomeni di cessione

Immacolata Bove

Immacolata Bove



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

**Co-polimeri random di PLA e PCL per il rilascio
di farmaci: studio di fenomeni di cessione**

Tesi in

Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Ing. Anna Angela Barba

Correlatrice:

Ing. Annalisa Dalmoro

Candidata:

Immacolata Bove

matricola 0612200010

Anno Accademico 2012/2013

*A mia madre, mio fratello, nonna Maria,
zia Angela, zio Egidio e in particolare a
mio padre, la mia carie ai denti...*

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman
La data prevista per la discussione della tesi è il 21 Giugno 2013
Fisciano, 14/06/2013

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	III
Indice delle tabelle	VII
Abstract	IX
Introduzione.....	1
1.1 Biopolimeri.....	2
1.1.1 Applicazioni biomedicali e farmaceutiche dei biopolimeri	5
1.2 Stato dell'arte	7
1.2.1 Rilascio di 5-Fluorouracil dal co-polimero random PCEL	9
1.2.2 Rilascio controllato di farmaci da polimeri bioerodibili	12
1.2.3 Effetto dell' α -tocoferolo sui film di PLA	17
1.3 Obiettivi del lavoro di tesi	21
Materiali e metodi	23
2.1 Materiali	24
2.1.1 Poliesteri	24
2.1.2 Co-polimeri ALI	25
2.1.3 α -Tocoferolo	27
2.1.4 Solventi e Reattivi	28
2.2 Apparecchiature	28
2.2.1 Agitatore	28

Pag. II	<i>Co-polimeri random di PLA e PCL: Fenomeni di cessione</i>	I. Bove
2.2.2	Frigotermostato	29
2.2.3	Stufa	29
2.2.4	Centrifuga	29
2.2.5	GPC	30
2.2.6	Spettrofotometro	30
2.2.7	Altre apparecchiature	31
2.3	Metodi	31
2.3.1	Film casting	31
2.3.2	Preparazione del tampone fosfato	32
2.3.3	Test di rilascio dell' α -TC dai co-polimeri	32
2.3.4	Metodo analitico per la misura dell' α -TC rilasciato	34
Risultati e discussione		43
3.1	Preparazione e caratterizzazione dei campioni	44
3.2	Caratterizzazione dei campioni post prelievo	49
3.2.1	Prelievo 1: 1 settimana	50
3.2.2	Prelievo 2: 3 settimane	52
3.2.3	Prelievo 3: 5 settimane	54
3.2.4	Prelievo 4: 8 settimane	56
3.2.5	Prelievo 5: 12 settimane	58
3.2.6	Prelievo 6: 28 settimane	60
3.2.7	Fenomeni erosivi: confronto tra i co-polimeri	62
3.2.8	Fenomeni di rilascio: confronto tra i co-polimeri	77
Conclusioni		79
4.1	Conclusioni	80
Bibliografia		83

Indice delle figure

Figura 1. Rappresentazione schematica del processo di rilascio del farmaco da matrice polimerica.....	6
Figura 2. Metodi di preparazione di film di poliesteri alifatici.....	8
Figura 3. Andamento della percentuale di acqua assorbita come funzione della degradazione nel tempo per i co-polimeri di PCEL caricati con 5-Fluorouracil (37°C, pH 7.4 PBS): PCEL-20 ([CL]/[LA]/[EO]=72.2/12.8/15.0) (■); PCEL-22 ([CL]/[LA]/[EO]=44.1/41.5/14.4) (●); PCEL-24 ([CL]/[LA]/[EO]=14.6/70.6/14.8) (▲).....	11
Figura 4. Andamento della percentuale di 5-Flu rilasciata dalle compresse di PCEL (37°C, pH 7.4 PBS): PCEL-20 ([CL]/[LA]/[EO]=72.2/12.8/15.0) (■); PCEL-22 ([CL]/[LA]/[EO]=44.1/41.5/14.4) (●); PCEL-24 ([CL]/[LA]/[EO]=14.6/70.6/14.8) (▲).....	12
Figura 5. Andamento della percentuale di acqua assorbita nel tempo di immersione per il PdLLGA con e senza farmaco.....	13
Figura 6. Andamento della percentuale di massa erosa nel tempo di immissione per i co-polimeri PdLLGA con e senza farmaco.....	14
Figura 7. Andamento della massa molecolare nel tempo di immissione per i co-polimeri PdLLGA con e senza farmaco.....	15
Figura 8. Andamento della massa molecolare nel tempo di immissione per i co-polimeri PILA con e senza farmaco.....	15
Figura 9. Andamento della percentuale di lidocaina e lidocaina cloridrato rilasciata dal PdLLGA.....	16
Figura 10. Andamento della percentuale di lidocaina e lidocaina cloridrato rilasciata dal PILA.....	17
Figura 11. Diffusione dell'α-tocoferolo dai film PLA in etanolo alla temperature di 43 (●), 33 (○), 23 (▼) e 13 (Δ) °C.....	18
Figura 12. Coefficiente di diffusione (D), K _{p,s} di α-tocoferolo dai film PLA di spessore di 54.61 μm in etanolo a 23, 33 e 43°C.....	19
Figura 13. Diffusione dell'α-tocoferolo dai film PLA in olio di cocco alla temperature di 43 (▼), 33 (○) e 23 (●) °C.....	20
Figura 14. Struttura del polilattide.....	24
Figura 15. Struttura del policaprolattone.....	25

Figura 16. Struttura α -Tocoferolo.....	27
Figura 17. Frigotermostato Intercontinental con all'interno l'agitatore Stuart.....	29
Figura 18. Spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer.....	30
Figura 19. Film caricati con α -tocoferolo.....	32
Figura 20. I 24 <i>vials</i> contenenti i campioni ALI in soluzione tampone.....	33
Figura 21. Calendario dei prelievi.....	33
Figura 22. Cuvetta sottoposta a radiazione. (I_o = intensità radiazione monocromatica; I = intensità radiazione in uscita dalla cuvetta; l =spessore cuvetta).....	35
Figura 23. Valutazione della costante di proporzionalità tra concentrazione ed assorbanza per il tocoferolo a pH 7.4.....	37
Figura 24. Spettro dell'assorbanza (A) di una soluzione di α -TC in funzione della lunghezza d'onda (λ).....	38
Figura 25. Spettro dell'assorbanza (A) di una soluzione di α -TC in funzione della lunghezza d'onda (λ).....	39
Figura 26. Funzione esponenziale da sottrarre come linea di base dello spettro.....	40
Figura 27. Sottrazione tra lo spettro dell'assorbanza e l'esponenziale.....	40
Figura 28. Curva ottenuta per sottrazione fittata dalla curva gaussiana.....	41
Figura 29. Valutazione della costante di proporzionalità tra concentrazione ed assorbanza per il tocoferolo a pH 7.4 con il metodo della sottrazione spettrale.....	42
Figura 30. Erosione in bulk di dissoluzione.....	62
Figura 31. Andamento della percentuale di acqua assorbita nel tempo per i quattro co-polimeri caricati con tocoferolo.....	64
Figura 32. Andamento della massa molecolare nel tempo per i quattro co-polimeri caricati con tocoferolo.....	65
Figura 33. Andamento della percentuale di massa erosa nel tempo per i quattro co-polimeri caricati con tocoferolo.....	66
Figura 34. Grafico semilogaritmico della massa molecolare nel tempo per i quattro co-polimeri, con relative linee di tendenza.....	67
Figura 35. Andamento della percentuale di acqua assorbita nel tempo per i campioni ALI 4 non caricati e caricati con tocoferolo.....	68
Figura 36. Andamento della massa molecolare nel tempo per i co-polimeri ALI 4 non caricati e caricati con tocoferolo.....	69
Figura 37. Andamento della percentuale di massa erosa nel tempo per i co-polimeri ALI 4 non caricati e caricati con tocoferolo.....	70
Figura 38. Andamento della percentuale di acqua assorbita nel tempo per i campioni ALI 6 non caricati e caricati con tocoferolo.....	71

Figura 39. Andamento della massa molecolare nel tempo per i co-polimeri ALI 6 non caricati e caricati con tocoferolo.....	71
Figura 40. Andamento della percentuale di massa erosa nel tempo per i co-polimeri ALI 6 non caricati e caricati con tocoferolo.....	72
Figura 41. Andamento della percentuale di acqua assorbita nel tempo per i campioni ALI 7 non caricati e caricati con tocoferolo.	73
Figura 42. Andamento della massa molecolare nel tempo per i co-polimeri ALI 7 non caricati e caricati con tocoferolo.....	73
Figura 43. Andamento della percentuale di massa erosa nel tempo per i co-polimeri ALI 7 non caricati e caricati con tocoferolo.....	74
Figura 44. Andamento della percentuale di acqua assorbita nel tempo per i campioni ALI 9 non caricati e caricati con tocoferolo.	75
Figura 45. Andamento della massa molecolare nel tempo per i co-polimeri ALI 9 non caricati e caricati con tocoferolo.....	76
Figura 46. Andamento della percentuale di massa erosa nel tempo per i co-polimeri ALI 9 non caricati e caricati con tocoferolo.....	76
Figura 47. Andamento della percentuale di tocoferolo rilasciato nel tempo per i quattro co-polimeri.	77
Figura 48. Zoom andamento della percentuale del tocoferolo rilasciato di tocoferolo rilasciato nel tempo per i quattro co-polimeri.	78

Indice delle tabelle

Tabella 1. Composizione co-polimeri PCEL.....	9
Tabella 2. Cambiamento della composizione e della massa dei co-polimeri PCEL-20, PCEL-22 e PCEL-24 nel tempo.....	10
Tabella 3. Risultati della co-polimerizzazione LA/CL.....	26
Tabella 4. Caratteristiche termiche dei co-polimeri (analisi al DSC).....	26
Tabella 5. Peso dei film prodotti.....	32
Tabella 6. Immagini e caratterizzazione dei campioni di ALI 4 caricato con α -tocoferolo al 20% in peso.....	45
Tabella 7. Immagini e caratterizzazione dei campioni di ALI 6 caricato con α -tocoferolo al 20% in peso.....	46
Tabella 8. Immagini e caratterizzazione dei campioni di ALI 7 caricato con α -tocoferolo al 20% in peso.....	47
Tabella 9. Immagini e caratterizzazione dei campioni di ALI 9 caricato con α -tocoferolo al 20% in peso.....	48
Tabella 10. Immagini e caratterizzazione dei campioni dopo il primo prelievo.....	51
Tabella 11. Quantità di TC residua valutata analizzando una parte di ogni campione dopo il primo prelievo.....	52
Tabella 12. Immagini e caratterizzazione dei campioni dopo il secondo prelievo.....	53
Tabella 13. Quantità di TC residua valutata analizzando una parte di ogni campione dopo il secondo prelievo.....	54
Tabella 14. Immagini e caratterizzazione dei campioni dopo il terzo prelievo.....	55
Tabella 15. Quantità di TC residua valutata analizzando una parte di ogni campione dopo il terzo prelievo.....	56
Tabella 16. Immagini e caratterizzazione dei campioni dopo il quarto prelievo.....	57
Tabella 17. Quantità di TC residua valutata analizzando una parte di ogni campione dopo il quarto prelievo.....	58
Tabella 18. Immagini e caratterizzazione dei campioni dopo il quinto prelievo.....	59
Tabella 19. Quantità di TC residua valutata analizzando una parte di ogni campione dopo il quinto prelievo.....	60
Tabella 20. Immagini e caratterizzazione dei campioni dopo il sesto prelievo.....	61

Tabella 21. Quantità di TC residua valutata analizzando un parte di ogni campione dopo il sesto prelievo..... 62

Tabella 22. Valori della costante di idrolisi per i quattro co-polimeri. 67

Abstract

This study is developed in framework of a research project aimed to investigate drug release from pharmaceutical system based on copolymers of lactide (LA) and caprolactone (CL). The random copolymers were synthesized using dedicated catalysts by researchers of the Department of Chemistry and Biology of the University of Salerno. In particular the goal of this thesis was to study the release of a lipophilic molecule (α -tocopherol) in physiological conditions from film of co-polymers with different percentages of LA and CL. The polymeric films, loaded with the lipophilic model molecule, were produced using the technique of *film casting*. In particular, 24 samples (6 for each kind of film) were subjected to characterization and in vitro degradation.

The four system were identified as ALI 4 + TC [LA / CL = 50/50], ALI 6 + TC [LA / CL = 10/90], ALI 7 + TC [LA / CL = 70/30], ALI 9 + TC [LA / CL = 90/10].

The timeline consists of six sample taking with a total duration of about 8 months. At each sampling, samples were wiped, photographed, weighed and subjected to thickness measure. Thus, samples were dried until they reach a constant weight in order to determine the weight loss and the percentage of absorbed water. Moreover, the determination of the molecular mass and the detection of the percentage of released active principle were done.

The results show that ALI 4 + TC samples were subjected to the largest erosion, as well as to the highest hydration, due to its amorphous nature, which led to a considerable decrease in molecular mass and therefore to a greater degradation of the polymer. On the contrary, ALI 6 + TC samples showed the greatest resistance to erosion and water absorption, due to the high degree of crystallinity.

ALI 7 + TC and ALI TC + 9, having a high LA content (respectively 70% and 90%) and a similar crystalline structure, showed a similar

behavior in both water uptake and erosion. However, ALI TC + 9 samples underwent a slight delay in hydrolysis, and therefore in removal of oligomers from the polymer, because of a larger thickness of samples and an initial higher molecular mass.

α -tocopherol release was negligible: it occurred as a result of co-polymers erosion phenomenal, which was anyway moderate. Loaded and unloaded co-polymers were compared, showing that the erosion was limited by the presence of the lipophilic molecule.

The presence of the α -tocopherol caused a slower reduction of molecular mass, which did not reach the critical value, neither for the polymer which underwent a larger erosion (ALI4 + TC).

The degradation of the co-polymers in dissolution bulk can be therefore described by three consecutive steps: hydration; hydrolysis, which breaks the chains until the attainment of a critical molecular mass with formation of oligomers, in this case not observed; and finally the erosion, caused by oligomers leaving polymeric films. Only during this last step drug release occurs.

Bibliografia

1. Tian H., Tang Z., Zhuang X., Chen X., Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application, *Progress in Polymer Science*, **37** 237—280 (2012)
2. Baszkin, *Blood compatible materials and their testing*, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, (1986)
3. Grassie N., Scott G., *Polymer degradation and stabilization*, Cambridge University Press, (1992)
4. Kaneda Y., Biorelated polymers and gels, controlled release and applications in biomedical engineering, *Academic Press, San Diego* (1998)
5. Dash T. K., Konkimalla V. B., Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review, *Journal of Controlled Release*, **158**, 15-33 (2012)
6. Wang S., Chen H., Cai Q., Bei J., Degradation and 5-Fluorouracil Release Behavior in vitro of Polycaprolactone/poly(ethylene oxide)/polylactide Tri-component Copolymer, *Polymers for Advanced Technologies* **12**, 253-258 (2008)
7. Frank A., Rath S. K., Venkatraman S.S., Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition; *Journal of Controlled Release* **102** 333-334 (2005)
8. Manzanarez-López F., Soto-Valdez H., Auras R., Peralta E., Release of α -Tocopherol from Poly(lactic acid) films, and its effect on the oxidative stability of soybean oil, *Journal of Food Engineering*, **104** 508-517 (2011)
9. Huang M., Li S., Hutmacher D., Coudane J., Vert M., Degradation Characteristics of Poly(-caprolactone)-Based Copolymers and Blends, *Journal of Applied Polymer Science* **102** 1681 – 1687 (2006)
10. Bramley P.M., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F.J., Manios Y., Roxoborough H.E., Schuch W., Sheehy P.J.A., Wagner K.H., Vitamin E, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80** (7) 913-938 (2000)
11. Robertiello V., Studio del rilascio di α -tocoferolo da geli biocompatibili per applicazioni medicali, *Tesi di Laurea in Chimica, Università degli Studi di Salerno* (2013)

12. Vecchione A., Sintesi e Caratterizzazione di Co-polimeri Statistici Lattide/Caprolattone, *Tesi di Laurea in Chimica, Università degli Studi di Salerno* (2012)
 13. Miller-Chou B. A., Koenig J. L., A review of polymer dissolution, *Progress in Polymer Science* **28** 1223-1270 (2003)
 14. Koontz J., Marcy J., O'Keefe S., Duncan S., Long T., Moffitt R., Polymer Processing and Characterization of LLDPE Films Loaded with α -Tocopherol, Quercetin, and Their Cyclodextrin Inclusion Complexes, *Journal of Applied Polymer Science* **117** 2299-2309 (2010)
 15. Tsuji H., Ikada Y., Blends of Aliphatic Polyesters. II. Hydrolysis of Solution-Cast Blends from Poly(L-lactide) and Poly(ϵ -caprolactone) in Phosphate-Buffered Solution, *Journal of Applied Polymer Science* **67** 405-415 (1998)
 16. Schiano P., Co-polimeri random di PLA e PCL per il rilascio dei farmaci: studio dei fenomeni erosivi, *Tesi di Laurea in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno* (2013)
-

RINGRAZIAMENTI

Il primo ringraziamento, com'è giusto che sia, va alla mia famiglia: a *mia madre Andreina* e a *mio padre Rino* per il sostegno totale, assoluto e incondizionato che mi hanno assicurato in ogni momento (siete i miei pilastri, mamma mezzo :p ! sono orgogliosa di avere voi come genitori!), a *mio fratello Matteo* per il suo essere rompiscatole (capisci, senza chiedere, quando sono giù e mi stai vicino, sempre, nel modo giusto), a *nonna Maria* per le sue preghiere, per i suoi manicaretti e per le sue ramanzine (semplicemente ti adoro!), a *zia Angela* per tutte le volte che mi sei stata vicino ma soprattutto per avermi insegnato ad amare la matematica e a *zio Egidio (Giò)* perché sei stato più un fratello maggiore che uno zio (ci sei sempre stato anche adesso che abiti a Km di distanza!).

Ringrazio il *Prof. Gaetano Lamberti* e la *Prof.ssa Anna Angela Barba*, miei relatori, per la disponibilità, la cortesia e la professionalità. In particolare, ringrazio il *Prof. Lamberti* per le sue buonissime caramelle, che si sono dimostrate necessarie per rendere più dolci le giornate del lavoro di scrittura.

Grazie grazie grazie alla mia correlatrice *Ing. Annalisa 'Lisi' Dalmoro*, per avermi 'sopportato' (sò di essere una logorroica rompiscatole :p !).

Grazie *Barbara (Barbi)* e *Sabrina (il Poeta)* per non avermi picchiata (:p) ogni volta che vi ho chiesto pareri su ogni singola frase che scrivevo nella tesi e grazie per avermi dato sicurezza sulle mie capacità. Grazie a voi, a *Lisi* e *Ross* le giornate in Lab sono state più spensierate...siete fantastiche bellezze!!!!!!

Paoli, abbiamo iniziato il lavoro di tesi insieme, scherzato, riso, hai ascoltato le mie stupidaggini, mi sono confidata con te, mi sei stata vicino spronandomi sempre e hai fatto molto altro...sei un'amica...grazie di tutto!!!

Ora, non so da dove cominciare per ringraziare le mie sorelle 'per scelta': Km e Km ci dividono ma tu (*Alessandra*) resti la mia compagna di banco: la ragazza che cinque minuti prima mi manda a quel paese e cinque minuti dopo scherza con me. Anche se tu vivessi a Timbuctù e io in Alaska, troveremmo un modo per essere presenti l'una per l'altra: tu ci sei semprissimo per me!

Deni (la mia doctor) sei un punto di riferimento, sei la prima a cui racconto le cose, l'amica con cui condivido tutto (anche le cose insignificanti). La tua famiglia mi ha accolto come una figlia (grazie Maria, grazie Silvestro) e io gli voglio bene come se lo fosse.

Paoletta, ti ho conosciuto il primo giorno di università ma è come se ti conoscessi da sempre. Tu e *Walter (papi)* siete delle persone semplicemente uniche (e come dice Walter: grandiiiiiii!).

Roby (la mia testarda e impulsiva preferita) grazie per i tuoi discorsi di incoraggiamento e per avere sempre un minuto per ascoltare i miei sproloqui interminabili.

Grazie a *zia Ela*: sei una madrina di cresima con i fiocchi, ho scelto davvero bene!

Grazie a *zia Anna*, a *zio Peppe*, a *Graziella* e a *Mary* per avermi trattato sempre come una di famiglia.

Un grazie enorme a *Gaetano* per aver sopportato i miei sbalzi d'umore continui e per essermi stato vicino in molte occasioni (io che parlo bene di te con gli altri e male di te quando sei presente, ti ringrazio nella mia tesi?).

Pasquale come vedi io mi sono ricordata di te, grazie di tutto, hai reso questi anni universitari più divertenti...Mi manchi!

Emanuela, ti ho conosciuto alla fermata del 27 e da allora siamo diventate amiche...grazie per aver sempre creduto in me!

Grazie *Raffi* per le lunghe chiacchierate in macchina, per i tuoi consigli e perchè mi porti a teatro a vedere le commedie di *Pasquale D'Avino* (aiuto regista).

Grazie alle mie vicine di casa (*Valeria* e *Marcella*) perchè ci sono sempre per inciuciare ma soprattutto grazie al nostro vicino che con la sua bellissima musica latina ci allietta le giornate (ahahahah).

Eli e *Antonio* (oggi *Arcibaldo* ☺) non riusciamo mai a vederci ma ci siete sempre quando ho bisogno, grazie.

Grazie a *Wanda*, *Enza*, *Martina*, *Pierfernandello*, *Luca*, *Serena*, *Alessia*, *Antonio*, *Ross*...siete tanti (chiedo scusa a chi ho dimenticato!)...non siete miei compagni di corso ma i miei amici, abbiamo condiviso esami, ansie, paure e soddisfazioni ma soprattutto ci siamo divertiti un sacco!!!

Grazie a *Valerio* per avermi aiutato ogni volta che avevo problemi con la tecnologia...Grazie a *te*, a *Giuseppe* e a *mio fratello* per avermi fatto 'compagnia' tutte le volte che rimanevo i weekend a casa!

Amici, vi ringrazierei uno per uno, ma per nominarvi tutti dovrei scrivere una nuova tesi, dimenticando sicuramente qualcuno, quindi: Ringrazio tutte le persone che stanno leggendo perchè vuol dire che siete venuti alla mia seduta di Laurea (dico a voi: *Mari (Yaya)*, *Raff Cica*, *Clara*, *Giovanna*, *Enzo*, *Ninfa*, *Biagio*, *Jon*, *Alvise*, *Nicola*, *Marco Leo*, ecc. ecc.)! Avete reso questo giorno ancora più indimenticabile. Vi voglio bene!!!!!!

Concludo questa carrellata di nomi nominando due persone che, purtroppo, non potranno leggere queste righe, ma che per me sono importanti e che voglio qui ricordare: mio nonno *Nicola* che resta il mio grande amore (mi manca il tuo fischiare e canticchiare la domenica mattina) e nonno *Matteo* che vive nei ricordi di mio padre (adoro ascoltare i racconti che riguardano me e te).

Alla prossima 'avventura', spero mi supporterete e supporterete ancora...

Vento in poppa!

