

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
FARMACIA**

**COMPLESSI POLIELETTROLITICI OTTENUTI TRAMITE
MICROFLUIDICA E LORO APPLICAZIONI**

Relatore: Prof.ssa *Vigani Barbara*

Correlatore: Dott.ssa *Valentino Caterina*

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di
Merlino Giuditta

Anno Accademico 2025/2026

1	INTRODUZIONE	6
2	COMPLESSI POLIELETTROLITICI: PRINCIPI, FORMAZIONE E LIMITI	9
2.1	Complessi polielettrolitici: definizione, classificazione e principi fondamentali	9
2.1.1	Classificazione	10
2.1.2	Modelli strutturali dei PEC	11
2.1.3	Processo di formazione dei PEC	11
2.1.4	Metodo di preparazione dei PEC	12
2.2	Parametri che influenzano la formazione dei complessi polielettrolitici	13
2.2.1	Rapporto di carica	13
2.2.2	Peso molecolare e struttura dei polimeri	14
2.2.3	pH	14
2.2.4	Forza ionica	15
2.2.5	Concentrazione e condizioni di preparazione	15
2.3	Processo di formazione e cinetica dei complessi polielettrolitici	16
2.3.1	Nucleazione dei complessi	16
2.3.2	Crescita, aggregazione e polidispersione	16
2.3.3	Ruolo del mixing nel controllo del processo	17
2.4	Limiti dei metodi convenzionali di preparazione dei complessi	18
2.4.1	Limitazioni nel controllo del mixing	18
2.4.2	Polidispersione e scarsa riproducibilità	19
2.4.3	Scalabilità e controllo di processo	19
2.4.4	Implicazioni per le applicazioni farmaceutiche	19
2.4.5	Limitazioni nei sistemi alginato–chitosano	20
2.5	Necessità di tecnologie avanzate per il controllo della formazione dei complessi polielettrolitici	20
3	MICROFLUIDICA PER LA PRODUZIONE DI COMPLESSI POLIELETTROLITICI	22
3.1	Introduzione alla microfluidica	22

3.2	Principi fisici della microfluidica	24
3.3	Dispositivi microfluidici per la formazione dei complessi polielettrolitici	28
3.3.1	Dispositivi a T-junction	28
3.3.2	Hydrodynamic Flow Focusing (HFF)	30
3.3.3	Staggered Herringbone Micromixers (SHM)	31
3.3.4	Droplet microfluidics	32
3.4	Ruolo del controllo del mixing nella formazione dei complessi polielettrolitici	35
3.5	Applicazioni della microfluidica nei sistemi polielettrolitici	36
3.5.1	Sistemi a base di polielettroliti naturali	37
3.5.2	Complessi polielettrolitici con acidi nucleici	39
3.5.3	Applicazioni nel drug delivery	40
3.6	Vantaggi e limitazioni della microfluidica per la produzione di PEC	41
3.6.1	Vantaggi della microfluidica	41
3.6.2	Limitazioni della microfluidica	43
4	APPLICAZIONI FARMACEUTICHE E BIOMEDICHE DEI COMPLESSI POLIELETTROLITICI	46
4.1	PEC come sistemi di veicolazione di principi attivi	46
4.2	PEC per la veicolazione degli acidi nucleici	49
4.3	Applicazioni in oncologia	55
4.4	Applicazioni mucosali e gastrointestinali	57
4.5	Medicina rigenerativa e tissue engineering	60
4.6	Altre applicazioni biomediche	63
4.7	Considerazioni finali	65
5	INFLUENZA DEI PARAMETRI DI FORMULAZIONE E DI PROCESSO SULLA FORMAZIONE MICROFLUIDICA DEI PEC: ANALISI DI CASO STUDIO	67
5.1	Caso studio del sistema alginato/chitosano per la veicolazione di gefitinib	67
5.1.1	Influenza del rapporto tra i polimeri	68

5.1.2	Concentrazione dei componenti e condizioni operative	69
5.1.3	Configurazione del chip e ordine di contatto	70
5.1.4	Caratteristiche del prodotto e limiti dello studio	71
6	CONCLUSIONI	74
	BIBLIOGRAFIA	78

1 Introduzione

Negli ultimi anni, lo sviluppo di sistemi innovativi per la veicolazione e il rilascio controllato di sostanze biologicamente attive ha assunto un ruolo sempre più importante nell'ambito farmaceutico e biomedico. La possibilità di veicolare un principio attivo in modo controllato e di indirizzarlo, quando possibile, verso specifici tessuti o cellule rappresenta infatti un aspetto fondamentale per migliorare l'efficacia di una terapia e, allo stesso tempo, ridurre gli effetti indesiderati. In questo contesto, lo sviluppo di sistemi di drug delivery basati su materiali polimerici e nanoparticellari ha permesso di ottenere piattaforme in grado di proteggere il principio attivo, modificarne il rilascio e influenzarne la distribuzione nell'organismo. Tra i materiali studiati per queste applicazioni, i polielettroliti hanno suscitato particolare interesse grazie alla presenza di gruppi ionizzabili lungo la catena polimerica, che permettono loro di interagire con specie di carica opposta e di formare strutture organizzate.

Una delle possibilità offerte dai polielettroliti è rappresentata dalla formazione dei complessi polielettrolitici (PEC), ottenuti principalmente attraverso l'interazione tra polimeri di carica opposta. La formazione di questi sistemi è generalmente determinata dalle interazioni elettrostatiche tra le catene polimeriche, alle quali possono contribuire anche legami a idrogeno, interazioni idrofobiche e altre forze intermolecolari. La combinazione di differenti polielettroliti permette di ottenere sistemi con caratteristiche strutturali e proprietà diverse, rendendo i PEC interessanti per numerose applicazioni in ambito farmaceutico e biomedico. In particolare, l'utilizzo di polielettroliti naturali come chitosano, alginato e acido ialuronico permette di sviluppare sistemi caratterizzati da proprietà di interesse quali biocompatibilità e biodegradabilità.

Le proprietà dei PEC possono essere sfruttate per la veicolazione di diverse tipologie di molecole, tra cui principi attivi, proteine, peptidi e acidi nucleici. La formazione del complesso può infatti permettere di associare la molecola di interesse alla matrice polimerica, proteggendola dalla degradazione e contribuendo a modificarne il rilascio. Particolare attenzione è stata rivolta alla formazione di complessi tra polimeri cationici e acidi nucleici, denominati polyplexes, che permettono di condensare e proteggere DNA e RNA e di favorirne il trasporto all'interno delle cellule. Questi sistemi risultano quindi particolarmente interessanti per applicazioni di gene delivery e, più in generale, per lo sviluppo di strategie terapeutiche basate sugli acidi nucleici. Nonostante il loro potenziale, rimangono però alcune problematiche legate alla stabilità dei complessi, alla sicurezza dei polimeri utilizzati e alla capacità di superare le diverse barriere presenti all'interno della cellula.

La formazione dei PEC è inoltre un processo fortemente influenzato dalle condizioni chimico-fisiche del sistema. Parametri quali il rapporto di carica tra i polimeri, il peso molecolare e la struttura delle catene, il pH, la forza ionica, la concentrazione dei polielettroliti e le condizioni di miscelazione possono modificare in maniera significativa la formazione e le caratteristiche finali dei complessi. Questi fattori influenzano infatti i processi di nucleazione, crescita e aggregazione delle particelle e, di conseguenza, la loro dimensione, distribuzione dimensionale e stabilità. In particolare, la velocità e l'uniformità del mixing assumono un ruolo importante, poiché la complessazione tra specie di carica opposta può avvenire in tempi molto rapidi.

I metodi convenzionali di preparazione dei PEC si basano principalmente sulla miscelazione macroscopica delle soluzioni contenenti i polielettroliti, attraverso agitazione meccanica o aggiunta sequenziale dei reagenti. Sebbene queste metodologie siano semplici e facilmente applicabili, presentano alcune limitazioni nel controllo delle condizioni di formazione dei complessi; la miscelazione a livello macroscopico può infatti determinare gradienti locali di concentrazione e differenze nelle condizioni di contatto tra i reagenti, favorendo una nucleazione non uniforme e fenomeni di aggregazione secondaria. Di conseguenza, possono essere ottenute particelle caratterizzate da dimensioni variabili, elevata polidispersione e scarsa riproducibilità tra diversi esperimenti. Queste problematiche risultano particolarmente importanti quando i PEC sono destinati ad applicazioni farmaceutiche, per le quali le caratteristiche dimensionali e strutturali delle particelle possono influenzarne la stabilità, il rilascio e il comportamento biologico.

Un ulteriore problema riguarda la possibilità di trasferire i processi convenzionali da una scala di laboratorio a una scala produttiva. L'aumento dei volumi può infatti accentuare le eterogeneità di mixing e rendere più difficile il mantenimento delle stesse condizioni operative, con conseguenze sulla qualità e sulla riproducibilità dei sistemi ottenuti. Nei sistemi alginato-chitosano, ad esempio, il controllo delle condizioni di preparazione risulta particolarmente importante, poiché variazioni del pH, del rapporto tra i polimeri e delle altre condizioni operative possono modificare significativamente la formazione e la stabilità delle nanoparticelle.

Queste criticità hanno portato alla ricerca di strategie in grado di controllare in maniera più precisa il contatto tra i reagenti e la cinetica di formazione dei complessi. In questo contesto, la microfluidica rappresenta una tecnologia particolarmente interessante, grazie alla possibilità di manipolare piccoli volumi di fluido all'interno di canali di dimensioni micrometriche e di controllare con precisione fenomeni quali trasporto di massa, diffusione e miscelazione. A queste scale, il flusso è generalmente laminare e il mescolamento tra correnti avviene principalmente attraverso la diffusione. La geometria

del dispositivo e le condizioni di flusso possono quindi essere utilizzate per modificare la distanza diffusiva, il tempo di contatto tra le diverse specie e le condizioni nelle quali avvengono nucleazione e crescita delle particelle.

L'applicazione della microfluidica alla produzione di nanoparticelle ha permesso di sviluppare diverse configurazioni, tra cui T-junction, hydrodynamic flow focusing, Staggered Herringbone Micromixers e sistemi di droplet microfluidics. Questi dispositivi differiscono per geometria e modalità di miscelazione, ma hanno in comune la possibilità di controllare in maniera più precisa le condizioni di contatto tra i reagenti. La microfluidica è stata successivamente applicata anche alla formazione di complessi polielettrolitici, dimostrando la possibilità di utilizzare il controllo dei flussi per influenzare la formazione delle particelle e ottenere sistemi caratterizzati da una distribuzione dimensionale più ristretta e da una maggiore riproducibilità.

L'interesse verso questo approccio è legato anche alla varietà di applicazioni dei sistemi polielettrolitici. La microfluidica è stata infatti utilizzata per la preparazione di sistemi a base di polielettroliti naturali, tra cui alginato e chitosano, ma anche per la produzione di sistemi destinati alla veicolazione di farmaci, proteine e acidi nucleici. In particolare, il controllo della velocità di miscelazione e delle condizioni di autoassemblaggio può risultare importante nella preparazione di polyplexes, nei quali la cinetica di interazione tra il polimero cationico e l'acido nucleico influenza le caratteristiche finali del complesso.

Nonostante i numerosi vantaggi, la microfluidica presenta ancora alcune limitazioni, tra cui la maggiore complessità dei dispositivi, i costi di fabbricazione e gestione, la produttività e il rischio di occlusione dei microcanali. Anche lo scale-up rappresenta un aspetto ancora oggetto di studio, poiché l'aumento della portata non garantisce necessariamente il mantenimento delle stesse condizioni di mixing. La microfluidica deve quindi essere considerata non semplicemente come una sostituzione dei metodi convenzionali, ma come una tecnologia che permette di ottenere un controllo più preciso dei processi di formazione delle particelle, soprattutto quando la cinetica di miscelazione e di autoassemblaggio rappresenta un fattore determinante.

Alla luce di queste considerazioni, il presente lavoro si propone di analizzare i principali aspetti legati alla formazione dei complessi polielettrolitici e al loro impiego in ambito farmaceutico e biomedico, con particolare attenzione al ruolo della microfluidica nel controllo del processo di formazione

2 Complessi polielettrolitici: principi, formazione e limiti

Questo capitolo è dedicato all'analisi dei complessi polielettrolitici (PEC), con particolare attenzione ai meccanismi di formazione, ai parametri che ne influenzano le proprietà e alle principali criticità associate ai metodi convenzionali di preparazione.

Inizialmente verranno introdotti i principi fondamentali che regolano la formazione dei PEC; successivamente, saranno analizzati i principali parametri chimico-fisici che influenzano la formazione dei complessi, tra cui il rapporto di carica tra i polimeri, il peso molecolare, il pH e la forza ionica del mezzo.

Infine, analizzeremo i limiti dei metodi convenzionali di preparazione dei PEC, mettendo in evidenza le difficoltà legate al controllo del processo, alla riproducibilità e alla scalabilità, e ciò porterà a discutere la necessità di sviluppare tecnologie avanzate in grado di garantire un controllo più preciso delle condizioni di formazione.

2.1 Complessi polielettrolitici: definizione, classificazione e principi fondamentali

I complessi polielettrolitici (PEC) sono sistemi che originano da interazioni di natura elettrostatica tra polimeri con carica opposta, come policationi (ad esempio il chitosano) e polianioni (come l'alginato); quando soluzioni acquose contenenti questi polielettroliti vengono poste a contatto, l'associazione tra polielettroliti di carica opposta può determinare la formazione di una fase densa separata dal solvente circostante oppure, in funzione delle condizioni del sistema, la formazione di strutture colloidali disperse come nanoparticelle o coacervati (Meka et al., 2017). Tra le interazioni che si instaurano durante la formazione dei complessi tra i polielettroliti troviamo le interazioni di Coulomb, i legami idrogeno, le interazioni idrofobiche, le interazioni di van der Waals e le interazioni dipolari (Robertis et al. 2015); tutte queste interazioni possono influenzare la stabilità e la struttura dei complessi (Li et al., 2018).

I PEC possono essere formati con un numero diverso di strutture e proprietà, il che conferisce loro grande versatilità e garantisce un'ampia gamma di applicazioni in numerosi ambiti scientifici e tecnologici, tra cui la medicina, la farmacia, le biotecnologie, l'ingegneria tissutale, i biomateriali, la biomedicina e anche il settore cosmetico, oltre ad altri campi applicativi (Koetz e Kosmella 2007).

2.1.1 Classificazione

In base ai tipi di polielettroliti reagenti, i PEC vengono classificati in:

- **PEC formati dall'interazione di polielettroliti naturali:** Molti complessi polielettrolitici vengono preparati utilizzando biopolimeri naturali, grazie alla loro biocompatibilità e biodegradabilità. Tra i sistemi più studiati rientrano quelli a base di chitosano associato a polianioni naturali come alginato, pectina, carragenina o carbossimetilcellulosa. Questi sistemi trovano ampio impiego nel drug delivery, nell'ingegneria tissutale e nella formulazione di biomateriali (George & Abraham, 2006).
- **PEC formati mediante interazione tra polielettroliti sintetici:** I PEC possono essere ottenuti anche utilizzando polimeri sintetici, come ad esempio acido acrilico o stirene solfonato. Rispetto ai sistemi naturali, i polielettroliti sintetici consentono un controllo più preciso delle proprietà chimico-fisiche, come densità di carica, peso molecolare e conformazione delle catene (Koetz & Kosmella, 2007).
- **PEC formati dalla combinazione di polielettroliti naturali e sintetici:** In alcuni casi vengono combinati polimeri naturali e sintetici per integrare la biocompatibilità dei primi con le proprietà meccaniche e strutturali dei secondi. Ad esempio, complessi tra proteine e polimeri sintetici possono dare origine a fenomeni di separazione di fase sotto forma di coacervati o precipitati solidi (Delair, 2011).
- **Complessazione proteina-polielettrolita:** Le interazioni tra proteine e polielettroliti possono portare alla formazione di precipitati amorfi, gel, fibre, coacervati o complessi solubili. La formazione di questi sistemi dipende da numerosi fattori, tra cui il numero di siti carichi presenti sulla superficie proteica, il pH del mezzo, la forza ionica e il rapporto stechiometrico tra i componenti (Perry et al., 2015). Complessi di questo tipo sono particolarmente studiati per applicazioni nel rilascio controllato di proteine e biomacromolecole.
- **Complessazione tra polioni e tensioattivi ionici:** I complessi formati dall'interazione tra polielettroliti e tensioattivi ionici rappresentano una classe di sistemi di grande interesse grazie alla loro somiglianza con alcuni aggregati biologici e membrane biomimetiche. La formazione di questi complessi dipende dalla natura del tensioattivo, dalla concentrazione critica micellare e dalle interazioni elettrostatiche con il polielettrolita (Ghimire & Bhattarai, 2020).

2.1.2 Modelli strutturali dei PEC

Le interazioni tra policationi e polianioni in soluzione possono dare origine a tre diversi tipi di strutture:

- PEC idrosolubili
- PEC colloidalmente stabili
- Bifasici (Koetz e Kosmella 2007).

Riguardo i primi, quindi i PEC idrosolubili, possono essere ottenuti quando polielettroliti caratterizzati da gruppi ionici deboli e da marcate differenze di peso molecolare vengono miscelati in rapporti non stechiometrici. In queste condizioni si formano strutture costituite da lunghe catene macromolecolari che fungono da “ospiti”, legate in modo sequenziale a poliioni più corti di carica opposta. La stabilità di questi PEC idrosolubili dipende da fattori quali la concentrazione dei sali disciolti e il rapporto di carica tra i due polielettroliti. (Koetz e Kosmella 2007).

I complessi derivanti da polielettroliti con masse molari molto differenti, miscelati in rapporti non stechiometrici, possono generare PEC idrosolubili. Tuttavia, in condizioni di bassa o moderata forza ionica, in soluzioni molto diluite e sempre in regime non stechiometrico, il processo di aggregazione può portare alla formazione di PEC colloidalmente stabili (Delair 2011). In questi sistemi, le particelle rimangono disperse nel mezzo senza andare incontro a precipitazione grazie alla presenza di cariche superficiali residue, che generano repulsioni elettrostatiche tra i complessi e ne limitano l'aggregazione. La stabilità colloidale dipende da parametri quali pH, forza ionica e rapporto di carica tra i polielettroliti, che influenzano direttamente le interazioni tra le particelle e la loro tendenza ad aggregare (Perry et al., 2015; Fu & Schlenoff, 2016)

Quando, invece, si miscelano soluzioni molto concentrate di polielettroliti ad alto e simile peso molecolare, in condizioni prossime al rapporto stechiometrico, si formano sistemi bifasici composti da una fase liquida e da una fase arricchita in PEC; in alcuni casi, la fase concentrata può assumere caratteristiche tipiche dei coacervati complessi (Gucht et al. 2011).

2.1.3 Processo di formazione dei PEC

Il processo di formazione dei PEC può essere suddiviso in tre fasi:

1. Complesso primario: il complesso primario può avere luogo immediatamente dopo la miscelazione delle due soluzioni di polielettroliti (PE) con carica opposta, grazie alle forze di legame; si tratta, pertanto, di un processo rapido.

2. Intracomplexi: si tratta di una formazione di complessi intermedi che richiede solitamente 1–2 ore dal momento della miscelazione. Durante questo processo, possono formarsi nuovi legami elettrostatici e/o possono verificarsi alterazioni nelle catene polimeriche.
3. Intercomplessi/aggregazione: Questo processo comporta l'aggregazione dei composti intermedi, principalmente attraverso interazioni idrofobiche, portando alla formazione di aggregati di dimensioni maggiori o di strutture insolubili che possono precipitare dal mezzo di dispersione, a seconda delle condizioni del sistema. Tale aggregazione è influenzata da molti fattori come la struttura dei componenti polimerici e le condizioni di complessazione. (Venkata S. Meka et al., 2017)

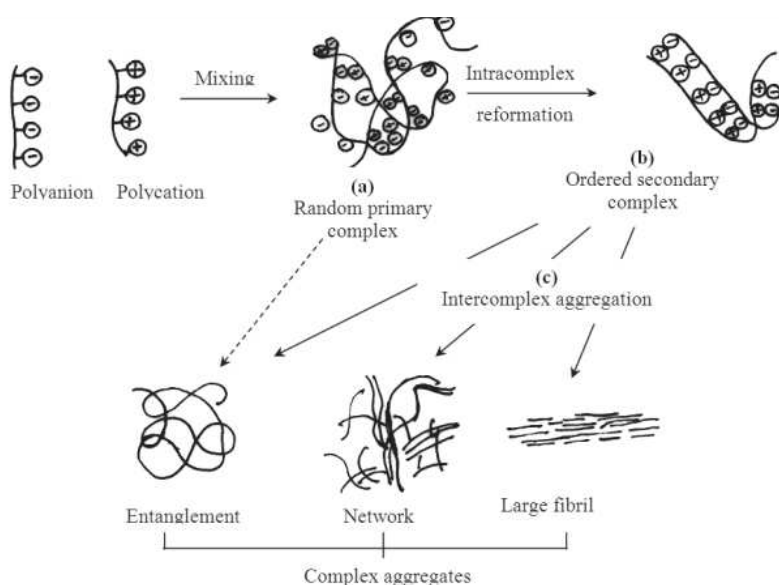


Figura 1: Rappresentazione schematica delle fasi di formazione e aggregazione dei complessi polielettrolitici. (Lankalapalli e Kolapalli 2009).

2.1.4 Metodo di preparazione dei PEC

Il metodo più utilizzato per la formazione di complessi è stato descritto da Gardlund et al. e consiste nella semplice tecnica di titolazione con PE (Gärdlund et al., 2007). Una soluzione di PE come titolante viene aggiunta ad un'altra soluzione di PE con carica opposta sotto agitazione. Durante questo processo di titolazione, il titolante diluisce la soluzione opposta nelle fasi iniziali e l'ulteriore titolazione porta alla formazione del complesso. La formazione di un PEC può essere modificata dalla velocità di aggiunta del titolante e la dimensione del complesso viene modificata dalla concentrazione dei PE. Koetz e Kosmella hanno descritto un semplice processo di formazione di complessi basato sulla quantità di titolante consumata: a basso consumo di titolante, il complesso si formava sotto

forma di piccole particelle o aggregati, mentre in caso di elevato consumo di titolante il complesso assumeva la forma di particelle o aggregati più grandi, che tendono a flocculare.

Oltre alla tecnica di titolazione sopra citata, la preparazione dei PEC può avvenire anche mediante altri metodi convenzionali, come la miscelazione diretta batch, la gelazione ionica e la complessazione indotta da variazioni di pH o forza ionica. Nei sistemi batch, i polielettroliti vengono semplicemente miscelati sotto agitazione meccanica, mentre nella gelazione ionica la formazione del complesso è favorita dalla presenza di specie ioniche multivalenti. Sebbene questi metodi siano semplici e ampiamente utilizzati, essi presentano spesso limitazioni nel controllo della nucleazione, della crescita delle particelle e della riproducibilità dei sistemi ottenuti (Gan et al., 2005; Karnik et al., 2008).

2.2 Parametri che influenzano la formazione dei complessi polielettrolitici

La formazione dei complessi polielettrolitici è fortemente influenzata da diversi parametri chimico-fisici, che incidono sia sull'organizzazione strutturale sia sulle proprietà finali dei sistemi ottenuti (Perry et al., 2015). Tali fattori, di seguito riportati, regolano il bilanciamento tra le forze attrattive e repulsive tra le catene polimeriche, determinando così la stabilità, le dimensioni e la morfologia dei complessi (Fu & Schlenoff, 2016).

2.2.1 Rapporto di carica

È importante analizzare il rapporto tra le cariche dei policationi e dei polianioni impiegati nella preparazione dei PEC; tale parametro, generalmente indicato con la lettera z , descrive il bilanciamento delle cariche nel sistema (Yubaraj Ghimire et al., 2020). Questo rapporto, noto come rapporto di carica e spesso espresso con Z , consente di definire la stechiometria carica-carica dei complessi formati (Pergushov et al. 2012). Quando le cariche di segno opposto sono presenti in proporzioni simili, le repulsioni elettrostatiche tra le catene diminuiscono, favorendo così i processi di aggregazione e la formazione di strutture più compatte (Perry et al., 2015). Tuttavia, condizioni vicine alla neutralità elettrica possono anche innescare fenomeni di aggregazione secondaria, con conseguente formazione di particelle di dimensioni maggiori e un aumento della polidispersione (Fu & Schlenoff, 2016).

Studi sperimentali hanno mostrato, ad esempio, che nei sistemi chitosano-alginato, un suo eccesso favorisce la formazione di particelle più compatte, grazie alla maggiore densità di cariche positive disponibili per le interazioni elettrostatiche (Almalik et al., 2013).

2.2.2 Peso molecolare e struttura dei polimeri

Il peso molecolare dei polimeri gioca un ruolo fondamentale nella formazione dei PEC, poiché influenza la lunghezza delle catene e il numero di siti disponibili per le interazioni (Li et al., 2018). In particolare, polimeri caratterizzati da elevato peso molecolare tendono a generare complessi di dimensioni maggiori e con una maggiore stabilità strutturale, proprio grazie all'incremento delle interazioni intermolecolari (Zhang et al., 2016).

Nei sistemi alginato–chitosano è stato osservato che un aumento del peso molecolare del chitosano determina un incremento delle dimensioni delle nanoparticelle; questo comportamento viene attribuito sia a una maggiore estensione conformazionale delle catene polimeriche sia all'aumento della viscosità del sistema (Katas et al., 2013).

Anche la rigidità e la conformazione delle catene polimeriche influenzano la struttura dei PEC, determinando la loro capacità di organizzarsi in strutture compatte o più diffuse (Li et al., 2018).

2.2.3 pH

La formazione dei PEC e la loro stabilità sono fortemente influenzate dal pH della soluzione dei polielettroliti impiegati; inoltre, variazioni nella concentrazione dei polielettroliti e nel pH della soluzione possono indurre cambiamenti di fase nei complessi (Taha et al., 2025).

Generalmente, a valori di pH molto bassi e in condizioni di elevata concentrazione, i polianioni non sono in grado di dissociarsi e, di conseguenza, non sono in grado di formare complessi, a causa dell'assenza di gruppi carbossilati in forma ionizzata (Meka et al., 2017). A valori di pH moderatamente acidi o prossimi alla neutralità (circa pH 5–7), i polianioni possono formare complessi stabili con policationi di carica opposta; in queste condizioni, il complesso tende a formarsi sotto forma di precipitato (Srinivas & Murthy, 2010). Con un ulteriore incremento del pH ($\text{pH} > 7,0$), e in seguito a diluizione, si può formare un coacervato di complesso elettrolitico in condizioni prossime all'equimolarità a causa della completa dissociazione dei polianioni.

Un incremento della forza ionica determina una riduzione della solubilità del sistema e, di conseguenza, la resa del complesso aumenta al diminuire della solubilità e il prodotto finale si presenta sotto forma di un precipitato più compatto (Meka et al., 2017).

Nel caso del chitosano, i gruppi amminici risultano protonati a pH acido, conferendo al polimero una carica positiva che favorisce l'interazione con polielettroliti anionici come l'alginato (Almalik et al., 2013). Tuttavia, la formazione dei complessi alginato–chitosano richiede un compromesso tra le condizioni di ionizzazione dei due polimeri: mentre il chitosano necessita di valori di pH

relativamente acidi per mantenere protonati i gruppi amminici, l'alginato deve essere sufficientemente dissociato per garantire la presenza delle cariche negative. Per questo motivo, la formazione dei PEC viene generalmente effettuata in un intervallo di pH intermedio, tipicamente in un range compreso tra 4,5 e 6, in cui entrambe le specie risultano almeno parzialmente ionizzate (George & Abraham, 2006; Katas et al., 2013). Solitamente, i due polimeri vengono inizialmente solubilizzati alle condizioni di pH più favorevoli alla loro dissociazione e successivamente miscelati per promuovere la complessazione.

2.2.4 Forza ionica

La forza ionica dei polielettroliti influisce in modo significativo sulle dimensioni finali dei PEC. In particolare, un aumento della forza ionica comporta una riduzione del diametro medio, fenomeno che potrebbe essere associato a una maggiore flessibilità delle catene polimeriche (Delair, 2011).

Inoltre, l'aumento della forza ionica, riduce l'intensità delle interazioni elettrostatiche tra i polimeri, limitando la formazione e la stabilità dei complessi (Fu & Schlenoff, 2016).

Studi sperimentali su sistemi alginato-chitosano hanno evidenziato che un incremento della concentrazione salina può determinare una riduzione delle dimensioni delle particelle oppure, in funzione delle condizioni operative, condurre alla loro destabilizzazione (Gan et al., 2005).

Questi effetti sono attribuibili alla competizione tra gli ioni presenti in soluzione e i gruppi carichi dei polimeri (Liu et al., 2017).

2.2.5 Concentrazione e condizioni di preparazione

La concentrazione dei polimeri rappresenta un parametro chiave che influenza la probabilità di collisione tra le catene e, di conseguenza, la formazione dei PEC (Zhao et al., 2020).

Un aumento della concentrazione di polielettrolita tende a favorire una riduzione delle repulsioni elettrostatiche tra particelle primarie dotate della stessa carica, favorendo così un incremento delle interazioni attrattive di natura dispersiva. Questo effetto contribuisce alla formazione di particelle secondarie di dimensioni più elevate, per un effetto di aggregazione. Tuttavia, tale effetto dipende dal rapporto di carica, dal pH, dalla forza ionica, dal peso molecolare e dall'ordine di miscelazione dei polielettroliti. Inoltre, il superamento di specifiche soglie di concentrazione può portare anche a fenomeni di precipitazione (Muller et al., 2011).

Per quanto riguarda invece le condizioni di preparazione, è stato osservato che, in sistemi alginato-chitosano, variazioni nella velocità di agitazione e nell'ordine di aggiunta dei reagenti possono portare a differenze significative nelle proprietà dei PEC (Katas et al., 2013).

2.3 Processo di formazione e cinetica dei complessi polielettrolitici

Come detto in precedenza, la formazione dei complessi polielettrolitici è un processo dinamico che avviene a seguito del contatto tra polimeri di carica opposta in soluzione acquosa, portando alla rapida associazione delle catene e alla formazione di strutture organizzate.

2.3.1 Nucleazione dei complessi

La fase iniziale della formazione dei PEC è rappresentata dalla nucleazione, durante la quale segmenti di polimeri con cariche opposte si associano formando nuclei primari stabilizzati da interazioni elettrostatiche (Perry et al., 2015). Un contributo determinante per la stabilità di questi nuclei è dato dal rilascio dei controioni associati alle catene polimeriche, che comporta un aumento dell'entropia del sistema e favorisce la formazione del complesso (Fu & Schlenoff, 2016).

Il numero e la dimensione dei nuclei dipendono fortemente dalle condizioni di concentrazione e dalla rapidità con cui i polimeri vengono messi in contatto. In condizioni di mixing rapido, si osserva la formazione di un elevato numero di nuclei di piccole dimensioni, mentre condizioni di mixing più lente favoriscono la formazione di un numero inferiore di nuclei, destinati a crescere maggiormente (Johnson & Prud'homme, 2003).

2.3.2 Crescita, aggregazione e polidispersione

Una volta formati, i nuclei possono evolvere attraverso processi di crescita che includono l'adsorbimento di ulteriori catene polimeriche e l'unione tra aggregati (Perry et al., 2015).

In questa fase, la diffusione delle specie e la viscosità del mezzo giocano un ruolo fondamentale nel determinare la velocità di crescita e la dimensione finale delle particelle (Fu & Schlenoff, 2016).

In assenza di un controllo adeguato delle condizioni di formazione, i complessi possono andare incontro a fenomeni di aggregazione secondaria, che portano alla formazione di particelle di dimensioni maggiori e distribuzioni dimensionali ampie (Perry et al., 2015). Questo fenomeno è particolarmente evidente in prossimità della neutralità di carica, dove la riduzione delle repulsioni elettrostatiche favorisce l'aggregazione tra particelle già formate (Fu & Schlenoff, 2016).

La conseguente polidispersione rappresenta una delle principali criticità dei sistemi ottenuti mediante metodi convenzionali.

2.3.3 Ruolo del mixing nel controllo del processo

Il mixing rappresenta uno dei parametri più critici nel determinare la cinetica di formazione dei PEC e le proprietà finali delle particelle (Johnson & Prud'homme, 2003).

Nei sistemi convenzionali, la miscelazione avviene su scala macroscopica e può generare gradienti locali di concentrazione, che portano a una nucleazione non uniforme; queste eterogeneità determinano la formazione di particelle con dimensioni variabili e scarsa riproducibilità (Karnik et al., 2008). Al contrario, condizioni di mixing rapido e omogeneo consentono di controllare la nucleazione e limitare la crescita incontrollata delle particelle, favorendo la formazione di sistemi più uniformi (Hansen et al., 2019).

La forte dipendenza della formazione dei PEC dalle condizioni di mixing e diffusione evidenzia come il processo sia intrinsecamente difficile da controllare mediante approcci convenzionali (Perry et al., 2015).

Queste limitazioni rappresentano uno dei principali motivi per cui si rende necessario lo sviluppo di tecnologie avanzate in grado di controllare in modo fine il processo di formazione dei complessi polielettrolitici, come verrà discusso nei paragrafi successivi.

Tabella 1 – Principali parametri che influenzano la formazione e le proprietà dei complessi polielettrolitici

Parametro	Effetto sulla formazione dei PEC	Effetto sulle particelle/complessi	Riferimenti
Rapporto di carica	Influenza il grado di neutralizzazione delle cariche	In prossimità della stechiometria aumenta aggregazione e possibile precipitazione	Perry et al., 2015
Peso molecolare	Modifica lunghezza e flessibilità delle catene polimeriche	PM elevato → particelle più grandi e sistemi più viscosi	Katas et al., 2013
pH	Regola ionizzazione dei gruppi funzionali	Influenza complessazione e stabilità, dimensione delle particelle	George & Abraham, 2006

Forza ionica	Scherman le interazioni elettrostatiche	Può ridurre dimensione o destabilizzare i PEC	Fu & Schlenoff, 2016
Concentrazione dei polimeri	Modifica frequenza di collisione tra catene	Alte concentrazioni → aggregazione e polidispersione	Muller et al., 2011
Condizioni di mixing	Controllano nucleazione e crescita dei complessi	Mixing non uniforme → ampia distribuzione dimensionale	Yuan & Huang, 2019
Velocità di agitazione	Influenza il contatto tra i reagenti	Differenze nella dimensione e stabilità dei PEC	Katas et al., 2013

2.4 Limiti dei metodi convenzionali di preparazione dei complessi

Negli ultimi decenni sono state condotte ricerche approfondite sui polimeri e sui complessi polimerici. Tuttavia, permangono alcuni limiti relativi ai complessi polimerici che dovranno essere affrontati dalla ricerca futura (Meka et al., 2017).

I metodi convenzionali per la preparazione dei complessi polielettrolitici si basano appunto sulla miscelazione macroscopica di soluzioni contenenti polimeri di carica opposta, mediante agitazione meccanica o semplice aggiunta sequenziale dei reagenti (Karnik et al., 2008).

Questi approcci, sebbene semplici e facilmente implementabili, presentano limitazioni significative nel controllo delle proprietà finali dei sistemi ottenuti (Valencia et al., 2012).

2.4.1 Limitazioni nel controllo del mixing

Uno dei principali limiti dei metodi convenzionali è rappresentato dal controllo insufficiente del processo di miscelazione (Kenis et al., 2000). Sebbene gli approcci tradizionali siano semplici da realizzare e ampiamente utilizzati a livello di laboratorio, presentano numerose limitazioni legate al controllo del processo di formazione dei complessi, in particolare quando la complessazione avviene su scale temporali molto rapide (Yuan & Huang, 2019).

Poiché la formazione dei PEC avviene quasi istantaneamente al contatto tra specie di carica opposta, anche piccole variazioni locali nelle condizioni di mixing possono determinare differenze significative nelle proprietà finali delle particelle ottenute (Leclercq et al., 2011).

Yuan e Huang hanno evidenziato come i metodi convenzionali di miscelazione possano portare a una nucleazione incontrollata e alla formazione di particelle caratterizzate da ampia distribuzione dimensionale e scarsa uniformità.

2.4.2 Polidispersione e scarsa riproducibilità

Un'altra importante limitazione dei metodi convenzionali è rappresentata dalla difficoltà nell'ottenere sistemi monodispersi (Valencia et al., 2012). La polidispersione rappresenta un problema significativo in ambito farmaceutico, poiché influisce sulla stabilità, sulla biodistribuzione, sull'efficacia e sulla sicurezza dei sistemi di drug delivery (Zhao et al., 2020).

Inoltre, i metodi batch sono spesso caratterizzati da scarsa riproducibilità tra diversi esperimenti, a causa della sensibilità del processo a variazioni operative quali velocità di agitazione, ordine di aggiunta e concentrazione dei reagenti (Karnik et al., 2008). Questa variabilità limita la possibilità di standardizzare i processi e rappresenta un ostacolo per la traslazione industriale dei PEC (Hansen et al., 2019).

2.4.3 Scalabilità e controllo di processo

Un ulteriore limite dei metodi tradizionali riguarda la scalabilità dei processi di produzione, ovvero la capacità di un processo o di un sistema di essere trasferito da una scala ridotta, tipicamente di laboratorio, a una scala più grande, mantenendo però le stesse caratteristiche e prestazioni; significa quindi poter aumentare i volumi di produzione senza perdere il controllo sulle condizioni operative e senza alterare in modo significativo la qualità o la riproducibilità del risultato finale. Nei sistemi batch, l'aumento del volume di produzione può accentuare le eterogeneità di mixing, peggiorando ulteriormente il controllo sulle proprietà delle particelle (Valencia et al., 2012). La difficoltà nel mantenere condizioni operative costanti su scala maggiore rappresenta una sfida significativa per l'applicazione industriale dei PEC (Schlenoff et al., 2019).

2.4.4 Implicazioni per le applicazioni farmaceutiche

Le limitazioni dei metodi convenzionali hanno un impatto diretto sulle prestazioni dei sistemi basati su PEC in ambito farmaceutico (Zhao et al., 2020). La variabilità nella dimensione e nella struttura delle particelle può influenzare il rilascio del farmaco, la stabilità del sistema e la sua biodistribuzione (Li et al., 2018).

Pertanto, il superamento di queste limitazioni rappresenta un requisito fondamentale per lo sviluppo di sistemi basati su PEC destinati ad applicazioni cliniche.

2.4.5 Limitazioni nei sistemi alginato–chitosano

I sistemi basati su alginato e chitosano rappresentano una delle combinazioni polielettrolitiche maggiormente studiate per applicazioni biomedicali e farmaceutiche grazie alla loro biocompatibilità, biodegradabilità e bassa tossicità. Tuttavia, le criticità dei metodi convenzionali risultano particolarmente evidenti in questi sistemi (Katas et al., 2013).

Una delle principali limitazioni riguarda l'elevata sensibilità del processo alle condizioni di preparazione. La formazione dei complessi dipende infatti da parametri come pH, forza ionica, rapporto stechiometrico tra i polimeri e concentrazione delle soluzioni utilizzate; piccole variazioni di questi parametri possono portare a differenze significative nella dimensione e nella stabilità delle nanoparticelle (Gao et al., 2021). In particolare, la miscelazione non uniforme può favorire l'aggregazione secondaria e la formazione di particelle di grandi dimensioni (Katas et al., 2013).

Queste problematiche evidenziano la difficoltà nel controllare in modo preciso la formazione dei PEC utilizzando approcci convenzionali (Gan et al., 2005).

Nei sistemi a base di alginato e chitosano, il controllo del pH è particolarmente importante, perché il chitosano ha un comportamento pH-dipendente: se l'ambiente non è abbastanza acido, i gruppi amminici risultano meno protonati e questo riduce l'efficacia della complessazione con l'alginato (George & Abraham, 2006).

Inoltre, le tecniche di preparazione convenzionali rendono complicato il passaggio a una scala produttiva, perché l'aumento dei volumi porta a maggiori eterogeneità nel mixing e diminuisce ulteriormente la riproducibilità dei sistemi ottenuti (Yuan & Huang, 2019).

Nel complesso, quindi, tutte queste limitazioni evidenziano come i metodi convenzionali non consentano un controllo sufficientemente preciso della formazione dei complessi polielettrolitici, rendendo necessario lo sviluppo di tecnologie avanzate in grado di regolare in modo più accurato il mixing e la cinetica di formazione delle particelle.

2.5 Necessità di tecnologie avanzate per il controllo della formazione dei complessi polielettrolitici

Alla luce delle considerazioni precedenti, emerge chiaramente la necessità di sviluppare tecnologie in grado di fornire un controllo fine e riproducibile delle condizioni di formazione dei complessi

polielettrolitici. Tali tecnologie dovrebbero consentire di regolare in modo preciso parametri quali il mixing, il tempo di contatto tra i reagenti e la distribuzione spaziale delle specie coinvolte (Valencia et al., 2012).

Si apre quindi la strada all'utilizzo di tecnologie avanzate, che permettono di ottenere PEC con proprietà controllate e altamente riproducibili, rendendo possibile la loro applicazione su scala industriale e clinica. In questo contesto, la microfluidica rappresenta una soluzione particolarmente promettente, in quanto permette di controllare in modo fine i parametri di flusso e diffusione, rendendola uno strumento ideale per modulare la nucleazione e la crescita dei complessi polielettrolitici (Whitesides 2006)

3 Microfluidica per la produzione di complessi polielettrolitici

3.1 Introduzione alla microfluidica

Negli ultimi decenni, la crescente necessità di sviluppare sistemi di rilascio dei farmaci sempre più efficienti, riproducibili e facilmente trasferibili su scala industriale ha favorito l'affermazione della microfluidica come una delle tecnologie più promettenti nel campo delle scienze farmaceutiche e delle nanotecnologie. Grazie alla possibilità di manipolare quantità estremamente ridotte di fluidi all'interno di microcanali con dimensioni comprese tra alcune decine e alcune centinaia di micrometri, la microfluidica consente di controllare con elevata precisione i fenomeni di trasporto di massa, miscelazione e formazione di particelle, superando numerose limitazioni associate ai metodi convenzionali di preparazione delle nanoparticelle (Whitesides, 2006). La microfluidica deriva dalla combinazione di principi e tecnologie appartenenti a diversi ambiti scientifici, tra cui la chimica, la fisica, la biologia, la scienza dei materiali, la fluidodinamica e la microelettronica (Hamdallah et al., 2020). Questo approccio ha trovato poi applicazione in numerosi ambiti, tra cui la diagnostica, la chimica analitica, l'ingegneria tissutale e, soprattutto, lo sviluppo di sistemi avanzati per il drug delivery (Riahi et al., 2015).

Il termine *microfluidica* indica quindi la scienza e la tecnologia che si occupano dello studio del comportamento dei fluidi all'interno di canali di dimensioni micrometriche. A queste scale dimensionali, infatti, i fluidi si comportano in modo diverso rispetto ai sistemi macroscopici: predominano le forze viscosive rispetto a quelle inerziali, il flusso è generalmente di tipo laminare e il trasporto di massa tra specie chimiche differenti avviene principalmente per diffusione. Tali caratteristiche permettono di ottenere un controllo estremamente accurato delle condizioni operative, rendendo la microfluidica particolarmente adatta alla sintesi di nanomateriali e complessi polielettrolitici (Stone et al., 2004).

L'origine della microfluidica moderna viene generalmente fatta risalire allo sviluppo dei primi dispositivi *micro total analysis systems* (μ TAS), introdotti all'inizio degli anni Novanta con l'obiettivo di miniaturizzare le procedure analitiche tradizionali. I lavori pionieristici di Manz e altri collaboratori

dimostrarono come numerose operazioni di laboratorio potessero essere integrate all'interno di un unico dispositivo miniaturizzato, aprendo la strada allo sviluppo dei cosiddetti sistemi *lab-on-a-chip* (Dittrich & Manz, 2006). Negli anni successivi, il rapido progresso delle tecniche di microfabbricazione ha permesso la realizzazione di dispositivi sempre più complessi e performanti, favorendo una diffusione sempre più ampia della microfluidica anche in ambito biomedico e farmaceutico (Thorsen et al., 2002).

L'introduzione del concetto di *lab-on-a-chip* ha quindi permesso un'importante evoluzione della microfluidica; questi dispositivi sono in grado di integrare in un unico supporto miniaturizzato numerose operazioni normalmente eseguite in laboratorio, tra cui preparazione dei campioni, miscelazione dei reagenti, reazioni chimiche, separazione e analisi dei prodotti. La miniaturizzazione comporta numerosi vantaggi, tra cui una significativa riduzione del consumo di reagenti, tempi di analisi più brevi, maggiore automazione del processo e minore rischio di contaminazione, rendendo tali dispositivi particolarmente interessanti per applicazioni farmaceutiche e diagnostiche (Whitesides, 2006).

Parallelamente allo sviluppo dei sistemi *lab-on-a-chip*, la microfluidica ha trovato crescente applicazione nella produzione di nanoparticelle destinate al rilascio di farmaci. A differenza dei metodi convenzionali, quali precipitazione, emulsione o semplice miscelazione in batch, i dispositivi microfluidici permettono di controllare con elevata precisione il contatto tra i reagenti, limitando la formazione di gradienti locali di concentrazione e migliorando la riproducibilità del processo. Di conseguenza, è possibile ottenere nanoparticelle caratterizzate da dimensioni più uniformi, indice di polidispersione (PDI) ridotto e maggiore stabilità colloidale (Karnik et al., 2008). Tali caratteristiche risultano particolarmente rilevanti per applicazioni farmaceutiche, nelle quali anche piccole variazioni dimensionali possono influenzare la biodistribuzione, la cinetica di rilascio del principio attivo e l'efficacia terapeutica.

Negli ultimi anni, la microfluidica è stata progressivamente estesa anche alla preparazione di complessi polielettrolitici (PEC). Come discusso nel Capitolo 2, la formazione dei PEC dipende fortemente dalla velocità di miscelazione, dal rapporto di carica tra i polimeri, dal pH, dalla forza ionica e dalla concentrazione delle soluzioni; nei metodi convenzionali, il controllo simultaneo di tali parametri risulta spesso difficoltoso e può determinare la formazione di particelle eterogenee o fenomeni di aggregazione indesiderati. I dispositivi microfluidici consentono invece di regolare in maniera estremamente precisa le condizioni di contatto tra polielettroliti di carica opposta, influenzando direttamente i processi di nucleazione, crescita e stabilizzazione dei complessi (Hood

& DeVoe, 2015). Questo approccio permette di ottenere PEC con distribuzioni dimensionali più ristrette e proprietà maggiormente riproducibili, rappresentando una valida strategia per superare molte delle limitazioni evidenziate nei metodi convenzionali.

L'interesse verso questa tecnologia è ulteriormente aumentato grazie alla sua versatilità. Sebbene il sistema chitosano–alginato rappresenti uno dei modelli maggiormente studiati, numerosi lavori hanno dimostrato l'applicabilità della microfluidica anche alla preparazione di altri complessi polielettrolitici, quali chitosano–acido ialuronico, chitosano–carbossimetilcellulosa, poli(L-lisina)–acido ialuronico, complessi polisaccaride-proteina e sistemi destinati al trasporto di acidi nucleici, evidenziando come il controllo del processo di miscelazione rappresenti un elemento chiave indipendentemente dalla natura dei polielettroliti impiegati (Boddohi & Kipper, 2010).

Alla luce di queste considerazioni, la microfluidica non rappresenta semplicemente una tecnica alternativa ai metodi convenzionali, ma costituisce un approccio in grado di controllare razionalmente la formazione dei complessi polielettrolitici, migliorandone le caratteristiche chimico-fisiche e favorendone il trasferimento verso applicazioni farmaceutiche e biomediche. Nei paragrafi successivi analizzeremo quindi i principi fisici alla base della microfluidica, le principali configurazioni dei dispositivi impiegati e il loro ruolo nel controllo della formazione dei PEC, con particolare attenzione agli aspetti che influenzano dimensione, polidispersione, stabilità e riproducibilità delle nanoparticelle.

3.2 Principi fisici della microfluidica

Il comportamento dei fluidi all'interno dei dispositivi microfluidici è governato da principi fisici differenti rispetto a quelli osservati nei sistemi macroscopici convenzionali. La principale differenza è rappresentata dal rapporto tra le forze inerziali e quelle viscosi che agiscono sul fluido. Nei sistemi macroscopici, le forze inerziali possono assumere un ruolo predominante e favorire fenomeni di miscelazione convettiva; al contrario, nei sistemi caratterizzati da dimensioni micrometriche, le forze viscosi diventano relativamente più importanti e il flusso tende a mantenersi ordinato e prevedibile (Whitesides, 2006).

Il rapporto tra forze inerziali e viscosi è espresso attraverso il **numero di Reynolds (Re)**, uno dei principali parametri utilizzati per descrivere il comportamento dei fluidi. Il numero di Reynolds è definito come:

$$Re = \frac{\rho UL}{\mu} = \frac{UL}{\nu}$$

dove ρ è la densità del fluido, U la velocità caratteristica del flusso, L la lunghezza caratteristica del sistema, μ la viscosità dinamica e ν la viscosità cinematica. La riduzione delle dimensioni del canale tipica dei dispositivi microfluidici determina generalmente valori di Reynolds relativamente bassi, nei quali le forze viscosi prevalgono su quelle inerziali (Squires & Quake, 2005).

Una conseguenza di queste condizioni è la prevalenza del regime laminare. Quando due correnti fluide vengono introdotte nello stesso microcanale, tendono infatti a scorrere parallelamente senza generare i vortici e le instabilità tipiche del flusso turbolento. In questo modo, i due fluidi possono mantenere, per un certo tratto, un'interfaccia ben definita e il loro miscelamento avviene principalmente attraverso la diffusione delle molecole da una corrente all'altra, attraverso l'interfaccia che le separa. (Nguyen & Wu, 2005).

La diffusione molecolare rappresenta pertanto il principale meccanismo di trasferimento di massa tra correnti che scorrono in regime laminare. Questa caratteristica costituisce un importante vantaggio dei sistemi microfluidici, poiché permette di controllare in maniera precisa il trasporto delle specie presenti nei diversi flussi. La possibilità di prevedere e modulare il processo di miscelazione rappresenta infatti uno degli elementi fondamentali su cui si basa lo sviluppo dei dispositivi microfluidici destinati alla combinazione e al trattamento di differenti reagenti. Nel caso della formazione dei complessi polielettrolitici, queste caratteristiche sono particolarmente importanti, poiché permettono di controllare il contatto tra le soluzioni contenenti polielettroliti di carica opposta, agendo sulla geometria del microcanale e sulle modalità con cui i diversi flussi vengono convogliati e miscelati (Whitesides, 2006).

Il trasporto di una specie all'interno di un sistema microfluidico dipende dal rapporto tra la diffusione molecolare e il trasporto convettivo dovuto al movimento del fluido. La diffusione è legata al movimento casuale delle molecole causato dalla loro agitazione termica, mentre la convezione consiste nel trasporto delle specie determinato dal movimento complessivo del fluido. La relativa importanza di questi due meccanismi può essere descritta mediante il numero di Peclet (Pe), un parametro adimensionale definito come rapporto tra trasporto convettivo e trasporto diffusivo. Il numero di Peclet può essere espresso come:

$$Pe = UaHD$$

dove U_a rappresenta la velocità media del flusso, H rappresenta una lunghezza caratteristica del sistema perpendicolare alla direzione del flusso e D rappresenta invece il coefficiente di diffusione della specie considerata (Bird et al., 2001).

Il valore di Pe permette quindi di valutare quale dei due meccanismi di trasporto risulti predominante. Valori elevati del numero di Peclet indicano una maggiore rilevanza del trasporto convettivo rispetto alla diffusione, mentre, a valori inferiori, la diffusione assume un ruolo progressivamente più significativo. Nei sistemi microfluidici, l'importanza relativa dei due meccanismi può essere modulata intervenendo sulla velocità del flusso e sulle dimensioni caratteristiche del sistema. In condizioni di flusso laminare, il miscelamento tra due correnti a contatto avviene infatti prevalentemente attraverso la diffusione. Quando il numero di Peclet è sufficientemente elevato, il tempo durante il quale le due correnti rimangono a contatto può risultare troppo breve affinché la diffusione determini un mescolamento significativo; l'interfaccia tra i due fluidi rimane pertanto relativamente netta. Al contrario, una riduzione della velocità di flusso aumenta il tempo di contatto tra le correnti e permette alla diffusione di agire più efficacemente, favorendo una miscelazione più omogenea dei reagenti (Atencia et al., 2005).

Queste differenze nelle condizioni di miscelazione possono influenzare direttamente la formazione delle nanoparticelle. Una miscelazione più uniforme favorisce infatti condizioni di complessazione più omogenee all'interno del microcanale, riducendo la presenza di zone caratterizzate da concentrazioni locali molto differenti. Questo può portare a una nucleazione e a una crescita più uniformi e, di conseguenza, alla formazione di nanoparticelle con dimensioni più controllate e distribuzioni dimensionali più ristrette. Al contrario, una miscelazione meno efficace può determinare condizioni locali di complessazione differenti, favorendo processi di aggregazione e una maggiore eterogeneità dimensionale delle particelle ottenute.

Questo comportamento evidenzia quindi come la velocità di flusso, le dimensioni del microcanale e la diffusività delle specie siano parametri strettamente connessi tra loro nel determinare l'efficienza del miscelamento. La possibilità di modulare il numero di Peclet attraverso la scelta delle condizioni operative rappresenta uno degli aspetti che rendono la microfluidica particolarmente adatta al controllo dei fenomeni di trasporto e miscelazione su scala micrometrica. Nel contesto della formazione dei complessi polielettrolitici, il controllo di tali condizioni assume particolare importanza, poiché la velocità con cui le specie di carica opposta entrano in contatto può influenzare il processo di formazione dei complessi. La possibilità di modificare la velocità del flusso e la geometria del sistema permette quindi di intervenire sul rapporto tra convezione e diffusione e, di

conseguenza, sulle modalità con cui le diverse soluzioni vengono miscelate all'interno del microcanale (Whitesides, 2006).

Per migliorare il miscelamento nei sistemi microfluidici sono stati sviluppati numerosi approcci basati sulla modifica della geometria dei canali o sull'introduzione di perturbazioni controllate del flusso. Il controllo del miscelamento riveste infatti un ruolo fondamentale in numerose applicazioni microfluidiche, nelle quali l'efficienza del mescolamento può influenzare la velocità delle reazioni e la formazione di sistemi autoassemblati, come anche micro e nanoparticelle. I dispositivi dedicati a questo scopo sono definiti micromixer e questi possono essere principalmente classificati in micromixer attivi e micromixer passivi (Yaralioglu et al., 2004).

- Micromixer attivi: richiedono l'applicazione di una forza esterna, come vibrazioni meccaniche o attuazione pneumatica, per incrementare l'efficienza della miscelazione; tuttavia, la necessità di componenti esterni può renderne più complessi il controllo e l'integrazione con gli altri elementi del dispositivo microfluidico (Yaralioglu et al., 2004).
- Micromixer passivi: non richiedono fonti di energia esterne e sfruttano esclusivamente la geometria del microcanale per aumentare l'efficienza del mixing. In particolare, la presenza di microstrutture sulla superficie o di cambiamenti nella configurazione del flusso può modificare il percorso delle correnti e aumentare la superficie di contatto tra esse, favorendo così il trasferimento di massa attraverso la diffusione (Park et al., 2003). Tra questi sistemi rivestono particolare importanza gli Staggered Herringbone Micromixers (SHM), nei quali una serie di strutture geometriche, disposte secondo una caratteristica configurazione a "liscia di pesce", induce una riorganizzazione delle correnti e dei moti trasversali all'interno del canale. Questo meccanismo aumenta significativamente l'efficienza del mixing pur mantenendo condizioni di flusso laminare e consente inoltre di raggiungere tempi di miscelazione dell'ordine dei millisecondi, rendendo gli SHM particolarmente interessanti per la preparazione rapida di sistemi autoassemblati e nanoparticellari (Zhigaltsev et al., 2012). Nei processi di preparazione di nanoparticelle e complessi polielettrolitici vengono quindi frequentemente preferiti i sistemi passivi grazie alla loro semplicità costruttiva, riproducibilità e compatibilità con processi continui (Capretto et al., 2011).

Il controllo preciso dei fenomeni di trasporto di massa e delle condizioni di mixing rappresenta uno degli aspetti più rilevanti della microfluidica applicata alla formazione di nanoparticelle e PEC. La possibilità di modulare in maniera accurata tempi di diffusione, velocità di flusso e gradienti di concentrazione consente infatti di influenzare direttamente i processi di nucleazione e crescita delle

particelle, migliorando uniformità dimensionale e riproducibilità rispetto ai metodi convenzionali (Karnik et al., 2008).

3.3 Dispositivi microfluidici per la formazione dei complessi polielettrolitici

La preparazione di nanoparticelle e complessi polielettrolitici mediante microfluidica può essere effettuata utilizzando diverse configurazioni dei dispositivi, che permettono di controllare il contatto tra i reagenti, il trasporto di massa e le condizioni di miscelazione. La geometria del microcanale e la disposizione dei flussi influenzano infatti la distanza che le specie devono percorrere per diffondere, il tempo necessario per la miscelazione e il tempo di permanenza dei reagenti all'interno del dispositivo. Questi parametri determinano quindi le condizioni in cui avvengono i processi di nucleazione, crescita e autoassemblaggio delle particelle (Liu et al., 2022).

Le diverse configurazioni microfluidiche possono essere ricondotte principalmente a sistemi a T-junction, dispositivi basati sulla hydrodynamic flow focusing (HFF), micromixer passivi quali gli Staggered Herringbone Micromixers (SHM) e sistemi basati sulla droplet microfluidics. Sebbene tutti questi approcci sfruttino le caratteristiche del trasporto su scala micrometrica, essi differiscono per modalità di contatto tra le correnti, meccanismo di mixing e possibilità di controllo dei parametri di processo. La scelta della configurazione più appropriata dipende quindi dal tipo di nanoparticella che si vuole ottenere e dalle caratteristiche del processo di autoassemblaggio coinvolto (Huang et al., 2023).

3.3.1 Dispositivi a T-junction

I dispositivi a T-junction rappresentano una delle configurazioni microfluidiche più semplici per mettere in contatto due correnti fluide. In questa geometria, due flussi vengono introdotti attraverso canali disposti perpendicolarmente e confluiscono in un unico canale di uscita. Nella configurazione più comune, il canale laterale contiene la fase dispersa, che entra nel canale principale attraversato dalla fase continua. L'intersezione tra i due flussi determina la formazione di goccioline della fase dispersa all'interno della fase continua (Kim et al., 2015).

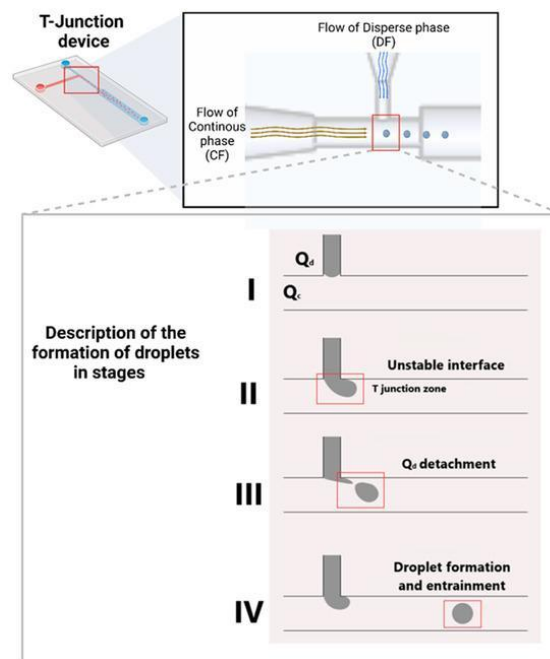


Figura 2: Rappresentazione schematica della formazione di goccioline in un dispositivo microfluidico a T-junction: la fase dispersa incontra perpendicolarmente la fase continua nel canale principale, dando origine alle goccioline. (Gu et al. (2011)).

La formazione e le caratteristiche delle goccioline dipendono da diversi parametri, tra cui la bagnabilità delle pareti del dispositivo, le portate relative delle due fasi e la presenza di tensioattivi. In particolare, la scelta delle condizioni di bagnabilità della superficie permette di favorire la formazione di emulsioni differenti, come emulsioni olio-in-acqua (O/A) o acqua-in-olio (A/O) (Xu et al., 2006). Attraverso l'utilizzo di più T-junction in serie e di superfici con diversa bagnabilità, è inoltre possibile ottenere emulsioni multiple, come quelle acqua-in-olio-in-acqua (A/O/A), utili soprattutto nei processi di incapsulamento e di estrazione (Basova et al., 2015).

La formazione delle goccioline può avvenire secondo diversi regimi, principalmente dripping, jetting e squeezing, che dipendono dalle condizioni di flusso e dal numero capillare. Anche la dimensione delle goccioline può essere controllata modificando le portate dei fluidi o altri parametri operativi, permettendo di ottenere sistemi con dimensioni più uniformi (De Menech et al., 2008).

La semplicità della geometria della T-junction, unita alla possibilità di controllare in modo preciso la formazione delle goccioline, rende questa configurazione particolarmente interessante per applicazioni che richiedono una produzione riproducibile e ad alta produttività (Chou et al., 2015).

3.3.2 Hydrodynamic Flow Focusing (HFF)

Una delle configurazioni maggiormente utilizzate per la sintesi microfluidica di nanoparticelle è rappresentata dalla Hydrodynamic Flow Focusing (HFF). In questo approccio, un flusso centrale contenente i precursori della nanoparticella viene introdotto all'interno di un microcanale e viene successivamente compresso lateralmente da due flussi esterni, generalmente costituiti da una fase acquosa o da un antisolvente. La focalizzazione permette di ridurre notevolmente la larghezza del flusso centrale e, di conseguenza, anche la distanza che le molecole devono percorrere attraverso la diffusione (Lu et al., 2016).

A causa del regime laminare, i fluidi non si mescolano mediante turbolenza, ma principalmente attraverso la diffusione molecolare all'interfaccia tra solvente e antisolvente. La rapidità del processo di miscelazione dipende da diversi parametri, tra cui la diffusività del solvente, le dimensioni del canale e, soprattutto, la larghezza del flusso centrale focalizzato e il rapporto tra le portate del flusso centrale e dei flussi laterali. In particolare, una riduzione della larghezza del flusso centrale comporta una diminuzione della distanza che le molecole devono percorrere per diffusione, determinando quindi una significativa riduzione del tempo necessario alla miscelazione (Karnik et al., 2008).

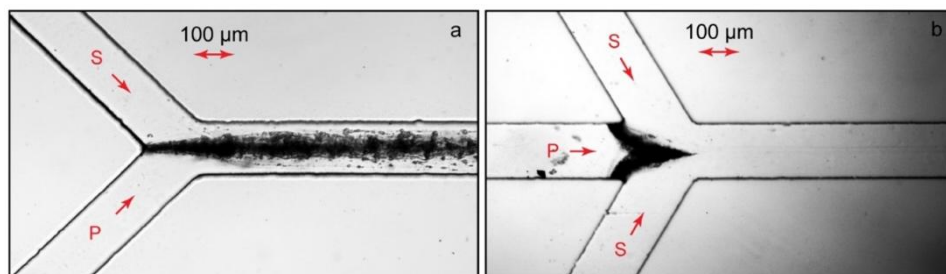


Figura 3: Immagini sperimentali della complessazione polielettrolita–tensioattivo in un dispositivo microfluidico a giunzione a Y (a) e mediante hydrodynamic flow focusing (b). (Bezrukov e Galyametdinov 2022).

Poiché la larghezza del flusso focalizzato dipende sia dalle dimensioni del microcanale sia dal rapporto tra le portate, l'impiego di canali di dimensioni ridotte e di adeguati rapporti di flusso consente di ottenere tempi di miscelazione molto brevi. Questo controllo più preciso delle condizioni di miscelazione permette di modulare i processi di nucleazione e crescita delle nanoparticelle, favorendo la formazione di particelle di dimensioni più piccole e con una distribuzione dimensionale più uniforme rispetto ai metodi convenzionali (Solorzano et al., 2016).

Un ulteriore vantaggio della HFF è rappresentato dalla possibilità di modulare le caratteristiche delle nanoparticelle agendo sulle condizioni operative e sulla geometria del dispositivo. La variazione della

larghezza dei canali e del rapporto tra le portate consente infatti di controllare le condizioni di miscelazione e, di conseguenza, le dimensioni e la distribuzione dimensionale delle particelle ottenute. Inoltre, l'impiego di precursori lipidici o polimerici opportunamente funzionalizzati, come la PEGilazione o la presenza di uno o più ligandi di targeting, permette di ottenere nanoparticelle dotate di proprietà superficiali specifiche (Hui et al., 2018).

Nonostante i numerosi vantaggi, la HFF presenta alcune limitazioni, principalmente legate alla miscelazione passiva per diffusione. La riduzione delle dimensioni dei canali, necessaria per ottenere tempi di miscelazione più brevi e nanoparticelle di dimensioni ridotte, comporta infatti una diminuzione della produttività del sistema. Inoltre, elevati rapporti tra le portate possono determinare una significativa diluizione della sospensione di nanoparticelle all'uscita del dispositivo (Liu et al., 2022).

3.3.3 Staggered Herringbone Micromixers (SHM)

Per superare le limitazioni della HFF, sono state sviluppate strategie volte ad accelerare la miscelazione, tra cui l'integrazione di specifiche geometrie, come gli Staggered Herringbone Micromixers (SHM), che favoriscono il rimescolamento dei fluidi, e l'impiego di micromiscelatori attivi, nei quali una fonte di energia esterna promuove la miscelazione. Questi approcci permettono di ridurre i tempi di miscelazione e migliorare il controllo delle caratteristiche delle nanoparticelle (Stroock et al., 2002). Quando è necessario ottenere tempi di miscelazione ancora più brevi rispetto a quelli ottenibili mediante semplice diffusione, possono essere utilizzati micromixer passivi basati sul trasporto convettivo caotico, tra i quali gli SHM, che rappresentano una delle configurazioni maggiormente studiate. Gli SHM sono costituiti da una serie di strutture geometriche asimmetriche disposte sul fondo del microcanale secondo una configurazione caratteristica a "lisca di pesce". Queste strutture modificano localmente il percorso delle correnti e inducono un trasporto trasversale che aumenta rapidamente l'interfaccia tra i fluidi (Stroock et al., 2002).

Il meccanismo di mixing degli SHM si differenzia quindi da quello di un semplice microcanale rettilineo: in quest'ultimo, due correnti affiancate possono mescolarsi principalmente per diffusione, mentre la geometria Herringbone induce ripetute deformazioni e ripiegamenti delle correnti, aumentando progressivamente la superficie di contatto tra esse. Il risultato è un'accelerazione del trasferimento di massa senza la necessità di introdurre una fonte di energia esterna, mantenendo quindi il carattere passivo del dispositivo (Evers et al., 2018).

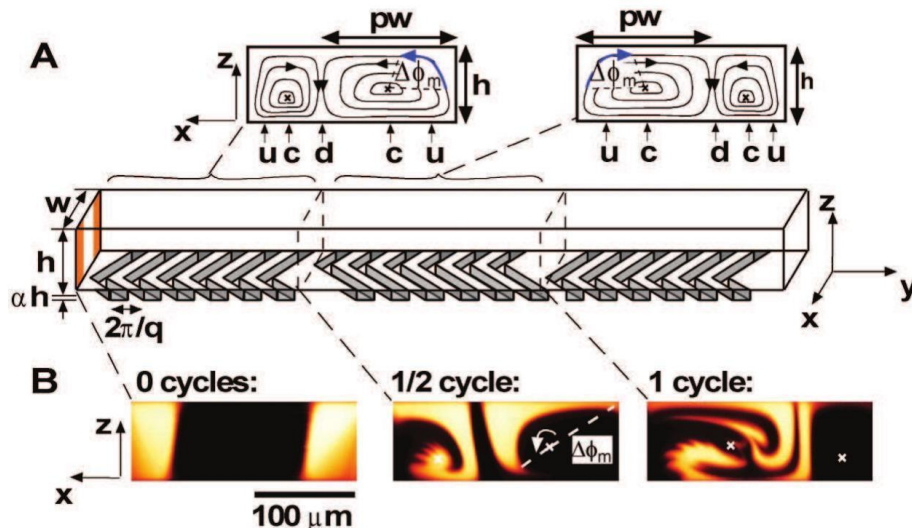


Figura 4. Configurazione degli Staggered Herringbone Micromixers (SHM) e rappresentazione del processo di miscelazione: le strutture asimmetriche del microcanale inducono moti trasversali che favoriscono il rimescolamento dei fluidi in regime laminare. (Kwak et al., 2016).

La capacità di ottenere miscelamenti nell'ordine dei millisecondi ha reso gli SHM particolarmente interessanti per la produzione di sistemi autoassemblati. Un esempio importante è rappresentato dalla preparazione di lipid nanoparticles (LNP) per il trasporto di piccoli RNA interferenti (siRNA). In questo tipo di processo, una fase contenente i lipidi disciolti in etanolo viene miscelata rapidamente con una fase acquosa contenente il siRNA; la rapida variazione delle condizioni del solvente durante il mixing favorisce l'autoassemblaggio dei componenti lipidici e la formazione delle nanoparticelle (Zhigaltsev et al., 2012).

Un ulteriore vantaggio degli SHM è rappresentato dalla possibilità di parallelizzare i dispositivi, ovvero collegare più unità microfluidiche in parallelo per aumentare la produttività senza modificare necessariamente le condizioni di mixing all'interno del singolo canale. Questa strategia risulta particolarmente interessante nell'ottica dello scale-up, poiché permette di aumentare la quantità di prodotto mantenendo il controllo garantito dalla geometria del singolo elemento di miscelazione (Evers et al., 2018).

3.3.4 Droplet microfluidics

Un approccio differente è rappresentato dalla droplet microfluidics, meccanismo nel quale le correnti fluide vengono compartimentalizzate sotto forma di goccioline disperse all'interno di una seconda fase immiscibile. Ogni gocciolina può essere considerata come un piccolo compartimento nel quale

avvengono le reazioni o i processi di autoassemblaggio, permettendo di isolare fisicamente le diverse unità di reazione e di controllarne le condizioni di formazione (Lu et al., 2016).

La compartmentalizzazione offre diversi vantaggi rispetto ai sistemi continui convenzionali. In particolare, la formazione di goccioline di dimensioni controllate permette di ottenere volumi di reazione estremamente ridotti e condizioni relativamente uniformi all'interno delle singole unità. Questo approccio è stato utilizzato per la preparazione di diverse categorie di materiali, comprendenti particelle polimeriche, liposomi, coacervati e altri sistemi autoassemblati (Agha et al., 2023).

La droplet microfluidics può inoltre essere combinata con altre operazioni microfluidiche, consentendo di introdurre più reagenti in successione o di effettuare diverse fasi di reazione all'interno dello stesso dispositivo; questa caratteristica risulta particolarmente interessante per sistemi nei quali la formazione delle nanoparticelle richiede più passaggi consecutivi, poiché consente di mantenere il controllo delle condizioni operative lungo l'intero processo (Agha et al., 2023).

Rispetto ai sistemi HFF e SHM, la droplet microfluidics introduce quindi un ulteriore livello di controllo basato sulla compartmentalizzazione del processo. Tuttavia, l'utilizzo di una fase continua immiscibile e la necessità di controllare la formazione, la stabilità e la successiva separazione delle goccioline possono rendere il sistema più complesso rispetto ai dispositivi continui basati esclusivamente sul mixing di due correnti miscibili.

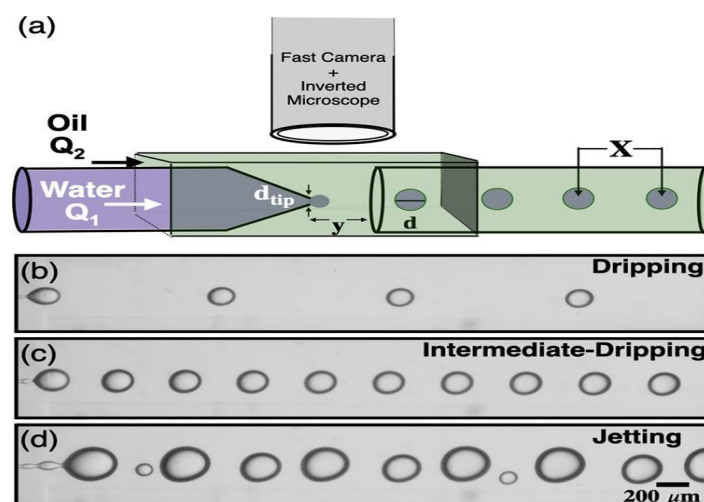


Figura 5: Sequenza di formazione e distacco di una gocciolina nel regime di dripping. (Shen et al. 2020).

Tabella 2: confronto tra le principali configurazioni microfluidiche.

Configurazione	Principale meccanismo di mixing	Caratteristica principale	Vantaggi	Possibili limitazioni	Possibili applicazioni nei sistemi PEC
T-junction	Diffusione all'interfaccia	Incontro ortogonale delle correnti	Semplicità costruttiva e facilità di integrazione	Mixing e dipendente dalla diffusione	Interessante per sistemi a goccia e processi in cui il confinamento dei reagenti è vantaggioso
HFF	Diffusione su distanza ridotta	Focalizzazione del flusso centrale	Elevato controllo delle condizioni di processo e produzione continua	Necessità di controllare accuratamente le portate	Particolarmente adatta alla formazione di nanoparticelle mediante complessazione rapida e al controllo delle dimensioni
SHM	Advezione caotica + diffusione	Strutture herringbone nel canale	Mixing molto rapido e riproducibile	Geometria più complessa rispetto ai canali semplici	Adatta a sistemi PEC che richiedono mixing rapido e omogeneo, con possibile controllo della distribuzione dimensionale
Droplet microfluidics	Mixing e reazione all'interno delle goccioline	Compartimentalizzazione e micreattori	Elevato controllo delle singole unità di reazione	Necessità di una continua immiscibilità e controllo	Interessante per PEC formati in condizioni di confinamento e per sistemi in cui è

delle importante
goccioline controllare il
 microambiente
 di formazione

3.4 Ruolo del controllo del mixing nella formazione dei complessi polielettrolitici

La possibilità di controllare con precisione il miscelamento rappresenta uno dei principali vantaggi dell'impiego della microfluidica nella preparazione dei complessi polielettrolitici. Come discusso nel Capitolo 2, la formazione dei PEC è fortemente dipendente dalle condizioni con cui i polimeri di carica opposta vengono messi in contatto. Nei dispositivi microfluidici, tuttavia, il controllo della geometria dei canali, delle portate e dei tempi di residenza permette di definire in maniera più precisa le condizioni di contatto tra i reagenti.

Le diverse configurazioni descritte nel paragrafo precedente permettono di intervenire sul miscelamento secondo modalità differenti. Nei sistemi HFF, ad esempio, la focalizzazione del flusso riduce la distanza diffusiva tra le correnti e consente di accelerare il trasferimento di massa. Negli SHM, invece, la presenza delle strutture Herringbone induce un trasporto trasversale delle correnti e permette di ottenere tempi di miscelazione ancora più brevi. La scelta della configurazione microfluidica può quindi essere utilizzata per modulare la velocità con cui i polielettroliti entrano in contatto e, di conseguenza, le condizioni nelle quali ha luogo la complessazione.

Questo aspetto è particolarmente rilevante quando la formazione del PEC è molto rapida. Un controllo più preciso del mixing consente infatti di ridurre le variazioni locali di concentrazione e di rapporto di carica che possono verificarsi durante la miscelazione convenzionale, favorendo condizioni di formazione più omogenee. Il controllo delle condizioni fluidodinamiche può quindi contribuire a ottenere particelle caratterizzate da una distribuzione dimensionale più ristretta e da una minore tendenza all'aggregazione (Karnik et al., 2008).

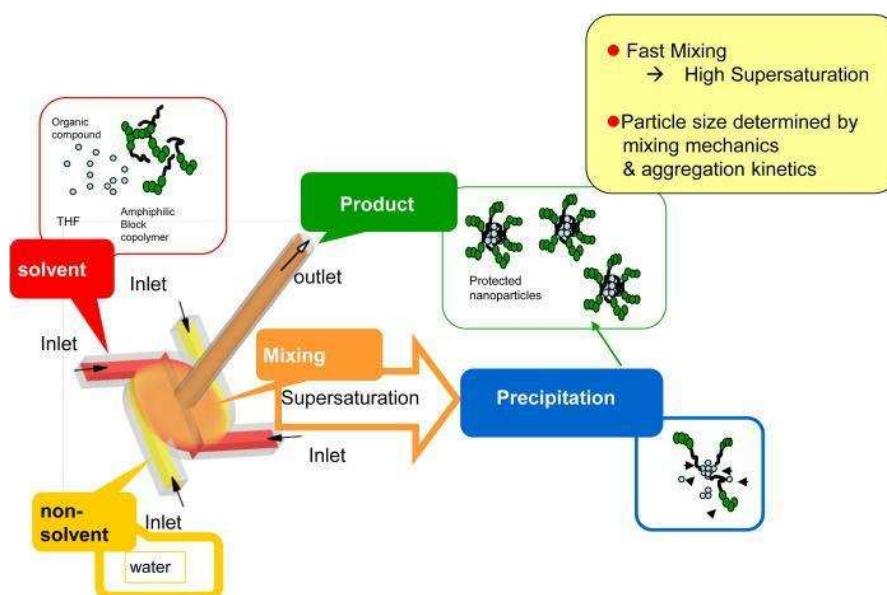


Figura 6. Rappresentazione schematica della miscelazione per diffusione in un microcanale e delle successive fasi di nucleazione e crescita delle nanoparticelle durante il processo di nanoprecipitazione. (Gimondi et al. 2023).

L'effetto del mixing non deve tuttavia essere considerato indipendentemente dagli altri parametri di processo quali velocità di flusso, rapporto tra le portate, geometria del canale, concentrazione dei polielettroliti e diffusività delle specie, che interagiscono tra loro nel determinare le condizioni di formazione delle particelle. La microfluidica permette di controllare simultaneamente questi parametri e di studiarne l'effetto sulle caratteristiche finali dei PEC, offrendo quindi un livello di controllo difficilmente ottenibile mediante la miscelazione convenzionale. In questo senso, il vantaggio della microfluidica non risiede semplicemente nella possibilità di miscelare più rapidamente i reagenti, ma nella possibilità di controllare le condizioni spazio-temporali nelle quali avviene la complessazione; tale controllo può tradursi in una maggiore uniformità dimensionale, una migliore riproducibilità e una maggiore possibilità di modulare le proprietà dei complessi ottenuti.

3.5 Applicazioni della microfluidica nei sistemi polielettrolitici

Negli ultimi anni, l'impiego della microfluidica nella preparazione di sistemi polielettrolitici ha suscitato crescente interesse, grazie alla possibilità di controllare con elevata precisione le condizioni di miscelazione e, di conseguenza, i processi di complessazione e autoassemblaggio. Sebbene molte delle prime applicazioni della microfluidica alla produzione di nanoparticelle abbiano riguardato principalmente liposomi e sistemi ottenuti dall'autoassemblaggio di molecole anfipatiche, l'approccio è stato successivamente esteso a sistemi nei quali la formazione delle particelle è determinata da interazioni elettrostatiche tra specie di carica opposta. In questo contesto, la microfluidica permette di ottenere condizioni di miscelazione più uniformi e controllate rispetto ai sistemi convenzionali,

con effetti sulle dimensioni, sulla distribuzione dimensionale e sulla stabilità delle particelle ottenute (Ma et al., 2019).

Le applicazioni della microfluidica in questo ambito comprendono principalmente la produzione di nanoparticelle e microparticelle a base di polielettroliti naturali o sintetici, ma anche la realizzazione di sistemi per il trasporto di farmaci, proteine e acidi nucleici. Particolare interesse è stato rivolto ai polisaccaridi naturali che, grazie alla loro elevata biocompatibilità e alla possibilità di formare strutture stabilizzate mediante interazioni ioniche, risultano materiali interessanti per applicazioni farmaceutiche e biomedicali (Elsabhy & Wooley, 2012).

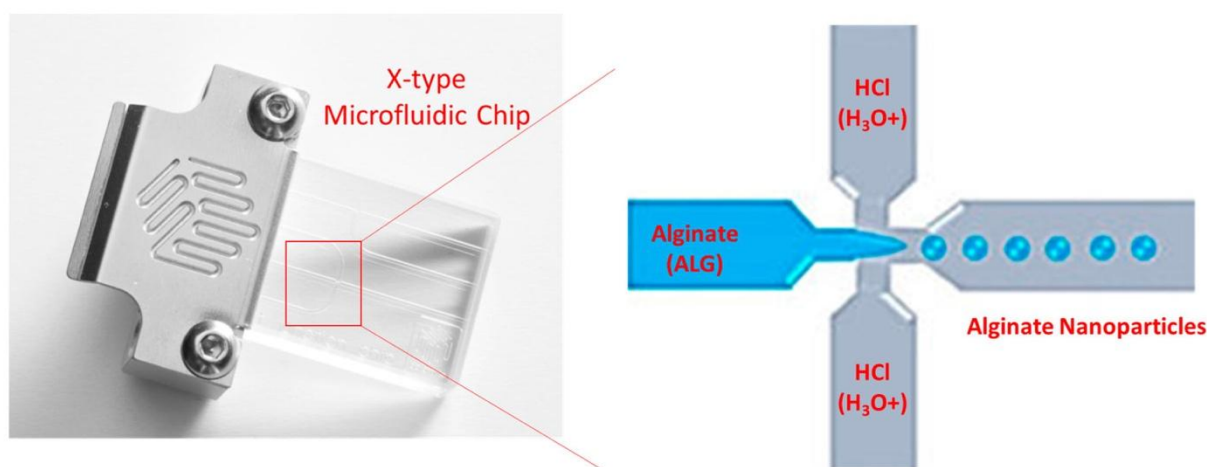


Figura 7. Schema del dispositivo microfluidico impiegato per la produzione di nanoparticelle di alginato mediante complessazione polielettrolitica con poli-L-lisina. (Kim et al. 2015).

Tra i polielettroliti naturali maggiormente studiati in questo contesto, l'alginato riveste un ruolo particolarmente importante. La possibilità di combinare l'alginato con specie cationiche e di sfruttarne allo stesso tempo le proprietà di gelificazione e di complessazione polielettrolitica ha portato allo sviluppo di numerosi sistemi particellari, utilizzati per l'incapsulamento e il rilascio controllato di sostanze biologicamente attive (Thassu et al., 2007).

3.5.1 Sistemi a base di polielettroliti naturali

L'alginato è un polisaccaride anionico lineare e non ramificato costituito da residui di acido β -D-mannuronico e α -L-guluronico; i gruppi carbossilati presenti conferiscono all'alginato un comportamento polielettrolitico e ciò consente l'interazione con specie cationiche in soluzione. In particolare i gruppi carbossilati forniscono all'alginato una carica complessivamente negativa a pH neutro (Thassu et al., 2007).

Uno degli esempi più significativi dell'applicazione della microfluidica alla formazione di PEC è rappresentato dalla preparazione di nanoparticelle utilizzando alginato e poli-L-lisina (PLL). È stato sviluppato un dispositivo microfluidico nel quale una soluzione contenente un pre-gel di alginato e calcio viene miscelata con una soluzione di PLL; il contatto tra il polielettrolita anionico e quello cationico determina la formazione del complesso polielettrolitico e la conseguente generazione delle nanoparticelle. Rispetto alla miscelazione convenzionale, l'impiego del dispositivo microfluidico ha permesso di ottenere nanoparticelle caratterizzate da una maggiore stabilità nei confronti dell'aggregazione. Inoltre, la variazione delle portate dei fluidi ha consentito di modulare la dimensione delle nanoparticelle, dimostrando come le condizioni fluidodinamiche possano essere utilizzate per controllare direttamente le caratteristiche del prodotto finale (Kim et al., 2015). Questo esempio è particolarmente perché dimostra che il vantaggio della microfluidica non è limitato alla semplice produzione di nanoparticelle, ma può essere sfruttato direttamente per controllare una reazione di complessazione polielettrolitica. Inoltre, l'utilizzo di PLL permette di evidenziare come la strategia possa essere applicata anche a sistemi costituiti da polielettroliti differenti rispetto alla più comune combinazione chitosano–alginato (Gonzalez et al., 2002).

Il sistema chitosano–alginato rappresenta un'altra combinazione di particolare interesse. Yang e altri collaboratori hanno sviluppato un dispositivo a L-junction per ottenere particelle magnetiche di alginato caratterizzate da dimensioni uniformi e diametro modulabile, rivestite da chitosano; questo rivestimento ha consentito di ottenere un sistema caratterizzato da un rilascio dell'amoxicillina più prolungato rispetto alle particelle non rivestite, evidenziando come la combinazione di alginato e chitosano possa essere sfruttata per modulare il comportamento di rilascio del principio attivo (Yang et al., 2021).

Un ulteriore esempio di impiego dell'alginato nella formazione di PEC mediante microfluidica è stato riportato da Liu et al. (2019), che hanno sviluppato un dispositivo microfluidico a quattro canali per la fabbricazione di microfibre cave costituite da alginato di sodio e chitosano. In questo caso, l'interazione ionica tra i gruppi carbossilici dell'alginato e i gruppi amminici del chitosano ha portato alla formazione di un complesso polielettrolitico all'interfaccia tra i due flussi. Il controllo dei flussi all'interno del dispositivo ha permesso di ottenere microfibre caratterizzate da un diametro di circa 200 μm e da uno spessore della parete di circa 1,3 μm . Le microfibre ottenute hanno inoltre permesso l'incapsulamento di cellule HepG2, mostrando buona vitalità e proliferazione cellulare e suggerendo il loro potenziale impiego nel tissue engineering epatico (Liu et al., 2019).

L'utilizzo di polielettroliti naturali differenti dal comune sistema alginato–chitosano risulta interessante per ampliare le possibilità di progettazione dei nanosistemi. L'acido ialuronico, ad esempio, è un polisaccaride anionico frequentemente impiegato come componente di sistemi nanoparticellari grazie alla sua biocompatibilità e alle sue caratteristiche biologiche, mentre altri polisaccaridi possono essere combinati con polimeri cationici per ottenere strutture stabilizzate da interazioni elettrostatiche.

3.5.2 Complessi polielettrolitici con acidi nucleici

Un ulteriore ambito nel quale il controllo del processo di complessazione assume particolare importanza è rappresentato dalla formazione di polyplexes, ovvero complessi ottenuti dall'interazione tra acidi nucleici e polimeri cationici. In questi sistemi, il DNA o l'RNA viene associato a polielettroliti di carica opposta attraverso interazioni elettrostatiche, dando origine a nanoparticelle che possono essere utilizzate come sistemi di trasporto intracellulare (Kim et al., 2021). In questo contesto, la microfluidica è stata utilizzata per controllare la velocità con cui i diversi componenti entrano in contatto durante il processo di autoassemblaggio. Un esempio è rappresentato dal sistema di microfluidics-assisted confinement (MAC), sviluppato per la preparazione di nanocomplessi polimero–acido nucleico. Nel lavoro di Grigsby et al. (2013), il sistema MAC è stato realizzato mediante un dispositivo di droplet microfluidics costituito da un generatore di gocce a flusso incrociato, nel quale le soluzioni acquose contenenti acido nucleico e polimero cationico venivano confinate all'interno di goccioline water-in-oil di volume picolitrico. Le goccioline venivano successivamente convogliate in un canale serpentino, progettato per favorire la miscelazione dei reagenti anche in condizioni di flusso laminare. Il confinamento dei reagenti all'interno di piccoli volumi ha permesso di accelerare il processo di complessazione e di ottenere polyplexes più uniformi e meno soggetti ad aggregazione rispetto a quelli preparati mediante miscelazione convenzionale. Gli autori hanno inoltre osservato un miglioramento dell'efficienza del trasferimento di DNA plasmidico e mRNA, evidenziando il potenziale della droplet microfluidics per la preparazione di sistemi destinati alla gene delivery (Ho et al., 2011; Grigsby et al., 2013).

L'interesse per questi sistemi deriva dal fatto che DNA e RNA presentano caratteristiche molecolari differenti e possono interagire in maniera diversa con i polimeri cationici. Di conseguenza, il controllo della cinetica di complessazione assume un ruolo importante nella determinazione delle proprietà finali dei polyplexes. La microfluidica offre in questo caso la possibilità di modulare le condizioni di formazione in maniera riproducibile, intervenendo sui parametri di flusso e sul tempo disponibile per l'interazione tra le diverse specie (Grigsby et al., 2013).

3.5.3 Applicazioni nel drug delivery

Tra le applicazioni della microfluidica nella preparazione dei complessi polielettrolitici (PEC), un ambito di particolare interesse è rappresentato dal drug delivery. La possibilità di controllare le condizioni di contatto tra polielettroliti di carica opposta permette infatti di modulare le caratteristiche delle nanoparticelle ottenute, influenzandone dimensioni, distribuzione dimensionale e capacità di incorporare principi attivi. In questo contesto, la scelta della geometria del dispositivo assume un ruolo importante, poiché determina le modalità di miscelazione e può influenzare le proprietà finali del complesso.

Un esempio è rappresentato dal lavoro di Chiesa et al. (2020), che hanno sviluppato nanoparticelle costituite da acido ialuronico (HA) e chitosano (CS), sfruttando le interazioni polielettrolitiche tra i due polisaccaridi. La preparazione è stata effettuata mediante uno staggered herringbone micromixer (SHM), nel quale le strutture a forma di herringbone favoriscono la miscelazione dei reagenti attraverso l'advezione caotica. Variando le condizioni di preparazione, si sono ottenute nanoparticelle con dimensioni medie adatte a differenti modalità di somministrazione: circa 118 nm per la somministrazione parenterale e 349 nm per quella locoregionale. I PEC sono stati inoltre caricati con everolimus, un farmaco utilizzato in ambito oncologico, e hanno mostrato un'efficace internalizzazione cellulare mediata dal recettore CD44 nelle cellule staminali mesenchimali umane CD44-positive. Questi risultati evidenziano come l'impiego di uno SHM possa consentire di controllare le caratteristiche dimensionali dei PEC e di sviluppare sistemi destinati alla veicolazione di principi attivi (Chiesa et al., 2020).

Un esempio più recente è stato riportato da Atashbasteh et al. (2025), che hanno studiato la preparazione microfluidica di nanoparticelle a base di chitosano e acido ialuronico contenenti rivastigmina, un principio attivo impiegato nel trattamento sintomatico della malattia di Alzheimer. Gli autori hanno confrontato quattro configurazioni di dispositivi fabbricati mediante stampa 3D: canali a geometria Y, a T, con ostacoli interni (*baffle*) e con strutture staggered herringbone. Il confronto ha permesso di valutare l'influenza della geometria del chip sulle caratteristiche delle nanoparticelle e sull'incorporazione del farmaco. La configurazione SHM ha fornito la formulazione ottimizzata, con particelle di dimensioni comprese tra circa 310 e 476 nm e un'efficienza di incapsulamento fino al 94,76%. Le prove di rilascio hanno inoltre evidenziato un profilo caratterizzato da una fase iniziale più rapida, seguita da un rilascio prolungato fino a 24 ore. Questo studio dimostra quindi l'importanza di confrontare geometrie differenti per individuare le condizioni

più adatte alla formazione di PEC destinati alla veicolazione di uno specifico principio attivo (Atashbasteh et al., 2025).

Nel complesso, questi studi evidenziano come la microfluidica possa essere utilizzata per preparare PEC destinati al drug delivery, permettendo di controllare le condizioni di formazione e di modulare le proprietà delle nanoparticelle in funzione dell'applicazione prevista. La scelta della geometria del dispositivo deve essere effettuata considerando le caratteristiche dei polielettroliti, le proprietà desiderate per il complesso e le esigenze di incorporazione e rilascio del principio attivo. Sebbene i risultati ottenuti siano promettenti, sono necessari ulteriori studi per verificare il comportamento di questi sistemi in condizioni fisiologiche e valutarne la sicurezza e l'efficacia in vivo.

3.6 Vantaggi e limitazioni della microfluidica per la produzione di PEC

Come evidenziato nei paragrafi precedenti, l'impiego della microfluidica nella preparazione di sistemi nanoparticellari presenta diversi vantaggi rispetto alle metodologie convenzionali condotte in condizioni di bulk. Il principale elemento distintivo della tecnologia è rappresentato dalla possibilità di controllare in maniera precisa le condizioni di miscelazione, intervenendo sui parametri fluidodinamici e sulla geometria del dispositivo (Ma et al., 2017); nonostante ciò, questo metodo presenta anche alcune limitazioni che devono essere considerate. In questo paragrafo verranno quindi analizzati i principali vantaggi e le limitazioni associate all'impiego della microfluidica nella preparazione di sistemi nanoparticellari.

3.6.1 Vantaggi della microfluidica

- **Controllo delle condizioni di miscelazione:** Le ridotte dimensioni dei canali permettono di diminuire le distanze di diffusione tra le diverse correnti e di ottenere una miscelazione rapida e controllata. Sebbene il flusso sia generalmente laminare e la miscelazione avvenga prevalentemente per diffusione, la ridotta scala dimensionale del sistema consente di ottenere tempi di miscelazione brevi e riproducibili. La geometria del dispositivo e le condizioni di flusso possono essere utilizzate per modulare il tempo disponibile per l'interazione tra i componenti e, di conseguenza, il processo di formazione delle particelle (Saad et al., 2016). Nel caso dei PEC, una miscelazione più uniforme favorisce un contatto più omogeneo tra policationi e polianioni, influenzando i processi di nucleazione e crescita delle particelle. Questo può contribuire a ottenere nanoparticelle con dimensioni più uniformi e una distribuzione dimensionale più ristretta (Kim et al., 2015; Chiesa et al., 2020).

- **Controllo della cinetica di complessazione nei sistemi polielettrolitici:** Nei sistemi polielettrolitici, la formazione del complesso dipende dalle interazioni tra specie di carica opposta. Come discusso nei capitoli precedenti, la formazione dei PEC è influenzata da diversi parametri, tra cui:

- rapporto di carica.
- pH.
- forza ionica.
- concentrazione dei componenti.

A questi fattori si aggiunge la cinetica con cui le diverse specie vengono messe a contatto. La microfluidica permette di intervenire su questo aspetto attraverso la regolazione delle portate e della geometria dei microcanali, offrendo quindi un ulteriore strumento per controllare il processo di complessazione (Chang & Yeo, 2010).

- **Controllo della dimensione e delle caratteristiche delle particelle:** Il controllo delle condizioni di miscelazione può riflettersi direttamente sulle caratteristiche fisico-chimiche delle nanoparticelle. La possibilità di modificare le portate e il rapporto tra i flussi consente di modulare la dimensione delle nanoparticelle e, in determinate condizioni, la loro distribuzione dimensionale. Abbiamo visto l'esempio di nanoparticelle di alginato ottenute mediante complessazione polielettrolitica tra alginato e poli-L-lisina (PLL) all'interno di un dispositivo microfluidico e si è osservato:

- maggiore stabilità nei confronti dell'aggregazione rispetto alla miscelazione convenzionale;
- possibilità di controllare la dimensione delle nanoparticelle modificando le portate dei fluidi.

Questo dimostra direttamente come le condizioni fluidodinamiche possano essere utilizzate per modulare il processo di formazione di un PEC (Kim et al., 2015).

- **Maggiore riproducibilità del processo:** Nei sistemi convenzionali condotti in batch, la miscelazione può essere influenzata da:
- modalità di agitazione;
 - velocità di aggiunta dei componenti;
 - condizioni locali presenti all'interno del recipiente.

Nei dispositivi microfluidici, invece, i parametri fluidodinamici possono essere definiti e mantenuti in maniera più precisa; il controllo delle portate e del rapporto tra i flussi permette quindi di ottenere condizioni di formazione più uniformi e di ridurre la variabilità tra differenti produzioni. Prendendo come esempio la formazione di nanoparticelle PLGA-PEG, si è visto che sono caratterizzate da:

- elevata monodispersità;
 - buona riproducibilità *batch-to-batch*;
 - dimensione controllabile attraverso i parametri di processo (Gimondi et al., 2022).
- **Possibilità di modulare le caratteristiche delle particelle attraverso i parametri di processo:** La variazione delle portate, del rapporto tra le fasi e della concentrazione dei componenti, può essere utilizzata per ottenere particelle con caratteristiche dimensionali differenti senza modificare necessariamente la composizione chimica della formulazione; questo risulta particolarmente interessante nei sistemi destinati al drug delivery. La dimensione delle nanoparticelle può infatti influenzare proprietà quali il caricamento del principio attivo e il suo rilascio (Liu et al., 2022).
 - **Ridotto consumo di reagenti:** Le dimensioni micrometriche dei canali consentono di lavorare con volumi ridotti di reagenti. Questo è particolarmente vantaggioso durante lo sviluppo di nuove formulazioni, per l'ottimizzazione dei parametri e la valutazione di differenti condizioni sperimentali. È possibile limitare il consumo di:
 - polimeri;
 - principi attivi;
 - proteine;
 - altri componenti della formulazione.

La possibilità di operare in flusso continuo può inoltre favorire la standardizzazione delle condizioni sperimentali e rendere il processo potenzialmente più facilmente automatizzabile (Ma et al., 2017).

3.6.2 Limitazioni della microfluidica

- **Limitata produttività dei singoli dispositivi:** Le ridotte dimensioni dei microcanali, necessarie per ottenere un controllo efficace della miscelazione e della diffusione, limitano il volume di fluido che può essere processato attraverso una singola unità; un semplice aumento

della portata non rappresenta necessariamente una soluzione. La modifica delle condizioni fluidodinamiche può infatti influenzare:

- tempo di miscelazione;
 - tempo di residenza;
 - cinetica di formazione;
 - caratteristiche finali delle particelle (Mo et al., 2020).
-
- **Difficoltà di scale-up:** La limitata produttività dei singoli dispositivi rappresenta una delle principali difficoltà associate al trasferimento dalla scala di laboratorio a quella produttiva. Per aumentare la quantità di prodotto è possibile utilizzare più unità microfluidiche in parallelo attraverso un approccio denominato numbering-up. L'aumento del numero di canali richiede tuttavia di garantire una distribuzione uniforme dei flussi tra le diverse unità; una distribuzione non uniforme può infatti determinare condizioni di miscelazione differenti e, di conseguenza, particelle con caratteristiche non omogenee.
 - **Possibile clogging dei microcanali:** La presenza di particelle, aggregati o impurità all'interno delle correnti può favorire fenomeni di aggregazione e conseguente ostruzione dei canali (Ma et al., 2017). Georgieva ed altri collaboratori hanno studiato sperimentalmente il fenomeno del clogging in condizioni di flusso convergente. Gli autori hanno dimostrato che la presenza di piccole quantità di particelle di dimensioni micrometriche può favorire l'eterocoagulazione con particelle nanometriche e determinare l'ostruzione del microcanale. Il fenomeno dipende inoltre dalle condizioni di flusso e dalle interazioni tra le particelle. Il clogging può quindi compromettere la stabilità del processo e, nei casi più severi, interrompere il funzionamento del dispositivo (Georgieva et al., 2010).
 - **Maggiore complessità strumentale:** Rispetto alle metodologie convenzionali, l'impiego della microfluidica può richiedere una strumentazione più articolata. Il funzionamento del dispositivo richiede generalmente:
 - sistemi di alimentazione dei fluidi;
 - controllo delle portate;
 - pompe;
 - connessioni tra i diversi componenti.

Questa maggiore complessità consente di ottenere un controllo più preciso del processo, ma può rappresentare un limite durante le fasi iniziali di sviluppo della formulazione (Ma et al., 2017).

Nel complesso, la microfluidica presenta quindi un equilibrio tra elevato controllo del processo e maggiore complessità operativa; non deve essere considerata semplicemente come un'alternativa alle metodologie convenzionali, ma come una piattaforma in grado di offrire un controllo più preciso dei processi di formazione delle particelle, particolarmente vantaggioso quando la cinetica di miscelazione e di autoassemblaggio rappresenta un fattore determinante per le proprietà del sistema finale

4 Applicazioni farmaceutiche e biomediche dei complessi polielettrolitici

I complessi polielettrolitici hanno suscitato un interesse crescente in ambito farmaceutico e biomedico grazie alla possibilità di sfruttare le interazioni elettrostatiche tra polimeri di carica opposta per ottenere sistemi in grado di incorporare e veicolare diverse tipologie di molecole terapeutiche. La composizione e le proprietà dei polielettroliti impiegati possono essere modulate per ottenere complessi con differenti dimensioni, morfologie, cariche superficiali e caratteristiche di rilascio, permettendo di adattare il sistema alle specifiche esigenze applicative (Bonaccorso et al., 2026).

La formazione dei PEC avviene generalmente in ambiente acquoso e può essere effettuata senza l'utilizzo di solventi organici o di reticolanti chimici; questa caratteristica risulta particolarmente vantaggiosa per la preparazione di sistemi destinati alla somministrazione di molecole sensibili. (Wu et al., 2020). L'impiego di polielettroliti naturali, tra cui chitosano, alginato, acido ialuronico e pectina, offre inoltre la possibilità di sviluppare sistemi caratterizzati da biocompatibilità e biodegradabilità, ampliandone le potenzialità per applicazioni farmaceutiche e biomedicali (Cazorla-Luna et al., 2021).

Le proprietà dei PEC possono essere sfruttate per la veicolazione di differenti categorie di sostanze, comprendenti piccole molecole, proteine, peptidi, acidi nucleici e altre biomacromolecole. In base alla natura dei componenti e delle condizioni di formulazione, i complessi possono essere progettati per proteggere le molecole incorporate dalla degradazione, contribuendo a preservarne la stabilità, modificarne la distribuzione nell'organismo e ottenere un rilascio prolungato o sensibile a specifiche condizioni fisiologiche (Bonaccorso et al., 2025).

In questo capitolo verranno analizzate le principali applicazioni farmaceutiche e biomediche dei complessi polielettrolitici, con particolare attenzione al loro impiego come sistemi di veicolazione di principi attivi, alla somministrazione di acidi nucleici, alle applicazioni in oncologia, alle vie di somministrazione mucosali e gastrointestinali e all'impiego nella medicina rigenerativa e nell'ingegneria tissutale.

4.1 PEC come sistemi di veicolazione di principi attivi

L'impiego dei PEC come sistemi di drug delivery deriva dalla loro capacità di associare molecole terapeutiche attraverso interazioni elettrostatiche, legami a idrogeno, interazioni idrofobiche e altre interazioni non covalenti. Tali interazioni possono consentire l'incorporazione del principio attivo

all'interno della matrice polielettrolitica oppure la sua associazione con la superficie e con le catene dei polimeri, a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche del farmaco e dei componenti del PEC (Meka et al., 2017).

La capacità del sistema di proteggere il principio attivo rappresenta un ulteriore elemento di interesse; l'associazione con la matrice polimerica può infatti limitare l'esposizione della molecola a condizioni ambientali sfavorevoli e ridurre la degradazione, contribuendo a prolungarne la permanenza nel sistema biologico (Wu et al., 2020). Questo aspetto risulta particolarmente importante nel caso di proteine, peptidi e altre biomacromolecole, per le quali stabilità e conservazione dell'attività biologica rappresentano requisiti fondamentali per lo sviluppo di una formulazione terapeutica (Bonaccorso et al., 2025).

Il comportamento del principio attivo all'interno del PEC dipende tuttavia dalle caratteristiche della molecola e dalla natura delle interazioni che si instaurano con i polielettroliti. I farmaci ionizzati possono interagire direttamente con i gruppi carichi dei polimeri, mentre molecole non ioniche possono essere associate alla matrice attraverso legami a idrogeno, interazioni idrofobiche o mediante intrappolamento fisico all'interno della struttura del complesso (Mok & Park, 2009).

La struttura del PEC può inoltre essere modulata in modo da ottenere differenti profili di rilascio. La diffusione del principio attivo attraverso la matrice, il rigonfiamento del materiale, la dissociazione del complesso e la degradazione dei polimeri possono infatti contribuire alla velocità complessiva di liberazione della sostanza incorporata (Schatz et al., 2004). Di conseguenza, la composizione e l'organizzazione del complesso possono essere utilizzate per ridurre il rilascio immediato della dose e ottenere una liberazione più graduale nel tempo (Bonaccorso et al., 2025).

Il rilascio del farmaco può essere influenzato anche dalle condizioni dell'ambiente biologico. Poiché molti polielettroliti possiedono gruppi ionizzabili, variazioni del pH possono modificarne il grado di ionizzazione e, di conseguenza, l'intensità delle interazioni tra le catene polimeriche (Wu et al., 2020). Inoltre, la presenza di sali e di altre specie ioniche può schermare le interazioni elettrostatiche e modificare la stabilità del complesso, favorendo, in determinate condizioni, il rigonfiamento, la dissociazione o la riorganizzazione della matrice (Bonaccorso et al., 2025).

Queste caratteristiche rendono possibile lo sviluppo di PEC stimuli-responsive, nei quali il rilascio del principio attivo può essere modulato in risposta a variazioni di pH, temperatura o altre condizioni dell'ambiente biologico (Li et al., 2017). Tale proprietà può essere sfruttata, ad esempio, per progettare sistemi più stabili durante il transito attraverso determinati distretti dell'organismo e capaci

di modificare il proprio comportamento una volta raggiunto il sito d'azione (Cazorla-Luna et al., 2021).

Tra i polielettroliti naturali, il chitosano rappresenta uno dei materiali maggiormente studiati per la realizzazione di PEC destinati al drug delivery. La presenza di gruppi amminici protonabili conferisce al chitosano una carica positiva in condizioni acide e ne permette l'interazione con numerosi polianioni naturali, tra cui alginato, pectina, acido ialuronico, solfato di destrano e altri polisaccaridi (Wu et al., 2020). Le formulazioni a base di chitosano sono inoltre caratterizzate da proprietà mucoadesive e dalla capacità di interagire con le superfici biologiche, caratteristiche che possono favorire la permanenza del sistema nel sito di somministrazione (Cazorla-Luna et al., 2021).

I PEC a base di chitosano sono stati studiati per la veicolazione di numerose categorie di principi attivi, incluse piccole molecole e sostanze biologiche. La combinazione del chitosano con differenti polianioni consente infatti di modificare la struttura del complesso e le sue proprietà di rilascio, rendendo possibile la progettazione di sistemi con caratteristiche differenti in funzione della via di somministrazione e del tipo di attivo veicolato (Wu et al., 2020).

Un esempio concreto è rappresentato dai sistemi costituiti da chitosano e acido ialuronico per la veicolazione dell'eparina, una molecola biologicamente attiva studiata anche per possibili applicazioni nel trattamento dell'asma. In uno studio sono state sviluppate nanoparticelle a base di chitosano e acido ialuronico contenenti eparina non frazionata o eparina a basso peso molecolare. Le formulazioni hanno mostrato un'efficienza di associazione dell'eparina pari a circa il 70% nei sistemi selezionati e una stabilità di almeno 24 ore in soluzione tampone a pH 7,4. Inoltre, la velocità di rilascio è risultata dipendente dal tipo di eparina incorporata, dimostrando come le caratteristiche del principio attivo e la composizione del sistema possano influenzare il comportamento della formulazione (Oyarzun-Ampuero et al., 2009).

L'alginato costituisce un altro polianione naturale largamente utilizzato nei sistemi di veicolazione. La sua capacità di formare strutture reticolate in presenza di ioni bivalenti e di interagire con policationi consente di ottenere matrici e particelle nelle quali il principio attivo può essere incorporato e successivamente rilasciato in maniera modulabile (Thassu et al., 2007). In funzione della composizione del sistema, l'alginato può essere combinato con chitosano, poli-L-lisina o altri policationi per modificare la densità della rete polimerica e le caratteristiche di rilascio (Bonaccorso et al., 2025).

Un esempio specifico è rappresentato dai PEC a base di chitosano e alginato sviluppati da Chen et al. (2019) per la somministrazione orale dell'insulina. In questo caso, il complesso è stato ottenuto mediante autoassemblaggio di nanoparticelle rivestite con chitosano e alginato, sfruttando le interazioni elettrostatiche tra i due polielettroliti. Il sistema ha mostrato un rilascio dell'insulina dipendente dal pH e, negli studi condotti su ratti diabetici, ha permesso di prolungare il rilascio del principio attivo e di ridurre la glicemia dopo somministrazione orale (Chen et al., 2019).

La possibilità di modificare il rapporto tra i polielettroliti rappresenta quindi uno strumento importante per controllare le proprietà del sistema. Variazioni della composizione possono infatti influenzare la densità di interazioni elettrostatiche, la porosità della matrice, il rigonfiamento e la stabilità del complesso, con conseguenti modifiche della capacità di trattenere e rilasciare il principio attivo (Wu et al., 2020).

Un ulteriore vantaggio dei PEC consiste nella possibilità di progettare sistemi destinati alla co-veicolazione di più sostanze. La presenza di differenti componenti polimerici e di più domini di interazione può consentire l'associazione simultanea di molecole caratterizzate da proprietà chimico-fisiche differenti, aprendo la possibilità di combinare più agenti terapeutici all'interno dello stesso sistema (Bonaccorso et al., 2025).

Nel complesso, le caratteristiche dei PEC consentono quindi di intervenire su diverse fasi del processo di drug delivery, dall'associazione del principio attivo alla sua protezione e al successivo rilascio. La possibilità di modificare la composizione del complesso e di sfruttare la risposta a condizioni ambientali rende questi sistemi particolarmente versatili e adatti allo sviluppo di formulazioni destinate a differenti vie di somministrazione e categorie di farmaci (Cazorla-Luna et al., 2021).

4.2 PEC per la veicolazione degli acidi nucleici

Gli acidi nucleici rappresentano una particolare categoria di molecole terapeutiche per le quali la somministrazione sistemica e il raggiungimento delle cellule bersaglio risultano particolarmente complessi. DNA e RNA sono infatti macromolecole fortemente cariche negativamente e, se somministrati in forma libera, possono essere rapidamente degradati da nucleasi, eliminati dall'organismo e presentano una limitata capacità di attraversare autonomamente le membrane cellulari. Per questo motivo, il loro impiego terapeutico richiede generalmente l'associazione con sistemi di veicolazione in grado di proteggerli e favorirne l'ingresso nelle cellule (Ita, 2020).

Tra le diverse strategie studiate, la complessazione con polimeri cationici ha portato alla formazione dei cosiddetti polyplexes, che possono essere considerati complessi interpolielettrolitici ottenuti spontaneamente dall'interazione elettrostatica tra gli acidi nucleici e specie policationiche (Hess et al., 2017). La presenza di numerose cariche positive lungo le catene del polimero permette infatti di interagire con i gruppi fosfato negativi presenti nello scheletro degli acidi nucleici, determinandone la condensazione in strutture di dimensioni nanometriche (Kim et al., 2021).

La formazione del complesso comporta una forte compattazione dell'acido nucleico e può contribuire a proteggerlo dalla degradazione enzimatica. La condensazione, inoltre, riduce la densità di carica negativa del materiale genetico e può favorirne l'interazione con le membrane cellulari, facilitandone l'internalizzazione (Hess et al., 2017). Queste caratteristiche hanno reso i polyplexes particolarmente interessanti come sistemi di gene delivery non virale, in alternativa ai vettori virali (Gupta et al., 2024).

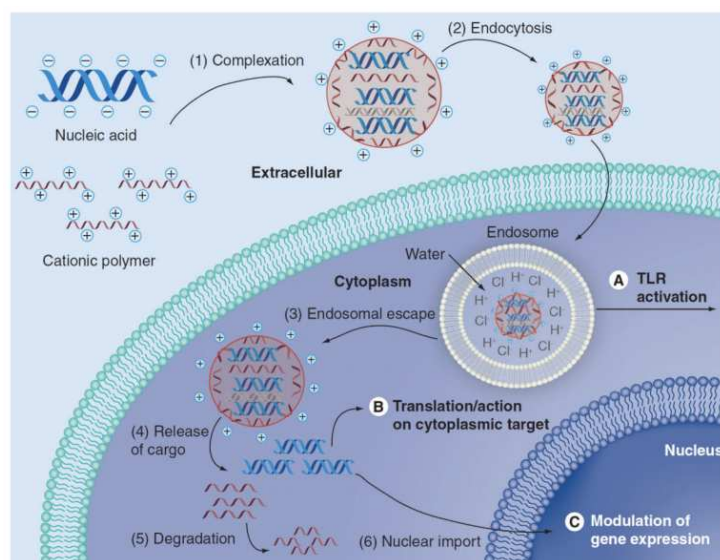


Figura 8: Rappresentazione schematica delle principali fasi della veicolazione intracellulare degli acidi nucleici mediante polimeri cationici: complessazione, endocitosi, fuga endosomiale, rilascio del carico e destino intracellulare dell'acido nucleico. (Sunshine et al. 2011).

Tra i polimeri utilizzati per questo scopo rientrano poli-L-lisina, polietilenimmina (PEI), polimeri a base di poliamidoammine e numerosi copolimeri cationici progettati per ottenere un compromesso tra capacità di complessazione, stabilità e biocompatibilità (Ita, 2020). Le caratteristiche del polimero influenzano infatti il rapporto di carica necessario per la formazione del complesso, la dimensione delle particelle, la morfologia, la stabilità in ambiente biologico e la capacità di rilasciare l'acido nucleico all'interno della cellula (Porello et al., 2024).

Come già visto in precedenza, il chitosano, grazie alla presenza di gruppi amminici protonabili, può interagire elettrostaticamente con DNA e RNA formando complessi polielettrolitici; la sua origine naturale, la biodegradabilità e la relativa biocompatibilità hanno portato a un ampio interesse verso il suo impiego come vettore per acidi nucleici (Karayianni et al., 2023). Nel caso dei complessi chitosano–DNA, è stato dimostrato che il processo di compattazione dell'acido nucleico dipende dal rapporto di carica tra chitosano e DNA e dalle caratteristiche strutturali del polimero cationico (Bravo-Anaya et al., 2019). In particolare, il grado di acetilazione e il peso molecolare del chitosano influenzano la quantità di gruppi amminici disponibili per l'interazione con il DNA e, di conseguenza, la stechiometria, la dimensione e la stabilità dei complessi ottenuti (Borchard et al., 2001). Anche il pH e la concentrazione dei sali presenti nel mezzo possono modificare il comportamento del sistema, poiché influenzano il grado di protonazione del chitosano e la schermatura delle interazioni elettrostatiche (Bravo-Anaya et al., 2019).

La natura delle interazioni tra acido nucleico e policatione può inoltre determinare morfologie differenti; si possono infatti trovare sistemi sotto forma di particelle compatte, micelle e altre strutture organizzate, la cui formazione dipende dalla composizione del polimero, dal rapporto tra le cariche e dalle condizioni del mezzo. L'utilizzo di copolimeri a blocchi cationici ha ampliato ulteriormente le possibilità di progettazione, permettendo di combinare regioni responsabili della complessazione dell'acido nucleico con domini in grado di contribuire alla stabilità colloidale o all'interazione con le cellule (Kim et al., 2021).

Uno dei principali vantaggi dei polyplexes è quindi la capacità di **proteggere il materiale genetico** durante la fase extracellulare; la condensazione dell'acido nucleico all'interno del complesso può infatti ridurre l'esposizione alle nucleasi e limitarne la degradazione, aumentando la possibilità che una quantità sufficiente di materiale genetico raggiunga le cellule bersaglio. Tuttavia, la protezione dell'acido nucleico non è sufficiente per garantire un'efficace attività biologica, poiché il sistema deve successivamente superare una serie di barriere intracellulari (Raik et al., 2018). Dopo l'internalizzazione, infatti, una parte significativa dei polyplexes viene trasferita all'interno di compartimenti endosomiali. L'acido nucleico deve quindi essere rilasciato dal complesso e raggiungere il compartimento cellulare nel quale svolgerà la propria funzione, rendendo l'endosomal escape uno dei principali ostacoli alla gene delivery basata su polimeri (Mehta et al., 2024).

Una delle principali difficoltà nella veicolazione intracellulare degli acidi nucleici è rappresentata dalla fuoriuscita dei polyplexes dagli endosomi, all'interno dei quali vengono inglobati dopo l'ingresso nella cellula. Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare questo processo, tra cui

il cosiddetto effetto “proton sponge”, particolarmente studiato per alcuni polimeri cationici contenenti gruppi amminici protonabili (Richard et al., 2013). Questi gruppi possono legare protoni durante l’acidificazione dell’ambiente endosomiale, contribuendo alla capacità tampone del polimero. Tale fenomeno può favorire alterazioni dell’ambiente interno dell’endosoma e, insieme ad altri processi, contribuire alla destabilizzazione della membrana e alla conseguente liberazione dell’acido nucleico nel citoplasma (Bravo-Anaya et al., 2019).

Per migliorare questo comportamento, sono stati sviluppati polimeri cationici pH-responsive, nei quali la protonazione e la carica del polimero cambiano in funzione del pH. Questi sistemi possono essere progettati per mantenere una buona capacità di complessazione in ambiente extracellulare e, successivamente, modificare le proprie proprietà all'interno degli endosomi, favorendo la liberazione dell'acido nucleico e l'endosomal escape (Wei et al., 2017).

Un esempio è rappresentato dal lavoro di Cheng et al. (2017), che hanno sviluppato un polimero cationico pH-responsive per la veicolazione di acidi nucleici. Il sistema è stato progettato per mantenere una maggiore stabilità dei polyplexes in condizioni fisiologiche e favorire il rilascio del DNA in ambiente endosomiale. In particolare, l'acidificazione dell'endosoma determina la scissione di legami sensibili al pH presenti nel polimero, favorendo il passaggio a una struttura più idrofila e la successiva liberazione del materiale genetico. Rispetto a un polimero di controllo non sensibile al pH, il sistema ha mostrato una maggiore efficienza di trasferimento di un plasmide codificante per la luciferasi, sia in vitro sia in un modello in vivo (Cheng et al., 2017).

Un'altra caratteristica importante è la necessità di ottenere un equilibrio tra stabilità del complesso e capacità di dissociazione. Un polyplex eccessivamente stabile può proteggere efficacemente l'acido nucleico durante il trasporto extracellulare, ma può renderne difficile il rilascio una volta raggiunta la cellula. Al contrario, una dissociazione troppo rapida può determinare una perdita prematura della protezione e una ridotta efficienza di delivery (Kim et al., 2021).

L’interesse per l’utilizzo dei PEC con acidi nucleici si è esteso anche a sistemi diversi da quelli basati esclusivamente sul chitosano. Un esempio è rappresentato dalle nanoassemblies a base di chitosano e destrano solfato, ottenute attraverso la complessazione polielettrolitica in ambiente acquoso e in condizioni di basso shear; questo approccio permette di combinare un policatione e un polianione biocompatibili per la formazione di nanostrutture destinate alla veicolazione degli acidi nucleici (Leclercq et al., 2024).

La ricerca più recente si è inoltre orientata verso polimeri cationici sempre più complessi, nei quali vengono introdotte unità non cationiche con funzioni specifiche e queste modifiche possono essere utilizzate per migliorare la stabilità nei fluidi biologici, la selettività cellulare, l'uptake, l'endosomal escape e la biodegradabilità, mantenendo al tempo stesso una sufficiente capacità di interazione con gli acidi nucleici (Porello et al., 2024).

Un esempio è rappresentato dall'introduzione di catene di poli(etilenglicole) (PEG) nella polietilenimina (PEI), un polimero cationico ampiamente utilizzato per la veicolazione degli acidi nucleici. La PEGilazione può ridurre l'adsorbimento delle proteine plasmatiche sulla superficie dei polyplexes e prolungarne il tempo di circolazione nel sangue. Tuttavia, questa modifica può anche ridurre le interazioni con le cellule e, di conseguenza, l'efficienza di trasfezione, evidenziando la necessità di bilanciare la stabilità extracellulare con la capacità di ingresso cellulare. Un'altra strategia consiste nell'introdurre unità zwitterioniche, come quelle derivate dalla carbossibetaina o dalla fosforilcolina, che possono limitare le interazioni aspecifiche con le proteine e migliorare la biocompatibilità dei vettori. Sono state inoltre studiate catene di poli(2-ossazolina) associate alla PEI, con l'obiettivo di ridurre la citotossicità mantenendo una buona capacità di legare e condensare il DNA. Questi esempi mostrano come l'introduzione di unità non cationiche permetta di modificare in modo mirato le proprietà dei polimeri destinati alla gene delivery, pur richiedendo un attento bilanciamento tra stabilità, interazione cellulare ed efficienza di trasfezione (Porello et al., 2024).

I polyplexes possono essere utilizzati per il trasporto di differenti tipologie di acidi nucleici, come anche DNA plasmidico, mRNA, siRNA e altre molecole di RNA. Le caratteristiche del carico influenzano però la progettazione del vettore, poiché dimensione, struttura, rigidità e funzione biologica dell'acido nucleico possono modificare le modalità di condensazione e il comportamento intracellulare del complesso (Ita, 2020). Nel caso del siRNA, ad esempio, la formazione di un complesso con un polimero cationico permette di proteggere la molecola dalla degradazione e di favorirne l'ingresso nelle cellule, rendendo possibile il silenziamento di specifici geni. Per l'mRNA, invece, la protezione del carico deve essere accompagnata da un rilascio sufficientemente rapido all'interno del citoplasma, dove la molecola deve rimanere disponibile per la traduzione proteica (Porello et al., 2024).

Nonostante i progressi compiuti, la traduzione dei polyplexes in applicazioni cliniche rimane limitata da problemi quali la tossicità di alcuni policationi, la stabilità in ambiente fisiologico, la difficoltà di controllare in maniera precisa il rilascio del carico e la necessità di ottenere un'efficiente internalizzazione cellulare associata a un adeguato endosomal escape (Gupta et al., 2024). La ricerca

attuale è pertanto orientata allo sviluppo di materiali più sicuri, biodegradabili e funzionalizzabili, capaci di mantenere un'elevata efficienza di delivery riducendo gli effetti indesiderati (Porello et al., 2024).

Un ulteriore aspetto importante riguarda il trasferimento dei polyplexes dalla ricerca preclinica alla sperimentazione clinica. Un esempio è rappresentato da CALAA-01, un sistema sperimentale costituito da un polimero cationico a base di ciclodestrina complessato con un siRNA diretto contro la subunità M2 della ribonucleotide reduttasi (RRM2). La formulazione comprendeva inoltre polietilenglicole (PEG), utilizzato per migliorarne la stabilità, e transferrina, introdotta come ligando per favorire il riconoscimento delle cellule tumorali. CALAA-01 è stato valutato in uno studio clinico di fase I su 24 pazienti con tumori solidi refrattari alle terapie convenzionali. Lo studio ha fornito evidenze della distribuzione del sistema nel tessuto tumorale e dell'attività del siRNA, ma è stato successivamente interrotto a causa di tossicità dose-limitanti. Il sistema non è quindi diventato un prodotto terapeutico commercializzato, ma rappresenta un esempio significativo delle potenzialità e delle difficoltà della traslazione clinica dei polyplexes (Zuckerman et al., 2014).

Un secondo esempio è CYL-02, un sistema di terapia genica non virale costituito da un plasmide di DNA complessato con polietilenimina lineare (PEI), studiato nel trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico. Il plasmide codificava geni destinati a contrastare la progressione tumorale e a sensibilizzare le cellule al trattamento con gemcitabina. Nello studio clinico di fase I, condotto su 22 pazienti, il trattamento è risultato complessivamente ben tollerato e sono state rilevate evidenze dell'espressione dei geni terapeutici nei tessuti tumorali; tuttavia, non sono state osservate risposte tumorali obiettive, sebbene in nove pazienti sia stata riscontrata una stabilizzazione della malattia fino a sei mesi. Un successivo studio di fase II, che confrontava CYL-02 associato a gemcitabina con la sola chemioterapia, risulta registrato come completato nel giugno 2022. Questi risultati mostrano come i sistemi di complessazione tra polimeri cationici e acidi nucleici siano arrivati alla sperimentazione clinica, pur richiedendo ulteriori evidenze per dimostrarne il beneficio terapeutico e consentirne un eventuale impiego clinico (Buscail et al., 2015).

Nel complesso, possiamo dire che i PEC basati su acidi nucleici rappresentano una delle principali applicazioni delle interazioni polielettrolitiche nel campo della nanomedicina. La possibilità di condensare, proteggere e trasportare DNA e RNA attraverso complessi formati spontaneamente rende questi sistemi interessanti per la gene therapy e per altre strategie terapeutiche basate sugli acidi nucleici, anche se il superamento delle barriere intracellulari e il miglioramento della sicurezza dei policationi rimangono aspetti fondamentali per la loro futura applicazione.

4.3 Applicazioni in oncologia

L'impiego dei PEC in ambito oncologico è stato ampiamente studiato come strategia per migliorare la veicolazione degli agenti antitumorali e, allo stesso tempo, limitarne gli effetti indesiderati sui tessuti sani. La possibilità di ottenere sistemi nanometrici attraverso interazioni elettrostatiche tra polielettroliti di carica opposta, spesso in condizioni acquose e senza l'impiego di solventi organici o agenti reticolanti covalenti, rende i PEC particolarmente interessanti per la formulazione di farmaci sensibili alle condizioni di preparazione (Prajapati et al., 2024). Le proprietà chimico-fisiche del complesso possono inoltre essere modulate attraverso la scelta dei polielettroliti e il controllo di parametri quali rapporto di carica, pH e composizione del mezzo, influenzando dimensioni, stabilità e modalità di rilascio del principio attivo (Wu et al., 2020).

Uno degli aspetti di maggiore interesse riguarda la possibilità di ottenere un rilascio più controllato del farmaco e di sfruttare le caratteristiche del microambiente tumorale. In particolare, la presenza di un ambiente extracellulare leggermente più acido rispetto ai tessuti sani è stata utilizzata per progettare PEC in grado di modificare le proprie proprietà in funzione del pH. Zhao ed altri collaboratori, ad esempio, hanno sviluppato nanoparticelle polielettrolitiche costituite da chitosano galattosilato e ialuronato, caratterizzate da una superficie con carica reversibile in funzione del pH. Il sistema, utilizzato per la veicolazione della doxorubicina, ha mostrato un rilascio controllato del farmaco in risposta alle variazioni di pH e una capacità di targeting verso cellule di epatocarcinoma, evidenziando come la modulazione delle interazioni elettrostatiche possa essere sfruttata per progettare sistemi sensibili all'ambiente tumorale (Zhao et al., 2015).

Un ulteriore approccio consiste nell'introdurre nel sistema componenti in grado di favorire il riconoscimento selettivo delle cellule tumorali. In questo contesto, l'acido ialuronico risulta particolarmente interessante per la sua capacità di interagire con il recettore CD44, frequentemente espresso sulla superficie di numerose cellule tumorali. Sono state quindi sviluppate nanoparticelle ottenute mediante complessazione polielettrolitica tra acido ialuronico e chitosano, utilizzate per veicolare farmaci antitumorali e combinare le proprietà dei due polisaccaridi con una possibile strategia di targeting mediata da CD44 (Goodarzi et al., 2014). In uno studio condotto su nanoparticelle costituite da chitosano modificato idrofobicamente e rivestito con acido ialuronico, la doxorubicina è stata incorporata nel complesso con un'efficienza di incapsulamento pari a circa il 56%, mentre il sistema ha mostrato un rilascio prolungato del farmaco in condizioni fisiologiche (Chen et al., 2019).

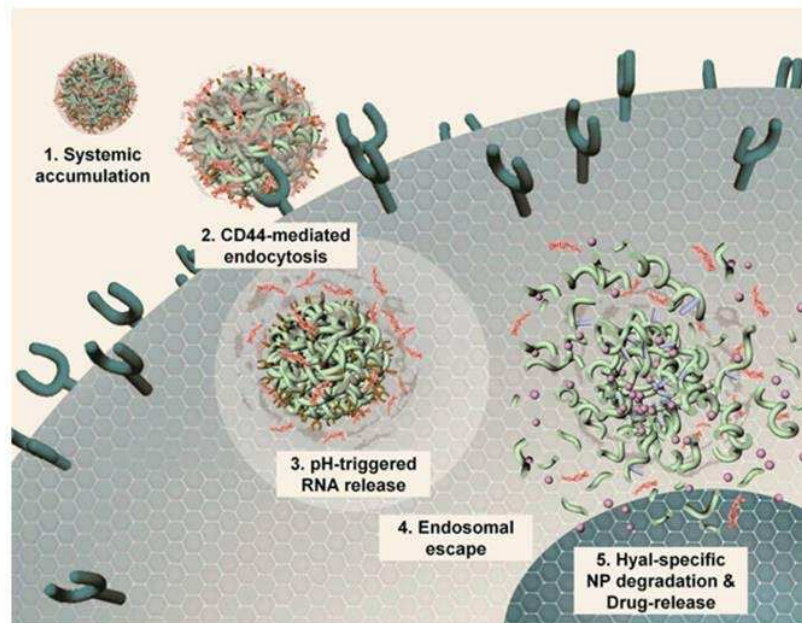


Figura 9: Rappresentazione schematica del riconoscimento dell'acido ialuronico da parte del recettore CD44 e dei possibili meccanismi di internalizzazione dei nanocarrier. (Rios de la Rosa et al. 2019).

I PEC possono inoltre essere utilizzati per la co-veicolazione di più agenti terapeutici, aspetto particolarmente interessante nel trattamento dei tumori caratterizzati da fenomeni di resistenza ai farmaci. Sono stati sviluppati PEC a base di chitosano contenenti contemporaneamente doxorubicina e acido zoledronico, con l'obiettivo di contrastare la resistenza alla doxorubicina. I sistemi ottenuti hanno mostrato, in vitro, un effetto antiproliferativo sinergico dei due principi attivi e, nelle linee cellulari resistenti alla doxorubicina, la formulazione combinata è risultata in grado di ripristinare la sensibilità al farmaco. Questo esempio evidenzia come i PEC possano essere utilizzati non soltanto per migliorare la somministrazione di un singolo principio attivo, ma anche come piattaforme per strategie di combinazione terapeutica (Giarra et al., 2018).

Più recentemente, è stato studiato anche l'impiego dei PEC per la somministrazione locale di farmaci antitumorali. Nel 2024 sono state sviluppate nanoparticelle polielettrolitiche costituite da chitosano e acido ialuronico come sistema bioadesivo per la somministrazione topica di paclitaxel e 5-fluorouracile, due farmaci caratterizzati da proprietà chimico-fisiche differenti. Il complesso ha permesso l'incorporazione di entrambi i farmaci, mantenendone l'attività citotossica; nel caso del paclitaxel, la formulazione ha inoltre determinato un aumento della penetrazione cutanea, suggerendo una possibile applicazione nel trattamento locale dei tumori cutanei (Hirokawa et al., 2024).

Nel complesso, i risultati disponibili mostrano che i PEC possono essere progettati per rispondere a diverse esigenze della terapia oncologica, tra cui il miglioramento della solubilità e della stabilità dei

farmaci, il controllo della loro liberazione, il targeting di specifiche popolazioni cellulari e la co-veicolazione di più principi attivi (Prajapati et al., 2024). Tuttavia, gran parte delle evidenze disponibili deriva ancora da studi in vitro o da modelli animali e la possibilità di trasferire questi sistemi alla pratica clinica dipende dalla loro stabilità in condizioni fisiologiche, dalla riproducibilità delle caratteristiche delle particelle, dal comportamento dopo somministrazione sistemica e dalla sicurezza a lungo termine. Inoltre, la risposta dei sistemi nanostrutturati all'ambiente biologico può essere influenzata dall'interazione con proteine plasmatiche e dalle caratteristiche del microambiente tumorale, rendendo necessario un controllo accurato del comportamento del sistema anche dopo la somministrazione (Wu et al., 2020).

4.4 Applicazioni mucosali e gastrointestinali

Le vie di somministrazione mucosale e, in particolare, quella orale rappresentano un ambito di grande interesse per l'impiego dei PEC come sistemi di veicolazione. Sebbene la somministrazione orale sia semplice, non invasiva e generalmente ben accettata dal paziente, il tratto gastrointestinale presenta numerose barriere che possono compromettere la stabilità e l'assorbimento dei principi attivi. Tra queste rientrano:

- Variazioni di pH
- Presenza di enzimi digestivi
- Degradazione del contenuto della formulazione
- Caratteristiche della barriera mucosale (Hamman, 2010).

In questo contesto, i PEC a base di chitosano risultano particolarmente interessanti grazie alla presenza di gruppi amminici protonabili che possono interagire elettrostaticamente con gruppi anionici di altri polielettroliti, formando strutture più resistenti alle condizioni ambientali rispetto al chitosano non complessato. La formazione del complesso può quindi ridurre la rapida dissoluzione del chitosano in ambiente gastrico e permettere una modulazione della velocità di rilascio del farmaco. Inoltre, il carattere mucoadesivo del chitosano può favorire l'interazione delle particelle con lo strato di muco e aumentarne il tempo di permanenza a livello della superficie intestinale (Wu et al., 2020).

Tra i sistemi più studiati rientrano i PEC chitosano–alginato. L'interazione tra i gruppi amminici carichi positivamente del chitosano e i gruppi carbossilici negativi dell'alginato porta alla formazione di strutture in grado di modificare il proprio comportamento in funzione del pH (Kumar & Mishra, 2008). In condizioni acide, la contrazione e la gelificazione del sistema possono contribuire a

proteggere il principio attivo dall'ambiente gastrico, mentre il successivo cambiamento delle condizioni del tratto gastrointestinale può favorire il rigonfiamento della struttura e la liberazione del farmaco. Questa caratteristica ha reso le nanoparticelle chitosano–alginate particolarmente interessanti per la somministrazione orale e per il rilascio a livello intestinale (Li et al., 2022).

Un'applicazione particolarmente studiata dei PEC in ambito gastrointestinale riguarda la somministrazione orale di proteine e peptidi, come l'insulina, che risulta fortemente svantaggiata dalla degradazione enzimatica e dalle condizioni acide dello stomaco. Le nanoparticelle a base di polimeri naturali possono contribuire a proteggere queste molecole durante il transito gastrointestinale e a favorirne il successivo rilascio a livello intestinale. A questo proposito, Lopes et al. (2016) hanno sviluppato nanoparticelle contenenti insulina, costituite da un nucleo di alginato e destrano solfato e rivestite con chitosano e albumina. La formulazione è stata progettata per rispondere alle variazioni di pH che si verificano lungo il tratto gastrointestinale: nelle condizioni gastriche simulate, ha limitato il rilascio dell'insulina, impedendone la liberazione di circa il 70%, mentre nelle condizioni intestinali simulate ha consentito un rilascio più prolungato. Inoltre, il rivestimento con chitosano e albumina ha migliorato l'interazione delle nanoparticelle con modelli cellulari dell'epitelio intestinale, aumentando la permeabilità dell'insulina rispetto alle particelle non rivestite. Questi risultati evidenziano come la combinazione di protezione dal rilascio prematuro, sensibilità al pH e interazione con la mucosa intestinale possa favorire la somministrazione orale di proteine, sebbene i dati ottenuti in modelli in vitro non siano sufficienti a dimostrarne l'efficacia clinica nell'uomo (Lopes et al., 2016).

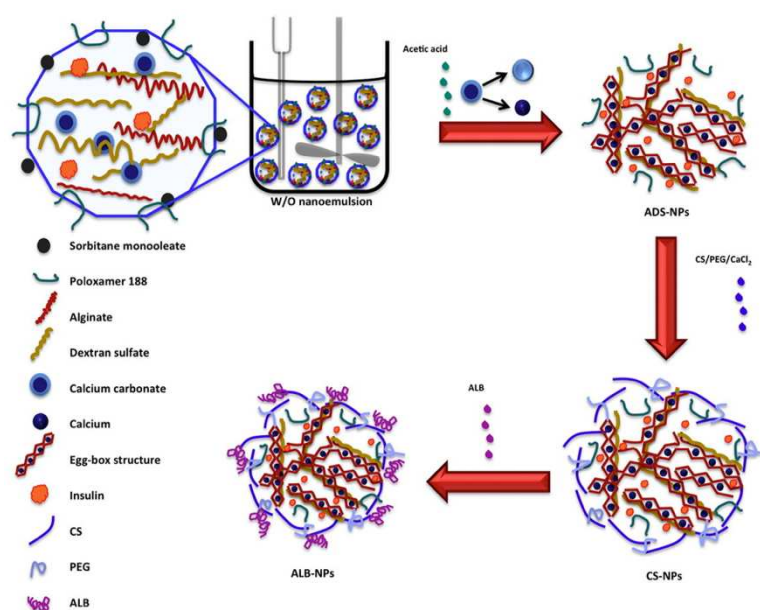


Figura 10: Schema di una strategia di preparazione di nanoparticelle polimeriche per la veicolazione dell'insulina. (Mansoor et al. 2019).

I PEC sono stati studiati anche per il trattamento localizzato di patologie intestinali; le formulazioni a base di chitosano e alginato possono infatti essere progettate per mantenere il principio attivo protetto durante il passaggio gastrico e favorirne la liberazione nelle regioni più distali del tratto gastrointestinale. Questo approccio è stato considerato soprattutto per il trattamento di patologie del colon, tra cui la colite ulcerosa e il carcinoma coloretale, nelle quali un rilascio locale può consentire di aumentare la concentrazione del farmaco nel sito interessato e, allo stesso tempo, limitare l'esposizione sistemica (Kumar and Mishra, 2008).

La capacità dei PEC di interagire con la mucosa può essere sfruttata anche attraverso la modulazione della loro composizione superficiale. In generale, la mucoadesione può aumentare il tempo di permanenza delle particelle sulla superficie epiteliale e favorire un contatto più prolungato con il tessuto bersaglio. Questa proprietà è particolarmente importante quando si utilizzano sistemi destinati al rilascio locale, nei quali una maggiore permanenza a livello della mucosa può favorire il trasferimento del principio attivo e contribuire a ridurre la frequenza di somministrazione (Wu et al., 2020).

Oltre alla via orale, le proprietà mucoadesive dei PEC a base di chitosano hanno portato a considerarne l'impiego anche attraverso altre vie mucosali. Sono stati studiati, ad esempio, sistemi destinati alla somministrazione nasale di farmaci e acidi nucleici, nei quali la capacità del chitosano di interagire con le componenti anioniche del muco può contribuire a prolungare la permanenza del sistema sulla superficie mucosale. In questi casi, tuttavia, è necessario bilanciare la mucoadesione con la capacità delle particelle di attraversare lo strato di muco (mucopenetrazione) e raggiungere l'epitelio (Bhunchu et al., 2014).

Nel complesso, gli studi presenti in letteratura mostrano che i complessi polielettrolitici possono essere progettati per proteggere il principio attivo durante il transito gastrointestinale, modulare il rilascio in funzione del pH e favorire l'interazione con l'epitelio intestinale. Oltre ai sistemi per la somministrazione orale dell'insulina descritti in precedenza, Iannuccelli et al. (2011) hanno sviluppato microparticelle a base di alginato e chitosano contenenti gentamicina, valutandone l'interazione con l'epitelio intestinale. Gli esperimenti condotti su modelli cellulari Caco-2 e su tessuti intestinali animali ex vivo hanno evidenziato l'internalizzazione delle particelle da parte degli enterociti e delle cellule M delle placche di Peyer, coinvolte nel trasporto di materiale attraverso la mucosa intestinale. Tuttavia, il passaggio verso le regioni subepiteliali è risultato associato soprattutto

alle cellule M, senza dimostrare un'efficacia terapeutica nell'uomo. Un ulteriore esempio è rappresentato dallo studio di Čalijs et al. (2013), che hanno sviluppato microparticelle per la somministrazione orale di naprossene, basate su alginato e oligochitosano e rinforzate mediante la formazione di un complesso polielettrolitico tra oligochitosano ed Eudragit L100-55. L'introduzione di questo complesso ha migliorato la protezione del farmaco in ambiente acido e ha permesso di modulare il rilascio nelle condizioni intestinali simulate, evidenziando il potenziale di queste formulazioni per la somministrazione orale a rilascio controllato.

Per quanto riguarda la traslazione clinica, un esempio da considerare con cautela è lo studio di Badwan et al. (2009), nel quale cinque formulazioni sperimentali di insulina per uso orale, caratterizzate da diverse dimensioni delle particelle, sono state valutate in 25 volontari sani. La formulazione con particelle di 57 nm ha mostrato il profilo più promettente tra quelli analizzati per la somministrazione orale; tuttavia, la frazione della dose assorbita stimata era pari al 3%, rispetto al 19% della formulazione somministrata per via sottocutanea. Si tratta quindi di un esempio di sperimentazione nell'uomo, ma non della dimostrazione di un sistema PEC clinicamente validato o di un prodotto commercializzato. Nel complesso, le applicazioni dei PEC in ambito mucosale e gastrointestinale rimangono caratterizzate soprattutto da risultati preclinici. Le principali criticità riguardano la variabilità dell'assorbimento, la stabilità nelle condizioni fisiologiche e la difficoltà di trasferire i risultati ottenuti in vitro e negli animali alla pratica clinica. Questi aspetti evidenziano la necessità di ulteriori studi sulla sicurezza, sulla riproducibilità delle formulazioni e sulla loro efficacia nell'uomo (Hamman, 2010; Li et al., 2022).

4.5 Medicina rigenerativa e tissue engineering

I PEC hanno trovato applicazione anche nell'ambito della medicina rigenerativa e del tissue engineering, dove possono essere utilizzati per la realizzazione di biomateriali destinati a sostenere la crescita cellulare e la ricostruzione dei tessuti danneggiati. In questo contesto, i PEC presentano un interesse particolare perché le interazioni elettrostatiche tra polielettroliti di carica opposta consentono di ottenere strutture con proprietà chimiche, morfologiche e meccaniche modulabili, senza richiedere necessariamente la formazione di legami covalenti tra le catene polimeriche (Ciarlantini et al., 2024).

Una delle principali applicazioni riguarda la produzione di scaffold tridimensionali, che devono fornire alle cellule un ambiente favorevole all'adesione, alla proliferazione e alla differenziazione, riproducendo almeno in parte le caratteristiche della matrice extracellulare naturale. In questo tipo di applicazione, proprietà quali porosità, dimensione dei pori, idrofilia, rigidità e velocità di

degradazione rivestono un ruolo fondamentale, poiché influenzano direttamente il comportamento delle cellule e il processo di rigenerazione del tessuto (Muzzarelli et al., 2012).

I sistemi a base di chitosano e alginato rappresentano un esempio particolarmente interessante di questo approccio. La formazione del PEC tra il chitosano, policationico, e l'alginato, polianionico, permette di modificare le proprietà strutturali del materiale rispetto ai singoli polimeri e di ottenere matrici porose con caratteristiche meccaniche modulabili. Suneetha ed altri collaboratori, nel 2020, hanno sviluppato idrogel contenenti PEC chitosano–alginato inseriti in una rete di poli(acrilammide), ottenendo strutture macroporose con una morfologia fibrosa. La presenza del PEC ha influenzato in maniera significativa porosità, dimensione dei pori e proprietà meccaniche del materiale, che ha inoltre mostrato buona biocompatibilità, adesione e proliferazione di cellule osteoblastiche, evidenziando il potenziale del sistema per applicazioni nell'ingegneria del tessuto osseo (Suneetha et al., 2020).

Un approccio più recente ha sviluppato scaffold bioattivi e biomimetici costituiti da PEC chitosano–alginato mediante liofilizzazione, seguita da reticolazione con CaCl_2 . Variando il rapporto molare tra i due polielettroliti è stato possibile modulare la struttura e le proprietà meccaniche degli scaffold. Il sistema selezionato ha presentato una buona morfologia porosa, mentre la successiva funzionalizzazione con gruppi e molecole in grado di mimare alcuni componenti della matrice extracellulare ha modificato ulteriormente idrofilia, porosità e proprietà biologiche del materiale. In particolare, gli scaffold funzionalizzati hanno favorito la penetrazione e la proliferazione dei fibroblasti, mostrando come la combinazione tra complessazione polielettrolitica e funzionalizzazione della superficie possa essere utilizzata per ottenere matrici più biomimetiche (Ciarlantini et al., 2024).

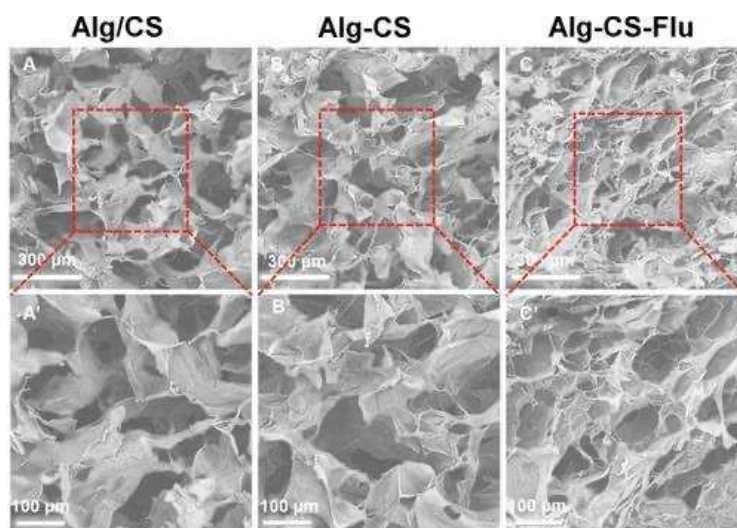


Figura 11. *Micrografie SEM di scaffold porosi a base di complessi polielettrolitici chitosano–alginato ottenuti con differenti rapporti tra i polimeri. Ciarlantini et al. 2024).*

I PEC a base di chitosano sono stati studiati anche nella rigenerazione della cartilagine, grazie alla combinazione delle proprietà del chitosano con quelle di polielettroliti biologicamente rilevanti, quali acido ialuronico e condroitin solfato. Questi ultimi sono componenti della matrice extracellulare cartilaginea e possono contribuire a rendere il materiale più simile all'ambiente naturale delle cellule. Il chitosano può formare facilmente PEC con acido ialuronico e condroitin solfato e queste combinazioni possono essere utilizzate per la realizzazione di scaffold destinati alla rigenerazione cartilaginea (Henson et al., 2012). Il chitosano può inoltre fornire un ambiente favorevole alla proliferazione dei condrociti e alla produzione della matrice extracellulare e può essere impiegato come supporto per la veicolazione di fattori di crescita (Kim et al., 2003).

Un ulteriore vantaggio dei PEC nel tissue engineering è rappresentato dalla possibilità di associare alla funzione strutturale anche una funzione di rilascio di molecole bioattive. La matrice polielettrolitica può infatti interagire con proteine, fattori di crescita o altre molecole e consentirne una liberazione progressiva durante il processo rigenerativo; in questo modo, il materiale può svolgere contemporaneamente il ruolo di supporto fisico per le cellule e di sistema di rilascio locale, permettendo di concentrare il segnale biologico nella sede interessata e ridurre la necessità di somministrazioni ripetute (Muzzarelli et al., 2012).

Nel complesso, l'impiego dei PEC nella medicina rigenerativa si basa quindi sulla possibilità di combinare:

- Biocompatibilità
- Struttura porosa
- Proprietà meccaniche modulabili
- Interazioni con le cellule e con la matrice extracellulare.

Il principale interesse consiste nella possibilità di progettare materiali nei quali la composizione e il rapporto tra i polielettroliti determinino caratteristiche specifiche per il tessuto da rigenerare. Rimangono tuttavia alcune criticità, soprattutto per quanto riguarda il controllo delle proprietà meccaniche e della degradazione, la stabilità degli scaffold in condizioni fisiologiche e la necessità di ottenere caratteristiche sufficientemente riproducibili per il successivo trasferimento verso applicazioni precliniche e cliniche (Suneetha et al., 2020; Ciarlantini et al., 2024).

4.6 Altre applicazioni biomediche

Oltre alle applicazioni oncologiche, gastrointestinali e di medicina rigenerativa, i PEC sono stati studiati in numerosi altri ambiti biomedici, sfruttando soprattutto la loro capacità di combinare proprietà dei diversi polimeri e di ottenere sistemi con caratteristiche modulabili. Tra le applicazioni di maggiore interesse rientrano il trattamento delle ferite, la somministrazione oculare di farmaci, il controllo delle infezioni e la veicolazione di antigeni per la vaccinazione (Mndlovu et al., 2020; Solomevich et al., 2021).

Un settore particolarmente interessante è quello del wound healing, nel quale i PEC possono essere impiegati per la realizzazione di film, membrane, idrogel e particelle destinate a proteggere la ferita e a favorirne la guarigione. I sistemi a base di chitosano associato a polimeri anionici possono presentare proprietà di bioadesione, capacità di assorbimento dei fluidi e attività antimicrobica, oltre a permettere l'incorporazione e il rilascio controllato di molecole bioattive. La complessazione tra i polielettroliti consente inoltre di modulare caratteristiche quali porosità, rigonfiamento, resistenza meccanica e degradazione, influenzando così il comportamento del materiale durante il processo di cicatrizzazione (Mndlovu et al., 2020). In questo contesto, sono stati studiati anche PEC costituiti da chitosano e acido ialuronico, impiegati come idrogel per il trattamento di ferite e ustioni, sfruttando le proprietà dei due polisaccaridi e la possibilità di mantenere un ambiente umido favorevole alla guarigione (Da Silva et al., 2014).

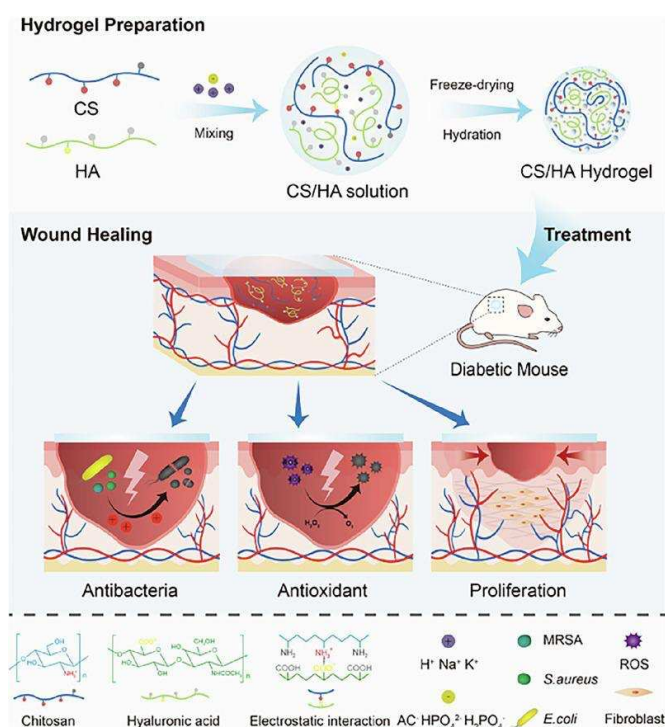


Figura 12: Rappresentazione schematica della formazione di un complesso polielettrolitico tra chitosano e acido ialuronico, alla base di materiali per medicazioni destinate alla guarigione delle ferite. (Valachová e Šoltés 2021).

Un'altra possibile applicazione riguarda la somministrazione oculare. L'utilizzo di nanoparticelle ottenute per complessazione polielettrolitica può contribuire a migliorare la permanenza del principio attivo sulla superficie oculare e a favorirne la penetrazione nei tessuti, riducendo al tempo stesso la frequenza di somministrazione (Casey-Power et al., 2022). In particolare, l'acido ialuronico può formare PEC con diversi policationi, tra cui chitosano e suoi derivati, poli-L-lisina e polimeri a base di arginina. Questi sistemi sono stati studiati per la veicolazione di molecole destinate sia al segmento anteriore sia al segmento posteriore dell'occhio, sfruttando le proprietà bioadesive e la biocompatibilità dell'acido ialuronico (Hotze et al., 2010). Un esempio riguarda nanoparticelle ottenute mediante complessazione tra chitosano e acido ialuronico e destinate alla somministrazione topica di eritropoietina, nelle quali il rapporto tra i due polielettroliti ha influenzato le dimensioni delle particelle e la stabilità del sistema (Silva et al., 2020).

I PEC possono inoltre essere utilizzati per lo sviluppo di sistemi antimicrobici, sia attraverso l'attività intrinseca di alcuni polielettroliti, sia mediante la veicolazione controllata di agenti antibatterici. Un esempio è rappresentato dai complessi ottenuti da chitosano e destrano fosfato, nei quali l'incorporazione di cefazolina ha portato alla formazione di idrogel caratterizzati da biocompatibilità, biodegradabilità e rilascio prolungato del farmaco. I sistemi caricati con cefazolina hanno inoltre mostrato attività antimicrobica nei confronti di *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, evidenziando il potenziale dei PEC come piattaforme per il trattamento locale delle infezioni (Solomevich et al., 2021). Più recentemente, l'interesse verso polielettroliti e PEC in questo ambito è aumentato anche in relazione alla necessità di contrastare la resistenza agli antibiotici e le infezioni associate alla formazione di biofilm, sebbene siano ancora necessari ulteriori studi in vivo e clinici (Alsayyed et al., 2024).

Un'ulteriore applicazione è rappresentata dalla vaccinazione, nella quale i PEC possono svolgere contemporaneamente il ruolo di sistemi di veicolazione dell'antigene e di supporto alla risposta immunitaria (Zhao et al., 2020). Sono stati sviluppati PEC costituiti da trimetilchitosano e diversi polianioni, tra cui alginato, condroitin solfato, destrano, acido ialuronico ed eparina, per la somministrazione di un vaccino peptidico contro *Streptococcus pyogenes*. I complessi ottenuti hanno mostrato dimensioni intorno a 200 nm e carica superficiale positiva; in particolare, il sistema contenente eparina ha indotto nei topi una maggiore risposta anticorpale sistemica e mucosale rispetto agli altri PEC studiati (Steer et al., 2016). Questi risultati mostrano come la composizione del

complesso possa influenzare non solo le proprietà fisico-chimiche del sistema, ma anche la risposta biologica associata alla somministrazione dell'antigene.

Nel complesso, queste applicazioni evidenziano la versatilità dei PEC come biomateriali e sistemi di veicolazione in differenti contesti biomedici. La possibilità di combinare polielettroliti naturali o sintetici di diversa natura permette infatti di modulare proprietà quali mucoadesione, attività antimicrobica, stabilità, permeabilità e rilascio delle molecole incorporate. Tuttavia, come per le altre applicazioni considerate, il passaggio da sistemi sperimentali a formulazioni clinicamente utilizzabili richiede ulteriori studi sulla stabilità in vivo, sulla sicurezza a lungo termine, sulla riproducibilità e sull'effettivo comportamento dei PEC nelle condizioni fisiologiche (Casey-Power et al., 2022; Alsayyed et al., 2024).

4.7 Considerazioni finali

L'analisi delle diverse applicazioni biomediche evidenzia come i complessi polielettrolitici (PEC) costituiscano una piattaforma estremamente versatile, la cui efficacia deriva dalla possibilità di combinare le proprietà di polielettroliti differenti attraverso interazioni principalmente di natura elettrostatica. La scelta dei componenti e il controllo delle condizioni di formazione permettono infatti di modulare caratteristiche quali dimensione, carica superficiale, morfologia, stabilità, capacità di incorporazione e profilo di rilascio, adattando il sistema alle specifiche esigenze dell'applicazione considerata (Wu et al., 2020; Bonaccorso et al., 2026).

Nel campo del drug delivery, questa versatilità ha permesso di sviluppare sistemi destinati alla veicolazione di farmaci antitumorali, acidi nucleici e molecole biologiche, mentre in altri ambiti i PEC possono assumere una funzione prevalentemente strutturale, come nel caso degli scaffold per la medicina rigenerativa, oppure contribuire alla protezione e alla permanenza del principio attivo nelle applicazioni mucosali e gastrointestinali. L'impiego di polielettroliti naturali, come chitosano, alginato e acido ialuronico, risulta particolarmente interessante per la loro biodegradabilità e biocompatibilità, anche se le proprietà del sistema finale dipendono fortemente dalla composizione e dalle condizioni di preparazione (Bhattacharyya et al., 2026).

Nonostante i risultati incoraggianti ottenuti in numerosi studi, permangono tuttavia diverse criticità che limitano il trasferimento dei PEC verso applicazioni industriali e cliniche. La natura dinamica delle interazioni elettrostatiche rende infatti i sistemi sensibili a parametri quali pH, forza ionica, concentrazione e presenza di altre specie in soluzione, con possibili variazioni delle proprietà delle particelle durante la conservazione e dopo la somministrazione. Anche la riproducibilità delle

caratteristiche fisico-chimiche rappresenta un aspetto importante, poiché piccole variazioni nelle condizioni di preparazione possono influenzare dimensione, polidispersità, carica e stabilità del complesso (Bonaccorso et al., 2026). Un ulteriore limite è rappresentato dalla difficoltà di prevedere il comportamento dei PEC in condizioni fisiologiche a partire dai soli risultati ottenuti in vitro. Dopo la somministrazione, infatti, le interazioni con proteine, sali e componenti cellulari possono modificare la struttura e le proprietà del complesso, influenzandone biodistribuzione, stabilità e rilascio del carico. Per questo motivo, la definizione di relazioni più affidabili tra parametri di formulazione, proprietà del PEC e comportamento biologico rappresenta uno degli aspetti più importanti per il futuro sviluppo di questi sistemi (Bhattacharyya et al., 2026).

Le prospettive future sono quindi rivolte verso una progettazione sempre più razionale dei PEC, basata sulla comprensione dei meccanismi che regolano la loro formazione e sul controllo simultaneo delle proprietà chimiche, strutturali e biologiche. In questo contesto, l'integrazione tra polielettroliti di origine naturale, materiali funzionalizzati e tecniche di produzione più controllate potrebbe favorire lo sviluppo di sistemi maggiormente riproducibili e adattabili alle diverse esigenze terapeutiche. Parallelamente, sarà necessario migliorare la standardizzazione dei metodi di caratterizzazione e definire strategie più efficaci per correlare le proprietà misurate in laboratorio con le prestazioni in vivo (Rekab & Oladipo, 2026).

Nel complesso, i PEC mostrano quindi un potenziale rilevante come piattaforme multifunzionali per applicazioni farmaceutiche e biomediche. Il loro sviluppo futuro dipenderà non soltanto dalla possibilità di ottenere sistemi con proprietà sempre più sofisticate, ma soprattutto dalla capacità di aumentarne la prevedibilità, la riproducibilità e la sicurezza, aspetti indispensabili per trasformare i risultati ottenuti in ambito sperimentale in applicazioni realmente trasferibili alla pratica clinica

5 Influenza dei parametri di formulazione e di processo sulla formazione microfluidica dei PEC: analisi di caso studio

5.1 Caso studio del sistema alginato/chitosano per la veicolazione di gefitinib

Un esempio dell'influenza dei parametri di formulazione e di processo sulla formazione microfluidica di sistemi a base di polielettroliti è rappresentato dal lavoro di Alizadeh et al. (2024), che hanno sviluppato un nanocarrier a base di alginato e chitosano per veicolare gefitinib. Il prodotto è stato ottenuto attraverso l'interazione iniziale tra gefitinib e alginato, seguita dall'autoassemblaggio di alginato e chitosano. Il lavoro è quindi pertinente allo studio dei sistemi basati su polielettroliti, pur tenendo presente che gli autori descrivono il prodotto principalmente come nanocarrier e non ne approfondiscono una classificazione strutturale formale come PEC. Il gefitinib è un inibitore della tirosina chinasi dell'EGFR utilizzato in specifiche forme di tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) avanzato caratterizzate da mutazioni di EGFR. Gli autori motivano lo sviluppo del nanocarrier con la limitata solubilità acquosa del farmaco e con la sua distribuzione non selettiva, associata al rischio di effetti indesiderati.

Gli autori hanno studiato l'effetto della concentrazione dei polimeri e del farmaco, del rapporto tra chitosano e alginato, della portata, della lunghezza della zona di reazione e della configurazione del dispositivo. L'ottimizzazione è stata condotta in più fasi: inizialmente sono state considerate la dimensione di picco e la polidispersità delle particelle, mentre nelle fasi successive è stata valutata l'efficienza di incapsulamento del principio attivo.

Il dispositivo è stato realizzato mediante incisione laser di lastre di poli(metil metacrilato) (PMMA). Le soluzioni madri di chitosano e alginato, entrambe all'1% p/v, sono state preparate rispettivamente in soluzione acquosa di acido acetico all'1% v/v e in acqua deionizzata. Il gefitinib è stato solubilizzato in soluzione acquosa di acido acetico allo 0,8% v/v. Il chitosano utilizzato presentava un intervallo di peso molecolare dichiarato di 50–190 kDa; gli autori non hanno invece confrontato polimeri con differenti pesi molecolari o gradi di deacetilazione.

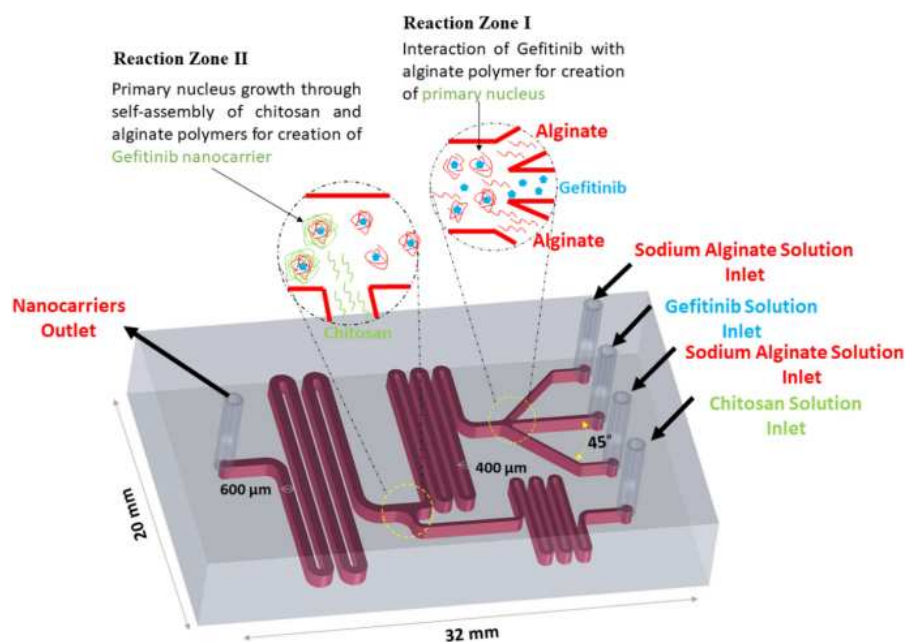


Figura 13: Rappresentazione schematica del chip microfluidico utilizzato per la sintesi di nanocarrier di gefitinib a base di chitosano e alginato (Alizadeh et al. 2024).

5.1.1 Influenza del rapporto tra i polimeri

Nella prima fase, la concentrazione di alginato è stata mantenuta allo 0,20% p/v, mentre quella di chitosano è stata progressivamente aumentata dallo 0,15 allo 0,40% p/v. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un chip a tre ingressi e una portata riportata di 1,54 mL/min. All’aumentare del rapporto nominale tra le concentrazioni in massa di chitosano e alginato, la dimensione di picco misurata mediante DLS diminuiva da 549 a 483 nm. Il PDI, invece, non diminuiva in modo continuo: passava da 0,91 a 0,37 al rapporto CS/ALG pari a 1,50, per poi aumentare a 0,41 al rapporto pari a 2,00.

Tabella 5.1. Effetto del rapporto di concentrazione chitosano/alginato sulle caratteristiche dimensionali nella fase preliminare di ottimizzazione.

Alginato (% p/v)	Chitosano (% p/v)	Rapporto CS/ALG	Dimensione di picco ± SD (nm)	PDI
0,20	0,15	0,75	549 ± 66	0,91
0,20	0,20	1,00	544 ± 223	0,39
0,20	0,30	1,50	499 ± 300	0,37
0,20	0,40	2,00	483 ± 293	0,41

Nota: dati da Alizadeh et al. (2024). CS: chitosano; ALG: alginato; SD: deviazione standard; PDI: indice di polidispersità.

Il rapporto 2,00 permetteva di ottenere la dimensione di picco più bassa (483 nm), mentre il rapporto 1,50 presentava il PDI minore (0,37) ed è stato quindi selezionato per gli esperimenti successivi. La scelta evidenzia come la riduzione delle dimensioni debba essere valutata insieme all'eterogeneità del sistema. Un PDI di 0,37 indica una distribuzione dimensionale ancora piuttosto ampia e non consente di descrivere le particelle come monodisperse.

Il rapporto considerato esprime le concentrazioni in massa dei polimeri e non il rapporto tra le cariche effettivamente disponibili per la complessazione. Poiché l'aumento della concentrazione di chitosano modifica anche la concentrazione complessiva dei componenti, questa serie di esperimenti non permette di separare completamente l'effetto del rapporto compositivo da quello della concentrazione totale.

5.1.2 Concentrazione dei componenti e condizioni operative

Gli autori hanno successivamente modificato le concentrazioni dei polimeri mantenendo un rapporto nominale chitosano/alginato di circa 1,50, selezionando lo 0,20% p/v di chitosano e lo 0,13% p/v di alginato. Alle concentrazioni più basse venivano descritte difficoltà nella formazione di particelle ben definite, mentre concentrazioni più elevate provocavano l'occlusione dei microcanali. La composizione delle soluzioni influenzava quindi sia le caratteristiche del prodotto sia la possibilità di mantenere operativo il dispositivo.

Anche la concentrazione di gefitinib contribuiva alla formazione del sistema. Nella serie preliminare condotta a una portata di 1,54 mL/min, aumentando la concentrazione del farmaco da 44,70 a 134,10 $\mu\text{mol/L}$, la dimensione di picco misurata mediante DLS diminuiva da 532 a 362 nm; il PDI variava invece tra 0,42 e 0,37 senza mostrare un andamento strettamente monotono. Nella successiva ottimizzazione del caricamento, un incremento della concentrazione di gefitinib favoriva l'aumento dell'efficienza di incapsulamento. Gli autori hanno interpretato questi risultati come conseguenza di una maggiore formazione di nuclei gefitinib–alginato. Tale meccanismo rimane tuttavia un'interpretazione proposta, poiché la nucleazione non è stata misurata direttamente. I dati dimensionali della fase preliminare non devono essere confusi con la formulazione finale utilizzata per ottenere la massima efficienza di incapsulamento.

Tabella 5.2. Parametri selezionati nelle diverse fasi di ottimizzazione e relative osservazioni.

Parametro		Condizione selezionata	Osservazione
Concentrazione chitosano	di	0,20% p/v	Compromesso tra formazione delle particelle e funzionamento del chip
Concentrazione alginato	di	0,13% p/v	Selezionata insieme alla concentrazione di chitosano
Concentrazione gefitinib (fase finale)	di	1,117 mmol/L	Incremento del caricamento; concentrazioni superiori causavano occlusione
Portata (fase preliminare)		2,15 mL/min	Ottimizzata con gefitinib a circa 111 μ mol/L; EE dichiarata $\approx$ 30,1%
Lunghezza della zona di reazione II (fase preliminare)		64 mm	Ottimizzata con gefitinib a circa 111 μ mol/L; oltre 128 mm si osservava occlusione
Lunghezza superiore a 128 mm		Non selezionata	Occlusione dei microcanali

La portata è stata ottimizzata utilizzando una concentrazione di gefitinib di circa 111 μ mol/L, quindi inferiore a quella della formulazione finale. In questa fase, la portata selezionata di 2,15 mL/min corrispondeva a un'efficienza di incapsulamento dichiarata di circa il 30,1%. Questo valore non deve essere confuso con il 68,4% raggiunto dopo la successiva ottimizzazione della concentrazione del farmaco.

Secondo gli autori, l'andamento osservato rifletteva un equilibrio tra efficacia della miscelazione e tempo disponibile per l'associazione dei componenti. Anche l'aumento della lunghezza della zona di reazione II non produceva un beneficio continuo: una lunghezza di 64 mm è stata selezionata, mentre canali più lunghi di 128 mm provocavano occlusione. Il lavoro mostra quindi che portata e percorso di reazione devono essere scelti considerando congiuntamente il caricamento, il tempo di contatto e il rischio di deposito sulle pareti o di blocco dei microcanali.

5.1.3 Configurazione del chip e ordine di contatto

Il confronto tra le modalità di alimentazione ha evidenziato l'importanza della sequenza con cui i componenti vengono messi in contatto. La configurazione finale comprendeva quattro ingressi: due per l'alginato, uno per il gefitinib e uno per il chitosano. In questo modo il farmaco poteva entrare in

contatto con l'alginato prima dell'aggiunta del chitosano, favorendo la formazione del nucleo iniziale prima dell'autoassemblaggio del nanocarrier.

Tabella 5.3. Confronto tra le configurazioni operative nella fase di ottimizzazione del chip (gefitinib circa 111 $\mu\text{mol/L}$).

Configurazione	Modalità di contatto	Incapsulamento dichiarato
Chip a tre ingressi	Alimentazione separata di chitosano, alginato e gefitinib	30,1%
Chip a tre ingressi con preincubazione	Gefitinib e alginato preincubati per 40 minuti	42,0%
Chip a quattro ingressi	Contatto gefitinib–alginato seguito dall'aggiunta di chitosano	45,3%

La preincubazione della miscela gefitinib–alginato per 40 minuti migliorava il caricamento rispetto all'alimentazione separata (42,0% contro 30,1%). Il chip a quattro ingressi permetteva di ottenere un valore ancora superiore (45,3%) senza richiedere una fase esterna di preincubazione. Il risultato suggerisce che favorire l'interazione farmaco–alginato prima della complessazione con il chitosano possa contribuire all'incorporazione del principio attivo. Il confronto riguarda tuttavia la configurazione complessiva, poiché modifica contemporaneamente la distribuzione dei flussi e la storia di contatto dei reagenti. I valori della tabella si riferiscono alla fase di ottimizzazione del chip, con gefitinib a circa 111 $\mu\text{mol/L}$, e non alla formulazione finale a concentrazione più elevata.

5.1.4 Caratteristiche del prodotto e limiti dello studio

Con la configurazione a quattro ingressi e le condizioni selezionate — chitosano allo 0,20% p/v, alginato allo 0,13% p/v, gefitinib a 1,117 mmol/L, portata di 2,15 mL/min e lunghezza della zona di reazione II pari a 64 mm — gli autori hanno riportato un'efficienza di incapsulamento del 68,4% e una capacità di caricamento di $50,2 \pm 3,4$ mg/g, equivalente a circa il 5,02% in massa.

Tabella 5.4. Principali risultati di caratterizzazione e valutazione in vitro del nanocarrier.

Valutazione	Risultato riportato	Precisazione / limite
DLS	362 ± 184 nm; PDI = 0,37	Serie preliminare: gefitinib 134,10 µmol/L e portata 1,54 mL/min; non corrisponde alle condizioni finali.
FE-SEM	13,60 ± 3,60 nm	Misura su campione preparato per la microscopia elettronica a scansione.
TEM	5,30 ± 2,60 nm	Preparazione differente; valore molto distante dal diametro idrodinamico misurato mediante DLS.
Efficienza di incapsulamento finale	68,4%	Valore riportato dagli autori; da interpretare con cautela per l'incongruenza nella formula riportata.
Capacità di caricamento	50,2 ± 3,4 mg/g (≈ 5,02% p/p)	Valore dichiarato dagli autori per la formulazione ottimizzata.
Rilascio in vitro	Maggiore a pH 5,5 rispetto a pH 7,4	Risultato ottenuto nelle condizioni del saggio; non dimostra targeting tumorale in vivo.
Saggio MTT su A549	IC ₅₀ a 48 h: gefitinib libero 28,090 µg/mL; nanocarrier 3,189 µg/mL. IC ₅₀ a 72 h: 12,380 e 2,721 µg/mL, rispettivamente.	Dato in vitro su una linea tumorale. Il testo riporta 48/72 h, mentre la didascalia della Fig. 7 indica 24/48 h.
Nanocarrier privo di farmaco	Nessuna citotossicità significativa riportata nel saggio A549	Non equivale a una dimostrazione di sicurezza su cellule sane o in vivo.

Le misure dimensionali riportate nell'articolo differiscono notevolmente tra loro. La DLS ha fornito un valore di 362 ± 184 nm (PDI 0,37) in una serie preliminare condotta a una concentrazione iniziale di gefitinib di 134,10 µmol/L e a una portata di 1,54 mL/min; le immagini FE-SEM e TEM sono state invece analizzate su campioni preparati per la microscopia e hanno fornito valori rispettivamente di

13,60 ± 3,60 nm e 5,30 ± 2,60 nm. Gli autori attribuiscono tali differenze al rigonfiamento del materiale in dispersione e alle diverse procedure di preparazione dei campioni. Tuttavia, l'entità dello scarto è elevata: i valori ottenuti mediante microscopia non possono essere utilizzati come sostituti del diametro idrodinamico misurato in dispersione, né le tre misure dovrebbero essere considerate direttamente intercambiabili. In particolare, il valore TEM di 5,30 ± 2,60 nm riportato anche nell'abstract non rappresenta la dimensione rilevata mediante DLS in sospensione.

Un ulteriore limite riguarda l'equazione dell'efficienza di incapsulamento riportata nell'articolo, che è espressa come rapporto tra gefitinib non incorporato e quantità totale di farmaco aggiunta. Scritta in questo modo, la formula descrive la frazione non incapsulata, non l'efficienza di incapsulamento; per quest'ultima ci si aspetterebbe il rapporto tra la quantità di farmaco incorporata e quella inizialmente aggiunta. Dal testo non è possibile stabilire se si tratti di un errore tipografico nella formula o di un problema nei calcoli effettivamente eseguiti. Per questo motivo, le percentuali di incapsulamento vanno riportate come valori dichiarati dagli autori e interpretate con cautela.

Nel complesso, lo studio evidenzia come concentrazioni, rapporto compositivo, portata, lunghezza della zona di reazione e ordine di contatto contribuiscano alla formazione del nanocarrier e alla definizione delle condizioni operative. Non vengono però analizzati sistematicamente il pH durante la formazione, la forza ionica, il peso molecolare e il grado di deacetilazione del chitosano. Inoltre, le valutazioni biologiche sono limitate a un saggio MTT in vitro sulla linea tumorale A549: non sono riportate prove in vivo o studi clinici e non è quindi possibile concludere che il sistema migliori il targeting tumorale o la sicurezza nell'organismo. Il caso costituisce pertanto un esempio di ottimizzazione di una specifica formulazione, ma i risultati dimensionali molto diversi e l'incongruenza nella formula di incapsulamento richiedono una lettura critica dei dati (Alizadeh et al., 2024).

6 Conclusioni

L'analisi svolta nel corso di questo lavoro ha evidenziato come i complessi polielettrolitici (PEC) rappresentino sistemi estremamente versatili, le cui caratteristiche possono essere modulate intervenendo sia sulla scelta dei polielettroliti sia sulle condizioni utilizzate durante la loro formazione. In particolare, parametri quali il rapporto di carica, il peso molecolare, il pH, la forza ionica e la concentrazione influenzano in maniera significativa l'organizzazione delle catene e le proprietà finali dei complessi.

Un aspetto che emerge in modo particolare è la stretta relazione tra le condizioni di preparazione e le caratteristiche del sistema ottenuto. La formazione dei PEC non è infatti un processo statico, ma comprende fenomeni di associazione, nucleazione, crescita e possibile aggregazione. Di conseguenza, anche variazioni relativamente piccole nelle condizioni di preparazione possono determinare differenze nella dimensione, nella distribuzione dimensionale e nella stabilità delle particelle. Questo rappresenta un elemento importante soprattutto nel caso di sistemi destinati ad applicazioni farmaceutiche e biomediche, nei quali le proprietà fisico-chimiche possono influenzare il comportamento del sistema una volta introdotto nell'organismo.

Da questo punto di vista, una delle principali criticità individuate riguarda la riproducibilità. I metodi convenzionali, basati sulla miscelazione dei polielettroliti in sistemi di volume maggiore, possono infatti rendere difficile il controllo simultaneo delle condizioni di formazione e favorire la presenza di eterogeneità nel sistema. Il problema diventa ancora più evidente quando si considera il passaggio a una scala produttiva maggiore, nel quale il mantenimento delle stesse condizioni di miscelazione può risultare complesso. Pertanto, il controllo delle condizioni di formazione rappresenta uno degli aspetti centrali per lo sviluppo dei PEC. Non è infatti sufficiente individuare una combinazione di polielettroliti in grado di formare un complesso stabile, ma è necessario comprendere in che modo i parametri di processo influenzino la struttura e le proprietà del sistema finale. Una maggiore conoscenza di queste relazioni può contribuire allo sviluppo di formulazioni più riproducibili e con caratteristiche maggiormente prevedibili.

Alla luce delle problematiche evidenziate, la microfluidica emerge come un approccio particolarmente interessante per migliorare il controllo del processo di formazione dei PEC. Il principale vantaggio non consiste semplicemente nella possibilità di effettuare la miscelazione in volumi ridotti, ma nella possibilità di controllare in maniera più precisa le condizioni spatio-temporali nelle quali i polielettroliti entrano in contatto.

La possibilità di modificare geometria del dispositivo, portate e configurazione dei flussi permette infatti di intervenire sulla diffusione, sul trasporto di massa e sui tempi caratteristici del processo. Questo può avere un effetto diretto sui fenomeni di nucleazione e crescita e, di conseguenza, sulle caratteristiche delle particelle ottenute. L'utilizzo della microfluidica può quindi rappresentare una strategia per ridurre alcune delle eterogeneità tipiche della miscelazione convenzionale e favorire una maggiore uniformità dei sistemi.

Un elemento particolarmente interessante è inoltre la possibilità di applicare lo stesso principio a sistemi polielettrolitici differenti; l'approccio microfluidico è stato infatti studiato non solo per sistemi a base di chitosano e alginato, ma anche per altre combinazioni di polielettroliti e per sistemi destinati alla veicolazione di acidi nucleici. Questo evidenzia come il controllo della miscelazione rappresenti un aspetto rilevante indipendentemente dalla specifica composizione del PEC.

Un ulteriore approfondimento è stato dedicato al caso studio di Alizadeh et al. (2024), relativo alla preparazione microfluidica di un nanocarrier a base di alginato e chitosano per la veicolazione del gefitinib. L'analisi ha permesso di evidenziare come le caratteristiche del sistema ottenuto dipendano non soltanto dalla composizione della formulazione, ma anche dalle condizioni operative adottate. In particolare, la concentrazione dei polimeri e del farmaco, la portata, la lunghezza della zona di reazione e la configurazione del dispositivo, insieme all'ordine con cui i componenti entrano in contatto, hanno assunto un ruolo rilevante nell'ottimizzazione del processo. Lo studio mostra quindi concretamente l'importanza del controllo dei parametri di formulazione e di processo nella produzione microfluidica di nanocarrier polimerici. Allo stesso tempo, l'analisi critica dei risultati ha evidenziato alcuni aspetti che richiedono cautela, tra cui le differenze tra le dimensioni ottenute con tecniche di caratterizzazione diverse e un'incongruenza nella formula di efficienza di incapsulamento riportata dagli autori. Inoltre, le valutazioni biologiche, limitate a prove in vitro, non consentono di trarre conclusioni definitive sul comportamento del sistema in vivo o sulla sua efficacia terapeutica. Il caso studio sottolinea pertanto sia le potenzialità dell'approccio microfluidico nell'ottimizzazione delle formulazioni, sia la necessità di una caratterizzazione rigorosa e di ulteriori verifiche per confermare le prestazioni dei sistemi sviluppati.

Tuttavia, la microfluidica non elimina completamente le problematiche associate alla produzione dei complessi. La maggiore complessità dei dispositivi, i costi di fabbricazione e gestione, la produttività e il rischio di occlusione dei microcanali rappresentano ancora alcuni degli aspetti da considerare. In particolare, lo scale-up rimane una delle principali difficoltà, poiché l'aumento della portata non garantisce necessariamente il mantenimento delle stesse condizioni di miscelazione. La microfluidica

deve quindi essere considerata come uno strumento in grado di migliorare il controllo del processo, ma il suo trasferimento verso una produzione su scala maggiore richiede ancora ulteriori sviluppi.

L'analisi delle applicazioni considerate ha mostrato come la versatilità dei PEC permetta di utilizzarli in contesti differenti, sfruttando di volta in volta proprietà specifiche del sistema. La possibilità di combinare polielettroliti con caratteristiche diverse consente infatti di modulare aspetti quali stabilità, interazione con l'ambiente biologico, capacità di incorporazione e rilascio delle molecole associate.

Nel campo del drug delivery, i PEC possono essere utilizzati per proteggere il principio attivo e modificarne il rilascio, mentre la loro applicazione alla veicolazione degli acidi nucleici ha portato allo sviluppo dei polyplexes. In questo caso, la complessazione permette di condensare e proteggere il materiale genetico, ma il trasferimento intracellulare rimane influenzato dalla presenza di diverse barriere biologiche. Questo evidenzia come la semplice formazione di un complesso stabile non sia necessariamente sufficiente a garantire un'efficace funzione terapeutica.

Le potenzialità dei PEC si estendono inoltre ad altri ambiti, tra cui l'oncologia, la somministrazione mucosale e gastrointestinale e la medicina rigenerativa. In questi contesti, le proprietà dei complessi possono essere sfruttate in modo differente, ad esempio per favorire il rilascio controllato di molecole terapeutiche, aumentare la permanenza del sistema nel sito di somministrazione oppure contribuire alla formazione di biomateriali destinati alla rigenerazione tissutale.

Nel complesso, le diverse applicazioni analizzate mostrano quindi che non esiste un'unica caratteristica dei PEC alla base del loro interesse, ma la possibilità di combinare composizione e condizioni di preparazione in funzione dell'obiettivo desiderato. Questa flessibilità rappresenta uno dei principali punti di forza dei sistemi polielettrolitici, ma allo stesso tempo rende necessario un controllo accurato della loro progettazione.

Nonostante le numerose potenzialità evidenziate, il trasferimento dei PEC verso applicazioni industriali e cliniche presenta ancora alcune criticità. La loro natura dinamica rende infatti i complessi sensibili alle condizioni dell'ambiente in cui si trovano; variazioni di pH, forza ionica, concentrazione e presenza di altre specie possono modificare le interazioni tra i polielettroliti e, di conseguenza, la struttura e la stabilità del sistema.

Un problema particolarmente importante riguarda inoltre la difficoltà di prevedere il comportamento dei PEC in condizioni fisiologiche sulla base dei soli risultati ottenuti in vitro. Dopo la somministrazione, infatti, i complessi possono interagire con proteine, sali e componenti cellulari,

modificando le proprie caratteristiche e influenzando aspetti quali stabilità, biodistribuzione e rilascio della molecola associata. Diventa quindi necessario approfondire maggiormente il rapporto tra le caratteristiche determinate durante la formulazione e il comportamento effettivo del sistema in vivo.

In questo contesto, la riproducibilità e la standardizzazione assumono un ruolo centrale. La definizione di condizioni di preparazione e metodologie di caratterizzazione maggiormente standardizzate potrebbe infatti facilitare il confronto tra i diversi sistemi studiati e permettere di individuare relazioni più affidabili tra parametri di formulazione, proprietà dei PEC e risposta biologica.

Anche lo sviluppo della microfluidica dovrà affrontare problematiche legate principalmente alla produttività e alla scalabilità. Sarà quindi importante sviluppare dispositivi e strategie di produzione che permettano di aumentare la quantità di sistema ottenuta senza perdere il controllo sulle condizioni di miscelazione che rappresentano uno dei principali vantaggi della tecnologia.

Le prospettive future sono quindi rivolte verso una progettazione sempre più razionale dei PEC, nella quale la scelta dei polielettroliti e delle condizioni di formazione sia guidata da una maggiore comprensione delle relazioni tra struttura, proprietà fisico-chimiche e comportamento biologico. L'integrazione tra materiali maggiormente funzionalizzati, tecniche di produzione più controllate e metodologie di caratterizzazione standardizzate potrebbe contribuire allo sviluppo di sistemi più prevedibili e riproducibili.

In conclusione, i complessi polielettrolitici presentano un potenziale significativo come piattaforme per applicazioni farmaceutiche e biomediche, grazie alla possibilità di modulare le loro proprietà in funzione dell'utilizzo previsto. Dall'analisi svolta emerge tuttavia che la principale sfida futura non consiste solamente nello sviluppo di sistemi sempre più complessi, ma nella possibilità di controllarne in modo affidabile la formazione, prevederne il comportamento e garantirne la riproducibilità e la sicurezza. In questo quadro, la microfluidica può rappresentare uno strumento importante, soprattutto per migliorare il controllo del processo di preparazione. Il superamento delle attuali limitazioni, in particolare quelle legate alla scalabilità, alla standardizzazione e alla previsione del comportamento in vivo, sarà fondamentale per favorire il passaggio dei PEC dalla ricerca sperimentale verso applicazioni farmaceutiche e biomediche concretamente trasferibili.

Bibliografia

- Sarah L. Perry, Lorraine, Kyle Q. Hoffmann, Matthew J. Kade, Dimitrios Priftis, Katie A. Black, Derek Wong, Ryan A. Klein, Charles F. Pierce III, Khatcher O. Margossian, Jonathan K. Whitmer, Jian Qin, Juan J. de Pablo & Matthew Tirrell (2015). Chirality-selected phase behaviour in ionic polypeptide complexes.
- Fu & Schlenoff (2016). Driving Forces for Oppositely Charged Polyion Association in Aqueous Solutions: Enthalpic, Entropic, but Not Electrostatic.
- Yubaraj Ghimire, Mahendra Morang Adarsh, Ajaya Bhattarai, Mahendra Morang Adarsh (2020).
- A Review on Polyelectrolytes (PES) and Polyelectrolyte Complexes (PECs).
- Pergushov, D. V., Müller, A. H. E., & Schacher, F. H. (2012). Micellar interpolyelectrolyte complexes. *Chemical Society Reviews*, 41(21).
- Abdulaziz Almalik, Shima Karimi, Sihem Ouasti, Roberto Donno, Christine Wandrey, Philip J. Day, Nicola Tirelli (2013). Hyaluronic acid (HA) presentation as a tool to modulate and control the receptor-mediated uptake of HA-coated nanoparticles.
- Taha, M. E., Maraie, N. K., & Sahu, R. K. (2025). Spotlight on Polyelectrolyte Complexes and Their Medical Application in Drug Delivery. *Al Mustansiriyah Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25(2), 266–279.
- Meka, V. S., Sing, M. K. G., Pichika, M. R., Nali, S. R., Kolapalli, V. R. M., & Kesharwani, P. (2017). A comprehensive review on polyelectrolyte complexes.
- Srinivas, L., & Ramana Murthy, K. V. (2010). Preparation and evaluation of polyelectrolyte complexes for oral controlled drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 4(1), 69–77.
- Abdulaziz Almalik, Philip J. Day, Nicola Tirelli (2013). HA-Coated Chitosan Nanoparticles for CD44-Mediated Nucleic Acid Delivery.
- Haliza Katas, Maria Abdul Ghafoor Raja, and Kai Leong Lam (2013). Development of Chitosan Nanoparticles as a Stable Drug Delivery System for Protein/siRNA.
- Delair, T. (2011). Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1), 10–18
- Lili Zhao, Wanli Jin, Jazmina Gonzalez Cruz, Nirmal Marasini, Zeinab G. Khalil, Robert J. Capon, Waleed M. Hussein, Mariusz Skwarczynski, and Istvan Toth (2020). Development of Polyelectrolyte Complexes for the Delivery of Peptide-Based Subunit Vaccines against Group A Streptococcus.
- Martin Müller, Bernd Keßler, Johanna Frölich, Sebastian Poeschla, Bernhard Torger (2011). Polyelectrolyte Complex Nanoparticles of Poly(ethyleneimine) and Poly(acrylic acid): Preparation and Applications.
- Haliza Katas, Maria Abdul Ghafoor Raja, and Kai Leong Lam (2013). Development of Chitosan Nanoparticles as a Stable Drug Delivery System for Protein/siRNA.

- Brian K. Johnson, Robert K. Prud'homme (2003). Flash NanoPrecipitation of Organic Actives and Block Copolymers using a Confined Impinging Jets Mixer.
- Karnik, R., Gu, F., Basto, P., Cannizzaro, C., Dean, L., Kyei-Manu, W., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2008). Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles. *Nano Letters*, 8(9).
- Kenis, P. J. A., Ismagilov, R. F., Takayama, S., Whitesides, G. M., Li, S., & White, H. S. (2000). Fabrication inside microchannels using fluid flow. *Accounts of Chemical Research*, 33(12), 841–847.
- Ankerfors, C., Ondaral, S., Wågberg, L., & Ödberg, L. (2010). Using jet mixing to prepare polyelectrolyte complexes: Complex properties and their interaction with silicon oxide surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351(1), 88–95.
- Leclercq, L., Boustta, M., & Vert, M. (2011). Dynamics of polyelectrolyte complex formation and stability when a polycation is progressively added to a polyanion under physico-chemical conditions modeling blood. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26(1), 29–45.
- Valencia, P. M., Farokhzad, O. C., Karnik, R., & Langer, R. (2012). Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 7(10), 623–629.
- Yang Gao, Quingming Ma, Jie Cao, Yiwen Wang, Xin Yang, Quilong Xu, Quing Liang, Yong Sun (2021). Recent advances in microfluidic-aided chitosa-based multifunctional materials for biomedical applications.
- Quan Gan, Tao Wang, Colette Cochrane, Paul McCarron (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery.
- Meera George, T. Emilia Abraham (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan.
- Yu Yuan, Yan Huang (2019). Ionically Crosslinked Polyelectrolyte Nanoparticle Formation Mechanisms: The Significance of Mixing.
- Joseph B. Schlenoff, Mo Yang, Zachary A. Digby, Qifeng Wan (2019). Ion Content of Polyelectrolyte Complex Coacervates and the Donnan Equilibrium.
- Hamdallah, S.I., Zoqlam, R., Erfle, P., Blyth, M., Alkilany, A.M., Dietzel, A., Qi, S. (2020). Microfluidics for pharmaceutical nanoparticle fabrication: The truth and the myth. *Int. J. Pharm.*, 584, 119408.
- Reza Riahi, Ali Tamayo, Seyed Ali Mousavi Shaegh, Amir Ghaemmaghami, Mehmet R. Dokmeci, Ali Khademshosseini (2015). Microfluidics for Advanced Drug Delivery Systems.
- Todd Thorsen, Sebastian J. Maerkl, Stephen R. Quake (2002). Microfluidic Large-Scale Integration.
- Autori: Petra S. Dittrich & Andreas Manz (2006). Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery.
- Hood & DeVoe (2015). High-Throughput Continuous Flow Production of Nanoscale Liposomes by Microfluidic Vertical Flow Focusing.
- Boddohi & Kipper (2010). Engineering Nanoassemblies of Polysaccharides.

- Squires, T. M., & Quake, S. R. (2005). Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of Modern Physics*, 77(3), 977–1026.
- Nguyen, N. T. & Wu, Z. G. (2005). Micromixers — a review. *J. Micromech. Microeng.*
- Bird, R. B., Stewart, W. E. & Lightfoot, E. N. (2001). *Transport Phenomena*.
- Javier Atencia & David J. Beebe (2005). Controlled microfluidic interfaces. *Autori:*
- Goksen G. Yaralioglu, Ira O. Wygant, Theodore C. Marentis, and Butrus T. Khuri-Yakub (2004). Ultrasonic Mixing in Microfluidic Channels Using Integrated Transducers.
- Sung-Jin Park, Jung Kyung Kim, Junha Park, Seok Chung, Chanil Chung and Jun Keun Chang (2003). Rapid three-dimensional passive rotation micromixer using the breakup process.
- Zhigaltsev, I.; Belliveau, N.; Hafez, I.; Leung, A.; Huft, J.; Hansen, C.; Cullis, P. (2012). Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing.
- Kim, S.; Sukovich, D.; Abate, A. (2015). Patterning microfluidic device wettability with spatially-controlled plasma oxidation.
- Xu, J.; Li, S.; Tan, J.; Wang, Y.; Luo, G. (2006). Controllable preparation of monodisperse O/W and W/O emulsions in the same microfluidic device.
- Basova, E.; Foret, F. (2015). Droplet microfluidics in (bio) chemical analysis.
- De Menech, M.; Garstecki, P.; Jousse, F.; Stone, H. (2008). Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction.
- Chou, W.; Lee, P.; Yang, C.; Huang, W.; Lin, Y. (2015). Recent advances in applications of droplet microfluidics.
- Isabel Ortiz de Solorzano, Laura Uson, Ane Larrea, Mario Miana, Victor Sebastian & Manuel Arruebo (2016). Continuous synthesis of drug-loaded nanoparticles using microchannel emulsification and numerical modeling: effect of passive mixing.
- Yue Hui, David Wibowo, Yun Liu, Rui Ran, Hao-fei Wang, Arjun Seth, Anton P.J. Middelberg and Chun-Xia Zhao (2018). Understanding the effects of nanocapsular mechanical property on passive and active tumor targeting.
- D. Stroock, G. M. Whitesides (2002). Controlling Flows in Microchannels with Patterned Surface Charge and Topography.
- Martijn J. W. Evers, Jayesh A. Kulkarni, Roy van der Meel, Pieter R. Cullis, Pieter Vader, and Raymond M. Schiffelers (2018). State-of-the-Art Design and Rapid-Mixing Production Techniques of Lipid Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery.
- Abdulrahman Agha, Waqas Waheed, Ion Stiharu, Vahé Nerguizian, Ghulam Destgeer, Eiyad Abu-Nada and Anas Alazzam (2023). A review on microfluidic-assisted nanoparticle synthesis, and their applications using multiscale simulation methods.
- Xiuqing Ma, Rui Li, Zhiming Jin, Yiqiang Fan, Xuance Zhou & Yajun Zhang (2019). Injection molding and characterization of PMMA-based microfluidic devices.

- Mahmoud Elsabahy & Karen L. Wooley (2012). Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications.
- Deepak Thassu, Yashwant Pathak, Michel Deleers (2007). Nanoparticulate Drug-Delivery Systems: An Overview.
- Kim, K., Kang, D.-H., Kim, M.-S., Kim, K.-S., Park, K.-M., Hong, S.-C., Chang, P.-S., & Jung, H.-S. (2015). Generation of alginate nanoparticles through microfluidics-aided polyelectrolyte complexation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 471, 86–92.
- Gonzalez Ferreiro M, Tillman L, Hardee G, Bodmeier R. (2002). Characterization of alginate/ poly-l-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers.
- Ita, K. (2020). Polyplexes for gene and nucleic acid delivery: Progress and bottlenecks. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 150, 105358.
- Young Hun Kim, Kwanghee Lee, Sheng Li (2021). Nucleic Acids Based Polyelectrolyte Complexes: Their Complexation Mechanism, Morphology, and Stability.
- Christopher L. Grigsby, Yi-Ping Ho, Chao Lin, Johan F. J. Engbersen & Kam W. Leong (2013). Microfluidic Preparation of Polymer-Nucleic Acid Nanocomplexes Improves Nonviral Gene Transfer.
- Leslie Y. Yeo, Hsueh-Chia Chang, Peggy P. Y. Chan, and James R. Friend (2011). Microfluidic Devices for Bioapplications.
- W. S. Saad, R. K. Prud'homme (2016). Principles of nanoparticle formation by Flash Nanoprecipitation.
- E. Chiesa, A. Greco, F. Riva, E. M. Tosca, R. Dorati, S. Pisani, T. Modena, B. Conti, I. Genta (2019). Staggered Herringbone Microfluid Device for the Manufacturing of Chitosan/TPP Nanoparticles: Systematic Optimization and Preliminary Biological Evaluation.
- M. Shamsi, P. Zahedi (2017). On-Chip Preparation of Streptokinase Entrapped in Chitosan Nanoparticles Used in Thrombolytic Therapy Potentially.
- Z. Mahmoudi, J. Mohammadnejad, S. R. Bazaz, A. A. Mehrizi, M. Saidijam, R. Dinarvand, M. E. Warkiani, M. Soleimani (2020). Promoted chondrogenesis of hMCSs with controlled release of TGF- β 3 via microfluidics synthesized alginate nanogels.
- F. S. Majedi, M. M. Hasani-Sadrabadi, J. J. VanDersarl, N. Mokarram, S. Hojjati-Emami, E. Dashtimoghadam, S. Bonakdar, M. A. Shokrgozar, A. Bertsch, e P. Renaud (2014). On-Chip Fabrication of Paclitaxel-Loaded Chitosan Nanoparticles for Cancer Therapeutics.
- R. Ran, A. P. J. Middelberg, C. X. Zhao (2016). Microfluidic synthesis of multifunctional liposomes for tumour targeting.
- Pedro M. Valencia, Eric M. Pridgen, Brian Perea, Suresh Gadde, Christopher Sweeney, Philip W. Kantoff, Neil H. Bander, Stephen J. Lippard, Robert Langer, Rohit Karnik, e Omid C. Farokhzad (2013). Synergistic cytotoxicity of irinotecan and cisplatin in dual-drug targeted polymeric nanoparticles.
- H.-C. Chang, L. Y. Yeo (2010). Electrokinetically Driven Microfluidics and Nanofluidics.

- Sara Gimondi, Carlos F. Guimarães, Sara Filipa Fontoura Vieira, Virgínia M. F. Gonçalves, M. E. Tiritan, R. L. Reis, Helena Susana Costa Machado Ferreira, and N. M. Neves (2022). Microfluidic mixing system for precise PLGA-PEG nanoparticles size control.
- Mo, Y., Lu, Z., Rughoobur, G., Patil, P., Gershenfeld, N., Akinwande, A.I., Buchwald, S.L., Jensen, K.F (2020). Microfluidic electrochemistry for single-electron transfer redox-neutral reactions.
- Zhang Z., Kim J., Hwang J., Seo H., Kim G., Choi S., Hyun K.-A., Jung H.-I. (2026). Vertical numbering-up microfluidic architecture for scalable and homogeneous lipid nanoparticle production.
- Ma, J.; Lee, S.M.-Y.; Yi, C.; Li, C.-W (2017). Controllable synthesis of functional nanoparticles by microfluidic platforms for biomedical applications.
- Bonaccorso, A., Zingale, E., Carbone, C., Musumeci, T., & Pignatello, R. (2026). A current overview of polyions and polyelectrolyte complexes for pharmaceutical applications with special emphasis to brain purposes.
- Wu, D., Zhu, L., Li, Y., Zhang, X., Xu, S., Yang, G., & Delair, T. (2020). Chitosan-based Colloidal Polyelectrolyte Complexes for Drug Delivery: A Review.
- Raúl Cazorla-Luna, Araceli Martín-Illana, Fernando Notario-Pérez, Roberto Ruiz-Caro and María-Dolores Veiga (2021). Naturally Occurring Polyelectrolytes and Their Use for the Development of Complex-Based Mucoadhesive Drug Delivery Systems: An Overview.
- Mok, H. and Park, T.G. (2009). Functional polymers for targeted delivery of nucleic acid drugs.
- C Schatz, JM Lucas, C Viton, A Domard, C Pichot, T Delair (2004). Formation and properties of positively charged colloids based on polyelectrolyte complexes of biopolymers.
- Li, Y.C.; Zhang, Y.S.; Akpek, A.; Shin, S.R.; Khademhosseini, A (2017). The next-generation technology for biofabrication enabled by stimuli-responsive materials.
- Hess, K. L., Andorko, J. I., Tostanoski, L. H., & Jewell, C. M. (2017). Polyplexes assembled from self-peptides and regulatory nucleic acids blunt toll-like receptor signaling to combat autoimmunity. *Biomaterials*, 118, 51–62.
- Gupta, P., Sharma, A., & Mittal, V. (2024). Polymeric Vehicles for Nucleic Acid Delivery: Enhancing the Therapeutic Efficacy and Cellular Uptake. *Recent Advances in Drug Delivery and Formulation*, 18(4), 276–293.
- Ilaria Porello, Nina Bono, Gabriele Candiani and Francesco Cellesi (2024). Advancing nucleic acid delivery through cationic polymer design: non-cationic building blocks from the toolbox.
- Lourdes Mónica Bravo-Anayaa, Karla Gricelda Fernández-Solís, Julien Rosselgongb, Jesrael Luz Elena Nano-Rodríguez, Francisco Carvajal, Marguerite Rinaudo (2019). Chitosan-DNA polyelectrolyte complex: influence of chitosan characteristics and mechanism of complex formation.
- Maria Karayianni, Theodore Sentoukas, Athanasios Skandalis, Natassa Pippa and Stergios Pispas (2023). Chitosan-Based Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery: Technological Aspects, Applications, and Future Perspectives.
- Borchard, G. (2001). Chitosans for gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52(2), 145–150.

- Sergei V. Raik, Daria N. Poshina, Tatiana A. Lyalina, Dmitry S. Polyakov, Vadim B. Vasilyev e Yury A. Skorik (2018). *N*-[4-(*N,N,N*-trimethylammonium)benzyl]chitosan chloride: Synthesis, interaction with DNA and evaluation of transfection efficiency.
- Mehta, M. J., Kim, H. J., Lim, S. B., Naito, M., & Miyata, K. (2024). Recent Progress in the Endosomal Escape Mechanism and Chemical Structures of Polycations for Nucleic Acid Delivery.
- Richard, M. Thibault, G. De Crescenzo, M.D. Buschmann and M. Lavertu (2013). Ionization behavior of chitosan and chitosan–DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI, *Biomacromolecules*.
- Y. Wei, R. Liao, A. A. Mahmood, H. Xu and Q. Zhou (2017). pH-responsive pHLIP (pH low insertion peptide) nanoclusters of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a tumor-selective MRI contrast agent.
- Prajapati, B. G., Sharma, J. B., Sharma, S., Trivedi, N. D., Gaur, M., & Kapoor, D. U. (2024). *Harnessing polyelectrolyte complexes for precision cancer targeting: a comprehensive review*. *Medical Oncology*.
- Goodarzi N, Ghahremani MH, Amini M, Atyabi F, Ostad SN, Shabani Ravari N, Nateghian N, Dinarvand R. (2014). CD44-targeted docetaxel conjugate for cancer cells and cancer stem-like cells: A novel hyaluronic acid-based drug delivery system. *Chem Biol Drug Des*.
- L. Chen, Y. Zheng, L. Feng, Z. Liu, R. Guo, Y. Zhang (2019). *Novel hyaluronic acid coated hydrophobically modified chitosan polyelectrolyte complex for the delivery of doxorubicin*.
- Giarra, S., Zappavigna, S., Campani, V., Abate, M., Cossu, A. M., Leonetti, C., Porru, M., Mayol, L., Caraglia, M., & De Rosa, G. (2018). Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes for Doxorubicin and Zoledronic Acid Combined Therapy to Overcome Multidrug Resistance.
- M. Hirokawa, J. S. Passos, J. R. Nunes, L. B. Lopes (2024). *Evaluation of polyelectrolyte nanoparticles of chitosan and hyaluronic acid as topical delivery systems for cytotoxic agents*.
- Josias H. Hamman (2010). Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems.
- Shangyong Li, Hui Zhang, Kaiwei Chen, Mengfei Jin, Son Hai Vu, Samil Jung, Ningning He, Zhou Zheng & Myeong-Sok Lee (2022). Application of chitosan/alginate nanoparticle in oral drug delivery systems: prospects and challenges.
- Kumar P, Mishra B. (2008). Colon targeted drug delivery systems—an overview.
- Lopes M, Shrestha N, Correia A, et al. (2016). Dual chitosan/albumin- coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin.
- Bhunchu S, Rojsitthisak P. (2014). Biopolymeric alginate-chitosan nano-particles as drug delivery carriers for cancer therapy.
- Muzzarelli, R. A. A., Greco, F., Busilacchi, A., Sollazzo, V., & Gigante, A. (2012). *Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review*.

- Suneetha, M., Rao, K. M., & Han, S. S. (2020). *Mechanically improved porous hydrogels with polysaccharides via polyelectrolyte complexation for bone tissue engineering*.
- Ciarlantini, C., Francolini, I., Silvestro, I., Mariano, A., Scotto d'Abusco, A., & Piozzi, A. (2024). Design of bioactive and biomimetic scaffolds based on chitosan-alginate polyelectrolyte complexes for tissue engineering.
- Henson, F. M. D., Getgood, A. M. J., Caborn, D. M., McIlwraith, C. W., & Rushton, N. (2012). Effect of a solution of hyaluronic acid–chondroitin sulfate–N-acetyl glucosamine on the repair response of cartilage to single-impact load damage.
- Kim, S. E., Park, J. H., Cho, Y. W., Chung, H., Jeong, S. Y., Lee, E. B., et al. (2003). Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta1: Implications for cartilage tissue engineering.
- Hillary Mndlovu, Lisa C. du Toit, Pradeep Kumar, Yahya E. Choonara, Thashree Marimuthu, Pierre P. D. Kondiah and Viness Pillay (2020). Bioplatfrom Fabrication Approaches Affecting Chitosan-Based Interpolymer Complex Properties and Performance as Wound Dressings.
- Solomevich, S. O., Dmitruk, E. I., Bychkovsky, P. M., Salamevich, D. A., Kuchuk, S. V., & Yurkshtovich, T. L. (2021). *Biodegradable polyelectrolyte complexes of chitosan and partially crosslinked dextran phosphate with potential for biomedical applications*.
- Hotze, E. M.; Phenrat, T.; Lowry, G. V. (2010). Polyelectrolyte Complexes of Hyaluronic Acid and Diethyl aminoethyl Dextran: Formation, Stability and Hydrophobicity.
- Silva, B.; Marto, J.; Braz, B. S.; Delgado, E.; Almeida, A. J.; Gonçalves, L. (2020). New Nanoparticles for Topical Ocular Delivery of Erythropoietin.
- Rahaf Alsayyed, Adriana Ribeiro and Helena Cabral-Marques (2024). Polyelectrolytes and Polyelectrolyte Complexes as Future Antibacterial Agents.
- Steer, A. C.; Carapetis, J. R.; Dale, J. B.; Fraser, J. D.; Good, M. F.; Guilherme, L.; Moreland, N. J.; Mulholland, E. K.; Schodel, F.; Smeesters, P. R. (2016). Status of research and development of vaccines for *Streptococcus pyogenes*.
- Rekab, P., & Oladipo, A. A. (2026). Chitosan–Alginate Polyelectrolyte Systems: From Classical Release Models to the D-PARMO Framework.
- Bhattacharyya, D., Mukherjee, S., & Kaity, S. (2026). *Progress in biopolymer-based polyelectrolyte complexes for biomedical applications*.
- Ho, Y.-P., Grigsby, C. L., Zhao, F., & Leong, K. W. (2011). Tuning Physical Properties of Nanocomplexes through Microfluidics-Assisted Confinement.
- Atashbasteh, E., Esfahany, M. N., Reisi, P., Minaian, M., & Taheri, A. (2025). Microfluidic Fabrication of Rivastigmine-Loaded Chitosan-Hyaluronic Acid Nanoparticles Using 3D-Printed Devices.
- Felipe A. Oyarzun-Ampuero, J. Brea, M. I. Loza, D. Torres e M. J. Alonso (2009). Chitosan-hyaluronic acid nanoparticles loaded with heparin for the treatment of asthma.

- Tingting Chen, Shunying Li, Wenting Zhu, Zhi Liang e Qingbing Zeng (2019). Self-assembly pH-sensitive chitosan/alginate coated polyelectrolyte complexes for oral delivery of insulin.
- Jonathan E. Zuckerman, Ismael Gritli, Anthony Tolcher, Jeremy D. Heidel, Dean Lim, Robert Morgan, Bartosz Chmielowski, Antoni Ribas, Mark E. Davis e Yun Yen (2014). Correlating animal and human phase Ia/Ib clinical data with CALAA-01, a targeted, polymer-based nanoparticle containing siRNA.
- Louis Buscail, Barbara Bournet, Fabienne Vernejoul, Gilles Cambois, Hubert Lulka, Naïma Hanoun, Marlène Dufresne, Aline Meulle, Alix Vignolle-Vidoni, Lactitia Ligat, Nathalie Saint-Laurent, Frédéric Pont, Sébastien Dejean, Marion Gayral, Frédéric Martins, Jérôme Torrisani, Odile Barbey, Fabian Gross, Rosine Guimbaud, Philippe Otal, Frédéric Lopez, Gérard Tiraby e Pierre Cordelier (2015). First-in-man Phase 1 Clinical Trial of Gene Therapy for Advanced Pancreatic Cancer: Safety, Biodistribution, and Preliminary Clinical Findings.
- Iannuccelli, V., Montanari, M., Bertelli, D., Pellati, F., & Coppi, G. (2011). Microparticulate polyelectrolyte complexes for gentamicin transport across intestinal epithelia.
- Čalija, B., Cekić, N., Savić, S., Daniels, R., Marković, B., & Milić, J. (2013). pH-sensitive microparticles for oral drug delivery based on alginate/oligochitosan/Eudragit® L100-55 “sandwich” polyelectrolyte complex. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 395–402.
- Badwan, A., Remawi, M., Qinna, N., Elsayed, A., Arafat, T., Melhim, M., Abu Hijleh, O., & Idkaidek, N. M. (2009). Enhancement of oral bioavailability of insulin in humans. *Neuro Endocrinology Letters*, 30(1), 74–78.
- Alizadeh, H., Ahmadi, M., & Heydari Shayesteh, O. (2024). On chip synthesis of a pH sensitive gefitinib anticancer drug nanocarrier based on chitosan/alginate natural polymers. *Scientific Reports*, 14, 772.
- Bezrukov, A., & Galyametdinov, Y. (2022). Tuning properties of polyelectrolyte-surfactant associates in two-phase microfluidic flows. *Polymers*, 14(24), 5480.
- Ciarlantini, C., Francolini, I., Silvestro, I., Mariano, A., Scotto d’Abusco, A., & Piozzi, A. (2024). Design of bioactive and biomimetic scaffolds based on chitosan-alginate polyelectrolyte complexes for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 327, 121684.
- Gu, H., Duits, M. H. G., & Mugele, F. (2011). Droplets formation and merging in two-phase flow microfluidics. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2572–2597.
- Karnik, R., Gu, F., Basto, P., Cannizzaro, C., Dean, L., Kyei-Manu, W., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2008). Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles. *Nano Letters*, 8(9), 2906–2912.
- Kim, K., Kang, D.-H., Kim, M.-S., Kim, K.-S., Park, K.-M., Hong, S.-C., Chang, P.-S., & Jung, H.-S. (2015). Generation of alginate nanoparticles through microfluidics-aided polyelectrolyte complexation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 471, 86–92.

- Kwak, T. J., Nam, Y. G., Najera, M. A., Lee, S. W., Strickler, J. R., & Chang, W.-J. (2016). Convex grooves in staggered herringbone mixer improve mixing efficiency of laminar flow in microchannel. *PLOS ONE*, 11(11), e0166068.
- Lankalapalli, S., & Kolapalli, V. R. M. (2009). Polyelectrolyte complexes: A review of their applicability in drug delivery technology. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(5), 481–487.
- Mansoor, S., Kondiah, P. P. D., Choonara, Y. E., & Pillay, V. (2019). Polymer-based nanoparticle strategies for insulin delivery. *Polymers*, 11(9), 1380.
- Rios de la Rosa, J. M., Pingraja, P., Pelliccia, M., Spadea, A., Lallana, E., Gennari, A., Stratford, I. J., Rocchia, W., Tirella, A., & Tirelli, N. (2019). Binding and internalization in receptor-targeted carriers: The complex role of CD44 in the uptake of hyaluronic acid-based nanoparticles (siRNA delivery). *Advanced Healthcare Materials*, 8(24), e1901182.