



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale
Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

Rilascio di principi attivi da
sistemi particellari Nano-Micro

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Ing. Diego Caccavo

Candidato:

Luca Broegg

matricola 0612201642

Anno Accademico 2019/2020

Ad Ugo, Carmine ed Enrico

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times new Roman, 12.

La data prevista per la discussione della tesi è il 28/07/2020

Fisciano, 07/07/2020

Sommario

Sommario.....	I
Indice delle figure.....	IV
Indice delle tabelle.....	VII
Abstract	IX
Introduzione	1
1.1 Rilascio controllato dei farmaci_____	2
1.1.1 Importanza del rilascio controllato dei farmaci	2
1.1.2 Micro sistemi di rilascio	4
1.1.3 Nano sistemi di rilascio	6
1.1.4 uso combinato di micro- e nanoparticelle	10
1.2 Stato dell'arte _____	11
1.2.1 Incapsulamento di nanovettori in microparticelle di alginato	11
1.3 Obiettivi _____	15
Materiali e metodi	17
2.1 Materiali _____	18
2.1.1 Alginato	18
2.1.2 Liposomi	21
2.1.3 Menadione	24
2.1.4 Cannabidiolo (CBD)	25
2.1.3 Altri materiali	25

2.2	Apparecchiature	26
2.1.1	HPLC	26
2.3	Metodi	29
2.3.1	Preparazione delle soluzioni	29
2.3.2	Produzione delle microparticelle	31
2.3.3	Produzione di soluzioni con acqua tamponata	34
2.3.4	Produzione altre soluzioni	34
2.3.5	Metodi HPLC	35
2.3.6	Metodo per il prelievo dei campioni	41
2.3.7	Rottura delle particelle mediante EDTA	42
Risultati e discussione		43
3.1	Test stabilità menadione nanoincapsulato	44
3.2	Test di stabilità del CBD nanoincapsulato	55
3.3	CBD in NiMDS	57
3.3.1	Dimensioni delle microparticelle	57
3.3.2	Test di rilascio di CBD da NiMDS	59
Conclusioni		63
4.1	Conclusioni	64
Bibliografia		67

Indice delle figure

Figura 1. 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) [2].	4
Figura 2. Microcapsula e microsfera	5
Figura 3. Targeting passivo	7
Figura 4. Targeting attivo	7
Figura 5. Liposoma	9
Figura 6. Struttura chimica alginato di sodio.	18
Figura 7. Struttura "egg-box" dell'alginato.	20
Figura 8. Struttura chimica della L- α - fosfatidilcolina	22
Figura 9. Struttura chimica del colesterolo.	23
Figura 10. Struttura chimica menadione.	24
Figura 11. Struttura chimica CBD.	25
Figura 12. HPLC (high performance liquid chromatography) [2].	28
Figura 13. Schematizzazione dell'apparato simil-microfluidico [11].	30
Figura 14. Microparticelle di alginato.	33
Figura 15. Rappresentazione schematica dell'impianto di produzione delle microparticelle [2].	33
Figura 16. Retta di taratura del menadione	37
Figura 17. "particolare" retta di taratura menadione [1-22 $\mu\text{g/ml}$]	38
Figura 18. Retta di taratura CBD in Metanolo.	40
Figura 19. Cromatogramma che evidenzia il picco di CBD contenuto all'interno dei liposomi nella soluzione contenente TRIS al tempo 0.	41
Figura 20. Carico di menadione in liposomi in soluzione contenente TRIS.	45
Figura 21. Confronto [%] del carico del menadione nelle diverse soluzioni preparate.	46
Figura 22. Cinetica ordine 0 per la degradazione del K3 nella soluzione contenente TRIS.	48

Figura 23. Cinetica ordine 1° per la degradazione del K3 nella soluzione contenente TRIS.....	49
Figura 24. Cinetica ordine 2° per la degradazione del K3 nella soluzione contenente TRIS.....	50
Figura 25. Cinetiche di ordine 0 per le soluzioni contenenti rispettivamente K3 in liposomi in acqua e K3 “puro” in acqua ed etanolo.....	52
Figura 26. Cinetiche di ordine 1° per le soluzioni contenenti rispettivamente K3 in liposomi in acqua e K3 “puro” in acqua ed etanolo.....	53
Figura 27. Cinetica del 2° ordine per una soluzione contenente K3, acqua ed etanolo in assenza di liposomi.....	54
Figura 28. Test di stabilità: carico CBD [%] nella soluzione liposomiale.....	56
Figura 29. Foto al microscopio in 4x di microparticelle caricate con liposomi contenenti CBD.....	57
Figura 30. Immagine analizzata delle microparticelle di alginato contenenti i liposomi con CBD (4x).....	58
Figura 31. PSD delle microparticelle contenenti CBD.	59
Figura 32. Rilascio di CBD (in forma libera e nanoincapsulata) presente all'esterno del sistema microparticellare e carico di CBD presente nel sistema nano-micro dopo la rottura mediante EDTA.....	60

Indice delle tabelle

Tabella 1. Produzione liposomi caricati con CBD.....	30
Tabella 2. Concentrazione/assorbanza menadione	36
Tabella 3. Concentrazioni per la determinazione della retta di taratura CBD ...	39
Tabella 4. Concentrazione del menadione in funzione del tempo dall'analisi dei dati sperimentali per la soluzione contenente TRIS.....	47
Tabella 5. Concentrazione/tempo del K3 inglobato nei liposomi in sola acqua.	51
Tabella 6. Concentrazione/ tempo del K3 "puro" in una soluzione di etanolo ed acqua.....	51

Abstract

An innovative frontier in the medical field is dictated by the development of new pharmacological techniques that exploit the controlled release of drugs: they concern the control of the storage and transport of active ingredients to specific sites within the human body, making it more constant concentration in the target site of the active substance. The main purposes of the techniques that exploit drug delivery therefore concern the cellular selectivity of the biological action of the active principle, with a consequent increase in the effectiveness of the treatment, the simplification of the patient's assumption methods, the control of the kinetics and quantity released, the reduction of side effects.

In particular, in this thesis work, a combined system of micro and nano particles was used. The combined use, therefore, of the latter, the so-called NiMDS (Nanoparticle in Microparticle Delivery System), allows to optimize the release process by combining the advantages of the individual systems. More specifically, systems consisting of liposomes, loaded with a model molecule, incorporated in alginate microparticles were produced. The microparticles have been produced using the ionotropic gelation mechanism: sodium alginate, placed in contact with Ca^{2+} divalent cations, is subject to a cross-linking phenomenon. The gels were therefore obtained by spraying an alginate and liposome solution and a calcium chloride solution in the air against each other. With this technique, it was possible to successfully incorporate the liposomes into the microparticles, thus using a configuration characterized by 0.5% alginate and 0.05 M CaCl_2 .

Therefore, the stability of two selected model molecules, menadione (vitamin K3) and CBD, was verified in liposomes in a physiological environment, then at a temperature of 37 ° and a pH of 7.6 and, once this was verified, are focused on the encapsulation of the nanocarriers

to study their possible release from the microparticle system. As far as K3 is concerned, there has been confirmation of the phenomenon of degradation interesting both the "pure" molecule and the one incorporated within the liposomes, finding a 2nd order degradation kinetics. We then moved on to the analysis of CBD, which showed an encapsulation efficiency of about 65%, an amount that was well protected by the liposomal system and therefore did not show degradation unlike the remaining part, " external" to nanocarriers.

Finally, analyzing the release of the CBD-containing liposomes from the alginate microparticles, it was seen that the amount of CBD released remained more or less constant throughout the analysis time (approximately 14 days), demonstrating an efficiency of incorporation of the liposomes with CBD in the microparticles of about 85% and, at the same time, a lack of release from the liposomes. At the end of the release test, the microparticles were broken through the use of EDTA, thus forcing the release of the liposomes and the load found confirmed the non-release, being able to ascertain that all the liposomes incorporated were still present in the microparticles.

This phenomenon can be explained considering that the release of liposomes from the microparticles is driven by their erosion. Particular attention must therefore be paid to the production process of NiMDS, especially to the step of incorporating liposomes in alginate, aiming for a higher standardization and correct identification of the concentration of alginate and calcium chloride so as to correctly modulate the release in the required times from the specific application.

Bibliografia

1. Baudino M., Studio di sistemi per il rilascio controllato di principi attivi da tessuti, tesi di laurea magistrale in ingegneria dei materiali, Politecnico di Torino, Dicembre 2011
2. Nevola C., Studio del rilascio di nanovettori liposomiali da microparticelle di alginato per applicazioni intraperitoneali, tesi di laurea in ingegneria chimica, Università di Salerno, Settembre 2019
3. Senatore C., Estrazione e quantificazione di cannabinoidi da Canapa light, tesi di laurea in ingegneria chimica, Università di Salerno, Novembre 2019.
4. <http://gruppotpp.unisa.it/micro-e-nano-particelle-polimeriche-definizione-e-utilita/> , consultato il 18/12/2019
5. <http://gruppotpp.unisa.it/sistemi-di-rilascio-basati-sui-liposomi/> , consultato il 18/12/2019
6. Botto C., preparazione e caratterizzazione di nanosistemi lipidici per il direccionamento e il rilascio modificato di farmaci e acidi nucleici in terapia oncologica, Dottorato di ricerca in Biologia cellulare e tecnologie del farmaco, Università di Palermo, 2016
7. 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).
8. Chuanyun Dai, Bochu Wang, Hongwei Zhao, Biao Li, Factors affecting protein release from microcapsule prepared by liposome in alginate, Chongqing University, China (2004).
9. Mannina P., Sistemi biopolimerici multiunità preparati per gelazione ionotropica, dottorato di ricerca in “scienze delle sostanze bioattive”,Università del Piemonte “Amedeo Avogadro”, anni accademici 2011-2014
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. Lamberti R., Preparazione di sistemi farmaceutici a rilascio controllato nel tratto GI, Tesi di laurea in Ingegneria Chimica, Università degli Studi di Salerno (2013)
 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. Kenneth A. Connors, Gordon L. Amidon, Valentino J. Stella, Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists, Pag 534-535
 14. Analytical chemistry, Vol. 51, No. 6, May 1979
 15. C. R. KOWARSKI' and H. 1. GHANDI, Complex Formation between Menadione and Cetylmorpholinium Ethosulfate: Effect on UV Photodegradation of Menadione, Aprile 1975 Volume 64, Numero 4, Pagine 696-698
 16. Roberta Pacifici, Emilia Marchei, Francesco Salvatore, Luca Guandalini, Francesco Paolo Busardò*and Simona Pichini, Evaluation of cannabinoids concentration and stability in standardized preparations of cannabis tea and cannabis oil by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, Novembre 2016.
-

Ringraziamenti

Ci tengo a ringraziare innanzi tutto il Professor Ing. Gaetano Lamberti per avermi permesso di lavorare con il suo team trasmettendomi con grande entusiasmo la passione per il suo campo di ricerca, nonché per l'enorme disponibilità, per nulla scontata, avuta nei miei riguardi.

Grazie al mio correlatore, l'Ing. Diego Caccavo, per la tanta pazienza avuta, per avermi fatto da guida in quest'ultima parte del percorso, per essermi stato vicino nei momenti di difficoltà aiutandomi a superarli a testa alta e risultando per me fonte di ispirazione.

Grazie ai miei genitori per i tanti sacrifici fatti, per aver sofferto e gioito con me, per avermi spronato a dare il meglio, a lottare per ciò che sogno, per avermi trasmesso gli ideali di rispetto ed umiltà.

Grazie a mia sorella Benedetta, che, nonostante i numerosi litigi, è pronta ad andare contro tutti pur di supportarmi.

Grazie alle mie nonne che seppur con difficoltà mi hanno ascoltato e capito soprattutto in quei momenti in cui riecheggiai un po' di tristezza.

Grazie a mio zio Luciano, mia spalla forte, per esserci sempre stato, per aver affrontato con me ogni battaglia, per avermi insegnato a voler bene in maniera incondizionata, per essere stato molto più che uno zio.

Grazie a mio cugino Ugo che, giorno per giorno, mi fa sentire importante.

Grazie a mio zio Renato, che con la sua presenza arricchisce ogni nostro incontro.

Grazie a mio cugino Raffaele, sempre pronto ad ascoltarmi e a spezzare una lancia a mio favore.

Infine voglio ringraziare i miei amici, quelli che ci sono sempre stati, le nuove scoperte, quelli che so non mi tradiranno mai.

A Biagio, amico di una vita, dico grazie per avermi insegnato che la perseveranza prima o poi ripaga sempre.

A Benito, compagno, collega, amico, dico grazie per aver lottato insieme a me, per avermi spronato a dare il meglio, a continuare a “pedalare” nonostante tutto e tutti, so che potrò sempre contare sul suo aiuto.

A Gaetano e Matteo, grazie perché ovunque ci porterà la vita, so di non perdervi mai.

A Pasquale, grazie per la tanta considerazione e disponibilità che ha contraddistinto tutti questi anni.

A Lazzaro e Rosario, nuove scoperte e compagni di mille avventure, grazie per starmi vicino, comprendermi e sopportarmi giorno per giorno, soprattutto nei momenti “off”.

A Chiara, Pia, Pierpaolo e Alfredo, dico grazie perché senza di voi questo stupendo percorso non sarebbe stato lo stesso. Grazie per le mille risate, per aver condiviso con me momenti che non dimenticherò mai.

Al mio coach, Giuseppe, dico grazie per avermi inculcato la mentalità del vero sportivo, per avermi insegnato a rimanere concentrato sull’obiettivo fino al raggiungimento dello stesso, grazie per essermi stato vicino e non avermi fatto arrendere mai.

A Claudio, che è stato per me un fratello maggiore, grazie per essere sempre presente nonostante la distanza.

A Cristiana, per aver lottato per me ed avermi fatto sempre sentire un ottimo amico.

A Marika per aver cercato di colmare le distanze, provando ad essere sempre presente nella mia vita.

Se oggi sono quello che sono è grazie a tutte le persone che, fino ad ora, ho incontrato sul mio cammino. Spero che un giorno possa fare per voi quello che, quotidianamente, fate per me.
