



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

**PRODUZIONE DI
NANOLIPOSOMI BIOADESIVI
MEDIANTE TECNICA
SIMIL-MICROFLUIDICA**

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Ing. Anna Angela Barba

0612201631

Candidato:

Benito Califano

matricola

Correlatore:

Ing. Annalisa Dalmoro

Anno Accademico 2019/2020



*Per quanto difficile possa essere la vita c'è sempre qualcosa che è
possibile fare. Guardate le stelle invece dei vostri piedi*

Stephen W. Hawking

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman
La data prevista per la discussione della tesi è il 20/07/20
04/07/20

Sommario

Sommario	1
Indice delle figure	6
Indice delle tabelle	8
Abstract	9
Introduzione	1
1.1 Sistemi di rilascio a base lipidica: i liposomi	2
1.1.1 Proprietà chimico-fisiche	2
1.1.2 Classificazione delle vescicole	4
1.1.3 Principali applicazioni di liposomi	5
1.1.4 Vantaggi e svantaggi nell'uso di liposomi	6
1.2 Chitosano	6
1.2.1 Struttura chimica del chitosano	6
1.2.2 Principali applicazioni del chitosano	7
1.2.3 Chitosano come mezzo di ricopertura dei liposomi	8
1.3 Obiettivi della tesi	8

Materiali, metodi e apparecchiature	10
2.1 Materiali	11
2.1.1 L- α -fosfatidilcolina di soia	11
2.1.2 Colesterolo	12
2.1.3 Chitosano	13
2.1.4 Etanolo	13
2.1.5 Acqua deionizzata	13
2.1.6 Altri materiali	13
2.2 Apparecchiature	13
2.2.1 Set up sperimentale utilizzato per la produzione di liposomi	13
2.2.2 Nano Zetasizer	14
2.2.3 Ultracentrifuga	16
2.2.4 Spettrofotometro	16
2.2.5 Turbidimetro	17
2.3 Metodi	18
2.3.1 Produzione di liposomi e ricopertura con chitosano mediante il metodo simil-microfluidico	18
2.3.2 Caratterizzazione dei nanovettori lipidici ricoperti e non	19
2.3.2.1 Caratterizzazione dimensionale	19
2.3.2.2 Potenziale zeta	19
2.3.2.3 Mucoadesività di liposomi ricoperti e non	20
2.3.2.4 Analisi della torbidità	20

2.3.3 Test di stabilità	21
Risultati e discussione	22
3.1 Caratterizzazione di liposomi ricoperti e non al tempo zero	23
3.1.1 Size e Potenziale Zeta	23
3.1.2 Mucoadesività	24
3.1.3 Resistenza a detergenti	24
3.2 Stabilità dopo 60 giorni a 4°C	25
3.2.1 Size e Potenziale Zeta	25
3.2.1.1 Confronto fra i dati al tempo 0 e dopo 60 giorni a 4°C	26
3.2.2 Mucoadesività	28
3.2.2.1 Confronto fra i dati al tempo 0 e a 60 giorni	28
3.2.3 Resistenza a detergenti	29
3.2.3.1 Confronto fra i dati ottenuti a tempo 0 e quelli a 60 giorni	30
3.3 Stabilità accelerata	31
3.3.1 Campioni a 40°C per 60 giorni	31
3.3.1.1 Size e Potenziale Zeta	32
3.3.1.2 Confronto fra i dati al tempo 0 e dopo 60 giorni a 40°C	32
3.3.1.3 Resistenza a detergenti	35

3.3.1.4 Confronto fra i dati al tempo 0 e i dati a 60 giorni	35
3.3.2 Campioni ad 80°C per 4 ore	36
3.3.2.1 Size e Potenziale Zeta	36
3.3.2.2 Confronto fra i dati al tempo 0 e dopo 4 ore ad 80°C	37
3.3.2.3 Resistenza a detergenti	39
3.3.2.4 Confronto fra i dati al tempo 0 e dopo 4 ore ad 80°C	40
Conclusioni	42
4.1 Conclusioni	43
Bibliografia	45

Indice delle figure

Figura 1. Struttura chimica fosfatidilcolina (A), schematizzazione di un fosfolipide (B) e disposizione a doppio strato (C) [4].	3
Figura 2. Geometrie delle molecole lipidiche e configurazioni possibili [2].	4
Figura 3. Schematizzazione delle tipologie di vescicole [6].	5
Figura 4. Struttura chimica del chitosano [6]	7
Figura 5. Struttura chimica della chitina [5]	8
Figura 6. Struttura chimica della fosfatidilcolina [11]	12
Figura 7. L- α -fosfatidilcolina derivata dalla soia	13
Figura 8. Struttura chimica del colesterolo [5]	14
Figura 9. Schematizzazione del set up sperimentale finalizzato alla produzione ed alla ricopertura di nanovesicole [14]	16
Figura 10. Grafico del potenziale zeta [2]	18
Figura 11. Spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer [2]	19
Figura 12. Turbidimetro PCE-TUM 20 [17]	20
Figura 13. Resistenza ai detergenti di liposomi ricoperti e non al tempo 0. L'ascissa rappresenta la variazione di concentrazione del detergente, l'ordinata rappresenta la variazione di torbidità della soluzione	29
Figura 14. Confronto fra Z-Average, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	30

Figura 15. Confronto fra PDI, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	31
Figura 16. Confronto fra PZ, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	31
Figura 17. Confronto fra Medie Numeriche, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	32
Figura 18. Confronto fra i dati sulla mucoadesività di liposomi, ricoperti e non, al tempo 0 e a 60 giorni a 4°C	33
Figura 19. Resistenza ai detergenti di liposomi ricoperti e non dopo 60 giorni. L'ascissa rappresenta la variazione di concentrazione del detergente, l'ordinata rappresenta la variazione di torbidità della soluzione	34
Figura 20. Confronto fra i dati relativi alle analisi di torbidità al tempo 0 e dopo 60 giorni a 4°C. Il confronto è stato fatto prendendo in considerazione il valore di concentrazione massima di detergente (espresso in %v/v) che ci restituisce una soluzione limpida	35
Figura 21. Confronto fra Z-Average, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	37
Figura 22. Confronto fra PDI, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	37
Figura 23. Confronto fra PZ, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	38
Figura 24. Confronto fra Medie Numeriche, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	38
Figura 25. Resistenza ai detergenti di liposomi ricoperti e non dopo 60 giorni a 40°C. L'ascissa rappresenta la variazione di concentrazione del detergente, l'ordinata rappresenta la variazione di torbidità della soluzione	39

Figura 26. Confronto fra i dati relativi alle analisi di torbidità al tempo 0 e dopo 60 giorni a 40°C. Il confronto è stato fatto prendendo in considerazione il valore di concentrazione massima di detergente (espresso in %v/v) che ci restituisce una soluzione limpida	40
Figura 27. Confronto fra Z-Average, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	42
Figura 28. Confronto fra PDI, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	43
Figura 29. Confronto fra PZ, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	43
Figura 30. Confronto fra Medie Numeriche, al tempo 0 e dopo 60 giorni, di liposomi ricoperti e non	43
Figura 31. Resistenza ai detergenti di liposomi ricoperti e non dopo 4 ore ad 80°C. L'ascissa rappresenta la variazione di concentrazione del detergente, l'ordinata rappresenta la variazione di torbidità della soluzione	44
Figura 32. Confronto fra i dati relativi alle analisi di torbidità al tempo 0 e dopo 4 ore ad 80°C. Il confronto è stato fatto prendendo in considerazione il valore di concentrazione massima di detergente (espresso in %v/v) che ci restituisce una soluzione limpida	45

Indice delle tabelle

Tabella 1. Z-Average, PDI, Potenziale Zeta e Size Numerica dei liposomi ricoperti e non, al tempo zero	27
Tabella 2. Mucoadesività di liposomi liberi e ricoperti	28
Tabella 3. Z-Average, PDI, Potenziale Zeta e Size Numerica dei liposomi ricoperti e non, dopo 60 giorni	30
Tabella 4. Mucoadesività di liposomi liberi e ricoperti, dopo 60 giorni a 4°C	32
Tabella 5. Z-Average, PDI, Potenziale Zeta e Size Numerica dei liposomi ricoperti e non, dopo 60 giorni a 40°C	36
Tabella 6. Z-Average, PDI, Potenziale Zeta e Size Numerica dei liposomi ricoperti e non, dopo 4 ore ad 80°C	41

Abstract

Due to many advantages about using liposomes as a new drug delivery system, chitosan is becoming more and more important as a way to cover liposomal structures for giving them improved characteristics, like better mucoadhesiveness, improved structural stability, more resistance to high temperatures and detergents.

Aim of this work was to study how a different deacetylation degree of chitosan could influence properties of covered liposomes. In particular, three different types of chitosan, with three deacetylation degrees, DD = 76%, DD = 81%, DD = 95%, were tested.

Performed tests let us know about dimension of uncovered and covered liposomes, zeta potential, mucoadhesiveness, and structural stability. It should be noted that those test have been made at time zero (immediately after the preparation stage) and after 60 days (aged structures).

From data relating to the size and zeta potential, it appears that chitosan with a 76% deacetylation degree guarantees greater dimensional uniformity (the polymer is better distributed on the liposomal surface).

About mucoadhesiveness two important results were obtained: the first is that at time 0 it has an increasing trend as the degree of deacetylation decreases, therefore once again chitosan with DD of 76% gives better performances than other chitosan kinds; the second that after a 60-day storage at 4 ° C the mucoadhesiveness settled around a value approximately equal for all the samples produced (about 30%), although in any case slightly higher as regards the one with 76% DD. Furthermore, size and zeta potential remain almost constant: this allows to achieve a fair conservation of vesicles if stored at 4°C without stabilizers adding.

The resistance of the coated and uncoated liposomes to detergents degradation was also studied, obtaining, both at time 0 and after 60 days at 4 ° C, that the coated liposomes are much more resistant than the uncoated ones and behave very similarly, with a slightly higher resistance as regards those with DD of 81% and 95%.

Then, two accelerated stability tests were performed: in the first one samples (uncoated and coated) were placed in an oven for 60 days at 40 ° C; in the second one samples (uncoated and coated) at 80 ° C for 4 hours. The results confirmed the role of polymeric layer as a protection for the liposomal phospholipid constituents: covered structures resists much better than the uncoated ones both at high temperatures and in presence of detergents, once again, regardless of the degree of deacetylation of the polymer used.

In conclusion, the performed research on the use of chitosan as a means of covering of liposomal vesicles not only confirms the achievement of structures with greater structural stability and greater resistance to degradation effects, but also highlighted that the degree of deacetylation of the chitosan types used in this study, does not play a key role in the coating processes, especially for covered liposomal systems subjected to storage periods.

Bibliografia

1. www.gruppotpp.unisa.it
2. Recupido F., “Produzioni di nanoliposomi per applicazioni nutraceutiche mediante un approccio simil-microfluidico”, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno, (2016).
3. Bochicchio 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).
4. www.chimica-online.it
5. www.wikipedia.org
6. www.irannano.org
7. Guidotti M., www.dctf.uniroma1.it
8. Reza Mozafari M., et al., “Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology”, *Journal of Liposomes Research*, 18 309-327 (2008).
9. Law B. A., King J.S., “Use of Liposomes for proteinase addition to cheddar cheese”, *Journal of Dairy Research*, 52 183-188 (1985).
10. Bochicchio S., et al., “Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation”, *LWT - Food Science and Technology*, 69 , pp. 9-16, (2016).
11. www.sigma-aldrich.com
12. www.assoenologi.it
13. Dalmoro et al., “Polymer-lipid hybrid nanoparticles as enhanced indomethacin delivery systems”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 121 16_28 (2018)
14. Barba A. A., Bochicchio S., Bertoncin P., Lamberti G., Dalmoro A., “Coating of Nanolipid Structures by a Novel Simil-Microfluidic Technique: Experimental and Theoretical Approaches”, *Coatings*, (2019)
15. www.pce-italia.it

16. Bradford Marion M., "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry* 72, 248-254 (1976)
 17. Delrieu et al., "Stabilized Liposomes", United States Patent, 5962015, (Oct. 1999)
-

Ringraziamenti

A chiusura di questo capitolo della mia vita sento necessari i seguenti ringraziamenti.

Il grazie più importante va alla mia famiglia, troppi per essere elencati, ma tutti fondamentali allo stesso modo e complici di questo mio primo traguardo. In particolare mio padre e mia madre per essersi dedicati a me sempre e comunque ed avermi sostenuto con amore incondizionato appoggiando ogni mia decisione, a mia sorella, che non ha mai smesso di supportarmi e sopportarmi.

Ringrazio di cuore il Professore Gaetano Lamberti e la Professoressa Anna Angela Barba per tutte le conoscenze che grazie a loro ho potuto apprendere e per la dedizione nel seguirmi costantemente con serietà e professionalità in questo percorso. Con la loro simpatia, inoltre, sono riusciti a mettermi sempre a mio agio in ogni circostanza.

Ringrazio Annalisa per tutti i suoi preziosi consigli ed insegnamenti, sempre pronta a rispondere alle mie innumerevoli domande si è dimostrata la migliore guida che si potesse avere.

Ringrazio Eleonora, che ha un posto speciale nel mio cuore, per essere stata il mio punto fisso e la mia forza, sempre e comunque al mio fianco senza chiedere mai nulla in cambio. Averti incontrata è stata la cosa migliore che potesse capitarmi.

Ringrazio i miei compagni di corso Armando, Federica, Loredana, Laura per aver vissuto insieme questo percorso sin dal primo giorno.

Ringrazio Luca che è stato sempre lì, pronto a spronarmi ed incoraggiarmi, ed insieme, fianco a fianco, abbiamo raggiunto il traguardo tanto atteso.

Un grazie particolare va al mio carissimo amico Rino, sicuro delle mie capacità molto più di quanto non lo fossi io. Sempre presente e pronto a sostenermi, mi ha trattato come un fratello e, duro e giusto quando serviva, ha saputo sempre consigliarmi nel migliore dei modi.

Ringrazio Dimitri ed Edoardo, che con la loro amicizia hanno saputo regalarmi momenti di spensieratezza proprio quando ne avevo bisogno. So senz'altro di poter contare su di loro sempre.

Ultimo ma non per importanza, ringrazio il Professore Marco Cipolletta, senza il quale io non sarei dove sono oggi. Il primo a vedere in me qualcosa che gli altri, me in primis, non avevano visto. Grazie a lui ho scoperto la chimica, ed ho imparato ad amarla, fino al punto di decidere che sarebbe stata il mio futuro. Mi ha fatto capire fino in fondo il significato delle parole "volere è potere" e si è dedicato a me più di chiunque altro prima di allora. Se adesso sono chi sono, e faccio ciò che faccio, è anche grazie a lui. Ovunque tu sia Prof, grazie, ti devo tanto.

