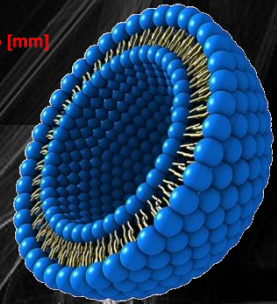
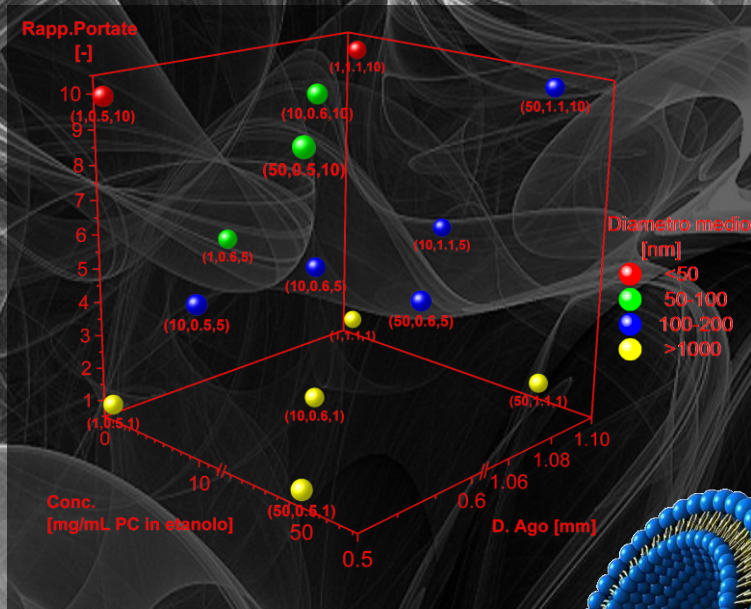


# Influenza delle condizioni operative nella produzione di liposomi

Influenza delle condizioni operative nella produzione di liposomi



Luca Ivan Vicinanza

Luca Ivan Vicinanza



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

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

# **Influenza delle condizioni operative nella produzione di liposomi**

Tesi in  
**Principi di Ingegneria Chimica**

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Ing. Sara Cascone

Ing. Annalisa Dalmoro

Candidato:

Luca Ivan Vicinanza

Matricola 0612201724

**Anno Accademico 2017/2018**



*A me!*

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

La data prevista per la discussione della tesi è il 20/12/18

Fisciano, 12/12/2018

# Sommario

<b>Sommario.....</b>	<b>I</b>
<b>Indice delle figure.....</b>	<b>V</b>
<b>Indice delle tabelle .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XI</b>
<b>Introduzione .....</b>	<b>1</b>
1.1 Definizione di liposoma: struttura e proprietà.....	2
1.2 Classificazione dei liposomi .....	5
1.3 Modifiche indotte nei liposomi .....	6
1.4 Stato dell'arte.....	7
1.5 Obiettivi.....	9
<b>Materiali, apparecchiature e metodi.....</b>	<b>11</b>
2.1 Materiali .....	12
2.1.1 Fosfatidilcolina.....	12
2.1.2 Solventi.....	12
2.2 Apparecchiature.....	13
2.2.1 Impianto per la produzione di liposomi.....	13
2.2.2 Turbidimetro.....	14
2.2.3 Nano Zetasizer.....	15

---

2.2.4 Master Sizer	17
2.3 Metodi _____	18
2.3.1 Progettazione esperimenti tramite DOE	18
2.3.2 Caratterizzazione dei sistemi liposomiali	20
2.3.3 Funzioni di distribuzione delle dimensioni	22
<b>Risultati e discussione .....</b>	<b>25</b>
3.1 Distribuzioni dimensionali _____	26
3.1.1 Concentrazione 1 mg/mL PC in etanolo	26
<b>RUN1 .....</b>	<b>26</b>
<b>RUN3 .....</b>	<b>31</b>
<b>RUN4 .....</b>	<b>33</b>
<b>RUN5 .....</b>	<b>35</b>
3.1.2 Concentrazione 10 mg/mL PC in etanolo	37
<b>RUN6 .....</b>	<b>37</b>
<b>RUN7 .....</b>	<b>39</b>
<b>RUN8 .....</b>	<b>41</b>
<b>RUN9 .....</b>	<b>43</b>
<b>RUN10 .....</b>	<b>45</b>
3.1.3 Concentrazione 50 mg/mL PC in etanolo	47
<b>RUN11 .....</b>	<b>47</b>
<b>RUN12 .....</b>	<b>50</b>
<b>RUN13 .....</b>	<b>52</b>
<b>RUN14 .....</b>	<b>53</b>
<b>RUN15 .....</b>	<b>55</b>
3.2 Discussioni _____	57
3.2.1 Torbidità campioni	57
3.2.2 Dimensioni dei liposomi	58
3.3 Confronti _____	61
<b>Conclusioni.....</b>	<b>63</b>

---

Sommario e indici. Pag. III

---

4.1 Conclusioni \_\_\_\_\_ 64

**Bibliografia ..... 67**

---





## Indice delle figure

Figura 1. Struttura di un fosfolipide, la fosfatidilcolina [2].	2
Figura 2. Struttura del liposoma e possibili collocazioni delle molecole attive al suo interno [2].	3
Figura 3. Meccanismo di rilascio [2].	4
Figura 4. Classificazione dei liposomi in base a lamellarità e dimensioni [2].	6
Figura 5. Immagine Impianto studio Pradhan et al [6].	8
Figura 6. Fotografia impianto simil-microfluidico.	13
Figura 7. Schematizzazione dell'intersezione dei flussi.	14
Figura 8. Diffrazione della luce sulle particelle [9].	17
Figura 9. Struttura del modello Box-Behnken.	19
Figura 10. Trasformazione da distribuzione volumetrica a distribuzione numerica.	24
Figura 11. Distribuzione numerica <i>RUN1</i> .	26
Figura 12. Distribuzione volumetrica <i>RUN1</i> .	27
Figura 13. Immagine campione <i>RUN1</i> .	28
Figura 14. Distribuzione numerica <i>RUN2</i> .	29
Figura 15. Distribuzione volumetrica <i>RUN2</i> .	29
Figura 16. Immagine campione <i>RUN2</i> .	30
Figura 17. Distribuzione numerica <i>RUN3</i> .	31
Figura 18. Distribuzione volumetrica <i>RUN3</i> .	31
Figura 19. Immagine campione <i>RUN3</i> .	32
Figura 20. Distribuzione numerica <i>RUN4</i> .	33
Figura 21. Distribuzione volumetrica <i>RUN4</i> .	33
Figura 22. Immagine campione <i>RUN4</i> .	34
Figura 23. Distribuzione numerica <i>RUN5</i> .	35

---

Figura 24. Distribuzione volumetrica <i>RUN5</i> .....	35
Figura 25. Immagine campione <i>RUN5</i> .....	36
Figura 26. Distribuzione numerica <i>RUN6</i> .....	37
Figura 27. Distribuzione volumetrica <i>RUN6</i> .....	37
Figura 28. Immagine campione <i>RUN6</i> .....	38
Figura 29. Distribuzione numerica <i>RUN7</i> .....	39
Figura 30. Distribuzione volumetrica <i>RUN7</i> .....	39
Figura 31. Immagine campione <i>RUN7</i> .....	40
Figura 32. Distribuzione numerica <i>RUN8</i> .....	41
Figura 33. Distribuzione volumetrica <i>RUN8</i> .....	41
Figura 34. Immagine campione <i>RUN8</i> .....	42
Figura 35. Distribuzione numerica <i>RUN9</i> .....	43
Figura 36. Distribuzione volumetrica <i>RUN9</i> .....	43
Figura 37. Immagine campione <i>RUN9</i> .....	44
Figura 38. Distribuzione numerica <i>RUN10</i> .....	45
Figura 39. Distribuzione volumetrica <i>RUN10</i> .....	45
Figura 40. Immagine campione <i>RUN10</i> .....	46
Figura 41. Distribuzione numerica <i>RUN11</i> .....	48
Figura 42. Distribuzione volumetrica <i>RUN11</i> .....	48
Figura 43. Immagine campione <i>RUN11</i> .....	49
Figura 44. Distribuzione numerica <i>RUN12</i> .....	50
Figura 45. Distribuzione volumetrica <i>RUN12</i> .....	50
Figura 46. Immagine campione <i>RUN12</i> .....	51
Figura 47. Distribuzione numerica <i>RUN13</i> .....	52
Figura 48. Distribuzione volumetrica <i>RUN13</i> .....	52
Figura 49. Distribuzione numerica <i>RUN14</i> .....	53
Figura 50. Distribuzione volumetrica <i>RUN14</i> .....	54
Figura 51. Immagine campione <i>RUN14</i> .....	54
Figura 52. Distribuzione numerica <i>RUN15</i> .....	55
Figura 53. Distribuzione volumetrica <i>RUN15</i> .....	55
Figura 54. Immagine campione <i>RUN15</i> .....	56
Figura 55. Andamento torbidità vs concentrazione finale.....	57

---

---

Figura 56. Diametri medi risultanti sulla struttura Box-Behnken..... 59



## Indice delle tabelle

Tabella 1. Composizione della L- $\alpha$ -fosfatidilcolina. ....	12
Tabella 2. Valore dei livelli di variazione dei parametri.....	18
Tabella 3. Tabella delle condizioni operative degli esperimenti.....	20
Tabella 4. Tabella con i valori salienti <i>RUN1</i> .....	28
Tabella 5. Tabella con i valori salienti <i>RUN2</i> .....	30
Tabella 6. Tabella con i valori salienti <i>RUN3</i> .....	32
Tabella 7. Tabella con i valori salienti <i>RUN4</i> .....	34
Tabella 8. Tabella con i valori salienti <i>RUN5</i> .....	36
Tabella 9. Tabella con i valori salienti <i>RUN6</i> .....	38
Tabella 10. Tabella con i valori salienti <i>RUN7</i> .....	40
Tabella 11. Tabella con i valori salienti <i>RUN8</i> .....	42
Tabella 12. Tabella con i valori salienti <i>RUN9</i> .....	44
Tabella 13. Tabella con i valori salienti <i>RUN10</i> .....	46
Tabella 14. Tabella con i valori salienti <i>RUN12</i> .....	51
Tabella 15. Tabella con i valori salienti <i>RUN13</i> .....	53
Tabella 16. Tabella con i valori salienti <i>RUN14</i> .....	54
Tabella 17. Tabella con i valori salienti <i>RUN15</i> .....	56
Tabella 18. Tabella con i valori di rilievo di tutta sperimentazione.....	60

---



# Abstract

Liposomes are phospholipid vesicles, which in the last decades attracted a lot of interest in pharmaceutical field, as carriers of drug and active molecules, being biocompatible and selective towards the target organ for which they were designed.

The aim of this thesis is to evaluate the influence of operative parameters in the liposomes production process, through a microfluidic-like plant system, realized by the Transport Phenomena and Process group, on their final dimension. The plant is composed of: two peristaltic pumps connected to the corresponding power suppliers, two silicone tubes and a needle which creates the crossing section between the deionized water flow and the alcohol solution flow. Compared to other methods of liposome production, this method is simpler, faster and cheaper and has the potential to be reproduced on large scale.

The operative variables taken in account in this work are the lipid concentration (phosphatidylcholine) in the alcoholic solution (C), the ratio between alcoholic solution flow and hydrating solvent flow (R), and the diameter of the needle used to guarantee the interdiffusion within the plant (D); each variable has been changed on 3 levels (-1, 0, +1). To achieve this goal an experimental design was created to allow to study most of the combinations of the variables with the least number of experiments. The type of Design of Experiment chosen was Box Behnken, thanks to which from an initial number of 27 experiments, it led to only 15 experiments per batch, almost halving the experimental work necessary to investigate any existing correlations. Through the combinations of the parameters in the experiments carried out it was possible to understand the effective influence of each variable and also its relative weight. For the characterization of the liposomal systems produced, three instruments



were used: a turbidimeter to evaluate the turbidity, and two devices for the determination of dimensional distributions: the nano zetasizer and the master sizer.

From the results it emerged that the variable with the greatest influence is the ratio between flow rates (which is the real rudder of this experimentation). Even for the concentration of the solution it was possible to identify an influence, albeit minimal, while for the third variable, the diameter of the needle, it was discovered that it presents a negligible dependency. Having evaluated the trend of the average particle diameter with the selected variables, it is at least possible to guess what order of magnitude will be the particles produced by setting the 3 parameters C, D, R, in the field of analysis used in this thesis. It can be concluded that it is possible to produce liposomes with the desired diameter simply by conveniently tuning the 3 selected parameters, ratio between flows, concentration of the alcoholic solution and diameter of the needle. For future experiments it is advisable to neglect the variable D, in favour of a more detailed analysis of the other two, perhaps also aimed to identifying a correlation of the first two with the average diameter, in such a way as to be predictive of the final average value.

---

# Bibliografia

1. F. Recupido, Produzioni di nanoliposomi per applicazioni nutraceutiche mediante un approccio simil-microfluidico, Tesi in *Transport Phenomena in Food Processes* (Anno Accademico 2015/2016)
2. <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/liposomi.html>
3. A. Akbarzadeh et al., Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Research Letters*, 8, 102-111 (2013)
4. M.R. Mozafari, Liposomes: an overview of manufacturing techniques, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10, 711-719 (2005)
5. L.A. Meure et al., Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review, *AAPS PharmSciTech*, 9, (3) 798-809 (2008)
6. P. Pradhan et al., Analysis and methylcellulose: powders, gels and matrix tablets, *Anticancer Research* 28, 943-948 (2008)
7. <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/fluka/pdf/PDF548388.pdf>
8. <http://www.pce-italia.it/html/dati-tecnici-1/turbidimetro-pce-tum20.htm>
9. <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/mastersizer-range/mastersizer-3000>
10. M. Collado-Fernández et al., Evaluation of turbidity: correlation between Kerstesz turbidimeter and nephelometric turbidimeter, *Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section*, 71, 563-566 (2000)



## Ringraziamenti

In primis, grazie al Professor Lamberti per avermi concesso l'opportunità di far parte del gruppo TPP, che negli ultimi mesi si è rivelato una grande famiglia.

Grazie alle mie correlatrici Sara e Annalisa che mi hanno guidato in questo cammino, con pazienza e passione, insegnandomi ogni giorno qualcosa di nuovo.

Grazie a Diego per avermi assistito nei momenti di difficoltà.

Grazie ai ragazzi del laboratorio T5 per aver condiviso con me questo percorso, rendendolo meno arduo, e per aver creato un ambiente piacevole in cui lavorare e al contempo divertirsi.  
Grazie soprattutto per avermi aperto la porta ogni giorno.

Grazie alla mia famiglia, non semplicemente per essermi stata sempre vicino, ma per aver fatto di me l'uomo che sono, con tutti i difetti e pregi del caso.  
Avete fatto davvero un ottimo lavoro, complimenti!

Grazie a Valentina, la mia metà, per aver condiviso con me questo percorso dal primo giorno (in realtà dal terzo, ho fatto tardi), fino alla sua fine, oggi (giorno 1192). È stato un piacere condividere con te gioie, sofferenze, ansie, sofferenze, pause pranzo e anche qualche sofferenza. Grazie davvero.

Grazie a Cosimo, Antonella e tutti i compagni di avventura conosciuti 3 anni orsono, che da colleghi sono diventati prima conoscenti e poi amici. È stato un piacere condividere con voi tutto questo. IUPAC.

Grazie a Luis Sal per avermi influenzato con il suo movimento artistico/culturale/sociale e avermi reso una persona migliore.

*“Che io possa avere la forza di cambiare le cose che posso cambiare, che io possa avere la pazienza di accettare le cose che non posso cambiare, che io possa avere soprattutto l'intelligenza di saperle distinguere.” [Tommaso Moro]*

A buon intenditor...

