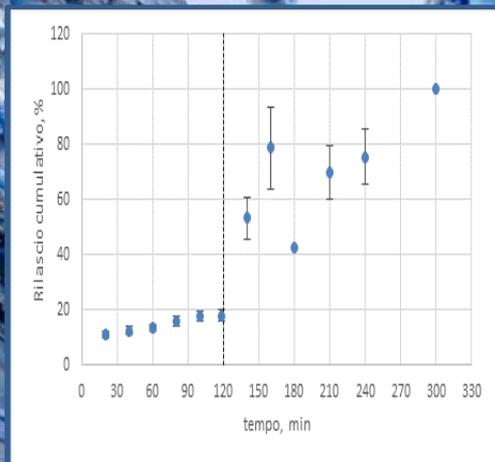


Microincapsulazione di sistemi liposomali contenenti indometacina

Tesi di Laurea in Ingegneria Chimica





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

Microincapsulazione di sistemi liposomali contenenti indometacina

Tesi in

Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Ing. Anna Angela Barba

Correlatore:

Ing. Annalisa Dalmoro

Candidato:

Gianmaria Cantarella

matricola 0612201141

Anno Accademico 2017/2018

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

La data prevista per la discussione della tesi è il 21/12/2017

Fisciano, 11/12/2017

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	V
Indice delle tabelle	VII
Abstract	IX
Introduzione.....	1
1.1 Importanza del rilascio controllato dei farmaci _____	2
1.2 Processi di incapsulamento _____	5
1.3 FANS _____	6
1.3.1 Meccanismo di azione dei FANS	6
1.3.2 Effetti indesiderati	7
1.3.3 Indometacina	7
1.4 Incapsulamento dell'indometacina _____	9
1.4.1 Liposomi	9
1.4.2 Incapsulamento dell'indometacina in liposomi	11
1.4.3 Incapsulamento di liposomi in alginato	12
1.5 Obiettivi del lavoro di tesi _____	14
Materiali, Apparecchiature e Metodi.....	17
2.1 Materiali _____	18
2.1.1 Alginato di sodio	18
2.1.2 Chitosano	19

2.1.3 Indometacina	20
2.1.4 L- α -fosfatidilcolina di soia	20
2.1.5 Colesterolo	21
2.1.5 Altri materiali	22
2.2 Apparecchiature	22
2.2.1 Impianto per la produzione e la ricopertura di liposomi	22
2.2.2. Impianto di microincapsulazione tramite atomizzazione assistita da ultrasuoni bench scale	23
2.2.3. Apparato di filtrazione	24
2.2.4 Essiccatore	25
2.2.5 Apparato di dissoluzione	26
2.2.6 Spettrofotometro	27
2.2.7 Apparecchiature di centrifugazione	28
2.2.8 Microscopio ottico	29
2.3 Metodi	30
2.3.1 Produzione liposomi incapsulanti indometacina	30
2.3.2 Produzione liposomi incapsulanti indometacina rivestiti da chitosano	30
2.3.3 Caratterizzazione dei sistemi liposomali	31
2.3.3.a Determinazione delle dimensioni e del potenziale Z dei sistemi liposomali	31
2.3.3.b Determinazione dell'efficienza di incapsulamento	31
2.3.4 Produzione dei sistemi microparticellari shell/core tramite atomizzazione assistita da ultrasuoni	33
2.3.5 Caratterizzazione delle particelle sia fresche che stabilizzate	34
2.3.6 Analisi statistica dei risultati	36

Risultati e discussione..... 37

3.1 Caratterizzazione dei sistemi liposomali contenenti indometacina tal quali e rivestiti con chitosano	38
3.1.1 Determinazione delle dimensioni e del potenziale zeta	38
3.1.2 Efficienza di incapsulamento	39

3.2 Produzione e caratterizzazione di sistemi microparticellari con struttura <i>shell/core</i> incapsulanti liposomi _____	40
3.2.1 Produzione di microparticelle incapsulanti liposomi	40
3.2.2 Contenuto di umidità delle particelle fresche	43
3.2.3 Dimensioni delle particelle fresche	43
3.2.4 Efficienza di incapsulamento	44
3.2.5 Stabilità delle microparticelle fresche	44
3.3 Stabilizzazione di sistemi microparticellari con struttura <i>shell/core</i> incapsulanti liposomi _____	45
3.3.1 Dimensioni delle microparticelle essiccate	46
3.3.2 Proprietà di rilascio	46
Conclusioni.....	49
4.1 Conclusioni _____	50
Bibliografia.....	53

Indice delle figure

Figura 1 Rappresentazione delle vie di somministrazioni farmacologiche	3
Figura 2 Andamento dei livelli ematici a seguito di terapie convenzionali (A-più compresse al giorno), dose singola (B), dose singola a rilascio controllato (C) [2]	4
Figura 3. Liberazione di un farmaco da un sistema biodegradabile che subisce un'erosione in <i>bulk</i> (a) e da un sistema biodegradabile che erode in superficie (b) [4].....	5
Figura 4 Struttura chimica dell'indometacina	8
Figura 5. Schematizzazione della struttura di un liposoma [10].....	10
Figura 5 Struttura chimica dell'alginato di sodio	18
Figura 7 Struttura chimica della chitina e del chitosano.....	19
Figura 7 Configurazione a doppio strato	20
Figura 8 Struttura chimica di L- α -fosfatidilcolina di soia	21
Figura 9 Struttura chimica del colesterolo.....	21
Figura 10. Layout dell'impianto di produzione di liposomi con metodo simil-microfluidico: 1-2-3 linea di alimentazione lipidi/etanolo/indometacina; 4-5-6 linea di alimentazione acqua deionizzata; D-1 e D-2 contenitori di alimentazione; G-1, G-2 pompe peristaltiche; I-1 iniettore (sezione di produzione); 7-8 acqua/sospensione etanolo liposomi incapsulanti indometacina; D-3 Contenitore di raccolta/miscelazione; Z-1 generatore ultrasuoni	22
Figura 11. Layout dell'impianto di produzione di micro-particelle shell/core tramite atomizzazione assistita da ultrasuoni: D-1 and D-2 becher di raccolta delle soluzioni core e shell, rispettivamente; G-1 and G-2 pompe peristaltiche; Z-1 atomizzatore a doppio canale; D-3) becher con soluzione reticolante; 1-2-3 linee di alimentazione del core; 4-5-6 linee di alimentazione dello shell; 7 prodotto finale (destinato alla filtrazione)	24
Figura 12. Pompa da vuoto, imbuto Buchner e beuta codata, rispettivamente da sinistra a destra	25
Figura 13 Essiccatore TG 200	26

Figura 14. Dispositivo di agitazione e termostatazione	26
Figura 15. Spettrofotometro Lambda 35 Perkin Elmer.....	27
Figura 16. Centrifuga R 8C-XS, Bench Top Centrifuge, Remi	28
Figura 17. Ultracentrifuga <i>Beckman Optima L-90K</i>	29
Figura 18. Microscopio ottico Leica DM-LP	29
Figura 19 Retta di taratura indometacina in una soluzione acqua/etanolo 50/50 v/v	33
Figura 20. Foto al microscopio ottico delle microparticelle <i>shell/core</i> fresche incapsulanti liposomi (ingrandimento 10 X)	43
Figura 21 Microparticella fresca (A) e microparticella essiccata (B) al microscopio ottico (ingrandimento 10 X).....	46
Figura 22 Profilo di rilascio di IND da microparticelle <i>shell/core</i> incapsulanti liposomi	47

Indice delle tabelle

Tabella 1 Caratteristiche chimico-fisiche dell'indometacina	7
Tabella 2 Valori di potenziale Z, diametro medio numerico, PDI e Z-average per liposomi tal quali e rivestiti con chitosano	38
Tabella 3 Efficienza di incapsulamento di liposomi tal quali e rivestiti con chitosano.....	39
Tabella 4. Parametri operativi selezionati per la produzione di microparticelle <i>shell/core</i> di alginato di sodio tramite atomizzazione assistita da ultrasuoni	41
Tabella 5 Caratteristiche delle varie alternative di produzione delle microparticelle con la relativa efficienza di incapsulamento.....	42
Tabella 6. Variazione della percentuale di indometacina non incapsulata e persa totale in 2 settimane di stoccaggio delle particelle <i>shell/core</i> fresche in frigorifero.	45

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 microparticles encapsulating liposomes containing indomethacin (non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID, used for inflammatory diseases, such as arthrosis, arthritis, etc.) were produced with the aim to assure high active ingredient loading, good gastric-resistance properties and easiness of stabilization. First of all, indomethacin was encapsulated in liposomes by an innovative and low-cost technique called simil-microfluidic, which allowed to obtain nanometric vesicles with high encapsulation efficiency (about 90% for not coated liposomes and about 98% for liposomes coated with chitosan). Then, indomethacin-loaded liposomes were encapsulated in shell-core microparticles, obtained by ultrasonic atomization, to assure both gastro-resistance and stability to dehydration. Sodium alginate was used as polymer in both shell and core formulation thanks to its enteric feature and its ability to easily complex with a crosslinking solution of divalent ions, being an anionic polymer. The possibility to obtain such a complex system, consisting of microparticles with alginate and liposome core and an alginate shell, was tested. Then, the best operating conditions, in terms of flow rates and composition of shell and core solutions, were defined to obtain the best encapsulation efficiency. In particular, if chitosan-coated liposomes were used in the core, a 72 % encapsulation efficiency was achieved, which is however lower than that of liposomes for the change of the liposomal membrane permeability due to the prolonged contact between liposomes and alginate.

The fresh microparticles had micrometric size (about 80 μm) and the encapsulation efficiency of 72% is higher than values found in the literature. Moreover, the fresh microparticles were stable in the preparation solution for one week, instead after two weeks, the alginate

shell starts to be damaged causing the release of loaded liposomes. Thus, stabilization was carried out to reduce the humidity through a fluid bed drying process. It must be noted that liposomes stabilization is usually performed by freeze-drying, as the heat deforms and causes the liposomal vesicles collapse. It was the first time that the stabilization of such a system was carried out by means of fluid bed drying and that the structure, after heat treatment, was not collapsed but was kept intact. In addition, stabilized microparticles containing liposomes showed gastro-resistance properties by retaining 80% of the encapsulated indomethacin at acidic pH, which is released only at neutral pH.

It can be concluded that the main result of this thesis was the production of innovative shell-core microparticles containing indomethacin-loaded liposomes, with high encapsulation efficiency, intact liposomal structure after drying and enteric release.

Il *drug delivery* (“rilascio del farmaco”) riguarda lo sviluppo di sistemi per la somministrazione ed il trasporto dei farmaci all’interno dell’organismo ed ha l’obiettivo di indirizzare l’effetto ad una determinata tipologia di cellule, migliorandone quindi l’efficacia e riducendone la tossicità. La ricerca in questo ambito è in continua evoluzione per rendere più efficaci e sicuri i dosaggi terapeutici e per consentire la somministrazione di farmaci particolarmente suscettibili a degrado.

In questo lavoro di tesi sono state prodotte microparticelle, con struttura *shell/core* incapsulanti sistemi liposomali contenenti indometacina (farmaco antiinfiammatorio non steroideo, utilizzato per diverse patologie infiammatorie come artrosi, artriti ecc.), che garantiscono elevato carico di principio attivo, buone proprietà di gastroresistenza e facilità di stabilizzazione. L’incapsulamento dell’indometacina in liposomi è avvenuto tramite una tecnica innovativa e a basso costo definita simil-microfluidica, che ha permesso di ottenere strutture vescicolari nanometriche con elevata efficienza di incapsulamento (circa il 90 % per liposomi tal quali e circa il 98 % per liposomi ricoperti con chitosano). Per garantire l’entericità e soprattutto la stabilità della formulazione nel tempo attraverso deidratazione, i liposomi caricati con indometacina sono stati inseriti in microparticelle a base di alginato con struttura *shell/core* ottenute tramite atomizzazione ad ultrasuoni. L’alginato sodico è molto utilizzato in campo farmaceutico per la produzione di forme di dosaggio orali di tipo enterico, inoltre, essendo un polimero anionico, può complessarsi facilmente con una soluzione reticolante di ioni bivalenti. È stata appurata la possibilità di ottenere un sistema complesso, formato quindi da microparticelle con *core* di alginato e liposomi ed uno *shell* di protezione di solo alginato. Dopo aver definito le condizioni operative migliori in termini di portate e composizione delle soluzioni *shell* e *core*, scelte sulla base dell’efficienza di incapsulamento, sono stati prodotti diversi lotti per caratterizzazioni successive come dimensioni, umidità, proprietà di rilascio. Utilizzando nel *core* i liposomi ricoperti da chitosano, è stata ottenuta un’elevata efficienza di incapsulamento dei sistemi microparticellari (circa il 72%), sebbene ridotta rispetto a quella ottenuta per i liposomi in quanto è noto da letteratura che il contatto prolungato tra liposomi e alginato, cambia la permeabilità della membrana liposomale.

Le microparticelle fresche così ottenute hanno dimensioni micrometriche (circa 80 μm) ed l'efficienza di incapsulamento del 72 % risulta superiore a valori riscontrati in letteratura. Le microparticelle fresche rimangono stabili nella soluzione di preparazione per un tempo di una settimana. Dopo due settimane, lo *shell* di alginato inizia a destabilizzarsi rilasciando i liposomi carichi. Vista la bassa stabilità dei sistemi microparticellari freschi si è proceduto alla stabilizzazione per ridurre l'umidità tramite un processo di essiccamento a letto fluido. È di notevole importanza osservare che solitamente la stabilizzazione dei liposomi è effettuata tramite liofilizzazione in quanto il calore va a deformare e collassare le vescicole liposomiali. In questo lavoro di tesi per la prima volta è stata condotta una stabilizzazione in letto fluidizzato ottenendo strutture essiccate integre. Inoltre i sistemi microparticellari contenenti i liposomi hanno mostrato proprietà di gastro resistenza trattenendo a pH acido l'80 % dell'indometacina incapsulata, che viene rilasciata solo a pH neutro.

Il risultato principale di questo lavoro di tesi è stato la produzione di sistemi innovativi di tipo microparticellare con struttura *shell/core* contenenti liposomi carichi con indometacina, con un'elevata efficienza di incapsulamento, struttura liposomale intatta post essiccamento e rilascio di tipo enterico.

Bibliografia

1. Dalmoro A., (2009) Microparticelle enteriche rivestite con “smart polymers” per applicazioni di rilascio controllato di farmaci, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica Università degli Studi di Salerno
2. <http://docenti.unicam.it/tmp/3603.pdf>
3. Bochicchio S., Dalmoro A., Barba A.A., d’Amore M., Lamberti G., “New Preparative Approaches for Micro and Nano Drug Delivery Carriers”, *Current Drug Delivery*, 14, 203-215, 2017
4. <http://win.spazioinfo.com/public/RILASCIO%20CONTROLLATO%202004.pdf>.
5. <http://www.treccani.it>
6. Pasero G., Marson P., “Piccola storia della terapia antireumatica. III. I farmaci antiflogistici non steroidei”, *Reumatismo*, 62 (3), 225-232, 2010.
7. Dudley Hart F., Boardman P.L., “Indomethacin: a new non-steroid anti-inflammatory agent”, *British Medical Journal*, 965-970, 1963.
8. Ubaldi E., Grattagliano I., “Il danno gastrointestinale da farmaci antinfiammatori non steroidei: prevenzione in Medicina Generale”, *Rivista Società Italiana di Medicina Generale*, 31-36, 2015
9. Mastrogiovanni D., (2015), Produzione di microvettori con struttura *shell/core* mediante atomizzazione assistita da ultrasuoni, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica Università degli Studi di Salerno
10. Recupido F., (2016), Produzioni di nanoliposomi per applicazioni nutraceutiche mediante un apporto simil-microfluidico, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica Università degli Studi di Salerno
11. P. Srinath, S. P. Vyas, and Prakash V. Diwan, “Preparation and Pharmacodynamic Evaluation of Liposomes of Indomethacin”, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26(3), 313-321, 2000
12. Soehngen E., Godin-Ostro E., Fielder G.F., Ginsberg S.R., Slusher M.A., Weiner A.L., “Encapsulation of indomethacin in liposome provides protection against both gastric and intestinal ulceration when orally administered to rats”, *Arthritis and Rheumatism*, Vol. 31, No. 3, 414-422, 1988.

13. Dai C., Wang B., Zhao H., Li B., "Factors affecting protein release from microcapsule prepared by liposome in alginate", *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, 42, 253-258, 2005.
 14. Takagi I., Shimizu H., Yotsuyanagi T., "Application of Alginate Gel as a Vehicle for Liposomes. I. Factors Affecting the Loading of Drug-Containing Liposomes and Drug Release", *Chem. Pharm. Bull.* 44(10), 1941-1947, 1996.
 15. Xing L., Dawei C., Liping X., Rongqing Z., "Oral colon-specific drug delivery for bee venom peptide: development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome", *Journal of Controlled Release* 93, 293-300, 2003.
 16. Wang L., Hu X., Shen B., Xie Y., Shen C., Lu Y., Qi J., Yuan H., Wu W., "Enhanced stability of liposomes against solidification stress during freeze-drying and spray-drying by coating with calcium alginate", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 163-170, 2015.
 17. S. Mizrahy and D. Peer, "Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2623-40, Apr. 2012.
 18. Marci L., (2015), Studio di formulazione e caratterizzazione di nanoparticelle a base di trimetil chitosano e sodio alginato per il rilascio mirato di farmaci
 19. R. A. Muzzarelli, "Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan," 1973
 20. R. Ravindra, K. R. Krovvidi, and A. A. Khan, "Solubility parameter of chitin and chitosan," *Carbohydr. Polym.*, vol. 36, no. 2-3, pp. 121-127, Jul. 1998.
 21. H. Honarkar and M. Barikani, "Applications of biopolymers I: chitosan," *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.*, vol. 140, pp. 1403-20, 2009.
 22. R. Nair, B. Reddy, C. Kumar, and K. Kumar, "Application of chitosan microspheres as drug carriers: a review," *J Pharma Sci Res*, vol. 17, pp. 1-12, 2009.
 23. Boochicchio S. (2017), Nanostructured vectors for the transport of active molecules through biological membranes for pharmaceutical and nutraceutical applications, Tesi di Dottorato in Ingegneria Industriale, Università degli Studi di Salerno.
 24. Deposito domanda brevetto per invenzione industriale 4. 102017000099627, 6.9. 2017
 25. Bochiccio S., Dalmoro A., Bertocin P., Lamberti G., Moustafin R.I., Barba A.A., "Design and production of hybrid nanoparticles with polymeric-lipid shell core structure: conventional and next generation approaches, under review to *Materials Science and Engineering C journal*, 2017.
-

26. DALMORO A. (2013) Novel technologies and process intensification in the production of micro-systems with pharmacological/nutraceutical activity, Tesi di Dottorato in Scienza e tecnologie per l'industria chimica, farmaceutica e alimentare -curriculum Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno.
 27. Dalmoro A., Sitenkov Y.A., Lamberti G., Barba A.A., Moustafine I.R., "Ultrasonic atomization and polyelectrolyte complexation to produce gastroresistant *shell/core* microparticles", Journal of Applied Polymer Science, 2015
 28. Balanc B., Trifkovic K., Dordevic V., Markovic S., Pjanovic R., Nedovic V., Bugarski B., "Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes", Food Hydrocolloids 61, 832-842, 2016
-

