UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

**Dipartimento di Ingegneria Industriale**

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

# Studio del rilascio di nanovettori liposomiali da microparticelle di alginato per applicazioni intraperitoneali

Tesi in

**Principi di Ingegneria Chimica**

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Ing. Diego Caccavo

Candidata:

Chiara Nevola

matricola 0612201656

**Anno Accademico 2018/2019**

*Ai miei genitori*

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

La data prevista per la discussione della tesi è il 27/09/2019
Fisciano, 10/09/2019

# Sommario

**Sommario** ..... I

**Indice delle figure** ..... V

**Indice delle tabelle** ..... IX

**Abstract** ..... XI

**Introduzione** ..... 1

1.1 Peritoneo _____ 2

1.1.1 Anatomia del peritoneo 2

1.1.2 Carcinoma peritoneale 3

1.1.3 Terapie 3

1.2 Rilascio controllato dei farmaci _____ 5

1.2.1 Importanza del rilascio controllato dei farmaci 5

1.2.2 Microparticelle 7

1.2.3 Nanoparticelle 9

1.2.4 Uso combinato di micro- e nanoparticelle 12

1.3 Stato dell'arte _____ 13

1.3.1 Incapsulamento di liposomi in alginato 13

1.4 Obiettivi _____ 17

**Materiali, apparecchiature e metodi** ..... 19

2.1 Materiali _____ 20

2.1.1 Alginato 20

2.1.2 Liposomi 23
2.1.3 α-tocoferolo 24
2.1.4 Indometacina 25
2.1.5 Menadione 26
2.1.6 Altri materiali 26
2.2 Apparecchiature 27
2.2.1 HPLC 27
2.2.2 Spettrofotometro 29
2.3 Metodi 30
2.3.1 Preparazione delle soluzioni 30
2.3.2 Produzione delle microparticelle 32
2.3.3 Test di rilascio in vitro 35
2.3.4 Rottura delle microparticelle mediante EDTA 41
2.3.5 Test di degradazione dell'α-tocoferolo 41
2.3.6 Test di degradazione dell'indometacina 44
2.3.7 Test di degradazione del menadione 45

**Risultati e discussione 47**
3.1 Microparticelle 0.3% di alginato e 0.03 M $CaCl_2$ 48
3.2 Microparticelle 0.5% di alginato e 0.05 M $CaCl_2$ 51
3.3 Microparticelle 1% di alginato e 0.1 M $CaCl_2$ 55
3.4 Confronti 59
3.6 Test di degradazione dell'α-tocoferolo 62
3.6.1 α-tocoferolo puro 62
3.6.2 α-tocoferolo nei liposomi 62
3.7 Test di degradazione dell'indometacina 64
3.8 Test di degradazione del menadione 65

**Conclusioni 67**
4.1 Conclusioni 68

**Bibliografia 71**

# Indice delle figure

Figura 1 Rappresentazione schematica del peritoneo [1]. ..... 2

Figura 2 Rappresentazione schematica della finestra terapeutica e ipotetico profilo di concentrazione del farmaco nell'organismo (A: Terapia multi-dose, B: Dose singola, C: Dose singola in forma controllata) [5]. ..... 6

Figura 3 Microcapsula e microsfera. ..... 8

Figura 4 Targeting passivo. ..... 10

Figura 5 Targeting attivo. ..... 10

Figura 6 Schematizzazione della struttura di un liposoma. ..... 11

Figura 7 Monomeri costituenti l'alginato. ..... 20

Figura 8 Rappresentazione schematica di una catena polimerica di alginato. ..... 20

Figura 9 Reticolazione dell'alginato con ioni calcio secondo il modello "egg-box". ..... 21

Figura 10 Struttura chimica della L-α-fosfatidilcolina. ..... 23

Figura 11 Struttura chimica del colesterolo. ..... 24

Figura 12 Struttura chimica dell'α-tocoferolo. ..... 25

Figura 13 Struttura chimica dell'indometacina. ..... 25

Figura 14 Struttura chimica del menadione. ..... 26

Figura 15 HPLC. ..... 28

Figura 16 Spettrofotometro. ..... 30

Figura 17 Schematizzazione dell'apparato simil-microfluidico [12]. ..... 31

Figura 18 Microparticelle di alginato. ..... 34

Figura 19 Rappresentazione schematica dell'impianto di produzione delle microparticelle. ..... 35

Figura 20 Cromatogramma ottenuto dall'analisi del campione S1 effettuata per la taratura del colesterolo. ..... 38

Figura 21 Picchi relativi al colesterolo presenti nei cromatogrammi ottenuti dall'analisi dei campioni preparati per tracciare la retta di taratura del colesterolo. 38

Figura 22 Retta di taratura del colesterolo. 39

Figura 23 Retta di taratura α-tocoferolo in etanolo per spettrofotometro. 42

Figura 24 Retta di taratura α-tocoferolo in etanolo per HPLC. 43

Figura 25 Retta di taratura indometacina. 44

Figura 26 Retta di taratura menadione. 45

Figura 27 Immagine scattata al microscopio delle microparticelle allo 0.3% di alginato e 0.03 M di $CaCl_2$ (4x). 48

Figura 28 Immagine analizzata delle microparticelle allo 0.03% di alginato e 0.03 M di $CaCl_2$ (4x). 49

Figura 29 PSD delle microparticelle allo 0.3% di alginato e 0.03 M di $CaCl_2$. 49

Figura 30 Rilascio di colesterolo dalle microparticelle prodotte con soluzioni 0.3% di alginato e 0.03 M di $CaCl_2$. 50

Figura 31 Foto delle provette Falcon contenenti il sistema di microparticelle allo 0.3% di alginato e 0.03 M di $CaCl_2$ (1. 19 h, 2. 42 h, 3. 66 h). 51

Figura 32 Immagine scattata al microscopio delle microparticelle allo 0.5% di alginato e 0.05 M di $CaCl_2$ (4x). 52

Figura 33 Immagine analizzata delle microparticelle allo 0.5% di alginato e 0.05 M di $CaCl_2$ (4x). 52

Figura 34 PSD delle microparticelle allo 0.5% di alginato e 0.05M di $CaCl_2$. 53

Figura 35 Rilascio di colesterolo dalle microparticelle prodotte con soluzioni 0.5% di alginato e 0.05 M di $CaCl_2$. 54

Figura 36 Foto delle provette Falcon contenenti il sistema di microparticelle allo 0.5% di alginato e 0.05 M di $CaCl_2$ (1. 1 h, 2. 42 h, 3. 334 h). 55

Figura 37 Immagine scattata al microscopio delle microparticelle all'1% di alginato e 0.1 M di $CaCl_2$ (4x). 56

Figura 38 Immagine analizzata delle microparticelle all'1% di alginato e 0.1 M di $CaCl_2$ (4x). 56

Figura 39 PSD delle microparticelle all'1% di alginato e 0.1 M di $CaCl_2$. 57

Figura 40 Rilascio di colesterolo dalle microparticelle prodotte con soluzioni 1% di alginato e 0.1 M di $CaCl_2$. 57

Figura 41 Foto delle provette Falcon contenenti il sistema di microparticelle all'1% di alginato e 0.1 M di $CaCl_2$ (1. 96 h, 2. 162 h, 3. 186 h). 58

Figura 42 Confronto immagini al microscopio (1. 0.3% Alg 0.03M $CaCl_2$; 2. 0.5% Alg 0.05M $CaCl_2$; 3. 1% Alg 0.1M $CaCl_2$). 60

Figura 43 Grafico di confronto dei rilasci di colesterolo ottenuti; le linee costituiscono solo una guida visiva. ..... 61

Figura 44 Esito del test di degradazione dell'α-tocoferolo puro eseguito allo spettrofotometro. ..... 62

Figura 45 Esito del test di degradazione dell'α-tocoferolo nei liposomi eseguito con HPLC. ..... 63

Figura 46 Esito del test di degradazione dell'indometacina eseguito allo spettrofotometro. ..... 64

Figura 47 Esito del test di degradazione del menadione eseguito allo spettrofotometro. ..... 65

# Indice delle tabelle

Tabella 1 Soluzioni preparate per costruire la retta di taratura del colesterolo..... 37

Tabella 2 Parametri operativi del metodo HPLC per la quantificazione del colesterolo. ..... 40

Tabella 3 Diametri medi delle microparticelle prodotte. ..... 59

# Abstract

The peritoneum is a serous membrane which covers the inner walls of the abdominal and pelvic cavities and also covers the organs located within those cavities, delimiting a virtual space, known as the intraperitoneal cavity. Peritoneal carcinomatosis is a very aggressive cancer, due to the metastatic spread of neoplastic cells derived from primary cancers in organs near the peritoneal cavity. The aim of this work is the development of a new drug delivery system that it has to be combined with cytoreductive surgery (CRS), the complete removal of macroscopically visible desease, as an adjuvant technique to destroy all microscopic tumor deposits still present in the peritoneal cavity after surgery. More specifically, NiMDS (Nanoparticles-in-Microparticles Delivery Systems) have been produced, characterized by liposome encapsulated in alginate microparticles. The microparticles were produced thanks to the mechanism of ionotropic gelation: cross-linking of alginate takes place due to the interaction between sodium alginate and divalent cations $Ca^{2+}$. The gels were obtained by spraying the alginate/liposomes solution and the calcium solution through each other in air. With this method, liposomes were successfully encapsulated in the microparticles. Several microparticles systems containing liposomes were prepared using different concentrations of alginate and $CaCl_2$ and the release of liposomes from these microvectors was investigated by measuring the concentration of cholesterol, constituent part of the liposomal membrane, present in the dissolution bulk. The microparticle system produced with 0.5% alginate solution and a 0.05 M $CaCl_2$ solution showed the most promising results: a controlled and regular release was observed for fourteen days, in agreement with the therapeutic needs. Therefore, the encapsulation of liposomal nanovectors in alginate microparticles could effectively represent a valid strategy to release drugs in a sustained manner. After having identified the

system with optimal release properties, the degradation times of different potential model drugs were tested, with the aim of incorporating those molecules into the liposomes. Future experiments have to be performed in order to evaluate the release performance of these model drugs.

# Bibliografia


1. https://medicinaonline.co/2017/03/17/differenza-tra-peritoneo-parietale-e-viscerale/, consultato il 06/09/2019
2. Mezzogiorno V., Mezzogiorno A., Compendio di anatomia umana, Piccin Nuova Libraria S.p.A., (1994).
3. http://rand-biotech.com/it/rand-hipec-hithoc-ipertermia-carcinosi-perfusione/hipec-chemio-ipertermia-intraperitoneale-carcinosi-peritoneale/, consultato il 06/09/2019
4. Wiebke Solaß, MD, Urs Giger-Pabst, MD, Jürgen Zieren, and Marc A. Reymond, Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC): Occupational Health and Safety Aspects, Annals of surgical oncology (2013) 3504–3511, doi: 10.1245/s10434-013-3039-x.
5. http://docenti.unicam.it/tmp/3603.pdf, consultato il 06/09/2019
6. Scognamiglio I., Nanovettori a base lipidica per la veicolazione di farmaci, Tesi di dottorato di Ricerca in Scienze farmaceutiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, (2011).
7. Julieta C. Imperiale, Alejandro Sosnik, Nanoparticle-in-Microparticle Delivery Systems (NiMDS): Production, Administration Routes and Clinical Potential, Journal of Biomaterials and Tissue Engineering Vol. 3, 22-38, (2013).
8. Isamu Takagi, Hidekazu Shimizu, Toshihisa Yotsuyanagi, Application of Alginate Gel as a Vehicle for Liposomes. I. Factors Affecting the Loading of Drug-Containing Liposomes and Drug Release, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, Japan (1996).
9. Chuanyun Dai, Bochu Wang, Hongwei Zhao, Biao Li, Factors affecting protein release from microcapsule prepared by liposome in alginate, Chongqing University, China (2004).
10. Daems C., Intraperitoneal cancer treatment: alginate microparticles loaded with liposomes, Tesi di laurea in Scienze farmaceutiche, Università degli Studi di Salerno, Ghent University, (2019).

11. Cascone S., Microincapsulazione di farmaci in biopolimeri mediante atomizzazione assistita da ultrasuoni, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno (2009).

12. Bochicchio S., Dalmoro A., Recupido F., Lamberti G., Barba A.A., Nanoliposomes Production by a Protocol Based on a Simil-Microfluidic Approach, Università degli Studi di Salerno, (2018), DOI 10.1007/978-3-319-62027-5_1.

13. Lamberti R., Preparazione di sistemi farmaceutici a rilascio controllato nel tratto GI, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno (2013).

14. Johanna K. Lang, Quantitative determination of cholesterol in liposome drug products and raw materials by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography, 507 (1990) 157-163.