

Abstract

In the last years, scientists and engineers have designed a wide range of polymeric systems capable responding to internal or external stimuli. There is a great range of responsive polymers that are sensitive to different stimuli such as light, temperature, electric field, magnetic field, pH and chemicals, etc. This kind of polymers are usually called also “smart polymers” or “intelligent polymers”; they have many applications in biology and medicine fields and can be used as sensor and biosensors, for controlled and trigger drug delivery, environmental remediation, chemo-mechanical actuators, and others.

Among several use of smart polymers, their use as micro and nano structured devices in nutraceutical and pharmaceutical field, in regenerative medicine, in the oil-gas industry and, for example, in the lubricants field, in the *self-healing* is very interesting and still poorly investigated.

In detail, a new approach for protection of the additives from thermo-oxidative degradation was proposed, using additive loaded microcapsules produced using a supercritical technique. These structures can allow to enhance the stability and to prolong the lifetime of the additives, reducing their volatility and reactivity and/or to maintain the additive concentration constant during operation, controlling their release. Two additives proposed by Total were studied: an antioxidant (AM) and a friction modifier (MoDTC). Spherical and regular nanocapsules with mean diameters of 195 ± 12 nm- 189 ± 10 nm and AM loading of 0.4 g- 0.73 g AM/g PMMA with EE of 57-95% were produced using Supercritical Emulsions Extraction (SEE-C) process. AM loaded microcapsules the microcapsules showed a good dispersability in base oil and the release of AM is responsive to pH level but also to temperature. Spherical and homogeneous PMMA loaded capsules were produced also using MoDTC. In this case, particles with mean diameter 187 ± 23 nm and EE of 90% were obtained.

Regarding the self-healing application, a protective coating for aerospace and automotive applications with the intrinsic capability to highlight damages suffered during the operating conditions, using an efficient and green process to produce microcapsules acting as a health-monitoring visual element is proposed. SEE-C technology was used to encapsulate a health-monitoring mixture based on DiGlycidyl Ether of Bisphenol A (DGEBA), dyed with Solvent Red 242, in polymethylmethacrylate polymer (PMMA). A comparison between SEE-C and Solvent Evaporation (SE) was also carried out in term of particle size distribution (PSD), encapsulation efficiency (EE) and stability in the time (TS) of the produced microcapsules. Larger microcapsules, with the size up to 726 nm and the EE below 57% were produced using the SE technology. The best results were obtained using SEE-C: spherical microcapsules with unwrinkled and smooth surface were obtained with mean size of 220 nm and EE up to 79 % using SEE-C. SEE-C capsules preserve their stability for the entire time frame analyzed of 30 days.

The protective coating was very sensitive in showing stress areas: impact tests carried out on strips of Carbon Fiber Reinforced Composites (CFRCs) coated with a green aqueous paint in which the SEE-C capsules were previously dispersed showed dye leaking associated with capsule breaking in the stressed areas, even using the low impact energies of 3.8 J and 4.5 J.

Controlled delivery of human growth factors is still a challenge in tissue engineering protocols, and poly-lactic acid and poly-lactic-co-glycolic acid carriers have been recently proposed for this purpose. In this study, the microencapsulation of two human growth factors, namely Growth Differentiation Factor -5 (hGDF-5) and Transforming Growth Factor $\beta 1$ (hTGF- $\beta 1$), by processing different emulsions using SEE-C technology. Polymer molecular weight, co-polymer ratio and surfactant amount in aqueous phases as well as phases mixing rate were varied to fabricate carriers with suitable size and loadings.

Carriers with different mean size from $0.4 \pm 0.09 \mu\text{m}$ up to $3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ were obtained by SEE-C technology when processing emulsions with different formulations; carriers were also loaded with $3 \mu\text{g/g}$ and $7 \mu\text{g/g}$ for hGDF-5 and hTGF- β 1 and they assured both growth factors controlled release along 25 days. Carriers showed also reduced cytotoxicity when evaluated in Chinese Hamster Ovary cells (CHO-K1); interestingly, they also exhibited a reduced cytotoxicity with respect to carriers obtained by conventional evaporation technique, and also a low reactivity on human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs), suggesting their safety and potential use in tissue engineering protocols.

Finally, the production of composite microspheres loaded with bioactive compounds has been another important challenge handled in this Ph.D. work. In particular, astaxanthin and beta-carotene were selected in this framework for their nutraceutical properties. The main outcome of this investigation was not only the improvement of the bioavailability, but also the protection of the antioxidant activity and shelf life of the bioactive compound. Defined and spherical particles were produced by means of the SEE-C technique using Ethyl Cellulose, PLA and PLGA as carriers.

In detail, the SEE-C technology was used to encapsulate astaxanthin in ethyl cellulose (EC), obtained particles with mean size of 363 nm and encapsulation efficiency up to 84%. β -Carotene (β -CA) was encapsulated into poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) and poly-lactic acid (PLA) carriers using SEE-C. α -Tocopherol (α -TOC) and Rosmarinic Acid (RA) were proposed as excipients to improve the formulation. PLA and PLGA carriers with sizes ranges between $1.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ and $0.3 \pm 0.07 \mu\text{m}$ were fabricated with encapsulation efficiencies between 50-80%. The co-encapsulation of α -TOC with β -CA gained to prolonged drug shelf life. Both systems preserved their antioxidant activity against light, heat and oxygen.

In conclusion, the SEE-C technique was successfully applied for production of smart microcapsules in several fields, demonstrating to be an attractive and available process from an industrial point of view.

Abstract

Negli ultimi anni, scienziati e ingegneri hanno progettato un'ampia gamma di sistemi polimerici in grado di rispondere a stimoli interni o esterni. Esiste una vasta gamma di polimeri reattivi che sono sensibili a diversi stimoli come luce, temperatura, campo elettrico, campo magnetico, pH e sostanze chimiche, ecc. Questo tipo di polimeri sono solitamente chiamati anche "polimeri smart" o "polimeri intelligenti", hanno molte applicazioni nei campi della biologia e della medicina e possono essere utilizzati come sensori e biosensori, per la somministrazione controllata di farmaci, risanamento ambientale, attuatori chemio-meccanici ed altro.

Tra i vari utilizzi dei polimeri intelligenti, molto interessante è il loro impiego come dispositivi micro e nano strutturati in campo nutraceutico e farmaceutico, nella medicina rigenerativa, nell'industria oil-gas; ad esempio, nel campo dei lubrificanti e del self healing essi sono ancora poco investigati.

In dettaglio, in questo lavoro di tesi è proposto un nuovo approccio per la protezione degli additivi dalla degradazione termo-ossidativa, utilizzando microcapsule caricate con additivi e prodotte utilizzando una tecnica supercritica. Queste strutture possono consentire di aumentare la stabilità e prolungare la vita degli additivi, riducendo la loro volatilità e reattività, mantenendone costante la concentrazione durante il funzionamento e controllandone il rilascio. Sono stati studiati due additivi proposti da Total: un antiossidante (AM) e un modificatore di attrito (MoDTC). Nanocapsule sferiche e regolari con diametri medi di 195 ± 12 nm- 189 ± 10 nm, con rapporto g AM/g PMMA 0.4- 0.73 ed EE del 57-95% sono state prodotte utilizzando il processo di estrazione con emulsioni supercritiche (SEE-C). Le microcapsule caricate con AM hanno mostrato una buona disperdibilità nell'olio base e il rilascio dell'additivo risulta sensibile alla variazione di pH ma anche di temperatura. Capsule sferiche ed omogenee caricate in PMMA sono state prodotte anche utilizzando MoDTC. In questo caso sono state ottenute particelle con diametro medio 187 ± 23 nm ed EE del 90%.

Per quanto riguarda l'applicazione self healing, è stato proposto un rivestimento protettivo per applicazioni aerospaziali con la capacità intrinseca di evidenziare i danni subiti durante le condizioni operative, utilizzando un processo efficiente e green per produrre microcapsule che fungono da elemento visivo di monitoraggio dello stato di usura. La tecnologia SEE-C è stata utilizzata per incapsulare una miscela di monitoraggio a base di diglicidil etere di bisfenolo A (DGEBA), tinto con Solvent Red 242, in polimetilmetacrilato (PMMA). È stato inoltre effettuato un confronto tra la tecnica SEE-C e la tecnica convenzionale di evaporazione del Solvente (SE) in termini di distribuzione granulometrica (PSD), efficienza di incapsulamento (EE) e stabilità nel tempo (TS) delle microcapsule prodotte. Microcapsule più grandi, con dimensioni fino a 726 nm e EE inferiori al 57% sono state prodotte utilizzando la tecnologia SE. I migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando la tecnica SEE-C: sono state ottenute microcapsule sferiche con superficie liscia, dimensione media di 220 nm ed EE fino al 79%. Le capsule SEE-C conservano la loro stabilità per l'intero arco temporale analizzato di 30 giorni.

Sono stati effettuati test di impatto eseguiti su strisce di compositi rinforzati con fibra di carbonio (CFRC) rivestiti con una vernice acquosa in cui le capsule SEE-C sono state precedentemente disperse. Il rivestimento protettivo è risultato sensibile ai test di impatto e ha consentito di mostrare le aree di stress che hanno evidenziato perdite di colorante associate alla rottura della capsula nelle aree sollecitate, anche utilizzando le energie a basso impatto di 3,8 J e 4,5 J.

La somministrazione controllata di fattori di crescita umana è ancora una sfida nei protocolli di ingegneria tissutale e recentemente sono stati proposti a questo scopo carrier di acido polilattico (PLA) e acido polilattico-co-glicolico (PLGA). In questo studio è stata proposta la microincapsulazione di due fattori di crescita umani,

il fattore di crescita differenziale-5 (hGDF-5) e il fattore di crescita trasformante $\beta 1$ (hTGF- $\beta 1$), elaborando diverse emulsioni utilizzando la tecnologia SEE-C. Il peso molecolare del polimero, il rapporto del copolimero e la quantità di tensioattivo nelle fasi acquose nonché la velocità di miscelazione delle fasi sono stati variati per fabbricare carrier con dimensioni e carichi adeguati.

Con la tecnologia SEE-C sono stati ottenuti carriers di dimensioni medie da $0.4 \pm 0.09 \mu\text{m}$ fino a $3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ utilizzando emulsioni con formulazioni diverse; le microcapsule sono state inoltre caricate con $3 \mu\text{g/g}$ e $7 \mu\text{g/g}$ di hGDF-5 e hTGF- $\beta 1$ e hanno assicurato il rilascio controllato di entrambi i fattori di crescita per 25 giorni. I carrier hanno anche mostrato una ridotta citotossicità quando sono stati messi a contatto con cellule ovariche di criceto cinese (CHO-K1), ridotta citotossicità rispetto ai vettori ottenuti con la tecnica di evaporazione convenzionale, e anche una bassa reattività sulle cellule mononucleate del sangue periferico umano (hPBMC), suggerendo la loro sicurezza e il potenziale utilizzo nei protocolli di ingegneria tissutale.

Infine, la produzione di microsfele composite caricate con composti bioattivi è stata un'altra importante sfida affrontata in questo lavoro di dottorato. In particolare, in questo campo sono stati selezionati astaxantina e beta-carotene per le loro proprietà nutraceutiche. Il principale risultato di questa indagine non è stato solo il miglioramento della biodisponibilità, ma anche la protezione dell'attività antiossidante e della durata di conservazione del composto bioattivo. Particelle definite e sferiche sono state prodotte mediante la tecnica SEE-C utilizzando etilcellulosa, PLA e PLGA come carriers polimerici.

In dettaglio, la tecnologia SEE-C è stata utilizzata per incapsulare l'astaxantina in etilcellulosa (EC), ottenendo particelle con dimensione media di 363 nm ed efficienza di incapsulamento fino all'84%. Il β -carotene (β -CA) è stato incapsulato in PLGA e PLA utilizzando la tecnica SEE-C. L' α -tocoferolo (α -TOC) e l'acido rosmarinico (RA) sono stati proposti come eccipienti per migliorare la formulazione. Particelle di dimensioni comprese tra $1.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ e $0.3 \pm 0.07 \mu\text{m}$ sono state prodotte con efficienze di incapsulamento tra il 50 e l'80%. La co-incapsulazione di α -TOC con β -CA ha consentito di prolungare la durata di conservazione del farmaco. Entrambi i sistemi hanno conservato la loro attività antiossidante preservando il principio attivo dalla degradazione di luce, calore e ossigeno.

In conclusione, la tecnica SEE-C è stata applicata con successo per la produzione di microcapsule intelligenti in diversi campi, dimostrandosi un processo interessante dal punto di vista industriale.