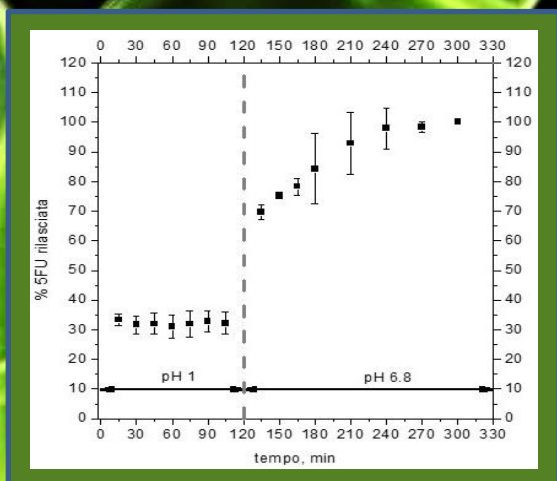
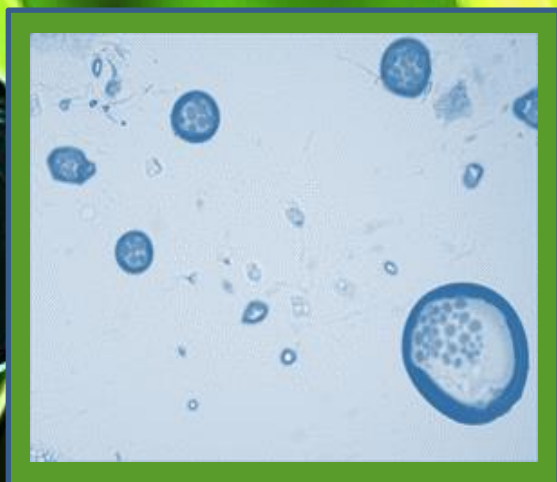


# Produzione di microvettori con struttura *shell-core* mediante atomizzazione assistita da ultrasuoni

Tesi di Laurea in Ingegneria Chimica



Debora  
Mastrogiovanni



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

**Facoltà di Ingegneria**  
**Dipartimento di Ingegneria Industriale**  
Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

**Produzione di microvettori con struttura *shell-core*  
mediante atomizzazione assistita da ultrasuoni**

Tesi in  
**Principi di Ingegneria Chimica**

Relatori:

Prof. Ing Gaetano Lamberti

Prof. Ing. Anna Angela Barba

Correlatore:

Ing. Annalisa Dalmoro

Candidata:

Debora Mastrogiovanni

matricola 0612200589

**Anno Accademico 2014/2015**



*Io sto con chi i sogni se li fa a mano.*

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman

La data prevista per la discussione della tesi è il 24 febbraio 2016  
Fisciano, 15 febbraio 2016

# Sommario

<b>Sommario .....</b>	<b>I</b>
<b>Indice delle figure .....</b>	<b>V</b>
<b>Indice delle tabelle .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>IX</b>
<b>Introduzione.....</b>	<b>1</b>
1.1 Importanza del rilascio controllato dei farmaci_____	2
1.2 Processi di microincapsulazione _____	5
1.2.1 Emulsione e evaporazione del solvente	6
1.2.2 Coacervazione	7
1.2.3 Polimerizzazione interfacciale	7
1.2.4 Deposizione elettrostatica	9
1.2.5 Spray-drying	9
1.2.6 Raffreddamento a spruzzo	9
1.2.7 Rivestimento in letto fluido	9
1.3 L'agente chemioterapico 5-Fluorouracile _____	10
1.3.1 Struttura chimica e proprietà chimico-fisiche del 5-Fluorouracile	10
1.3.2 Meccanismo d'azione e impieghi terapeutici del 5-FU	11
1.3.3 Incapsulazione di 5-FU	14
1.4 Obiettivi del lavoro di tesi _____	18
<b>Materiali e metodi .....</b>	<b>21</b>

---

2.1 Materiali _____	22
2.1.1 Alginato di sodio	22
2.1.2 Pluronic F127	26
2.1.3 5-Fluorouracil	28
2.1.4 Reticolanti	28
2.1.5 Altri materiali	30
2.2 Apparecchiature _____	31
2.2.1. Impianto di atomizzazione assistita da ultrasuoni	31
2.2.2. Apparato di separazione e lavaggio	32
2.2.3 Liofilizzatore	32
2.2.4. Apparato di dissoluzione	33
2.2.5 Spettrofotometro	34
2.2.6 Misuratore di umidità	34
2.2.7 Microscopio ottico	35
2.2.8 Centrifuga	36
2.2.9 DSC	36
2.3 Metodi _____	37
2.3.1 Preparazione soluzioni shell e core	37
2.3.2 Preparazione soluzioni reticolanti	38
2.3.3. Preparazione delle altre soluzioni	38
2.3.4 Produzione delle microparticelle shell-core	39
2.3.5 Caratterizzazione delle particelle	40
<b>Risultati e discussione .....</b>	<b>45</b>
3.1 Selezione preliminare dei parametri operativi _____	46
3.2 Sviluppo di un protocollo formulativo con uno <i>step</i> di complessazione _____	47
3.2.1 Concentrazioni e portate delle linee shell e core	47
3.2.2 Formulazione del bulk di reticolazione	49
3.2.3 Produzione e caratterizzazione di microparticelle shell-core	52
3.3 Sviluppo di un protocollo formulativo con due <i>step</i> di complessazione _____	57

---

Sommario e indici.	Pag. III
3.3.1 Formulazione del secondo bulk di reticolazione	57
3.3.2 Produzione e caratterizzazione di microparticelle shell-core rivestite	59
<b>Conclusioni.....</b>	<b>65</b>
4.1 Conclusioni _____	66
<b>Bibliografia.....</b>	<b>69</b>

---





## Indice delle figure

Figura 1. Rappresentazione dell'eliminazione del farmaco dalla circolazione sistemica [1]. .....	3
Figura 2. Concentrazione di un farmaco nel plasma nel tempo dopo diversi tipi di somministrazione: endovenosa, orale a risposta veloce o ritardata, somministrazioni multiple. ....	4
Figura 3. Andamento dei livelli ematici a seguito di somministrazioni a singola dose (A), ripetute (B) e per una forma farmaceutica a rilascio modificato (C) [2]. ....	4
Figura 4. Rilascio di un farmaco per a) erosione in massa, b) erosione in superficie [1]. .....	5
Figura 5. Fasi del processo di coacervazione [3]. .....	7
Figura 6. Polimerizzazione interfacciale mediante condensazione [3]. .....	8
Figura 7. Polimerizzazione interfacciale mediante addizione [3]. .....	8
Figura 8. Struttura chimica del 5-FU. ....	10
Figura 9. Processo di incapsulazione del 5-FU in nano-particelle CS [7]. ....	15
Figura 10. Schema di processo per l'incapsulazione di 5-FU mediante emulsioni ripetute [8]. .....	16
Figura 11. Struttura chimica dell'alginato. Polimeri a blocchi lineari di $\beta$ -D-mannuronate (M) e $\alpha$ -L-guluronate (G) con una variazione nella composizione e nella modalità sequenziale. ....	23
Figura 12. Reticolazione dell'alginato con ioni calcio. ....	24
Figura 13. Gelificazione indotta dallo ione calcio con formazione della struttura "egg box" .....	25
Figura 14. Struttura chimica del Pluronic. ....	27
Figura 15. Struttura chimica dell'Eudragit E100 [18]. ....	29
Figura 16. Struttura chimica dell'Eudragit RL100 [18]. ....	29
Figura 17. Rappresentazione schematica dell'impianto realizzato su scala da laboratorio per la produzione di microvettori <i>shell-core</i> . ....	31
Figura 18. Da sinistra a destra: pompa da vuoto; imbuto Buchner e beuta. ....	32

---

Figura 19. Liofilizzatore. ....	33
Figura 20. Dispositivo di agitazione e termostatazione. ....	34
Figura 21. Spettrofotometro Lambda 25 PerkinElmer. ....	34
Figura 22. Analizzatore di umidità Ohaus mod.MB45. ....	35
Figura 23. Microscopio ottico. ....	35
Figura 24. Centrifuga utilizzata nel lavoro di ricerca. ....	36
Figura 25. DSC Mettler Toledo 822. ....	37
Figura 26. Configurazione a matrice, se viene alimentato il solo canale interno ( <i>core</i> ), configurazione <i>shell-core</i> , se vengono alimentati sia il canale interno che quello esterno. ....	40
Figura 27. Retta di taratura del 5-FU. ....	42
Figura 28. Schema seguito per lo sviluppo di un nuovo protocollo operativo basato sulla variazione della formulazione sia delle linee <i>shell</i> e <i>core</i> che del reticolante. ....	49
Figura 29. Immagini al microscopio ottico delle microparticelle fresche (A) e liofilizzate (B), obiettivo 10 X. ....	54
Figura 30. Profilo di rilascio di 5-FU in microvettori ottenuti con un solo <i>step</i> di reticolazione. ....	56
Figura 31. Immagini al microscopio ottico delle microparticelle rivestite fresche (A) e liofilizzate (B), obiettivo 10 X. ....	61
Figura 32. Scansioni al DSC di: alginato puro (linea nera a punti), 5-FU (linea nera tratteggiata), Eudragit RS 100 (linea nera, continua), microvettori non rivestiti (linea grigia continua), microvettori rivestiti (linea grigia tratteggiata). ....	62
Figura 33. Profilo di rilascio di 5-FU in microvettori ottenuti con un due <i>step</i> di complessazione. ....	63

---

## Indice delle tabelle

Tabella 1. Proprietà chimico-fisiche del Fluorouracile[4].	11
Tabella 2. Caratteristiche delle alghe brune utilizzate per la produzione di alginati [10].	22
Tabella 3. Caratteristiche dei differenti <i>bulk</i> di reticolazione analizzati.	50
Tabella 4. Parametri operativi selezionati per la produzione di microparticelle <i>shell-core</i> di alginato di sodio tramite atomizzazione assistita da ultrasuoni.	53
Tabella 5. Diametro medio, <i>shrinkage</i> e umidità delle particelle prima e dopo liofilizzazione.	55
Tabella 6. Caratteristiche dei differenti <i>bulk</i> di complessazione con relativi: rilascio % a pH 1, rilascio % a pH 6.8, EE%.	58
Tabella 7. Parametri operativi selezionati per la produzione di microparticelle <i>shell-core</i> di alginato di sodio tramite atomizzazione assistita da ultrasuoni.	59
Tabella 8. Diametro medio, <i>shrinkage</i> e umidità delle particelle rivestite prima e dopo liofilizzazione, confrontati con quelli delle particelle non rivestite (in grigio).	60

---



## Abstract

*The development of drug delivery systems aims to target the action site, to improve the efficacy and to reduce the toxic effects of a pharmacological therapy, to stabilize and protect from degradation active molecules.*

*In this work shell-core microvectors (formed by a drug-containing nucleus, core, surrounded by an external shell) were produced by an innovative technique based on the combination between ultrasound assisted atomization and complexation among polymers with different charges. At first, the process ability to produce sodium alginate-based microvectors incapsulating an active molecule, 5-Fluorouracil (5-FU), was tested. The 5-FU is a chemotherapy agent largely used especially for the tumor of the colon, thus there is the need to produce systems for its oral administration to replace the more invasive endovenous one.*

*First of all, some important process parameters were evaluated: concentration and flow rate of shell and core solutions, bulk formulation, use of a second complexation step, influence of freeze drying. Shell-core microvectors, composed by a core with an aqueous solution of sodium alginate and Pluronic F127 and a shell of aqueous sodium alginate, were produced by varying the properties of reticulation bulk. Finally, an emulsion of dichloromethane (where 5-FU is not soluble) and a water solution of  $\text{CaCl}_2$  (the divalent ion interacts with alginate) was chosen as reticulating bulk since it allowed to obtain a high 5-FU encapsulation efficiency of about 50%. This results is very important because similar processes observed in literature gave low efficiencies in the encapsulation of hydrophilic molecules (about 10%).*

*After the evaluation of reticulation bulk properties, the role of both Pluronic F127 and of the alginate shell in retarding the active*

*molecule diffusion were investigated. In effect the 5-FU encapsulation efficiency was very low both in absence of Pluronic F127, confirming its role of mesh size reducer, and in absence of alginate shell (further protection against diffusion).*

*Shell-core microvectors were thus produced following this operative protocol by one complexation step, but the gastroresistance was not assured. Therefore, a novel preparative protocol, based on a second complexation step of alginate with a polycationic polymer, was developed. For the second complexation bulk, Eudragit RL 100 e Eudragit RS 100 were chosen because they are cationic and soluble in dicloromethane (to both avoid drug diffusion in complexation bulk and recycle the solvent of the first reticulation bulk). In particular, Eudragit RS 100 was the best choice since allowed to both keep intact the encapsulation efficiency and increase the gastroresistance.*

*The main feature of this work was therefore the development of a novel operative protocol, based on the coupling between ultrasound assisted atomization and polyelectrolytes complexation, for the production of enteric shell-core microvectors encapsulating a chemotherapeutic for colon tumor, by using a process at room temperature and pressure and without any toxic chemical reagents.*

---

Il *drug delivery* (“rilascio del farmaco”), ovvero lo sviluppo di sistemi per la somministrazione e la veicolazione dei farmaci nell’organismo, ha come obiettivo quello di circoscriverne l’effetto biologico su una determinata tipologia di cellule, migliorando l’efficacia di una terapia farmacologica e riducendone la tossicità. La ricerca in questo ambito è in continua evoluzione per rendere più efficaci e sicuri i dosaggi terapeutici, per consentire la somministrazione di farmaci particolarmente suscettibili a degrado, per stabilizzare nel tempo molecole attive.

In questo lavoro di tesi sono stati prodotti microvettori *shell-core*, cioè costituiti da un nucleo centrale (*core*, dove è posta la molecola attiva) e un guscio esterno (*shell*), attraverso una tecnica innovativa che prevede la combinazione di due processi fondamentali: l’atomizzazione assistita da ultrasuoni e la complessazione tra polimeri aventi cariche differenti. In fase preliminare è stata testata la capacità dell’impianto, già realizzato nell’ambito di precedenti attività di ricerca del gruppo *Transport Phenomena and Processes*, di produrre microvettori a base di alginato di sodio incapsulanti una molecola attiva, il 5-Fluorouracile (5-FU), un chemioterapico che ha una diffusa applicazione nel trattamento di diverse patologie tumorali, in particolare utilizzato per il tumore al colon. Per realizzare l’incapsulazione di 5-FU nelle microparticelle *shell-core* è stato necessario investigare una serie di parametri di processo quali concentrazioni e portate delle alimentazioni linea *shell* e linea *core*; formulazione del *bulk* di reticolazione; definizione dei materiali e delle condizioni di complessazione polielettrolitica. Le caratterizzazioni dei sistemi particellari prodotti (sia umidi che essiccati), in termini di morfologia, dimensione, carico e proprietà di rilascio, sono state condotte sia con metodi appositamente sviluppati che con procedure standardizzate (da farmacopea ufficiale).

Per la produzione dei sistemi particellari con le proprietà desiderate, sono stati prodotti lotti di vettori *shell-core* utilizzando l’alginato di sodio e il Pluronic F-127 in soluzione acquosa per la formulazione del *core*, e come unico eccipienti per lo *shell* l’alginato di sodio. Sono state poi testate diverse formulazioni per il *bulk* di reticolazione in quanto il 5-FU essendo una molecola idrofila non risulta essere facilmente incapsulabile. Si è scelto di utilizzare come reticolante una emulsione di una soluzione acquosa di  $\text{CaCl}_2$  in diclorometano poichè permette di ritenere una quantità di principio attivo (circa il 50%) relativamente considerevole. Si tratta di un risultato di notevole



importanza per la tecnica utilizzata, in quanto da studi effettuati fino ad oggi è stato osservato che le efficienze di incapsulazione di principi attivi idrofili hanno valori molto bassi (intorno al 10%). Tuttavia una volta definita la migliore formulazione del *bulk* di reticolazione (emulsione di una soluzione acquosa di  $\text{CaCl}_2$  in diclorometano) si è passati a valutare se sia la presenza del Pluronic F127 che la presenza dello *shell* ritardassero effettivamente la perdita del principio attivo nel reticolante in fase di formazione delle microparticelle. L'efficienza di incapsulazione ottenuta in assenza del Pluronic F127 è risultata significativamente inferiore a quella ottenuta in sua presenza, a conferma che tale polimero agisce come riduttore di *mesh size* del network polimerico dell'alginato. Un risultato peggiore è stato ottenuto in assenza dello strato protettivo dello *shell* evidenziando che la presenza di un ulteriore strato sottile di alginato reticolato riduce le perdite di principio attivo durante la produzione. Dai test di rilascio sui microvettori prodotti con un primo step di complessazione (quindi con la reticolazione con il  $\text{CaCl}_2$ ), è risultato che il principio attivo è liberato quasi completamente in ambiente gastrico (circa il 60%). Per ovviare a tale rilascio indesiderato è stato messo a punto un nuovo protocollo formulativo che ha previsto l'applicazione di un rivestimento dei sistemi *shell-core* attraverso un successivo step di complessazione polielettrolitica tale da garantire una maggiore gastroresistenza. In particolare per il secondo step di complessazione sono stati selezionati Eudragit solubili in diclorometano (sia per evitare la fuoriuscita del principio attivo nel secondo *step* che per riciclare il solvente del primo *step* di reticolazione) e cationici, che quindi vanno a complessarsi ulteriormente con l'alginato anionico residuo: Eudragit RL 100 e Eudragit RS 100. Sempre attraverso lo studio dei test di rilascio si è dimostrato che l'Eudragit RS 100 non solo mantiene inalterato il valore dell'efficienza di incapsulazione, ma garantisce anche migliori proprietà enteriche (quantità di 5-FU rilasciata circa del 30%) dei microvettori *shell-core*, probabilmente a causa della minore permeabilità del polimero dovuta al minore quantitativo di gruppi ammoniacali.

Il risultato principale di questo lavoro di tesi è stato lo sviluppo di un protocollo operativo, basato sull'accoppiamento tra atomizzazione ad ultrasuoni e complessazione polielettrolitica, che ha permesso di ottenere vettori di scala micrometrica (dimensioni di circa 60  $\mu\text{m}$ ) con efficienza di incapsulazione di un chemioterapico idrofilo relativamente elevata e con proprietà enteriche.

---

# Bibliografia

1. [www.scienzattiva.eu](http://www.scienzattiva.eu)
2. Coelho J.F., Ferreira P.C., Alves P., Cordeiro R., Fonseca A.C., Gois J.R., Gil M.H., (2010), Advanced Technologies potentially applicable in personalized treatments, EPMA Journal, 1: 164 – 209
3. Lezioni didattiche del prof. Marco Cespi, UNICAM
4. [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)
5. Battaglia E., Vanzetta M., Tolomeo S., (2001) La terapia infusioneale. Strumenti e metodi. The McGraw-Hill Companies
6. Chavanpatil M.D., Khadair A., Patil Y., Handa H., Mao G., Panyam J., (2007), Polymer-Surfactant Nanoparticles for Sustained Release of Water-Soluble Drugs, Journal of Pharmaceutical Sciences, 96 (12): 3379 - 3389
7. Li P., Wang Y., Peng Z., She F., Kong L.,(2011), Development of chitosan nanoparticles as drug delivery systems for 5-fluorouracil and leucovorin blends, Carbohydrate Polymers 85: 698–704
8. Rahman Z., Kohli K., Khar R.K., Ali M., Charoo N.A., Shamsher A.A., (2006), Characterization of 5-Fluorouracil Microspheres for Colonic Delivery, AAPS PharmSciTech ,7 (2): E1 – E9
9. Shishu, Gupta N., Aggarwal N., (2007), Stomach-Specific Drug Delivery of 5-Fluorouracil Using Floating Alginate Beads, AAPS PharmSciTech ,8 (2): E1 – E7
10. Shabbeer S., Shaheeda, Ramanamurthy KV., (2012), Formulation and evaluation of chitosan sodium alginate microcapsules of 5-fluorouracil for colorectal cancer, International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry, 2 (1): 7 - 19
11. [www.fmcbiopolymer.com](http://www.fmcbiopolymer.com)
12. Rehm B.H.A., (2009) Alginates: biology and applications, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
13. Cascone S.,(2009), Microincapsulazione di farmaci in biopolimeri mediante atomizzazione assistita da ultrasuoni, Tesi di laurea specialistica in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno

14. Kim C.K., Lee E.J., (1992), The controlled release of blue dextrane from alginate beads, *International Journal of Pharmaceutics*, 79:11–19.
  15. Rabbia L., (2010), Stent coronarici a rilascio controllato di farmaco: una tecnica innovativa di ricopertura, Tesi di laurea specialistica in Ingegneria Chimica Università degli Studi di Salerno.
  16. Singh V., Khullar P., Dave P Kaur N., (2013) ,Micelles, mixed micelles, and applications of polyoxypropylene (PPO)-polyoxyethylene (PEO)-polyoxypropylene (PPO) triblock polymers, *International Journal of Industrial Chemistry*, 4 (12): 1 - 18
  17. Batrakova E.V. and Kabanov A.V., (2008), Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers, *Journal of Controlled Release*,130: 98-106.
  18. [www.eudragit.evonik.com](http://www.eudragit.evonik.com)
  19. Dalmoro A., Sitenkov A.Y., Lamberti G., Barba A.A., Moustafine R.I., (2016) Ultrasonic atomization and polyelectrolyte complexation to produce gastroresistant *shell-core* microparticles, doi: 10.1002/app.42976
  20. Dalmoro A., (2013), Novel technologies and process intensification in the production of micro-systems with pharmacological/neutraceutical activity, Tesi di Dottorato in Scienza e Tecnologie per l'Industria Chimica, Farmaceutica e Alimentare, Università degli Studi di Salerno.
  21. Feo G., (2014), Atomizzazione assistita da ultrasuoni per la produzione di strutture *shell-core* incapsulanti molecole attive, Tesi di Laurea specialistica in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Università degli Studi di Salerno.
  22. Costabile M., (2014), Produzione di microvettori *shell-core* incapsulanti ergocalciferolo, Tesi di Laurea Specialistica in Farmacia, Università degli Studi di Salerno.
  23. Cascone S., (2009), Microincapsulazione di farmaci in biopolimeri mediante atomizzazione assistita da ultrasuoni, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica, Università degli studi di Salerno.
  24. Abrami M., D'Agostino I.,Gemsì M., Fiorentino S., Farra R., Asaro F., Lapasin R., Grassi G., Grassi M., (2014), Physical characterization of alginate–Pluronic F127 gel for endoluminal NABDs delivery, *Soft Matter* 10:729-737.
  25. Dalmoro A., Sitenkov A.Y., Lamberti G., Barba A.A., Mustafine R.I., (2016), Ultrasonic atomization and polyelectrolyte complexation to produce gastroresistant *shell-core* microparticles, *Journal of Applied Polymer Science*, 133 (6): 1-9.
-





*Alla mia famiglia che in questi anni mi ha dato la possibilità di crescere dandomi piena fiducia e libertà di scelta in tutte le decisioni da prendere.*

*Ai miei zii Giuseppe e Rosario, a mia nonna Elvira che sono stati sempre un supporto.*

*A mio nonno che avrei voluto tanto ci fosse in questo giorno.*

*Alle mie coinquiline, amiche di sempre: Valentina, Albina, Daiana e Maria Antonietta con cui ho condiviso sia momenti belli che momenti più spiacevoli, e inconsapevolmente mi hanno dato sempre un motivo per sorridere e per non perdere di vista le cose importanti.*

*A Mariateresa che mi ha resa felice quando mi ha detto che avremmo terminato insieme il corso di studi come l'avevamo intrapreso.*

*A Francesco che nonostante qualche incomprensione sono anni che mi sopporta.*

*Ai miei amici universitari che hanno reso questa esperienza più leggera e spensierata.*

*Ai professori Gaetano Lamberti e Anna Angela Barba che mi hanno dato questa opportunità.*

*Ad Annalisa che in questi mesi è stata sempre presente e disponibile e che non mi ha mai fatta sentire non idonea alla situazione.*

*A me che non ho mai smesso di credere nelle mie capacità.*

*Debora*

