

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria dei Materiali**

Tesi di Laurea Magistrale

Nanogel polimerici e il loro impiego come carrier



Relatore

prof. Marco Sangermano

Candidata

Giulia Mangino

Marzo 2021

Indice

1. Introduzione
2. Nanomedicina e Drug delivery
 - 2.1 Nanomedicina
 - 2.2 Drug delivery systems (DDs)
 - 2.3 Nanostrutture per il drug delivery
 - 2.3.1 Micelle
 - 2.3.2 Liposomi
 - 2.3.3 Dendrimeri
 - 2.3.4 Nanoparticelle polimeriche (PNPs)
 - 2.3.5 Idrogel
 - 2.3.6 Nanogel
 - 2.4 Meccanismi di rilascio
 - 2.5 Materiali biomedici
 - 2.5.1 Nanogel naturali
 - 2.5.2 Nanogel sintetici
3. Metodi di sintesi dei nanogel
 - 3.1 Crosslinking chimico
 - 3.2 Crosslinking fisico
4. Incapsulamento e targeting
5. Stimuli-responsive nanogel
6. Limiti e problemi
7. Applicazioni
8. Caso studio
 - 8.1 Scopo dello studio
 - 8.2 Sintesi del nanogel polimerico
 - 8.3 Incapsulamento del principio attivo
 - 8.4 Studio del rilascio controllato di caffeina
 - 8.5 Conclusioni
9. Bibliografia
10. Ringraziamenti

1. Introduzione

Il rilascio di principi attivi farmaceutici all'interno dell'organismo avviene mediante diverse tecniche di somministrazione che, al fine di ottenere un profilo concentrazione-tempo ottimale e costante, si basano su sistemi multi-dose. Tuttavia, con questo approccio si ottengono dei picchi che possono causare l'inefficacia del farmaco quando si è sotto il limite di concentrazione richiesto o effetti collaterali dovuti al sovradosaggio. Per superare questi limiti si ricorre al rilascio controllato mediante dispositivi in grado di incapsulare il farmaco e rilasciarlo solamente dove necessario in maniera costante e graduale, in questo modo esso non circola in tutto l'organismo, se ne evita lo spreco e si aumenta l'efficacia terapeutica. Questi carrier vengono definiti *drug delivery systems* (DDSs).

I *nanocarrier* in grado di veicolare la distribuzione di principi attivi e agenti diagnostici sono costituiti da sistemi colloidali come le micelle, i liposomi, i dendriti, le nanoparticelle, idrogel e nanogel.

In questo lavoro di tesi sono state illustrate le principali caratteristiche fisico-chimiche e le peculiari proprietà strutturali dei nanogel che li rendono tra i vettori più efficienti in termini di capacità di incapsulamento, proprietà di biocompatibilità ed elusione della risposta immunitaria. I nanogel si presentano come una dispersione di nanoparticelle di idrogel costituiti da polimeri idrofilici reticolati che formano un *network* tridimensionale in grado di assorbire una grande quantità di acqua, rigonfiandosi, ma mantenendo stabile la struttura. Essendo caratterizzati da dimensioni nanometriche tipicamente fino a circa 200-300 nm, i nanogel possiedono delle ottime proprietà fisico-chimiche migliori rispetto agli idrogel e agli altri *nanocarriers*.

Una delle principali caratteristiche di questi dispositivi è la capacità di trasportare il farmaco in uno specifico sito, ciò viene definito *targeting*. Esso può essere passivo e si basa sull'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) che prevede un aumento della permeabilità e della ritenzione in prossimità di un tessuto malato come quello tumorale, condizioni che favoriscono quindi un accumulo dei nanogel, o attivo che consiste nel riconoscimento e interazione tra specifici recettori espressi esclusivamente o prevalentemente sul tessuto malato e ligandi funzionalizzati sulla superficie del nanogel. Possono essere coniugate diverse macromolecole come anticorpi, proteine, polisaccaridi, aptameri e *small molecules* che riescono ad individuare i fenotipi del tessuto malato, come proteine o enzimi, sul quale vengono sovraespressi.

È possibile, inoltre, realizzare dei nanogel in grado di veicolare i farmaci nel sito malato e di rilasciarli solamente a seguito di uno stimolo interno o esterno (*stimuli-responsive nanogel*). Gli stimoli che inducono il rilascio del farmaco possono essere di due tipi, fisico e chimico, tra i principali si hanno variazioni di temperatura o pH in grado di innescare il cambiamento fisico nella struttura del nanogel, reazioni enzimatiche o redox che possono indurre la rottura dei legami di tipo covalente del *network* e ancora l'applicazione di un campo magnetico o di radiazione luminosa.

È stato infine proposto un caso studio in cui è stata incapsulata efficacemente della caffeina all'interno di un nanogel ottenuto tramite polimerizzazione in miniemulsione di acqua in olio (W/O), mediante radiazione UV. È stato utilizzato il polietilenglicole diacrilato (PEGDA) come monomero da cui si è ottenuto il *network* polimerico. Sono state poi esaminate le proprietà e caratteristiche del sistema e si è valutato il rilascio controllato *in vitro* per somministrazioni transdermiche.

2. Nanomedicina e Drug delivery

2.1 Nanomedicina

La Nanotecnologia è una disciplina che si occupa della progettazione e realizzazione di strutture su scala nanometrica. I nanomateriali (NMs) sono quindi definiti come materiali che presentano componenti distinguibili tra loro chimicamente e fisicamente dei quali almeno una delle dimensioni inferiori ai 100 nm.

A differenza dei materiali massivi, con dimensioni nella macro-scala, i nanomateriali presentano proprietà chimico-fisiche uniche che dipendono solamente dalle dimensioni e non dalla composizione della materia. Infatti, molte proprietà sono legate all'area interfacciale specifica che, alle dimensioni nanometriche, diventa molto elevata. Si ottengono così materiali con elevata reattività chimica, differenti proprietà fisiche quali temperatura di fusione, variazioni nelle proprietà ottiche come trasparenza, colore e lunghezza d'onda di assorbimento o emissione, variazioni nella conducibilità.

È quindi ovvio che le nanotecnologie presentino un elevato potenziale per lo sviluppo tecnologico in numerosi ambiti come quello aerospaziale, tecnologie informatiche, produzione di energia e in ambito medico.

Infatti, l'uso delle nanotecnologie per scopi medici e farmaceutici è oggi definita come nanomedicina e permette l'utilizzo di *nanodevices* biocompatibili a scopi diagnostici e terapeutici come la somministrazione di farmaci e vaccini o per l'integrazione di agenti di *imaging*.

In particolare, grazie alle dimensioni nanometriche e all'elevata selettività data da specifiche funzionalizzazioni, i *nanocarriers* sono in grado di trasportare i farmaci in un sito specifico oltrepassando le barriere fisiologiche. Queste capacità vengono utilizzate in particolare nel trattamento di diverse malattie come il cancro, malattie cardiovascolari, meningiti, infezioni, artriti o patologie neurologiche. [1]

Un'altra proprietà molto importante che devono possedere queste nanostrutture per applicazioni mediche è la biocompatibilità, devono dunque essere inerti limitando le interazioni tra il materiale e i tessuti e non devono innescare una reazione infiammatoria nel sistema ospitante.

I nanomateriali possono essere realizzati mediante due tipologie di sintesi: *Bottom up* o *Top down*.

Il primo approccio "dal basso verso l'alto" permette di realizzare il materiale a partire dagli elementi base che lo costituiscono, si basa anche sulla tendenza di alcuni atomi e molecole di autoassemblarsi mediante legami chimici in strutture ordinate (*self-assembly*).

L'approccio "dall'alto verso il basso" invece, produce il nanomateriale a partire dal materiale massivo riducendone le dimensioni attraverso metodi fisici (*lithography based*).

2.2 Drug delivery systems (DDSs)

I *drug delivery systems* (DDSs) sono dei dispositivi che permettono il rilascio controllato di principi attivi farmaceutici (*Active Pharmaceutical Ingredient*, API) nell'organismo di un essere vivente a scopo terapeutico. Al fine di migliorare le attuali tecniche di somministrazione dei farmaci e realizzare un profilo concentrazione-tempo ottimale, sono state sviluppate diverse tecnologie che mirano a controllare la velocità e il sito di rilascio.

Perché abbia effetto, un farmaco deve raggiungere una concentrazione ottimale che deve essere mantenuta nel tempo e i convenzionali sistemi di somministrazione, come quello orale o intravenoso,

consistono in una assunzione periodica di dosi elevate di farmaco in modo tale che il principio attivo possa agire in maniera quasi costante e mantenersi all'interno della finestra terapeutica.

Il profilo concentrazione-tempo che si ottiene mediante una somministrazione multi-dose, come mostrato in Figura 2.2.1, provoca dei picchi che possono causare l'inefficacia del farmaco quando si è sotto il limite di concentrazione richiesto o effetti collaterali dovuti al sovradosaggio.

Per superare questi limiti si ricorre al rilascio controllato mediante dispositivi in grado di incapsulare il farmaco e rilasciarlo solamente dove necessario in maniera costante e graduale, in questo modo esso non circola in tutto l'organismo, se ne evita lo spreco e si aumenta l'efficacia terapeutica.

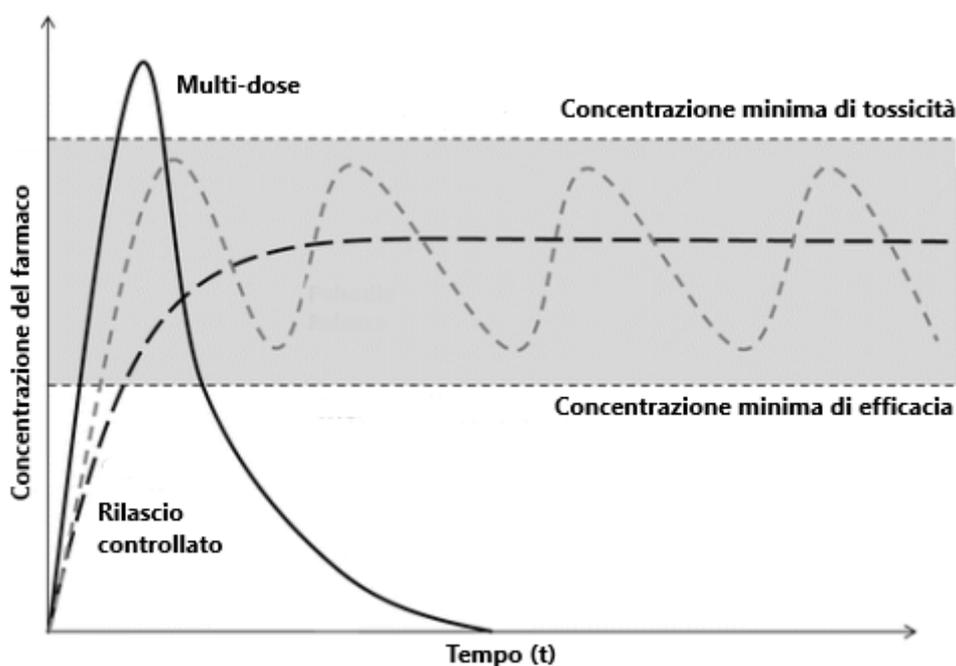


Figura 2.2.1: Confronto tra l'andamento temporale della concentrazione del farmaco nel sistema multi-dose e mediante rilascio controllato [2, con modifiche].

Oltre la biocompatibilità, i *drug delivery systems* devono essere in grado di soddisfare diversi requisiti, tra cui una buona stabilità del farmaco incapsulato al suo interno. Infatti, non si deve incorrere in un rilascio prematuro durante la fase di circolazione poiché il farmaco verrebbe a contatto con il tessuto sano e non raggiungerebbe quello malato. La capacità di incapsulamento di un *nanocarrier* viene definita dalla percentuale di caricamento che corrisponde alla quantità in peso di farmaco presente per unità di peso del *carrier*, tuttavia non è questo valore a definire la stabilità del sistema ma rappresenta piuttosto un coefficiente termodinamico di distribuzione del farmaco tra l'interno del *carrier* e il mezzo acquoso. L'obiettivo è quello di massimizzare questa percentuale per garantire che il farmaco raggiunga il sito malato e non venga disperso ad esempio a causa della presenza di siti idrofobici, cellule del sangue, del plasma, membrane e flussi turbolenti. In letteratura si sono ottenute percentuali di caricamento variabili tra il 10 – 60 %. [1]

Una volta arrivato nel sito specifico è necessario che il farmaco venga rilasciato e questo si ottiene introducendo sul *carrier* dei gruppi specifici in grado di rispondere a stimoli che possono essere di tipo fisico o chimico. Nel primo caso si ha un cambiamento fisico della struttura del *nanodevice* come un rigonfiamento o un collasso a seguito di uno stimolo come, ad esempio, una variazione del pH o della temperatura. Questo tipo di risposta si ottiene nel caso in cui il farmaco sia stato incapsulato

mediante crosslinking fisico o per interazioni supramolecolari. Nel caso in cui si abbiano legami di tipo covalente tra farmaco e *carrier* allora è necessario uno stimolo di tipo chimico per rompere questi legami e permettere il rilascio, un esempio possono essere variazioni del pH, di potenziale redox, reazioni enzimatiche o stimoli esterni come la luce. In alternativa, è stato possibile realizzare un *nanocarrier* per il rilascio controllato utilizzando una struttura *layer-by-layer* in cui ciascuna superficie, in maniera alternata, è stata rivestita con gruppi cationici e anionici. [1]

La capacità del carrier di trasportare il farmaco in uno specifico sito è definita *targeting* e può essere passivo o attivo. Il *targeting* passivo si basa sull'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) che prevede un aumento della permeabilità e della ritenzione in prossimità di un tessuto malato come quello tumorale. Infatti, come mostrato in Figura 2.2.2, le cellule tumorali si organizzano formando dei mono-strati in cui si hanno delle aperture che permettono la comunicazione con il sistema circolatorio e inoltre la vascolarizzazione aumenta notevolmente. In questi siti tendono quindi ad accumularsi alcune molecole come lipidi o nanoparticelle e ad interagire con il tessuto tumorale. Inoltre, i tessuti tumorali hanno caratteristiche simili ad un tessuto infiammato e mostrano quindi anche un innalzamento della temperatura e un pH inferiore rispetto a quelli sani, per questo motivo risulta adatto per una terapia mediante rilascio selettivo del farmaco.

Tuttavia, questo effetto dipende da una serie di fattori quali il tipo e grandezza del tumore, il luogo in cui si trova e se i *carriers* devono attraversare barriere fisiologiche o membrane che potrebbero bloccarne la circolazione. Per questo motivo risulta essere più efficace il *targeting* attivo in cui la superficie viene funzionalizzata con ligandi specifici e anticorpi in grado di intercettare i fenotipi del tessuto malato come enzimi e proteine sovraesprese come HER-2 che è un recettore presente sulla superficie delle cellule del seno ma che può proliferare in maniera incontrollata in presenza di una patologia. [3]

Infine, è necessario che la sintesi dei *nanocarriers* sia semplice, non dannosa per l'ambiente limitando l'uso di sostanze inquinanti e tossiche come tensioattivi e solventi organici, scalabile per la produzione su larga scala. Per questo motivo, prima di essere utilizzati è necessaria l'approvazione da parte di agenzie regolatorie, come la FDA (*Food and Drug Administration*) statunitense e l'EMA (*Agenzia Europea per i Medicinali*) europea, che hanno il compito di garantire la sicurezza e l'efficacia di farmaci, dispositivi medici e integratori alimentari.

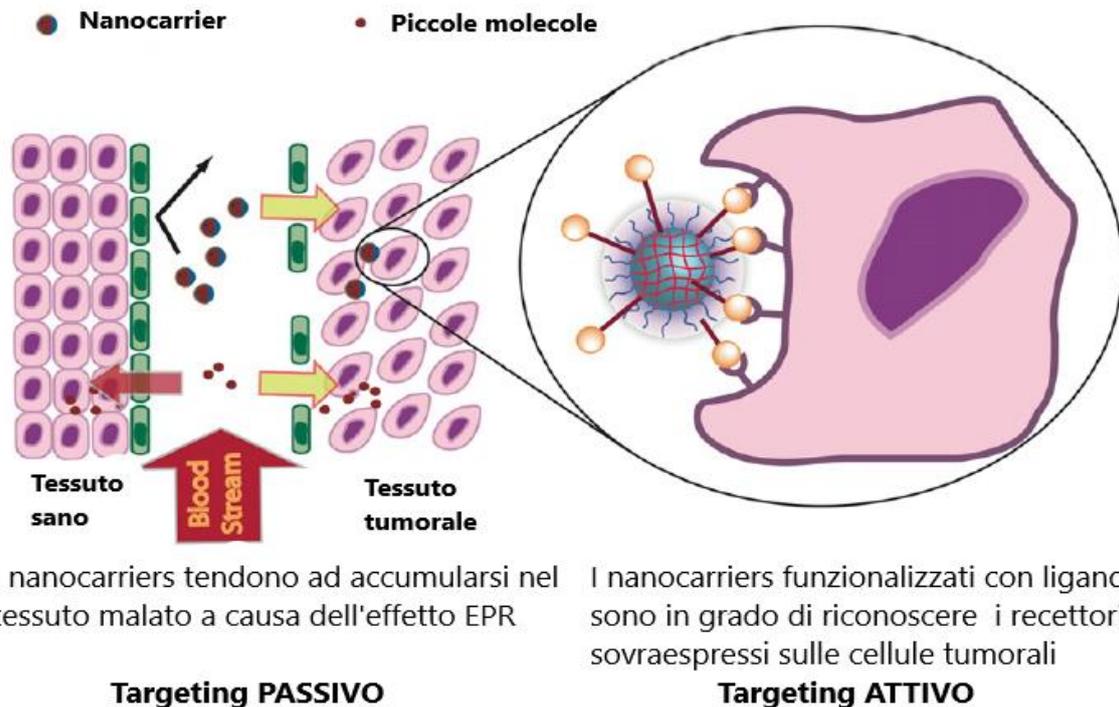


Figura 2.2.2: Confronto tra il targeting passivo basato sull'effetto EPR e il targeting attivo che agisce riconoscendo specifici recettori delle cellule malate [4, con modifiche].

2.3 Nanostrutture per il drug delivery

L'ampia ricerca scientifica che si è occupata negli ultimi anni delle nanotecnologie e delle sue applicazioni in ambito biomedico ha permesso di sviluppare diversi tipi di nanovettori in grado di veicolare la distribuzione di principi attivi e agenti diagnostici e controllare la loro cinetica di rilascio. Essi sono costituiti da sistemi colloidali come le micelle, i liposomi, i dendriti, le nanoparticelle, idrogel e nanogel.

Queste strutture risultano essere già ampiamente utilizzate a scopo diagnostico, come dispositivi in grado di contenere agenti di *imaging* che permettano di individuare precocemente la malattia, terapeutico, incapsulando farmaci che vengono protetti e veicolati dal vettore fino al sito malato, e infine teranostico, coniugando l'effetto di agenti terapeutici e diagnostici. [5]

I materiali impiegati per la realizzazione di questi dispositivi sono principalmente a base di lipidi e di polimeri, naturali o sintetici, poiché possiedono un'elevata biocompatibilità e biodegradabilità oltre che la possibilità di essere funzionalizzati e modificati in funzione delle specifiche applicazioni. Sono anche largamente utilizzate anche nanoparticelle ceramiche e metalliche in molteplici applicazioni biomediche, tra cui il *drug delivery*.

Le varie tipologie di nanostrutture sono descritte di seguito.

2.3.1 Micelle polimeriche

Le micelle polimeriche, costituite tipicamente da copolimeri a blocchi, sono strutture sovramolecolari che si ottengono mediante l'autoassemblaggio in soluzione acquosa di catene polimeriche idrofiliche (polietilenglicole PEG, polietilenossido PEO) e catene idrofobiche (come il poli(β -benzil-L-

aspartato) PBLA, l'acido polilattico PLA o policaprolattone PCL) a determinate condizioni di temperatura e con concentrazioni superiori alla concentrazione micellare critica (CMC). La realizzazione di micelle polimeriche per applicazioni di *drug delivery* avviene con CMC relativamente bassi, circa 10^{-6} - 10^{-7} M, poiché copolimeri a blocchi con concentrazioni superiori risultano essere instabili [6].

Queste nanostrutture sono particolarmente stabili in ambiente biologico e tendono ad organizzarsi in strutture ordinate di tipo *core-shell* in cui il nucleo risulta caratterizzato dalla frazione idrofobica mentre la corona esterna da quella idrofila. Grazie a questa configurazione, le micelle sono in grado di ospitare al loro interno farmaci lipofili e agenti di *imaging*, di trasportarli sino al sito di rilascio e di aumentarne il tempo di circolazione favorendo stabilità al sistema e prevenendone il riconoscimento da parte del sistema immunitario grazie allo *shell* solubile in ambiente biologico. È inoltre possibile il trasporto di farmaci idrofili tramite il loro adsorbimento sulla superficie esterna della micella [1].

Il farmaco può essere caricato all'interno della nanostruttura tramite diverse tecniche tra cui:

- Coniugazione chimica mediante legami covalenti (estereo, ammidico) tra il nucleo idrofobo e il farmaco
- Interazione elettrostatica se si vogliono incapsulare ad esempio acidi nucleici, è necessario l'utilizzo di polimeri che presentino una carica (polioni)
- Tecniche di tipo fisico come dialisi o emulsione/evaporazione del solvente

Le micelle risultano essere degli ottimi vettori grazie alla facilità di sintesi e caricamento del farmaco, alle ridotte dimensioni (tra i 50-100 nm) e flessibilità che ne permettono la penetrazione nelle membrane e nei tessuti oltre che la biocompatibilità e la biodegradabilità.

Inoltre, la capacità di veicolare e direzionare il farmaco dipende da numerosi fattori come la scelta del materiale polimerico, il tipo di interazione tra l'agente terapeutico e la micella, la presenza di ligandi specifici sulla superficie che favoriscono un *targeting* attivo.

I meccanismi di rilascio del farmaco coinvolti in queste nanostrutture sono di diffusione attraverso la matrice idrofobica o di erosione e dissoluzione della micella stessa a seguito di stimoli come variazioni di pH e di temperatura.

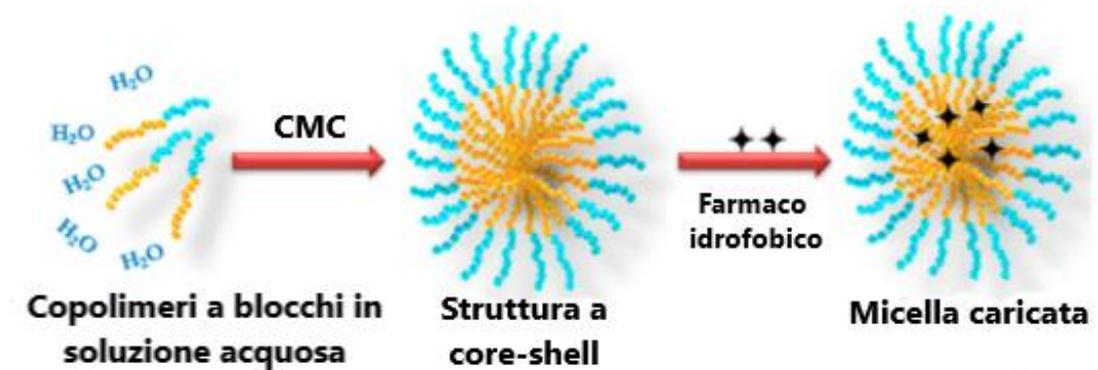


Figura 2.3.1.1: Formazione di micelle a partire da copolimeri a blocchi in soluzione acquosa e successivo incapsulamento del farmaco idrofobico all'interno del nucleo della micella [7, con modifiche].

2.3.2 Liposomi

I liposomi sono vescicole di dimensioni tipiche tra i 50-100 nm che presentano un nucleo cavo contenente un ambiente acquoso circondato da uno o più doppi strati fosfolipidici. I bilayer sono caratterizzati da interazioni idrofobiche tra le catene adiacenti mentre si ha l'esposizione delle teste idrofiliche verso l'esterno, come mostrato in Figura 2.3.2.1. Grazie a questa configurazione, i liposomi sono in grado di incapsulare sia agenti idrofilici nel nucleo, sia idrofobici posti nello strato lipidico.

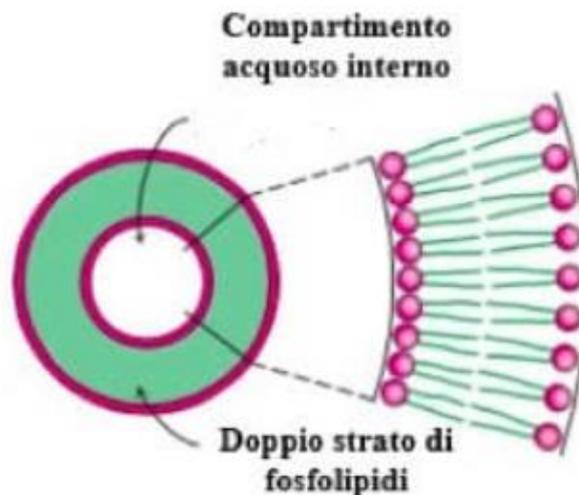


Figura 2.3.2.1: Schema della struttura dei lipidi in cui è presente un nucleo che contiene una fase acquosa e uno o più doppi strati fosfolipidici [8].

I liposomi vengono classificati in funzione della dimensione e del numero di doppi strati in uni, oligo e multilamellari.

Le proprietà chimico-fisiche di questi *carriers* come la dimensione del diametro e lo spessore del bilayer, la capacità di *targeting*, permeabilità e biodegradabilità possono essere ottimizzate tramite opportune funzionalizzazioni, variando il tipo di polimero e le proporzioni tra le parti idrofiliche e idrofobiche. [1]

Nonostante siano degli ottimi *nanocarriers* grazie alla possibilità di incapsulare una vasta varietà di farmaci, idrofilici e idrofobici, e di ridurne il tempo di esposizione all'ambiente fisiologico preservandone le proprietà fino al momento del rilascio, mostrano una scarsa capacità d'incapsulamento e tendono ad accumularsi nei tessuti sani provocando effetti collaterali indesiderati. Per questo motivo, oltre a fare un'attenta analisi del tipo di polimero da utilizzare, si tende a funzionalizzare la superficie con il polietilenglicole, mediante una coniugazione covalente (PEGilazione), evitando adsorbimenti aspecifici e prevenendone il riconoscimento da parte del sistema immunitario.

2.3.3 Dendrimeri

I dendrimeri sono composti polimerici ramificati che presentano una struttura altamente ordinata costituita da una parte centrale detto *core* che funge da centro di nucleazione per ramificazioni secondarie ottenute attraverso condensazioni successive della stessa unità. Alle estremità si hanno gruppi funzionali terminali che definiscono le proprietà finali del sistema.

Ciascuna zona della struttura conferisce determinate proprietà al sistema: il nucleo centrale, oltre a determinare la forma, dimensioni e molteplicità finali, è in grado di incapsulare macromolecole e farmaci grazie a una elevata porosità. Le ramificazioni intermedie, definite generazioni, conferiscono flessibilità e influenzano il volume libero totale mentre le estremità possono essere funzionalizzate con specifici ligandi favorendo il *targeting* attivo. È inoltre possibile stabilizzare il sistema con il PEG per evitare l'opsonizzazione.

Un esempio di struttura di un dendrimero è mostrato in Figura 2.3.3.1.

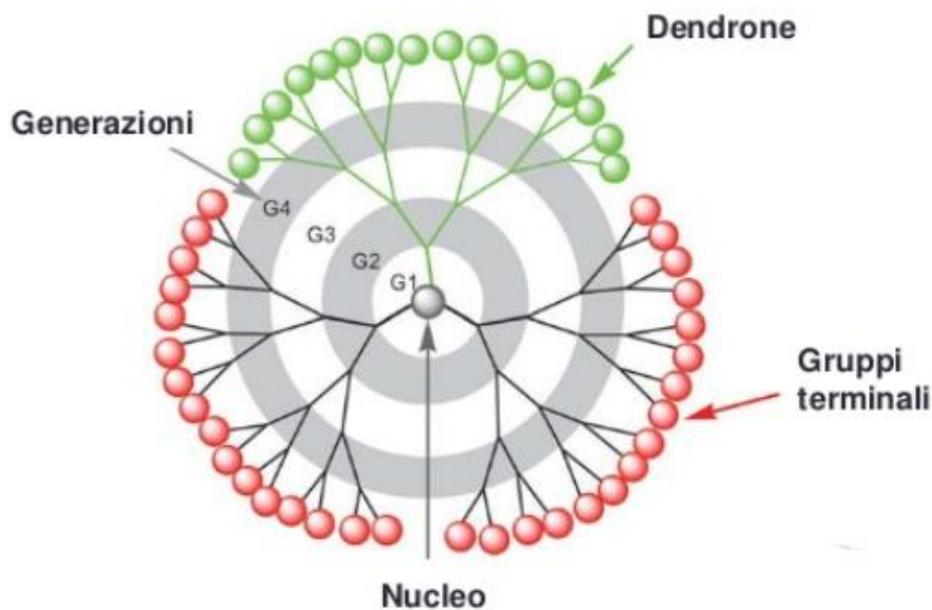


Figura 2.3.3.1: Struttura di un dendrimero caratterizzata da tre zone principali: un nucleo o *core*, le ramificazioni secondarie dette generazioni, gruppi terminali [9].

2.3.4 Nanoparticelle polimeriche (PNPs)

Le nanoparticelle polimeriche sono particelle che possono avere dimensioni molto variabili, dai 10 ai 300 nm, e sono già ampiamente utilizzate in ambito medico come dispositivi per *bioimaging*, biosensori, diagnosi *in vivo*, ingegneria tissutale e medicina rigenerativa. [1]

La possibilità di incapsulare un farmaco all'interno della nanoparticella o di farlo adsorbire sulla superficie rende questi dispositivi degli ottimi *nanocarriers* perché risultano essere molto stabili in ambiente fisiologico, possono trasportare principi attivi sia idrofobici sia idrofilici e possiedono un'elevata capacità di caricamento. Diversi tipi di polimeri biocompatibili, naturali e sintetici,

possono essere utilizzati per sintetizzare le nanoparticelle e, in funzione delle diverse composizioni, strutture e pesi molecolari, si possono controllare in maniera molto precisa le capacità tecnologiche dei *carriers* per implementare il tempo di circolazione, la stabilità, i profili farmaco-cinetici, la specificità e la *clearance*, ovvero la capacità dei dispositivi di degradarsi a fine vita in sostanze più semplici e piccole come monomeri che possano essere facilmente smaltiti dall'organismo ed evitare l'accumulo di sostanze estranee. I polimeri naturali sono molto utilizzati per la loro elevata biocompatibilità e biodegradabilità oltre che il basso costo e l'elevata disponibilità. Tuttavia, essi possono presentare problemi di contaminazione da agenti patogeni e non permettono inoltre di avere una composizione costante con conseguente variabilità tra diversi lotti. Tra i polimeri naturali più utilizzati per la realizzazione di PNPs si ha il chitosano, l'albumina, il sodio alginato.

La possibilità di controllare la struttura e la composizione dei polimeri sintetici, oltre la facilità di funzionalizzarli con specifici ligandi, li rendono spesso la scelta più appetibile. Quelli più utilizzati sono l'acido polilattico PLA, il policaprolattone PCL, il polivinilpirrolidone PVP, il polimetilmetacrilato PMMA, l'acido poliacrilico, la poliacrilamide e il PEG.

Vi sono differenti tecnologie di sintesi ciascuna delle quali permette di definire forma, dimensioni e proprietà farmaco-cinetiche delle nanoparticelle e si possono ottenere due tipologie principali di design, come rappresentato in Figura 2.3.4.1: le nanocapsule e le nanosfere. Le prime risultano cave all'interno e permettono dunque l'incapsulamento del farmaco disciolto in soluzione o in forma solida il tutto delimitato dalla membrana polimerica, le seconde invece sono dispositivi in cui il principio attivo è disperso nella matrice in maniera uniforme. In entrambi i casi il farmaco viene protetto dall'ambiente fisiologico e la superficie può essere modificata con ligandi per rendere i *nanocarriers* sito-specifici e favorire un *targeting* attivo.

Tra le tecniche più utilizzate per la produzione di nanoparticelle per il *drug delivery* vi sono l'emulsione e la nanoprecipitazione.

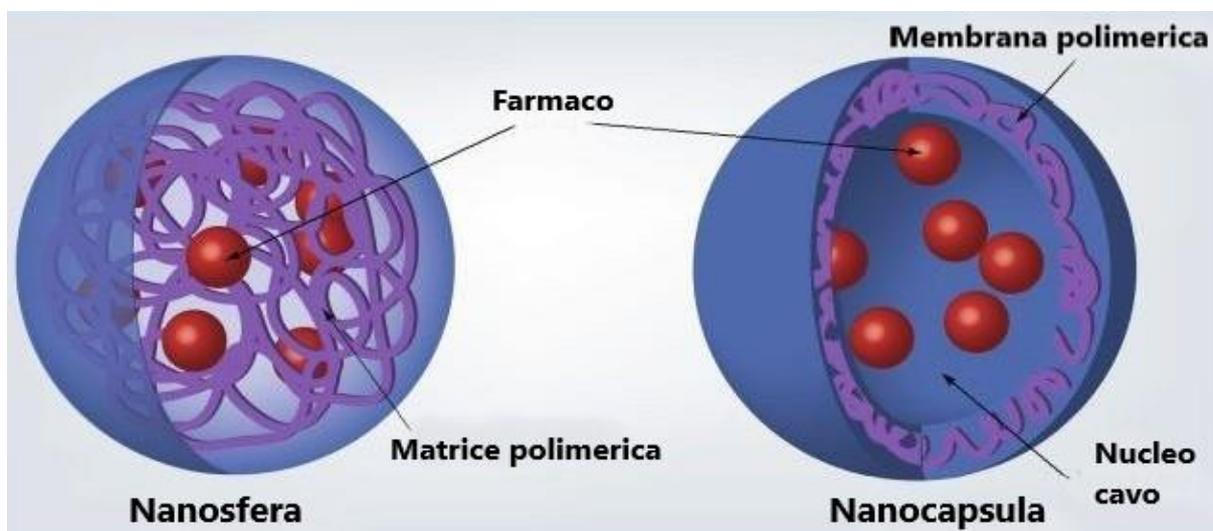


Figura 2.3.4.1: Rappresentazione schematica della struttura di una nanosfera e una nanocapsula [10, con modifiche].

2.3.5 Idrogeli

Gli idrogeli sono strutture che presentano un *network* tridimensionale costituito da polimeri idrofilici reticolati che, grazie all'elevata affinità con i mezzi acquosi, sono in grado di assorbire una grande quantità di acqua e rigonfiare mantenendo inalterata la struttura.

L'assorbimento di molecole di acqua è dovuto a un aumento dell'energia di interazione polimero-acqua (ΔG_{mix}) che caratterizza i processi di solubilizzazione e provoca così il rigonfiamento del *network*, allo stesso tempo si genera una forza elastica (ΔG_{el}) tra le giunzioni delle catene che tende a riportare la struttura alla configurazione iniziale, seguendo l'equazione (1).

$$\Delta G = \Delta G_{mix} + \Delta G_{el} \quad (1)$$

In funzione della frazione idrofila del polimero, la matrice può aumentare il suo volume anche di circa mille volte del suo peso iniziale.

Viene raggiunto infine un equilibrio secondo l'equazione (2), a specifiche temperature, tra le forze osmotiche e la forza dei crosslinking che si eguagliano ottenendo una struttura stabile con un volume finale molto maggiore [11].

$$\Delta G_{mix} + \Delta G_{el} = 0 \quad (2)$$

Nel caso si avesse un idrogel di tipo ionico, le capacità di rigonfiamento potrebbero aumentare per la presenza di un'ulteriore forza (ΔG_{ioni}) dovuta alle cariche presenti sulle catene che, tramite un'azione repulsiva, favorirebbero l'espansione della struttura [11].

$$\Delta G_{mix} + \Delta G_{el} + \Delta G_{ioni} = 0 \quad (3)$$

La capacità di *swelling* in ambiente fisiologico, le proprietà elastiche del reticolo, la possibilità di modulare le proprietà fisico-chimiche oltre che la biocompatibilità e biodegradabilità, rendono gli idrogeli degli ottimi materiali per la realizzazione di tessuti che riproducano le caratteristiche di quelli naturali e per l'incapsulamento di farmaci per il rilascio controllato.

I parametri più importanti che definiscono le caratteristiche fisiche e le proprietà degli idrogeli sono:

- Peso molecolare del polimero M_w , influenza il comportamento meccanico dell'idrogel poiché maggiore è il peso molecolare maggiore è il numero di legami multipli che rendono la struttura più rigida e il rigonfiamento più limitato.
- Peso molecolare della catena polimerica tra due punti consecutivi di crosslinking M_c , esso dipende dalla densità di reticolazione e influenza così la dimensione dei pori o *mesh size* (ξ).
- Frazione volumetrica del polimero allo stato rigonfiato $v_{2,s}$, è definito come il rapporto tra il volume del polimero iniziale V_p e il volume del gel rigonfiato V_{gel} , come illustrato nell'equazione (4). Corrisponde inoltre al reciproco della frazione di rigonfiamento o *swelling* Q .

$$v_{2,s} = \frac{\text{Volume polimero}}{\text{Volume gel rigonfiato}} = \frac{V_p}{V_{gel}} = \frac{1}{Q} \quad (4)$$

- *Mesh size*, corrisponde alla distanza tra due punti consecutivi di crosslinking e rappresenta la capacità dell'idrogel di incorporare ad esempio farmaci per il rilascio controllato. Può essere calcolato teoricamente tramite l'equazione (5) o misurato attraverso alcuni metodi come il microscopio, lo scattering della luce, misure di elasticità:

$$\xi = \sqrt{\frac{2C_n \overline{M}_c}{\overline{M}_0}} \frac{l}{\sqrt[3]{v_{2,s}}} \quad (5)$$

- con C_n : rapporto caratteristico di Flory
 l : lunghezza del legame nelle catene polimeriche
 $v_{2,s}$: frazione volumetrica del polimero rigonfiato

La quantità di farmaco che può essere inglobata e la velocità con cui esso viene rilasciato dipende dalla densità di reticolazione, cioè dalla tortuosità del percorso che devono effettuare le molecole, e dalla struttura degli idrogeli che può essere macroporosa, microporosa o non porosa.

- Condizioni esterne possono influenzare il rilascio dei farmaci inducendo variazioni di volume degli idrogeli rendendoli sensibili a cambiamenti fisici come variazioni di temperatura, presenza di campi elettrici o magnetici, presenza di luce oppure a cambiamenti chimici come la presenza di soluti e variazioni di pH.

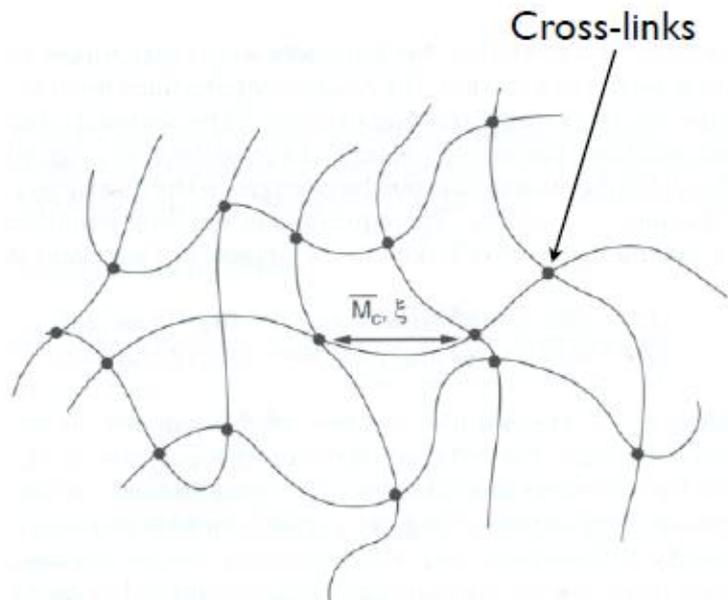


Figura 2.3.5.1: Struttura reticolata di un idrogel [12].

Gli idrogeli vengono spesso classificati in funzione della natura fisica o chimica dei legami reticolati. I primi sono caratterizzati da interazioni deboli di Van der Waals, elettrostatiche o da legami idrogeno tra le catene che rendono la struttura piuttosto labile e che tende a dissolversi facilmente nel mezzo di rigonfiamento. Gli idrogeli chimici invece, presentano un *network* reticolato attraverso legami di tipo covalente che rendono la struttura molto stabile chimicamente e meccanicamente anche dopo il rigonfiamento. Anch'essi incorrono a degradazione quando nella struttura sono presenti dei legami sensibili, ad esempio, all'idrolisi chimica o enzimatica.

Grazie alle ottime proprietà, gli idrogel sono largamente impiegati per diverse applicazioni biomediche con la possibilità di impiantare il dispositivo direttamente *in situ*, ricorrere a somministrazioni orali o anche mediante iniezione. Tuttavia, alcuni limiti nella capacità di deformazione e di scorrimento del materiale durante l'iniezione e la possibilità di avere una dissoluzione del polimero non voluta con conseguente rilascio prematuro del farmaco in siti differenti dal bersaglio, ha reso necessaria la realizzazione di idrogeli con una struttura nanometrica, definiti nanogel, che presentassero proprietà superiori come una migliore iniettabilità e maggiore capacità di caricamento.

2.3.6 Nanogel

Per applicazioni in ambito biomedico come il *drug delivery*, i nanogel rappresentano una delle scelte migliori grazie alle peculiari proprietà. Essi sono una dispersione di nanoparticelle di idrogel costituiti da polimeri idrofilici reticolati che formano un *network* tridimensionale in grado di assorbire una grande quantità di acqua, rigonfiandosi, ma mantenendo stabile la struttura.

I nanogel, avendo dimensioni nanometriche tipicamente fino a circa 200-300 nm [13], possiedono delle ottime proprietà fisico-chimiche migliori rispetto agli idrogeli e agli altri *nanocarriers*, tra le più rilevanti:

- Elevata area superficiale che permette di effettuare diverse bioconiugazioni e funzionalizzazioni che conferiscono al *nanocarrier* proprietà di biocompatibilità, elusione della risposta immunitaria da parte delle cellule fagocitiche del sistema reticoloendoteliale (RES) e favoriscono inoltre il *targeting* attivo.
- Possibilità di modificare e variare, in funzione delle specifiche applicazioni, la composizione chimica, le dimensioni e la morfologia del nanogel modulandone così le proprietà e realizzando dei sistemi in grado di reagire agli stimoli esterni come variazioni di temperatura o di pH per un rilascio controllato. [13]
- Elevata flessibilità strutturale, oltre che le dimensioni nanometriche inferiori a quelle dei batteri, favoriscono il passaggio dei nanogel all'interno dei capillari grazie alla bassa frizione sulle superfici e di passare attraverso pori e membrane biologiche che risultano essere un ostacolo per gli altri dispositivi per il *drug delivery*, come il tessuto polmonare e la membrana ematoencefalica [13]. Si ha inoltre, un incremento del tempo di circolazione dopo la somministrazione.
- Capacità di *swelling*, i nanogel sono in grado di aumentare il loro volume fino al 30%wt assorbendo grandi quantità di acqua, con modalità simile a quella descritta precedentemente per gli idrogeli, e ciò è dovuto alla presenza di gruppi funzionali idrofilici come -OH, -CONH-, -CONH₂-, -SO₃H e a reticolazioni di tipo chimico o fisico tra le catene polimeriche che mantengono la struttura intatta. È possibile anche avere un fenomeno di collasso o *deswelling* nel caso in cui il caricamento del farmaco provochi una riduzione di volume a causa di interazioni con le catene polimeriche di tipo elettrostatico, idrofobiche o legami a idrogeno. Ciò provoca una riduzione della solubilità della struttura con conseguente collasso ed esposizione delle catene idrofiliche che formano uno strato protettivo intorno alla struttura [14].

- Ridotta tossicità, le dimensioni nanometriche dei *carriers* permettono di avere una buona stabilità idrodinamica all'interno dei fluidi biologici e, oltre all'utilizzo di polimeri biocompatibili, si tende a scegliere tra quelli che a seguito della degradazione si scompongono in monomeri e molecole semplici adatte alla *clearance* renale o anche utilizzabili nelle reazioni metaboliche cellulari al fine di evitare fenomeni di accumulo ed effetti collaterali. Ad ogni modo, anche se non si utilizzassero polimeri non biodegradabili, le dimensioni nanometriche favorirebbero comunque la loro eliminazione da parte dei reni [15]. L'introduzione di legami labili e facilmente dissolvibili in ambiente riduttivo sulla catena principale del polimero o tra i legami reticolati del *network*, promuove la decomposizione del *carrier* e la sua eliminazione. [13]
- Maggiore capacità di caricamento con la possibilità di incapsulare anche più di una sostanza tra farmaci, molecole terapeutiche o biologiche come frammenti di DNA o RNA, proteine e nanoparticelle inorganiche utilizzate per applicazioni di *bioimaging*. Oltre alla funzione di caricamento e trasporto di molecole bioattive, i nanogel permettono anche la loro protezione dalla degradazione in vivo aumentandone così il tempo di circolazione.

I nanogel vengono realizzati principalmente con geometria sferica ma negli ultimi anni le tecniche di sintesi più innovative, come la fotolitografia, hanno anche permesso di creare nanogel con diverse strutture che incrementano le capacità di circolazione intravascolare. Tuttavia, ciò risulta essere ancora molto complicato e costoso [14].

La struttura di questi *nanocarriers* può essere inoltre realizzata con una configurazione *core-shell* o *core-shell-corona* che presenti almeno uno dei layer reticolato per dare stabilità e rigidità.

Come gli idrogeli, anche i nanogel vengono classificati in funzione della natura dei legami reticolati che formano il *network* che possono essere di tipo fisico, caratterizzato da legami deboli, o chimico mediante legami covalenti. Ciò verrà approfondito in seguito.

2.4 Meccanismi di rilascio

Il rilascio del farmaco contenuto all'interno del nanogel è funzione del polimero, o polimeri, utilizzati per la realizzazione del *carrier* e dalle sue proprietà. Infatti, la viscosità, la densità di reticolazione, la tipologia delle funzionalizzazioni, la porosità e la *mesh size* influenzano notevolmente il meccanismo e la velocità di rilascio. È stato dimostrato che i nanogel, grazie all'elevata stabilità nell'ambiente fisiologico, permettono un miglior controllo e un rilascio più lento e graduale rispetto, ad esempio, a sistemi come le micelle [16].

I meccanismi coinvolti nel rilascio controllato di farmaci da parte dei *nanocarriers* sono la diffusione, il rigonfiamento (*swelling*) e la pressione osmotica caratterizzate da processi di tipo fisico e la bioerosione che prevede invece meccanismi di tipo chimico. Si può inoltre avere un rilascio del farmaco indotto da variazioni ambientali quali variazioni di pH, temperatura o forza ionica e stimoli esterni come luce o campi magnetici. Questo ultimo tipo di approccio verrà approfondito in seguito. Tipicamente, due o più di questi meccanismi possono avvenire simultaneamente.

- Diffusione: il farmaco viene rilasciato attraverso il polimero a seguito di una variazione nella concentrazione tra l'interno e l'esterno della struttura definito dal coefficiente di diffusione D . Esso viene definito dall'equazione di Stoke-Einstein (6) ed è correlato a parametri sia del farmaco che del *carrier*:

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_h} \quad (6)$$

in cui k è la costante di Boltzmann, T la temperatura, η la viscosità e R_h il raggio idraulico. Vi sono due tipi di sistemi farmaco-vettore che utilizzano questo meccanismo, quelli a serbatoio che presentano un *core* cavo in cui è intrappolato il farmaco e una membrana polimerica esterna. In questo caso, il rilascio avviene con una cinetica di ordine zero finché la concentrazione del farmaco all'interno del *carrier* risulta maggiore di quella esterna. L'altra tipologia di sistema è a matrice, in cui il farmaco è disperso nel polimero in maniera omogenea. In questo caso la cinetica di rilascio risulta essere del primo ordine con una velocità di rilascio maggiore all'inizio e che decresce successivamente.

- *Swelling*: quando il *nanocarrier* viene a contatto con i fluidi biologici si ha un assorbimento di acqua che provoca un aumento del volume del polimero e, come mostrato in Figura 2.4.1, lo spazio tra le catene polimeriche varia permettendo così alle molecole del farmaco di fuoriuscire.

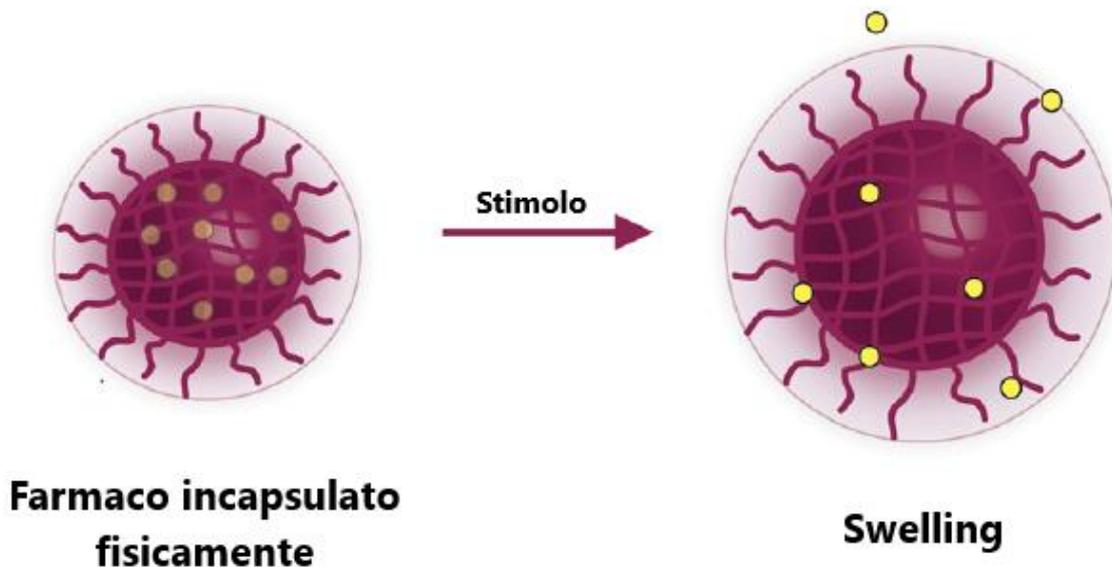


Figura 2.4.1: Rilascio controllato di un farmaco legato in modo non-covalente tramite una variazione fisica del nanocarrier [4].

- Pressione osmotica: la variazione di pressione osmotica tra l'interno e l'esterno del *device* provoca il rilascio del farmaco.
- Bio-erosione: questo meccanismo consiste nella degradazione uniforme della matrice polimerica o della sua superficie a causa di reazioni di decomposizione, come ad esempio l'idrolisi, che provoca la rottura dei legami chimici e il conseguente rilascio del farmaco. La velocità di rilascio risulta proporzionale a quella con cui vengono rotti i legami. La struttura polimerica viene decomposta in oligomeri e monomeri che l'organismo è in grado di eliminare.

2.5 Materiali biomedici

I materiali che vengono utilizzati in ambito medico devono soddisfare diversi requisiti al fine di evitare l'insorgere di problemi a causa di effetti collaterali, fenomeni di accumulo e reazioni del sistema immunitario.

È necessario quindi che siano biocompatibili in modo tale che l'organismo ospite non inneschi reazioni immunogeniche e si evitino effetti emo- e citotossici. Per questo motivo, risulta importante eliminare tracce di agenti estranei, additivi e residui di sintesi come solventi organici che potrebbero rendere il materiale non tollerabile.

I materiali quando vengono a contatto con l'ambiente fisiologico incorrono a degradazione di tipo ossidativa, enzimatica o idrolitica con alterazione graduale della loro struttura chimica, anche fino a dissoluzione completa, generando prodotti secondari che non devono provocare effetti tossici o accumularsi nell'organismo. Il biomateriale deve quindi essere anche biodegradabile, ovvero deve scomporsi in molecole più semplici che possano essere eliminate facilmente dall'organismo.

I materiali utilizzati per la sintesi di nanogel per il *drug delivery* sono polimeri biocompatibili e biodegradabili e vengono classificati in funzione della loro composizione chimica in naturali e sintetici. È anche possibile sintetizzare nanogel ibridi tra materiali naturali e materiali sintetici, attraverso copolimerizzazione o graffaggio, al fine di ottenere proprietà specifiche per diverse applicazioni.

La scelta di realizzare questi *nanocarriers* in materiale polimerico è dovuta alla loro elevata versatilità e variabilità di composizione che permettono di ottenere proprietà fisiche e meccaniche differenti in funzione del tipo di applicazione. Hanno anche un'ottima processabilità e lavorabilità necessarie per realizzare dispositivi di dimensioni nanometriche con forme e strutture complesse che possano ospitare al loro interno, o sulla superficie tramite funzionalizzazione, diverse biomolecole. Risulta quindi importante che il materiale presenti dei gruppi funzionali reattivi capaci di legarsi al farmaco e che sia stabile nel flusso ematico, ma che si degradi con velocità controllata al sito di azione.

2.5.1 Nanogel naturali

I nanogel naturali sono costituiti da polimeri reperibili nei tessuti biologici basati principalmente su proteine e polisaccaridi, per questo motivo possiedono delle ottime proprietà di biocompatibilità, biodegradabilità e inerzia chimica [17]. La possibilità di funzionalizzare questi polimeri grazie alla presenza di gruppi reattivi permette di modificarne le proprietà e la struttura in base alle esigenze.

La loro derivazione può essere animale o umana e prima del loro utilizzo è necessario effettuare una devitalizzazione del tessuto per eliminare tracce cellulari o contaminanti che potrebbero compromettere la loro applicazione *in vivo*.

Tra i polimeri naturali più diffusi e studiati si ha il collagene, principale proteina che costituisce la matrice extracellulare (ECM) nei tessuti animali. Esso è già stato ampiamente utilizzato per la sintesi di nanogel fisici con proprietà dipendenti dalle variazioni di temperatura, definiti gel termoreversibili che, tuttavia, mostrano scarse proprietà fisiche e meccaniche. Nanogel chimici reticolati mediante legami covalenti grazie ad agenti quali, ad esempio, la glutaraldeide o la metacrilammide possiedono proprietà migliori e sono dunque più diffusi [18].

A partire dal collagene, mediante una degradazione idrolitica, si ottiene la gelatina che è stata anch'essa utilizzata per sintetizzare nanogel [18].

Anche l'acido ialuronico è un polimero naturale che costituisce il tessuto connettivo, epiteliale e neurale ed è soggetto a numerose ricerche per realizzare nanogel in grado di reagire a stimoli interni ed esterni. Esso si presenta come un polimero lineare anionico e possiede un'elevata biocompatibilità, biodegradabilità e non tossicità, permette di realizzare facilmente diversi tipi di *nanocarriers* (micelle, nanoparticelle e nanogel) tramite coniugazione con gruppi idrofobi come il gruppo metacrilato, colesterolo o acetile [19]. Le dimensioni nanometriche e la possibilità di modificare dei gruppi funzionali presenti in catena come carbossili, idrossili e N-acetili, rendono i nanogel in acido ialuronico degli ottimi *carriers* per un *drug delivery* selettivo e mirato in particolare per tessuti tumorali grazie all'aumento di permeabilità e di ritenzione (effetto EPR) e alla capacità di interagire con recettori specifici delle cellule tumorali sovraespressi.

Diversi studi hanno mostrato le elevate capacità di caricamento dei nanogel di acido ialuronico incapsulando diversi farmaci, tra cui la doxorubicina (DOX) e il paclitaxel (PTX) [19].

Il chitosano è un polisaccaride derivante dalla deacetilazione della chitina che in natura risulta essere una componente degli esoscheletri di crostacei e insetti. Il chitosano possiede una solubilità variabile in funzione del pH del mezzo acquoso, infatti in soluzioni acide con pH inferiori a sei risulta solubile grazie alla presenza di gruppi amminici e della loro protonazione conferendo al polimero una carica superficiale netta positiva [20].

Tra le proprietà più interessanti del chitosano si ha una buona mucoadesività che promuove il tempo di permanenza dei farmaci nel sito di rilascio e un'ottima azione antimicrobica che limita o blocca la proliferazione di batteri grazie all'interazione elettrostatica che si instaura tra i gruppi amminici del polimero e la superficie dei batteri. Promuove inoltre la produzione di collagene da parte degli osteoblasti con conseguenti proprietà emostatiche e cicatrizzanti che favoriscono il suo utilizzo per applicazioni dell'ingegneria tissutale [21].

Nonostante i polimeri naturali mimino bene l'ambiente cellulare fisiologico e la loro porosità favorisca l'infiltrazione delle cellule oltre che la loro adesione e proliferazione, uno dei limiti principali è quello di avere scarse proprietà meccaniche come bassa resistenza e per questo motivo le loro applicazioni sono spesso limitate alla realizzazione di *scaffold*.

2.5.2 Nanogel sintetici

La grande versatilità dei polimeri sintetici permette, già in fase di progettazione, di realizzare un *nanocarrier* con determinate proprietà quali peso molecolare, struttura chimica e presenza di gruppi funzionali, variando in maniera controllata diversi parametri. Si è in grado quindi di sintetizzare materiali che possiedono proprietà differenti in funzione della loro applicazione.

Il glicole polietilenico (PEG) risulta essere uno dei polimeri più utilizzati grazie alla sua elevata biocompatibilità, non tossicità e non immunogenità, proprietà che gli hanno conferito la certificazione FDA (*Food and Drug Administration*) per somministrazioni iniettabili, topiche, rettali e nasali [22]. Il PEG è un polimero idrofilico e spesso si effettua una reticolazione di tipo covalente, definita PEGilazione, che permette di unire il PEG con una proteina terapeutica o un farmaco rendendoli non visibili al sistema immunitario, aumentando così il tempo di circolazione [22].

Tuttavia, questo polimero può presentare dei problemi di biodegradabilità oltre che alterare l'attività delle proteine a cui è legato [22].

Un altro polimero molto diffuso è il polivinilalcol (PVA), semicristallino, idrofilico e con una buona biocompatibilità e biodegradabilità. Il PVA permette la realizzazione di nanogel in maniera piuttosto facile e senza l'utilizzo di agenti reticolanti come è stato riportato in un lavoro di Chen *et al.* in cui

nanogel a base di PVA in grado di reagire a variazioni di pH, sono stati sintetizzati mediante fotoreticolazione di nanoaggregati [23].

Il N-(2-idrossipropil) metacrilammide (HPMA) è un polimero dell'acido metacrilico ed è uno dei *carrier* più comuni per il trasporto di farmaci. A causa della sua non biodegradabilità, l'HPMA viene utilizzato con pesi molecolari inferiori a 45 kDa in modo tale da poter essere eliminato facilmente dalle vie renali senza fenomeni di accumulo ed effetti collaterali [24].

3. Metodi di sintesi dei nanogel

La sintesi dei nanogel può avvenire tramite la polimerizzazione diretta dei monomeri in presenza di un agente reticolante o a partire da polimeri precursori che vengono successivamente reticolati formando così il *network* tridimensionale tipico di questi nanovettori.

Infatti, oltre che per l'origine del materiale, sintetico o naturale, i nanogel polimerici vengono tipicamente classificati in funzione del tipo di reticolazione che li caratterizza, si può avere un *crosslinking* fisico o chimico. Il primo è una reticolazione ottenuta in ambiente controllato che coinvolge interazioni deboli tra le catene polimeriche come legami a idrogeno, interazioni ioniche o idrofobiche. Questo tipo di strutture risultano essere meno stabili e più fragili rispetto ai nanogel di tipo chimico ma, grazie alle condizioni in cui vengono formati, facilitano il caricamento di farmaci e molecole evitando il loro danneggiamento [25].

I nanogel chimici, invece, coinvolgono legami di tipo covalente tra le catene polimeriche ottenuti durante la polimerizzazione di monomeri a basso peso molecolare o durante il *crosslinking* di precursori polimerici [14].

3.1 *Crosslinking chimico*

La capacità di autoassemblaggio dei copolimeri anfifilici in un mezzo acquoso permette la realizzazione di strutture nanometriche ordinate che vengono successivamente reticolate con metodi fisici o chimici per conferire stabilità strutturale. Alcuni esempi di reticolazione chimica più comunemente utilizzati sono elencati qui di seguito:

- Polimerizzazione radicalica: questa risulta essere la tecnica più comune e utilizzata per la produzione di nanogel grazie all'elevata efficienza e versatilità che permette di realizzare delle strutture stabili e ben definite con un'ampia varietà di omopolimeri e copolimeri a blocchi [26]. Inoltre, è possibile combinare in un unico processo la copolimerizzazione e la reticolazione del nanogel [13]. La reazione consiste nella formazione di radicali liberi che si generano a partire dalla decomposizione di un iniziatore tramite luce, temperatura o reazione redox. Queste specie altamente reattive danno inizio a una polimerizzazione successiva dei monomeri che si trovano all'interno di una sospensione colloidale formata per autoassemblaggio in precedenza, come micelle. La reazione, quindi, avviene all'interno di nanoreattori le cui proprietà sono funzione della quantità e tipologia di tensioattivo utilizzato e, a loro volta, definiscono le proprietà finali del nanogel quali dimensioni, forma e stabilità [13]. Uno degli svantaggi di questa tecnica è la difficoltà nel controllare la distribuzione dei pesi molecolari che provoca dunque una disomogeneità a livello molecolare del *network* polimerico. I metodi più utilizzati che si basano sulla polimerizzazione radicalica sono la polimerizzazione radicalica per trasferimento atomico (*Atom Transfer Radical*

Polymerization, ATRP) e la polimerizzazione a trasferimento di catena con addizione-frammentazione reversibile (*Reversible Addition Fragmentation chain Transfer*, RAFT).

- Reazioni di *Click chemistry*: la “chimica a scatto” rappresenta un insieme di metodi di sintesi di composti complessi a partire da molecole semplici, in maniera rapida e semplice. I vantaggi principali che derivano dall'utilizzo di queste reazioni è la loro alta specificità, buona resa e sono applicabili a numerosi gruppi funzionali diversi. Tra le reazioni più utilizzate per la realizzazione di nanogel polimerici si ha la reazione di cicloadizione di Huisgen azide-alchino catalizzata dal rame (CuAAC) che rende il processo molto rapido e altamente regioselettivo. La reazione consiste nella combinazione tra un azide e un alchino con formazione di un triazolo, il tutto in presenza di un catalizzatore di rame (I) [27]. Nonostante l'elevata efficienza del processo e la sua stabilità in ambiente biologico, recentemente si sono diffuse reazioni che non prevedono l'utilizzo di catalizzatori metallici per escludere l'insorgere di effetti tossici e rendere i composti più adatti all'uso biomedico, un esempio sono l'addizione di Michael e la reazione tiolo-ene.
- Reazione tra basi di Schiff: reazione di condensazione tra un'aldeide e un'ammina che permette la realizzazione di gel biocompatibili in condizioni controllate senza l'uso di catalizzatori. È stato notato che questi legami sono sensibili alle variazioni di pH e risultano essere più labili in ambienti acidi ma stabili in ambiente fisiologico, ciò li rende adatti alla realizzazione di *nanocarrier* a rilascio controllato. In uno studio di Qu and Yang *et al.*, è stato sintetizzato un nanogel mediante una reazione con basi di Schiff tra i gruppi amminici del farmaco urochinasi e il PEG funzionalizzato con la benzaldeide [27].
- Fotoreticolazione: i precursori polimerici possono presentare dei gruppi funzionali sensibili all'irraggiamento con fasci di elettroni ad alta energia o con i raggi γ , in grado di assorbirla originando specie reattive che innescano la reazione di polimerizzazione. Il vantaggio di questa tecnica è che la reticolazione avviene senza l'utilizzo di agenti reticolanti, additivi o catalizzatori. Si ha una resa molto elevata ed è possibile avere un buon controllo sulla dimensione e geometria delle nanoparticelle. Questa tecnica viene utilizzata ad esempio per la sintesi di nanogel a base di PVA [23].
- Legame disolfuro: il ponte disolfuro (-S-S-), contenuto in composti quali peptidi e proteine, è un legame che presenta una buona rigidità e conferisce quindi stabilità alla nanostruttura. Il principale vantaggio di questo legame è la sua reversibilità, poiché in funzione della concentrazione di tioli presenti può ridursi spontaneamente nei gruppi tiolici di partenza. Questa proprietà viene sfruttata per il rilascio di farmaci in tessuti tumorali perché l'ambiente che li circonda è caratterizzato da un'elevata concentrazione di tioli che facilita quindi la degradazione del *nanocarrier* [28].
- Legame amminico: si sfrutta l'elevata reattività di questo legame nei confronti di acidi carbossilici, esteri, isocianati *etc.* per favorire la reticolazione. Questo tipo di legame permette inoltre di introdurre nel nanogel la capacità di rispondere a stimoli esterni [13].
- Reticolazione tramite attività enzimatica: si possono utilizzare enzimi in grado di catalizzare la reticolazione polimerica in maniera molto efficiente e rapida. La reazione risulta essere facilmente controllabile e dipendente dalla struttura e composizione del polimero, dal rapporto tra i reagenti e la concentrazione dell'enzima. Nonostante risulti essere una tecnica che realizza nanogel altamente biocompatibili e adatta alla gelificazione *in situ*, non è ancora molto diffusa [27].

3.2 Crosslinking fisico

La reticolazione coinvolge interazioni deboli tra le catene dei precursori evitando così l'utilizzo di agenti reticolanti potenzialmente tossici. Inoltre, i nanogel fisici hanno la possibilità di incorrere ad una transizione sol-gel in seguito a variazioni ambientali e stimoli esterni in maniera più semplice rispetto ai nanogel chimici che invece possiedono una struttura più stabile e difficile da variare [13]. Le dimensioni dei vettori sono controllabili in funzione della concentrazione dei polimeri e dei parametri ambientali come il pH, la temperatura o la forza di interazione ionica. La struttura, tuttavia, possiede una minore resistenza meccanica e stabilità anche *in vivo*, limitandone così le applicazioni. Si possono quindi formare nanogel basati su interazioni ioniche che si instaurano tra le catene polimeriche di carica netta opposta. Spesso può essere utilizzato il colesterolo come frazione idrofobica che favorisce l'autoassemblaggio dei copolimeri idrofilici realizzando così una struttura stabile in cui si ha un equilibrio tra le frazioni idrofobiche e idrofiliche [27].

Un altro tipo di legame debole intra e intermolecolare che si può instaurare tra le catene dei precursori in presenza di gruppi come $-OH$ o $-NH_2$, è un legame a idrogeno che risulta essere sensibile alle variazioni di pH e alla natura del solvente.

4. Incapsulamento e targeting

Come evidenziato in precedenza, uno dei principali vantaggi dei nanogel è la capacità di superare le barriere biologiche anche se somministrati attraverso metodologie differenti da quella endovenosa, come orale, intradermica o polmonare. Quindi, in funzione del tipo di somministrazione e al farmaco che devono trasportare, i nanogel vengono realizzati in maniera tale da prolungare il tempo di circolazione del principio attivo, favorirne il passaggio nel flusso ematico oltrepassando sia le barriere fisiologiche, che non sarebbero in grado di superare da soli, sia di eludere i sistemi di riconoscimento di particelle estranee come avviene con l'opsonizzazione in cui le cellule fagocitarie si legano al corpo estraneo favorendo la sua eliminazione attraverso fegato e milza.

Una delle tecniche più diffuse per mascherare la natura del *nanocarrier* favorendo la sua circolazione, è quella di realizzare una coniugazione con il PEG, definita PEGilazione, che rende la superficie del nanogel più idrofilica, scherma un eventuale carica all'interno del *core* e induce un ingombro sterico che evita l'aggregazione e l'interazione con altre molecole. Queste proprietà, oltre che dipendere dalle dimensioni del nanogel e dalla sua forma, sono strettamente correlate al peso molecolare e alla densità superficiale del PEG [14].

Un'altra proprietà del nanogel che influenza il tempo di circolazione è la sua deformabilità e quindi il suo modulo elastico, meno il *carrier* risulta essere rigido con un modulo elastico minore e maggiore sarà la sua capacità di attraversare le membrane e barriere fisiologiche senza rimanerne intrappolato. Sono inoltre in grado di passare attraverso pori che presentano un diametro idrodinamico minore di quello del nanogel favoriti dalla pressione fisiologica.

È stato mostrato da diversi studi, che i nanogel sono in grado di incapsulare diverse tipologie di biomolecole e farmaci.

Le tecniche che permettono di realizzare l'incapsulamento sono principalmente tre:

- Coniugazione covalente dei principi attivi che può avvenire durante la sintesi del nanogel o utilizzandone uno preformato. Il sistema farmaco-vettore risulta essere molto stabile rispetto a quello realizzato tramite le altre tecniche.

- L'incapsulamento mediante interazioni fisiche quali elettrostatiche, di Van der Waals e interazioni idrofobiche tra il farmaco e le catene polimeriche. Tuttavia, per quanto sia semplice e utilizzato, questo metodo non permette elevate capacità di caricamento che risultano essere limitate a circa il 10%. Il vantaggio di utilizzare interazioni fisiche è la versatilità del sistema poiché è possibile incapsulare una grande varietà di farmaci, con proprietà chimiche diverse, senza modificarne la struttura e quindi l'efficacia terapeutica [4].
- L'autoassemblaggio prevede un'auto-organizzazione dei componenti in aggregati che presentano interazioni intermolecolari di tipo non covalente che, nonostante la loro scarsa forza prese singolarmente, mostrano un comportamento strutturale complessivo molto stabile grazie all'elevato numero di interazioni coinvolte.

Quando si instaura il legame con il farmaco, si ha il collasso della struttura del nanogel con conseguente riduzione del volume e ottenimento di nanoparticelle polimeriche in cui il farmaco risulta intrappolato al loro interno. Viene utilizzato un polimero idrofilico come il PEG per funzionalizzare la superficie del sistema evitando l'aggregazione delle nanoparticelle.

In funzione del tipo di *carrier* a disposizione e del farmaco da trasportare, viene selezionata una metodologia di incapsulamento differente che si basa sulle caratteristiche fisico-chimiche del sistema farmaco-vettore e dunque, l'efficienza di incapsulamento varia per ciascun caso.

È quindi possibile intrappolare all'interno dei nanogel differenti tipi di farmaci, principi attivi e biomolecole o anche una combinazione di essi, con natura sia idrofilica che idrofobica.

Un esempio di biomolecole che sono state oggetto di diversi studi per il *drug delivery*, sono le proteine che risultano avere una scarsa stabilità, bassa permeabilità e sono soggette a degradazione enzimatica con conseguente limitato tempo di circolazione. L'obiettivo dell'incapsulamento delle proteine nei nanogel è dunque quello di migliorare la loro emivita e aumentare il loro tempo di circolazione per favorire l'effetto terapeutico. L'insulina, ad esempio, è stata incapsulata efficacemente sia in nanogel naturali come chitosano o alginato, sia sintetici come il PCL e polimeri acrilici, in entrambi i casi si sono ottenuti degli ottimi risultati in termini di biocompatibilità, permeabilità e migliore reattività. La somministrazione di questi nanogel è di tipo orale e, nonostante le barriere epiteliali nel tratto gastrointestinale, è stata dimostrata la migliore efficacia sul trattamento dell'ipoglicemia rispetto alla somministrazione di insulina tramite iniezione [29].

Anche nella terapia genetica sono stati utilizzati nanogel per la somministrazione di brevi sequenze di DNA e RNA, definiti oligonucleotidi (ON), per il trattamento di malattie genetiche, disturbi neurodegenerativi e infezioni virali. Molecole come siRNA e mRNA sono già state utilizzate nel *drug delivery* ottenendo degli ottimi risultati ma il loro utilizzo rimane ancora soggetto di studi e ricerche [30].

L'incapsulamento degli oligonucleotidi risulta necessario in quanto risultano essere idrofili, con una carica netta negativa che impedisce loro il passaggio attraverso le membrane cellulari e possono essere facilmente degradate in ambiente fisiologico e attaccate dal sistema immunitario. È stato mostrato come nanogel cationici risultino essere un ottimo vettore per la somministrazione di oligonucleotidi che vengono incapsulati grazie a interazioni di tipo elettrostatico [30].

L'obiettivo di rilasciare il farmaco in un sito specifico può essere raggiunto mediante due tipologie di trasporto o *targeting*.

Il *targeting* passivo risulta essere il metodo più semplice perché il direzionamento si basa sulle caratteristiche morfologiche e chimico-fisiche del nanogel e sfrutta l'effetto EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) che permette di individuare il tessuto malato grazie a un aumento della permeabilità e della ritenzione in prossimità di esso. Infatti, il tessuto tumorale presenta anomalie

strutturali come una ipervascolarizzazione e un ridotto drenaggio linfatico che favoriscono quindi un accumulo dei nanogel in questa zona ottenendo così un'elevata concentrazione locale del farmaco antitumorale limitando molto gli effetti collaterali semplicemente modulando la dimensione dei carrier.

Il *targeting* attivo, invece, consiste nel riconoscimento e interazione tra specifici recettori espressi esclusivamente o prevalentemente sul tessuto malato e ligandi funzionalizzati sulla superficie del nanogel. Possono essere coniugate diverse macromolecole come anticorpi, proteine, polisaccaridi, aptameri e *small molecules* che riescono ad individuare i fenotipi del tessuto malato, come proteine o enzimi, sul quale vengono sovraespressi.

Questo tipo di *targeting* richiede una specifica progettazione del *nanocarrier* che viene prima sintetizzato e poi funzionalizzato con i ligandi che vengono tipicamente disposti sulla superficie in modo tale da essere rapidamente disponibili, sfruttando dunque l'elevata area superficiale specifica tipica dei nanogel [1].

Un esempio di recettore che risulta essere sovraespresso solo nei tessuti tumorali, in particolare in quelli del cancro ovarico, è il FR (*Folate Receptor*). In alcuni studi [1], i nanogel sono stati funzionalizzati con dell'acido folico che è stato in grado di interagire efficacemente con il FR ottenendo così un *carrier* capace di individuare il tessuto malato, accumularsi localmente e permettere un rilascio controllato del farmaco antitumorale solo nel sito specifico.

Anche gli anticorpi vengono utilizzati come ligandi, oltre che come agenti terapeutici, poiché possiedono un'elevata specificità per i recettori e un'alta affinità di legame coniugando così entrambe le proprietà [1].

Come è stato evidenziato in diversi studi, il *targeting* attivo risulta dunque essere un metodo più efficiente e sicuro per l'individuazione di tessuti non sani e per il loro trattamento perché favoriscono un migliore profilo di distribuzione dei *carrier*, più mirato, limitando al minimo l'accumulo di nanogel e il rilascio di farmaci in tessuti non bersaglio con conseguente diminuzione di effetti collaterali.

Uno schema del meccanismo del *targeting* attivo è illustrato in Figura 4.1.

I due metodi di *targeting*, attivo e passivo, risultano indipendenti tra loro ma possono essere utilizzati entrambi in maniera opportuna al fine di massimizzare le capacità di direzionamento del nanosistema.

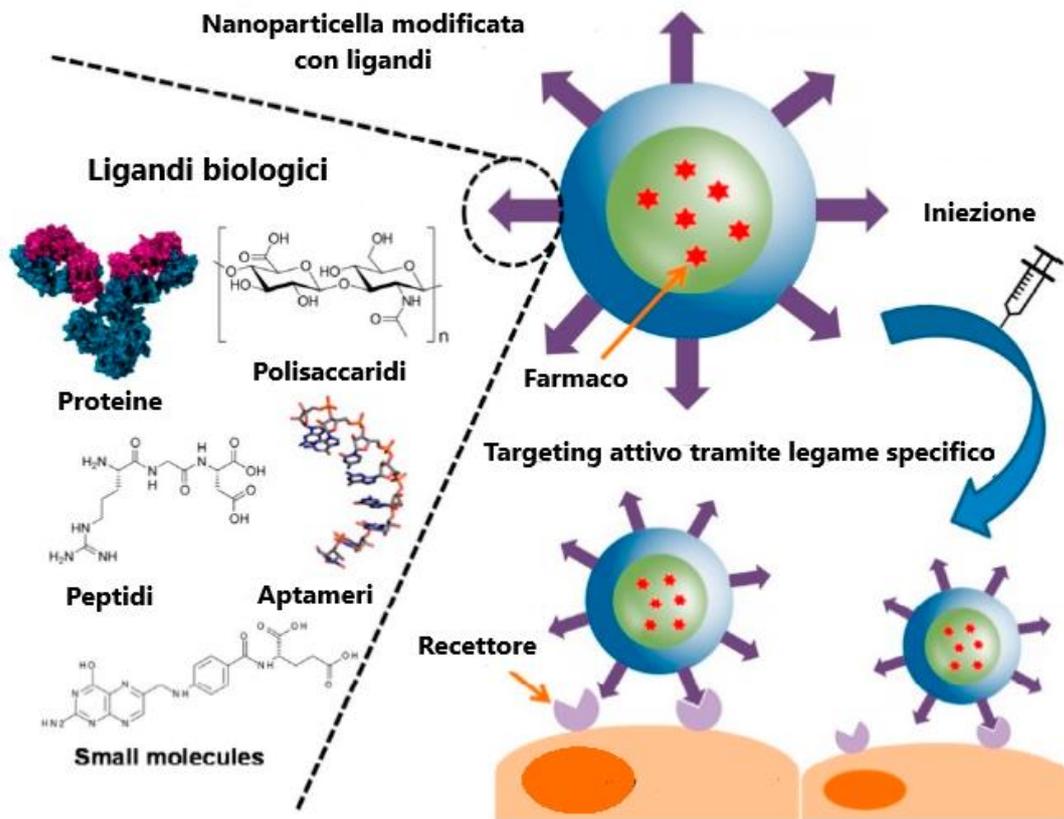


Figura 4.1: Rappresentazione schematica del meccanismo di *targeting* attivo e dei ligandi più utilizzati [29, con modifiche].

5. Stimuli-responsive nanogel

Grazie alle peculiari condizioni che presenta l'ambiente circostante ai tumori solidi come un innalzamento locale della temperatura, un minore pH rispetto ai tessuti sani, elevata concentrazione di glutatione (GHS) e alla presenza di particolari elementi biologici, è possibile realizzare dei nanogel in grado di veicolare i farmaci nel sito malato e di rilasciarli solamente a seguito di uno stimolo interno o esterno (*stimuli-responsive nanogel*), come illustrato in Figura 5.1.

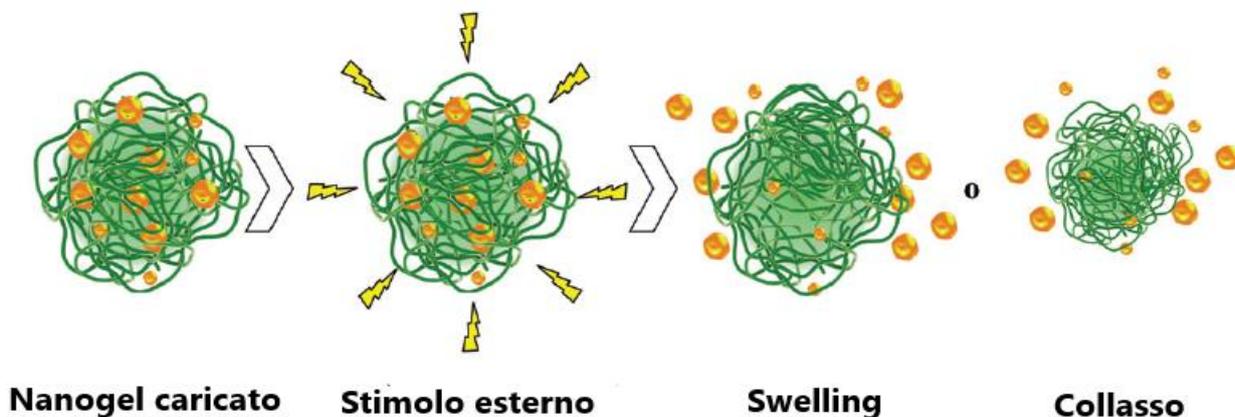


Figura 5.1: Meccanismo di rilascio da parte di un nanogel caricato a seguito di uno stimolo esterno o interno [13, con modifiche].

La possibilità di utilizzare nanogel per il *drug delivery* in grado di reagire a stimoli, permette di ridurre le dosi di farmaco necessarie e gli effetti collaterali poiché i *carrier* riescono ad arrivare al sito bersaglio e rilasciare *in situ* tutto l'agente terapeutico.

La capacità di reagire a stimoli può essere ottenuta e controllata modificando la struttura del nanogel, ad esempio, introducendo gruppi funzionali reattivi a uno specifico stimolo.

Gli stimoli che inducono il rilascio del farmaco possono essere di due tipi, fisico e chimico. Nel caso in cui il farmaco sia legato al vettore tramite legami di tipo covalente sarà dunque necessario utilizzare stimoli prettamente di tipo chimico per rompere questi legami come una reazione indotta da sostanze chimiche, tramite reazioni enzimatiche o redox e variazioni di pH. Se il farmaco risulta invece legato al carrier tramite interazioni fisiche, allora si potrà ricorrere a un rilascio indotto da stimolo sia chimico sia fisico come variazioni di temperatura o pH in grado di innescare il cambiamento fisico nella struttura del nanogel, come ad esempio un rigonfiamento o un collasso e una variazione nella idrofilicità o idrofobicità del sistema [4].

È anche possibile realizzare sistemi farmaco-vettore in grado di reagire a più di uno stimolo, in combinazione tra loro, rendendo il rilascio più specifico (*multi-stimuli responsive*).

Tra gli stimoli più utilizzati in grado di innescare il rilascio del farmaco da parte del nanogel si ha:

- Temperatura, alcuni nanogel, definiti termosensibili, sono in grado di incorrere a una variazione di volume tramite rigonfiamento e collasso mantenendo però la struttura originale a seguito di una variazione di temperatura che può essere facilmente applicata dall'esterno. Ciò accade in funzione del valore della temperatura critica di soluzione inferiore (*Lower Critical Solution Temperature*, LCST) del sistema poiché, se l'ambiente si trova ad una temperatura inferiore alla LCST, il nanogel è sottoposto a un rigonfiamento e quando la temperatura viene innalzata al di sopra della LCST si ha l'allontanamento dell'acqua contenuta nel *carrier* con conseguente riduzione di volume e rilascio del farmaco in maniera controllata [31].
- Variazioni di pH, poiché i tessuti tumorali presentano un ambiente circostante acido, con un pH inferiore di circa 0.5-1 unità rispetto a quello fisiologico che corrisponde a un valore di 7.4, si possono sfruttare sistemi farmaco-vettore sensibili a queste variazioni e a cui rispondono con una variazione di volume. Tipicamente, questi nanogel sono costituiti da polielettroliti reticolati che presentano gruppi ionizzabili che possono causare il rigonfiamento e il collasso della struttura a causa della repulsione elettrostatica che si genera. Esempi di legami sensibili all'ambiente acido sono quelli contenuti in acetali o chetali, ammina, immina, idrazone, esteri e vinil etere [27]. Infatti, la deprotonazione causa un aumento della pressione osmotica all'interno del vettore con conseguente rigonfiamento, aumento della porosità e assorbimento di acqua fino al collasso della struttura facilitando così il rilascio del farmaco [31].
- Reazioni enzimatiche, nei tessuti patologici è spesso presente un elevato numero di enzimi specifici ed è dunque possibile sfruttare questa variazione di concentrazione per veicolare in maniera selettiva i nanogel e permettere il rilascio di farmaci tramite attivazione degli enzimi [32]. I polimeri utilizzati per la realizzazione di questi *carrier* sono sensibili all'idrolisi enzimatica che provoca una variazione fisica e chimica a seguito dell'esposizione con gli enzimi. Tra gli enzimi che vengono sfruttati maggiormente si hanno proteasi, lipasi, fosfatasi ed endonucleasi [31].
- Reazioni redox, alcuni gruppi funzionali sono sensibili a differenze di potenziale riduttivo, ad esempio, tra l'ambiente extracellulare e intracellulare, che ne provoca la scissione. Uno dei

legami più utilizzati è quello disolfuro (-S-S-) poiché risulta molto stabile durante la circolazione nel flusso sanguigno ma labile quando viene assorbito dalle cellule, provocando così il rilascio del farmaco contenuto nel *carrier* [14]. Ciò accade perché all'interno delle cellule come nel citosol e nel nucleo, è presente un'elevata concentrazione di glutatione [33] che risulta essere circa 100-1000 volte superiore a quella presente nei fluidi extracellulari (circa 2-20 μM) generando così un ambiente altamente riduttivo. È stato inoltre mostrato che all'interno di cellule tumorali, la concentrazione di glutatione risulta essere ancora più elevata [27].

- Radiazione luminosa, utilizzando polimeri fotosensibili, come l'azobenzene, il benzopirano e la spiroossazina, si possono realizzare dei nanogel che incorrono a una isomerizzazione o fotodegradazione a seguito dell'esposizione di una sorgente luminosa con una specifica lunghezza d'onda. Questi cambiamenti strutturali provocano il rilascio del farmaco [34]. Nonostante sia una tecnica molto diffusa e che permette un elevato controllo del *carrier*, è necessario prestare molta attenzione alla lunghezza d'onda utilizzata poiché la luce compresa tra il medio UV (280-315 nm) e lontano UV (200-280 nm) possono risultare tossiche per l'organismo [16].
- Campo magnetico, introducendo nanoparticelle ferro e ferrimagnetiche all'interno del polimero tramite una polimerizzazione in emulsione, si realizzano nanogel ibridi in grado di reagire all'applicazione di un campo magnetico esterno.
- *Multi-stimuli responsive*, al fine di migliorare l'efficienza e il controllo del rilascio del farmaco, si possono utilizzare nanogel in grado di rispondere a due o più stimoli in modo da ottenere un effetto sinergico. Una delle combinazioni di stimoli maggiormente utilizzata è pH-temperatura.

Come è stato illustrato nei capitoli precedenti, i nanogel risultano essere un'importante risorsa per le applicazioni nel *drug delivery* grazie alle eccellenti proprietà e numerosi vantaggi rispetto agli altri *carriers*. Si è infatti visto come i nanogel migliorino il profilo e la cinetica di rilascio dei farmaci, costituendo inoltre un sistema di protezione per questi ultimi. Permettono infatti, un aumento del tempo di circolazione, evitando una prematura degradazione e riconoscimento da parte del sistema immunitario. Hanno un'elevata efficienza di caricamento, una buona stabilità nel flusso ematico e, modulando il tipo di materiale, la natura dei legami che lo costituiscono e il tipo di funzionalizzazioni presenti, permettono un rilascio mirato e controllato ottimizzando le proprietà terapeutiche del farmaco. Un esempio di ciclo *in vivo* è rappresentato in Figura 5.2.

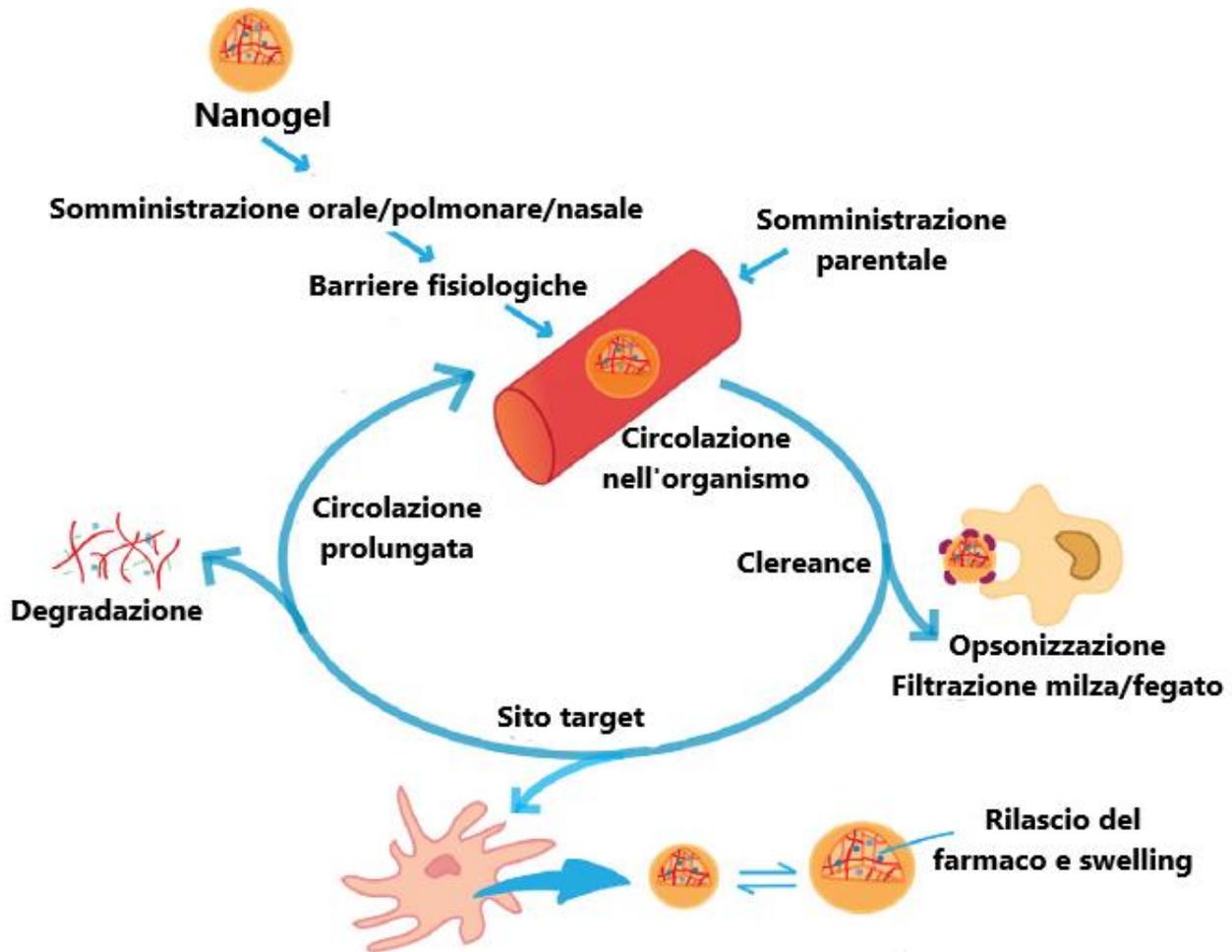


Figura 5.2: Esempio di ciclo in vivo di un nanogel per applicazioni nel drug delivery [14].

6. Limiti e problemi

Nonostante le eccellenti proprietà e gli ottimi risultati ottenuti nella sperimentazione, sia *in vitro* che *in vivo*, i nanogel risultano ancora essere oggetto di numerosi studi poiché si è visto che solamente il 5-10% della dose iniettata giunge effettivamente al sito bersaglio [14]. Vi sono infatti numerosi fattori che influenzano la distribuzione del vettore nei tessuti come la sua dimensione, geometria, composizione e carica o la tipologia di farmaco che trasporta. Alcuni dei problemi principali vengono esposti di seguito.

- *Clireance*, la filtrazione di sostanze estranee nel sangue dipende da organi quali milza o reni e l'eliminazione dei nanogel all'interno dell'organismo deve avvenire solamente dopo che essi hanno esplicitato il loro compito, ciò dipende da alcuni fattori quali la loro deformabilità e dimensione. Infatti, la filtrazione splenica risulta essere poco efficiente per nanoparticelle con dimensioni inferiori ai 200 nm che sono inoltre in grado di comprimersi e deformarsi facilmente. La filtrazione renale invece, è più efficace nell'eliminazione dei nanogel. In entrambi i casi però è necessario modulare con precisione la dimensione e la flessibilità del nanocarrier per evitare complicazioni e la loro rimozione prematura [14].

È stato mostrato come anche la geometria del sistema farmaco-vettore influisce sulla sua emivita e sul tempo di circolazione che risulta essere maggiore per nanoparticelle filamentose o con una geometria allungata [14].

Anche il rivestimento delle proteine e l'opsonizzazione contribuiscono alla *clearance* di particelle estranee favorendone l'assorbimento da parte degli organi del sistema reticoloendoteliale (RES) quali fegato e milza. Come illustrato in precedenza, un metodo per limitare questo fenomeno è quello di funzionalizzare la superficie del nanogel con il PEG che permette di eludere questi sistemi di difesa dell'organismo. Tuttavia, il PEG non è completamente inerte e le sue capacità dipendono dall'idrofobicità del vettore e dalla natura del farmaco trasportato [14].

- Carica superficiale, la presenza di una carica netta sulla superficie del nanogel può causare una variazione nel profilo di circolazione, il suo riconoscimento da parte delle cellule negli organi del RES oltre che una variazione nel profilo di opsonizzazione. Nonostante sia stato mostrato che nanoparticelle con carica neutra possiedano un tempo di circolazione maggiore, è necessaria l'introduzione di gruppi reattivi per facilitare l'incapsulamento dei farmaci, anche se conferiscono una carica superficiale non nulla quando quest'ultimo viene rilasciato.
- *Targeting*, come mostrato nei capitoli precedenti i nanogel possiedono delle ottime proprietà di *targeting*, sia passivo che attivo, in particolare nei confronti di tumori. Ciò perché questo tipo di tessuti mostra delle particolari caratteristiche che facilitano l'accumulo dei nanogel. È il caso di tumori solidi di piccole dimensioni che presentano una ipervascolarizzazione che favorisce il *targeting* passivo per effetto EPR. Tuttavia, tumori di dimensioni maggiori hanno la tendenza a sviluppare un'ipossia tissutale con conseguente necrosi, condizione che rende inaccessibile il tessuto tramite *targeting* passivo. In questi casi si ricorre dunque al *targeting* attivo tramite la funzionalizzazione della superficie dei nanogel con specifici ligandi in grado di riconoscere dei recettori che sono tipicamente sovraespressi nei tessuti tumorali. Anche in questo caso però, il *targeting* può risultare difficoltoso dal momento che è molto difficile selezionare dei recettori che siano espressi esclusivamente nel tessuto bersaglio con conseguente dispersione di farmaco anche nei tessuti sani [14]. Inoltre, l'accumulo del nanogel può non essere omogeneo sul sito malato a causa della disposizione non uniforme dei recettori. Un altro problema riguardante il *targeting* attivo è la progettazione e produzione dei sistemi farmaco-vettore, nonostante i molteplici progressi sui metodi di fabbricazione su scala nanometrica. La maggiore difficoltà risulta essere la scalabilità e riproducibilità dei sistemi tra i vari lotti a causa della sensibilità dei ligandi, in particolare anticorpi e peptidi, alle reazioni di bioconiugazione [14].

7. Applicazioni

Come illustrato precedentemente, i nanogel vengono per lo più impiegati come *nanodevices* per il rilascio mirato e controllato dei farmaci. Essi, come dimostrato, mostrano un'efficienza maggiore rispetto agli altri *carrier* come micelle, liposomi o dendrimeri, questo perché conciliano le ottime proprietà fisiche e meccaniche degli idrogeli e delle nanoparticelle. La loro elevata versatilità, in termini di dimensioni, geometria, natura dei polimeri e le diverse tipologie di farmaci che sono in grado di veicolare, fanno sì che i nanogel siano oggetto di numerosi studi che ne testino l'efficacia terapeutica. Essi sono stati già utilizzati *in vivo*, ottenendo ottimi risultati, nel trattamento di diverse patologie, prime tra tutte il cancro.

La doxorubicina (DOX) è uno dei farmaci chemioterapici più utilizzati contro diverse tipologie di tumori come quello al seno, ai polmoni, alle ovaie e altri ancora. Tuttavia, se somministrato da solo non è in grado di raggiungere in maniera specifica i tessuti malati causando dunque gravi effetti collaterali e tossicità per la necessità di utilizzarne elevate concentrazioni.

Si ricorre dunque all'incapsulamento della doxorubicina in nanogel che, sfruttando l'effetto EPR o il *targeting* attivo mediante funzionalizzazione della superficie delle nanoparticelle, sono in grado di giungere al sito malato e rilasciare il farmaco solamente in questa zona.

Un altro trattamento contro i tumori consiste in una terapia sostitutiva di miRNA che permette di regolare e ripristinare l'espressione genica dei tessuti malati alterata. In uno studio [35], si è incapsulato il miRNA all'interno di un nanogel funzionalizzato con specifici *nanobody* per incrementare la specificità del sistema. Gli esperimenti effettuati sia *in vitro* che *in vivo* hanno mostrato l'efficienza del *targeting* e dell'accumulo del miRNA nel sito di rilascio ottenendo così un'ottima efficacia antitumorale.

I nanogel sono stati utilizzati anche per la cura dell'artrite reumatoide, una malattia autoimmune che provoca un'inflammatione cronica delle articolazioni. In uno studio [36], è stato utilizzato il metotrexato (MTX) come agente terapeutico che è stato incapsulato in nanovettori migliorandone la solubilità, il rilascio controllato e il tempo di circolazione. La possibilità di rilasciare il farmaco direttamente nelle articolazioni soggette alla malattia, permette una disponibilità dell'agente terapeutico *in situ*, con maggiori concentrazioni e per un periodo di tempo più lungo.

Oltre che *carriers* per il *drug delivery*, i nanogel risultano essere degli ottimi agenti di *imaging* e agenti di contrasto. La possibilità di introdurre specifiche funzionalizzazioni permette di incapsulare e/o coniugare nanoparticelle inorganiche, coloranti organici e altre molecole.

Un esempio è l'utilizzo di nanoparticelle di ossido di ferro che, oltre a migliorare la stabilità colloidale e la sensibilità del vettore, conferiscono proprietà magnetiche.

Anche le nanoparticelle di oro possono essere incapsulate come agenti di *imaging* poiché, a seguito del rigonfiamento e collasso del nanogel, si ottiene una variazione reversibile nella distanza tra le particelle e di conseguenza diverse proprietà ottiche [14].

Piccole molecole a base di gadolino (Gd) e il manganese (Mn), che da soli provocherebbero problemi di tossicità e sarebbero eliminati dall'organismo, vengono utilizzati come agenti di contrasto nelle risonanze magnetiche grazie l'intrappolamento nei nanogel.

Alcune sostanze, come l'indocianina (ICG), sono in grado di emettere nella regione NIR e vengono utilizzati per l'*imaging in vivo* poiché queste lunghezze d'onda risultano essere più efficaci nei tessuti biologici. Dal momento che l'ICG presenta numerosi limiti se introdotta in ambiente fisiologico, come bassa emivita, degradazione in ambiente acquoso, interazione con alcune proteine del plasma che ne alterano la fluorescenza, i nanogel sono stati impiegati come vettori per permetterne la circolazione e incrementare l'effetto di *imaging* [14].

8. Caso studio

A dimostrazione dell'efficacia di incapsulamento di principi attivi da parte dei nanogel e della loro potenzialità in ambito biomedico, viene presentato uno studio effettuato al DISAT del Politecnico di Torino in cui sono stati realizzati *nanocarrier* polimerici per il rilascio transdermico di caffeina [37].

8.1 Scopo dello studio

Nel seguente studio sono stati sintetizzati nei nanogel di polietilenglicole diacrilato (PEGDA) mediante una fotopolimerizzazione in miniemulsione inversa di acqua in olio (W/O) in cui, al loro interno, è stata incapsulata della caffeina. È stato scelto come principio attivo la caffeina poiché è già largamente impiegata in ambito farmaceutico e cosmetico grazie alle sue numerose proprietà ed effetti benefici. Viene infatti utilizzata come stimolante del sistema nervoso centrale e intensifica dunque l'attività mentale e migliora i riflessi. Ha effetti broncodilatatori, favorendo la velocità e la profondità della respirazione con effetti positivi contro l'asma. Favorisce inoltre un aumento del metabolismo. Viene utilizzata anche all'interno di cosmetici per le sue proprietà antiossidanti, per trattare le adiposità localizzate e proteggere la pelle dalle radiazioni UV [38].

8.2 Sintesi del nanogel polimerico

Per realizzare il *nanocarrier* si è utilizzato come metodo di sintesi la fotopolimerizzazione in miniemulsione inversa che consiste nella preparazione di due fasi distinte, una dispersa acquosa e una continua oleosa. La prima è costituita da acqua, dal monomero PEGDA, dal fotoiniziatore che ha il compito di assorbire la radiazione luminosa e generare le specie reattive necessarie per garantire la polimerizzazione e dalla caffeina. Il tutto è sottoposto a uno stirring magnetico fino a completa solubilizzazione dei reagenti. Il fotoiniziatore utilizzato è il Darocur 1173 e si è scelto di inserirlo nella fase dispersa insieme al monomero in maniera tale da essere disponibile nel luogo della reazione e facilitarne lo sviluppo.

La fase continua è invece costituita da olio di semi di girasole e dal tensioattivo, anch'essa viene sottoposta a stirring per facilitare la dissoluzione del tensioattivo non ionico in olio. La scelta di utilizzare l'olio di semi di girasole come fase oleosa è dovuta alla sua biocompatibilità e non tossicità per l'organismo.

Per la scelta del tensioattivo sono stati presi in considerazione tre agenti: il sodio dodecilsolfato SDS, lo Span 80 e il Pluronic PE 6100. Quest'ultimo, un copolimero a blocchi composto da polietilenglicole (PEG) e polipropilenglicole (PPG), è un tensioattivo di tipo non ionico ed è stato selezionato in quanto permette di ottenere una buona stabilità dell'emulsione e limita i fenomeni di coalescenza. L'SDS è stato scartato poiché, essendo un agente schiumogeno, provoca problemi di foaming, instabilità del sistema e coalescenza. Anche lo Span 80, nonostante permetta di realizzare un sistema uniforme, non risulta essere adatto perché si ha coalescenza delle gocce dopo qualche ora.

In Figura 8.2.1, a seguito di un'analisi DLS (*Dynamic Light Scattering*), vengono riportati i dati del diametro medio delle nanoparticelle e l'indice di polidispersità PDI del sistema con lo Span 80 e con due diversi rapporti di Pluronic.

Surfactant	Surfactant, wt %	Z-Average, nm	Std dev, nm	PDI, -
Span 80	0.2	170.0	69.5	0.69
Pluronic PE 6100	0.3	245.2	30.5	0.19
Pluronic PE 6100	0.4	176.6	13.4	0.29

Figura 8.2.1: Dati dell'analisi DLS in cui si evidenziano il diametro medio delle nanoparticelle, la deviazione standard e il PDI.

Come si osserva dai risultati, la miniemulsione con lo 0.4%wt di Pluronic possiede ottime proprietà rispetto alle altre formulazioni come una deviazione standard minore e dimensioni delle particelle ridotte, dunque è stata scelta come quella ottimale.

Dopo aver definito la composizione finale del sistema, l'emulsione viene realizzata mediante l'utilizzo di un dispositivo ad alto taglio, l'Ultra Turrax, che permette di generare una turbolenza e ottenere una buona uniformità. Questo processo ha una durata di 10 minuti e una velocità di rotazione di 1400 rpm, valori che favoriscono una buona dispersione della fase acquosa in quella oleosa e una dimensione delle nanoparticelle ottimale.

Una volta ottenuta la miniemulsione inversa, essa deve essere polimerizzata mediante esposizione ai raggi UV emessi da una lampada al mercurio. Per tempi di irraggiamento minori ai 10 minuti la polimerizzazione è risultata incompleta, mentre per tempi superiori ai 15 minuti si è ottenuto del residuo solido dovuto all'eccessiva esposizione e formazione di aggregati di nanoparticelle.

Il tempo ottimale di esposizione è risultato essere 15 minuti, definito anche dall'analisi termica che ha evidenziato la mancanza del picco di fusione del monomero a conferma della completa polimerizzazione.

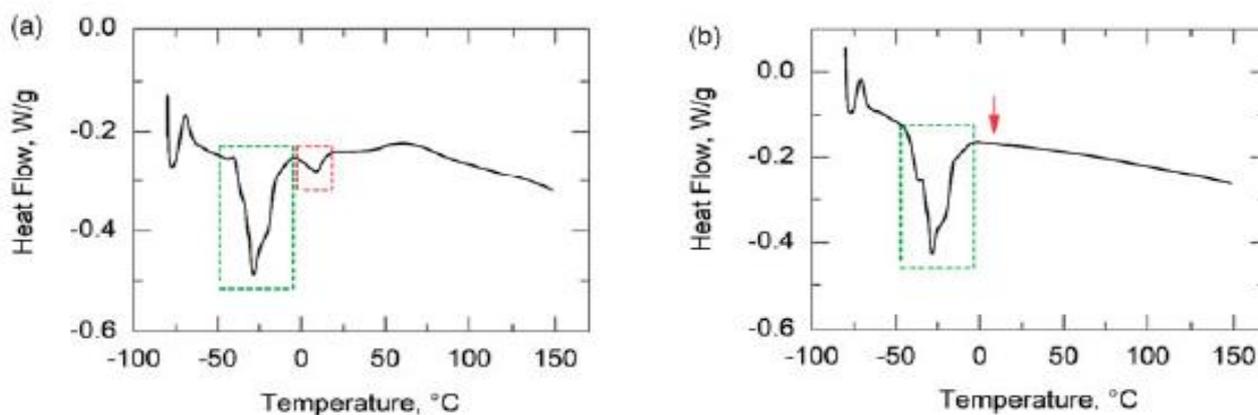


Figura 8.2.2: (a) Analisi DSC di un campione irraggiato per soli 10 min in cui è ancora presente il picco di fusione del PEGDA (riquadro rosso), indice di una polimerizzazione incompleta. (b) Analisi DSC di un campione irraggiato per 15 min in cui è presente il solo picco di fusione dell'olio di semi di girasole (riquadro verde).

8.3 Incapsulamento del principio attivo

Definita la formulazione ottimale e i parametri di processo, ci si è focalizzati sul loading della caffeina. Questo principio attivo risulta essere idrofilo e viene quindi dissolto nella fase dispersa, non essendo solubile nell'olio di semi di girasole, prima della formazione della miniemulsione e successiva polimerizzazione. Prima di procedere con l'incapsulazione, è stato effettuato uno studio sull'eventuale influenza del monomero e del fotoiniziatore sulla solubilità del principio attivo. Le prove sperimentali hanno dimostrato che i vari reagenti non hanno effetti negativi significativi e si è optato per una concentrazione di caffeina da inserire nel nanovettore di 25 mg/mL.

Dopo la formazione del nanogel si è effettuata un'analisi DLS tramite la quale si è verificato che il caricamento del principio attivo non ha apportato variazioni sulla dimensione delle nanoparticelle e sulla monodispersità del sistema. Come si osserva in Figura 8.3.1 la distribuzione delle dimensioni del nanogel caricato con la caffeina risulta essere di poco inferiore rispetto al sistema senza il principio attivo, dunque una differenza che si può ritenere trascurabile. Una calorimetria differenziale a scansione ha invece confermato l'avvenuta polimerizzazione del *network* polimerico anche in presenza della caffeina.

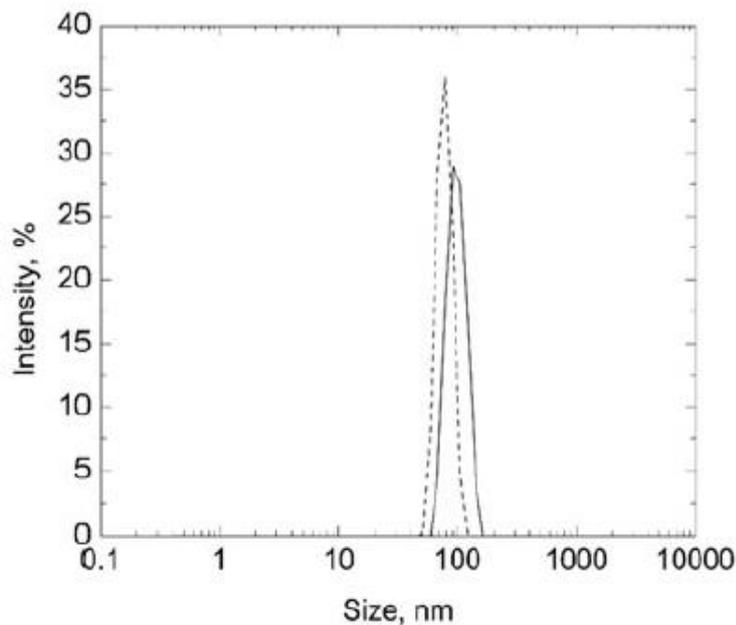


Figura 8.3.1: Confronto tra le distribuzioni dimensionali del nanogel contenente la caffeina (curva continua) e il nanogel non caricato (curva tratteggiata).

Un altro aspetto da verificare è l'efficienza di incapsulamento EE (*Encapsulation Efficiency*) ovvero la quantità di caffeina che effettivamente risulta essere intrappolata all'interno del *carrier*. Dal momento che il principio attivo ha carattere idrofilo ed è insolubile nella fase oleosa, esso sarà confinato solamente all'interno delle goccioline acquose presenti nella miniemulsione con la conseguenza che tutta la caffeina caricata sarà efficacemente incapsulata. Questa ipotesi è stata confermata da una spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) che ha mostrato la totale

assenza di caffeina nella fase continua e si è dunque ottenuta una EE del 100%. Come si osserva dallo spettro in Figura 8.3.2, i picchi caratteristici della caffeina C=N e C=O nel range di lunghezze d'onda tra 1700 e 1600 cm^{-1} non sono presenti nello spettro dell'olio di semi di girasole che risulta essere uguale a quello incontaminato.

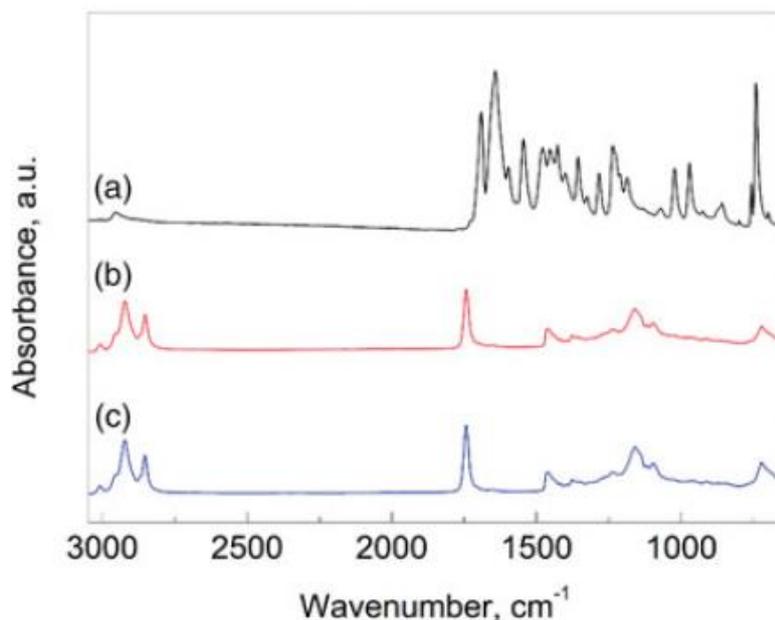


Figura 8.3.2: Spettri FT-IR della (a) caffeina, (b) olio di semi di girasole, (c) residuo solido.

Prima di valutare il rilascio della caffeina è necessario verificare che essa non venga degradata dalla radiazione UV durante l'irraggiamento. Infatti, la caffeina è un fotoprotettore che viene utilizzato contro il danneggiamento della pelle esposta alle radiazioni. È dunque necessario verificare che, dopo la fotopolimerizzazione, non si abbia una perdita del principio attivo per degradazione. Si è preparata una soluzione contenente la caffeina ed è stata sottoposta alle stesse condizioni operative di quella dello studio, si è osservato mediante una spettrofotometria UV/Vis una diminuzione nel picco di assorbimento a 273 nm, legata al gruppo cromoforo C=O, del 40%. Dopo aver aggiunto il fotoiniziatore invece, la riduzione dell'assorbimento della caffeina è risultata essere solamente dell'1%. Quest'analisi ha confermato l'efficienza del nanovettore nella protezione del principio attivo contenuto al suo interno da agenti esterni.

8.4 Studio del rilascio controllato di caffeina

Per verificare l'efficacia del sistema in ambiente fisiologico e valutare l'efficienza del rilascio controllato del farmaco, è stato effettuato un test di rilascio *in vitro* per mezzo di membrane in cellulosa per dialisi immerse per 10 minuti in una soluzione tampone di fosfato salino (PBS) che possiede un pH di 7,4 e dunque in grado di simulare quello del sangue.

All'interno del sacchetto da dialisi si inserisce tutta la formulazione in maniera tale da conoscere con esattezza la concentrazione iniziale della caffeina incapsulata e di conseguenza la sua massa iniziale. Ad intervalli regolari di un'ora per le prime 50 ore, vengono prelevati dei campioni da analizzare allo spettrofotometro UV/Vis che permette di definire la concentrazione del principio attivo contenuta mediante la legge di Lambert-Beer. Controlli sul rilascio della caffeina sono stati effettuati per nove giorni.

Valutando il rilascio della caffeina nel tempo si osserva che, dopo un'iniziale fase di lag di circa un'ora in cui non si ha nessun rilascio, il principio attivo inizia a disperdersi. Questo fenomeno, che viene evidenziato nella Figura 8.4.1, è dovuto all'iniziale diffusione del nanogel verso la membrana idrofila. Nella successiva fase si ha l'effettivo rilascio del principio attivo con una crescita della velocità di rilascio per un tempo totale di circa 50 ore, fino a raggiungere un plateau dove la concentrazione di caffeina rilasciata si mantiene costante nel tempo dopo circa 100 ore. Alla fine del tempo di osservazione di 202 ore, si ottiene una quantità totale di principio attivo rilasciato di circa 86%.

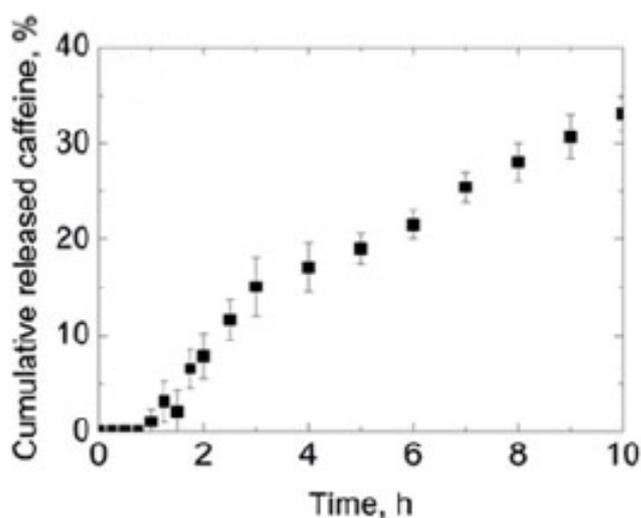


Figura 8.4.1: Andamento della concentrazione di caffeina rilasciata in funzione del tempo in cui si evidenzia un rilascio nullo nella prima ora.

Per definire il meccanismo coinvolto nel rilascio della caffeina, i dati raccolti sono stati confrontati con diversi modelli cinetici di diverso ordine, come mostrato in Figura 8.4.2.

<i>Kinetic release model</i>	<i>Model equation</i>	<i>R²</i>
Zero Order	$F = k_o t$	0.96
First Order	$\ln(1 - F) = -k_1 t$	0.78
Higuchi	$F = k_H t^{1/2}$	0.99
Hixson-Crowell	$1 - (1 - F)^{1/3} = k_{HC} t$	0.92
Baker-Lonsdale	$3/2[1 - (1 - F)^{2/3}] - F = k_{BL} t$	0.89

Figura 8.4.2: Meccanismi di rilascio di diverso ordine confrontati con i dati sperimentali. F è la frazione di caffeina rilasciata al tempo t ; k_o , k_1 , k_H , k_{HC} , k_{BL} sono costanti del modello matematico e R^2 è il coefficiente di determinazione.

Come si può osservare, il modello di Higuchi ha permesso di ottenere un fitting più adatto rispetto agli altri modelli con un coefficiente R^2 maggiore, ha permesso inoltre di definire la diffusione come principale meccanismo di rilascio coinvolto.

A prova della migliore efficienza di un rilascio mediante nanogel, è stato effettuato lo stesso test di rilascio su una miniemulsione, preparata alle stesse condizioni del nanovettore ad esclusione della presenza di monomero in maniera da non avere la formazione di idrogel. Vengono poste a confronto le curve di rilascio dei due sistemi in Figura 8.4.3 e si può osservare che nella miniemulsione si ha un rilascio del 20% di caffeina in maniera molto più rapida e che ha inizio a tempi inferiori rispetto all'ora di lag che si aveva nelle nanoparticelle. Anche il plateau viene raggiunto in tempi più brevi. La mancanza di un rilascio controllato nel tempo nella miniemulsione è dovuta al fatto che il principio attivo non risulta essere incapsulato in una struttura polimerica capace di rallentare il meccanismo oltre che di proteggere il contenuto per periodi di tempo molto maggiori. Ciò che avviene nella miniemulsione è un'iniziale formazione di uno strato sottile di acqua posto all'interfaccia con la membrana idrofilica con cui le goccioline possiedono un'affinità chimica. Dal momento che la struttura non risulta stabile a causa della mancata fotopolimerizzazione, una volta formato il film acquoso si ha un immediato rilascio di caffeina tramite un meccanismo di diffusione attraverso la membrana.

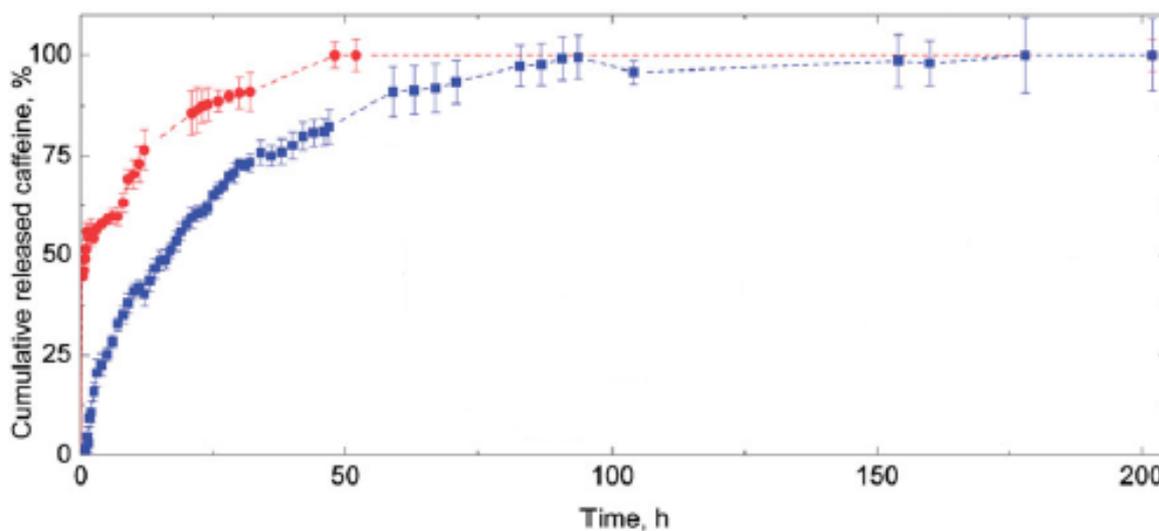


Figura 8.4.3: Confronto tra la curva di rilascio cumulativo di caffeina dal nanogel (curva blu) e la curva di rilascio dalla miniemulsione (curva rossa) in funzione del tempo.

Come è mostrato nella Figura 8.4.4, la quantità totale di caffeina rilasciata della miniemulsione è molto inferiore a quella del nanogel a dimostrazione del fatto che un sistema di incapsulazione del farmaco permette di avere un miglior controllo nel suo rilascio, più duraturo nel tempo e con quantità di farmaco effettivamente rilasciate molto più elevate.

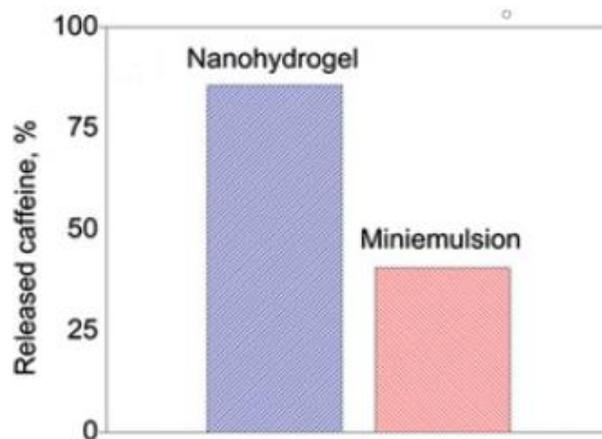


Figura 8.4.4: Confronto tra la quantità totale di caffeina rilasciata dal nanogel e dalla miniemulsione.

8.5 Conclusioni

Questo studio ha permesso di realizzare con successo delle nanoparticelle polimeriche caricate con della caffeina. Con l'obiettivo di formulare un sistema iniettabile si sono utilizzati materiali biocompatibili con l'organismo, le nanoparticelle polimeriche infatti sono realizzate con il PEGDA un derivato dal polietere che risulta non tossico e biocompatibile. Anche la fase continua, costituita da olio di semi di girasole, ha una buona compatibilità con l'organismo umano e favorisce inoltre il passaggio attraverso il primo strato della pelle e dunque la diffusione del farmaco idrofilo. La caffeina, invece, è stata selezionata per le sue numerose proprietà benefiche per l'organismo, nonostante la sua difficoltà di incapsulamento nei nanovettori a causa della sua idrofilia. Al fine di evitare la classica somministrazione enterale che consiste in un rilascio rapido e incontrollato del principio attivo, con conseguenti picchi di concentrazione del farmaco raggiunti in un solo minuto e completa metabolizzazione in circa 2-3 ore, oltre che la difficoltà di superare la clearance nello stomaco, si è voluto realizzare il nanovettore per una somministrazione di tipo transdermico. La difficoltà principale che si è riscontrata è la scarsa affinità della caffeina con lo strato corneo, ovvero lo strato più esterno della pelle, che è lipofilo e funge dunque da barriera. Al contrario, nello strato successivo detto germinativo le sostanze idrofile riescono a diffondere con più facilità.

La formulazione di una miniemulsione inversa con processi e valori ben definiti e ottimizzati ha permesso di realizzare un nanogel totalmente biocompatibile, con un'efficienza di incapsulamento del 100% e con la capacità di ottenere un rilascio controllato della caffeina. Si è inoltre dimostrato come l'incapsulamento migliori notevolmente l'emivita del farmaco proteggendolo dall'ambiente fisiologico, permetta di avere una somministrazione locale e con concentrazioni molto più elevate del principio attivo evitando così una somministrazione multi-dose e spreco di farmaco.

9. Bibliografia

- [1] Narayan, Roger, 2018, Nanobiomaterials - Nanostructured Materials for Biomedical Applications - 3. Self-Assembled Nanomaterials. Elsevier.
<https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00CXB2A1/nanobiomaterials-nanostructured/self-assembled-nanomaterials>, consultato il 22/09/2020.
- [2] William B. Liechty, David R. Kryscio, Brandon V. Slaughter, Nicholas A. Peppas, 2010, Polymers for Drug Delivery Systems, *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 149-173.
- [3] Dhritlahre, R.K., Saneja, A., 2020, Recent advances in HER2-targeted delivery for cancer therapy, *Drug Discovery Today*, [DOI: 10.1016/j.drudis.2020.12.014].
- [4] Chacko R.T., Ventura J., Zhuang J., Thayumanavan S., 2012, Polymer nanogels: A versatile nanoscopic drug delivery platform, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64** (9), 836-851.
[DOI: 10.1016/j.addr.2012.02.002]
- [5] Yih T.C. and Al-Fandi M., 2006, Engineered Nanoparticles as Precise Drug Delivery Systems, *Journal of Cellular Biochemistry*, **97** (6), 1184–1190. [DOI: 10.1002/jcb.20796]
- [6] Villani A., 2015, Micelle Polimeriche, <https://slideplayer.it/slide/976475/>, ultimo accesso 05/02/21.
- [7] Hussein Y.H.A. and Youssry M., 2018, Polymeric Micelles of Biodegradable Diblock Copolymers: Enhanced Encapsulation of Hydrophobic Drugs, *Materials*, **11** (5), 688.
[DOI: 10.3390/ma11050688]
- [8] Liposoma, <https://www.chimica-online.it/biologia/liposoma.htm>, ultimo accesso 05/02/21.
- [9] Di Stefano R., 2017, Dendrimeri, <https://www.slideshare.net/RiccardoDiStefano2/dendrimeri>, ultimo accesso 05/02/21.
- [10] Dadwai M., 2014, Polymeric Nanoparticles as Promising Novel Carriers for Drug Delivery: An Overview, *Journal of Advanced Pharmacy Education and Reserch*.
- [11] Peppas N.A., Hilt J. Z., Khademhosseini A., and Langer R., 2006, Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology, *Advanced Materials*, **18**, 1345–1360.
[DOI: 10.1002/adma.200501612]
- [12] Frau A., 2020, Cosa sono le reticolazioni nei polimeri, <https://it.quora.com/>, ultimo accesso 05/02/21.
- [13] Neamtu I., Rusu A. G., Diaconu A., Nita L. E.e Chiriac A. P., 2017, Basic concepts and recent advances in nanogels as carriers for medical applications, *Drug Delivery*, **24** (1), 539-557.
[DOI: 10.1080/10717544.2016.1276232]

- [14] Soni K. S., Desale S. S., Bronich T. K., 2016, Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation, *Journal of Controlled Release*, **240**, 109–126. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.11.009]
- [15] Kean T., Thanou M., 2010, Biodegradation, Biodistribution and Toxicity of Chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **62**, 3-11.
- [16] Shaha S., Rangaraja N., Laxmikeshavb K., Sampathi S., 2020, Nanogels as drug carriers – Introduction, chemical aspects, release mechanisms and potential applications, *International Journal of Pharmaceutics*, **581**, 119-268. [DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119268]
- [17] Munim, S. and Z. Raza, 2019, Poly (lactic acid) based hydrogels: formation, characteristics and biomedical applications. *Journal of Porous Materials*, **26** (3), 881-901.
- [18] Pal, Kunal Banerjee, Indranil, 2018, Polymeric Gels - Characterization, Properties and Biomedical Applications - 2.2 Types of Protein-Based Gels. Elsevier. <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011PPWX1/polymeric-gels-characterization/types-protein-based-gels>.
- [19] Kim K., Choi H., Choi E.S., Park M.H. and Ryu J.H., 2019, Hyaluronic Acid-Coated Nanomedicine for Targeted Cancer Therapy, *Pharmaceutics*, **11**, 301. [DOI: 10.3390/pharmaceutics11070301]
- [20] Wang J.J., Zeng Z.W., Xiao R.Z., Xie T., Zhou G.L., Zhan X.R., Wang S.L., 2011, Recent Advances of Chitosan Nanoparticles as Drug Carriers, *International Journal of Nanomedicine*, **6**, 765-774.
- [21] Aminabhavi T.M. and Dharupaneedi S.P., 2017, Production of chitosan-based hydrogels for biomedical applications, *Chitosan Based Biomaterials*, **1**, 295-319. [DOI: 10.1016/B978-0-08-100230-8.00012-1]
- [22] Liechty W.B, Krysciol D.R., Slaughter B.V. and Peppas N.A., 2010, Polymers for Drug Delivery Systems, *Annual Review Chemical Biomolecular Engineering*, **1**, 149–173. [DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847]
- [23] Chen W, Hou Y, Tu Z, Gao L, Haag R., 2017, pH-degradable PVA-based nanogels via photocrosslinking of thermo-preinduced nanoaggregates for controlled drug delivery, *Journal of Control Release*, **259**, 160-167. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.10.032]
- [24] Simonetti C., 2015, Profarmaci polimerici, <https://slideplayer.it/slide/977986/>, ultimo accesso 15/12/20.
- [25] Stanislawska I., Liwinska W., Lyp M., Stojek Z. and Zabost E., 2019, Recent Advances in Degradable Hybrids of Biomolecules and NGs for Targeted Delivery, *Molecules*, **24**, 1873. [DOI: 10.3390/molecules24101873]
- [26] Hernández-Adame L., Angulo C., García-Silva I, Palestino G. and Rosales-Mendoza S., 2019, An overview of nanogel-based vaccines, *Expert Review of Vaccines*, **18** (9), 1-18.[DOI: 10.1080/14760584.2019.1647783]

- [27] Zhang X., Malhotra S., Molina M., Haag R., 2015, Micro-and nanogels with labile crosslinks—from synthesis to biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, **44**, 1948–1973.
- [28] Khoee S., Asadi H., 2016, Nanogels: Chemical Approaches to Preparation, *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*. [DOI: 10.1081/E-EBPP-120050693]
- [29] Yin Y., Hu B., Yuan X., Cai L., Gao H. and Yang Q., 2020, Nanogel: A Versatile Nano-Delivery System for Biomedical Applications, *Pharmaceutics*, **12**, 290. [DOI: 10.3390/pharmaceutics12030290]
- [30] Soni K. S., Desale S. S. and Bronich T.K., 2016, Nanogels: an overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation, *Journal Control Release*, **240**, 109–126. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.11.009]
- [31] Ahmed S., Alhareth K., Mignet N., 2020, Advancement in nanogel formulations provides controlled drug release, *International Journal of Pharmaceutics*, **584**, 119435. [DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119435]
- [32] Li D., van Nostrum C. F., Mastrobattista E., Vermonden T., Hennink W. E., 2017, Nanogels for intracellular delivery of biotherapeutics, *Journal of Controlled Release*, **259**, 16-28. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.12.020]
- [33] Cheng R., Feng F., Meng F., Deng C., Feijen J., Zhong Z., 2011, Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery, *Journal of Controlled Release*, **152**, 2-12. [DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.01.030]
- [34] Preman N.K., Barki R.B., Vijayan A., Sanjeeva S.G., Johnson R.P., 2020, Recent developments in stimuli-responsive polymer nanogels for drug delivery and diagnostics: A review, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **157**, 121-153. [DOI: 10.1016/j.ejpb.2020.10.009]
- [35] Zhang Q., Ding F., Liu X., Shen J., Yue Su Y., Jiwen Qian J., Zhu X., Zhang C., 2020, Nanobody-guided targeted delivery of microRNA *via* nucleic acid nanogel to inhibit the tumor growth, *Journal of Controlled Release*, **328**, 425-434. [DOI: 0.1016/j.jconrel.2020.08.058]
- [36] Banjare N., Gautam L., Behera C., Gupta P.N., Vyas S., Vyas S.P., 2020, Cyclodextrin nanosponges based site-retentive controlled release system for treatment of rheumatic arthritis, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **60**, 101973. [DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101973]
- [37] Artusio F., Ferri A., Gigante V., Massella D., Mazzarino I., Sangermano M., Barresi A. & Pisano R., 2019, Synthesis of high payload nanohydrogels for the encapsulation of hydrophilic molecules via inverse miniemulsion polymerization: caffeine as a case study, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. [DOI: 10.1080/03639045.2019.1672714]
- [38] Luo L., Lane M. E., 2015, Topical and transdermal delivery of caffeine, *International Journal of Pharmaceutics*, **490**, 1, 155-164.

Ringraziamenti

Alla fine di questo percorso, credo sia doveroso ringraziare le persone che mi sono state accanto in tutti questi anni.

In primo luogo, vorrei ringraziare il Professore Marco Sangermano per la sua grande disponibilità e cura, non solo nei miei confronti durante il lavoro di tesi ma riguardo tutti i suoi studenti. La sua umanità, simpatia e contagiosa voglia di conoscenza hanno reso le lezioni e lo studio molto piacevoli.

Dedico questo successo personale ai miei genitori che mi hanno dato i mezzi e l'appoggio per intraprendere e concludere questo percorso. Mi sono stati accanto e mi hanno dato il loro supporto nei primi sbandamenti, hanno sempre creduto in me in maniera incondizionata e mi hanno anche sopportato durante le infinite ore di studio e i continui sbalzi d'umore.

Un grazie anche a mia sorella Carola che da sempre è una guida saggia e una consigliera sincera per le scelte più difficili. Grazie anche a Daniele che considero il mio fratello maggiore.

Le due persone su cui ho la certezza di poter contare per tutta la mia vita, in maniera incondizionata.

Ringrazio poi i miei amici, quegli "scoppiati" che sono diventati la mia seconda famiglia e con cui ho condiviso momenti indimenticabili. Amici che sono stati sempre presenti nei momenti più belli, nei trionfi, ma soprattutto nei momenti di difficoltà, quando era troppo difficile rimettersi in piedi da sola. Loro sono quel tipo di amici che auguro a tutti di avere nella propria vita, perché a me la rendono sempre migliore. Ma un grazie speciale va a Ylenia, un'amica vera che da anni è un punto fermo della mia vita.

Un grazie ai miei primi compagni di corso, Daniele e Valeria, che poi però sono diventati degli amici veri con cui condividere le gioie e gli infiniti dolori dell'università. Hanno reso tutti questi anni più leggeri, meno faticosi e le aule un luogo (quasi) piacevole.

Ancora grazie a Valeria perché con la sua energia e voglia di vivere contagiosa è stata un'amica inattesa ma una delle più importanti su cui poter sempre contare.

Un grazie speciale va alla mia nipotina Sofia che, da un anno e mezzo ha reso la mia vita più bella e piena di gioia, regalandomi le pause studio più belle di sempre. Le sue risate, i giochi, i balli ma anche le urla e i pianti disperati quando la porta della zia era chiusa, hanno colorato e scandito quelle giornate altrimenti grigie e monotone.

E infine un grande grazie a Federico, che fin dall'inizio di questo percorso mi è sempre stato accanto, mi ha spronato a dare sempre il meglio, mi ha insegnato a sognare in grande e a far di tutto per realizzare i propri obiettivi. Ma soprattutto mi ha aiutata a credere in me stessa. È la persona che più di tutti sa cosa c'è dietro a questo traguardo, che è riuscito a essere presente anche a chilometri di distanza e con cui condivido i sogni e i progetti del futuro.

Ma forse il grazie più grande va a me stessa. A me perché sono arrivata alla fine di questo percorso che anni fa sembrava impossibile concludere. A me che ci ho creduto anche quando andava tutto storto. A me, perché ho imparato quanto valgo e sono riuscita a dimostrarlo a tutti ma soprattutto a me stessa.