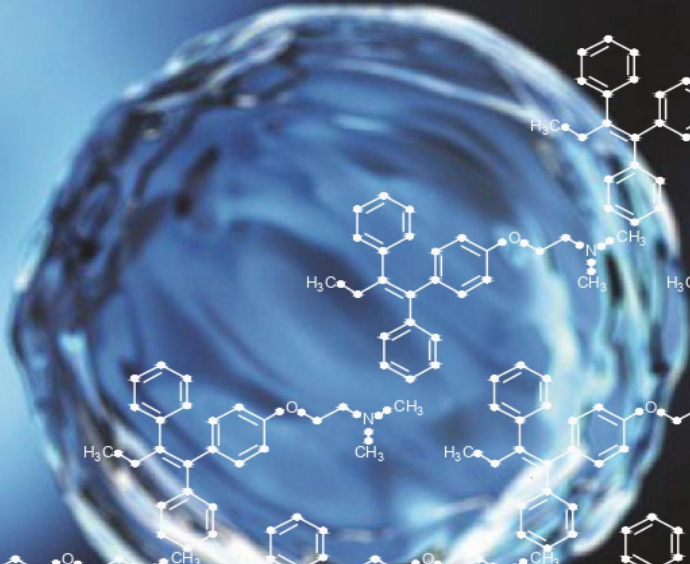
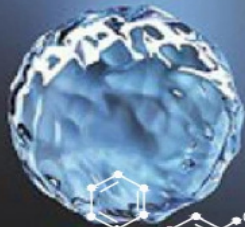
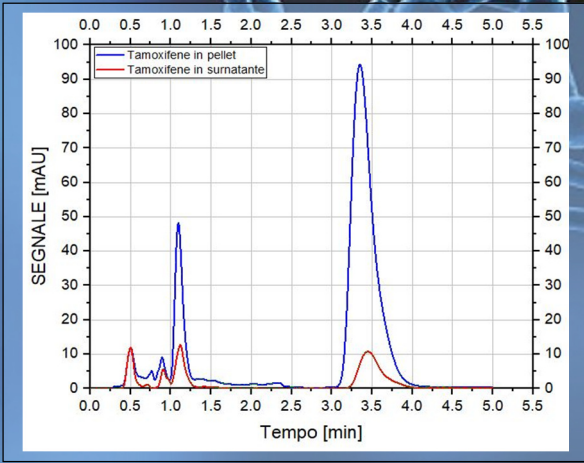


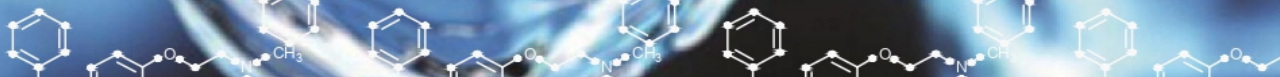


# Produzione di vettori nanoliposomiali per terapie oncologiche

## Tesi di Laurea in Ingegneria Chimica



**Eleonora Muccio**





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

**Dipartimento di Ingegneria Industriale**

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

# **Produzione di vettori nanoliposomiali per terapie oncologiche**

Tesi in

**Principi di Ingegneria Chimica**

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Ing. Anna Angela Barba

Correlatore:

Ing. Annalisa Dalmoro

Candidata:

Eleonora Muccio

matricola 0612201670

**Anno Accademico 2018/2019**



*A papà,  
a mamma,  
a mio fratello*

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

La data prevista per la discussione della tesi è il 25 Ottobre 2019.

Fisciano, 17 Ottobre 2019.

# Sommario

<b>Sommario</b> .....	I
<b>Indice delle figure</b> .....	V
<b>Indice delle tabelle</b> .....	VII
<b>Abstract</b> .....	IX
<b>Introduzione</b> .....	1
1.1 Sistemi di <i>Drug Delivery</i> in ambito oncologico .....	2
1.1.1 Biodisponibilità dei farmaci antineoplastici .....	2
1.1.2 Gli Smart Drug Delivery Systems, (DDSs) .....	3
1.1.3 Target attivo e passivo .....	5
1.2 Liposomi: sistema di <i>Smart Drug Delivery Systems</i> .....	6
1.2.1 Liposomi: aspetti generali e proprietà .....	6
1.2.2 Classificazione delle vescicole .....	8
1.2.3 Interazione dei liposomi con target biologici .....	9
1.3 Liposomi come <i>carrier</i> di farmaci oncologici .....	10
1.4 Microincapsulazione di vettori nanoliposomiali in ambito oncologico .....	11
1.4.1 Microparticelle .....	11
1.4.2 Uso combinato di micro e nanoparticelle .....	12
1.4.3 Alginato come mezzo per l'incapsulamento di liposomi .....	13

---

---

1.5 Obiettivi di tesi.....	17
<b>Materiali, metodi e apparecchiature.....</b>	<b>19</b>
2.1 Materiali.....	20
2.1.1 Tamoxifene _____	20
2.1.2 L- $\alpha$ -fosfatidilcolina di soia _____	21
2.1.3 Colesterolo _____	22
2.1.4 Alginato di sodio _____	23
2.1.5 Triton X-100 _____	24
2.1.6 Altri materiali _____	25
2.2 Apparecchiature .....	26
2.2.1 Set up sperimentale utilizzato per la produzione di liposomi _____	26
2.2.2 Impianto di produzione microparticelle _____	28
2.2.3 High Performance Liquid Chromatography - HPLC _____	30
2.2.4 Nano Zeta Sizer _____	31
2.2.5 Ultracentrifuga _____	32
2.2.6 Sonicatore _____	33
2.2.7 Altre apparecchiature _____	34
2.3 Metodi.....	35
2.3.1 Produzione di liposomi incapsulanti Tamoxifene __	35
2.3.2 Caratterizzazione dei sistemi liposomiali _____	35
2.3.2.a Determinazione delle dimensioni e del potenziale Z dei sistemi liposomiali	35
2.3.2.b Determinazione dell'efficienza di incapsulamento e carico	36
2.3.3 Test di stabilità _____	39
2.3.4 Produzione liposomi incapsulanti Tamoxifene rivestiti da alginato di sodio _____	39

---

Sommario e indici.	Pag. III
2.3.4.a Preparazione soluzione di reticolazione	39
2.3.4.b Preparazione soluzione tampone	40
2.3.4.c Preparazione soluzione di alginato	40
2.3.4.d Processo di produzione di microparticelle	40
2.3.5 Caratterizzazione dei sistemi microparticelle incapsulanti liposomi	41
2.3.5.a Determinazione delle dimensioni delle microparticelle incapsulanti liposomi	41
2.3.5.b Determinazione dell'efficienza di incapsulamento delle microparticelle	42
<b>Risultati e discussioni</b>	<b>43</b>
3.1 Produzione e caratterizzazione dei sistemi liposomiali contenenti Tamoxifene	44
3.1.1 Determinazione delle dimensioni e del potenziale zeta	44
3.2.2 Efficienza di incapsulamento e carico	45
3.2.3 Stabilità nel tempo	47
3.2 Produzione e caratterizzazione di sistemi microparticellari incapsulanti liposomi	51
3.2.1 Determinazione delle dimensioni	51
3.2.2 Efficienza di incapsulamento	54
<b>Conclusioni</b>	<b>57</b>
4.1 Conclusioni	58
<b>Bibliografia</b>	<b>59</b>
<b>Ringraziamenti</b>	<b>61</b>

---





## Indice delle figure

Figura 1. Vie di somministrazione di un farmaco [4].....	3
Figura 2. A) somministrazioni ripetute di compresse a rilascio convenzionale; B) il superamento della dose tossica conseguente la somministrazione di una compressa a rilascio convenzionale; C) somministrazione di una compressa a rilascio prolungato [5]. .....	4
Figura 3. A) Target passivo, B) Target attivo [7] .....	6
Figura 4. A) Schematizzazione di un fosfolipide, B) disposizione a doppio strato [9] .....	6
Figura 5. Trasporto composti attivi all'interno dell'organismo umano [10].....	7
Figura 6. Schematizzazione delle tipologie di vescicole [8].....	8
Figura 7. Struttura di un liposoma multilamellare [8] .....	9
Figura 8. Meccanismi secondo cui i liposomi possono interagire con cellule [2] .....	9
Figura 9. Microcapsula (sx) e microsfera (dx) [15].....	11
Figura 10. Chemioterapia Intraperitoneale a Flusso d'Aria Pressurizzata (PIPAC) [19] 14	
Figura 11. Liposomi ricoperti da alginato .....	16
Figura 12. Struttura molecolare del Tamoxifene.....	20
Figura 13. Struttura molecolare della Fosfatidilcolina .....	21
Figura 14. Doppio strato lipidico, bilayer.....	21
Figura 15. L- $\alpha$ -fosfatidilcolina di soia.....	21
Figura 16. Struttura molecolare del Colesterolo.....	22
Figura 17. Interazione tra colesterolo e fosfolipidi.....	22
Figura 18. Struttura chimica dell'Alginato di Sodio .....	23
Figura 19. Modello egg-box dell'Alginato di Sodio .....	23
Figura 20. Struttura molecolare Triton X-100.....	24
Figura 21. Schematizzazione del set up sperimentale finalizzato alla produzione di nanovettori liposomiali [22] .....	26
Figura 22. Foto del set up sperimentale utilizzato per la produzione di nanovettori liposomiali.....	28
Figura 23. Schematizzazione dell'impianto utilizzato per la produzione di microparticelle [15] .....	29

---

---

Figura 24. Foto dell'impianto di produzione di microparticelle.....	29
Figura 25. Foto HPLC Agilent 1260 Infinity.....	30
Figura 26. Nano Zeta Sizer (Malvern, UK) .....	31
Figura 27. Diagramma del potenziale elettrico .....	32
Figura 28. Ultracentrifuga Beckman Optima L-90K.....	33
Figura 29. VCX 130 PB-130 W.....	33
Figura 30. Retta di taratura Tamoxifene.....	38
Figura 31. Microparticelle di alginato .....	41
Figura 32. Size Numerica dei liposomi tal quali.....	45
Figura 33. Cromatogramma Tamoxifene incapsulato in liposomi.....	46
Figura 34. Evoluzione nel tempo della <i>Z-average</i> dei liposomi incapsulanti Tamoxifene.....	47
Figura 35. Evoluzione nel tempo della size numerica dei liposomi incapsulanti Tamoxifene.....	48
Figura 36. Evoluzione nel tempo della polidispersità dei liposomi incapsulanti Tamoxifene.....	48
Figura 37. Evoluzione nel tempo del potenziale zeta dei liposomi incapsulanti Tamoxifene.....	49
Figura 38. Efficienza di incapsulamento di Tamoxifene nel tempo .....	50
Figura 39. Microparticelle incapsulanti liposomi, 10X .....	51
Figura 40. Immagine analizzata con Custom MATLAB.....	52
Figura 41. Foto di liposomi visti al microscopio ottico, 10X .....	53
Figura 42. Foto di particelle di alginato vuote visto al microscopio ottico, 10X.....	53
Figura 43. Microparticelle incapsulanti liposomi, 40x .....	54

---

---

## Indice delle tabelle

Tabella 1. Parametri di esercizio HPLC .....	37
Tabella 2. Punti della retta di taratura del Tamoxifene.....	38
Tabella 3. Valori di potenziale Z, diametro medio numerico, PDI e <i>Z-average</i> .....	44
Tabella 4. Efficienza di incapsulamento di liposomi carichi di Tamoxifene.....	45
Tabella 5. Percentuale di TAM nel surnatante dopo Step 1 e Step 2.....	54

---



## Abstract

*The main obstacle to the administration of some antitumor compounds is the instability in physiological conditions, which reduces therapeutic efficacy and increases toxicity for the body. Administration of antineoplastic drugs is associated with serious and numerous side effects, which is why it is interesting to develop new drug delivery systems. In this work, liposomes have been produced that encapsulate Tamoxifen, a drug belonging to the class of non-steroidal antiestrogens, used in the treatment of different types of cancer, particularly breast cancer. Tamoxifen has been encapsulated in liposomes with an innovative low-cost technique called simi-microfluidic, developed by the TPP research group. The liposomes obtained showed dimensional homogeneity, excellent loading efficiency of the active ingredient and good stability over time. Thus, microparticles containing liposomes were produced that encapsulate tamoxifen (nanoparticle release systems in microparticles, NiMDS) as a new drug delivery system for peritoneal carcinosis. NiMDS have been produced thanks to the ionotropic gelation mechanism: the alginate crosslinking takes place thanks to the interaction between sodium alginate and bivalent  $\text{Ca}^{++}$  cations. The microparticles were obtained by spraying the alginate / nanoliposomes solution against the calcium solution spray. The results show that nanoliposomes have been successfully encapsulated in microparticles. The encapsulation of antineoplastic drugs and the production of liposomal nanovectors in alginate microparticles could effectively represent two valid strategies to formulate new drug delivery systems against different types of cancer.*

---

# Bibliografia

1. <https://www.eupati.eu/it/sviluppo-clinico-e-studi-clinici/biodisponibilita-e-bioequivalenza/>
2. Ravazzolo E., Sviluppo di nanovettori intelligenti per il targeting sito-specifico di sistemi terapeutici, Tesi di dottorato in Scienze Molecolari, Università degli studi di Padova, (2013)
3. Guarav Tiwari et al., Drug delivery systems: An updated review, Int J Pharm Investing. 2012 Jan-Mar; 2(1):2-11,10.4103/2230-973X.96920
4. Muhammad K., KMichael R. (2018/09/01); Challenges and innovations of drug delivery in older age; Advanced Drug Delivery Reviews ER, 135, 09/2018
5. Argenziano M. (2012); Tecnologia in pillole. Una 'forma farmaceutica' per il rilascio controllato; L'alambicco N°2 - Anno II - Febbraio 2012
6. Campodoni E., Sintesi e caratterizzazione di nanosistemi biocompatibili per drug delivery nel trattamento dell'Alzheimer, Tesi di laurea magistrale in chimica industriale, Università di Bologna, (2013)
7. <https://slideplayer.com/slide/8387484/>
8. [www.galenotech.org/liposomi.html](http://www.galenotech.org/liposomi.html)
9. <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/liposomi.html>
10. <https://www.cibdol.it/blog/619-che-cosa-sono-i-liposomi-e-perche-la-cibdol-ne-fa-ampio-uso>
11. 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
12. Chan, 2002; O'Regan & Jordan, 2002; Kramer & Brown, 2004; Perez, 2007; Alfirevic & Pirmohamed, 2008; Li et al., 2008; Sirisabya et al., 2008
13. Amit B., Rajiv K., Om Prakash K., Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation, University Institute of Pharmaceutical Sciences, (2004)
14. <http://gruppotpp.unisa.it/micro-e-nano-particelle-polimeriche-definizione-e-utilita/>
15. Nevola C., Studio del rilascio di nanovettori liposomiali da microparticelle di alginato per applicazioni intraperitoneali, Tesi di laurea in Principi di Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno, (2019)

16. 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).
17. Daems C., Intraperitoneal cancer treatment: alginate microparticles loaded with liposomes, Tesi di laurea in Scienze farmaceutiche, Università degli Studi di Salerno, Ghent University, (2019)
18. <https://www.my-personaltrainer.it/benessere/carcinosi-peritoneale.html>
19. <http://www.chirurgiaeoncologia.it/PIPAC.html>
20. J 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.
21. Mannina P., Sistemi biopolimerici multiunità preparati per la gelazione ionotropica, Tesi di dottorato di ricerca in scienza delle sostanze bioattive, Università degli del Piemonte Orientale, (2014)
22. Boichichio S., “Nanostructured vectors for the transport of active molecules through biological membranes for pharmaceutical and nutraceutical applications”, PhD in Industrial Engineering at University of Salerno, (2014).
23. Cattel L. (2008); I farmaci con incapsulazione liposomiale in oncologia, dall'innovazione tecnologica all'impiego clinico; Cagliari Giugno 2005, *Innovazioni terapeutiche in Oncologia Medica*, Dip. di scienza e tecnologia del farmaco, Università di Torino
24. JMuller R.H., Mader K., Gohla S.. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery – a Review of the State of the Art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2000, 50: 161-177
25. Recupido F., (2016), Produzioni di nanoliposomi per applicazioni nutraceutiche mediante un approccio simil-microfluidico, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica Università degli Studi di Salerno
26. Tonini V., (2011), Sintesi e caratterizzazione di nanoparticelle bimetalliche Pd/Au E Pd/Cu, Tesi di Laurea in Chimica Industriale Università degli Studi di Bologna
27. Mohammadi M., Ghanbarzadeh B., Hamishehkar H., “Formulation of Nanoliposomal Vitamin D3 for Potential Application in Beverage Fortification”, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 569-575 (2014)
28. Buddhadev L., Biswajit M., Tamoxifen Citrate Encapsulated Sustained Release Liposomes: Preparation and Evaluation of Physicochemical Properties, *Jadavpur University*, (2009), DOI: 10.3797/scipharm.0911-11.
29. Amit B., Rajiv K., Om Prakash K., Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation, *University Institute of Pharmaceutical Sciences*, (2004)



# Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Gaetano Lamberti per avermi dato la possibilità di prender parte a questo lavoro di tesi, di lavorare nel suo team e per avermi fatto conoscere, ed apprezzare, il mondo della ricerca universitaria. La ringrazio per i tanti insegnamenti, trasmessi con passione ed entusiasmo, durante questi anni di studio.

Ringrazio la Prof.ssa Anna Angela Barba per la gentilezza, premura ed attenzione sempre mostrata nei miei riguardi. Per avermi dato la possibilità di migliorare la mia conoscenza scientifica e di acquisire nuove competenze; il suo modo di affrontare i problemi e fare ricerca vuole essere una luce guida per il futuro.

Ringrazio la mia correlatrice l'Ing. Annalisa Dalmoro, per essere stata fonte inesauribile di conoscenza. Per avermi condotta in questi mesi verso la ribellione delle macchine, senza la quale non avrei imparato così tanto e per aver ascoltato i miei "brillanti" ragionamenti e aver gioito dei piccoli traguardi raggiunti ma anche di quelli non conseguiti. È stato un onore incommensurabile poter lavorare con te e mi auguro, un giorno, di poter avere un centesimo della tua conoscenza. Infinitamente grazie, per avermi spronata a dare sempre il meglio, per avermi mostrato che solo affrontando i propri insuccessi si possono ottenere grandi successi e che non avere un risultato è già un risultato. Grazie Lisa, per avermi mostrato gli insegnamenti e non solamente trasmessi per parola, questo è stato il più insegnamento che potessi trasmettermi.

Ringrazio l'Ing. Veronica De Simone per aver resto questi mesi luminosi nei momenti bui, per i racconti, consigli e caffè presi insieme. Hai reso il tirocinio più bello di quanto avessi immaginato e non potrò mai ringraziarti abbastanza per avermi accolta ed essere stata parte della mia seconda famiglia in questi

mesi di tirocinio. Senza la tua presenza non sarebbe stato lo stesso.

Ringrazio Caterina, Alessandra, Simona, Annalaura, Anna, Giada ed Ilenia per aver reso le giornate universitarie così piacevoli e divertenti. Mi avete regalato momenti di spensieratezza, risate a crepelle e conforto nei momenti più difficili di questa triennale. Grazie per avermi accettata per come sono e per essere stata presenza costante ma non assillante. Senza di voi, non sarebbero stati gli anni migliori passati in questa università. Mi auguro di poter condividere con voi ancora tanti momenti.

Ringrazio Nunzia, la mia adorata romanina, per essere diventata compagna di vita e non semplice collega di corso. Le lezioni passate insieme, le pause caffè, i pranzi sulle scale, le mille figuracce e tutti gli esami affrontati, accompagnati da un numero non quantificabile di messaggi audio scambiati, hanno lasciato ricordi indelebili che mai potrò cancellare. Grazie per esserci stata ogni giorno, supportandomi e sopportami senza esitazione; per aver affrontato con me non solo gli ostacoli universitari ma anche, e soprattutto, i problemi personali. Ti voglio bene, nel mondo più sincero e profondo e questa laurea è anche tua, perché senza di te, ora, non sarei a festeggiare questo traguardo. Ti auguro il meglio che la vita possa offrirti. Io sarò sempre qui accanto a te, a supportarti con altrettanti messaggi audio.

Ringrazio Sara, Anita, Ilaria A. e Modestino per aver condiviso momenti di felicità e preoccupazioni nonostante le distanze che ci dividono. Mi avete dimostrato che l'amicizia non dipende dai km che separano ma dalla volontà di accorciarli.

Ringrazio Alessia, adorata cognata, per tutti gli anni condivisi insieme, per le serate, gli sfoghi, le giornate passate a lamentarci di ogni cosa. Non sempre si cercano consigli, a volte si ha bisogno solo di qualcuno che ascolti, e tu, ci sei sempre stata. Non potevo desiderare cognata migliore.

Ringrazio Elvira e Paolo, per avermi accolta come figlia nella loro famiglia e aver avuto sempre una parola di conforto e di spensieratezza nei momenti in cui, pur non sapendolo, ne avevo bisogno.

Immensamente grazie a Bernardino, conosciuto proprio in una di queste aule, durante un brutto periodo in cui non ero più sicura di niente, non sentivo più mio questo percorso e avrei voluto mollare tutto. Sei entrato di soppiatto tra le mie convinzioni e le hai stravolte con premura, forza e dolcezza. Mi hai sostenuta nei momenti difficili tenendomi la mano, ad ogni passo, con inesauribile pazienza. Hai condiviso senza remora i giorni, le festività e le notti di studio accompagnandomi ad ogni esame, tifando, gioendo e piangendo, solo come chi ti ama davvero sa fare. Mi hai insegnato a vedere le cose con occhi diversi, a credere in me e a pensare di poter costruire, ogni giorno, qualcosa di bello con le mie sole forze, perché: *“tu puoi farcela, smettila di pensare il contrario”*. Vorrei dirti che sei l’unica cosa bella che ho e sembrerebbe una frase banale ma non renderebbe giustizia alla cosa più preziosa che mi hai regalato in questi anni: il concetto di autostima e di forza che mai devo mettere in discussione. Hai arricchito la mia vita e senza te, oggi, non sarei la persona che sono. Perciò mi sento in dovere di dirti grazie e forse bastava solo questo: una pagina vuota con un enorme grazie scritto al centro. Al centro di tutto, come te.

Grazie ad Emanuele pilastro fisso della mia esistenza, per essere il miglior fratello che potessi desiderare. Non servono molte parole tra noi ma la tua presenza è stata per me punto di riferimento. Spero di averti reso orgoglioso di me, come io lo sono di te. Questa laurea è anche tua.

Ringrazio i miei nonni, Maria e Benito, per avermi cresciuta nella genuinità di un tempo. Per essere stati secondi genitori e avermi amata incondizionatamente come solo i nonni sanno fare. Grazie nonni, per aver creduto in me ed avermi vista come la super nipote che stava diventando dottoressa. L’orgoglio nei vostri occhi e la felicità che vi ho letto è il più bel regalo che potessi ricevere. Mi avete accompagnata attraverso questi anni mano nella mano ed io non saprò mai ringraziarvi abbastanza. Condividere questo giorno con voi è la cosa più bella.

Un ringraziamento speciale va ai miei genitori, Giacomo e Patrizia, i quali, fin da quando ero bambina, mi hanno spronato a continuare gli studi. Grazie per avermi sopportata in tutti i giorni di nervosismo, per tutte le cene lamentose che avete dovuto sopportare. Grazie per avermi accompagnato fino ad ora

---

arricchendomi con i vostri insegnamenti e dimostrandomi, a fatti più che a parole, che persone nella vita si debba aspirare ad essere. La vostra dedizione al lavoro, alla famiglia, alla serietà nelle azioni compiute, alla responsabilità nel fare, e credere, sono le luci guida con cui ho affrontato il mio percorso di studi e con cui desidero affrontare il futuro che mi attende. Spero di avervi reso orgogliosi di me, almeno un decimo di quanto io lo sono di voi. Grazie per essere, ed essere stati, la mia mamma e il mio papà perfetti. Questa laurea è soprattutto vostra.

Alla fine, questi ultimi ringraziamenti li dedico a me. Al mio non essermi mai arresa, all'aver imparato sempre dai miei errori, a tutti i sacrifici fatti per lo studio in questi anni. A me stessa e a tutte le volte che ho pensato "*non ce la faccio*", "*non ce la posso fare da sola*", ma poi ce l'ho fatta; ho superato le mie paure e ce l'ho fatta sempre. Non importa quante volte sia caduta, ma quante volte mi sia rialzata per seguire questo mio sogno. Sono stati gli anni più belli e più duri fino ad ora vissuti, sono diversa da quando entrai in quello stravagante edificio blu puffo, ma ciò che ho imparato è per ora incommensurabile, è un mio piccolo sogno si è avverato. Questa laurea triennale, tanto sudata e desiderata è finalmente arrivata.

*Ad maiora semper!*

---