



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Biomedica
A.A. 2022/2023**

**Tesi di Laurea Magistrale
Marzo 2023**

Modifiche superficiali di vetri inerti e bioattivi con rivestimenti polimerici depositati tramite plasma

Relatrice:
Dott.ssa Marta Miola
Correlatrice:
Prof.ssa Enrica Verne'

Candidato:
Kevin Pontillo



*Si ringrazia IRIS S.r.l per aver reso possibile,
in collaborazione con il Politecnico di Torino,
la realizzazione di questo elaborato.*

*Un ringraziamento particolare va alla relatrice, Dott.ssa Marta Miola,
alla correlatrice, Prof.ssa Enrica Verne', all'Ing. Chiara Iurlaro
e alla Dott.ssa Katuscia Costabello per la disponibilità e la costante supervisione.*

*Infine, vorrei ringraziare tutti coloro che mi hanno sostenuto in
questo importante percorso di studi.*

Indice

Indice	5
Abstract (versione italiana)	9
Abstract (English version)	11
Introduzione	13
1. Vetri e vetroceramici inerti	15
1.1. Vetro sodico-calcico (<i>soda-lime glass</i>).....	18
1.2. Vetri al boro	18
1.3. Zerodur®.....	19
2. Materiali per la bioingegneria	21
2.1. Risposta dell'organismo all'impianto	21
2.2. Adsorbimento proteico.....	23
2.3. Adesione cellulare correlata all'adsorbimento proteico	24
3. Vetri e vetroceramici per il settore ortopedico	27
3.1. Tessuto osseo	27
3.2. Rigenerazione dell'osso	29
3.3. Vetri e vetroceramici bioattivi.....	29
3.4. Produzione di vetri bioattivi.....	31
3.5. Vetro bioattivo 45S5 Bioglass®	31
3.6. Vetro bioattivo S53P4.....	33
3.7. Vetroceramici apatite/wollastonite	34
4. Superfici antimicrobiche	37
4.1. L'infezione batterica	37
4.2. Principali strategie contro infezioni batteriche.....	39
4.3. Superfici antiadesive: superidrofobicità	39
4.3.1. Modello di Young.....	40
4.3.2. Modello di Wenzel	41
4.3.3. Modello di Cassie-Baxter	41
4.3.4. Superfici a chimica e topografia superidrofobica.....	42
4.3.5. Superfici superidrofobiche in natura: topografia multiscala	43
4.4. Superfici battericide	45
4.4.1. Topografia	45
4.4.2. Chimica superficiale.....	49
5. Modifiche superficiali	53
5.1. Chimica superficiale.....	53
5.2. Morfologia e topografia	55
6. Attivazione e funzionalizzazione di superfici: trattamenti al plasma	57
6.1. Plasma: generalità e possibili applicazioni.....	57

6.2. Parametri di impostazione del plasma gassoso	58
6.2.1. Pressione	59
6.2.2. Temperatura	59
6.2.3. Densità del plasma	60
6.2.4. Potenza.....	60
6.2.5. Tensione e corrente	60
6.3. Sorgenti di plasma gassoso	61
6.3.1. Plasma a radiofrequenza con scarica luminosa (<i>radiofrequency glow discharge, rfGD</i>).....	61
6.3.2. Plasma a risonanza di ciclotrone elettronico (<i>electron cyclotron resonance, ECR</i>)	62
6.3.3. Plasma a scarica effetto corona (<i>corona discharge</i>)	63
6.3.4. Plasma atmosferico ad arco.....	64
6.3.5. Plasma a scarica con barriera di dielettrico.....	65
6.3.6. Plasma ad arco in vuoto	66
6.3.7. Plasma al laser.....	67
6.4. Tecniche di modifica superficiale con plasma	68
6.4.1. <i>Sputtering</i>	68
6.4.2. <i>Etching</i>	69
6.4.3. <i>Implantation</i>	71
6.4.4. <i>Deposition</i>	72
6.5. Effetti del trattamento al plasma su materiali	75
6.5.1. Morfologia superficiale.....	75
6.5.2. Proprietà tribologiche.....	77
6.5.3. Gruppi funzionali superficiali	78
6.5.4. Effetti biologici	80
7. Sezione sperimentale	83
7.1. Materiali e metodi	83
7.1.1. Vetri bioattivi	83
7.1.2. Vetri inerti.....	84
7.1.3. Funzionalizzazione con plasma	84
7.2. Caratterizzazioni	85
7.2.1. Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS.....	86
7.2.2. Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico.....	87
7.2.3. Chimica superficiale: spettroscopia FTIR.....	88
7.2.4. Bagnabilità: WCA.....	90
7.2.5. Carica superficiale: potenziale zeta.....	90
7.2.6. Bioattività: test in SBF	91
7.2.7. Proprietà antiadesive: test batterici <i>in vitro</i>	93
7.3. Risultati	94

7.3.1.	Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS	94
7.3.2.	Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico	100
7.3.3.	Chimica superficiale: spettroscopia FTIR	102
7.3.4.	Bagnabilità: WCA	105
7.3.5.	Carica superficiale: potenziale zeta	107
7.3.6.	Bioattività: test in SBF	108
7.3.7.	Proprietà antiadesive: test batterici <i>in vitro</i>	120
7.4.	Conclusioni	123
	Bibliografia e sitografia	125

Abstract (versione italiana)

Per le loro proprietà ottiche, chimiche e meccaniche, i materiali vetrosi coprono vaste aree di interesse per il settore industriale, dalla produzione di oggetti di uso quotidiano fino all'impiego in ambito biomedico. Le caratteristiche di questi materiali possono spaziare molto da un'applicazione ad un'altra: la variazione della composizione chimica e la possibilità di subire modifiche a livello superficiale rendono i vetri estremamente versatili. Tuttavia, anche le superfici dei vetri sono soggette a contaminazione batterica. Per questo motivo, lo scopo principale di questo lavoro di tesi è quello di mettere a punto trattamenti superficiali per conferire a diverse tipologie di vetri (inerti e bioattivi) proprietà antiadesive e/o antimicrobiche nei confronti di agenti potenzialmente patogeni. In questa direzione, si può agire alla micro e nanoscala su diversi aspetti quali la morfologia, la topografia, la carica, la chimica e l'energia superficiali. Per alterare queste caratteristiche, sono quindi essenziali le tecniche di modifica superficiale compatibili con substrati in vetro, tra cui si annoverano i trattamenti al plasma a pressione atmosferica. Il plasma, infatti, oltre alla sterilizzazione e alla pulizia dei materiali, permette di ottenere svariate modifiche superficiali modulando i parametri di lavoro della camera, come gas di processo e condizioni del reattore, ad esempio temperatura e pressione.

L'attività di ricerca di questa tesi, condotta presso il Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia del Politecnico di Torino in collaborazione con IRIS S.r.l., si è focalizzata su una composizione di vetro inerte (da finestratura) e due di vetri/vetroceramici bioattivi (SBA2 e S53P4). Dopo la loro preparazione, i campioni sono stati attivati con plasma He/O₂ o He/N₂ e rivestiti con plasma He/HDMSO o He/F8261, rispettivamente, poi caratterizzati. Per investigare la morfologia e la composizione di questi materiali, è stata effettuata un'analisi al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) munito di spettroscopia a dispersione di energia (EDS), per l'analisi topografica e profilometrica si è svolta un'osservazione al microscopio confocale a laser ottico, per una stima della bagnabilità della superficie è stata condotto un test statico di angolo di contatto con acqua (WCA), al fine di investigare la chimica superficiale si è effettuata un'analisi spettroscopica in trasformata di Fourier nell'infrarosso (FTIR), con l'obiettivo di valutare la carica superficiale del materiale è stata condotta la misura del potenziale zeta, per testare la reattività in vitro sono state realizzate prove di bioattività in soluzione fisiologica simulata (SBF), per caratterizzare il comportamento delle superfici nei confronti di agenti patogeni sono stati svolti test batterici *in vitro*.

Abstract (English version)

Due to their optical, chemical, and mechanical properties, glass covers wide areas of interest for the industrial sector, from the production of everyday objects to the use in the biomedical field. The characteristics of these materials can vary greatly from one application to another: the variation of the chemical composition and the possibility of undergoing surface modifications make glass extremely versatile. However, glass surfaces are also prone to bacterial contamination. Therefore, the main purpose of this thesis work is to design surface treatments aimed to give to different types of glasses (inert and bioactive) anti-adhesive and/or antimicrobial properties against potentially pathogenic agents. In this direction, it is possible to act at the micro and nanoscale on various aspects such as surface morphology, topography, charge, chemistry, and energy. To modify these characteristics, surface modification techniques compatible with glass substrates are essential, including atmospheric pressure plasma treatments. The plasma, indeed, in addition to the sterilization and cleaning of materials, allows to obtain various surface modifications by modulating the working parameters of the chamber, such as process gas and reactor conditions, for example, temperature and pressure.

The research activity of this thesis, conducted at the Department of Applied Science and Technology of the Politecnico di Torino in collaboration with IRIS S.r.l., focused on a composition of inert glass (for fenestration) and two of bioactive glass/glass-ceramics (SBA2 and S53P4). After their preparation, the samples were activated with He/O₂ or He/N₂ plasma and coated with He/HDMSO or He/F8261 plasma, respectively, then characterized. To investigate the morphology and composition of these materials, a Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM) equipped with energy dispersive spectroscopy (EDS) analysis was performed; for the topographical and profilometric analysis an optical laser confocal microscope observation was performed; for an estimation of the wettability of the surface a static Water Contact Angle (WCA) test was conducted; to investigate the functional groups grafted to the surface a Fourier Transform InfraRed (FTIR) spectroscopic analysis was performed; in order to evaluate the surface charge of the material the measurement of the zeta potential was carried out, the *in vitro* bioactivity tests were carried out in simulated physiological solution (SBF), *in vitro* bacterial tests were carried out to characterize the behavior of the surfaces against pathogens.

Introduzione

I materiali più utilizzati in ambito industriale comprendono polimeri, metalli, vetri, vetroceramici e loro compositi. Questi si adattano brillantemente ad applicazioni in vari settori, quali il meccanico, l'edilizio, l'elettronico, il biomedico e così via, e nelle forme più diversificate, da pezzi massivi a prodotti con porosità modulabile, a filamenti e fibre micro e nanometriche.

In applicazioni che richiedono proprietà ottiche di trasparenza nella vita di tutti i giorni, oltre a sostanze organiche (come il polimetilmetacrilato) hanno vasto impiego i vetri silicati. Questi vengono impiegati per diverse finalità, dalla realizzazione di bottiglie di bevande ai componenti trasparenti degli infissi, fino alla produzione di microchip elettronici e alla vetreria di laboratorio.

Talvolta, è essenziale impartire particolari finiture superficiali, sia da un punto di vista morfologico sia chimico, al fine di conferire a tali materiali proprietà specifiche, così da semplificare manutenzione e protocolli, come la pulizia di superfici o la prevenzione di infezioni batteriche. Si ritiene dunque fondamentale trattare la superficie dei materiali con metodi che promuovano un suo cambiamento stabile e duraturo, in diverse condizioni d'uso e per lunghe finestre temporali ma senza compromettere le proprietà ottiche e meccaniche del *bulk*.

Ad esempio, in molti studi è stata realizzata una modifica superficiale ispirata alle foglie di alcune piante, come il loto, che rende il materiale idrofobico ed autopulente: come si mostra in figura I, quando una goccia d'acqua rotola su una superficie di caratteristiche analoghe a quelle della foglia di loto porta con sé polvere e detriti lasciando pulito il tratto percorso, al contrario della superficie ordinaria.

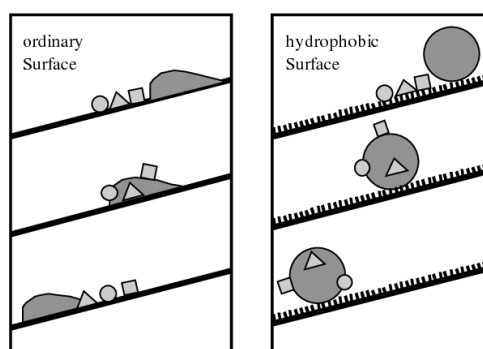


Figura I. Effetto di autopulizia di una superficie: confronto tra una superficie comune a sinistra ed una di chimica e morfologia specifica a destra (Benedix, Roland et al. "Application of Titanium Dioxide Photocatalysis to Create Self-Cleaning Building Materials.", 2001).

La modulazione della topografia e della chimica superficiale può essere ottenuta sottoponendo i materiali a tecniche di modifica della superficie, tra cui si menzionano i trattamenti al plasma. Questi ultimi sono in grado di alterare la rugosità del substrato consentendo al contempo l'aggraffaggio di gruppi funzionali contenenti silossani e/o fluorurati, essenziali per ottenere l'abbassamento dell'energia libera di superficie e quindi l'idrofobicità.

In questa tesi, campioni di vetro inerte e bioattivo sono stati trattati al plasma per ridurre l'energia libera superficiale, dunque la bagnabilità, con l'inserimento di esametildisilossano o fluorosilano in superficie a fini antiadesivi nei confronti di detriti e microbi.

1. Vetri e vetroceramici inerti

I vetri sono materiali solidi costituiti da ossidi, detti formatori di reticolo (principalmente silice ma anche ossidi di boro e fosforo), che globalmente non presentano un reticolo cristallino ordinato. La silice fusa, se non raffreddata con tempi sufficientemente lunghi, non è in grado di cristallizzare regolarmente in quarzo seguendo il diagramma di stato. Perciò, come si deduce dalla figura 1.1, il reticolo non presenta ordine a lungo raggio e mostra un'architettura tipica del liquido da cui ha avuto origine. La forma tetraedrica dell'unità fondamentale della silice amorfa non si ripropone con la periodicità tipica dei solidi cristallini, ma casualmente. Si può dunque affermare che i vetri non rientrano termodinamicamente nella categoria di solidi ma in quella di liquidi sottoraffreddati. L'assenza di domini cristallini, quindi di bordi di grano, garantisce la trasparenza del materiale. D'altra parte, lo stato vetroso, non essendo una condizione di equilibrio, tende ad evolvere verso situazioni più stabili, vale a dire che tende a cristallizzare.

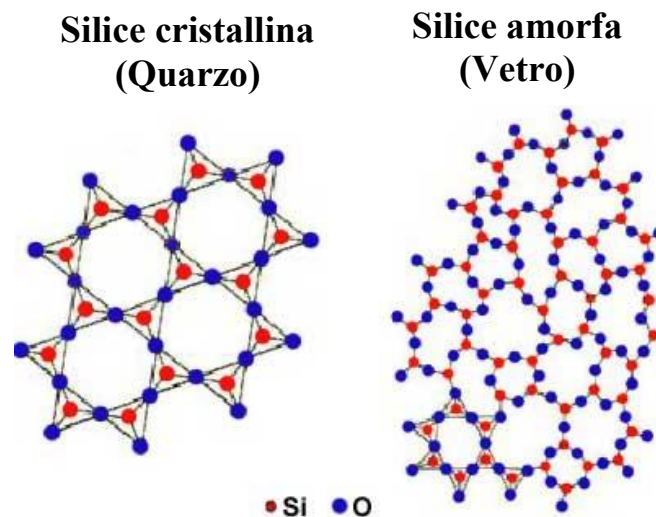


Figura 1.1. Rappresentazione qualitativa del reticolo cristallino del quarzo (a sinistra) e di quello del vetro (a destra). Immagine adattata da <https://physicsopenlab.org/2018/02/13/crystalline-and-amorphous-solids/>

Il vetro di silice può essere arricchito inserendo nella miscela ossidi modificatori di reticolo, tra cui quelli di metalli alcalini (Na_2O , K_2O , Li_2O , ecc.) o alcalino-terrosi (MgO , CaO , ecc.), che da soli non possono formare un vetro ma ne trasformano la struttura. Ad esempio, possono interpersi tra i rami troncati del reticolo amorfo posizionandosi a ridosso dell'ossigeno (non pontante) che presenta una densità di carica opposta rispetto ai cationi intromessi. Esistono anche ossidi intermedi (Al_2O_3 , PbO , ecc.) che da soli non formano

vetri ma possono sostituire un ossido formatore di reticolo. Le sostanze aggiunte in miscela sono classificate secondo il loro scopo come nella seguente tabella.¹

Categoria	Composto o classe chimici	Funzione
Fondenti	K ₂ O, Na ₂ O	Riduzione della T _g , abbassamento viscosità durante la lavorazione
Stabilizzanti	CaO, BaO, MgO, ZnO	Miglioramento proprietà meccaniche e chimiche
Affinanti	As ₂ O ₃ , nitrati alcalini e d'ammonio	Promozione dell'eliminazione di difetti
Coloranti	Ossidi di ferro, rame, cromo e cobalto	Alterazione cromatica
Decoloranti	MnO ₂	Neutralizzazione cromatica
Opacizzanti	Fosfati di sodio/calcio, cloruri di sodio/calcio, ossido di stagno, talco	Produzione di vetro opalino

La struttura amorfa implica, a differenza di alcuni polimeri e dei metalli, l'assenza di un punto di fusione riferito ai domini cristallini, ma la presenza di una temperatura di transizione vetrosa (T_g) che riguarda le regioni disordinate. Al di sotto di questa, i movimenti di torsione e rotazione di porzioni molecolari risultano "congelati", così come i movimenti traslazionali dell'intera molecola. A temperature inferiori a T_g, il materiale possiede energia sufficiente solo per le vibrazioni degli atomi intorno alle posizioni di equilibrio e per movimenti di pochi atomi nelle zone adiacenti. In queste circostanze il vetro risulta quindi duro ed estremamente viscoso: all'aumentare della temperatura, la sua viscosità diminuisce.

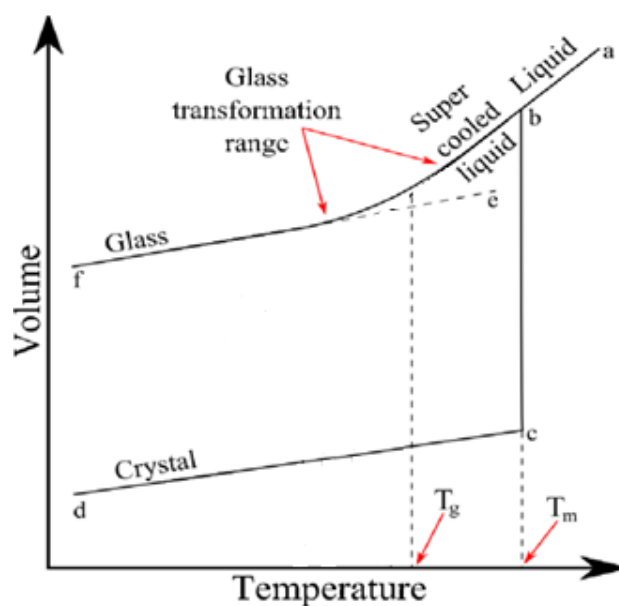


Figura 1.2. Potenziali curve di raffreddamento per la formazione di vetri o cristalli. (adattamento da Zheng et al., 2015)

In figura 1.2 si osserva il volume (specifico) del materiale in funzione della temperatura. Dallo stato liquido, raffreddando il materiale si assiste a due comportamenti: se la velocità di cristallizzazione è superiore a quella di raffreddamento, prevalgono la nucleazione e la crescita di domini cristallini, quindi compare una temperatura di fusione T_m in corrispondenza della quale si ha una brusca riduzione del volume specifico (passaggio da stato liquido a solido, percorso a-b-c-d); se la velocità di raffreddamento sovrasta quella di cristallizzazione, la diminuzione del volume specifico è più morbida (si apprezza a partire da T_g) e non si osserva il passaggio di stato da liquido a solido ma ad uno stato di liquido sottoraffreddato (percorso a-b-f). Al diminuire della velocità di raffreddamento del vetro, la curva si sposta verso il basso. Esistono materiali intermedi che contengono sia domini amorfi sia cristallini e prendono il nome di vetroceramici.

Dal diagramma tensione-deformazione in figura 1.3, è osservabile il comportamento fragile dei vetri: questi, se sottoposti a sforzo, presentano una deformazione elastica limitata ed una deformazione plastica quasi assente. Quando si supera il carico di snervamento, a differenza di metalli e polimeri, non si nota il fenomeno di incrudimento, bensì la rottura fragile del materiale, dal momento che i meccanismi che arrestano la propagazione della cricca nei materiali metallici sono assenti (es. bordi di grano che ostacolano il moto delle dislocazioni). Un parametro da tenere sotto controllo è la porosità: il modulo elastico diminuisce all'aumentare di questa, così come la resistenza a flessione. I materiali vetroceramici presentano modulo di Young, durezza, resistenza all'abrasione e alla rottura superiori a quelli del vetro di partenza, tuttavia perdono in trasparenza.

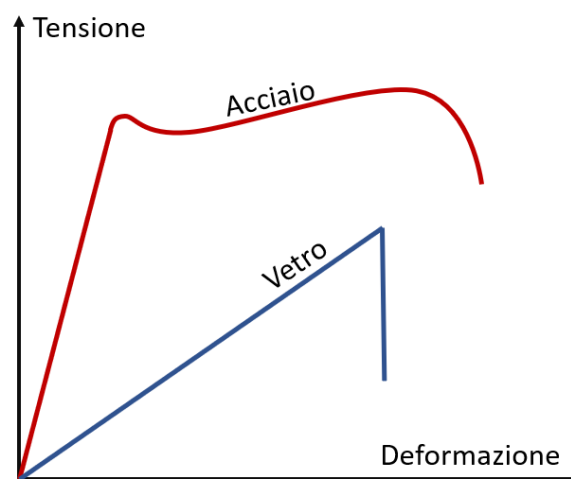


Figura 1.3. Diagramma qualitativo tensione-deformazione per un materiale duttile (acciaio) e uno fragile (vetro).

1.1. Vetro sodico-calcico (*soda-lime glass*)

La varietà di vetro più comune (90% dei vetri fabbricati) è il sodico-calcico, in inglese *soda-lime glass*, adoperato per pannelli delle finestre, contenitori di vetro (barattoli e bottiglie) per fini alimentari e per altri articoli commerciali. È il vetro più facilmente riciclabile per via della molteplicità di volte in cui può essere rammollito e rifuso. Il vetro *soda-lime*, rispetto alla silice pura che presenta una migliore inerzia allo shock termico ma un elevato punto di fusione (1713°C), permette la lavorazione a temperature più basse grazie alla riduzione della viscosità a caldo. Questo è possibile per l'aggiunta di carbonato di calcio (Na₂CO₃, "soda") che abbassa la T_g ma al contempo rende il vetro idrosolubile, effetto generalmente non voluto. Di conseguenza, viene aggiunto ossido di calcio (CaO, "lime" perché ottenuto da *limestone*, "calcare") che ne aumenta la stabilità chimica e la durata, insieme a quelli di magnesio e di alluminio. La composizione convenzionale del *soda-lime glass* prevede quindi 73-74%wt SiO₂, 13-14%wt Na₂O, 9-11%wt di CaO, 0.1-1.5%wt Al₂O₃, 0.2-4%wt MgO. Altri ossidi possono essere presenti sotto forma di impurità, quali K₂O (0.03-0.3%wt), Fe₂O₃ (0.04-0.1%wt, conferisce il sottotono cromatico verde), TiO₂ (0.01-0.02%wt). Il *soda-lime glass* presenta una temperatura di transizione vetrosa tra 564-573°C, densità di 2.52-2.53 g/cm³, temperatura di *liquidus* tra 1000-1040°C ed un coefficiente di espansione termica di 9-9.5·10⁻⁶ K⁻¹.

Il vetro *soda-lime* può essere suddiviso in due categorie, in base alla sua destinazione d'uso: *flat glass* (vetro piatto) per la fabbricazione di infissi e *container glass* (vetro per recipienti) per la realizzazione di contenitori, bottiglie, bicchieri, ecc. Oltre per i metodi di lavorazione (processo *float* per vetri piatti e soffiatura/pressatura per vetri da recipiente), le due tipologie di vetro differiscono anche per le percentuali di ossidi nelle composizioni: il *container glass* possiede un minor quantitativo di MgO e Na₂O e una maggior quantità di SiO₂, CaO e Al₂O₃ rispetto al *flat glass*, presentando quindi un minore apporto di ioni idrosolubili (magnesio e sodio) incompatibili con il prolungato contatto con cibi e bevande.

1.2. Vetri al boro

Per le sue straordinarie caratteristiche di inerzia chimica e termica, tra le tipologie di vetro più utilizzate si ricorda quella al boro, che include vetri commercialmente noti con i nomi di Pyrex® e Duran®. I vetri borosilicati presentano composizioni chimiche variabili: 70-80%wt SiO₂, 7-13%wt B₂O₃, 4-8%wt ossidi di metalli alcalini (Na₂O e K₂O), 2-7%wt Al₂O₃ e 0-5%wt ossidi di metalli alcalini terrosi (CaO, MgO, ecc.). I vetri borosilicati

mostrano una transizione vetrosa a 525°C e un punto di rammollimento a 825°C. Questo tipo di vetro presenta una notevole resistenza agli sbalzi di temperatura (anche di 165°C, rispetto ai 55°C del *soda-lime*) per il suo basso coefficiente di dilatazione termica ($3.3 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$), che riduce eccezionalmente lo stress termico causato da gradienti di temperatura². Tale caratteristica permette di fabbricare pentole e stoviglie da cucina resistenti agli shock termici.

La sostituzione di ossidi alcalini da parte di B_2O_3 nel reticolo amorfo di SiO_2 causa una minore espansione per la presenza di atomi di boro trivalenti. La presenza di questo elemento riduce la densità del Pyrex® (2.23 g/cm^3) rispetto ai vetri più comuni (*soda-lime*) data la sua minore massa atomica. I vetri borosilicati mostrano un'eccellente resistenza alla corrosione (ad esclusione dell'acido fluoridrico, HF) in ambienti di pH estremo senza riportare impatti rilevanti sul materiale; per questa ragione viene utilizzato per la vetreria da laboratorio.

1.3. Zerodur®

Tra i vetroceramici per applicazioni tecniche, dalle straordinarie caratteristiche di resistenza al calore è lo Zerodur®. Rientra nella classe di vetroceramici appartenenti al sistema $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-Li}_2\text{O}$. Possedendo un coefficiente di dilatazione termica molto ridotto ($0.02 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ a 0-50°C) ed omogeneo in tutto il materiale, si impiega per la produzione di specchi di telescopi che mantengano una buona figura ottica (ossia quanto una superficie ottica si discosta dal suo valore di progettazione ideale³) in ambienti estremamente freddi come lo spazio profondo. La sua bassa tendenza alla dilatazione in condizioni di stress termico trova impiego anche in tecniche di microlitografia e trattamenti al plasma.

Lo Zerodur® presenta una composizione complessa (55.4%wt SiO_2 , 25.4%wt Al_2O_3 , 3.7%wt Li_2O , 0.2%wt Na_2O , 0.6%wt K_2O , 1%wt MgO , 1.6%wt ZnO , 7.2%wt P_2O_5 , 2.3%wt TiO_2 , 1.8%wt ZrO_2 , 0.6%wt AsO_3)⁴ che conferisce una durezza simile a quella dei vetri borosilicati ma un'ardua lavorabilità con metodi tradizionali, a causa dell'elevata percentuale di allumina⁵. Il metodo di lavorazione più efficace è il *grinding* a controllo numerico computerizzato (CNC), in cui dei granuli in movimento asportano via il materiale dalla superficie del pezzo, portando al contempo alla formazione di difetti sub-superficiali; per questo motivo, sono necessari dei trattamenti *post-grinding* per il miglioramento della finitura superficiale. Il processo CNC consente la manifattura di pezzi di geometria complessa con una precisione elevata⁶.

2. Materiali per la bioingegneria

Un settore in continua crescita che offre un ampio panorama commerciale è quello della medicina rigenerativa. Tale ambito si occupa del ripristino delle funzioni fisiologiche di cellule, tessuti od organi, nell'eventualità di una loro totale o parziale perdita, impiegando materiali atti ad offrire una certa tolleranza o risposta da parte dell'organismo che lo ospita. Entrano quindi in gioco i biomateriali, che possono essere definiti come sostanze o insieme di sostanze non vitali impiegate per realizzare un dispositivo medico che si interfaccia, limitatamente o integralmente, con un tessuto vivente.

Nasce così l'esigenza di investigare quali materiali rispettino le specifiche che li rendano *biomateriali*. Requisito comune che deve essere soddisfatto è la biocompatibilità, definita come la capacità di un dispositivo medico o materiale di operare con un'adeguata risposta dell'ospite in una specifica applicazione. Tale peculiarità è dimostrata in vitro tramite esperimenti che provino la vitalità delle cellule dopo un certo tempo a contatto con la superficie del materiale da testare. Le interazioni a scala microscopica che avvengono tra i tessuti biologici e il materiale estraneo coinvolgono la sua superficie e le cellule viventi. Bisogna quindi distinguere ciò che succede al materiale impiantato e ciò che accade all'organismo che lo ospita. Tale distinzione si ricompona nella risposta biologica, che determina la biodegradabilità del biomateriale in funzione delle sue caratteristiche superficiali. Da questa prospettiva, è possibile distinguere quattro tipologie di materiali:

- Bioinerti: queste sostanze svolgono un ruolo passivo, non inducono una risposta apprezzabile da parte dell'ospite e in genere possiedono una capacità biodegradativa estremamente limitata;
- Bioattivi: tali materiali possono suscitare una risposta positiva da parte dell'organismo;
- Biorisorbibili: possono degradarsi al contatto coi fluidi biologici decomponendosi in sostanze non tossiche;
- Biomimetici: evoluzione dei precedenti, sono in grado di simulare l'ambiente nativo in cui sono inseriti o che devono sostituire, provvedendo alla segnalazione biologica tramite *pathway* chimici.

2.1. Risposta dell'organismo all'impianto

Non appena il materiale viene impiantato, avviene il contatto tra la superficie del materiale e le molecole d'acqua presenti nei fluidi biologici, che formano un guscio nell'ordine dei

nanosecondi. La natura di questa interazione dipende fortemente dalle proprietà superficiali del materiale ed è essenziale per il passo successivo, che comprende l'adsorbimento specifico e dipendente dal tempo di proteine presenti inizialmente nella matrice extracellulare. Tale evento copre una scala temporale dai secondi alle ore. Successivamente si verifica il raggiungimento della superficie dell'impianto da parte delle cellule che, in poche ore fino a diversi giorni, migrano, aderiscono e si differenziano producendo opportuni indicatori chimici. Quest'ultimo passo è fortemente influenzato da specifiche proteine (del citoscheletro, della membrana cellulare ed extracellulari), da fattori solubili rilasciati a causa della degradazione del materiale, da caratteristiche chimiche e morfologiche della sua superficie e dalla sua porosità. Infine, l'innesto di un biomateriale può avere esito positivo, manifestandosi con una totale integrazione coi tessuti, a partire da alcuni giorni fino a diversi decenni in base alla tipologia d'impianto⁷.

Quando un biomateriale non possiede una particolare affinità per le cellule bersaglio, la neoformazione di tessuto viene meno per l'assenza di opportuni segnali fisico-chimici. In questo caso possono verificarsi delle reazioni avverse. Fondamentali per il successo di un biomateriale si dimostrano i metodi di segnalazione biochimica adottati dal sistema immunitario nella risposta da corpo estraneo (*foreign body response*, FBR). In questo meccanismo, si avviano una serie di cascate di segnalazione biochimica nel sito d'impianto da parte dell'organismo, dando inizio alla fase di infiammazione. Immediatamente prima a questo stadio, che si estende dalle ore ai giorni, l'adsorbimento proteico, l'attivazione delle piastrine e i neutrofilo guidano la pulizia della ferita e la formazione di matrice provvisoria. Per manipolare la conseguente risposta infiammatoria, la superficie del materiale è importante per l'affinità proteica e deve presentare siti a cui le proteine possano legarsi; queste ultime possono cambiare conformazione funzionando da ligandi per i recettori extracellulari. Conformazioni proteiche diverse portano a *pathway* di segnalazione e a risposte cellulari differenti.

Durante l'infiammazione, si osserva il reclutamento di monociti, che possono differenziare in due differenti fenotipi: i macrofagi di tipo 1, che governano la fase acuta del processo rilasciando fattori solubili pro-infiammatori, e quelli di tipo 2, che dominano invece la successiva fase cronica liberando invece sostanze antinfiammatorie. È proprio l'equilibrio tra questi due fenotipi cellulari che determina l'efficacia del processo di guarigione della ferita e la corretta integrazione del dispositivo impiantato. Nella fase cronica dell'infiammazione, i macrofagi di tipo 2 possono fondersi grazie al rilascio di citochine

da parte di mastociti e cellule T, generando cellule giganti da corpo estraneo (*foreign body giant cells*, FBGC). Queste sono in grado di reclutare fibroblasti portando alla formazione di una capsula fibrotica attorno al dispositivo⁷. La formazione dell'involucro di collagene dimostra che l'impianto non viene riconosciuto dall'organismo. In questa circostanza, l'interfaccia tra tessuto e biomateriale non è stabile in quanto il tessuto nativo non si ancora direttamente all'impianto, causando spesso il fallimento del dispositivo.

2.2. Adsorbimento proteico

Il rivestimento d'acqua che si forma in superficie al materiale nell'immediato post-impianto determina le modalità con cui le proteine del siero sanguigno vengono adsorbite. Ciò dipende dalle caratteristiche fisico-chimiche della superficie: la combinazione di diversi livelli di idrofilia, idrofobia, energia libera e carica superficiale comporta la maggiore affinità di alcune proteine rispetto ad altre. Tuttavia, sono da considerare anche la loro dimensione e concentrazione. Le proteine adsorbite in superficie variano nel tempo, secondo un processo dinamico competitivo detto "effetto Vroman", rappresentato in figura 2.1, secondo cui inizialmente verranno adsorbite le proteine a basso peso molecolare e ad elevata concentrazione; in secondo luogo, queste verranno sostituite da proteine più massicce e presenti in concentrazioni minori ma con maggiore affinità per la superficie.⁸

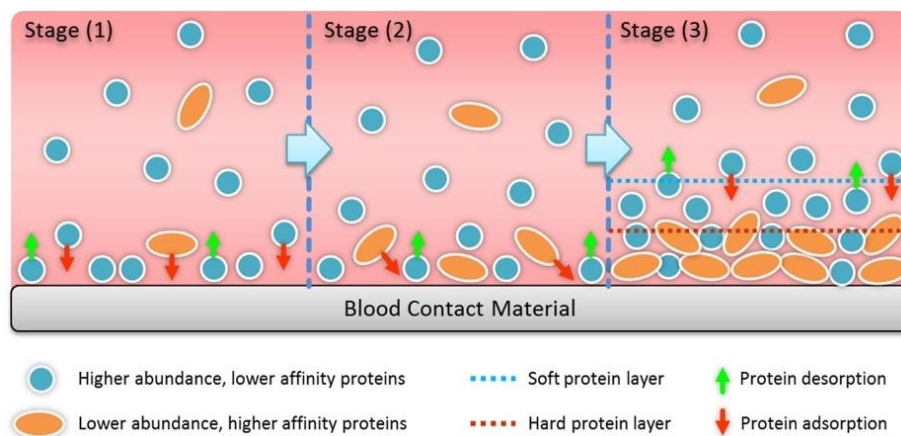


Figura 2.1. Effetto Vroman: nello stadio 1 le proteine più abbondanti ma a bassa affinità vengono adsorbite dalla superficie del materiale a contatto con il sangue; nello stadio 2 avviene il desorbimento delle proteine a bassa affinità e la loro sostituzione con quelle ad elevata affinità; nello stadio 3 si osserva la stratificazione stabile delle due tipologie di proteine. (Chen et al., 2022)

Oltre alla simultanea presenza di più tipologie di proteine, è da considerare la loro conformazione, ossia la variazione della distanza relativa tra gli amminoacidi che le compongono, e il loro orientamento, vale a dire la loro posizione nello spazio tridimensionale a conformazione fissata. Questi parametri vengono variati nel momento in

cui si verifica la denaturazione delle proteine, portando all'esposizione o alla messa in ombra di particolari siti attivi che diventano disponibili o meno per nuove interazioni. L'alterazione delle proteine può essere causata dall'interazione stessa con la superficie del materiale: se questa è idrofila, la proteina tenderà a nascondere i gruppi idrofobi all'interno esponendo invece quelli polari. Oltre all'interazione con la superficie, bisogna considerare anche l'eventuale formazione di legami deboli tra proteine. È necessario tenere conto di tutti i fattori che porterebbero le proteine adsorbite a variare la propria conformazione od orientamento, poiché un oscuramento dei loro siti attivi potrebbe significare una compromessa comunicazione cellulare⁹.

2.3. Adesione cellulare correlata all'adsorbimento proteico

Le cellule sono in grado di perlustrare la superficie del biomateriale attraverso lo strato proteico adsorbito che lo riveste, sfruttando delle protrusioni che si infiltrano tra i peptidi oppure digerendoli gradualmente. Ciò avviene in prevalenza a seguito dell'adesione cellulare, in quanto precedentemente le cellule fanno affidamento alla conformazione e alla geometria che le proteine assumono in funzione del biomateriale a cui aderiscono⁹. Emerge qui il ruolo di "interprete" svolto dalle proteine, capaci di trasmettere l'informazione dal biomateriale alla cellula. Per stabilire il tipo di risposta cellulare, è dunque essenziale funzionalizzare il biomateriale in modo da renderlo affine alle biomolecole che consentano di mandare gli opportuni segnali di reclutamento, proliferazione e adesione alle cellule d'interesse. È stato osservato che le cellule aderiscono preferenzialmente su superfici rugose e idrofobiche poiché mediano l'adsorbimento di proteine di adesione¹⁰.

Il posizionamento strategico di gruppi superficiali può, oltre a mettere in comunicazione il biomateriale e la biomolecola funzionale, condizionare il destino di una cellula. Questo avviene mediante l'adsorbimento specifico di proteine per via dell'affinità che queste hanno con i gruppi funzionali esposti. I gruppi che suscitano maggior interesse includono quello metilico (-CH₃), quello ossidrilico (-OH), quello carbossilico (-COOH) e quello amminico (-NH₂). I primi due gruppi, essendo neutri, non mostrano un significativo numero di proteine adsorbite rispetto agli ultimi due, che possiedono invece una carica netta. Questo si traduce in una limitata migrazione cellulare per i gruppi -CH₃ e -OH, a differenza di -COOH e -NH₂. D'altra parte, è stato dimostrato che il gruppo funzionale non influenza direttamente il differenziamento della cellula quando l'area di diffusione cellulare è fissata. Ciò è stato dedotto per mezzo della progettazione di una serie di "microisole" costituite da

self-assembled monolayer (SAM) di superficie limitata su cui le cellule possono aderire senza diffondere. In questo modo l'effetto sul differenziamento provocato dalla diffusione è stato neutralizzato. È emerso che l'influenza dei gruppi superficiali sul differenziamento cellulare è solo di tipo indiretto, in quanto massimizzano l'adsorbimento di proteine che governa l'adesione aspecifica e la diffusione (*spreading*) cellulare¹¹.

3. Vetri e vetroceramici per il settore ortopedico

In seguito ad eventi traumatici e/o patologici, sovente si ricorre al trattamento della lesione attraverso l'impiego di biomateriali che garantiscano un'efficace integrazione con il tessuto interessato. Per quanto riguarda l'osso, è indispensabile l'intervento di sostanze che favoriscano la migrazione cellulare nella zona lesa, al fine di rigenerare completamente il tessuto danneggiato. A questo fine, i vetri e i vetroceramici bioattivi hanno riscosso un notevole successo su esperimenti sia *in vitro* sia *in vivo*. Questi biomateriali possono essere impiegati in varie forme e modalità: rivestimenti di protesi articolari, sostitutivi ossei e spaziatori intervertebrali sono solo alcune delle applicazioni nel settore ortopedico.

3.1. Tessuto osseo

Il tessuto osseo svolge numerose funzioni nel corpo umano, dal sostegno meccanico al collegamento con muscoli e altri tessuti per consentire il movimento, alla protezione degli organi interni da urti e lesioni. Questo tessuto dalla struttura gerarchica è composto dal 20% di acqua, dal 30-35% di matrice organica e dal 65-70% di sostanze inorganiche. Il collagene, che rappresenta il componente prevalente della fase organica, possiede una struttura a tripla elica costituita da diverse fibre intrecciate tra loro che conferiscono resistenza a trazione e elasticità dell'architettura ossea. Gli elementi base del collagene, le fibrille, si organizzano in fibre, aggregati di dimensione maggiore che si orientano parallelamente fra loro ospitando cristalli di matrice inorganica. A loro volta, le fibre si dispongono in complessi ordinati detti lamelle. Il costituente principale della fase inorganica è l'idrossiapatite (HAp), un sale doppio costituito da fosfato tricalcico e idrossido di calcio, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Essa determina le proprietà meccaniche dell'osso e si trova al suo interno sottoforma di cristalli molto fini, allungati e interconnessi, delle dimensioni di circa $2 \times 20 \times 40$ nm.

Il tessuto osseo si può differenziare in due sottocategorie, distinguibili per il modo in cui le lamelle sono disposte: l'osso corticale, che costituisce la parte di rivestimento delle ossa, e l'osso trabecolare, che si trova invece nelle zone distali (epifisi) delle ossa lunghe. Nella prima tipologia si osservano strutture concentriche che si costruiscono attorno ad un canale (detto Haversiano) dentro cui passa un capillare. Nel secondo tipo si osserva invece una struttura trabecolare delle lamelle, disposte in modo da trasferire al meglio i carichi da un'estremità all'altra dell'osso.

Le cellule del tessuto osseo risiedono nella matrice organica calcificata. I capillari che permeano l'osso consentono l'approvvigionamento di nutrienti e ossigeno e l'allontanamento di metaboliti e anidride carbonica per la sopravvivenza delle cellule. Si riscontrano vari fenotipi cellulari nel tessuto osseo:

- Osteoblasti: sono cellule cuboidali che si trovano prevalentemente in superficie; comprendono circa il 5% delle cellule totali del tessuto osseo. Il loro ruolo è quello di formare nuovo tessuto osseo (osteoidi) che verrà successivamente calcificato. Presentano un aspetto tipico di cellule atte alla sintesi proteica, in quanto si osservano un apparato di Golgi ed un reticolo endoplasmatico ruvido sovrabbondanti. Al tempo stesso, attività di secrezione vescicolare è rilevante¹².
- Cellule di rivestimento dell'osso (*bone lining cells*): hanno l'aspetto di osteoblasti allungati e risiedono, in stato di riposo, nella zona in cui non si ha né rimozione né deposizione di matrice ossea. Possono svolgere funzioni secretive e, intromettendosi tra osteoclasti e matrice, possono impedire il riassorbimento di osso in zone in cui non dovrebbe avvenire. Queste cellule possono inibire o favorire la differenziazione degli osteoblasti producendo sostanze quali osteoprotegerina (OPG) o l'attivatore recettore del fattore nucleare κ -B (RANK), rispettivamente¹².
- Osteociti: costituiscono circa il 90-95% delle cellule ossee, hanno un'aspettativa di vita molto ampia e derivano dal differenziamento di osteoblasti. Presentano un centro che poi si ramifica a formare il sistema lacuno-canalicolare. Nonostante non partecipino ad attività di deposito o rimozione di tessuto osseo, non svolgono un ruolo passivo, bensì sono utili alla comunicazione cellula-cellula e alla meccanopercezione¹².
- Osteoclasti: sono cellule di dimensioni maggiori rispetto alle precedenti e presentano più nuclei. Sono responsabili del riassorbimento osseo e sono capaci di polarizzare durante la loro azione demolitiva, mostrando zone che entrano in contatto con la matrice ossea e zone che non la toccano¹².

L'attività costruttiva e distruttiva di osteoblasti e osteoclasti è alla base del rimodellamento osseo, che definisce il costante *turnover* delle cellule del tessuto dettato dagli sforzi meccanici percepiti. Un osso correttamente stimolato tende a rinnovarsi nel tempo, viceversa se non soggetto a sollecitazioni verrà lentamente riassorbito, portando ad un cospicuo fragilimento della struttura ossea. Questa avversità può presentarsi anche a livello di segnalazione biochimica: se la comunicazione cellula-cellula viene meno, si

assiste ad uno squilibrio tra deposizione e riassorbimento di osso, che può portare a condizioni patologiche del tessuto, quali osteopetrosi qualora prevalesse l'attività osteoblastica e osteoporosi qualora governi quella osteoclastica.

3.2. Rigenerazione dell'osso

Per quanto riguarda gli Stati Uniti d'America, la stima del numero di fratture ossee ammonta a circa 15 milioni all'anno, di cui 1.6 milioni di natura traumatica mentre 2 milioni di natura osteoporotica. Il costo complessivo può raggiungere i 60 miliardi di dollari annui e la richiesta oscilla attorno a 1.6 milioni di innesti l'anno. La tendenza crescente è osservabile analogamente nel resto del mondo¹³.

Il tessuto osseo è in grado di rigenerarsi autonomamente, in particolar modo negli individui più giovani. Un'eccessiva perdita di osso, causato da patologie, lesioni o tumori ossei, può portare a difetti ossei di grande estensione, che vengono definiti oltre una dimensione critica (*critical-size defect*, CSD) determinata da 2-2,5 volte il diametro dell'osso leso¹². Il processo di guarigione nel caso delle lesioni oltre la soglia CSD è compromesso: è necessario quindi fare affidamento ad innesti ossei.

Gli innesti di osso autologo possono essere sfruttati per risolvere difetti di piccola entità, ma presentano alcuni problemi. Una strategia alternativa per lesioni estese consiste nella realizzazione di innesti allogenici. Con questa tecnica, a differenza degli innesti autologhi, il paziente non soffre di morbidità del sito donatore: si è dimostrato in uno studio che il tasso di complicanze minori, tra cui infezioni superficiali, perdita di sensibilità temporanea e lieve dolore, è stato stimato del 20.6%, mentre le complicanze maggiori, che includevano drenaggio della ferita, infezioni profonde, dolore e perdita sensoriale prolungati, ematomi estesi, cicatrici antiestetiche, si sono verificate con un'incidenza dell'8.6% su un campione di 243 innesti ossei autogeni in 239 pazienti¹⁴. Una problematica che emerge dall'uso di innesti allogenici è il rischio di trasmissione di patologie e di rigetto da parte del sistema immunitario, che comporterebbe un prolungato uso di farmaci immunosoppressori. Inoltre, il numero di donatori compatibili con il paziente non compensa adeguatamente la richiesta clinica¹³.

3.3. Vetri e vetroceramici bioattivi

È fondamentale adottare strategie alternative agli innesti ossei: un metodo promettente, frutto dell'ingegneria del tessuto osseo (*bone tissue engineering*, BTE) consiste nella

realizzazione di dispositivi impiantabili in materiale bioattivo. Solitamente, vengono realizzati piccoli riempitivi ossei o rivestimenti di dispositivi impiantabili utilizzando vetri e vetroceramici in grado di promuovere la precipitazione di idrossiapatite (*in vivo* e *in vitro*) secondo un particolare meccanismo di bioattività. Questo consta di una dinamica alterazione della superficie del materiale al contatto con i fluidi biologici, dove entra in gioco la dissoluzione del biomateriale con conseguente rilascio di ioni nell'organismo. Tali ioni, tra cui si annoverano quelli di Si, Ca, P e Na, svolgono un ruolo cruciale nell'espressione genica degli osteoblasti.¹⁵

La bioattività di un materiale può essere investigata misurando la velocità di formazione del legame all'interfaccia tra tessuto e impianto. La natura di tale legame dipende dal tipo di materiale utilizzato; possiamo quindi definire l'indice di bioattività come

$$I_B = \frac{100}{t_{0.5bb}}$$

dove $t_{0.5bb}$ è il tempo necessario affinché metà della superficie del materiale si leghi al tessuto¹⁶. L'indice di bioattività è strettamente correlato alla composizione del biovetro: al variare di quest'ultima, il materiale può legarsi o meno ad un tessuto duro e/o molle, come rappresentato nel diagramma ternario in figura 3.1. Qualsiasi materiale con un valore di I_B maggiore di 8, come il biovetro 45S5, si legherà sia ai tessuti molli che a quelli duri, mentre sostanze con valore $I_B < 8$ ma > 0 , come l'idrossiapatite sintetica, si legheranno solo ai tessuti duri¹⁷.

Si può svolgere una suddivisione dei materiali per BTE in base alle proprie caratteristiche di bioattività:

- Materiali osteoproduttivi e osteoconduttivi (classe A): reazioni superficiali veloci provocano l'aumento della concentrazione di ioni solubili, promuovendo la comunicazione chimica intra ed extracellulare. In questa categoria rientrano i vetri bioattivi 45S5¹⁸;
- Materiali osteoconduttivi (classe B): avviene una crescita ossea superficiale dovuta a reazioni meno immediate, provocando un rilascio limitato di ioni e dando luogo soltanto a reazioni extracellulari d'interfaccia. Capostipite di questa categoria è l'idrossiapatite¹⁸.

È importante menzionare che diverse tipologie di vetri bioattivi portano a differenze significative riguardo alle velocità di rigenerazione dell'osso *in vivo*.

3.4. Produzione di vetri bioattivi

Per la produzione convenzionale di biovetri si provvede alla fusione di miscele polverose di ossidi ad elevate temperature (1100-1400°C) in crogioli realizzati in metallo altofondente (es. Pt). Successivamente, si effettua una tempra del fuso in acqua o la ricottura in stampi resistenti alle alte temperature (es. lega di ottone). I processi di fusione tradizionali non consentono la realizzazione di vetri di varia composizione, a causa della temperatura di *liquidus* molto elevata della silice (oltre i 1700°C) unitamente alla viscosità del fuso qualora si eccedesse con la percentuale di SiO₂ contenuta¹⁵.

Un processo alternativo per la produzione di biovetri sfrutta la transizione sol-gel a temperatura ambiente: si verifica una reazione di polimerizzazione di precursori organici per formare un gel reticolato inorganico. Successivamente si effettuano invecchiamento, essiccazione e stabilizzazione del gel. La formazione del vetro avviene riscaldando il gel a temperature contenute, intorno a 600-700°C¹⁵. Questo processo a bassa temperatura presenta numerosi vantaggi rispetto ai tradizionali processi di fusione: la struttura nanoporosa che si osserva nei biovetri ottenuti da processo sol-gel, non osservabile nei biovetri convenzionali, può portare a una superficie specifica più ampia implicando una bioattività e una velocità di degradazione più elevate. Anche nel caso di composizioni binarie (es. 70% wt. SiO₂, 30% wt. CaO), i vetri prodotti da metodo sol-gel mostrano elevata bioattività, comparabilmente a vetri più complessi derivati da fuso. In aggiunta, si superano gli svantaggi della fusione convenzionale di possibile contaminazione, abbattendo anche costi di produzione¹⁵.

3.5. Vetro bioattivo 45S5 Bioglass®

Il primo vetro bioattivo (*bioactive glass*, BG) ad essere entrato in commercio è il Bioglass®, scoperto da Larry L. Hench nel 1969. Questo materiale coniuga la costruzione di un forte legame di interfaccia tessuto-impianto e l'attivazione genetica dei percorsi cellulari di segnalazione. La composizione del Bioglass®, chiamato anche 45S5, consta di 45% wt silice (SiO₂), 24.5% wt ossido di calcio (CaO), 24.5% wt ossido di sodio (Na₂O), 6% wt anidride fosforica (P₂O₅); tuttavia, è possibile sostituire parzialmente SiO₂ con anidride borica (B₂O₃) e CaO con fluoruro di calcio (CaF₂). L'aggiunta di allumina (Al₂O₃, massimo 3% wt) va controllata attentamente onde evitare un peggioramento della

bioattività. La considerevole presenza di ossidi di sodio e calcio e l'elevato rapporto $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ rendono la superficie estremamente reattiva in ambiente fisiologico: è stato dimostrato che, nonostante la semplice composizione, l'indice di biocompatibilità I_B di questo BG è il massimo tra tutti quelli investigati^{17,19}. La lavorabilità a caldo di questo BG è buona grazie alla vicinanza con l'eutettico del diagramma ternario $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$, visibile in figura 3.1. Il Bioglass® presenta una struttura costituita da unità fondamentali tetraedriche di SiO_4 che si interconnettono a formare una rete tridimensionale attraverso atomi di ossigeno pontanti tra atomi di silicio. Il network di silicati viene interrotto quando si incontrano atomi modificatori di reticolo, quali Ca e Na, che si legano all'ossigeno generando una discontinuità.

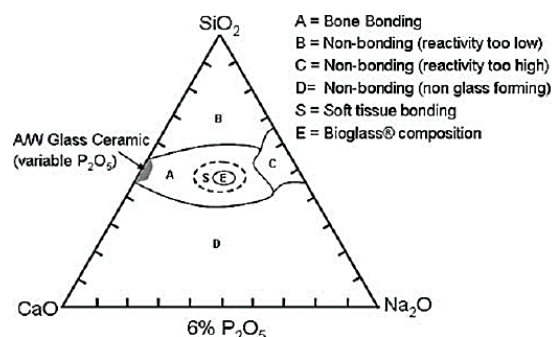
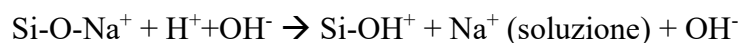


Figura 3.1. Diagramma ternario delle composizioni per il legame osseo. La regione S è una regione di bioattività di classe "bone bonding" in cui i vetri bioattivi (BG) si legano all'osso e ai tessuti molli. (Hench, 2006)

In figura 3.2 è schematizzato il meccanismo di bioattività di un biovetro. Quando un biovetro 45S5 è esposto ad una soluzione tampone di tris(idrossimetil)amminometano (TRIS) non contenente ioni di fosforo o calcio, avvengono in successione le seguenti reazioni¹⁷:

- Rapido scambio di ioni Na^+ , K^+ e Ca^{2+} con H^+ o H_3O^+ presenti nella soluzione:



La diffusione governa questo stadio con una dipendenza dal tempo del tipo $t^{-1/2}$.

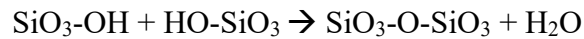
Il pH della soluzione aumenta a contatto con la superficie del vetro (da 7.4 a 9).

- Dissoluzione della silice sotto forma di $\text{Si}(\text{OH})_4$, risultante dalla rottura dei legami Si-O-Si e dalla formazione di Si-OH (silanoli) all'interfaccia della soluzione di vetro:



Questo step è controllato da reazioni d'interfaccia e mostra una dipendenza dal tempo di tipo $t^{1.0}$.

- Condensazione e ripolimerizzazione di silanoli a formare uno strato di gel di silice sulla superficie:



- Migrazione di ioni Ca^{2+} e PO_4^{3-} dalla superficie attraverso il gel di silice per formare uno strato amorfo di fosfati di calcio.
- Cristallizzazione dello strato amorfo di $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ tramite l'inglobamento di anioni OH^- , CO_3^{2-} o F^- dalla soluzione per formare uno strato di idrossi, carbonato o fluoroapatite.

Grazie alla formazione del gel di silice, i fattori di crescita rilasciati nella zona d'impianto vengono assorbiti dal biomateriale. L'osteinduzione si manifesta nel momento in cui la silice e gli ioni modificatori rilasciati attivano le cascate di segnalazione cellulare responsabili del differenziamento e della formazione di matrice ossea.

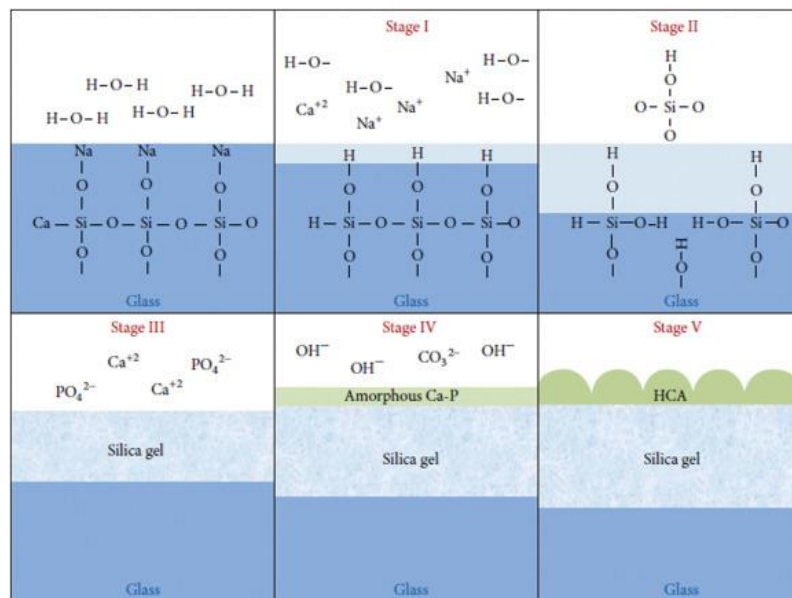


Figura 3.2. Schematizzazione del meccanismo di bioattività di un biovetro. (Varanasi, V. G. et al. *Surface Modifications and Surface Characterization of Biomaterials Used in Bone Healing*. in *Materials for Bone Disorders 405–452*, Elsevier, 2017)

3.6. Vetro bioattivo S53P4

Appartenente allo stesso sistema del Bioglass® è il vetro bioattivo S53P4, noto commercialmente come BonAlive®. Il meccanismo di bioattività di questo biomateriale, analogo a quello illustrato per il Bioglass®, confida nel rilascio di ioni calcio/sodio e silice solubile seguito da una ripolimerizzazione di una zona interna ricca di SiO_2 e di una esterna di idrossiapatite. La composizione del S53P4 consta di 53%wt SiO_2 , 23%wt Na_2O , 20%wt CaO , 4%wt P_2O_5 . Si nota come il contributo percentuale di silice sia superiore nel

BonAlive® rispetto al Bioglass®, causa della ritardata formazione degli strati tipici della bioattività in vivo e in vitro. Al contempo questo esubero genera una maggiore connettività del reticolo, permettendo una certa varietà di forme impartibili al vetro durante la lavorazione a caldo²⁰.

3.7. Vetroceramici apatite/wollastonite

I ceramici a base di allumina mostrano buona biocompatibilità ed elevata resistenza meccanica, ma non una capacità microscopica di legarsi stabilmente all'osso, al contrario di ceramici bioattivi a base di calcio e fosforo. Questi ultimi sono soggetti all'azione corrosiva in ambiente fisiologico, che porta alla formazione superficiale di apatite. Kokubo et al. investigarono il potere bioattivo di un vetroceramico (Cerabone®) da essi ideato, contenente domini cristallini di apatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F}_2, \text{O})$) e wollastonite (CaSiO_3). Questo materiale contiene una struttura a catena di silicati, rappresentata in figura 3.3, ottenuta per cristallizzazione di un vetro del sistema $\text{MgO-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaF}_2$. La composizione del vetroceramico presenta 38%wt fluoroapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), 34%wt β -wollastonite, 28%wt fase amorfa del suddetto vetro (4.6%wt MgO, 44.9%wt CaO, 34.2%wt SiO_2 , 16.3%wt P_2O_5 , 0.5%wt CaF_2). L'immersione del biomateriale in soluzioni fisiologiche ha portato alla formazione di uno strato di circa 1 μm di spessore ricco in calcio e fosforo, all'interfaccia tra vetroceramico e osso. Il loro legame si pensa derivi da due possibili modelli: la formazione iniziale di una struttura non fibrillare a cui si attaccano le fibrille di collagene e l'ancoraggio diretto delle fibre di collagene alla superficie del vetroceramico. Variazioni nella struttura chimica, nella cristallinità, nella solubilità e nella tipologia di saggio (*in vivo/in vitro*) possono portare a morfologie di legame d'interfaccia diverse^{21,22}.

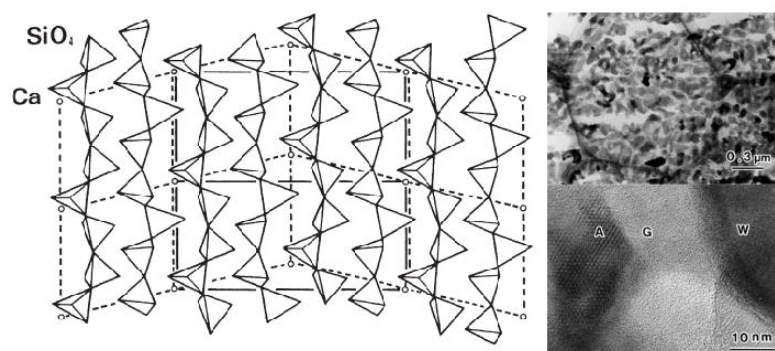


Figura 3.3. A sinistra, struttura della β -wollastonite; a destra, immagini TEM del vetroceramico A/W (A: apatite, G: stato amorfo, W: wollastonite) (Kokubo, 2008)

Il Cerabone® permette la soluzione di un numero elevato di ioni calcio e silicato, indispensabili nella formazione dello strato di apatite simile a quella ossea *in vitro* e *in vivo*.

Il meccanismo di bioattività interessa principalmente la fase amorfa:

- gli ioni PO_4^{3-} , essendo incorporati nell'apatite e presenti in grandi quantità nella soluzione tampone, non vengono disciolti;
- gli ioni Ca^{2+} , essendovi alte percentuali di CaO nel vetroceramico, possono aumentare la loro concentrazione essendo soprasaturi rispetto all'apatite;
- la silice idratata (Si-OH) può fornire siti preferenziali per la nucleazione dell'apatite sulla superficie del materiale A/W.
- L'afflusso di ioni calcio e fosfato dai fluidi circostanti innesca la creazione di nuclei cristallini, favorendo la crescita di idrossicarbonatoapatite.

La sostanziale differenza tra il meccanismo di azione del Bioglass® e quello del Cerabone® consiste nella generazione di uno strato di apatite sulla superficie senza la formazione uno strato di gel siliceo, la cui presenza impedisce una consistente forza di legame tra il materiale e l'osso²³.

4. Superfici antimicrobiche

Da un paio d'anni a questa parte, risultano di grande interesse le superfici antimicrobiche, specialmente in ambito sanitario. Varie interfacce, quali maniglie delle porte, lavabi, finestre, tavoli e sedie, in ambiente ospedaliero possono divenire vettori di trasmissione per agenti patogeni, tra cui batteri, virus e spore. Le infezioni batteriche possono interessare anche i dispositivi medici, in particolare e di più complicato trattamento quelli impiantabili: in questi casi è necessario ricorrere all'espanto e alla successiva cura dell'infezione.

4.1. L'infezione batterica

Si distinguono, illustrati in figura 4.1, due tipologie di batteri che mostrano diversa resistenza ad approcci battericidi:

- Batteri Gram-positivi (G+): presentano una spessa parete cellulare il cui lato esterno è costituito da un voluminoso strato di peptidoglicani (20-80 nm di spessore) che risultano di un color blu/viola se soggetti alla colorazione di Gram (violetto di genziana, si lega ai proteoglicani);
- Batteri Gram-negativi (G-): possiedono una membrana cellulare molto più sottile rispetto ai Gram-positivi, mostrando uno strato ridotto di proteoglicani (2-3 nm) interposto tra due membrane lipidiche; il colorante non è in grado di raggiungere questo *layer* e di conseguenza i batteri risultano di colore rosso.

L'infezione batterica dipende da un numero rilevante di variabili (energia superficiale, rugosità, bagnabilità, topografia, ecc.) che influiscono sull'adesione dei microrganismi alle superfici e sul conseguente sviluppo di *biofilm*, costituito dai batteri (15%) e dalla matrice extracellulare (85%) che questi secernono. Il processo di adesione batterica si compone di due parti: una iniziale reversibile, in cui il batterio aderisce grazie al contributo di forze deboli come interazioni elettrostatiche, di van der Waals ed idrofobiche tra cellula e substrato (in una scala temporale di circa un minuto), ed una finale irreversibile, durante la quale interazioni forti, come legami a idrogeno, covalenti ed idrofobiche generano una notevole forza di adesione. Nel primo stadio, il batterio può essere allontanato dalla superficie con l'applicazione di uno sforzo di taglio contenuto, provocato ad esempio da un flusso liquido, mentre nella seconda fase sono necessari agenti chimici oppure forze notevoli per estirpare le cellule batteriche, quali sonicazione e raschiatura²⁴.

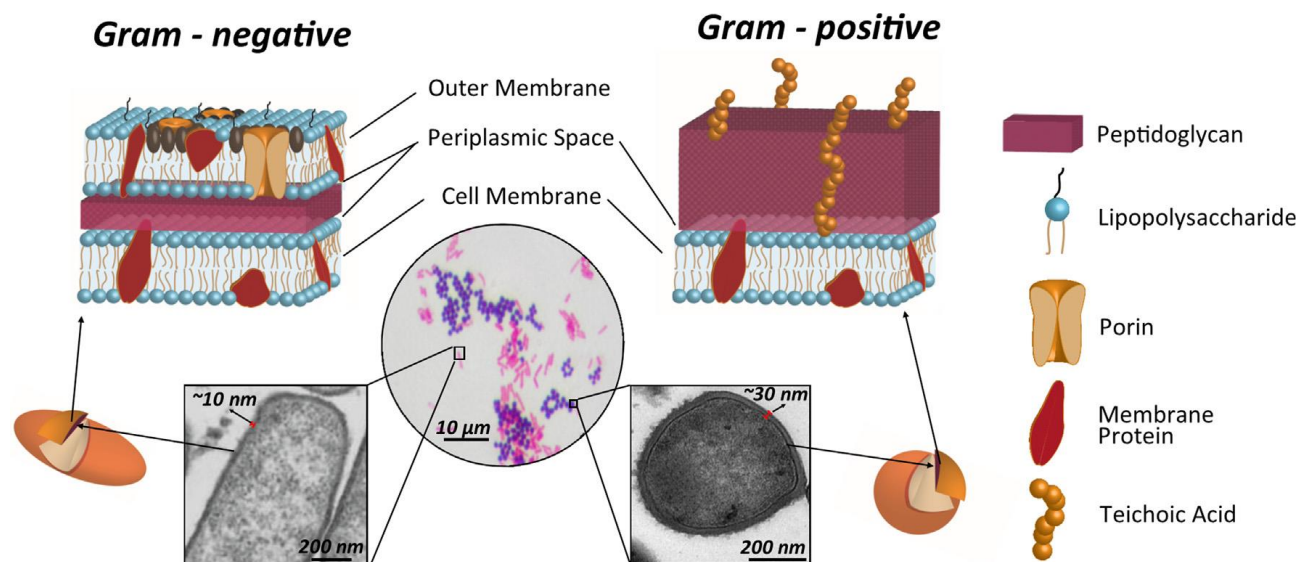


Figura 4.1 Rappresentazione schematica che evidenzia le differenze tra la struttura della membrana plasmatica di batteri Gram-negativi e Gram-positivi, con immagini al TEM di ceppi di batteri G- (*Pseudomonas aeruginosa*, a sinistra) e G- (*Staphylococcus aureus*, a destra). (Elbourne et al, 2019)

Generalmente, la formazione di *biofilm* avviene su superfici con rugosità ed idrofobicità tali da permettere la deposizione di opportune proteine; queste generano un ambiente ottimale per il raggiungimento e l'adsorbimento di batteri in forma planctonica, soprattutto se presenti alte concentrazioni di nutrienti. Una volta adese alla superficie, le cellule procariote possono comunicare tra loro tramite il rilascio di molecole segnalatrici (*quorum sensing*), avviando la costruzione del *biofilm* in modo auto-organizzato e cooperativo. Il trasporto convettivo e diffusivo di ossigeno e nutrienti favorisce l'edificazione del *biofilm* batterico, consentendo la replicazione cellulare e la crescita della matrice extracellulare. Raggiunto il giusto grado di maturazione, il *biofilm* presenta una forma "a fungo" che promuove il distacco di spore batteriche, le quali si allontanano al fine di ricominciare il loro ciclo vitale altrove.

Al fine di trattare un'infezione batterica avanzata, il solo uso di antibiotici potrebbe risultare poco efficace contro alcuni ceppi, detti *superbugs* ("superbatteri"), che hanno sviluppato nel tempo una notevole resistenza ai farmaci grazie ad una "evoluzione" genetica. Molte malattie di origine batterica che affliggono l'uomo sono infatti causate da infezioni di *superbugs*, quali *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e molti altri. Questi ceppi presentano varie mutazioni nel genoma, talvolta concedendo anche maggiori capacità trasmissive. Modifiche nei geni che codificano particolari enzimi, ad esempio la β -lattamasi, sono sovente causa di farmaco-resistenza ad antibiotici come penicilline e cefalosporine²⁵.

4.2. Principali strategie contro infezioni batteriche

I batteri, se non organizzati in un *biofilm* adeso ad una superficie, mostrano basse prospettive di sopravvivenza. Dunque, è utile intervenire affinché l'adesione non si verifichi a priori, o altrimenti sterminare i patogeni a posteriori. Si è reso necessario quindi lo sviluppo di strategie alternative e che coadiuvi o sostituisca l'azione dei farmaci convenzionali: impedendo l'adesione dei patogeni, sopprimendo la loro proliferazione su una superficie o provocandone la morte per stress meccanico, è possibile ridurre notevolmente la probabilità di infezione.

Un metodo efficace comprende la produzione di superfici antimicrobiche. Queste possono essere discriminate in più sottocategorie, in base all'effetto che produce sul microrganismo:

- Superfici antiadesive (*anti-biofouling*): impediscono l'adesione dei patogeni ostacolando la formazione di una colonia batterica;
- Superfici antimicrobiche: il loro meccanismo di azione entra in gioco successivamente all'adesione; possono essere ulteriormente distinte in due classi:
 - Batteriostatiche, che non permettono la proliferazione dei batteri adesi alla superficie;
 - Battericide, che inducono la morte del patogeno attraverso vari *pathway*.

Diverse tecniche di realizzazione di queste interfacce vertono sulle modifiche chimiche e fisiche delle superfici del materiale da trattare. È stato appurato che alcune molecole e particolari morfologie impediscano l'adesione batterica; in particolare, è possibile ricreare delle topografie di origine naturale osservate su flora e fauna che dimostrano un notevole potere antibatterico.

4.3. Superfici antiadesive: superidrofobicità

Per ottenere superfici a bassa adesione ed autopulenti si può sfruttare la topografia microscopica tipica di una superficie superidrofobica presente in natura. Ne sono un esempio le foglie di loto o le ali di cicale, capaci di allontanare efficacemente l'acqua dalla loro superficie formando con questa un angolo di contatto statico (*static water contact angle*, sWCA) elevato. Tramite la misura di quest'ultimo, si possono distinguere superfici superidrofiliche (sWCA compreso tra 0° e 10°), idrofiliche (sWCA compreso tra 10° e 90°, figura 4.2 c), idrofobiche (sWCA compreso tra 90° e 150°, figura 4.2 d) e superidrofobiche (sWCA > 150°, figura 4.2 e). Un'altra misura d'interesse è quella dell'isteresi dell'angolo

di contatto (*contact angle hysteresis*, CAH), che quantifica l'adesività della goccia d'acqua con il substrato ed è la differenza tra un angolo di avanzamento θ_A (misura di adesione solido-liquido) e uno di retrocessione θ_R (misura di coesione solido-liquido), illustrati in figura 4.3 b. Solitamente si ha $\theta_A > \theta_R$. L'inclinazione del piano su cui scorre la goccia rispetto all'orizzontale è detto angolo di *roll-off* (α) o *sliding angle* (SA). L'angolo per cui si ha slittamento (α_c) è dato dalla seguente relazione ottenuta da semplici osservazioni dinamiche:

$$\frac{mg \sin \alpha_c}{d} \approx \gamma_{LV} (\cos \theta_{R(\min)} - \cos \theta_{A(\max)})$$

dove m è la massa della goccia, g l'accelerazione di gravità e d il diametro della goccia d'acqua in pendenza. Una riduzione dell'isteresi dell'angolo di contatto porta ad un decremento di α_c . Il comportamento di gocce d'acqua su queste superfici è esplicabile da modelli microscopici di bagnabilità.

4.3.1. Modello di Young

Le molecole o gli atomi in superficie a solidi o liquidi possiedono un'energia maggiore rispetto a quelli all'interno, poiché non occupati in interazioni forti o deboli con altre particelle della stessa sostanza (figura 4.2 a). Al diminuire della tensione superficiale di un solido, lo sWCA aumenta.

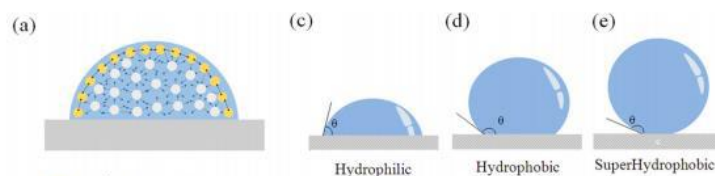


Figura 4.2 Tensione superficiale (a), angolo di contatto statico (sWCA) per una superficie idrofila (c), idrofoba (d) e superidrofobica (e).

Il modello di T. Young sancisce che l'energia d'interfaccia tra due superfici ha un valore specifico che è proporzionale all'area d'interfaccia. Young ha introdotto un'espressione quantitativa per l'angolo di contatto statico θ (figura 4.3 a) su una superficie piatta e liscia:

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}}$$

dove γ_{SL} , γ_{LV} e γ_{SV} sono la tensione d'interfaccia tra solido-liquido, liquido-vapore e solido-vapore mentre θ rappresenta l'angolo di contatto statico del liquido sulla superficie solida, come illustrato in figura 4.3 a²⁶.

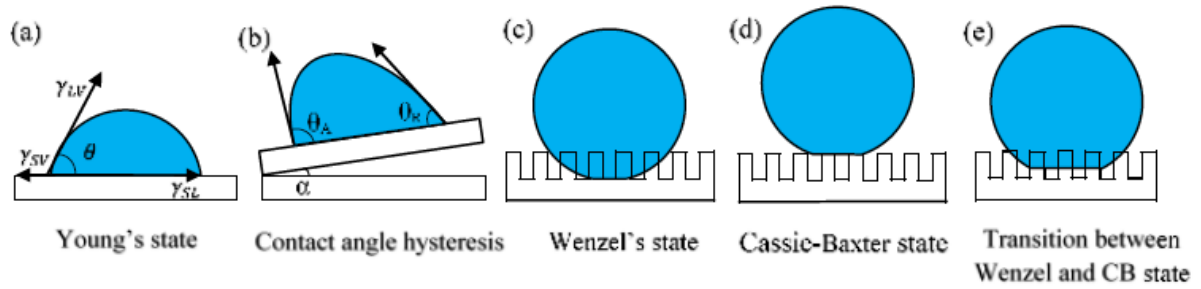


Figura 4.3 Vari stati di una goccia d'acqua su una superficie solida. (Parvate et al., 2020)

Il modello di Young spiega esaurientemente il fenomeno di idrofilia. Esistono altri modelli che illustrano approfonditamente il comportamento idrofobico di una superficie. Il modello di Wenzel (1936) e quello di Cassie-Baxter (1944) correlano l'angolo di contatto con la rugosità della superficie, considerando l'interfaccia solido-liquido e quella solido-liquido-aria, rispettivamente. In entrambi i modelli si assume le asperità siano omogenee sulla superficie e che la profondità/sporgenza delle asperità sia molto più piccola del raggio della goccia.²⁷

4.3.2. Modello di Wenzel

Nel modello di Wenzel (figura 4.3 c) si assume una superficie chimicamente omogenea la cui rugosità vengono completamente riempite dal liquido (ipotesi di bagnabilità omogenea). Ne risulta un'isteresi dell'angolo di contatto notevole che impedisce alla goccia di rotolare lungo la superficie inclinata. Wenzel ha ottenuto un'equazione che lega la rugosità superficiale (r , ossia il rapporto tra la superficie totale e quella planare) e l'angolo di contatto definito da Young (θ) all'effettivo sWCA su una superficie ruvida (θ_W):

$$\cos \theta_W = r \cos \theta$$

Per substrati con rugosità o porosità elevate, il valore assoluto del secondo membro dell'equazione di Wenzel potrebbe raggiungere valori maggiori di 1. In queste circostanze, dal momento che il modello di Wenzel è inadeguato, si presta meglio il modello di Cassie-Baxter.

4.3.3. Modello di Cassie-Baxter

Cassie-Baxter proposero un modello (figura 4.3 d) che si basa sull'eterogeneità chimica della superficie (ipotesi di bagnabilità eterogenea), implicando la presenza di aria tra le valli e le creste delle asperità. La goccia d'acqua poggia soltanto sulle sommità delle creste e l'aria resta intrappolata negli spazi occlusi. L'area di contatto tra solido e liquido è

minimizzata, mentre è massimizzata quella tra liquido ed aria, portando la goccia d'acqua ad assumere una forma tondeggiante. L'equazione dell'angolo di contatto effettivo (θ_{CB}) diventa, secondo questo modello:

$$\cos \theta_{CB} = f(\cos \theta + 1) - 1$$

con θ angolo di contatto di Young e f la frazione di superficie di contatto liquido-solido. A differenza del modello di Wenzel, la goccia d'acqua può rotolare facilmente poiché presenta una bassa isteresi dell'angolo di contatto²⁶.

4.3.4. Superfici a chimica e topografia superidrofobica

Le caratteristiche di superidrofobicità possono essere raggiunte agendo sulla chimica superficiale di un materiale. In particolare, è stato osservato che gruppi funzionali apolari e/o contenenti fluoro mostrano idrofobicità grazie ad un abbassamento dell'energia superficiale: $=CH_2$, $-CH_3$, $-CH_2F$ e $-CF_3$ presentano un angolo di contatto crescente.

In uno studio²⁸ sono state realizzate nanoparticelle (NPs) di silice (119 ± 12 nm di diametro) funzionalizzate superficialmente con fluoroalchilsilano ($C_{16}H_{19}F_{17}O_3Si$) al fine di incorporare gruppi fluorurati. Successivamente le NPs sono state depositate in soluzione sol-gel attraverso *spin-coating* su vari substrati, tra cui alluminio, silicio e vetro. Maggiore è il numero di rivestimenti eseguiti, maggiori sono la rugosità superficiale (fino a $0.700 \mu m$) e l'angolo di contatto statico. In figura 4.4 si nota il *pattern* superficiale osservabile al SEM a diversi ingrandimenti e l'angolo di contatto raggiunto. Sono stati ottenuti sWCA di oltre 150° e CAH di 2° in seguito alla deposizione di nove strati di NPs, conferendo alla superficie funzionalizzata proprietà antiadesive e autopulenti. È stato inoltre osservato che la trasparenza dei substrati vetrosi non è alterata né da uno, né da nove strati di deposizione. Le applicazioni in diversi settori comprendono la realizzazione di finestre di edifici e parabrezza di automobili ma anche l'uso come additivo in vernici per ottenere rivestimenti superidrofobici su larga scala.

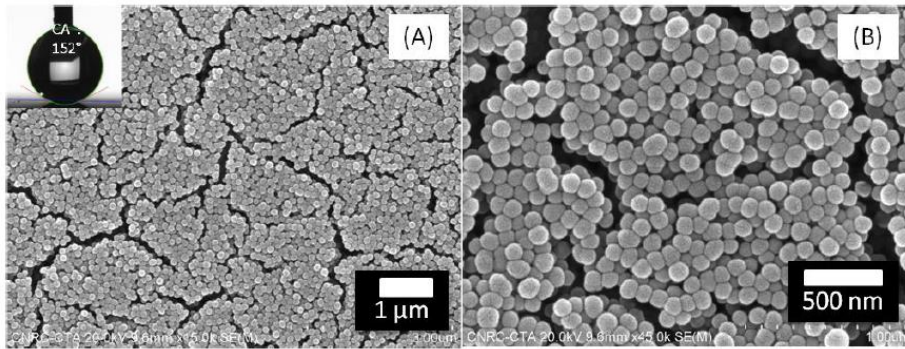


Figura 4.4 Immagini al SEM di nanoparticelle di silice fluorurate depositate in tre strati con spin-coating su un substrato di alluminio, mostrando uno sWCA di 152° (Brassard et al., 2012).

4.3.5. Superfici superidrofobiche in natura: topografia multiscala

Nella realtà, si osserva solitamente un comportamento intermedio tra i due modelli (figura 4.3 e), dovuto alla compresenza di una struttura micrometrica e di una nanometrica rivestite da materiali idrofobi, come la cera. In natura, i petali di rosa seguono prevalentemente il modello di Wenzel, osservando alti sWCA e adesione elevata: al capovolgimento del petalo ($\alpha=180^\circ$) le gocce d'acqua non scivolano né si staccano (effetto petalo); ciò è dovuto ad una CAH superiore a 5° . Le foglie di *Nelumbo nucifera* (pianta del fiore di loto) obbediscono perlopiù al modello di Cassie-Baxter, con elevati sWCA ma bassa adesione: anche a SA ridotti, si osserva il rotolamento della goccia a basse inclinazioni ($\alpha < 10^\circ$) e il distacco di questa per $\alpha > 90^\circ$ (effetto loto), causato da una CAH inferiore a 5° ²⁹. Quest'ultima tipologia di superficie soddisfa gran parte dei requisiti che determinano la capacità "autopulente":

- 1) la goccia d'acqua che rotola su una superficie deve mostrare uno sWCA $> 150^\circ$
- 2) la goccia deve presentare bassa adesione e potersi muovere a inclinazioni ridotte ($\alpha_c < 10^\circ$),
- 3) l'adesione polvere-superficie deve essere inferiore a quella polvere-acqua, così da garantire l'allontanamento dei residui al passaggio della goccia.

La caratteristica di autopulizia ha vaste applicazioni edilizie in diversi ambienti, dai vetri che rivestono i grattacieli alle finestre degli ospedali.

4.3.5.1. Foglia di loto

La peculiarità della superficie della foglia di loto (*Nelumbo*) consiste nella struttura gerarchica a doppia scala: grazie al SEM, sono stati osservati dei cristalloidi epicuticolari nanometrici di cera (figura 4.5 a-b), che intrappolano l'aria (le strutture aghiformi in rosso

in figura 4.5 c), posti in superficie a strutture micrometriche papillari (le zone tondeggianti nere), riducendo al minimo l'area di contatto solido-acqua²⁹. L'assenza delle nanostrutture cerosi compromette la superidrofobicità della foglia del loto: dopo una tempra a 150°C per 1 h, i nanocristalli di cera sono stati completamente eliminati dalla superficie della foglia, mentre la microstruttura papillare è stata conservata; questo ha portato ad una riduzione dello sWCA da $142.4^\circ \pm 8.6^\circ$ (foglia non trattata) a 126.3° (foglia ricotta), comunque superiore rispetto a quello ottenuto su una superficie cerosa liscia (74°). Bisogna notare che anche le strutture micrometriche sono essenziali per un elevato angolo di contatto: si nota che l'aumento dello sWCA rispetto alla superficie cerosa liscia risulta del 70% grazie alla struttura micrometrica, ma solo del 13% per quella nanometrica. In ogni caso, al fine della superidrofobicità è necessaria la presenza di entrambe le strutture³⁰. Queste scoperte hanno gettato le basi per la produzione di superfici superidrofobiche a bassa adesione che vertono sulla riproduzione della struttura gerarchica della foglia del loto ma non solo. Negli ultimi anni sono state infatti individuate in natura altre superfici che mostrano caratteristiche paragonabili.

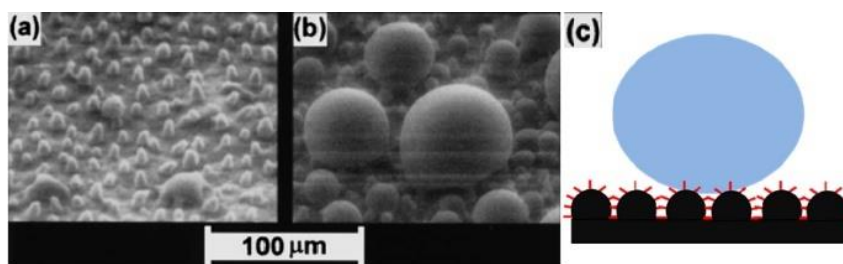


Figura 4.5 Immagine SEM di gocce d'acqua in crescita (a, b) sulla superficie della foglia di loto; schema (c) di una goccia d'acqua che poggia su una superficie a struttura gerarchica analoga a quella della foglia del loto. (Latthe et al., 2014)

4.3.5.2. Foglia del taro

Un'altra pianta che mostra proprietà analoghe è quella del taro (*Colocasia esculenta*): anche in questo caso la struttura gerarchica della foglia mostra protuberanze ellittiche di 10-30 μm di diametro coperte da cristalli di cera epicuticolari nanometrici, presentando angoli di contatto intorno a 150° . È stato osservato che lo sporco e i batteri si annidano all'interno delle gocce d'acqua sulla foglia piuttosto che sulla superficie della foglia stessa. Anche il taro mostra proprietà di autopulizia. La densità delle nanostrutture deve essere elevata al fine di ridurre la probabilità di adesione batterica o particellare in ambiente acquoso³⁰.

4.3.5.3. Pelle di squalo

Anche nel regno animale si osservano superfici dalle caratteristiche di autopulizia. Ne è un esempio la pelle di squalo, che presenta nervature microstrutturate sui suoi dentelli dermici.

Queste canalizzano l'acqua in modo che il suo scorrimento non impedisca eccessivamente il moto dell'animale, riducendo l'attrito e permettendogli di nuotare a velocità elevate per catturare le sue prede. La struttura della pelle di squalo impedisce l'adesione di parassiti (cirripedi) come avviene per altre specie acquatiche, quali ad esempio le balene, grazie alla riduzione dell'area superficiale disponibile per organismi aderenti causata dalla micro/nanostruttura ruvida. Il flusso d'acqua accelerato riduce inoltre il tempo di contatto di organismi potenzialmente adesivi³⁰.

4.3.5.4. Pelle di gecko

Altro caso d'interesse è la pelle di gecko. Le zampe di questo animale presentano proprietà adesive selettive per diverse tipologie di superfici. Questo è spiegato dalla presenza di schiere periodiche di micrometrici bastoncini cheratinosi detti *setae*, di 30-130 μm di lunghezza e 5 μm di diametro, composti a loro volta da aghi nanometrici del diametro di 200-500 nm. L'elevata capacità adesiva deriva dalla somma di tutte le interazioni deboli di van der Waals che nell'insieme costituiscono una notevole forza di adesione con proprietà idrofobiche. La pelle che si trova sul dorso del gecko presenta invece proprietà superidrofobiche dovute alla doppia struttura micro/nanometrica: spinule di centinaia di nanometri di lunghezza e di qualche micrometro di lunghezza fuoriescono dalla superficie di scaglie emisferiche dal diametro di centinaia di micrometri disposte in un *pattern* a nido d'ape. L'angolo di contatto di 150° formato con le spinule, che intrappolano l'aria tra loro e le calotte micrometriche, caratterizza questa superficie, producendo in aggiunta un effetto antibatterico contro ceppi G⁺ e G⁻^{30,31}.

4.4. Superfici battericide

L'abbattimento batterico può essere ottenuto sfruttando percorsi differenti. Si può in primo luogo usufruire della topografia e della rugosità di una superficie che determini la morte del batterio in seguito ad uno sforzo fisico esercitato sulla sua membrana cellulare. In secondo luogo, è possibile funzionalizzare la superficie di materiali impiantandovi specie chimiche di nota tossicità contro questi microrganismi.

4.4.1. Topografia

In natura è stata osservata una notevole resistenza alla biodegradazione da parte delle carcasse di molti insetti. In particolare, le loro ali dimostrano una scarsa suscettibilità all'attacco batterico. Studi recenti illustrano l'inclinazione dei batteri alla morte causata dalla rottura della membrana plasmatica in seguito all'adsorbimento sulle superfici alari di

cicale e libellule. È stato appurato che la lisi cellulare su queste interfacce naturali non è indotta da interazioni chimiche, di bagnabilità o di energia superficiale, ma da uno stress fisico. Le superfici alari degli insetti menzionati, sottoposte ad osservazioni SEM, presentano un *pattern* costituito da *nanopillars*, piccole strutture nanometriche cilindriche che ricordano i denti di un pettine, di diverse geometrie e distribuzioni superficiali ³⁰.

4.4.1.1. Modello di allungamento

La membrana plasmatica del batterio è considerata sottile ed elastica rispetto alle dimensioni caratteristiche del *nanopillar*. Quando il batterio aderisce a queste nanostrutture, lo strato adsorbito presenta una regione in contatto diretto con la punta del *nanopillar* ed una zona in cui la membrana risulta sospesa tra i pilastri. Questo succede per via della differenza di scala tra il microrganismo (scala micrometrica) e i *nanopillar* (scala nanometrica). Quando il batterio si posiziona su superfici dotate di questa nanostruttura, l'area di contatto diretto aumenta, deformando la membrana plasmatica nelle regioni sospese e portando alla sua rottura. Secondo questo modello biofisico, la morte del batterio dipende prevalentemente dalla rigidità della membrana cellulare: nei batteri G-, lo spessore ridotto della parete permette alle nanostrutture di modellare la membrana con facilità, a differenza dei ceppi G+ che oppongono più resistenza poiché presentano uno strato superficiale di proteoglicani consistente e rigido. Ciò risulta in una maggiore suscettibilità dei G- alla rottura della membrana cellulare al contatto con i *nanopillar* ³⁰.

4.4.1.2. Modello termodinamico

Un secondo modello, che prevede un'analisi termodinamica, è stato successivamente proposto: qui, il meccanismo battericida è stato investigato studiando la variazione di energia libera totale del batterio che aderisce alla superficie dotata di *pattern*. La deformazione della parete cellulare si calcola attraverso la variazione di energia libera che si misura in due momenti diversi, quando i microrganismi sono adesi su superfici piatte e quando invece su *pattern* nanometrici. La deformazione massima della membrana si osserva in corrispondenza dell'apice del *nanopillar*: data la ridotta quantità dei proteoglicani nella membrana dei ceppi G-, la capacità di allungamento è più significativa rispetto ai G+, causando una maggiore inclinazione alla morte cellulare. Per di più, è stata esaminata l'interazione adesiva tra cellula e substrato. Di recente è stato dedotto che *pattern* nanometrici con un elevato rapporto altezza/larghezza mostrano una maggiore affinità,

quindi forza di adesione superiore, per le cellule rispetto a rapporti inferiori, risultando in un aumento del tasso di mortalità cellulare³⁰.

4.4.1.3. Misure di forza di rottura

Per misurare la capacità battericida dei *nanopillar* sono stati condotti test diretti di micro-indentazione su batteri. In questo modo è possibile individuare la forza necessaria alla rottura della membrana cellulare. Una punta affilata (*cantilever*) di un microscopio a forza atomica (AFM) entra in contatto con la zona centrale della superficie di *Salmonella typhimurium*, adsorbito su un substrato di silicio (figura 4.6 A). La forza di carico è stata incrementata fino alla perforazione della parete cellulare e al successivo contatto con il substrato. In uscita è stata ottenuta una curva di perforazione (figura 4.6 B), che rivela l'altezza reale del batterio vivo, la sua elasticità iniziale in condizioni fisiologiche, la pressione richiesta per perforare la parete cellulare e la rientranza cellulare prima che la parete cellulare fosse perforata. Da questo studio è emerso che la forza necessaria per la perforazione della parete cellulare del batterio è di circa 2 nN e la corrispondente pressione richiesta è determinata da $P = F/(\pi r^2) \approx 5 \text{ atm}$, con r raggio della punta del cantilever³². In alcuni casi, soprattutto per quanto riguarda *nanopillar* flessibili, l'adsorbimento batterico causa la deformazione delle nanostrutture: tramite misure indirette, è possibile ottenere matematicamente la forza che ha generato tale alterazione se le caratteristiche fisiche, come il modulo elastico del materiale, sono note²⁴.

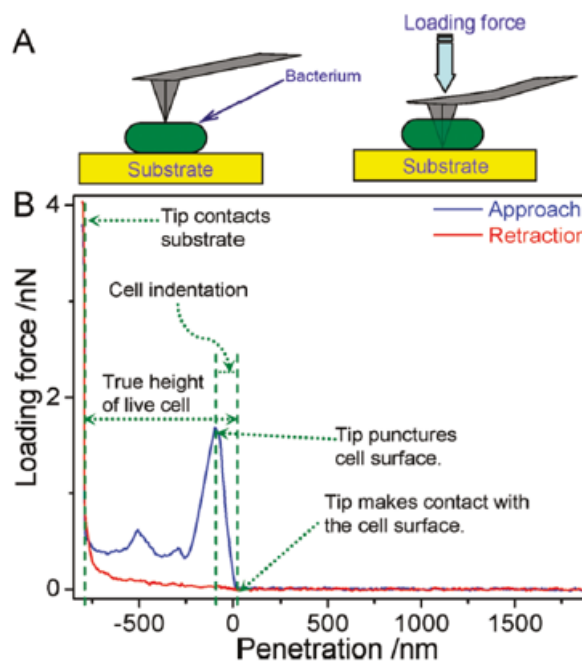


Figura 4.6. Schemi di esperimenti di perforazione (A) e una tipica curva di perforazione ottenuta con una punta biolever (B) (Suo et al., 2009)

4.4.1.4. *Topografie battericide in natura*

È possibile confrontare diverse tipologie di *pattern* nanostrutturati presenti in natura. Le ali di cicala mostrano proprietà superidrofobiche, autopulenti e battericide grazie ai *nanopillar* che le rivestono. Questi presentano un rapporto altezza/lunghezza contenuto (200 nm in altezza, 60-100 nm in larghezza), risultando efficaci prevalentemente contro i batteri G- (figura 4.7 a-b) e facendo affidamento sulla deformazione della membrana cellulare. Le ali di libellula mostrano invece un rapporto d'aspetto superiore (altezza 190-310 nm, larghezza 40-50 nm) rispetto a quelle di cicala. Quando un batterio si deposita su questo *nanopattern*, le strutture più alte tendono a piegarsi, incrementando la superficie di contatto con la membrana. Inoltre, il batterio, secernendo sostanze polimeriche extracellulari, aderisce saldamente alla nanostruttura (figura 4.7 e-f). La forza di adesione, quando sufficientemente elevata, impedisce al microrganismo di allontanarsi, causando la rottura della parete e quindi la morte del batterio (figura 4.7 g). Le ali di libellula, mostrando un rapporto altezza/larghezza dei *nanopillar* maggiore rispetto alle ali di cicala, presentano un potere battericida anche nei confronti dei batteri G+ (figura 4.7 h-i). Oltre alle proprietà autopulenti, la pelle di gecko presenta anche capacità antibatteriche. Il rivestimento dorsale di questo animale presenta un *pattern* nanometrico costituito da piccoli uncini, analoghi a sottilissimi *nanopillar* dal rapporto altezza/larghezza molto alto (2-4 μm di altezza e 10-20 nm di larghezza all'apice). In aggiunta, la distribuzione spaziale di queste spinule risulta poco densa rispetto ai casi precedenti, mostrando una distanza tra *nanopillar* di 500 nm contro i 170 nm delle ali di cicala e libellula. Questo porta ad un comportamento molto diverso tra batteri G+ e G-: i primi, avendo una parete cellulare più malleabile e dimensioni maggiori, possono andare incontro a morte per deformazione della membrana (figura 4.7 j-k); i secondi, dalle dimensioni più contenute e dalla parete rigida, flettono le sottili nanostrutture sopravvivendovi a ridosso (figura 4.7 l)³⁰.

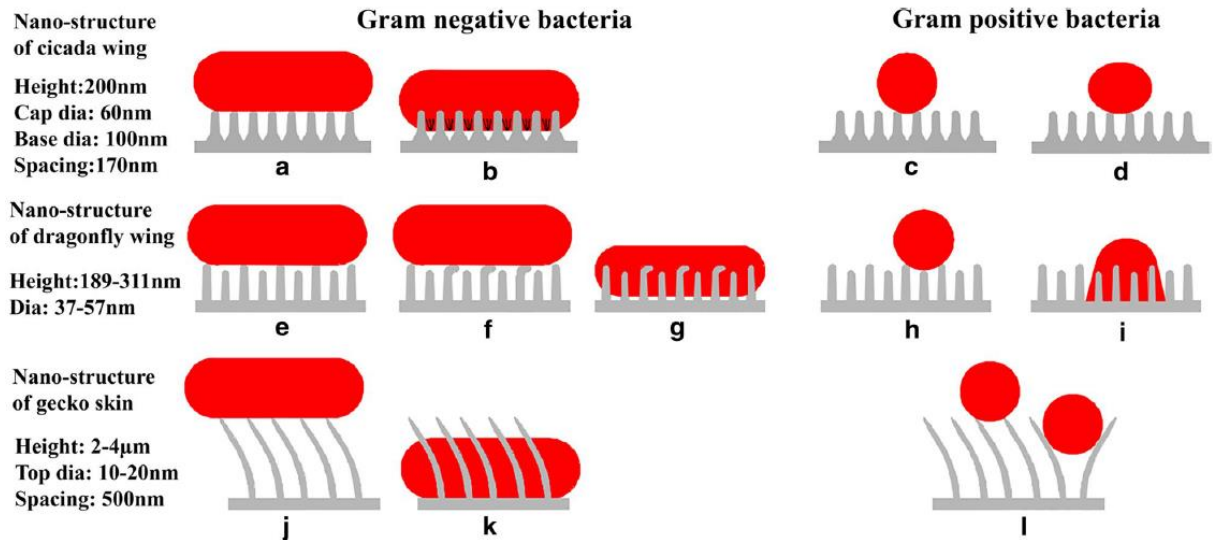


Figura 4.7 Rappresentazione schematica delle interazioni di batteri Gram-positivi e Gram-negativi con le nanostrutture presenti su ali di cicala (a-d), ali di libellula (e-i) e pelle di gecko (j-l). (Jaggessar et al., 2017)

4.4.1.5. Replicazione delle topografie su superfici artificiali

In questa prospettiva, la progettazione di superfici battericide necessita di una combinazione ottimale dei parametri geometrici che caratterizzano il *nanopillar*, al fine di ottenere il migliore potere antibatterico³⁰. Un approccio promettente è la riproduzione di topografie antibatteriche bioispirate, sia antiadesive sia battericide, su materiali sintetici in molteplici ambiti applicativi. A questo scopo varie strategie possono essere attuate, tra cui tecniche di litografia *soft*: si cola il precursore di un silossano (solitamente PDMS) sul *pattern* da imitare e lo si polimerizza per ottenere un'impronta; successivamente si adagia lo stampo polimerico realizzato su una resina fotopolimerizzabile. Dopo l'esposizione alla radiazione luminosa ad una specifica lunghezza d'onda, si rimuove lo stampo in PDMS dalla resina e si ottiene la superficie con la topografia iniziale. Questo procedimento è stato sfruttato per la replica nanostrutturata delle ali di *Pantala flavescens* su substrati in silicio, vetro e polietilentereftalato (PET). Inoltre, l'aggiunta di un rivestimento fluorurato di tipo SAM rende la superficie superidrofobica³³.

4.4.2. Chimica superficiale

Un ulteriore metodo che sfrutta le proprietà chimiche degli elementi è l'impiego di ioni per produrre superfici battericide. Elementi che mostrano un maggior potere antibatterico a basse concentrazioni (< 1 ppm) sono mercurio (sottoforma di cloruro) e argento (in veste di nitrato). Questi elementi in forma ionica presentano un ampio spettro d'azione e non mostrano segni significativi di farmacoresistenza. Sebbene molte cure basate su ioni metallici siano state abbandonate per problemi di tossicità, i metodi che prevedono l'uso di

Ar continuano ad essere allettanti essendo un elemento poco nocivo e adatto a sistemi di rilascio controllato (ad esempio, patch per il trattamento di ustioni)³⁴. Un altro fattore chimico che incide sulla sopravvivenza dei microrganismi è il pH, che può essere variato con la dissoluzione della superficie del materiale: vengono rilasciati *in situ* ioni e specie reattive che presumibilmente aggrediscono i batteri portando alla loro morte. Questo può accadere per materiali come vetri e vetroceramici in ambiente fisiologico³⁵.

4.4.2.1. Ioni argento

Inizialmente, si pensava che il potere antimicrobico dei composti d'argento fosse proporzionale alla quantità e alla rapidità di rilascio degli ioni metallici. D'altra parte, i microrganismi sono in grado di incapsulare notevoli quantità di ioni metallici da soluzioni molto diluite (10^5 - 10^7 ioni Ag^+ per cellula). Sebbene sia stato osservato che alcune mutazioni di *Salmonella typhimurium* presentino una resistenza all'azione battericida di ioni metallici di Cu, Co, Ni, Cr, la sensibilità ad Ag e Hg resta invariata. L'inerzia chimica dell'argento cessa nel momento in cui entra in contatto con l'acqua (umidità della pelle, fluidi biologici nella ferita, ecc.), rilasciando ioni reattivi che si legano insistentemente a proteine. Queste vengono denaturate e deformate, non potendo più svolgere la loro funzione strutturale o metabolica e portando la cellula batterica alla morte. Inoltre, gli ioni di Ag possono legarsi agli acidi nucleici (DNA e RNA) dei microrganismi, impedendogli una corretta replicazione del materiale genetico. Data la loro carica positiva, gli ioni metallici possono essere adsorbiti sulla membrana plasmatica dei microrganismi, che presenta invece carica superficiale negativa per la presenza di gruppi fosfato: gli ioni possono interferire con l'azione di alcuni enzimi che collaborano alla sintesi della membrana, portando alla fuoriuscita di sostanze vitali. Un'altra azione battericida potrebbe essere correlata alla proprietà inibitoria degli ioni argento nella respirazione cellulare³⁴.

Il potere antibatterico dell'Ag è stato testato nella fabbricazione di un vetro di silice trattato al plasma con impianto di ioni. I campioni vetrosi sono stati trattati con diverse dosi (ioni/cm²) ed energie (kV) di impianto ed è stata evidenziata la generazione di uno strato sub-superficiale di NPs di Ag. Il numero di colonie batteriche sopravvissute risulta minimo per i campioni trattati con $1 \cdot 10^{17}$ ioni/cm², 55 kV e $7 \cdot 10^{16}$ ioni/cm², 20 kV, rispettivamente. La dose e l'energia dell'impianto riflettono la relazione tra la concentrazione di Ag e il potere battericida. Con scansioni tridimensionali al microscopio a forza atomica (AFM), è stata osservata la morfologia dei campioni trattati, notando che al crescere della rugosità (causata dall'impatto degli ioni sulla superficie) aumenta l'azione battericida. Questo può

essere dovuto alla ruvidità superficiale che offre più occasioni di contatto tra ioni Ar^+ e batteri. Le nanoparticelle e i batteri si legano con una forza dipendente dalla superficie di interazione: NPs più piccole mostrano un'interazione superficiale diretta maggiore rispetto a quelle più grandi, dunque una possibilità di incontro con i batteri più importante³⁶.

4.4.2.2. Ioni stronzio

In ambito odontoiatrico e ortopedico, è in corso di studi l'impiego di ioni metallici rilasciati da vetri bioattivi, per scopi sia osteogenetici sia antibatterici. Gli ioni Sr^{2+} hanno mostrato ottimi risultati *in vitro*: promuovono la differenziazione di cellule mesenchimali in osteoblasti, stimolano la formazione di collagene di tipo I e aumentano la secrezione di osteoprotegerina (OPG) promuovendo la produzione ossea. Dato il potere inibente degli ioni di stronzio nei confronti degli osteoclasti, farmaci e dispositivi che contengono questo elemento chimico possono migliorare le condizioni di pazienti osteoporotici. Per quanto riguarda la composizione di vetri bioattivi, lo stronzio può sostituire il calcio nella forma ossidata, avendo essi un rapporto carica/dimensione simile. L'inclusione di una percentuale di SrO nel vetro può indurre una rapida dissoluzione del materiale ed una precipitazione di apatite mista ($\text{Sr}_5\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) accelerata. Questi effetti sono dovuti al maggiore peso e dimensione dello Sr rispetto al Ca, che producono un'espansione del reticolo aumentando la velocità di dissoluzione del vetro. Dal momento che un'infezione batterica può ostacolare la corretta guarigione dell'osso, l'impiego di Sr può limitarne la frequenza, seguendo tuttavia meccanismi non ancora chiari. È noto però che l'effetto battericida di questi ioni è proporzionale alla loro concentrazione, come è stato dimostrato durante alcuni test su vetri al 4mol% di P_2O_5 con parziale sostituzione di Sr ³⁷.

4.4.2.3. Variazione del pH

È stato confermato in diversi studi che il Bioglass® 45S5 drogato con ossido di argento abbia effetti battericidi. Tuttavia, altre ricerche hanno suggerito che diversi vetri bioattivi, in forma di particelle in soluzioni fisiologiche e privi di ioni antibatterici, possano provocare reazioni simili. Il discorso è applicabile a materiali che presentino meccanismi di azione e condizioni d'uso analoghi ai biovetri. È stato appurato che gli effetti battericidi sono proporzionali alla concentrazione e alla dimensione delle particelle vetrose disperse nel mezzo, quindi ai livelli di ioni (di silicio, calcio, sodio, ecc.) nel surnatante. L'area superficiale delle particelle è cruciale, poiché, se molto estesa (come nel caso di nanoparticelle), si ha un rilascio più consistente di specie alcaline rispetto a frammenti con rapporto superficie/volume minore (microparticelle), portando ad una variazione notevole

di pH. Gli effetti battericidi sono stati studiati analizzando diverse composizioni di biovetro-ceramici contenenti Na_2O , K_2O , MgO , CaO , B_2O_3 , P_2O_5 , Al_2O_3 e SiO_2 . La concentrazione di 50 mg/ml ed un rapporto superficie/volume delle particelle di 185 cm^{-1} sono richiesti per osservare l'effetto battericida. Maggiore è la capacità dissolutiva del vetro, maggiori sono la variazione locale di pH e la concentrazione di ioni alcalini nella soluzione, conferendo proprietà antibatteriche più efficaci³⁵.

5. Modifiche superficiali

Nel caso di dispositivi impiantabili, è di fondamentale importanza favorire l'integrazione del biomateriale all'interfaccia con l'organismo, senza la formazione di un tessuto connettivo interposto. Per raggiungere tale scopo si può ricorrere a modifiche superficiali che possano al contempo favorire un meccanismo di bioattività. Ad esempio, aggraffare superficialmente alcune molecole (come fattori di crescita e molecole biomimetiche) può indurre la formazione di un particolare tipo di tessuto impedendo la fibrosi. Le modifiche superficiali possono coinvolgere diversi aspetti del materiale, quali la morfologia, la rugosità, la topografia, la carica superficiale, la composizione chimica, l'energia libera di superficie, l'idrofilicità/idrofobicità e i gruppi funzionali.

5.1. Chimica superficiale

Da un punto di vista chimico sono possibili diverse modifiche a livello superficiale: l'inserimento di un gradiente chimico o di un monostrato auto-assemblato (*self-assembled monolayer*, SAM), l'aggraffaggio chimico superficiale o l'aggiunta di un additivo nel bulk che renda attiva la superficie.

Un metodo comune è la realizzazione di un SAM, che permette di sviluppare un rivestimento costituito da una struttura estremamente ordinata su un substrato. Le molecole anfifiliche che compongono il rivestimento sono costituite da una testa affine alla superficie del materiale e di una coda. Quest'ultima serve da spaziatore tra il substrato e il gruppo funzionale che costituisce l'estremità opposta alla testa, come è rappresentato in figura 5.1. Gli accoppiamenti più utilizzati consistono in oro o silicio come substrato e gruppi tiolo o silano per la testa, rispettivamente. È possibile modulare lo spessore del monostrato variando la lunghezza delle catene alchiliche. La configurazione *trans* di queste ultime causa un'inclinazione rispetto alla verticale di circa 30°: in questo modo si massimizzano le interazioni deboli (Van der Waals) tra i gruppi metilene adiacenti. In base al tipo di gruppo funzionale posto all'estremità della coda, è possibile modificare le caratteristiche superficiali del materiale su cui è stato auto-assemblato il monostrato: i gruppi neutri, metilico e idrossilico, rendono la superficie rispettivamente idrofobica e idrofilica, mentre i gruppi carichi, carbossilico e amminico, risultano in una carica superficiale negativa e positiva, rispettivamente. Un interessante approccio coinvolge modifiche di superfici con un *pattern* chimico di SAM con diversi gruppi funzionali: costruendo una superficie

eterogenea è possibile indirizzare la migrazione e l'adesione in zone specifiche (ad esempio, idrofile) ed evitare l'adesione in altre regioni (ad esempio, idrofobe)⁹.

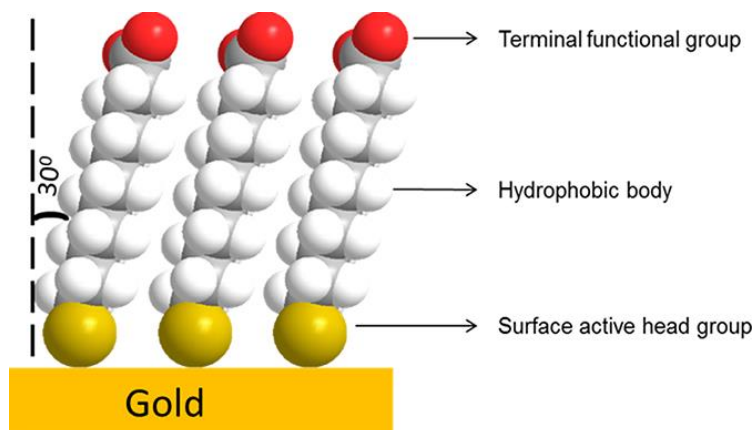


Figura 5.1. Rappresentazione schematica di una molecola anfifilica che compone un SAM con accoppiamento oro (substrato)-tiolo (testa). Si noti il gruppo funzionale posto all'estremità della coda. (Bhattacharai et al., *Self-Assembled Monolayers of Carbohydrate Derivatives on Gold Surfaces*. in *Carbohydrate (InTech)*, 2017). doi: 10.5772/66194.)

Altra strategia è l'aggraffaggio superficiale diretto di biomolecole funzionali all'adesione cellulare, sfruttando la composizione chimica del biomateriale in seguito ad un'attivazione, per esempio operata da un plasma. In questa prospettiva è possibile legare covalentemente dei peptidi di adesione (ad esempio, il tripeptide Arg-Gly-Asp, RGD, responsabile del legame con i recettori integrinici). Per rendere più accessibile il peptide è possibile distanziarlo dalla superficie funzionalizzata utilizzando uno spaziatore, ad esempio costituito da una catena di un polimero inerte all'adesione cellulare, come il polietilene glicole (PEG). Bisogna prestare attenzione alla lunghezza dello *spacer*, in quanto distanze oltre i 70 nm porterebbero ad un insufficiente raggruppamento dei siti di legame dell'integrina, essenziale per lo *spreading* cellulare⁹.

Una tecnica che sfrutta l'adsorbimento elettrostatico di polielettroliti è l'assemblaggio *layer-by-layer*. Quando un substrato avente una carica superficiale netta, per sua natura o in seguito ad attivazioni o funzionalizzazioni con opportune molecole, entra in contatto con la soluzione di un polielettrolita di carica opposta, lo adsorbe. Lo strato carico adsorbito diviene il substrato del polielettrolita di carica opposta contenuto nella soluzione successiva. In questo modo è possibile proseguire con la stratificazione, ottenendo rivestimenti dello spessore di qualche nanometro. Vi sono varie tecnologie che permettono di ottenere *coating* tramite deposizione *layer-by-layer*: dalla più semplice ma estremamente versatile, il *dipping* (immersione del substrato, figura 5.2), alle più elaborate ma ad alta efficienza in termini di omogeneità dei *layer* e spessore del film: *spinning* (rotazione del

substrato), *spraying* (spruzzo sul substrato), l'*electromagnetic deposition* (deposizione tramite applicazione di campo elettromagnetico, permette spessori anche di 20 μm) e il *fluidic* (utilizzo di sistemi canalizzati microfluidici). La tecnica più banale prevede l'immersione del substrato in soluzioni di polielettroliti alternata a lavaggi tra la deposizione di un *layer* e l'altro. Possono essere utilizzate varie forme e dimensioni di substrati, da materiali planari, flessibili, a particelle ed emulsioni. Tra le sostanze depositabili si ricordano le soluzioni colloidali e i polimeri. Si ottengono, in lassi temporali relativamente brevi (dalle decine di secondi a qualche minuto per il dipping di uno strato), un rivestimento dagli strati più o meno interpenetrati con rugosità superficiale tra le unità e le decine di nanometri³⁸.

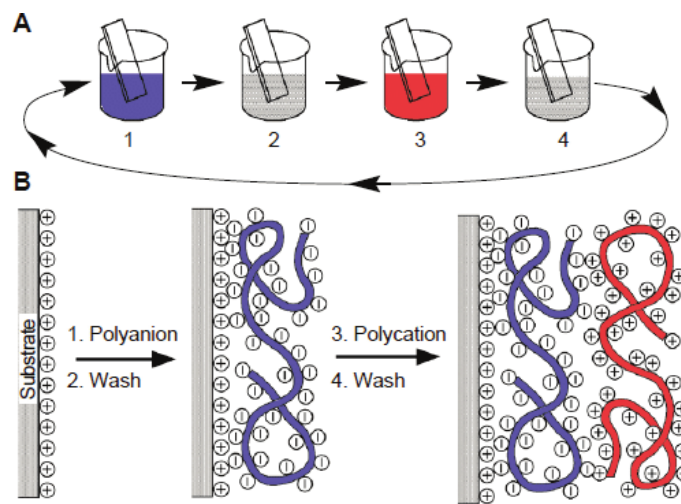


Figura 5.2. Rappresentazione della tecnica layer-by-layer: procedimento ciclico del metodo dipping (A) e adsorbimento alternato dei polielettroliti sul substrato (B). (1. Zaidi, S. J. & Fadhillah, F. Application of Multilayer Thin Film Technology in Desalination Membrane. in Desalination (InTech, 2017). doi:10.5772/intechopen.68375)

5.2. Morfologia e topografia

È stato ipotizzato che le cellule percepiscano modifiche delle caratteristiche superficiali alla scala micro-nanometrica del materiale su cui giacciono; tuttavia, non è chiaro se queste alterazioni agiscano direttamente sulle cellule o come effetto della modifica delle proteine precedentemente adsorbite. Non soltanto la dimensione caratteristica può influenzare i comportamenti cellulari, ma anche la tipologia di *pattern* costruito sulla superficie, come ad esempio creste, valli, isole, scanalature. Un parametro rilevante è la profondità/sporgenza delle alterazioni topografiche: è stato dimostrato che, per scanalature inferiori a 500 nm di altezza, le cellule assumono una configurazione allineata anche per via delle caratteristiche chimiche del materiale, fatto non più riscontrabile per profondità intorno a 5 μm indipendentemente dalla chimica. Questo fa pensare che valori profondità

caratteristici per cui si verifica l'allineamento delle cellule si aggirino tra i 10 e i 100 μm . È da notare che cellule di diversa natura possono agire anche in modo opposto nel contesto di una medesima topografia. Le interazioni cellulari sono governate anche dalla porosità del materiale e dall'interconnessione dei pori: anche in questo caso, la topografia, intesa come curvatura interna dei pori, mostra uno spettro comportamentale variegato in base al tipo di cellula. Altro parametro morfologico da considerare è la rugosità superficiale. Le cellule rispondono diversamente al variare di questa grandezza, favorendo l'adesione superficiale oppure impedendola del tutto⁹.

6. Attivazione e funzionalizzazione di superfici: trattamenti al plasma

Il rivestimento superficiale di biomateriali impiantabili è fondamentale per un'efficace integrazione del dispositivo con i tessuti interessati, ma anche in altri settori che necessitano di un'azione specifica, come autopulente o antimicrobica. Al fine di funzionalizzare un dispositivo utilizzando legami covalenti o modificandone la morfologia, è necessario agire sulla chimica della sua superficie. Per il *grafting* di molecole funzionali, i gruppi più esterni al materiale, se non intrinsecamente attivi, necessitano di un'attivazione che generi specie reattive, identificabili ad esempio in gruppi carichi o radicali liberi. Tale finalità può essere raggiunta in diversi modi, da attacchi chimici aggressivi a trattamenti tramite plasma, di cui si discuterà di seguito.

6.1. Plasma: generalità e possibili applicazioni

Uno dei metodi più utilizzati, semplici e immediati per la funzionalizzazione superficiale di materiali è la modifica al plasma. Se si applica continuamente energia alla materia, la sua temperatura cresce portando a modifiche del suo stato, osservando il passaggio dal solido, al liquido ed infine all'aeriforme. Se l'erogazione di energia non cessa, il guscio elettronico si disintegra e vengono a crearsi particelle cariche, tra cui ioni, elettroni e radicali liberi. La collettività di queste specie chimiche prende il nome di plasma, o quarto stato della materia. In natura questo fenomeno è osservabile da eventi quali fulmini e aurore boreali. Circa la funzionalizzazione superficiale di substrati, il processo è guidato dall'attivazione di specie chimiche di un gas composto da sostanze non polimerizzabili, tra cui elio, argo, azoto, ossigeno, anidride carbonica e ammoniaca. Tuttavia, è possibile impiegare anche gas di monomero organico che polimerizza direttamente sul materiale³⁹.

A livello industriale è possibile produrre il plasma utilizzando sorgenti energetiche come le microonde, la radiofrequenza o l'emissione di elettroni a partire da una scarica di un filamento caldo. Il potere funzionalizzante del plasma risiede nell'alta densità di specie reattive, che bombardano e modificano la superficie di materiali inerti in condizioni normali⁴⁰.

I composti instabili generati agiscono attraverso svariati percorsi, quali l'intromissione in un doppio legame o in uno singolo oppure l'estrazione di un atomo di idrogeno. Queste alterazioni sono spesso accompagnate dalla sintesi di composti a basso peso molecolare, quindi volatili, che talvolta possono portare a complicazioni (ad esempio, può talvolta

verificarsi la rideposizione di queste sostanze su superfici non perpendicolarmente esposte al plasma)^{11,39}.

Tra i vantaggi apportati dall'uso del trattamento al plasma, si annovera la variazione dell'energia libera di superficie, che porta ad un progresso nella forza adesiva e nell'idrofilicità/idrofobicità, ma anche la variabilità nelle caratteristiche chimiche, meccaniche, biologiche, ottiche ed elettriche. D'altra parte, si devono ottimizzare diversi parametri di processo che correlano la qualità del plasma con l'effetto finale sulla superficie funzionalizzata: si pensi, ad esempio, all'impostazione ottimale di voltaggio e potenza in grado di generare un plasma omogeneo, o alla selezione di ugelli e punte in grado di agire su ampie superfici in poco tempo. Inoltre, le tecniche al plasma dimostrano ragguardevole affidabilità e riproducibilità dei procedimenti, applicabilità a varie geometrie e dimensioni del substrato nonché vastità di materiali compatibili, tra cui metalli, polimeri, ceramici e compositi. Altra nota distintiva consiste nell'uso del plasma per la sterilizzazione industriale di prodotti, in quanto processo flessibile e poco costoso. Infine, il trattamento al plasma può essere combinato con altre tecniche litografiche comunemente usate nella fabbricazione di componenti che presentano *pattern* micrometrici, come succede per i prodotti della microelettronica⁴⁰.

In ambito strettamente biomedicale, il trattamento al plasma può essere impiegato per la realizzazione di superfici emocompatibili, tra cui protesi vascolari, *stent* coronarici, cateteri e membrane per emodialisi, valvole cardiache. La tecnica al plasma viene utilizzata anche per immobilizzare molecole *anti-fouling* che impediscono l'adesione di patogeni e sostanze che porterebbero alla formazione trombi: vengono realizzati lenti intraoculari (IOL), lenti a contatto, cerotti per la guarigione di ferite, biosensori. Inoltre, il plasma si presta anche alla sterilizzazione di strumenti chirurgici da taglio o pinze⁴⁰.

6.2. Parametri di impostazione del plasma gassoso

Un plasma è caratterizzato da diverse grandezze, che influenzano sia le qualità del plasma stesso, sia gli effetti che esso produce su un determinato substrato. I parametri che possono essere modificati durante un trattamento al plasma includono la potenza, la tensione applicata in termini di valore nominale e forma d'onda (continua, alternata, pulsata), la temperatura, la pressione, le specie gassose adoperate e la densità elettronica. Particolari valori di queste caratteristiche richiedono la variazione di alcune componenti costruttive dello strumento.

6.2.1. Pressione

Il plasma può essere prodotto in condizioni di bassa pressione o a pressione atmosferica. Nel primo caso, la generazione di plasma necessita di una camera chiusa in cui realizzare il vuoto, al contrario di un dispositivo che lavora in ambiente aperto. Da questa distinzione scaturiscono *pro* e *contro*: nel caso di plasma a vuoto, l'intero pezzo viene lavorato durante il trattamento, si mantengono bassi i *takt times* su prodotti di area estesa, si ottengono materiali ad elevata energia superficiale ed una chimica ultra-pulita all'interfaccia, si permette l'utilizzo di gas di servizio corrosivi isolando l'utilizzatore dal processo. Tuttavia, non è un processo continuo e richiede la formazione di vuoto spinto con conseguenti alti costi produttivi e di apparecchiature. Il plasma atmosferico consente di operare in modo continuo a pressione ambiente, permette di utilizzare diversi tipi di gas o l'aria compressa come gas di processo, presenta una buona affidabilità ed è una procedura automatizzabile. D'altra parte, l'area processata è spesso relativamente piccola, si richiedono volumi di gas di processo molto grandi (circa 1 m³/h), i *takt times* sono prolungati per parti estese, le tipologie di gas impiegabili sono limitate e serve una ventilazione forzata nella zona di lavoro in seguito a formazione di ozono nell'area di lavoro⁴¹.

6.2.2. Temperatura

L'energia cinetica, dunque la velocità delle particelle eccitate che compongono il plasma, può essere quantificata attraverso la temperatura. Se le velocità con cui si muovono gli elettroni all'interno di un plasma seguono una distribuzione di Maxwell-Boltzmann, si può parlare di temperatura elettronica, così come di temperatura ionica se a seguirla sono gli ioni. Queste grandezze vengono misurate in K o eV, secondo l'equivalenza

$$1 \text{ K} \approx 8.617 \cdot 10^{-5} \text{ eV}$$

Solitamente, la temperatura elettronica può essere superiore a quella ionica di diversi ordini di grandezza, poiché in molte sorgenti di plasma gli elettroni sono più suscettibili al riscaldamento rispetto agli ioni. Inoltre, gli elettroni presentano una massa molto più piccola degli ioni; quindi, essendo il trasferimento di energia durante una collisione più efficiente per corpi di masse simili, il raggiungimento dell'equilibrio termico procede lentamente senza che si verifichi nel tempo di osservazione⁴².

6.2.3. Densità del plasma

Per densità del plasma si intende la concentrazione o il numero di particelle di gas ionizzato in un dato volume, o in altri termini la porzione di un gas che si trova in uno stato ionizzato. Questa percentuale è tipicamente del 4-14% per quanto riguarda un sistema a bassa pressione (0.1-0.6 mbar). Maggiore è la potenza applicata, maggiore è la percentuale di gas ionizzato. Le proprietà del plasma cambiano al variare della densità: anche se un gas è debolmente ionizzato, mostrando una densità esigua, possiede ancora le sue caratteristiche nonostante l'apparenza macroscopica. Il plasma utilizzato nella modifica delle superfici è solitamente plasma freddo, ossia a basse temperature con una densità ridotta, di solito <1% o circa 10^8 elettroni/cm³. Questo plasma si contrappone a quello caldo, in cui il gas è completamente ionizzato e ha una densità molto elevata, di circa 10^{12} elettroni/cm³.

6.2.4. Potenza

Quando si tratta un substrato con densità elettroniche considerevoli, si deve considerare la potenza per unità di superficie, ossia la potenza totale rapportata all'area della zona coperta dal plasma: per azioni come pulizia, attivazione superficiale, deposizione ed *etching* si usano normalmente potenze comprese nell'intervallo 0.01-3 W/cm². Se si vuole incrementare la reattività del plasma, quindi la densità elettronica e le velocità di deposizione/*etching*, occorre somministrare potenze maggiori di 3 W/cm². Un aumento di potenza, però, si traduce nell'innalzamento della temperatura del substrato trattato, implicando la necessità di un sistema di raffreddamento efficace sia per il substrato sia per il sistema.⁴³

6.2.5. Tensione e corrente

Un plasma gassoso viene innescato tramite un potenziale che attraversa il gas: il potenziale oltre cui il guscio elettronico si rompe dipende dalla pressione e dalla larghezza del *gap* di scarica. Questo potenziale presenta un andamento che decresce avvicinandosi a 0.7 Torr (punto di minimo) per poi aumentare; quando si devia da questo valore critico si richiede l'aumento del campo elettrico di rottura⁴⁰. L'andamento della tensione in funzione della corrente in una scarica di gas a bassa pressione e quello per un gas a pressione atmosferica sono mostrati in figura 6.1 A e B, rispettivamente. In A si osservano quattro regioni: (1) zona "oscura" o "scarica Townsend", prima dell'accensione della scintilla, (2) regione di "bagliore normale", (3) zona di "bagliore anomalo" e (4) area di "scarica ad arcò" (il plasma diventa altamente conduttivo). Con l'aumento della pressione, le zone (2) e (3) tendono a

ridursi. A 760 Torr, per molti gas la scintilla precede direttamente la formazione di un arco. In B si osservano invece sue regioni: la scarica “effetto corona”, che corrisponde ad una corrente molto bassa, e la scarica ad arco, dove il gas diventa molto conduttivo a causa di una brusca diminuzione di tensione contemporanea all’aumento repentino di corrente. Alcune sorgenti di plasma a bassa pressione, dato che presentano un campo elettrico di rottura più ridotto ed una corrente più modulabile, possono produrre grandi regioni di plasma uniforme con una densità elettronica ben controllata⁴⁰.

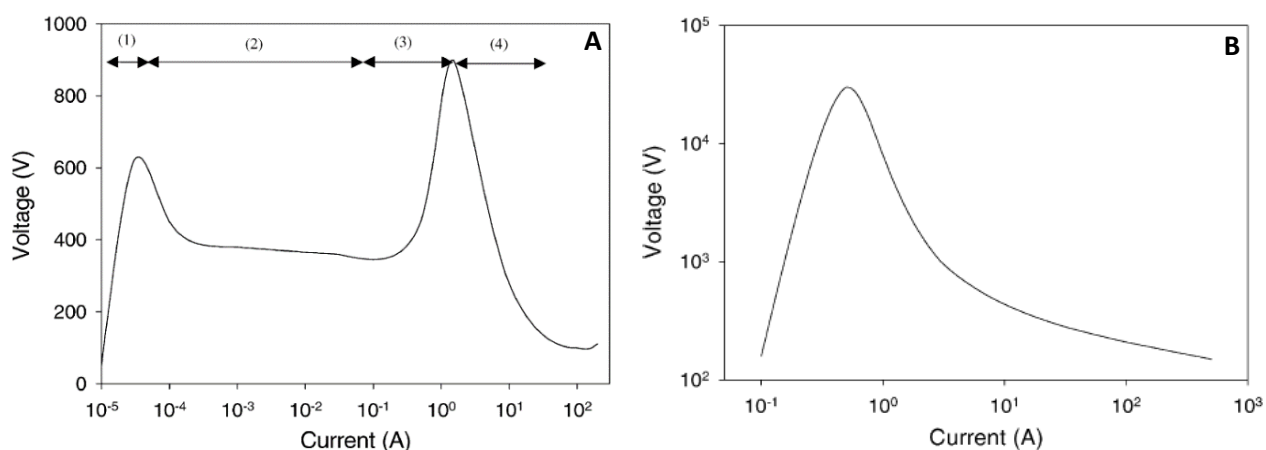


Figura 6.1. Andamento della curva corrente-tensione di una scarica di gas a bassa pressione (1 Torr) (A) e a pressione atmosferica (B). (Chu et al., 2002)

6.3. Sorgenti di plasma gassoso

6.3.1. Plasma a radiofrequenza con scarica luminosa (*radiofrequency glow discharge, rfGD*)

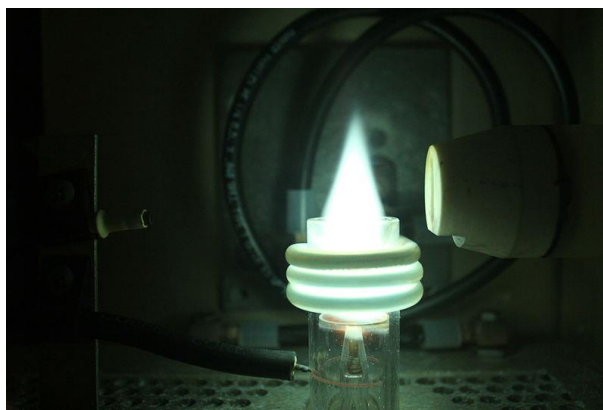


Figura 6.2. Un primo piano di una torcia al plasma di Argon Thermo Jarrell Ash Atomscan 16 accoppiata induttivamente. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Inductively_Coupled_Plasma.jpg#/media/File:Inductively_Coupled_Plasma.jpg)

Uno dei metodi più adoperati per la modifica superficiale, il plasma a radiofrequenza con scarica luminosa (*radiofrequency glow discharge, rfGD*) consente la generazione di ampi volumi di plasma stabile. Il tipo di accoppiamento della radiofrequenza al carico può essere

capacitivo (*capacitively coupled plasma*, CCP) o induttivo (*inductively coupled plasma* ICP), presentando in entrambi l'opzione di elettrodi interni od esterni alla camera. La modalità con elettrodi esterni è la più usata in quanto la presenza di un tubo di scarica in quarzo o borosilicato limita gli effetti causati dalle impurità introdotte nel plasma a causa del materiale degli elettrodi. In figura 6.2 si osserva una torcia generata da uno strumento rfGD. Le caratteristiche operative del plasma rfGD sono riassunte nella seguente tabella.

Frequenza rfGD	13.56 MHz
Pressione durante la scarica	10^{-3} - 10^2 Torr
Densità elettronica a bassa pressione (10^{-3} -1 Torr)	10^9 - 10^{11} cm ⁻³
Densità elettronica a pressione media (1- 10^2 Torr)	Fino a 10^{12} cm ⁻³
Temperatura elettronica	Diversi eV
Temperatura ionica	Molto bassa

6.3.2. Plasma a risonanza di ciclotrone elettronico (*electron cyclotron resonance*, ECR)

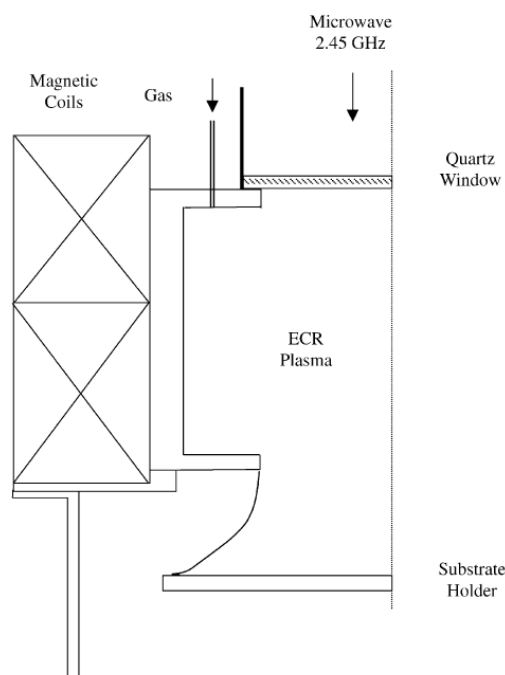


Figura 6.3 Schema di una sorgente di plasma ECR. (Chu et al., 2002)

La sorgente a risonanza di ciclotrone elettronico (*electron cyclotron resonance*, ECR) permette la generazione di plasma ad alta densità e a bassa pressione. Vengono introdotte le microonde attraverso una finestra al quarzo all'interno della camera. Per raggiungere le condizioni di risonanza alcune bobine magnetiche vengono posizionate lungo il perimetro della camera. All'applicazione di un campo magnetico, gli elettroni del plasma si spostano

seguendo un'orbita elicoidale attorno alle linee del campo magnetico. La frequenza ω del moto del ciclotrone in assenza del campo elettrico è data da

$$\omega = \frac{eB}{m}$$

dove B è il campo magnetico ed e e m sono rispettivamente la carica e la massa dell'elettrone. Il campo magnetico può essere regolato in modo da ottenere un plasma ad alta densità nel momento in cui la frequenza del ciclotrone degli elettroni e quella delle microonde corrispondono. Se si confinano gli elettroni nel plasma si intensifica il potere ionizzante, ottenendo la massima densità. L'elevata frequenza di collisione tra elettroni e ioni favorisce un ingente stato medio di carica ionica, ma l'uniformità della distribuzione del plasma non è ottimale. La temperatura elettronica supera notevolmente quella degli ioni. In figura 6.3 è schematizzato un sistema ECR per produzione di plasma. Le impostazioni operative sono mostrate sinteticamente illustrate nella seguente tabella ⁴⁰.

Frequenza microonde	2.45 GHz
Pressione durante la scarica	10^{-5} - 10^{-3} Torr
Densità elettronica	10^{11} - 10^{12} cm ⁻³

6.3.3. Plasma a scarica effetto corona (*corona discharge*)

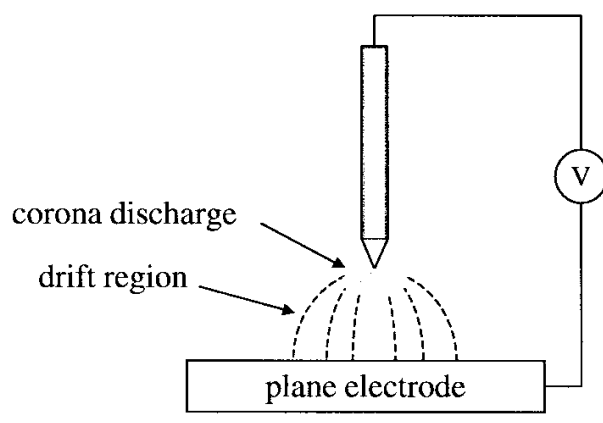


Figura 6.4 Schematizzazione di un sistema per plasma a effetto corona. (Schütze et al., 1998)

La scarica “effetto corona” si mostra come un bagliore luminoso nello spazio attorno alla punta di un ago in un campo elettrico altamente non uniforme. In figura 6.4 è rappresentato in modo semplificato un sistema di scarica “effetto corona” di tipo punta-piano. Avendo l’anodo (punta), posto ad alta tensione, una dimensione caratteristica ridotta rispetto a quella del catodo (piano), il campo elettrico sulla punta è elevatissimo. Se le dimensioni caratteristiche degli elettrodi sono paragonabili, la tensione tra loro produce una scintilla

invece di una scarica effetto corona. Si applicano all'anodo diversi kV risultando in una corrente di scarica tra 10^{-10} e 10^{-4} A. Seguono in tabella le grandezze operative.

Pressione durante la scarica	760 Torr
Densità elettronica (zona corona)	10^{13} - 10^9 cm ⁻³ , diminuisce al crescere della distanza tra gli elettrodi
Densità elettronica (zona di deriva)	10^6 cm ⁻³
Temperatura elettronica	5 eV
Temperatura ionica	Molto bassa

6.3.4. Plasma atmosferico ad arco

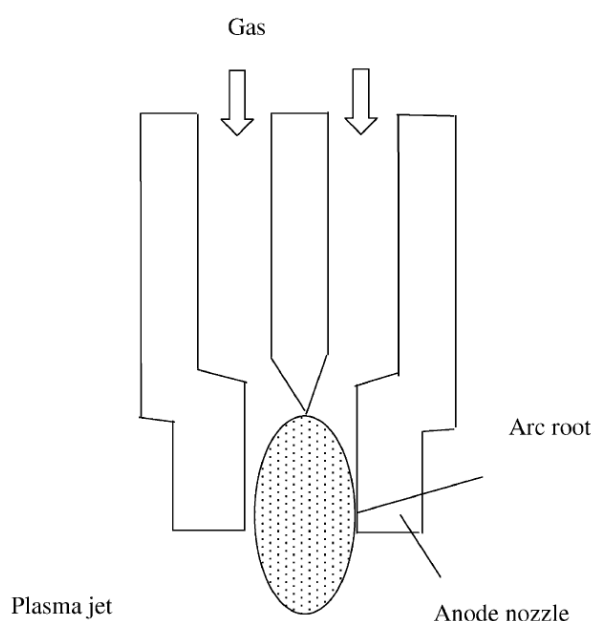


Figura 6.5. Schema di una torcia a spruzzo di plasma. (Chu et al., 2002)

Il metodo più diffuso per la funzionalizzazione di biomateriali per mezzo del plasma è una torcia a spruzzo (*plasma spray torch*). Questa prevede di consueto un ugello (anodo) collegato alla terra e raffreddato ad acqua. L'ugello, che convoglia il flusso di gas verso la punta, ospita internamente un catodo a bastoncino appuntito. Vi sono inoltre valvole e tubi per l'ingresso del gas. Affinché la torcia sia utilizzabile, si devono generare corrente di scarica e potenza molto elevate. Il gas fluisce tra il catodo e l'anodo a temperature elevatissime ($> 8000\text{K}$) e a pressione atmosferica (10^5 Pa), permettendo lo sviluppo di plasma. L'elevata velocità (>1000 m/s) e temperatura del flusso di plasma portano alla fusione di quasi tutte le particelle solide. In figura 6.5 si rappresenta uno schema del sistema. Si riportano in tabella i dati di utilizzo ⁴⁰.

Pressione durante la scarica	760 Torr
Densità elettronica	10^{16} - 10^{19} cm ⁻³
Temperatura elettronica	7-9 eV
Temperatura ionica	0.3-0.9 eV

6.3.5. Plasma a scarica con barriera di dielettrico

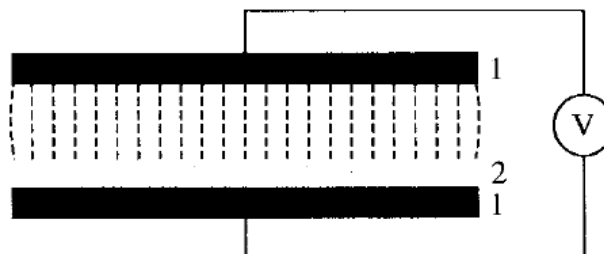


Figura 6.6 Schema di un sistema per scarica silenziosa. (Schütze et al., 1998)

Il sistema al plasma con barriera di dielettrico (*dielectric barrier discharge*, DBD) genera scariche "silenziose" a pressione atmosferica. I dispositivi DBD possono essere realizzati in molte configurazioni, tipicamente planari, utilizzando piastre parallele separate da un dielettrico o cilindriche, utilizzando piastre coassiali con un tubo dielettrico tra di loro. In figura 6.6 si mostra lo schema di questa sorgente in configurazione planare: si nota che è formata da due elettrodi metallici (contrassegnati dal numero 1 in figura) distanti diversi mm, di cui almeno uno è rivestito con un sottile strato di dielettrico (marcato dal numero 2 in figura). I materiali dielettrici comuni includono vetro, quarzo, ceramica e polimeri. La tensione applicata tra le piastre può raggiungere e superare i 20 kV. Il plasma viene generato attraverso una successione di microscariche ad arco, della durata di 10–100 ns e distribuite casualmente nello spazio e nel tempo. Questo tipo di plasma può essere impiegato per la pulizia di superfici di ogni tipo e per la deposizione chimica da vapore di polimeri e film semi-vetrosi. Le scariche silenziose sono efficienti generatori di ozono e questa si è rivelata la loro principale applicazione industriale⁴⁴. Segue una tabella che illustra i parametri di processo.

Pressione durante la scarica	760 Torr
Densità elettronica	$2 \cdot 10^{19}$ cm ⁻³
Temperatura elettronica	1-10 eV

6.3.6. Plasma ad arco in vuoto

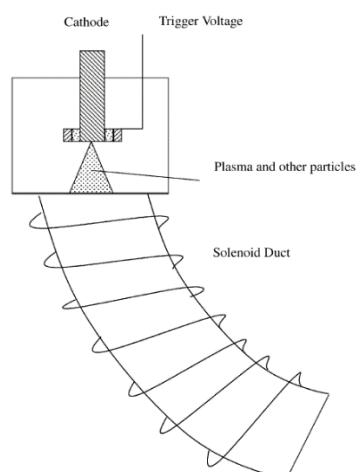


Figura 6.7 Rappresentazione schematica di una sorgente di gas ad arco sottovuoto. (Chu et al., 2002)

Tipicamente, una sorgente di plasma ad arco in vuoto si compone di un'unità di produzione del plasma e di un filtro per le macroparticelle. La scarica tra il catodo e l'anodo si osserva in corrispondenza dell'applicazione di un impulso di diversi kV all'elettrodo d'innesco. La corrente di scarica dell'arco si concentra sulla superficie del catodo, generando posizioni non stazionarie (punti catodici) di densità di corrente elevatissime ($\approx 10^{12}$ A/m) associata all'altrettanto copiosa densità di potenza ($\approx 10^{13}$ W/m). Quest'ultima permette la trasformazione di fase del materiale solido del catodo al plasma completamente ionizzato, che espande in modo rapido nell'ambiente sottovuoto raggiungendo velocità ioniche di $(0.5-2.0) \cdot 10^4$ m/s. Oltre ad esserlo del plasma completamente ionizzato, i punti catodici sono la sorgente di goccioline e residui (macroparticelle). Per questa ragione si adoperano filtri curvi a solenoide per macroparticelle, in modo da limitare la contaminazione del plasma. Il loro funzionamento consiste nell'impatto delle macroparticelle neutre, non più influenzate dal campo magnetico, contro la superficie esterna del condotto curvo. Quest'ultimo è ben visibile nella rappresentazione in figura 6.7. Alcuni vantaggi di questa tecnologia includono la formazione di un'abbondante quantità di ioni di materiale catodico e la varietà di materiali conduttivi utilizzabili per la realizzazione del catodo. Per l'elevata velocità del flusso plasmatico, il fenomeno di diffusione è poco significativo rispetto a quello di trasporto, portando ad un flusso di plasma poco uniforme sia in direzione assiale che radiale. Seguono tabellati i valori dei parametri di sistema.

Pressione durante la scarica (spot catodico)	≈ 0 (Vuoto)
Densità elettronica	10^{20} cm ⁻³
Temperatura ionica	Tra 20 eV (elementi leggeri) e 200 eV (elementi pesanti)

6.3.7. Plasma al laser

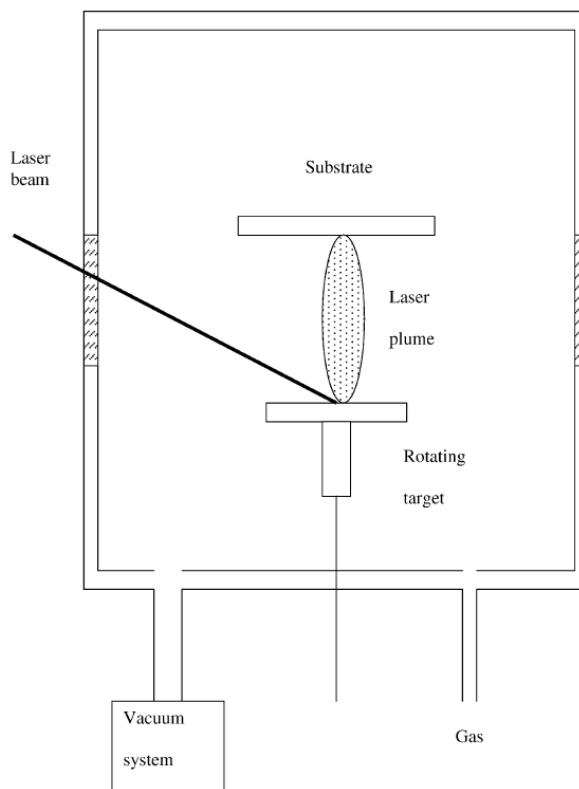


Figura 6.8 Rappresentazione schematica di un sistema di plasma al laser. (Chu et al., 2002)

Come visibile in figura 6.8, il sistema di plasma al laser prevede una camera a vuoto in cui viene iniettato un gas. Attraverso delle finestre laterali, un fascio laser ad alta densità colpisce un bersaglio solido rotante all'interno della camera, da cui si genera una "piuma di plasma" (*laser plume*) per interazione laser-solido, diretta sul substrato. Possono verificarsi due situazioni:

- In caso di bassa fluensa del laser, il fascio passa quasi senza attenuazione attraverso il vapore che si produce sul bordo d'attacco e si comporta da mezzo sottile. L'evaporazione avviene dal metallo liquido e la conduzione del calore nel bersaglio solido è la principale fonte di perdita di energia, pertanto non si produce un plasma.
- In condizioni di alta fluensa del laser, la temperatura del vapore è sufficientemente alta da causare un'eccitazione atomica e una ionizzazione apprezzabili. Il vapore inizia ad assorbire la radiazione laser incidente portando alla sua rottura e alla formazione di plasma.

L'intensità del laser è generalmente dell'ordine di 10^8 - 10^{10} W/cm². La densità elettronica diminuisce esponenzialmente con la distanza tra il bersaglio e il substrato; il suo valore

massimo è di circa 10^{18} - 10^{20} cm⁻³. L'area di formazione del plasma davanti al bersaglio è molto ridotta e la velocità del flusso del plasma è elevata, per questo la formazione di un plasma laser ampio ed uniforme è di complessa realizzazione⁴⁰.

Pressione durante la scarica (spot catodico)	≈ 0 (Vuoto)
Densità elettronica	10^{18} - 10^{20} cm ⁻³
Temperatura ionica ed elettronica	1-5 eV
Intensità del laser	10^8 - 10^{10} W/cm ²

6.4. Tecniche di modifica superficiale con plasma

Tra le principali tecnologie che sfruttano il plasma per conferire particolari caratteristiche topografiche, morfologiche, chimiche, ecc. si considerano l'incisione (*etching*) o modifica della rugosità, la pulizia (*cleaning*) o rimozione di grassi e oli dalla superficie, l'impianto (*implantation*) e la deposizione (*deposition*), tutte in grado di asportare e/o aggiungere materiale. Evento che accomuna molte di queste tecniche è la polverizzazione catodica, o *sputtering*, ossia il brusco allontanamento di atomi, ioni o frammenti molecolari dalla superficie di un materiale bombardato da particelle energetiche di massa non trascurabile (tipicamente ioni).

6.4.1. Sputtering

Lo *sputtering* al plasma si rivela un semplice metodo per trattare superfici. Questo processo prevede l'applicazione di un voltaggio negativo (da 1 a diversi kV) al substrato; i cationi, contenuti nel plasma generato da sorgenti rfGD o ECR, vengono così accelerati verso il campione. Essendo l'energia relativamente bassa, gli ioni si limitano all'infiltrazione nella zona superficiale del substrato, dove avviene un trasferimento di energia tra gli atomi di superficie per mezzo di collisioni elastiche e anelastiche. Grazie a queste ultime, alcuni atomi acquisiscono energia sufficiente riuscendo a fuggire dal substrato. Successivamente allo *sputtering* dello strato esterno di atomi, i *layers* sottostanti verranno esposti agli ioni e progressivamente incisi. Questo processo, adatto alla decontaminazione superficiale del materiale, può essere utilizzato come pretrattamento per step successivi⁴⁰.

Lo *sputtering* si manifesta anche nella pulizia di zone superficiali: la rimozione di materiale esterno avviene tramite reazioni chimiche che generano prodotti volatili, i quali si allontanano dal substrato. Solitamente per la pulizia si adoperano gas inerti, in prevalenza argon per la sua elevata resa di *sputtering* e per il costo contenuto⁴⁰.

6.4.2. Etching

L'*etching* si verifica quando si rimuove selettivamente del materiale da una superficie, in modo da lasciare un *pattern* in rilievo o in profondità. Per quanto riguarda lo studio di biomateriali, l'*etching* è principalmente praticato su materiali polimerici ed è classificabile come metodo sottrattivo. Quando si utilizza un polimero come substrato, l'interazione con un plasma porta a due reazioni competitive, la modifica o la degradazione. Se prevale l'effetto di modifica, le proprietà del polimero cambieranno a causa dell'interazione del fascio ionico, della co-polimerizzazione plasma-innesto e della polimerizzazione del plasma. Se invece domina la degradazione, si verifica l'*etching* sulla superficie. Le modifiche con questi trattamenti non coinvolgono il *bulk* del materiale, di conseguenza il substrato possiede caratteristiche fisiche, chimiche e meccaniche simili ai polimeri di partenza, poiché la composizione elementare, la struttura chimica, il grado di polimerizzazione e la cristallinità dei polimeri trattati non vengono significativamente alterati. Si osserva una perdita di peso molecolare durante il processo di *etching*, principalmente dovuta alla scissione dei legami tra le catene polimeriche e alle reazioni dei radicali generati quando si espone il materiale al plasma⁴⁰.

In corso di investigazione sono i trattamenti al plasma condotti su superfici di biomateriali vetrosi e vetro-ceramici. Queste tecnologie presentano diverse applicazioni nei settori di monitoraggio ambientale, diagnosi biomedica, micro-fluidica ed analisi chimiche. La silice amorfa e altri vetri sono superiori al silicio e ai polimeri in termini di durata meccanica, riutilizzabilità, trasparenza ottica, natura isolante e biocompatibilità in molte applicazioni microfluidiche. Il *deep reactive ion etching* (DRIE) può essere sfruttato per la realizzazione di superfici vetrose con topografia ad alta precisione dimensionale ed elevato rapporto d'aspetto. Il trattamento può essere eseguito a secco o ad umido; tuttavia, quest'ultimo caso è più incline alla formazione di *undercut* (una zona al bordo della superficie scavata che si dimostra più profonda di quest'ultima) e di un profilo isotropico del canale inciso. Al contrario, un *etching* a secco risulta in un profilo anisotropo del canale con un contorno preciso a scala micrometrica⁴⁵. Alla base del meccanismo di funzionamento del DRIE si trova una reazione chimica tra il gas insufflato nella camera a plasma e la superficie del materiale; inoltre, gli effetti fisici di bombardamento ionico favoriscono la rimozione dei prodotti di reazione altamente volatili (*sputtering*). È possibile interporre tra plasma e substrato una maschera, grazie alla quale impartire alla superficie del materiale specifici *pattern* micrometrici, sia in negativo sia in positivo. Le maschere per *etching* possono

essere realizzate in materiali differenti e con varie tecnologie: metalli (ad esempio Ni), silicio amorfo o *photoresist* negativi epossidici (SU-8) possono essere immobilizzati sul substrato da spruzzare con il plasma. Ciascuna tipologia di maschera è più adatta a realizzare un particolare *pattern* con dimensioni caratteristiche precise, in base anche allo spessore desiderato, alla finitura delle superfici incise e alla verticalità delle pareti⁴⁶.

Solitamente, per il DRIE su un vetro si adoperava un plasma a gas inerte di tipo CCP o ICP in combinazione ad un gas fluorurato con la funzione di precursore (C_3F_8 , CHF_3 , CF_4 , SF_6 , ecc.). Tra i gas inerti si usano prevalentemente Ar o He al fine di aumentare la stabilità, la selettività o la penetrabilità da parte degli ioni. Tuttavia, è possibile impiegare anche gas reattivi come O_2 e N_2 . Durante questo processo, la velocità di incisione (*etch rate*) convenzionale spazia tra diverse decine e qualche centinaio di nm/min e si osserva una bassa selettività della maschera a causa della deposizione sulla superficie incisa di materiali non volatili formati durante il trattamento. Più recentemente sono stati raggiunti *etch rate* tra 0.6 e 1.2 $\mu\text{m}/\text{min}$, utilizzando esafluoruro di zolfo come gas in un plasma di tipo ICP. Per raggiungere un risultato ottimale si possono modificare diversi parametri, tra cui la specie chimica del gas, le percentuali dei componenti di una miscela di gas, il rateo di flusso del gas e la potenza elettrica degli elettrodi superiore e inferiore. Per quanto riguarda l'*etching* sui vetri, le problematiche più rilevanti si identificano con un basso *etch rate*, una bassa selettività tra maschera e substrato e la realizzazione di microstrutture ad alto rapporto d'aspetto^{45,46}.

Ulteriori problematiche sorgono nel momento in cui ad essere sottoposto ad un trattamento di etching è un vetro-ceramico, contenente una notevole quantità di allumina (Al_2O_3), come nel caso di Zerodur®. Questi materiali riescono difficilmente ad essere lavorati con plasma a gas fluorurati, oltre a presentare accumuli di prodotti non volatili. Al contempo, non si devono applicare stress termici notevoli per lunghi intervalli temporali che possano compromettere la struttura cristallina penalizzando le proprietà del materiale. Per migliorare il profilo del fondo inciso e la selettività maschera-substrato, è possibile utilizzare gas polimerizzanti combinati a quelli fluorurati, ma con il compromesso di un *etch rate* minore e di angoli della parete laterale inferiori a causa della formazione di un sottile strato polimerico. Una possibile causa di pareti non verticali è la deposizione di composti volatili sulle superfici non investite perpendicolarmente dal plasma. Questo problema può essere parzialmente risolto con l'impiego di gas al cloro, comportando però la necessità di infrastrutture idonee al suo trattamento. Un'ulteriore ragione per cui si

ottengono angoli di parete ridotti ed *etch rate* inferiori rispetto alla sola silice potrebbe risiedere nella composizione del vetro-ceramico, che presenta una miscela di fasi principalmente cristalline e amorfe mostrando suscettibilità diverse⁵.

6.4.3. *Implantation*

Un metodo additivo di modifiche al plasma è l'impianto ad immersione ionica (*plasma immersion ion implantation*, PIII), che permette l'introduzione di elementi nella superficie del materiale senza limitazioni termodinamiche. All'interno della camera a vuoto, i campioni sono circondati da un plasma ad alta densità e viene loro applicato un alto potenziale negativo pulsato. Gli ioni generati nel plasma sovrastante vengono accelerati attraverso la guaina plasmatica (strato in un plasma che ha una maggiore densità di ioni positivi) formata attorno ai campioni e impiantati nella superficie dei bersagli. In figura 6.9 è schematizzato un sistema per impianto ad immersione ionica. Il PIII è in grado di erogare un flusso ionico elevato grazie alla mancanza di un sistema ottico per il trasporto ionico e di uno per la selezione di massa. Tra i vantaggi di questa tecnologia rientra la possibilità di trattare uniformemente campioni di forma complessa, senza ricorrere a scansioni superficiali o a particolari manipolazioni del bersaglio. Qualora venissero variati i parametri di processo, si otterrebbero anche effetti come deposizione ed *etching* superficiali, mantenendo il vuoto nella camera. Inoltre, il rischio di deformazione termica dei campioni è minimo in quando l'impianto viene condotto a bassa temperatura e il *target* raffreddato. Tuttavia, per ottenere una dose uniforme bisogna ottimizzare il processo agendo sulla densità del plasma, sull'ampiezza dell'impulso e sulla tensione applicata. Per un substrato di dimensioni ridotte e geometria sofisticata, al fine di mantenere una forma di guaina adeguata si ricorre ad un'elevata densità di plasma, una durata breve dell'impulso ed un'alta frequenza⁴⁰.

Per trattare un materiale con PIII si possono utilizzare fonti di plasma gassoso quali CCP/ICP rfGD e ECR. La resistenza all'usura, alla corrosione e la durezza possono essere migliorate grazie al PIII. Inoltre, è possibile bombardare la superficie di biomateriali con ioni di elementi pesanti per renderla antibatterica. In particolare, è stato osservato che, in vetri di silice trattati con ioni Ag^+ con diverse dosi ed energie di impianto ionico, l'argento si distribuisce sottoforma di nanoparticelle creando uno strato superficiale efficace per l'azione battericida contro *E. coli*³⁶.

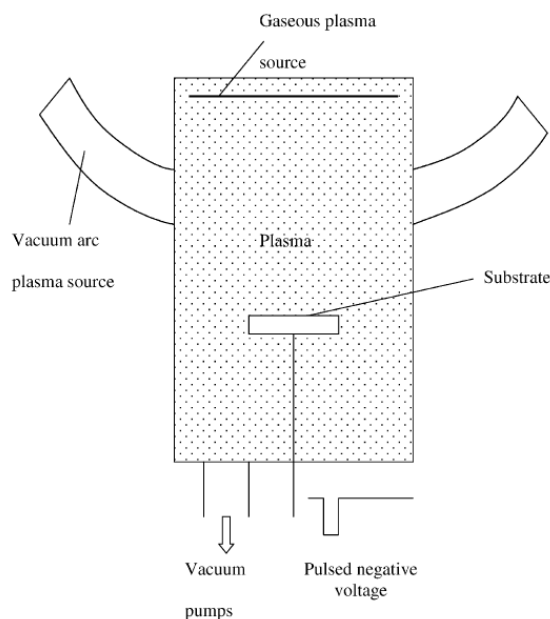


Figura 6.9 Schema di un sistema per Plasma Immersion Ion Implantation. (Chu et al., 2002)

6.4.4. Deposition

Altra tecnologia promettente è la deposizione al plasma (*plasma deposition*), che consente la sintesi uno strato superficiale con proprietà profondamente diverse da quelle del *bulk*. Questo trattamento racchiude diverse tecniche, tra cui la doppia deposizione al plasma, la copolimerizzazione per innesto di plasma, la polimerizzazione al plasma, l'ablazione al laser e l'irradiazione al plasma.

6.4.4.1. Dual plasma deposition (DPD)

Derivata dalla PIII, la *dual plasma deposition* (DPD) sfrutta sorgenti di tipo rfGD e ad arco sottovuoto per la generazione simultanea di plasma gassoso e metallico. Possono essere fabbricati *film* costituiti da diversi elementi con varie composizioni, utilizzando solo uno strumento e mantenendo il vuoto. L'implemento di un plasma metallico, normalmente in modalità pulsata, permette elevate densità ioniche e conseguentemente una notevole densità di nucleazione superficiale. L'impiego di plasma pulsato consente anche la diffusione e il rilassamento di particelle deposte tra un impulso e l'altro. Inoltre, il substrato è completamente immerso nel plasma promuovendo una deposizione semplice ed uniforme. Durante la DPD è essenziale gestire l'energia ionica, applicando un potenziale elettrico continuo quando substrato e *layer* depositato sono conduttori o semiconduttori o impartendone altrimenti uno alternato o pulsato per minimizzare l'accumulo di carica⁴⁰.

6.4.4.2. Plasma polymerization

Il trattamento di *plasma polymerization* prevede la trasformazione di molecole a basso peso molecolare in molecole ad alto peso molecolare attraverso l'utilizzo di specie energetiche presenti nel plasma, quali elettroni, ioni, radicali liberi. La polimerizzazione al plasma differisce significativamente da quella convenzionale per quanto riguarda la composizione chimica e le proprietà fisico-chimiche nonostante l'utilizzo degli stessi precursori. Durante tale processo, la sintesi del polimero comprende l'attivazione di monomeri in radicali, la ricombinazione dei radicali formati e la riattivazione delle particelle ricombinate. L'insieme di questi eventi porta alla formazione di un rivestimento disordinato in cui le unità monomeriche non si ripetono in successione, bensì presentano reticolazioni, frammentazioni e riarrangiamenti. Di conseguenza si osserva una densità di *cross-link* molto elevata rispetto ad un polimero ottenuto con processi convenzionali, come rappresentato in figura 6.10⁴⁷. Generalmente, i polimeri ottenuti attraverso un trattamento al plasma presentano modulo elastico elevato e non mostrano una temperatura di transizione vetrosa evidente. Si ottengono film polimerici di ottima resistenza all'abrasione grazie alla microdurezza conferita a seguito del processo. Per la produzione di polimeri con plasma si usano idrocarburi alifatici (alcani come metano ed etano, alcheni come etilene ed acetilene) o aromatici (benzene). È possibile impiegare gas inorganici al fluoro (F_2 , HF, NF_3 , BF_3 , SF_4 , SF_6) o monomeri fluorurati per la produzione di polimeri idrofobici. Si possono produrre tramite plasma polimeri a partire da monomeri organo-silicici con notevole resistenza alla temperatura, inerzia chimica ed ottime proprietà elettriche, ottiche e biochimiche. I comuni precursori organo-silicici includono silano (SiH_4), disilano ($Si-Si$), disilossano ($Si-O-Si$), disilazano ($Si-NH-Si$) e disiltiano ($Si-S-Si$)⁴⁰.

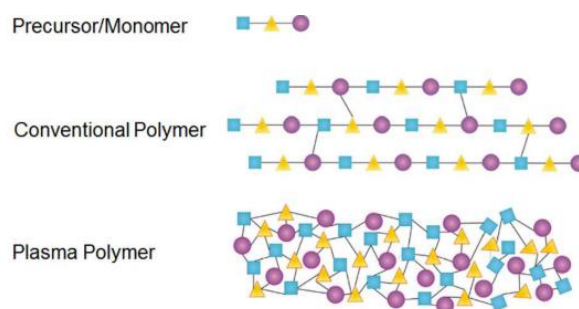


Figura 6.10 Comparazione schematica tra un film di polimero ottenuto per polimerizzazione al plasma e di uno ottenuto con un processo convenzionale a partire dallo stesso precursore. (Thiry et al., 2016)

6.4.4.3. *Plasma-grafting co-polymerization*

Esponendo al plasma i materiali polimerici, vengono a crearsi dei radicali lungo le catene polimeriche che inducono la polimerizzazione al contatto con monomeri liquidi o gassosi. Sulla superficie del materiale esposto al plasma si formano quindi degli innesti (*grafts*) polimerici. Nel particolare, si assiste in primo luogo alla formazione di radicali per mezzo delle collisioni anelastiche tra la superficie del polimero e le particelle cariche del plasma, che è di solito ad argon, elio o azoto. I radicali possono persistere anche per diversi giorni. In secondo luogo, si espone il substrato a vapori ad alta temperatura oppure a soluzioni acquose od organiche di monomero. Bisogna prestare attenzione al contenuto di ossigeno nel vapore o nella soluzione di monomero in quanto inibitore di reazione. Questo trattamento di *plasma-grafting co-polymerization* si effettua per variare le proprietà di bagnabilità di polimeri⁴⁰.

6.4.4.4. *Laser ablation*

Durante l'ablazione laser (*laser ablation*, LA) un fascio laser colpisce un bersaglio e genera un "pennacchio" di plasma, che viene trasportato sul substrato per produrre un film mantenendo invariata la stechiometria. La qualità del film dipende dalla densità e dall'energia cinetica del pennacchio: se troppo energetico, danneggerà il *film*. Nel LA è cruciale il controllo del pennacchio per ottenere rivestimento sottile di alta qualità. La fluensa ottimale del laser è vincolata alla distanza tra substrato e bersaglio, che è compresa tra 2-5 cm, e alla pressione del gas di ambiente. L'interazione del pennacchio con il substrato e la morfologia del bersaglio sono essenziali per la riuscita dell'ablazione laser. Inoltre, il *target* deve presentare una densità elevata per ottenere un *film* senza l'intrusione di goccioline: ad esempio, può essere utilizzato un bersaglio amorfo temprato in modo da limitare la formazione di particelle. Rispetto alle tecniche convenzionali, il LA permette la deposizione di materiali alto-fondenti finché si promuove l'assorbimento della radiazione da parte del materiale. In aggiunta, la contaminazione del *film* è limitata rispetto a tecniche che utilizzano filamenti o piastre riscaldanti per l'evaporazione della sostanza da depositare, consentendo quindi il processo anche in ambiente ossidante e ad alta pressione⁴⁰.

6.4.4.5. *Plasma spraying*

La spruzzatura al plasma (*plasma spraying*) viene condotta a pressione atmosferica: si introducono nel plasma prodotto da una torcia le polveri dei materiali da spruzzare. A causa dell'elevata temperatura e della velocità di flusso del plasma, le polveri parzialmente o

totalmente fuse vengono rapidamente accelerate verso il substrato, formando un rivestimento con una struttura a lamelle. Grazie all'elevata temperatura del nucleo del plasma, si possono depositare quasi tutti i metalli e varie combinazioni di materiali ad alto punto di fusione, come ceramiche, *cermet* e materiali refrattari. I materiali possono essere lavorati purché si superino i 300 K di differenza di temperatura tra il punto di fusione e quello di decomposizione o evaporazione. Con questo processo è possibile trattare substrati di geometria articolata. Per di più, dato l'ampio spettro di materiali lavorabili, questa tecnica consente la produzione di film resistenti a corrosione, alta temperatura e ablazione. Tuttavia, l'adesione tra substrato e rivestimento spruzzato non è ottimale, ma può essere migliorata controllando opportunamente il gradiente termico all'interfaccia tra il substrato e il rivestimento. Un gradiente troppo ripido porterebbe alla formazione di uno strato amorfo (il tempo non è sufficiente per la formazione di domini cristallini) e all'introduzione di stress termici residui che possono portare alla generazione di cricche, schegge o delaminazione. Il *plasma spraying* è utilizzato per la realizzazione di rivestimenti in idrossiapatite di impianti protesici metallici grazie alle sue proprietà osteoconduttive⁴⁰.

6.5. Effetti del trattamento al plasma su materiali

Durante la modifica della superficie di un materiale, bisogna tener conto dello spessore dello strato modificato, in quanto, se troppo profondo, potrebbe compromettere le caratteristiche meccaniche e funzionali del *bulk* con notevoli rischi di delaminazione. In linea teorica, sarebbe sufficiente uno spessore di 0.33-1 nm, ma nella pratica si opta per un *layer* più esteso per garantire un rivestimento uniforme e senza fori e al contempo prevenire la degradazione del *bulk* causata dall'erosione meccanica. Si ricerca quindi il migliore compromesso per garantire un minimo spessore del *layer* soddisfacendo i requisiti di funzionalità, uniformità e durata.

6.5.1. Morfologia superficiale

Una particolare morfologia può pilotare la proliferazione, la crescita e l'adesione cellulare, così come impedire l'adesione o causare la distruzione di batteri. Grazie alle tecniche di *etching*, con o senza maschera, è possibile variare la topografia superficiale così come la rugosità e la morfologia, producendo substrati su cui le cellule possono aderire selettivamente. È stato provato che una superficie con rugosità e bagnabilità elevate favorisca l'adesione cellulare su diversi materiali^{10,48}, mentre una topografia

nanostrutturata con proprietà superidrofobiche impedisca l'insediamento e/o la proliferazione di batteri^{30,49}.

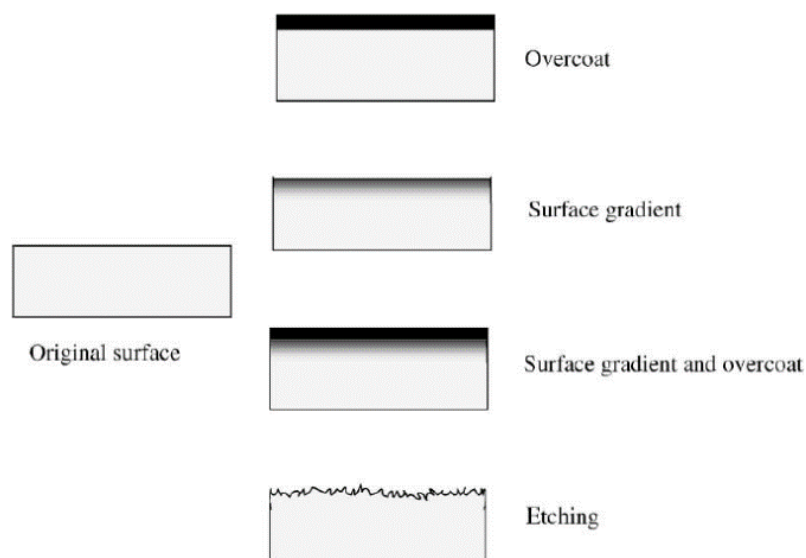


Figura 6.11 Rappresentazione semplificata di modifiche superficiali al plasma di biomateriali. (Chu et al., 2002)

In figura 6.11 sono rappresentate diverse finiture superficiali in base alla tecnica al plasma adottata. È possibile agire sulla morfologia superficiale di vari materiali, tra cui polimeri, vetri e vetro-ceramici. Solitamente, si parte da un substrato e si procede con una modifica al plasma. Se si usa una maschera, si ottiene il *pattern* superficiale per *etching*, altrimenti si prosegue con una micro-litografia: dopo la modifica al plasma, si riveste il substrato trattato con un *resist*, lo si irradia interponendo una maschera e successivamente si sviluppa; si effettua un ulteriore trattamento al plasma al seguito del quale si effettua lo *stripping* del *resist* sviluppato, ottenendo un *pattern* avvallato⁴⁰.

Attraverso un continuo *etching* anisotropo al plasma di tetrafluotometano (CF_4), è possibile realizzare su substrati vetrosi una topografia gerarchica con protuberanze ampie 500 nm decorate con *pillar* di 15-30 nm di altezza. Questa procedura non-litografica prevede il rivestimento iniziale del vetro con un *layer* di quarzo di 1 μm di spessore (in blu in figura 6.12); grazie alla presenza di impurità metalliche localizzate e alla distribuzione disuniforme del campo elettrostatico, si ottiene un *etching* selettivo. Proseguendo col trattamento al plasma, i *pillar* ottenuti dal *layer* sacrificale di silice svolgono un'azione protettiva, venendo incisi più lentamente rispetto al resto del substrato. Così, si ottiene l'*etching* del vetro sottostante (in celeste in figura 6.12) e la conseguente formazione della nanostruttura. Queste nanostrutture possono essere sfruttate per la realizzazione di superfici rese superidrofobiche con il supporto di un rivestimento a bassa energia superficiale⁵⁰.

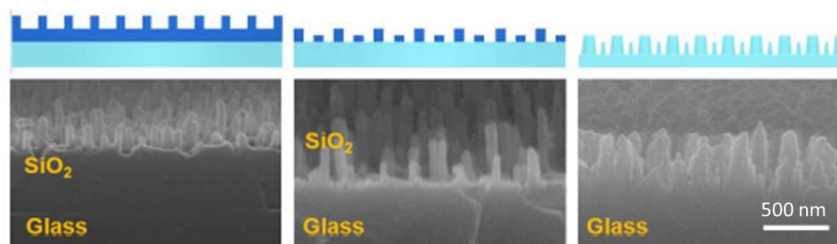


Figura 6.12 Schematizzazione (in alto) e immagini al SEM (in basso) del substrato rivestito trattato con plasma-etching di CF_4 in tre momenti successivi: etching selettivo del layer in quarzo (a sinistra), notevole etching del layer in quarzo (centro), completa asportazione del quarzo e etching selettivo parziale del substrato vetroso (destra). (Yu et al., 2015)

È stato inoltre mostrato come lo spessore iniziale del layer superficiale di quarzo e il tempo di esposizione al plasma influenzino le dimensioni e la distribuzione delle nanostrutture. In particolare, per rivestimenti di poche centinaia di nm si ottengono *nanopillar* dal calibro delle decine di nm, mentre per *coating* spessi qualche micron si hanno strutture di diametri delle centinaia di nm, come si osserva in figura 6.13⁵¹.

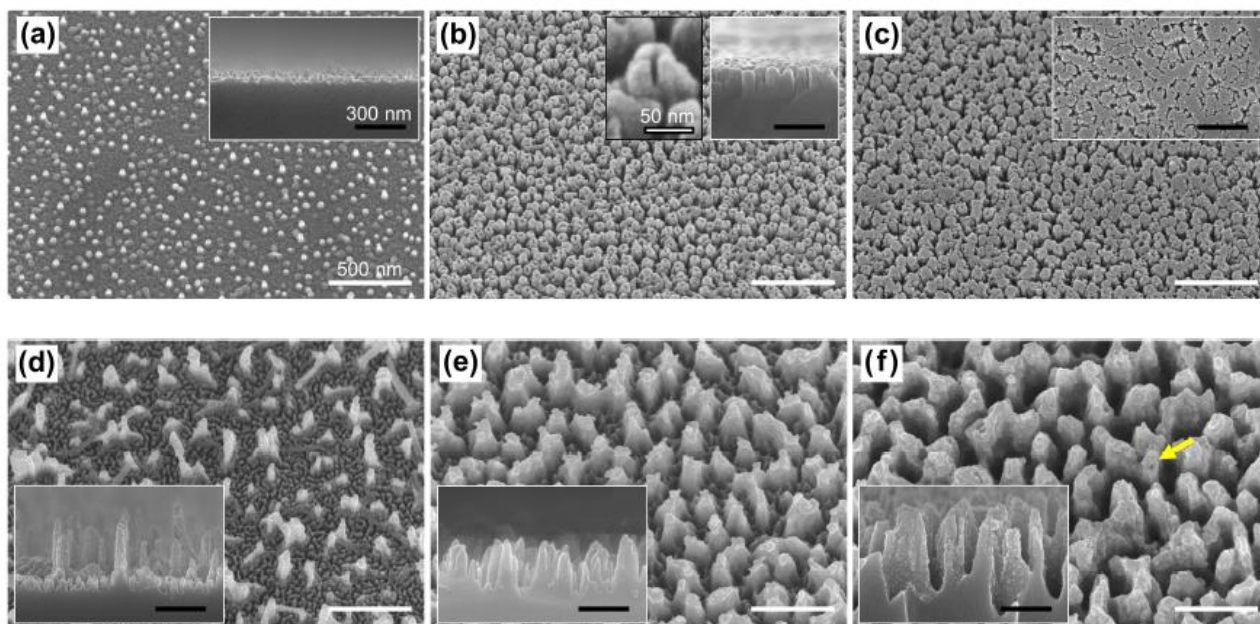


Figura 6.13 Immagini al SEM di substrati vetrosi con rivestimento al quarzo di 250 nm (a, b, c) e 1000 nm (d, e, f), sottoposti ad etching al plasma di CF_4 di durata pari a 5 min (a), 15 min (b), 20 min (d), 30 min (e) e 60 min (c, f). (Yoon et al., 2020)

6.5.2. Proprietà tribologiche

In ambito di impianti chirurgici, è da considerare l'interfaccia tra materiale e organismo ma anche tra i moduli dello stesso dispositivo impiantabile. A scopo esemplificativo, l'artroprotesi totale d'anca presenta almeno due interfacce organismo-impianto (se si considerano solo stelo-osso e coppa acetabolare-osso) e una impianto-impianto (se si pensa all'accoppiamento testina-inserito della coppa). Se nei primi casi si cerca di ottenere una buona interfaccia puntando all'osteointegrazione dell'impianto (o in generale

all'integrazione da parte dell'organismo), nel secondo caso si incontrano difficoltà in termini di attrito ed usura. Un accoppiamento non ottimale tra materiali può portare alla formazione di *debris*, che possono provocare l'infiammazione dei tessuti circostanti. Se questa non si risolvesse, potrebbe verificarsi il fallimento dell'impianto. Inoltre, l'usura si può manifestare anche come innesco di cricche che possono portare alla rottura fragile a fatica dell'impianto. È ragionevole una funzionalizzazione al plasma per migliorare le caratteristiche tribologiche superficiali dei materiali senza intaccarne il *bulk*. L'impianto di ioni è una tecnica compatibile con il miglioramento delle proprietà tribologiche: in seguito alle collisioni degli ioni accelerati contro una superficie, si osserva la deformazione del reticolo cristallino del materiale che porta ad un indurimento superficiale osservabile a profondità inferiori a 1 μm . Come si evince dalla rappresentazione in figura 6.14, lo strato esterno del materiale presenta un notevole disordine causato dalla penetrazione degli ioni (si noti anche il fenomeno di *sputtering*). Altro metodo di miglioramento della resistenza all'usura consiste nella realizzazione di rivestimenti tramite deposizione al plasma di nitruro di carbonio (CN) o di *diamond-like carbon* (DLC) tramite la deposizione PIII o rfGD⁴⁰.

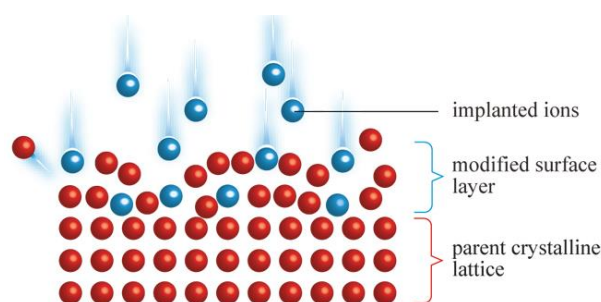


Figura 6.14 Rappresentazione delle modifiche del reticolo cristallino superficiale del materiale generate dall'impianto ionico. (Prokhorov, 1990)

6.5.3. Gruppi funzionali superficiali

I trattamenti al plasma sono ampiamente utilizzati per l'aggraffaggio di molecole funzionali. Questo può essere ottenuto sfruttando la chimica intrinseca del substrato o combinando l'azione del plasma a gas che si riarrangia per formare specie funzionali. Il plasma è in grado di aumentare l'energia superficiale dei materiali creandovi gruppi funzionali: trattando materiali polimerici, si rileva la presenza di vari gruppi utili al *grafting*, quali ossidrilico, carbonilico, aldeidico, etero e carbossilico⁵². Di grande interesse per il *grafting* di biomolecole (ad es. proteine) è il gruppo amminico. Quest'ultimo può essere unito alla superficie polimerica mediante un processo a due step: si effettua

inizialmente un *etching* con gas inerte (ad es. Argon) e successivamente si tratta la superficie con un plasma al gas di monomero (ad es. 3-amminopropil-trietossisilano, APTES) che presenta la funzionalità amminica sul lato opposto a quello di aggraffaggio. La funzionalizzazione con APTES può essere effettuata anche su vetri di silice⁵³.

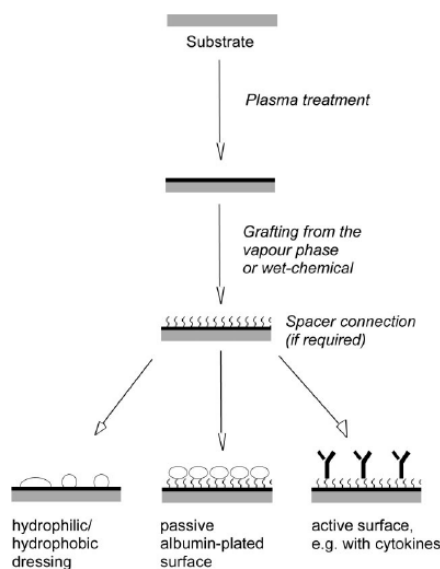


Figura 6.15 Ottimizzazione della crescita cellulare. (Oehr et al., 1999)

In figura 6.15 è mostrato come la funzionalizzazione al plasma utile all'aggraffaggio di molecole possa favorire la crescita cellulare attraverso tre strade differenti:

- 1) per la presenza di rivestimenti idrofobici/idrofilici, la cellula percepisce una certa energia libera di superficie che ne determina il destino;
- 2) le superfici rivestite possono svolgere una funzione biomimetica in modo da non essere riconosciute dall'organismo come estranee;
- 3) le superfici possono essere aggraffate a biomolecole che promuovono la crescita, la proliferazione e la diffusione cellulare⁵².

Per quanto riguarda substrati vetrosi, la scarica al plasma è usata anche per aumentare la reattività del materiale: in uno studio, dopo la sua attivazione, la superficie vetrosa è stata aggraffata all'1,2-etanditiolo (EDT); i gruppi -SH liberi in superficie sono stati collegati a nanoparticelle in oro (AuNPs) in sospensione colloidale. I substrati in vetro funzionalizzati con AuNPs sono molto utili per metodi di analisi spettroscopiche (in particolare nella *Surface Enhanced Raman Scattering*, SERS, e nella *Surface Plasmon Resonance*, SPR)⁵⁴. In una pubblicazione che ricapitola diversi metodi citati, sono stati realizzati dei rivestimenti al fluoro su substrati vetrosi (Si e *soda-lime glass*) ricoperti di allumina: i

campioni, che mostrano gruppi funzionali superficiali, sono stati trattati con *atomic layer deposition* (ALD) di Al_2O_3 al fine di ottenerne uno strato sottile (28 nm) dall'elevato indice di rifrazione ($n \approx 1.64$). In seguito, i dispositivi vengono immersi in acqua deionizzata a 85-90°C per conferire all'allumina un aspetto simile all'erba di prato (*grass-like alumina*, GLA), con una rugosità di 35 nm. Al di sopra del GLA viene depositato con sistema al plasma del fluoropolimero (trifluorometano, CHF_3) al fine di abbassare l'energia superficiale del rivestimento (figura 6.16). Quest'ultimo ha dimostrato di possedere ottime proprietà superidrofobiche (angolo di avanzamento e di retrocessione di 173° e 160°, rispettivamente) e antiriflesso (94.9% di trasmissione media per un vetro rivestito da un solo lato)⁵⁵.

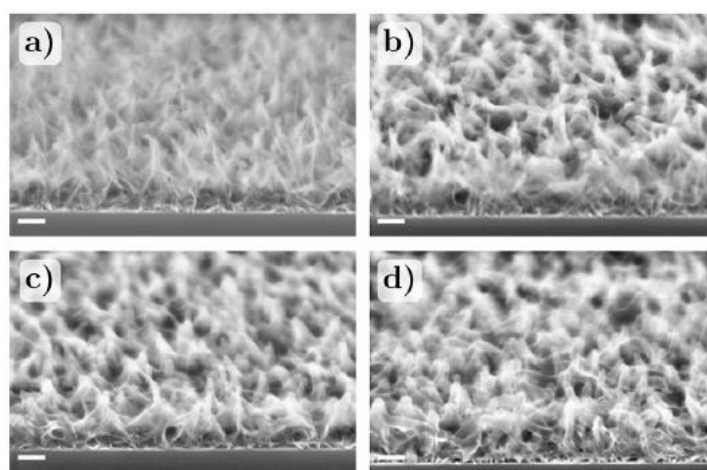


Figura 6.16 Immagini SEM trasversali di Si rivestito con GLA e fluoropolimero, depositato per 3 (a), 5 (b), 7 (c) e 10 (d) minuti; le barre di scala corrispondono a 100nm di lunghezza. (Isakov, et al., 2020)

6.5.4. Effetti biologici

Il plasma può svolgere un'azione decontaminante nei confronti di diversi materiali. Di solito si impiega un plasma a bassa pressione (rfGD) combinato a gas compatibili con l'ambiente sanitario, quali acido peracetico o perossido di idrogeno. L'efficacia è elevata contro molti ceppi batterici e relative spore. Lo sterminio di questi microrganismi è garantito dalla formazione di specie reattive, come radicali liberi ossidrilici od ossigeno generati dalla dissociazione del gas, che reagiscono con le entità biologiche uccidendole e rimuovendone al contempo i detriti. Una volta avvenuta la sterilizzazione, cessa la generazione di plasma e i componenti attivati ritornano ad uno stato di equilibrio, formando ossigeno biatomico, acqua e composti secondari non tossici. I vantaggi di questa tecnologia comprendono la bassa temperatura di esposizione (non superiore a 50°C), permettendo la decontaminazione di materiali termosensibili, e l'assenza di residui dannosi alla fine del

trattamento, dal momento che non si impiegano sostanze nocive, come accade invece per la sterilizzazione con ossido di etilene o formaldeide; per quest'ultima ragione e per l'assenza di radiazioni ionizzanti (es. raggi gamma), è da ritenersi un processo sicuro, oltre ad essere veloce ed economico⁴⁰.

In uno studio è stato impiegato un plasma atmosferico a barriera di dielettrico per sterminare microrganismi: in 2 minuti si è raggiunta una diminuzione nella concentrazione di batteri e lieviti allo stato vegetativo di un ordine logaritmico ≥ 6 , mentre in 20 minuti si ha la stessa azione antimicrobica per le spore di *Geobacillus stearothermophilus*, partendo in tutti i casi da una concentrazione di 10^6 - 10^7 cfu. In questa pubblicazione è stato investigata anche l'influenza del materiale utilizzato come dielettrico: in particolare, sono stati impiegati il *Flame Retardant 4* (FR4, un materiale composito composto da una tela intrecciata in fibra di vetro con un legante ignifugo in resina epossidica) e il semi-ceramico *Rogers®3003* (SC, un materiale composito a base di politetrafluoroetilene caricato con ceramica), aventi costanti dielettriche del valore di 3.00 e 4.15, rispettivamente. Dagli esperimenti è emerso che il FR4 risulta più efficiente nell'attività microbica rispetto al SC, in termini di quantità di ROS generate, di temperatura superficiale durante la produzione di plasma e di potenza assorbita. Tuttavia, il FR4 presenta una degradazione più rapida. Un altro aspetto considerato è la presenza di un liquido sull'elettrodo, che è stato dimostrato inibire la generazione di plasma e la sua efficacia nella sterilizzazione⁵⁶.

7. Sezione sperimentale

In questo lavoro di test, si è proceduto con lo svolgimento di trattamenti superficiali su materiali vetrosi con l'intenzione di conferire proprietà idrofobe, necessarie per prevenire l'adesione di microrganismi e per facilitare il lavaggio delle superfici. Durante la ricerca sperimentale di questa tesi, sono state investigate le differenze tra il materiale trattato e tal quale osservabili tra tipologie di vetro inerte e bioattivo. In particolare, è stata effettuata una funzionalizzazione superficiale al plasma su vetri da finestratura e su vetri bioattivi S53P4 e SBA2. Quest'ultimo appartiene al sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ e possiede caratteristiche e composizione simili al biovetro 45S5. I campioni di vetro bioattivo sono stati sintetizzati in laboratorio, diversamente da quelli in vetro inerte forniti da IRIS S.r.l.

7.1. Materiali e metodi

La preparazione e la caratterizzazione dei campioni di vetro sono state svolte nei laboratori del Dipartimento di Scienze Applicate e Tecnologia presso il Politecnico di Torino nei mesi da novembre 2022 a marzo 2023.

7.1.1. Vetri bioattivi

I vetri bioattivi sono stati realizzati tramite il processo di colata e fusione partendo da specifici precursori. La miscela di reagenti (SiO_2 , Na_2CO_3 , CaCO_3 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, H_3BO_4 , Al_2O_3) è stata posta in un crogiolo di platino per formare il vetro SBA2 con la seguente composizione: 48%mol SiO_2 , 18%mol Na_2O , 30%mol CaO , 3%mol P_2O_5 , 0.43%mol B_2O_3 , 0.57%mol Al_2O_3 . Il crogiolo è stato inserito in forno (Nabertherm® LHT 04/18) a 1450°C per 1h, il fuso colato in uno stampo cilindrico in ottone e poi ricotto in forno (Manfredi® OVMAT 2009) a 500°C per 13h.

Un'altra miscela di reagenti (SiO_2 , Na_2CO_3 , CaCO_3 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) è stata versata in un crogiolo di platino per la formazione del vetro S53P4 BonAlive® con la seguente composizione: 53%wt SiO_2 , 23%wt Na_2O , 20%wt CaO , 4%wt P_2O_5 . Il crogiolo è stato posto in forno a 1360°C per 3h, il fuso colato in uno stampo cilindrico e poi ricotto in forno a 520°C per 1h.

Dopo la rimozione dei vetri dallo stampo, per entrambi i vetri bioattivi sono stati ricavati dei campioni cilindrici di diametro 10 mm e altezza 7 mm sezionando le barrette per mezzo di una troncatrice (ATM® Brillant 220). Una delle due superfici dei campioni è stata sottoposta a lucidatura (Struers® LaboPol-2) con carte abrasive a 500 rpm secondo il seguente protocollo: sgrossatura a P600, lucidatura progressiva a P800 per 30s, P1000 per

60s, P1200 per 90s, P2500 per 120s e P4000 per 150s. Alcuni campioni da sottoporre alla misura del potenziale zeta sono stati assottigliati dal lato non lucidato con carta abrasiva a grana P120 a 500 rpm fino ad uno spessore di poco inferiore a 3 mm.

7.1.2. Vetri inerti

I campioni di vetro inerte da finestratura, di composizione nominale non nota ma a base di silice, sono stati forniti da IRIS S.r.l. Essi presentano delle dimensioni di 20x20x4 mm e degli smussi a 45° di 1 mm lungo gli spigoli. Per paragonare le superfici iniziali dei vetri inerti e di quelli bioattivi e al contempo verificare l'influenza della rugosità superficiale, sono state condotte delle prove sia su campioni lucidati (secondo lo stesso protocollo dei campioni in vetro bioattivo) sia su campioni inalterati. Alcuni campioni da sottoporre alla misura del potenziale Z sono stati assottigliati dal lato non lucidato con carta abrasiva a grana P120 a 500 rpm fino ad uno spessore di poco inferiore a 3 mm.

7.1.3. Funzionalizzazione con plasma

		Flusso di gas (l/min)					Condizioni plasma		
		He	O ₂	N ₂	HMDSO in He	F8261 in He	Tensione (kV)	Frequenza (kHz)	Tempo (s)
Trattamento 1	Pretratt.	8	0.2	-	-	-	6	5	45
	Coating	8	-	-	0.4	-	6	5	90
Trattamento 2	Pretratt.	8	-	0.2	-	-	6	5	45
	Coating	8	-	-	-	0.4	6	5	90

Tabella 7.1. Parametri impostati durante il trattamento al plasma dei campioni di vetri da finestratura (lucidati e non) e bioattivi.

Le modifiche sono state condotte sulla superficie lucidata dei campioni levigati a grana P4000 o su una delle due superfici inalterate dei campioni non lucidati. Le condizioni delle modifiche sono riassunte in tabella 7.1. È stato impiegato un reattore di plasma atmosferico in configurazione DBD (*dielectric barrier discharge*, figura 7.2 A) a disposizione presso IRIS S.r.l. Il trattamento 1 include un pretrattamento in He e O₂, per l'esposizione di gruppi ossidrilici superficiali utili al *grafting* di monomero che avviene in fase di rivestimento, e un *coating* in HMDSO (esametildisilossano, a sinistra in figura 7.1), che dovrebbe conferire proprietà idrofobe alla superficie⁵⁷. Nel trattamento 2, il pretrattamento in He e N₂ fornisce gruppi amminici superficiali a disposizione del *grafting* di monomero per il successivo *coating* con il fluoro-silano F8261 (1H,1H,2H,2H-perfluoroalchiltrirossisilano, a destra in figura 7.1), in grado di conferire proprietà altamente idrofobe⁵⁸. Nella fase di deposizione il gas elio viene fatto gorgogliare nei precursori polimerici mediante *bubbler*.

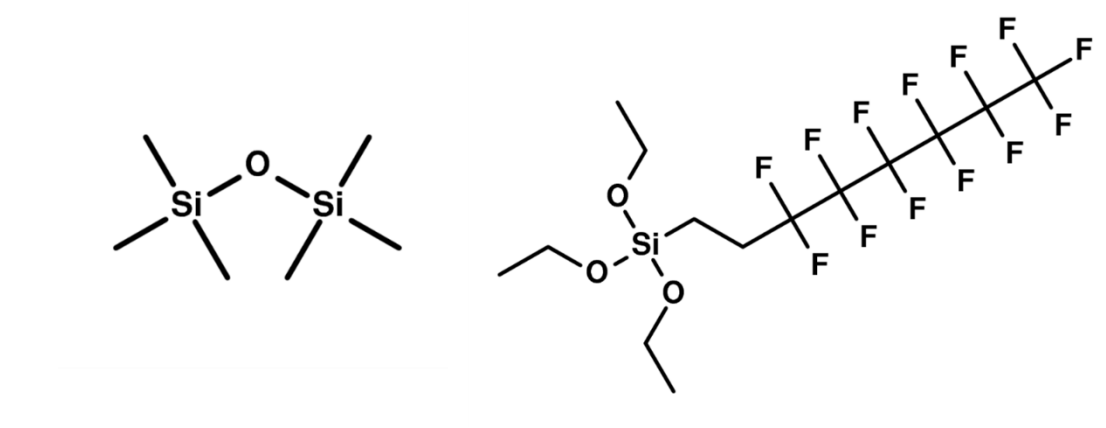


Figura 7.1. Formule di struttura di esametildisilossano (HMDSO) a sinistra e di 1H,1H,2H,2H-perfluoroalchiltrirossilano (F8261) a destra. Immagini ottenute dall'editor PubChem Sketcher V2.4.

Per tutti i trattamenti, è stata impostata una tensione di 6 kV ed una frequenza di 5 kHz. I campioni sono stati posti nel *gap* tra il piatto superiore del reattore e il dielettrico, posti ad una distanza di circa 7 mm (figura 7.2 B-C). Dopo l'inserimento dei campioni, è stato avviato il plasma per 45 s nel caso di pretrattamento e per 90 s nel caso di rivestimento. In alcuni casi è stata eseguita una parziale mascheratura dei campioni di vetro inerte per mezzo di nastro adesivo in carta allo scopo di funzionalizzare e investigare il materiale a tre *time step*: 45 s, 70 s e 90 s. Alcuni campioni sono stati solo pretrattati per monitorare il cambiamento di energia superficiale ad ogni *step* della funzionalizzazione.

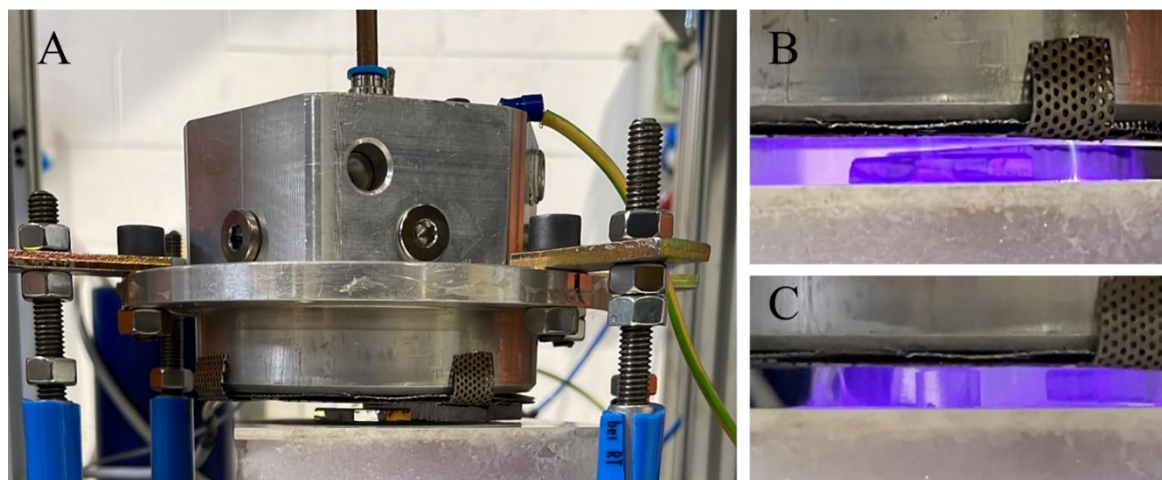


Figura 7.2. Sorgente di plasma a doppia barriera di dielettrico (DBD). In A si osserva la piastra superiore, collegata ad un polo e alla terra, sospesa mediante dei pilastri filettati al di sopra della piastra inferiore collegata al polo opposto; si noti lo strato di dielettrico (allumina) che riveste uno spessore di silicone. Il campione è posto tra il dielettrico e la piastra superiore. In B e C sono mostrati i campioni di vetro da finestratura e bioattivo, rispettivamente, a plasma acceso.

7.2. Caratterizzazioni

Effettuato il trattamento al plasma, i campioni trattati con silossano e fluoro-silano sono stati analizzati presso il Politecnico di Torino per studiare gli effetti del rivestimento

polimerico superficiale. Le prove sono state condotte sia su campioni trattati sia su campioni non trattati e comprendono analisi inerenti a morfologia, topografia, rugosità, bagnabilità, chimica superficiale, composizione, struttura cristallina, carica superficiale, bioattività *in vitro* e adesione batterica. In dettaglio, per investigare la morfologia e la composizione, è stata effettuata un'analisi al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) munito di spettroscopia a dispersione di energia (EDS), per l'analisi topografica e profilometrica si è svolta un'osservazione al microscopio confocale a laser ottico, al fine di investigare la chimica superficiale si è effettuata un'analisi spettroscopica in trasformata di Fourier nell'infrarosso (FTIR), per una stima della bagnabilità della superficie è stata condotta un test statico di angolo di contatto con acqua (WCA), con l'obiettivo di valutare la carica superficiale del materiale è stata condotta la misura del potenziale zeta, per testare la reattività *in vitro* sono state realizzate prove di bioattività in soluzione fisiologica simulata (SBF) con studio della diffrazione dei raggi X (XRD), per caratterizzare le proprietà antiadesive sono state svolte delle prove *in vitro* di coltura batterica. Come si noterà in seguito, non tutte le prove menzionate sono state effettuate sui campioni soggetti a trattamento 2.

7.2.1. Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS

La microscopia elettronica a scansione con emissione di campo (*field emission scanning electron microscopy*, FE-SEM) produce immagini che mostrano la morfologia superficiale di materiali conduttivi. Solitamente, i campioni vengono analizzati in condizioni di vuoto spinto, in modo che le molecole di gas non interferiscano con i fasci di elettroni incidenti, riflessi e diffusi indispensabili per l'*imaging*. Un fascio di elettroni è generato attraverso un cannone a emissione di campo (*field emission gun*) e viene convogliato e deflesso per mezzo di lenti elettromagnetiche. Quando gli elettroni colpiscono la superficie del campione, si comportano secondo due modalità principali: l'elettrone può essere riflesso con un angolo piccolo rispetto alla verticale alla superficie del campione (*backscattered electron*, BE, generato da urto elastico) oppure può provocare la diffusione di elettroni del materiale analizzato in direzione completamente diversa rispetto a quella di incidenza (*secondary electron*, SE, in seguito ad urto anelastico con perdita di energia). Nel microscopio a scansione elettronica la ricostruzione dell'immagine è operata da sensori distinti per i BE e per gli SE, dal momento che forniscono informazioni diverse⁵⁹.

Per conoscere la composizione dei campioni investigati, è possibile condurre un'analisi spettroscopica a dispersione di energia (*energy dispersive spectroscopy*, EDS). Questa può

essere svolta utilizzando un microscopio SEM. Il principio di funzionamento dell'EDS consiste nell'emissione di raggi X dovuto al bombardamento del campione esaminato per mezzo di un fascio focalizzato di cariche ad alta energia. Un elettrone viene eccitato dal fascio incidente ad un livello energetico più alto; tornando allo stato iniziale, la particella emette energia di una quantità pari allo scarto tra i due livelli sottoforma di radiazioni X. Con la rilevazione di queste ultime, l'analisi EDS restituisce uno spettro che mostra i picchi relativi alla composizione elementare del campione investigato⁶⁰.

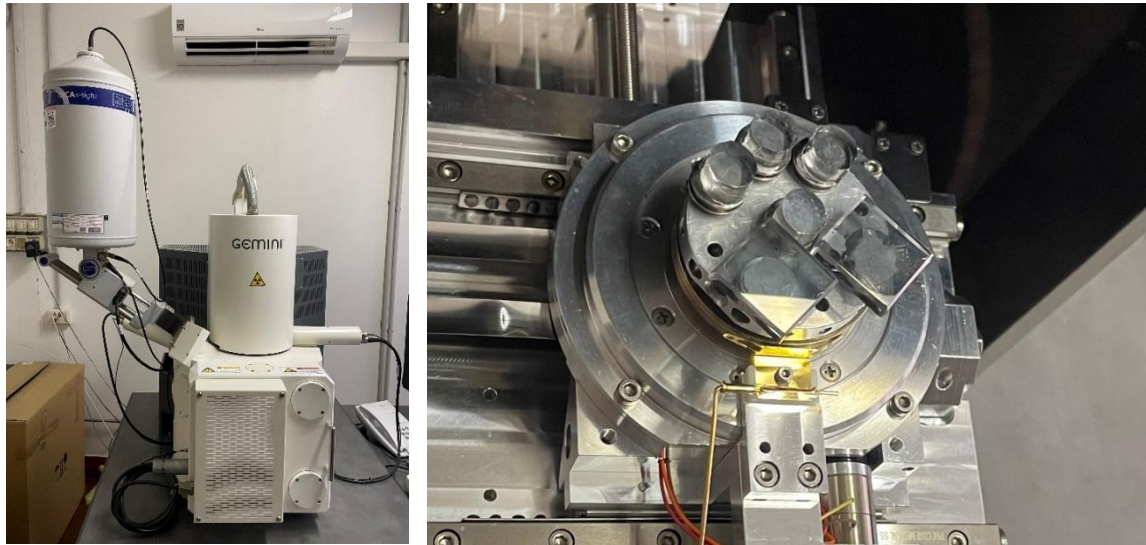


Figura 7.3. Microscopio FE-SEM con sonda EDS (sinistra) e campioni di vetri bioattivi e da finestratura posti negli stub di supporto prima della chiusura della camera a vuoto (destra).

I campioni di tutte le tipologie di vetro sono stati rivestiti con Pt attraverso *sputtering* e incollati ai supporti circolari (*stub*) mediante una colla a base di argento. Dopo il posizionamento dei campioni all'interno della camera dello strumento (figura 7.3 a destra) e l'induzione del vuoto ad una pressione di $1,5 \cdot 10^{-5}$ Torr, è stato applicato un voltaggio ad alta tensione (*electron high tension*, EHT) di 5.00 kV ad una distanza tra la sonda e il campione compresa tra 4 e 6 mm. L'osservazione è stata condotta a diversi ingrandimenti con il sensore InLens: 1000x, 5000x, 10000x, 50000x, 100000x, 200000x. L'analisi EDS, eseguita invece a valori di EHT pari a 15.00 kV, è stata svolta in parallelo a quella morfologica, con l'uso del microscopio FE-SEM Zeiss® Ultra 55 in combinazione con la sonda EDS Oxford Instruments® INCA x-sight (figura 7.3 a sinistra).

7.2.2. Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico

Il microscopio confocale a laser ottico permette di visualizzare la topografia di una superficie tridimensionale estraendone parametri come la rugosità. L'immagine

tridimensionale ottenuta in modalità confocale viene costruita sovrapponendo una serie di scansioni effettuate per mezzo di un fascio laser che fuoriesce da un'apertura, detta *pinhole*, in grado di visualizzare solo ciò che è presente sul piano di messa a fuoco dello strumento. Considerando la superficie del campione da analizzare parallela al piano x-y, lo spessore di volume analizzato viene definito ponendo un limite di visibilità massimo ed uno minimo, spostando lungo l'asse z il piano di messa a fuoco. Per campioni molto lisci e planari, il *pinhole* si "apre" completamente mettendo a fuoco l'intera superficie nell'area analizzata.

L'analisi è stata condotta con la lente 20x (+10x di ottico) del microscopio Zeiss® LSM 900, con un ingrandimento totale di 200x. L'apertura del *pinhole* è stata mantenuta tra 29 e 460 μm , con un *master gain* tra 200 e 250 V e un numero di scansioni tra 80 e 100. Ottenuta la ricostruzione dell'immagine, sono stati applicati in successione due filtri, uno passa basso a 8 μm per la *waviness* e uno passa alto a 250 μm per la *roughness*. Sono stati quindi estratti i parametri di rugosità, in particolare Sq (altezza quadratica media). Per stimare lo spessore del *coating*, sui campioni parzialmente mascherati (vetro da finestratura non lucidato, trattato a 45s, 70s e 90s) è stata valutata la differenza di altezza tra la parte rivestita e la parte protetta dal nastro adesivo.

7.2.3. Chimica superficiale: spettroscopia FT-IR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) consiste in una tecnica di caratterizzazione di superfici che monitora le transizioni vibrazionali operate dal nucleo di un atomo rispetto alla posizione di equilibrio. La radiazione elettromagnetica nel range infrarosso viene assorbita dalla superficie del campione causando la transizione energetica delle sue particelle. I dati grezzi inerenti all'assorbanza, definita come

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

con I_0 radiazione incidente ed I quella trasmessa, vengono elaborati attraverso la trasformata di Fourier producendo infine uno spettro, in cui si riporta il numero d'onda in ascissa (cm^{-1}) e l'assorbanza in ordinata (u.a.).

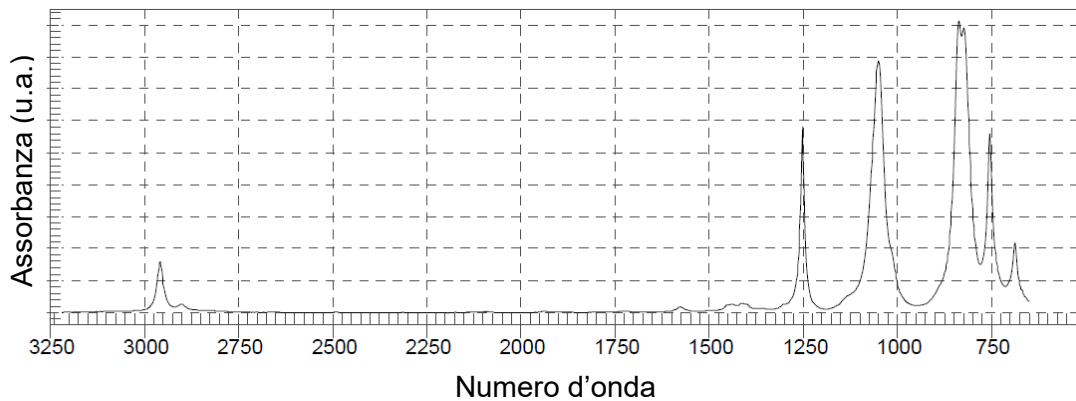


Figura 7.4. Spettro FT-IR di riferimento del esametildisilossano (immagine adattata da: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/quality/spectra/540/453/ATIR0003849.pdf>)

Al fine di svolgere un'analisi qualitativa dei gruppi superficiali presenti sui campioni funzionalizzati con il trattamento 1, è stato eseguito un confronto tra lo spettro FT-IR dell'esametildisilossano (in figura 7.4) e quelli dei campioni trattati e non trattati. I picchi caratteristici per *film* sottili di HMDSO, si osservano a $781\text{--}796\text{ cm}^{-1}$ (*rocking* di $-\text{CH}_3$ e *stretching* di Si-C in Si-CH_3), a $1020\text{--}1074\text{ cm}^{-1}$ (*stretching* Si-O-Si), a $1260\text{--}1259\text{ cm}^{-1}$ (*deformation* di CH_3 in Si-CH_3), a 1399 cm^{-1} (*bending* asimmetrico di CH_3 in Si-CH_3) e a $2950\text{--}2960\text{ cm}^{-1}$ (*stretching* asimmetrico di CH_3 in Si-CH_3).

Per investigare la chimica superficiale dei campioni soggetti a trattamento 2, è stato effettuato un confronto tra gli spettri FT-IR dei vetri trattati e del fluorosilano F8261, illustrato in figura 7.5. Quest'ultimo presenta bande di assorbimento del metilene ($-\text{CH}_2-$) a circa 2922 cm^{-1} (*stretching* asimmetrico), a 2856 cm^{-1} (*stretching* simmetrico), a 1379 cm^{-1} (*bending*). Alla banda intorno a 1063 cm^{-1} si riferisce la vibrazione dei legami Si-O-C del fluorosilano. I numeri d'onda intorno a 1197 e 1142 cm^{-1} riguardano invece i moti vibrazionali gruppo metilico ($-\text{CH}_3$)⁶¹.

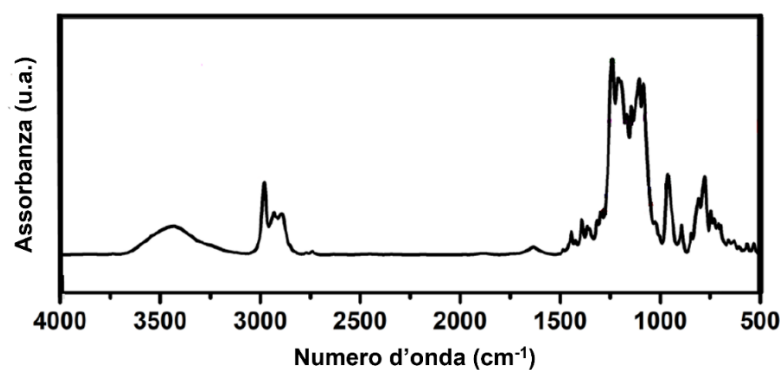


Figura 7.5. Spettro FTIR di riferimento del esametildisilossano (immagine adattata da: Wang, H. et al., *Researches on silane coupling agent treated AlN ceramic powder and fabrication of AlN/PTFE composites for microwave substrate applications*. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* 30, 20189–20197 (2019).

L'esame è stato condotto per mezzo dello spettrometro Thermo Scientific® Nicolet iS50 FT-IR in modalità riflettanza totale attenuata (ATR).

7.2.4. Bagnabilità: WCA

Per determinare l'idrofilicità dei campioni prima e dopo il trattamento al plasma, è stato condotto un test di angolo di contatto (*water contact angle*, WCA) in condizioni statiche. Le gocce di acqua sono state depositate mediante siringa sulla superficie dei campioni analizzati e la misura dell'angolo di contatto statico è stata effettuata in triplicato dopo un tempo di 2s dall'istante di contatto tra le due parti. I campioni non funzionalizzati sono stati puliti con etanolo prima della misura. Il test è stato eseguito con Kruss® DSA 100 sui campioni con trattamento 1 e 2.

7.2.5. Carica superficiale: potenziale zeta

Il potenziale zeta viene spesso utilizzato per la caratterizzazione, in termini di carica elettrica, dell'interfaccia solido-liquido o liquido-gas, facendo riferimento al modello del doppio strato elettrochimico (*electrochemical double layer*, EDL) per cui un solido, quando entra in contatto con una soluzione acquosa, assume una carica superficiale. Quest'ultima può generare un potenziale elettrico che decresce all'aumentare della distanza con la superficie. Il comportamento delle cariche superficiali rivela informazioni utili riguardo i gruppi funzionali esposti, assumendo valori diversi al variare del pH della soluzione adoperata: a seconda dell'acidità o della basicità del liquido, le funzionalità superficiali possono mostrarsi protonate, neutre o deprotonate. La densità dei gruppi esposti su una superficie influenza il comportamento della stessa: una densità elevata può inibire la completa dissociazione o protonazione dei gruppi a causa della repulsione tra un gruppo carico e quelli adiacenti. La determinazione del potenziale zeta deriva dalla misura dell'effetto elettrocinetico osservato quando un solido ed una fase liquida si muovono in modo relativo tra loro. Quando una soluzione acquosa si sposta rispetto ad un campione solido, si genera una risposta elettrica che può manifestarsi sottoforma di potenziale o di corrente. Questa grandezza può essere stimata in modalità tangenziale (flusso lungo la superficie del campione) oppure in modalità di permeazione (flusso attraverso un campione poroso)⁶².

Dopo un prelavaggio con acqua bidistillata del circuito idraulico dello strumento Anton Paar® SurPASS Electrokinetic Analyzer (figura 7.7 A), la coppia di campioni è stata inserita nella camera di analisi (figura 7.7 B) con un *gap* tra le superfici funzionalizzate di

poco più di 100 μm . Il circuito è stato caricato con una soluzione acquosa dell'elettrolita KCl a concentrazione 0.001 M, che conferisce un pH di circa 5.6. Il flusso è impostato a 100 ml/min. Per la titolazione basica (da pH 5.6 a circa 9), si impiega una soluzione acquosa di NaOH 0.05 M effettuando 15 scansioni a diversi valori di pH da 4 rampe ciascuna, così come per quella acida (da pH 5.6 a circa 3) in cui si impiega una soluzione acquosa di HCl 0.05 M. La curva in uscita presenta per ciascun valore di pH la media e la deviazione standard delle quattro rampe di ogni scansione. Sono state effettuate prima le rampe a titolazione basica e poi quelle a titolazione acida. L'analisi è stata svolta sui campioni funzionalizzati con trattamento 1 di vetri da finestratura lucidati e bioattivi (SBA2 e S53P4).

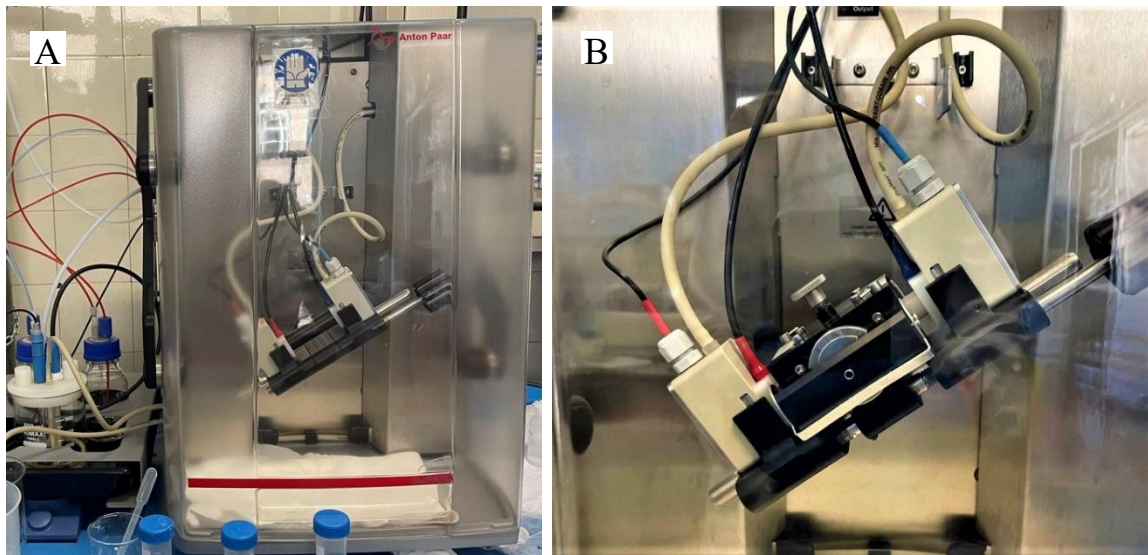


Figura 7.7. Anton Paar® SurPASS Electrokinetic Analyzer per la misura del potenziale zeta: strumento in configurazione di lavaggio (A) e dettaglio della camera caricata con la coppia di campioni da analizzare (B).

7.2.6. Bioattività: test in SBF

La reattività dei campioni di vetro bioattivo, prima e dopo il trattamento al plasma, è stata stimata *in vitro* mediante prove di bioattività, ossia la capacità dei vetri di indurre la precipitazione di idrossiapatite (HAp) sulla loro superficie. Si pongono i campioni in un fluido biologico simulato (*simulated body fluid*, SBF) a temperatura e pH controllati, per diversi intervalli di tempo, in modo da promuovere il meccanismo di bioattività.

Un metodo efficace per testare la precipitazione di idrossiapatite sulle superfici dei vetri bioattivi è l'analisi della diffrazione dei raggi X (*X ray diffraction*, XRD). Questa tecnica fornisce informazioni riguardo la struttura cristallografica, la composizione chimica e le proprietà fisiche di un materiale. La tecnica XRD è fondata sull'interferenza costruttiva dei

raggi X monocromatici e di un campione cristallino. I raggi X generati vengono collimati e diretti al campione da investigare: la loro interazione produce un fascio diffratto, che viene quindi rilevato, elaborato e quantificato. L'intensità dei raggi diffratti diffusi a diverse angolazioni del materiale viene tracciata per visualizzare un modello di diffrazione. Quest'ultimo è unico per ciascuna fase del materiale e rispecchia la chimica specifica e la disposizione atomica del campione. Il modello di diffrazione complessivo è una semplice somma di quelli di ciascuna fase⁶³. A scopo esemplificativo, in figura 7.6 sono riportati i modelli di diffrazione di raggi X della superficie di un vetro bioattivo a diversi time step: si notino il *plateau* e i picchi caratteristici del gel di silice (7gg) e dell'HAp (28 e 56gg), rispettivamente.

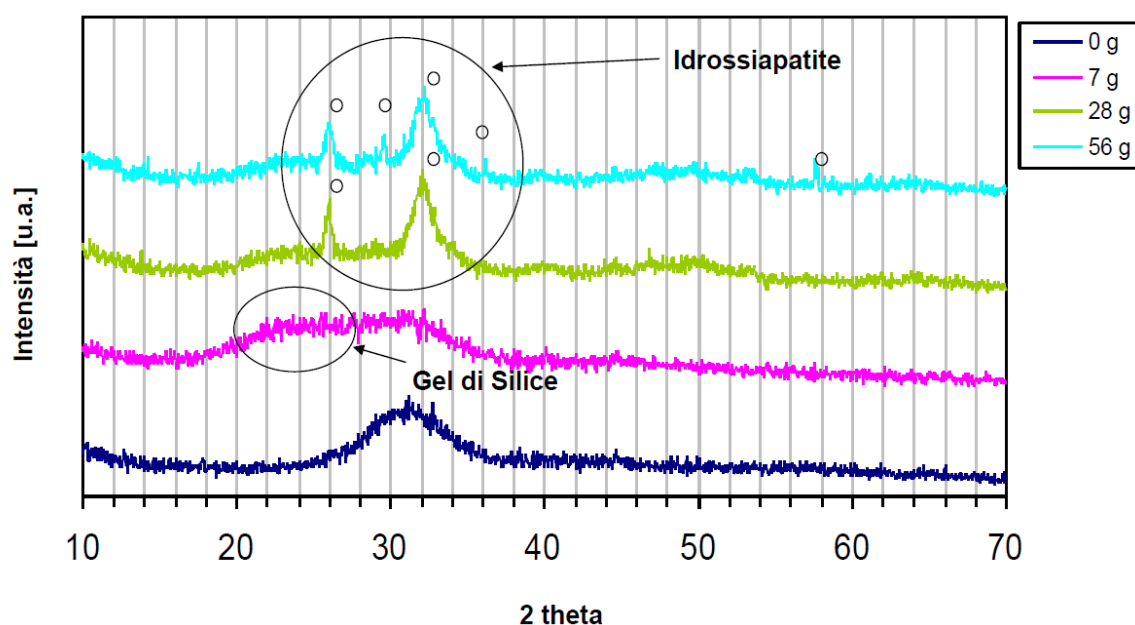


Figura 7.6. Diffrazione a raggi X durante le fasi di reazione sulla superficie di un vetro bioattivo: modello di diffrazione a 0, 7, 28, e 56 giorni. (Prof.ssa E. Verne', dispense del corso di Biomateriali - 05AFYMZ – A.A. 2021/2022)

La soluzione SBF è stata preparata secondo il protocollo di Kokubo-Takadama⁶⁴ inserendo sequenzialmente i primi otto reagenti elencati in tabella 7.2 all'interno di un becher in plastica contenente acqua deionizzata ad una temperatura di 36 ± 1.5 °C con agitatore magnetico a 200 rpm. Inserito il pHmetro, sono stati introdotti i reagenti 9 e 10 (quest'ultimo in eccesso) in modo da tamponare la soluzione a $\text{pH } 7.4 \pm 0.1$. I campioni soggetti a trattamento 1 e non trattati sono stati posti in recipienti ermetici immersi in 50 ml di SBF nell'*orbital shaker* IKA® KS 4000i control in agitazione planare a 37°C a 120 rpm per 3, 7 e 14 giorni.

Ordine di inserimento	Reagente	Massa o volume per 1L di SBF
1	NaCl	8.035 g
2	NaHCO ₃	0.355 g
3	KCl	0.225 g
4	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.231 g
5	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.311 g
6	HCl (1M)	39 ml
7	CaCl ₂	0.292 g
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g
9	TRIS	6.118 g
10	HCl (1M)	0-5 ml

Tabella 7.2. Elenco dei reagenti e delle rispettive quantità (massa o volume) inseriti sequenzialmente in acqua deionizzata per la realizzazione di 1L di SBF.

Per appurare i meccanismi di bioattività e la conseguente precipitazione di HAp, sono state condotte delle misure di pH della soluzione SBF in cui sono stati immersi i campioni. Successivamente, una misura più precisa della bioattività è stata fornita dall'analisi al FE-SEM parallelamente all'EDS, ad ingrandimenti di 500x, 2000x, 10000x e 50000x secondo lo stesso protocollo seguito per l'analisi morfologica, e dall'analisi XRD. Quest'ultima è stata condotta per mezzo del diffrattometro Philips® X'Pert, utilizzando la geometria della telecamera Bragg-Brentano con radiazione incidente Cu-K α , tensione e corrente della sorgente impostate a 40 kV e 30 mA, dimensione del passo $\Delta(2\theta) = 0.02^\circ$, tempo di conteggio fisso di 1 s per passo. Gli spettri ottenuti sono stati analizzati utilizzando il programma "X'Pert High Score", con il database PCPDFWIN (2002 JCPDS- International Center for Diffraction Data).

7.2.7. Proprietà antiadesive: test batterici *in vitro*

Per valutare le proprietà antiadesive dei campioni con trattamento 1, si è svolto un test di coltura batterica presso il Centro di Ricerca Traslazionale sulle Malattie Autoimmuni e Allergiche (CAAD) a Novara. Si è seguito il protocollo *International Standard Organization* (ISO) 22196: è stata preparata una sospensione di batteri del ceppo *Staphylococcus Aureus* (American Type Culture Collection, ATCC), con una concentrazione batterica di 1×10^5 CFU/ml. 50 e 500 μ l di sospensione cellulare standardizzata sono stati posizionati rispettivamente sui campioni di vetro da finestra, inseriti in una *multiwell* da 6, e su quelli di vetro bioattivo, posizionati in una da 12. Le

cellule sono state lasciate aderire uniformemente alla superficie per 90 minuti a 37 °C. Le cellule non adese sono state rimosse lavando delicatamente con 1 ml di soluzione tampone fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS). Per permettere il distacco del *biofilm* dalla superficie dei campioni, questi ultimi sono stati sospesi in 2 ml di PBS, sonicati per 5 min a 60 Hz (VWR International® Aquasonic 250HT) e vorticati per 30 s; questo è stato ripetuto tre volte. Aliquote di 200 µl di sospensione sono state trasferite nei pozzetti di una *multiwell* da 96 ed usate per preparare sei diluizioni seriali di fattore dieci, mescolando 20 µl di sospensione con 180 µl di PBS. 20 µl di ciascuna diluizione sono stati invasati in piastre di agar Luria-Bertani (LB) e incubati per 24 h a 37 °C. Il giorno successivo è stato conteggiato il numero di unità formanti colonie (*Colony-Forming Units*, CFU) per ml, utilizzando la seguente formula:

$$(\text{numero di colonie}) \cdot 10 \cdot (\text{fattore di diluizione})^{-1}$$

Infine, l'*imaging* al SEM (JEOL® JSM-IT500) è stato utilizzato per studiare le microcolonie batteriche formate sulle superfici dei campioni. Dopo aver fissato i campioni con glutaraldeide al 2,5% per una notte, sono stati disidratati mediante scala alcolica (soluzione acquosa di etanolo al 70, 90 e 100%, 1 h ciascuno), rigonfiati con esametildisilazano, montati su *stubs* con nastro adesivo di carbonio conduttivo e metallizzati con oro. Le immagini sono state raccolte a diversi ingrandimenti (2000x e 4000x) utilizzando una sonda per elettroni secondari.

7.3. Risultati

7.3.1. Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS

Le immagini ottenute in microscopia elettronica (figura 7.9 e 7.10) hanno rivelato la presenza di particelle sferiche su tutti i campioni rivestiti con il trattamento 1, identificabili con la deposizione di polimero.

Per il vetro da finestratura non lucidato, le particelle sferiche si distribuiscono secondo un *pattern* casuale, a differenza di tutte le altre tipologie di vetro lucidato, sia inerte sia bioattivo, dove le sfere si dispongono seguendo principalmente il motivo di linee parallele generato dalla lucidatura. Il vetro da finestratura lucidato mostra ad elevati ingrandimenti un rivestimento più omogeneo rispetto a quello dei campioni non lucidati, in cui sono notevolmente distinguibili delle particelle di qualche decina di nm.

Nei campioni rivestiti di vetro da finestratura non lucidati e lucidati, a ingrandimenti elevati sono visibili delle cricche nel *coating*, probabilmente dovute allo *shock* termico subito dal campione dopo il trattamento al plasma. Nei vetri inerti non trattati si osservano alterazioni riconducibili alle procedure di manipolazione dei campioni.

Il vetro bioattivo SBA2 mostra alcuni “aloni” circolari (già visibili ad occhio nudo come *pattern* regolare, in figura 7.8) all’interno dei quali si ha una concentrazione di particelle molto più elevata rispetto alle regioni al di fuori. Inoltre, a differenza delle regioni circostanti, dentro queste aree le particelle mostrano due ordini di grandezza diversi: a ingrandimenti più bassi (5000-50000x), si stima una dimensione caratteristica di poco meno di 1 μm , mentre a elevati ingrandimenti (100000-200000x) questa scende a qualche decina di nm. La presenza di questi aloni, riscontrabili anche in altri campioni di vetro bioattivo dalle stesse caratteristiche dimensionali, è con molta probabilità dovuta alla distanza ridotta tra la superficie del campione esposta al plasma e la rete metallica a fori circolari del reattore. Nell’alone potrebbe essersi dunque verificato un *etching* e/o una polimerizzazione più consistente, mentre nelle aree a minor flusso di plasma è più probabile la sola deposizione di monomero.



Figura 7.8. Pattern visibile a occhio nudo riscontrato in seguito al trattamento al plasma su campioni di vetri bioattivi SBA2 (a sinistra) e S53P4 (a destra).

In alcuni campioni di vetro bioattivo S53P4 è visibile, a tutti gli ingrandimenti, una fase cristallina dispersa in una amorfa, nonostante ad occhio nudo il materiale risulti completamente trasparente. La formazione di queste fasi cristalline non interessa tutti i lotti di vetro colato, dal momento che non sono visibili in tutti i campioni di S53P4. Dopo il rivestimento, i campioni di S53P4 presentano particelle di dimensioni paragonabili a quelle

osservate nelle aree esterne agli aloni del campione di SBA2, dell'ordine delle centinaia di nm.

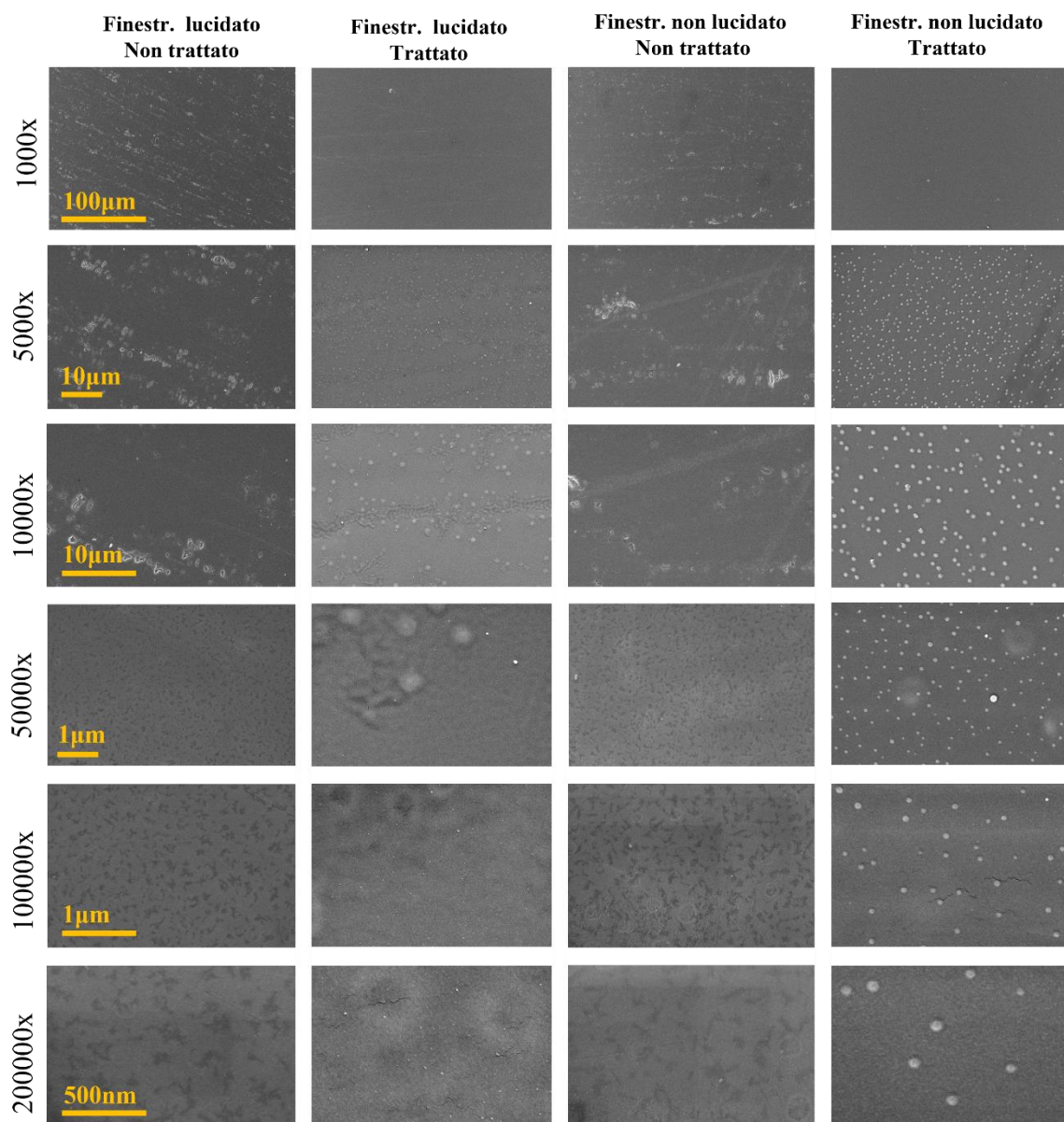


Figura 7.9. Immagini a ingrandimenti crescenti (1000x, 5000x, 10000x, 50000x, 100000x, 200000x) ottenute al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM per i vetri inerti da finestratura: lucidato non trattato, lucidato trattato, non lucidato non trattato, trattato non lucidato. La scala di grandezza è riportata in giallo e vale per le immagini sulla stessa riga.

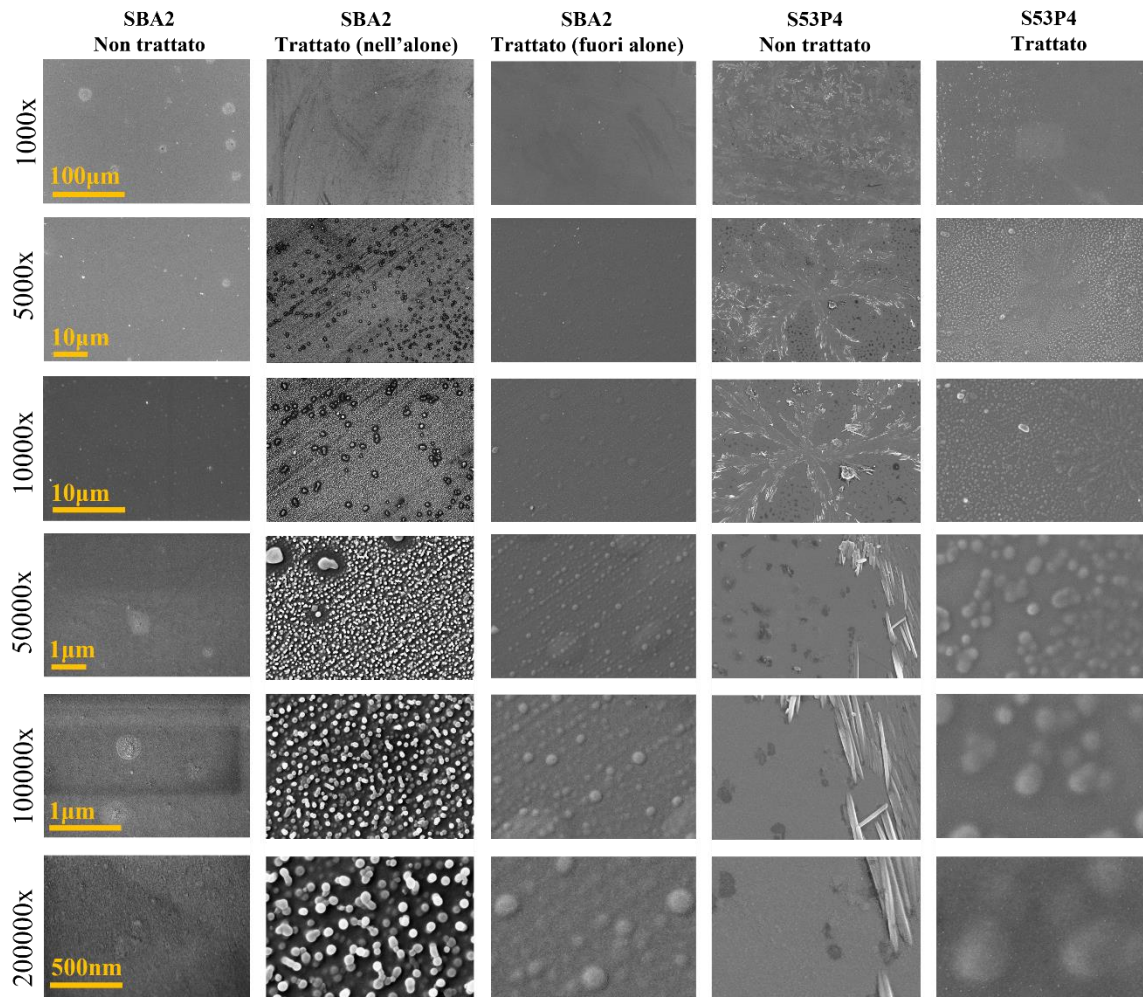


Figura 7.10. Immagini a ingrandimenti crescenti (1000x, 5000x, 10000x, 50000x, 100000x, 200000x) ottenute al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM per i vetri bioattivi: SBA2 non trattato, SBA2 trattato nell' alone, SBA2 trattato fuori dall' alone, S53P4 non trattato, S53P4 trattato. La scala di grandezza è riportata in giallo e vale per le immagini sulla stessa riga.

Per quanto riguarda le percentuali in peso (%wt) e atomiche (%at) analizzate all'EDS (figure 7.11 e 7.12) è riscontrabile in tutte le tipologie di vetro un aumento significativo (t student, $p = 0.017$ per vetro da finestratura lucidato) nella frazione di carbonio nei vetri trattati, imputabile al carbonio dei gruppi metilici (CH_3) esposti del rivestimento polimerico. Questo si osserva più consistentemente nei vetri inerti rispetto ai bioattivi. Una piccola frazione di C si osserva sempre in vetri che siano entrati in contatto con l'atmosfera per via di fenomeni di carbonatazione. Gli altri elementi non hanno subito cambiamenti significativi.

L'analisi EDS del vetro da finestratura ha consentito di stimare la composizione del materiale: oltre agli elementi più frequenti (Si, O, Na, Ca), si osserva la presenza di magnesio (Mg) di circa il 2%wt, come modificatore di reticolo insieme a CaO e Na_2O . Il

contributo in platino (Pt) è dovuto alla metallizzazione dei campioni effettuata per renderli conduttivi, quindi visibili al microscopio elettronico.

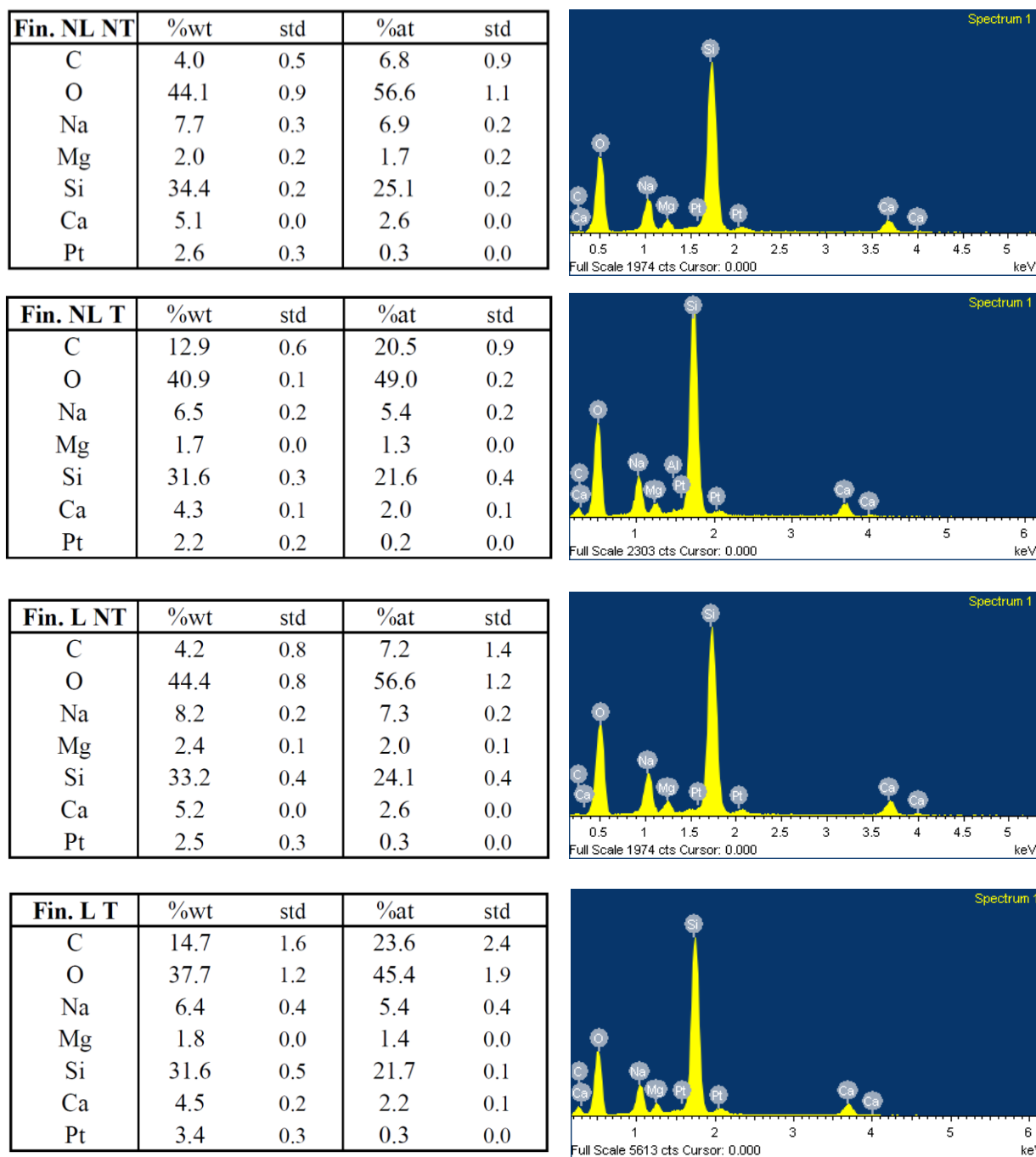


Figura 7.11. Composizioni in peso (%wt) e atomiche (%at) e spettri EDS di vetri da finestratura non lucidati (Fin. NL), lucidati (Fin. L): confronto tra campioni non trattati (NT) a sinistra e trattati (T) a destra. Si riportano valori medi e deviazioni standard su due misure per ciascuna tipologia di vetro inerte. Il platino (Pt) è presente in quanto rivestimento conduttivo dei campioni per l'analisi al SEM.

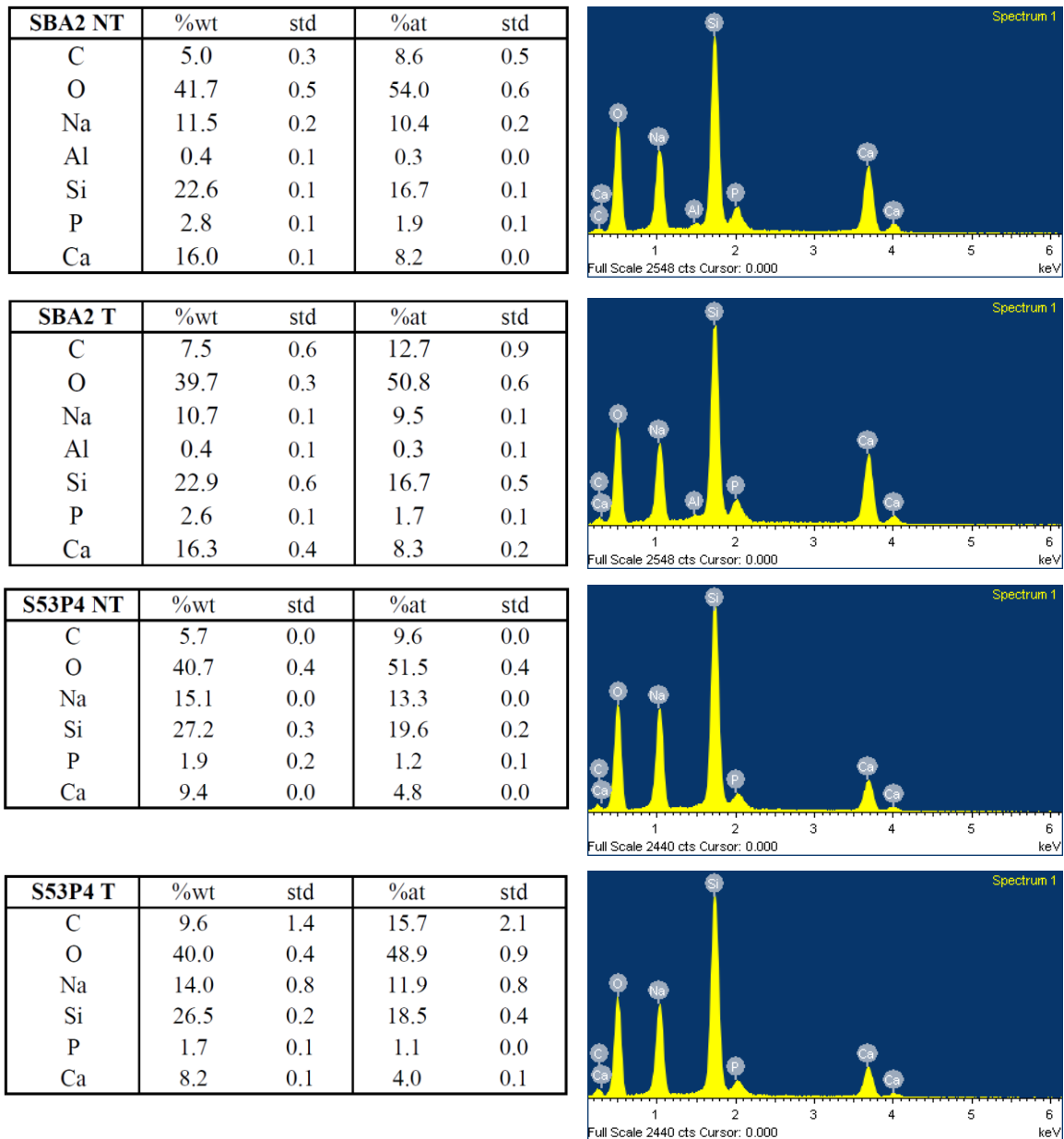


Figura 7.12. Composizioni in peso (%wt) e atomiche (%at) e spettri EDS di vetri bioattivi SBA2 e S53P4: confronto tra campioni non trattati (NT) a sinistra e trattati (T) a destra. Si riportano valori medi e deviazioni standard su due misure per tutte le tipologie di vetro bioattivo.

7.3.2. Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico

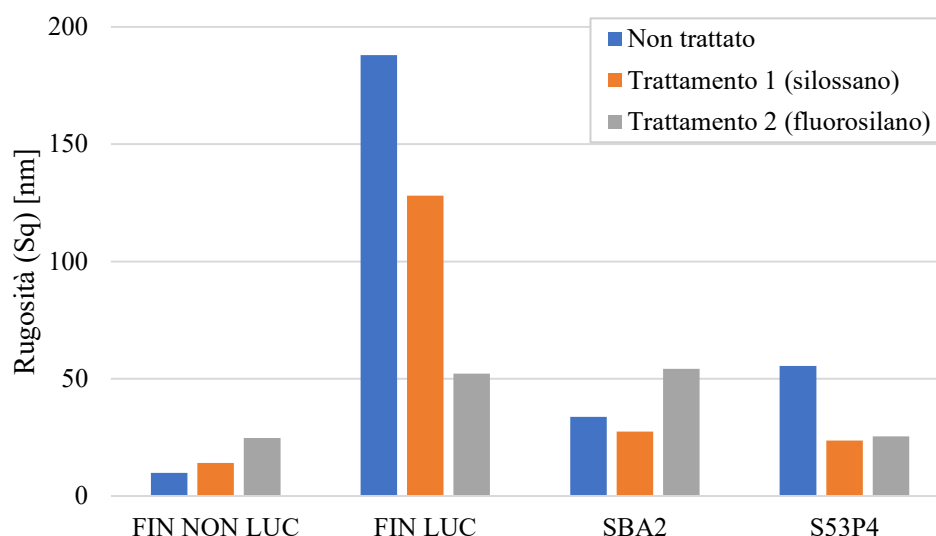


Figura 7.13. Valori di rugosità in termini di media quadratica (S_q) per i vetri inerti lucidati (FIN LUC) e non lucidati (FIN NON LUC) e vetri bioattivi SBA2 e S53P4. Si riportano i valori prima del trattamento e dopo i trattamenti 1 e 2.

I valori di rugosità estratti dalle misure al microscopio confocale sono riportati nell'istogramma in figura 7.13. Si osservano valori elevati per quanto riguarda il vetro da finestratura lucidato, a dimostrazione del fatto che in realtà le carte abrasive causano la rigatura della superficie molto liscia del vetro *float*, che mostra invece una rugosità ridotta. In figura 7.14 si osservano alcune catture svolte su campioni non trattati con il microscopio confocale in modalità ottica ad ingrandimento 500x: si notano la superficie estremamente rigata del vetro da finestratura lucidato (C) paragonato al vetro bioattivo SBA2 (A) e S53P4 (B).

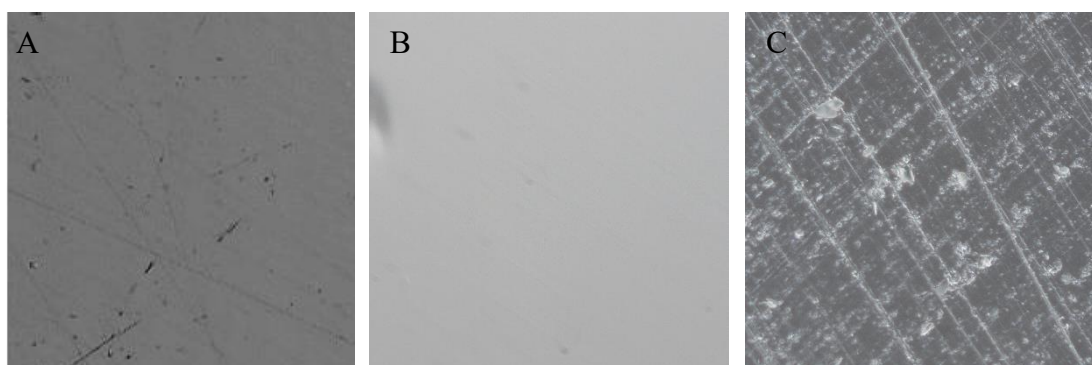


Figura 7.14. Immagini ad ingrandimento 500x ottenute in microscopia ottica dei campioni non trattati di vetro bioattivo S53P4 con (A) e senza (B) fase cristallina dispersa nella fase amorfa e del vetro da finestratura lucidato (C).

Il *coating* in silossano sembrerebbe ridurre la rugosità di tutti i campioni lucidati che da non trattati la presentano elevata, comportandosi come un *film* livellante riempiendo le asperità più profonde; al contrario, per il vetro da finestratura non lucidato, il rivestimento

di HMDSO sembrerebbe aumentare leggermente la rugosità. Conclusioni simili possono essere tratte dai valori di rugosità dopo il trattamento con fluorosilano, ad eccezione del vetro SBA2 che mostra una rugosità maggiore rispetto al campione non trattato.

La misura dello spessore del rivestimento in silossano (trattamento 1), stimata sul vetro non lucidato mascherato e trattato per tre intervalli temporali differenti, non ha mostrato differenze statisticamente significative (secondo analisi ANOVA su quattro campioni): come si nota in figura 7.15, sembrerebbe che lo spessore del *coating*, per ciascun *time step*, sia dell'ordine delle decine di nm.

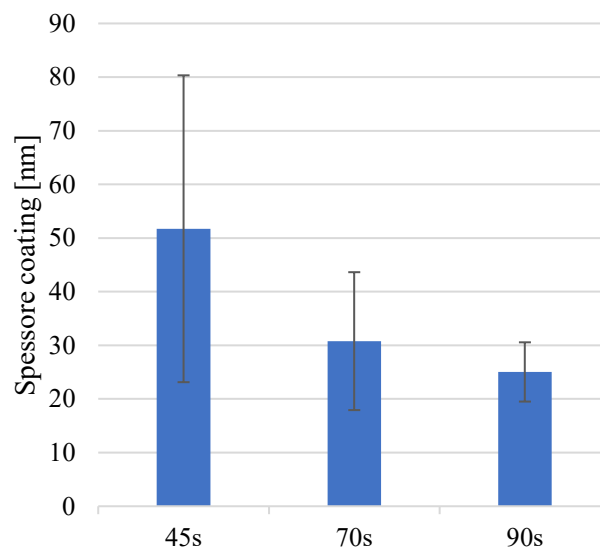


Figura 7.15. Valori medi e deviazioni standard dello spessore del coating di silossano a time step di 45, 70 e 90 s per il vetro da finestratura non lucidato.

7.3.3. Chimica superficiale: spettroscopia FTIR

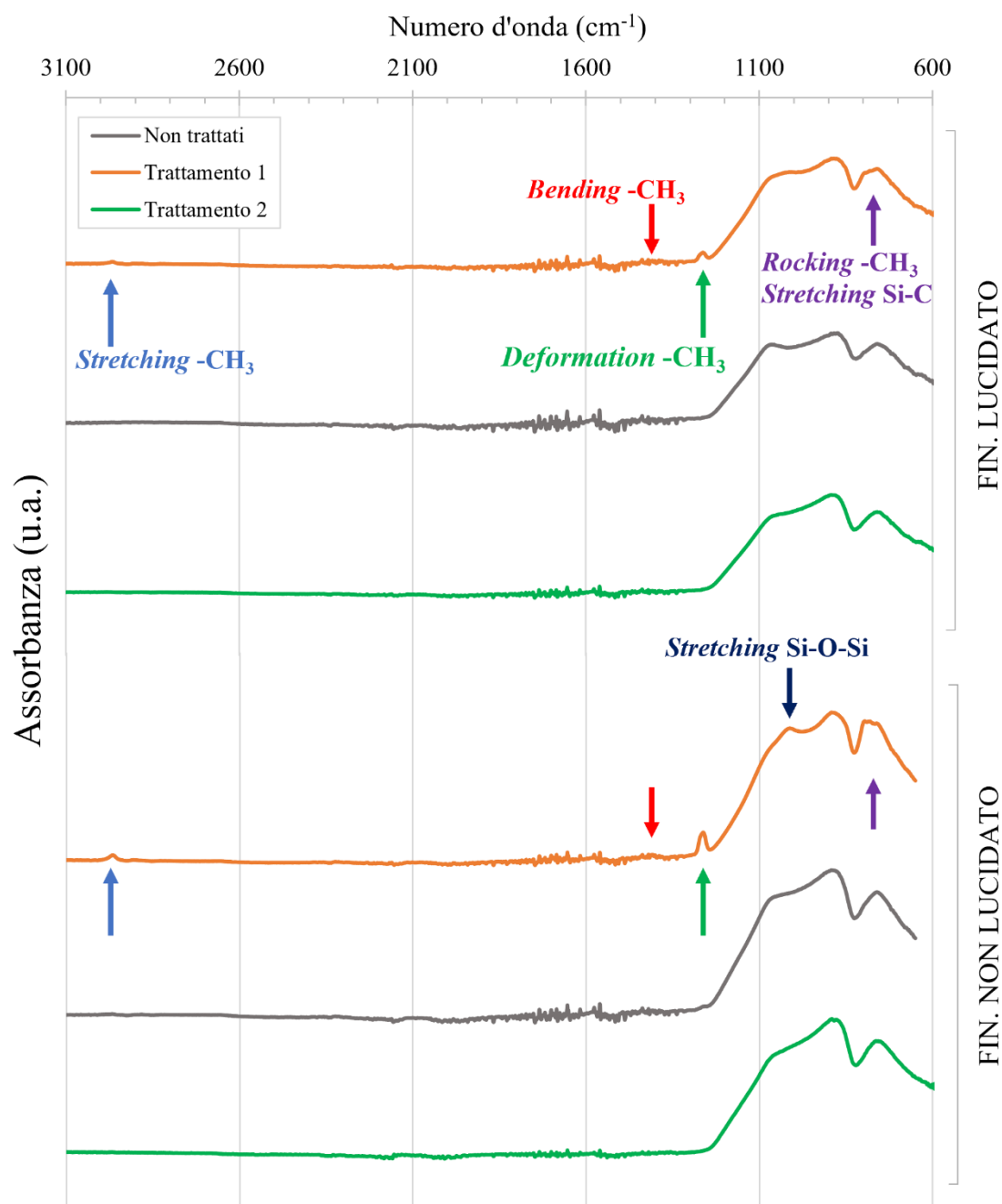


Figura 7.16. Spettri FTIR dei campioni di vetro da finestra lucidato e non lucidato non trattati, con trattamento 1 e con trattamento 2. Si evidenziano i picchi caratteristici, ove visibili, con le frecce: in azzurro lo stretching di -CH₃, in rosso il bending di -CH₃, in verde la deformation di -CH₃, in blu lo stretching di Si-C-Si, in viola il rocking di -CH₃ e lo stretching di Si-C.

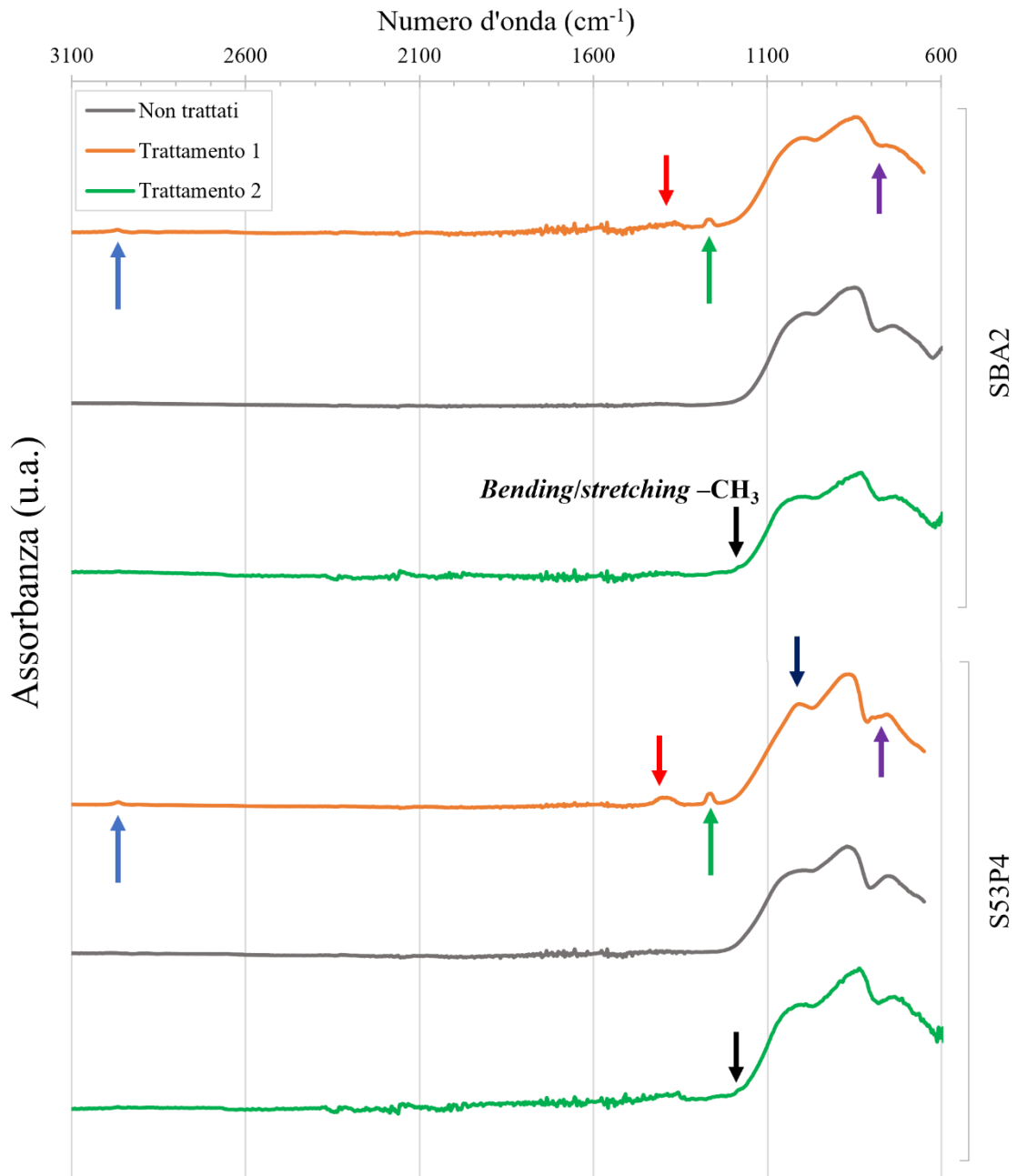


Figura 7.17. Spettri FTIR dei campioni di vetri bioattivi SBA2 e S53P4 non trattati, con trattamento 1 e con trattamento 2. Si evidenziano i picchi caratteristici, ove visibili, con le frecce: in azzurro lo stretching di $-\text{CH}_3$, in rosso il bending di $-\text{CH}_3$, in verde la deformation di $-\text{CH}_3$, in blu lo stretching di Si-C-Si , in viola il rocking di $-\text{CH}_3$ e lo stretching di Si-C , in nero il bending e lo stretching di $-\text{CH}_3$.

In figura 7.16 e 7.17 si riportano li spettri FTIR dei campioni con trattamento 1, con trattamento 2 e non trattati di vetro inerte e di vetro bioattivo, rispettivamente. In tutte le tipologie di vetri trattati (bioattivi e non) sono stati riscontrati i picchi caratteristici dello spettro del silossano. A circa 3000 cm^{-1} si osserva il picco inerente allo *stretching* asimmetrico del gruppo metilico in Si-CH_3 . Intorno a 1300 cm^{-1} si osserva invece il picco

relativo a *deformation* del metile in Si-CH₃, mentre a 1400 cm⁻¹ le curve presentano dei picchi che corrispondono al *bending* asimmetrico del gruppo metile in Si-CH₃. Nei dintorni di 1000 cm⁻¹ compare un tratto convesso per i campioni trattati, frutto della convoluzione dei segnali generati dallo *stretching* del legame Si-O-Si che caratterizza sia la silice nel vetro sia il silossano nel rivestimento. Vicino a 800 cm⁻¹ si nota un allargamento del picco che riguarda lo *stretching* del legame Si-O-Si della silice, causato probabilmente dalla sua convoluzione con i picchi riguardanti il *rocking* di -CH₃ e lo *stretching* di Si-C nel legame Si-CH₃.

Per quanto riguarda il trattamento 2, l'analisi FTIR ha rilevato una scarsa presenza del rivestimento sui campioni trattati, dal momento che si osserva soltanto, in alcuni casi, un picco a circa 1200 cm⁻¹. Per investigarne la causa, è stato svolto un confronto (figura 7.18) tra campioni di vetro da finestratura non lucidato in cui si varia il pretrattamento (He/O₂ e He/N₂), mentre si mantiene lo stesso rivestimento in silossano. In questo modo si è analizzata l'influenza del pretrattamento: effettivamente, si nota una scarsa rilevazione del *coating* di HMDSO nei campioni pretrattati con He/N₂ rispetto alla controparte, data l'assenza dei picchi caratteristici del silossano. Dunque, siccome i campioni rivestiti con il trattamento 2 sono stati pretrattati con He/N₂, si suppone che il *grafting* del fluoro-silano sia stato analogamente ostacolato.

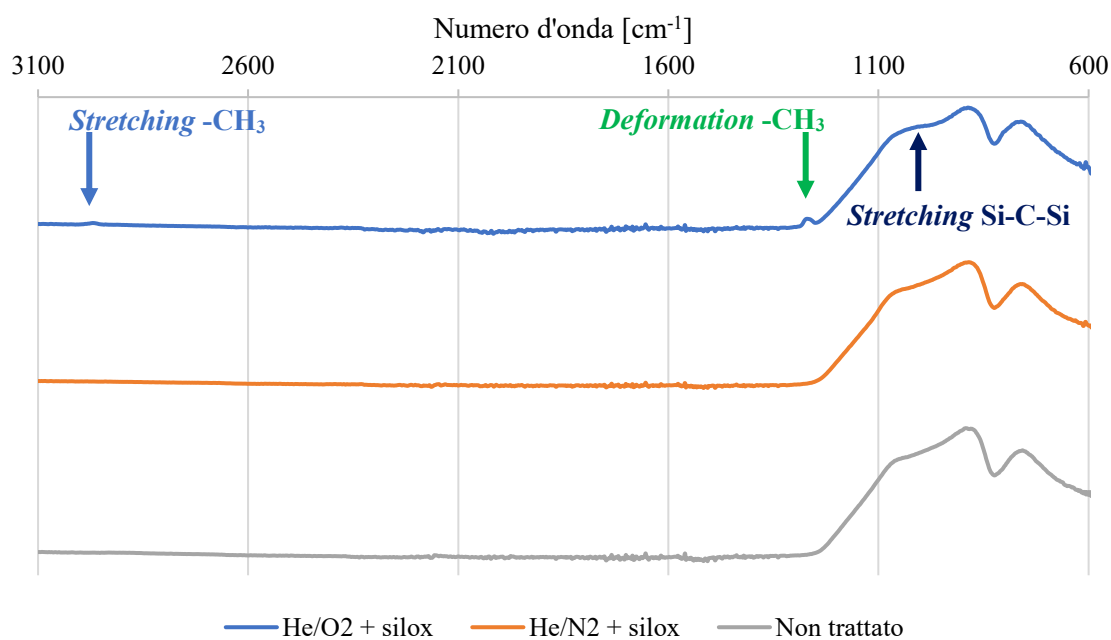
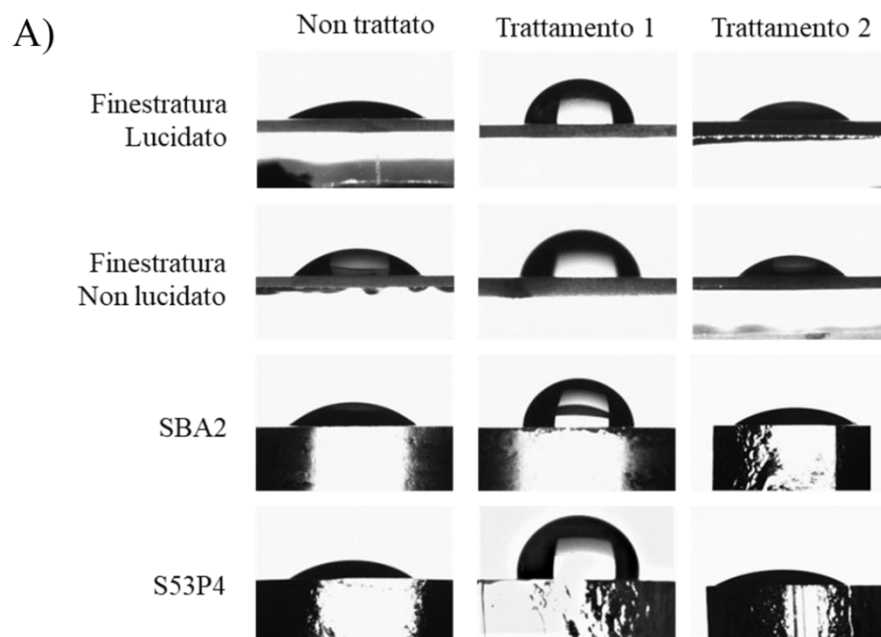


Figura 7.18. Confronto tra campioni di vetro da finestratura non lucidato: non trattato, pretrattato He/O₂ e rivestito con silossano e pretrattato He/N₂ e rivestito con silossano. Si evidenziano i picchi caratteristici, ove visibili, con le frecce: in azzurro lo stretching di -CH₃, in verde la deformation di -CH₃, in blu lo stretching di Si-C-Si.

7.3.4. Bagnabilità: WCA

In figura 7.19 si osservano le catture eseguite durante il test (A) e i valori medi con le rispettive deviazioni standard delle misure di angolo di contatto statico (B) effettuate in triplicato. In tutte le tipologie di vetro si osserva un incremento del WCA statico dopo il trattamento 1. Il vetro da finestratura non trattato mostra una differenza significativa (t student, $p < .001$) per i campioni lucidati e non lucidati. Questo potrebbe essere dovuto alla rugosità della superficie: il materiale tal quale presenta una superficie liscia rispetto alla controparte, quindi, in accordo ai modelli di bagnabilità, il vetro non lucidato risulta più idrofobo. La differenza non è riscontrabile dopo il trattamento 1.

Dopo il trattamento 2, si registra un significativo incremento (t student, $p = 0.003$) dell'angolo di contatto solo per i campioni di vetro da finestratura lucidato, mentre per gli altri casi si ha una variazione poco significativa. Per individuare le cause di questo blando cambiamento, sono state esaminate diverse combinazioni di pretrattamento e rivestimento al plasma su campioni di vetro da finestratura non lucidato, riassunte in figura 7.20: oltre al non trattato (NT) e al funzionalizzato con trattamento 1 ($O_2 + \text{silox}$) e con trattamento 2 ($N_2 + F$), sono stati investigati gli accoppiamenti di pretrattamento He/N_2 con rivestimento in silossano ($N_2 + \text{silox}$), solo pretrattamento con He/N_2 e solo pretrattamento con He/O_2 . Si registra un aumento significativo (t student, $p = 0.002$) del WCA nel vetro $N_2 + \text{silox}$, tuttavia significativamente inferiore (t student, $p = 0.002$) al trattamento 1. I valori di WCA per il vetro solo pretrattato con He/O_2 e con He/N_2 non sono significativamente differenti rispetto al controllo.



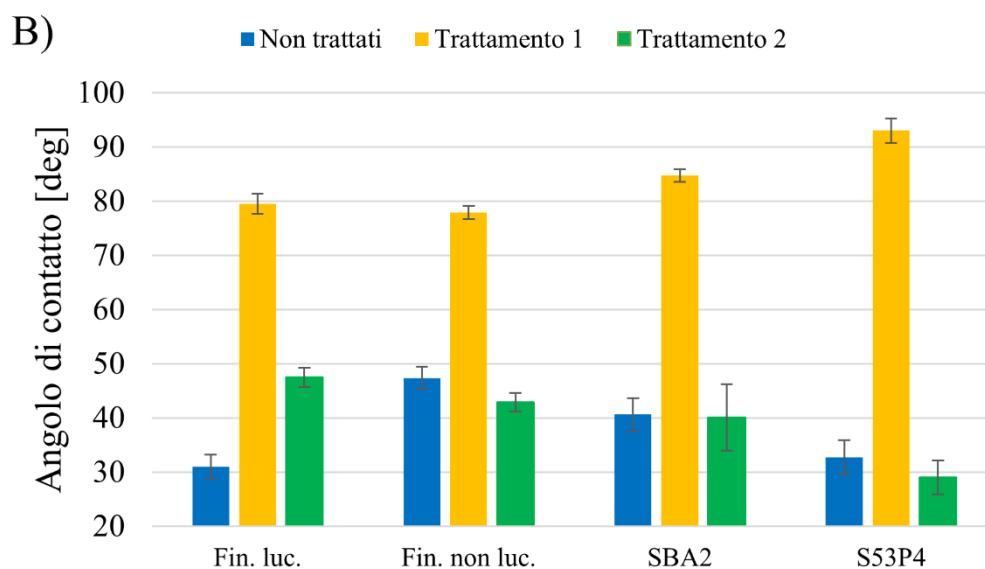


Figura 7.19. Catture effettuate durante i test di angolo di contatto (A) e relativi valori medi e deviazioni standard (B) per tutti i tipi di vetro: campioni non trattati, con trattamento 1 e con trattamento 2. Misure effettuate in triplicato.

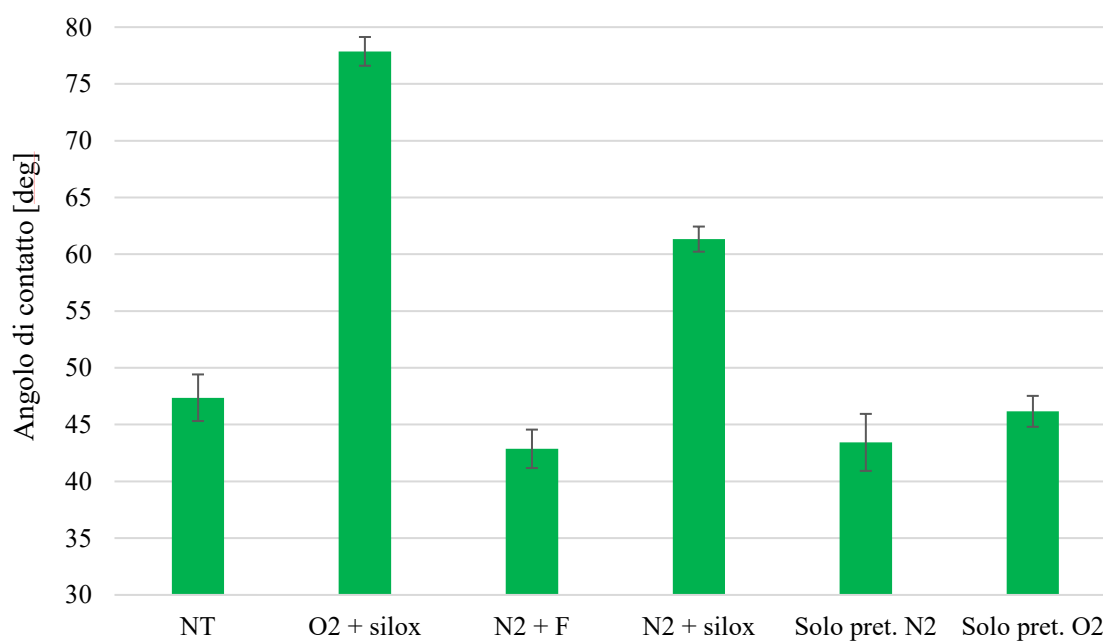


Figura 7.20. Valori medi e deviazioni standard degli angoli di contatto per vetro da finestratura non lucidato: campioni non trattati (NT), con trattamento 1 (O₂ + silox), con trattamento 2 (N₂ + F), pretrattati con He/N₂ e silossano (N₂ + silox), con solo pretrattamento He/N₂ e con solo pretrattamento He/O₂. Misure effettuate in triplicato.

7.3.5. Carica superficiale: potenziale zeta

In figura 7.28 sono rappresentate le curve dei campioni di vetro da finestratura lucidato, SBA2 e S53P4 prima e dopo il trattamento 1.

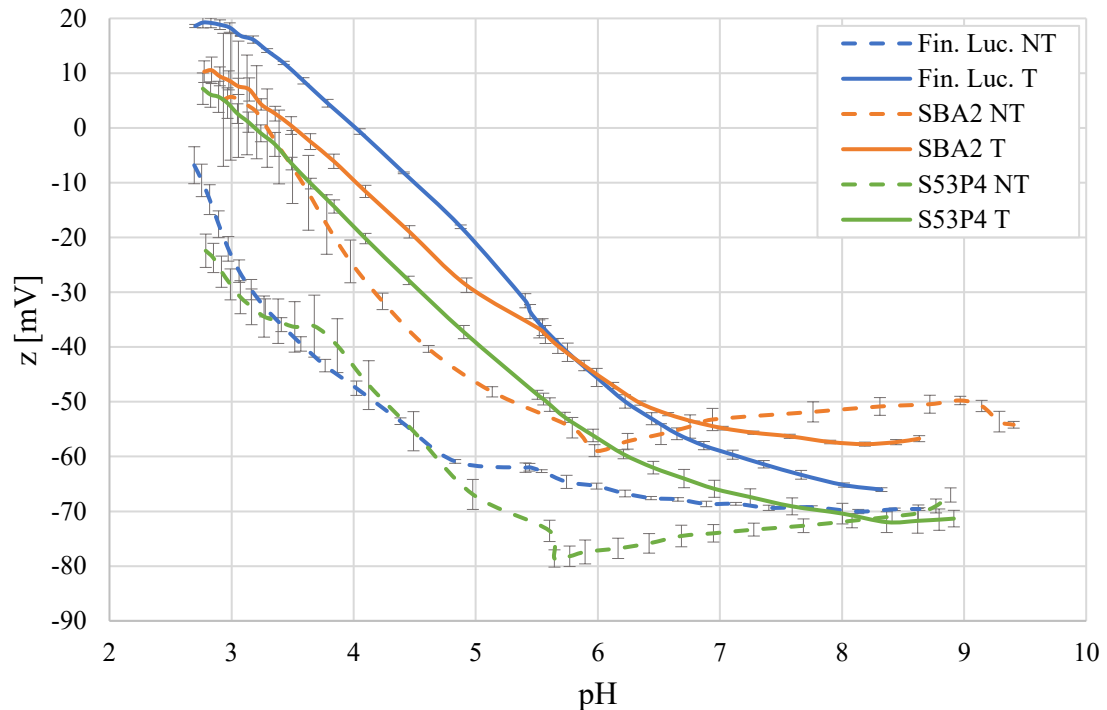


Figura 7.28. Confronto globale delle curve di potenziale zeta al variare del pH per il vetro da finestratura lucidato e bioattivi SBA2 e S53P4 prima e dopo il trattamento 1.

Per i campioni non trattati del vetro da finestratura lucidato, la misura del potenziale zeta ha suggerito la presenza di gruppi acidi (principalmente ossidrilici, $-OH$) in superficie, come si evince dal *plateau* della curva a pH basici. Questo tipo di vetro rivestito non presenta *plateau* rilevanti, confermando la presenza di gruppi apolari il cui stato di protonazione non varia in base al pH, come accade per i gruppi metilici ($-CH_3$) che espone il silossano. Il punto isoelettrico per il vetro da finestratura lucidato si trova a pH 4.02 per i campioni trattati, mentre per quelli non trattati non è stato individuato nel *range* di indagine della misura (con un'interpolazione dei punti della curva, si può ritenere sia intorno a 2.6, in accordo con le stime del punto isoelettrico della silice amorfa⁶⁵). Le basse deviazioni standard dimostrano la stabilità del rivestimento di silossano.

Per quanto riguarda il vetro bioattivo S53P4, nei campioni non trattati si nota un *plateau* a pH basico dovuto probabilmente alla presenza di gruppi ossidrilici in superficie, come per il vetro da finestratura. Il vetro S53P4 trattato mostra una curva simile a quella del vetro inerte rivestito, confermando l'esposizione dei gruppi metilici caratteristici del HMDSO.

Per il controllo, non si registra il punto isoelettrico nel *range* di pH indagato, mentre per il vetro funzionalizzato si rivela essere a pH 3.19.

Circa il vetro bioattivo SBA2, si individua nei campioni non trattati un *plateau* a pH basico attribuibile all'esposizione dei gruppi ossidrilici da parte del vetro, analogamente agli altri vetri investigati. Per il vetro SBA2 trattato, si osserva un debole *plateau* a pH basici, forse per la persistenza di gruppi -OH in superficie al vetro; il resto dell'andamento è compatibile con la presenza di gruppi idrofobi superficiali apportati dal silossano. Il punto isoelettrico passa da 3.29 per il vetro non trattato a 3.51 per quello rivestito.

Per entrambi i vetri bioattivi, si osserva un decremento della deviazione standard nei campioni trattati probabilmente dovuto al rallentamento della reattività ad opera del rivestimento.

7.3.6. Bioattività: test in SBF

In quanto indicatore del meccanismo di bioattività, l'andamento del pH della soluzione SBF in cui sono stati immersi i campioni con trattamento 1 e non trattati per 3, 7 e 14 gg è riportato in figura 7.21 (misure in duplicato). Al giorno 0 il pH della soluzione prima dell'immersione dei campioni è stato registrato a 7.4. Al giorno 3, si osserva un aumento del pH di due decimi per i campioni trattati e di circa tre decimi per quelli non trattati. Al giorno 7, si assiste ad una leggera diminuzione del pH di un decimo per il vetro SBA2 non trattato e di mezzo decimo in tutti gli altri casi. Al giorno 14 si assiste ad una lieve risalita di tutte le curve di circa mezzo decimo, ad eccezione del vetro S53P4 non trattato il cui pH resta pressoché invariato dal *time step* precedente. In generale, il range di pH del *plateau* (7.65 – 7.75 per i non trattati, 7.55-7.65 per i trattati) è per tutti i vetri abbastanza costante e confinato a valori non citotossici. Inoltre, si osserva uno scostamento tra i vetri bioattivi trattati e tal quali: mostrando valori più bassi, sembrerebbe che i campioni rivestiti siano meno soggetti al meccanismo di bioattività.

In figura 7.21 e 7.22 si osservano le analisi al FE-SEM delle superfici dei campioni trattati e non trattati a 3, 7 e 14 giorni di immersione in soluzione SBF per il vetro bioattivo SBA2 e S53P4, rispettivamente, a diversi ingrandimenti: 500x, 2000x, 10000x e 50000x.

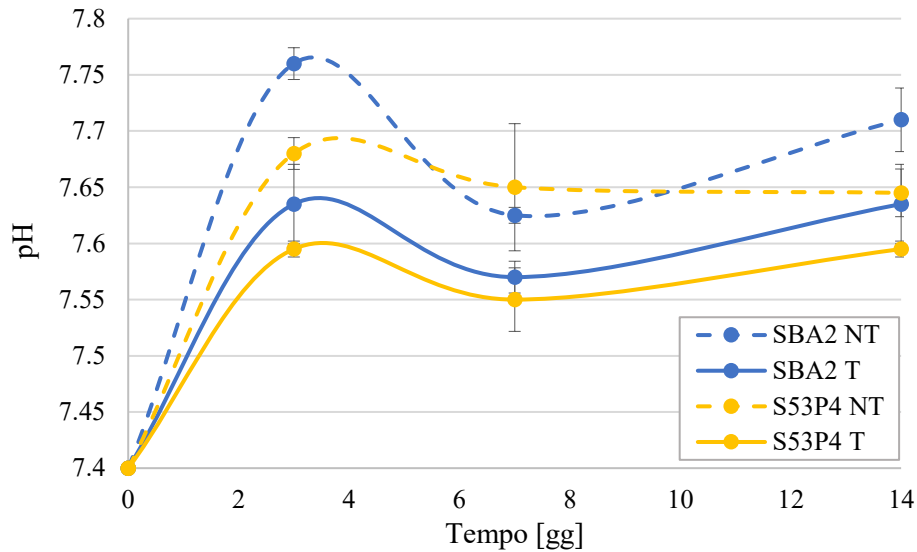


Figura 7.20. Valori medi e deviazioni standard del pH nel tempo rilevati nella soluzione SBF di immersione dei vetri bioattivi: misure effettuate in duplicato a tre time step differenti (3 giorni, 7 giorni e 14 giorni).

Per il vetro SBA2 non trattato, si osserva l’iniziale formazione del gel di silice, che risulta fratturato in seguito alla preparazione del campione (estrazione dalla SBF, essiccazione, metallizzazione, ecc.) per la microscopia. Il gel viene progressivamente ricoperto da nuclei di cristallizzazione di HAp, della dimensione di qualche decina di μm ; in questo caso, la tipica morfologia “a cavolfiore” dell’HAp si nota già dal giorno 3. Al giorno 14 la superficie è completamente ricoperta di HAp. Nel vetro SBA2 trattato, si osserva che la superficie del campione presenta zone in cui il rivestimento permane ed altre in cui questo è soggetto delaminazione. Questo processo potrebbe essere dovuto alla formazione di cricche nel *coating* causate dall’infiltrazione della SBF attraverso regioni in cui il rivestimento è meno omogeneo. Al giorno 3 si osserva quindi l’assenza del gel di silice e la presenza del rivestimento di silossano crepato. Al giorno 7 si osserva che, nelle regioni di delaminazione, sta avendo luogo il processo di bioattività ma persistono ancora numerose regioni in cui si riscontra il *coating*. Al giorno 14, si rileva la forte presenza di gel di silice ricoperto da HAp, sebbene si osservi ancora qualche piccola regione ricoperta da HMDSO.

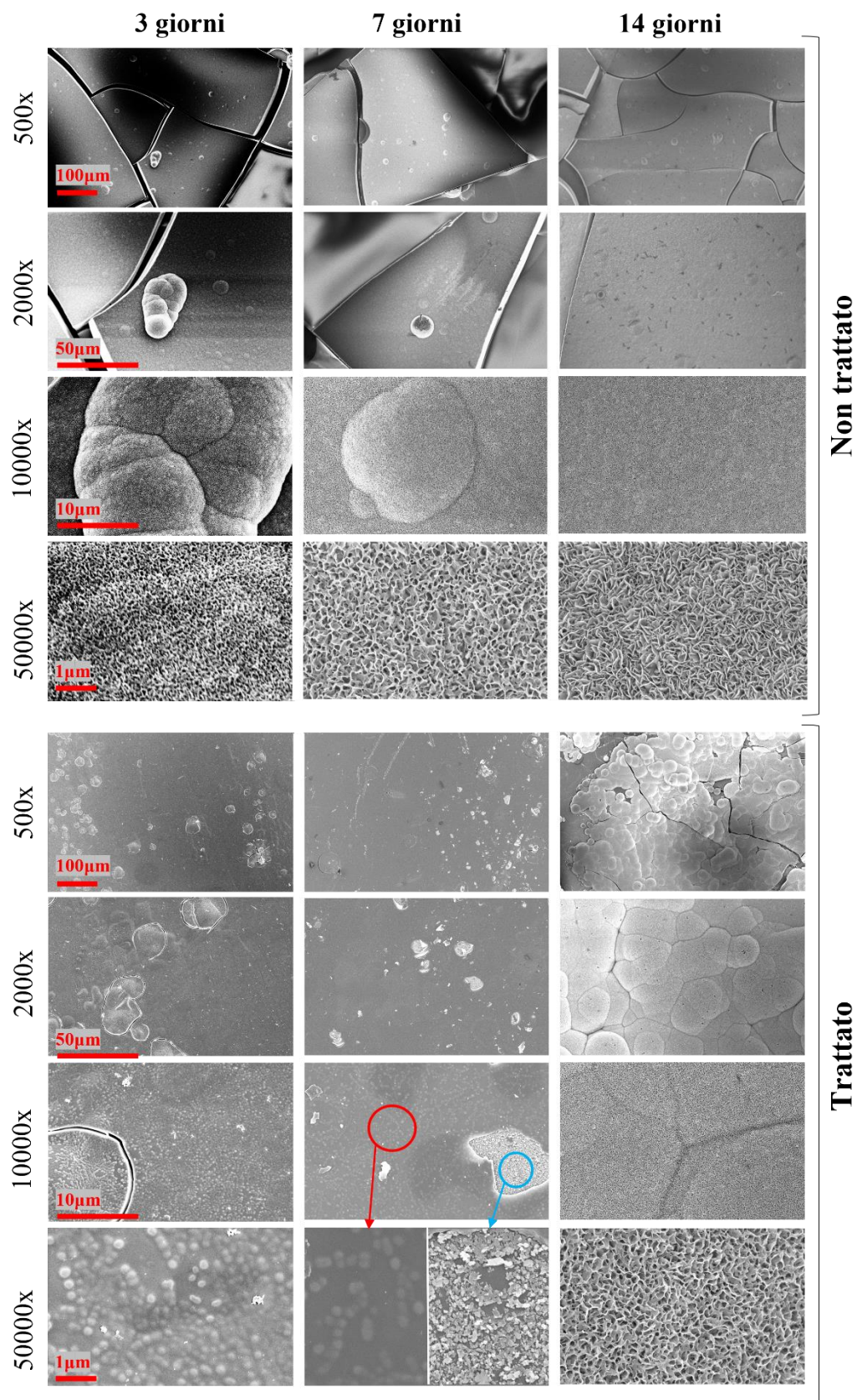


Figura 7.21. Immagini al FE-SEM a ingrandimenti crescenti (500x, 2000x, 10000x, 50000x) del vetro bioattivo SBA2 trattato e non trattato dopo 3, 7 e 14 giorni in SBF. La scala di grandezza è riportata in rosso e vale per le immagini sulla stessa riga.

Per quanto riguarda il vetro S53P4 non trattato e trattato, data la parziale incongruenza dei risultati di EDS e di XRD con le immagini al FE-SEM, sono state svolte analisi morfologiche in duplicato (riquadri giallo e verde in figura 7.22) per i campioni al giorno 7 e al giorno 14. Al giorno 3 si notano dei cristalli che emergono dallo strato di gel di silice essiccato analogo a quello dello SBA2: ciò è causato dalle reazioni di bioattività che interessano, per quanto riguarda un vetroceramico, solo la fase amorfa; non si notano ancora i cristalli con la tipica morfologia della HAp. Al giorno 7, per la replica del riquadro giallo si nota la formazione del gel di silice, mentre per quella nel riquadro verde si osservano molti nuclei cristallini di HAp depositati sul gel di silice. È necessario sottolineare che i campioni del giorno 7 (trattato/non trattato), a differenza di quelli del giorno 3, non presentano fasi cristalline disperse in quella amorfa. Al giorno 14, l'assenza di HAp in entrambe le repliche potrebbe essere dovuta ad un distacco dello strato superficiale ricco di HAp, seguito dalla formazione di gel di silice sulla superficie del vetro nuovamente esposta alla soluzione SBF. Analogamente a SBA2, per il vetro S53P4 trattato si osservano, dal giorno 3, zone di delaminazione in cui il vetro ha reagito e dove la fase cristallina emerge da quella amorfa, su cui si è formato il gel di silice. Nelle regioni non interessate alla delaminazione, il rivestimento si mostra simile a quello del vetro trattato non immerso in SBF, ma con la formazione di protuberanze di circa 1 μm . Al giorno 7 si nota, in alcune zone del campione, la consistente presenza di nuclei di cristallizzazione dell'HAp per la replica del riquadro verde, anche se ridotta rispetto al tal quale, mentre per quella del riquadro giallo si osserva la presenza del rivestimento in silossano privo di HAp. Al giorno 14 si nota un aumento nel rivestimento di cristalli di HAp per il campione nel riquadro verde, al contrario di quello nel riquadro giallo dove non se ne rileva la precipitazione. La variabilità dei riscontri osservati al FE-SEM, insieme ai risultati ottenuti con l'analisi XRD, può essere causata dal rallentato meccanismo di bioattività del vetro S53P4 rispetto a SBA2 e alla sua parziale cristallizzazione non uniforme per tutti i campioni.

Si deve notare che molte delle zone di delaminazione, sia per SBA2 sia per S53P4, corrispondono al *pattern* di "aloni" riscontrato nei campioni bioattivi al termine del trattamento al plasma. È proprio in queste zone che il rivestimento potrebbe essere disuniforme e consentire l'infiltrazione della soluzione SBF, concedendo la reazione della fase amorfa e quindi sottraendo sostegno strutturale al *coating*.

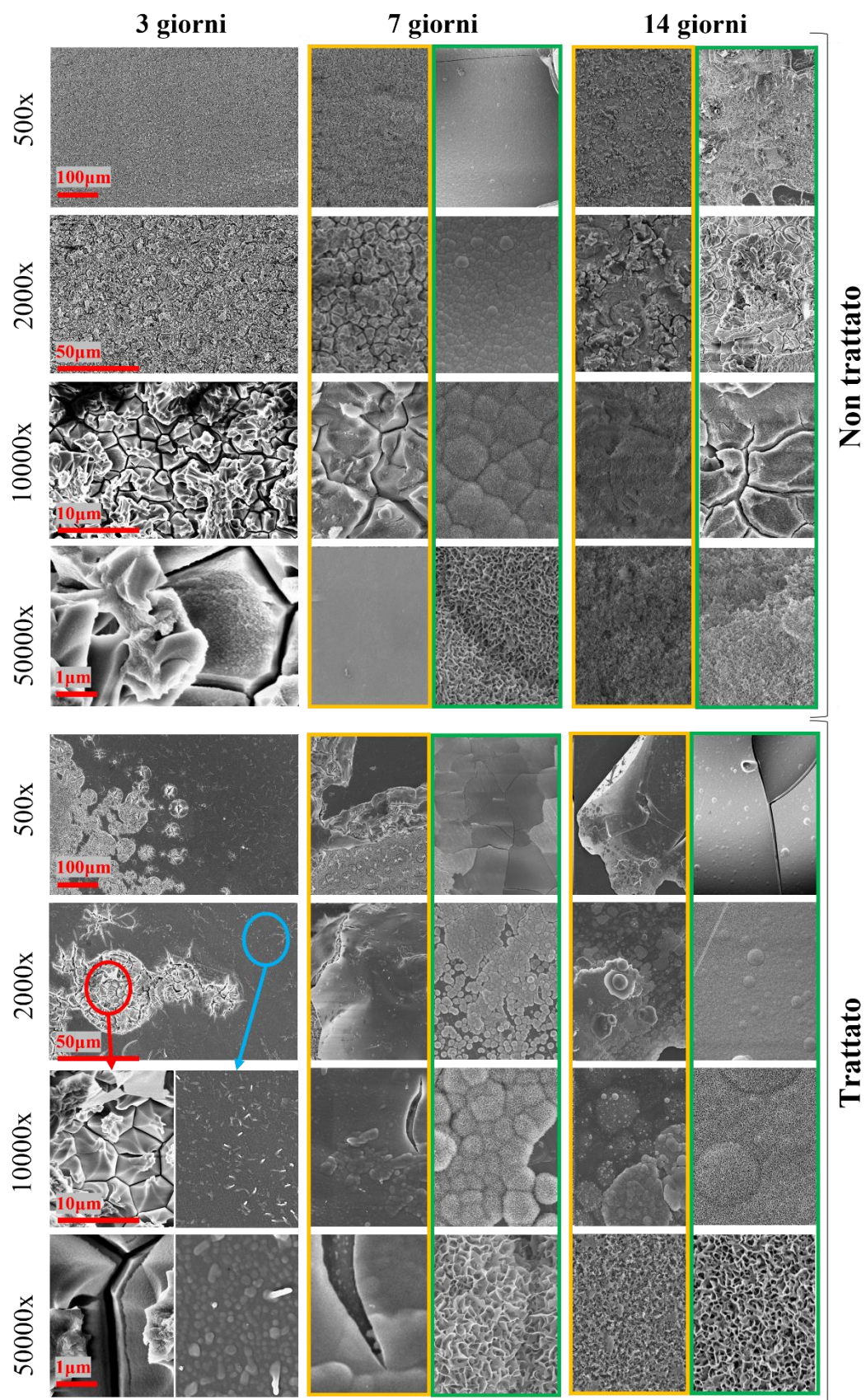


Figura 7.22. Immagini al FE-SEM a ingrandimenti crescenti (500x, 2000x, 10000x, 50000x) del vetro bioattivo S53P4 trattato e non trattato dopo 3, 7 e 14 giorni in SBF. La scala di grandezza è riportata in rosso e vale per le immagini sulla stessa riga. I riquadri colorati in giallo e verde indicano campioni differenti.

In figura 7.23 sono riportate le composizioni (%wt e %at) e gli spettri EDS della superficie dei campioni di vetro bioattivo dopo 3 giorni in soluzione SBF. Si osserva una consistente differenza nei contenuti di fosforo e calcio per il vetro SBA2, trattato e non: una percentuale maggiore di entrambi gli elementi nel campione tal quale conferma la precipitazione di idrossiapatite. Si osserva inoltre che la percentuale di silicio nel campione trattato è nettamente maggiore rispetto al non trattato. Questi risultati evidenziano che la presenza del rivestimento di silossano rallenta sostanzialmente il meccanismo di bioattività del vetro nei primi giorni. In aggiunta, si osserva una netta diversità in contenuto di sodio (minore nel campione non trattato) indice del rilascio ionico da parte di SBA2 che avviene al suo contatto con la soluzione SBF. Il vetro S53P4 non mostra differenze marcate tra il campione trattato e il tal quale. Sembra quindi che i tempi di reazione di questo biovetro siano più lunghi rispetto a SBA2.

Le composizioni e gli spettri EDS dei campioni di vetro bioattivo dopo 7 giorni di immersione in soluzione SBF sono raggruppati in figura 7.24. Nel vetro SBA2 si osservano alcune differenze tra il campione trattato e il controllo: circa il sodio, una percentuale elevata per il campione trattato suggerirebbe la sua mancata dissoluzione nella SBF a causa per l'interposizione del *coating*, diversamente dal controllo; il fosforo, analogamente al calcio, risulta in quantità maggiore nel vetro non trattato, a causa di una precipitazione più consistente di HAp; il silicio risulta più presente nel campione trattato, testimoniando la persistenza del rivestimento e dell'influenza della silice sottostante ad esso. Per il vetro bioattivo S53P4 si osservano percentuali compositive simili allo SBA2 per il campione tal quale; d'altra parte, per il vetro rivestito si osservano zone in cui calcio e fosforo sono presenti in basse quantità ed altre in cui invece prevalgono. Questo potrebbe essere dovuto ad un cedimento del *coating*, che permette al vetro di reagire a differenza di altre regioni in cui il rivestimento ha impedito il meccanismo di bioattività.

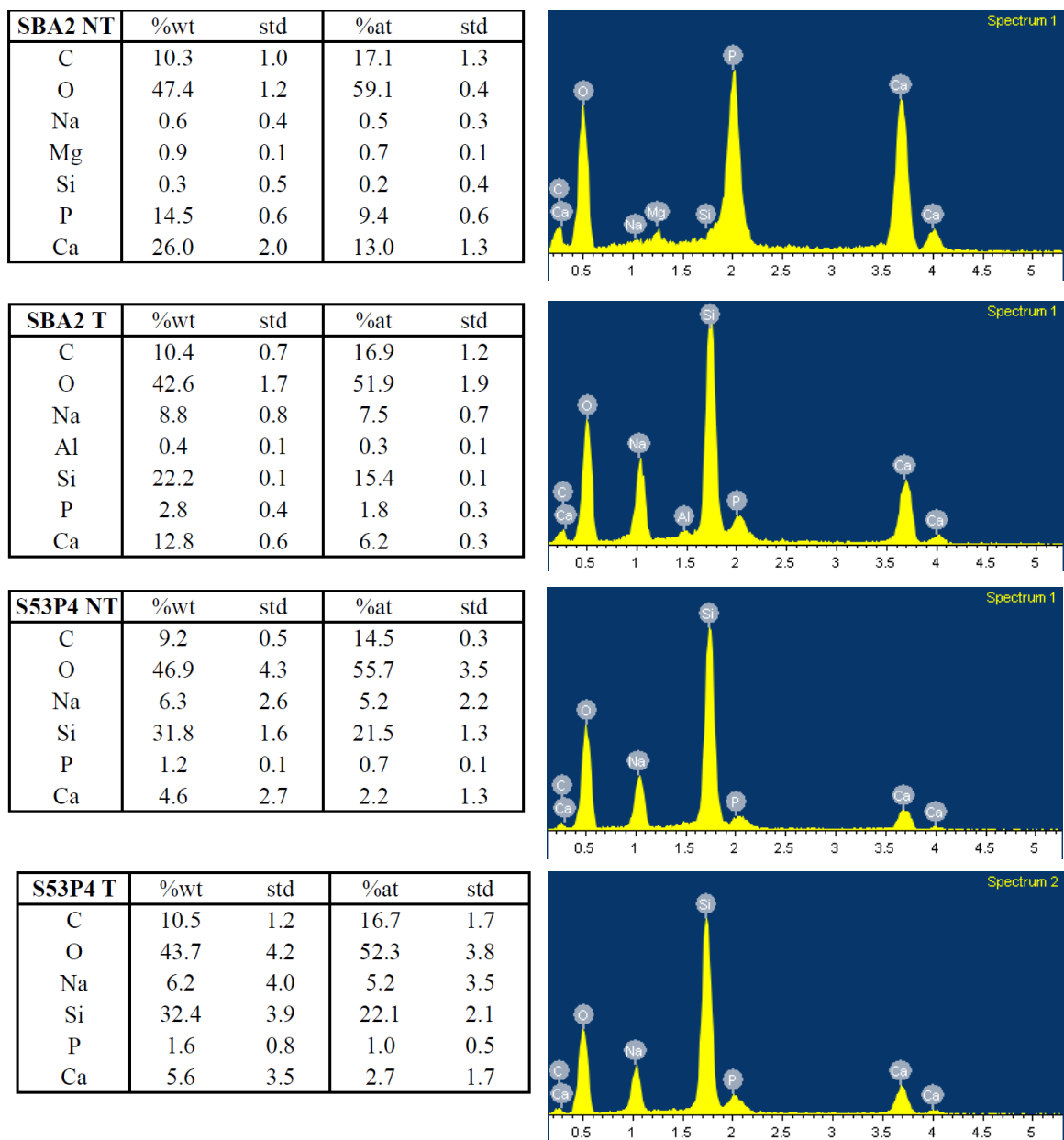
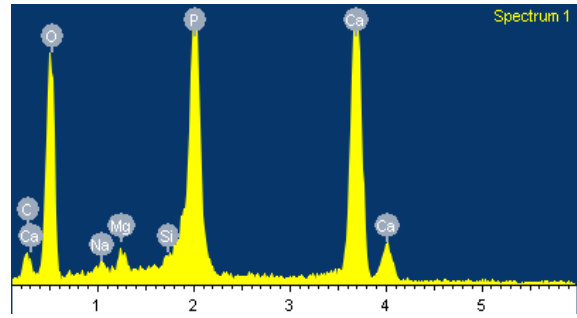
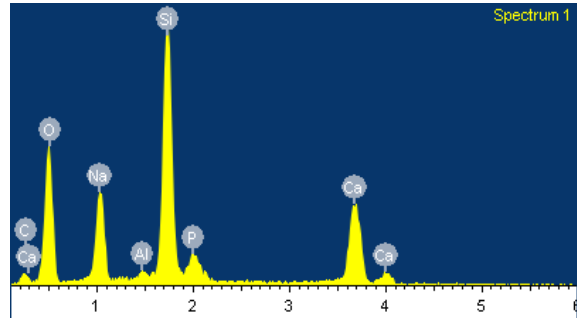


Figura 7.23. Composizioni percentuali in peso (%wt) e atomiche (%at) e spettri EDS di vetri bioattivi SBA2 e S53P4 dopo 3 giorni in SBF: confronto tra campioni non trattati (NT) e trattati (T). Si riportano in tabella valori medi e deviazioni standard su due misure per SBA2 NT, tre misure per SBA2 T, quattro misure per S53P4 NT e quattro misure per S53P4 T.

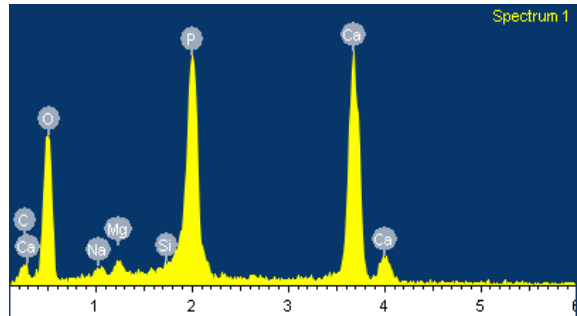
SBA2 NT	%wt	std	%at	std
C	6.2	0.2	10.8	0.3
O	47.7	0.6	62.3	0.5
Na	0.6	0.1	0.5	0.1
Mg	1.1	0.0	0.9	0.0
Si	0.1	0.1	0.1	0.1
P	14.6	0.4	9.8	0.3
Ca	29.8	0.4	15.6	0.3



SBA2 T	%wt	std	%at	std
C	8.5	1.8	14.4	2.8
O	39.4	0.4	50.0	1.3
Na	9.4	0.7	8.3	0.8
Al	0.4	0.2	0.3	0.1
Si	24.0	0.4	17.3	0.0
P	2.4	0.2	1.6	0.2
Ca	15.9	0.6	8.0	0.4

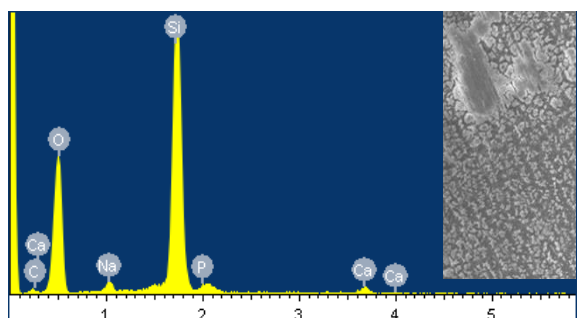


S53P4 NT	%wt	std	%at	std
C	6.3	0.6	11.2	1.1
O	45.3	1.3	60.1	1.5
Na	0.7	0.2	0.6	0.2
Si	0.0	0.0	0.0	0.0
P	16.1	0.1	11.0	0.1
Ca	30.5	0.7	16.1	0.5



S53P4 T	%wt	std	%at	std
C	6.6	0.8	10.8	1.4
O	46.7	2.7	57.3	2.3
Na	1.2	0.6	1.0	0.5
Si	40.2	4.2	28.0	2.5
P	1.8	1.8	1.1	1.2
Ca	3.6	4.1	1.8	2.0

Zona a basso contenuto di HAp



S53P4 T	%wt	std	%at	std
C	6.8	0.4	12.1	0.6
O	41.0	1.0	54.7	1.0
Na	1.0	0.3	0.9	0.3
Si	12.6	4.2	9.5	3.3
P	12.8	1.0	8.8	0.6
Ca	25.1	1.7	13.3	0.8

Zona ad alto contenuto di HAp

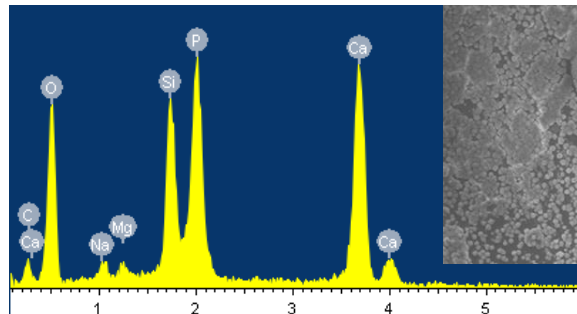


Figura 7.24. Composizioni percentuali in peso (%wt) e atomiche (%at) e spettri EDS di vetri bioattivi SBA2 e S53P4 dopo 7 giorni in SBF: confronto tra campioni non trattati (NT) e trattati (T). Si riportano in tabella valori medi e deviazioni standard su tre misure per SBA2 NT, tre misure per SBA2 T, tre misure per S53P4 NT, tre misure per S53P4 T (basso contenuto di HAp) e due misure per S53P4 (alto contenuto di HAp).

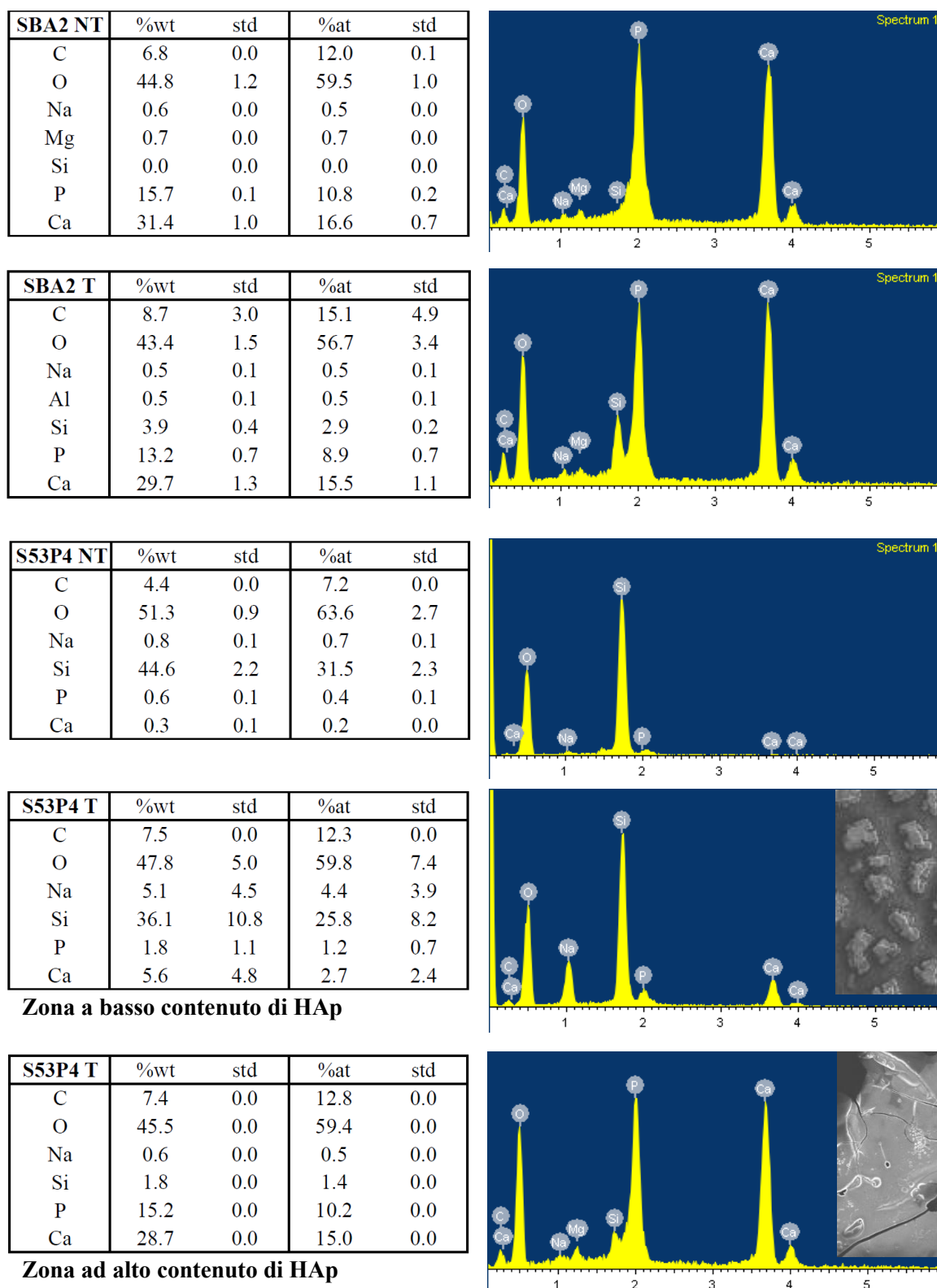


Figura 7.25. Composizioni percentuali in peso (%wt) e atomiche (%at) e spettri EDS di vetri bioattivi SBA2 e S53P4 dopo 14 giorni in SBF: confronto tra campioni non trattati (NT) e trattati (T). Si riportano in tabella valori medi e deviazioni standard su due misure per SBA2 NT, tre misure per SBA2 T, quattro misure per S53P4 NT, quattro misure per S53P4 T (basso contenuto di HAp) e una misura per S53P4 (alto contenuto di HAp).

In figura 7.25 si illustrano le composizioni e i rispettivi spettri EDS dei vetri bioattivi dopo 14 giorni in soluzione fisiologica simulata. Per il vetro SBA2 non trattato, si rilevano alti contributi da parte di calcio e fosforo sia per i campioni trattati sia per quelli di controllo; in questi ultimi, si nota una differenza nella percentuale di silicio in quanto minore rispetto alla controparte, che presenta ancora zone di esposizione del *film* polimerico. Per il vetro S53P4, nei campioni non trattati si osserva un netto decremento dei contributi in calcio e fosforo, fatto che confermerebbe il distacco dello strato superficiale di HAp. Per i campioni rivestiti, si osservano, analogamente al *time step* precedente, alcune regioni ricche in HAp e altre zone in cui si registra una marcata prevalenza del silicio, attribuibile al gel di silice.

Per quanto riguarda l'analisi della diffrazione dei raggi X, in entrambi i vetri bioattivi al giorno 0 si osserva l'alone caratteristico della struttura amorfa del vetro, per valori di 2θ tra 25° e 35° , sia nei campioni trattati che nei controlli.

Al giorno 3, per il vetro SBA2 non trattato si assiste alla comparsa di un picco a 26° , attribuibile alla formazione di HAp, per il vetro trattato la curva resta invariata rispetto al *time step* precedente. Per il vetro S53P4 non trattato, si osserva una debole convessità della curva nel *range* tra 14° e 26° (fascio celeste in figura 7.27), imputabile alla presenza di gel di silice e non riscontrabile nel campione trattato; tuttavia, in quest'ultimo si registra un picco a 28° analogamente allo SBA2 rivestito.

Al giorno 7, per il vetro SBA 2 non trattato sono ben visibili i picchi a 26° e 32° , mentre per il vetro trattato si assiste ad un ampio picco in corrispondenza di 32° . Inoltre, si avvistano anche picchi a 50° e a 54° : questi potrebbero essere picchi secondari dell'HAp. Per il vetro S53P4, la bombatura riscontrata al giorno 3 risulta più accentuata al giorno 7, mentre non sono visibili netti cambiamenti per i campioni trattati.

Al giorno 14, si distinguono picchi a 26° , 30° e 32° (principali dell'HAp, indicati dalle linee verticali in figura 7.26 e 7.27) per il vetro SBA2 non trattato, in aggiunta ai picchi a 50° e 54° osservati al giorno 7. Per lo SBA2 trattato si registrano dei picchi meno pronunciati a 26° e 32° . Il vetro S53P4 non trattato presenta un'accentuazione della convessità già osservata precedentemente, al contrario del vetro rivestito che mostra un leggero alone in corrispondenza dell'intervallo relativo al gel di silice.

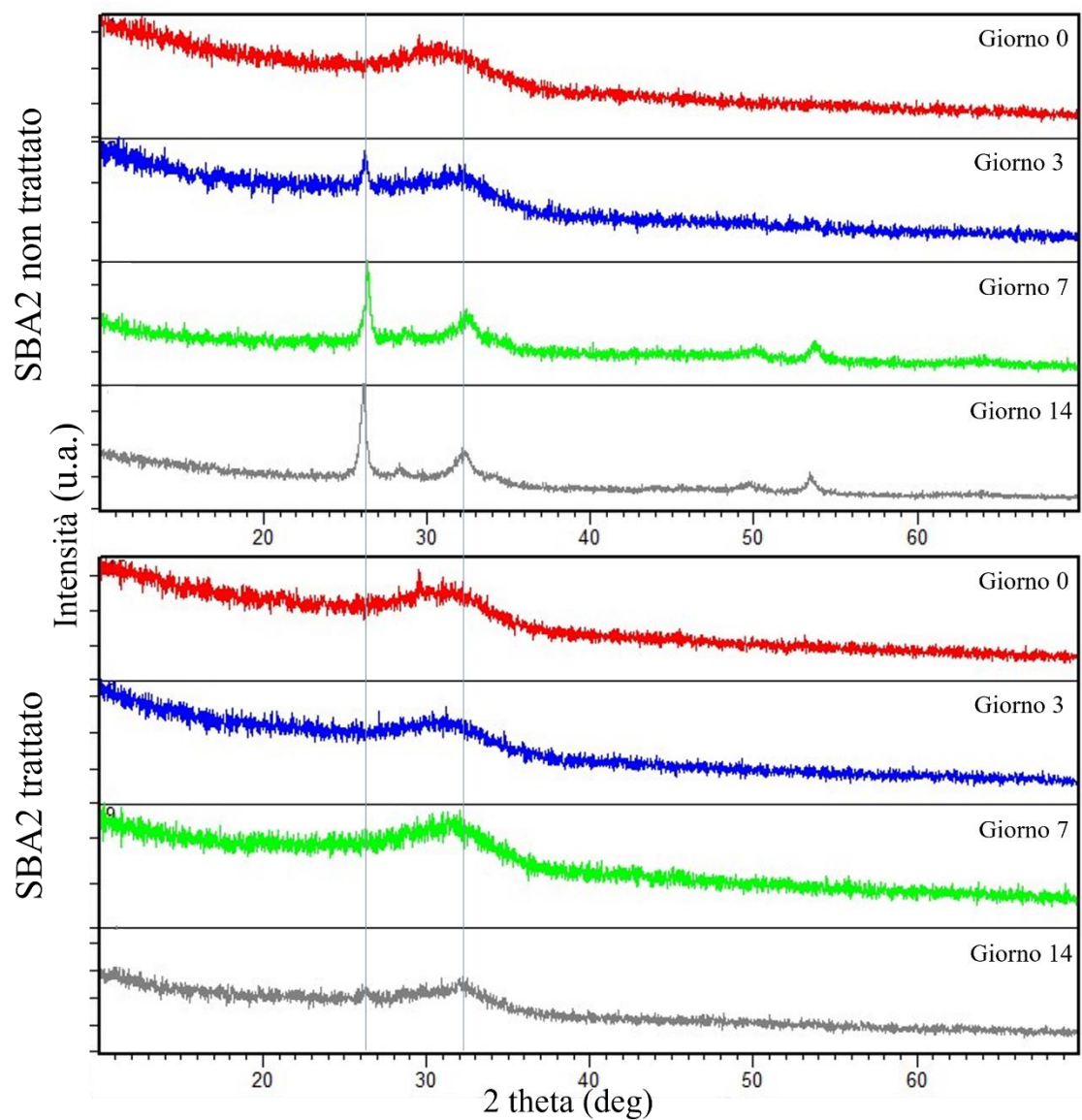


Figura 7.26. Modelli di diffrazione per il vetro SBA2 trattato e non trattato prima dell'immersione e dopo 3, 7 e 14 giorni in SBF. Le linee verticali si riferiscono al valore di 2θ dei picchi caratteristici dell'HAp.

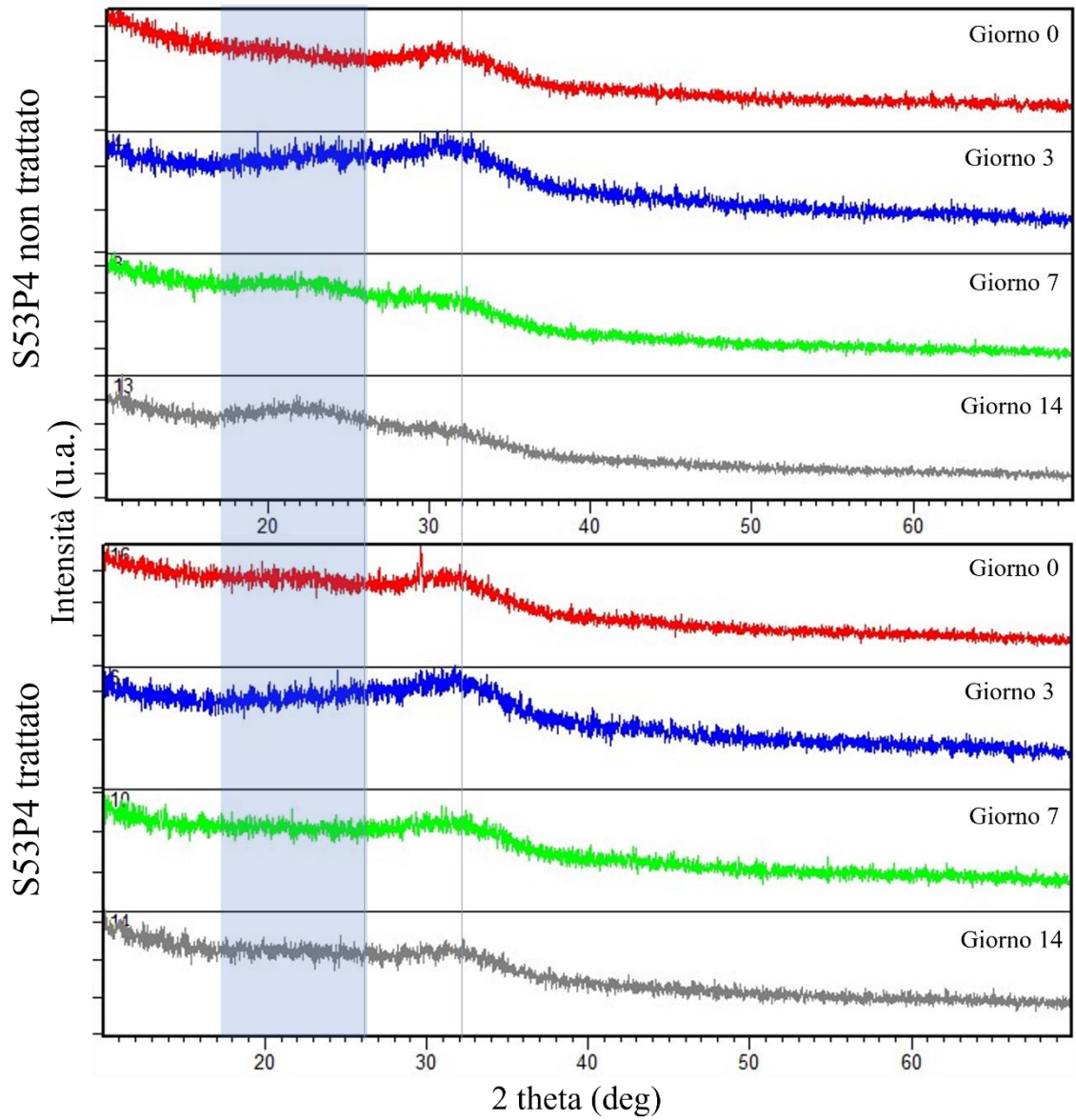


Figura 7.27. Modelli di diffrazione per il vetro S53P4 trattato e non trattato prima dell'immersione e dopo 3, 7 e 14 giorni in SBF. Le linee verticali si riferiscono al valore di 2theta dei picchi caratteristici dell'HAp.

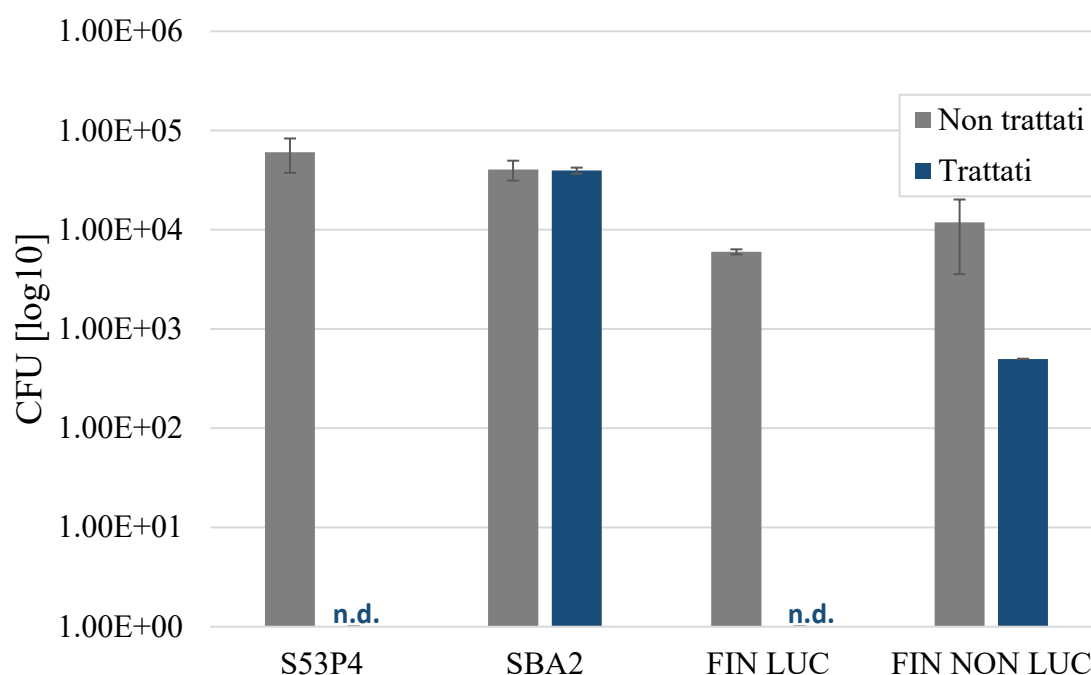
7.3.7. Proprietà antiadesive: test batterici *in vitro*

Figure 7.29. Conteggio delle colonie batteriche vive per i vetri inerti lucidati e non lucidati e i vetri bioattivi S53P4 e SBA2: confronto tra campioni rivestiti con trattamento 1 e non trattati. Misure effettuate in duplicato.

Il conteggio delle colonie batteriche vive, riportato in figura 7.29 (stima quantitativa) e 7.30 (stima qualitativa), ha mostrato risultati positivi per i campioni di vetro bioattivo S53P4 e da finestratura lucidato soggetti a trattamento 1: per entrambi i vetri non sono stati rilevati *spot* per alcuna diluizione della sospensione. Tuttavia, il vetro SBA2 non mostra variazioni significative tra i campioni di controllo e quelli rivestiti con trattamento 1, in cui si osservano colonie batteriche per le diluizioni 1-2, a differenza del vetro da finestratura non lucidato in cui si nota uno scostamento significativo (*t student*, $p = 0.039$) per la diluizione 1. Questo risultati sono in leggero contrasto con quanto osservato al SEM: le immagini in figura 7.31 mostrano infatti la presenza di colonie batteriche su tutte le superfici dei vetri studiati, sia nel caso dei campioni rivestiti sia nel caso dei controlli. D'altra parte, si osserva per tutti i vetri non trattati un numero di batteri più elevato organizzati in aggregati consistenti (contrassegnati dalle freccette rosse) in cui è visibile il *biofilm*; nei campioni rivestiti sono presenti batteri in minor quantità e distribuiti in modo più disperso, che non danno luogo alla formazione di *biofilm*. Questo suggerirebbe una proprietà batteriostatica delle superfici trattate, che quindi non promuovono la proliferazione batterica e lo sviluppo del *biofilm*, senza svolgere un'azione propriamente antiadesiva o battericida. Il conteggio delle colonie per vetro SBA2 sembra quindi non congruente con quanto osservato al SEM e potrebbe essere dovuto alla difficoltà di staccare i batteri dalla superficie del vetro, vista

l'elevata rugosità dovuta alla reattività del vetro e la scarsa efficacia della sonicazione e del *vortexing* per il distacco dei batteri dalle superfici.

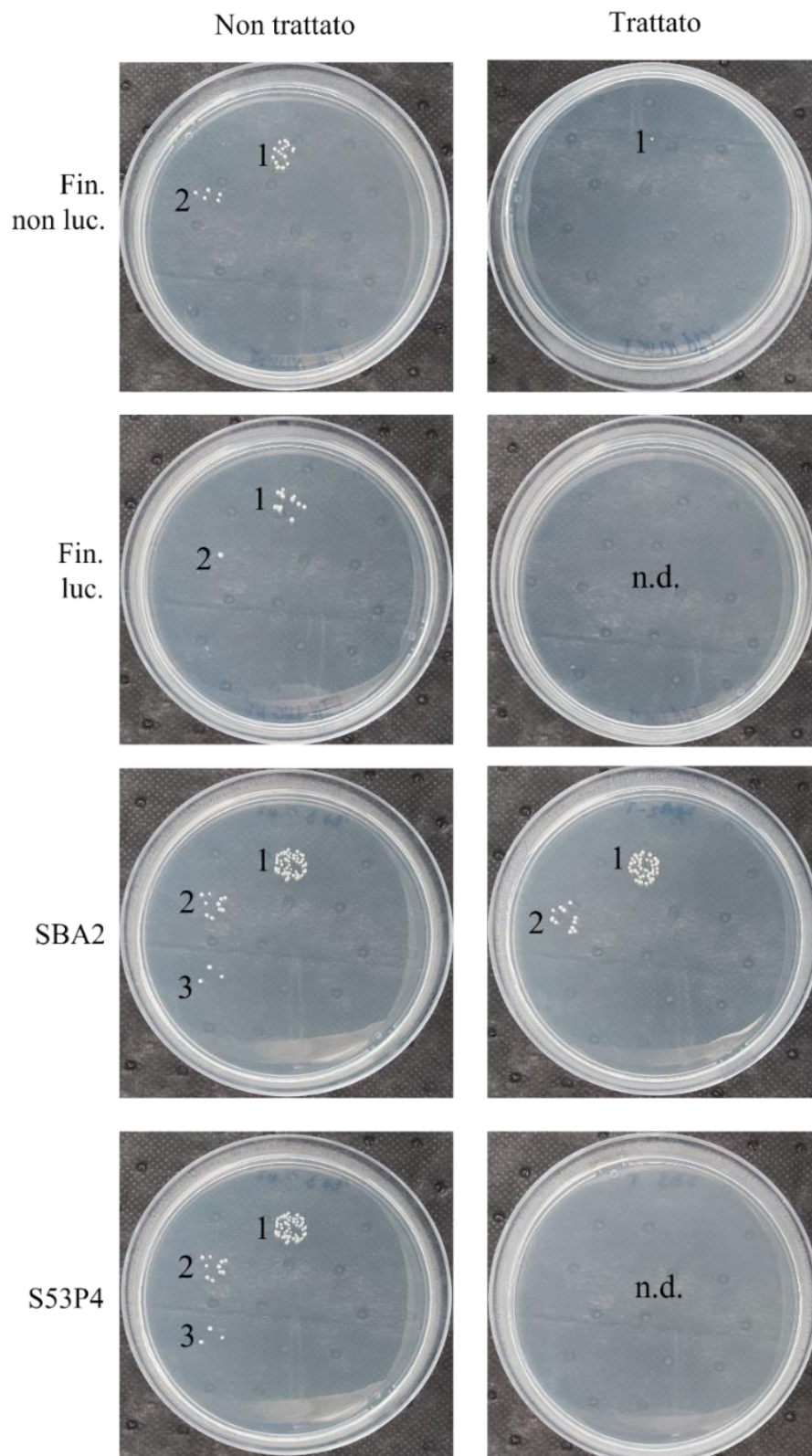


Figura 7.30. Conteggio delle colonie batteriche vive a diverse diluizioni: il numero riportato rappresenta la diluizione corrispondente.

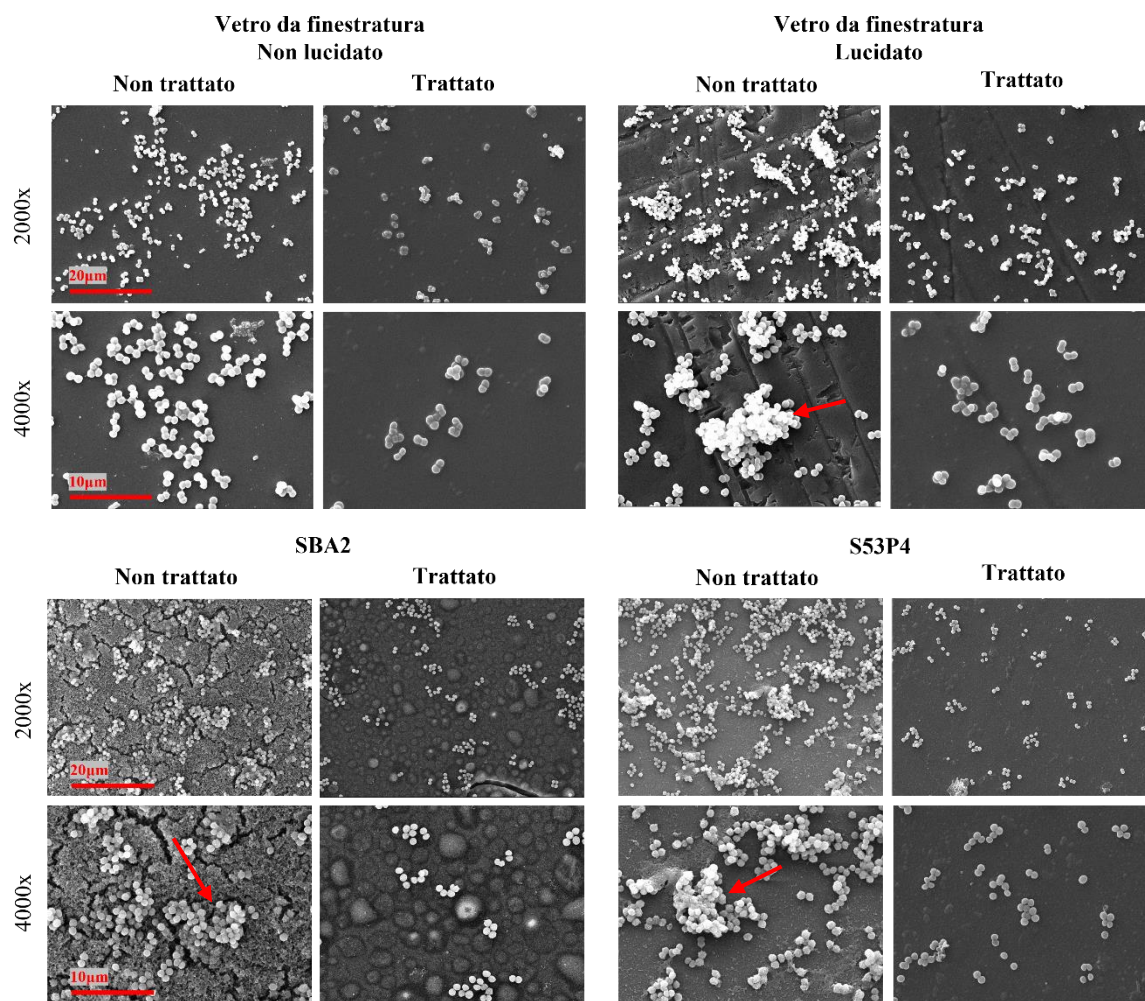


Figura 7.31. Immagini al SEM delle microcolonie batteriche formate sulle superfici dei campioni trattati e non trattati di vetro da finestra non lucidato e lucidato e di vetri bioattivi SBA2 e S53P4. Ingrandimenti a 2000x e 4000x. La scala di grandezza è riportata in rosso e vale per le immagini sulla stessa riga. Si evidenziano gli aggregati batterici con produzione di biofilm con le freccette rosse.

7.4. Conclusioni

La funzionalizzazione superficiale di vetri da finestratura e vetri bioattivi attraverso trattamento di attivazione e deposizione tramite plasma ha prodotto materiali a energia di superficie ridotta. Questo è stato dimostrato dall'incremento dell'angolo di contatto in tutti i campioni trattati con esametildisilossano. Le informazioni estratte dall'analisi morfologica e dalla chimica superficiale hanno testimoniato la deposizione del *coating* in silossano, enfatizzando l'influenza della distanza tra la superficie trattata e la piastra superiore del reattore, capace di generare *pattern* particolari nel rivestimento. Lo studio della rugosità e della topografia ha suggerito un'azione riempitiva del materiale depositato nei confronti di asperità profonde, con uno spessore del *film* dell'ordine delle decine di nm. La misura della carica superficiale coincide con l'ipotesi dell'esposizione di gruppi funzionali idrofobi in superficie. La reattività dei vetri bioattivi sembra essere leggermente rallentata, ma non bloccata, dalla presenza del rivestimento in silossano. L'analisi dell'adesione batterica ha mostrato il carattere batteriostatico delle superfici trattate.

Dalle analisi svolte su campioni funzionalizzati con fluoro-silani, è emersa la necessità di un'ottimizzazione dei parametri di processo e della tecnica al plasma, quali la temperatura nella camera del reattore, la natura dei gas di attivazione della superficie e il metodo di circolazione di quelli di monomero.

In conclusione, il lavoro svolto in questa tesi ha dimostrato che la deposizione tramite plasma del silossano può essere sfruttata per impedire la proliferazione di batteri su superfici di vetro inerte; nel caso di vetri bioattivi, il rivestimento provvederebbe all'iniziale protezione del paziente nei confronti di agenti patogeni nel momento dell'impianto, seguita dal progressivo meccanismo di bioattività che garantisce l'osteointegrazione del dispositivo. Considerati entrambi i tipi di vetro e i risultati ottenuti in questo lavoro, si possono pensare applicazioni nel settore sanitario, sia da un punto di vista edilizio, sia ortopedico, in particolare per la rigenerazione del tessuto osseo.

Bibliografia e sitografia

1. UNEDI. *Enciclopedia Universale 'UNEDI'*. (1980).
2. Brandt, R. C.; Martens, R. I. Shattering Glass Cookware. *Am. Ceram. Soc. Bull. Am. Ceram. Soc.*
3. https://www.photonics.com/EDU/optical_figure/d5801.
4. Esmailzare, A., Rahimi, A. & Rezaei, S. M. Investigation of subsurface damages and surface roughness in grinding process of Zerodur® glass-ceramic. *Appl. Surf. Sci.* **313**, 67–75 (2014).
5. Weigel, C., Schulze, M., Gargouri, H. & Hoffmann, M. Deep etching of Zerodur glass ceramics in a fluorine-based plasma. *Microelectron. Eng.* **185–186**, 1–8 (2018).
6. Döhring, T., Thomas, A., Jedamzik, R., Kohlmann, H. & Hartmann, P. Manufacturing of lightweighted ZERODUR components at SCHOTT. *Opt. Mater. Struct. Technol. III* **6666**, 666602 (2007).
7. Rahmati, M., Silva, E. A., Reseland, J. E., Heyward, C. & Haugen, H. J. Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. *Chem. Soc. Rev.* **49**, 5178–5224 (2020).
8. Chen, X., Chen, J. & Huang, N. The structure, formation, and effect of plasma protein layer on the blood contact materials: A review. *Biosurface and Biotribology* **8**, 1–14 (2022).
9. Roach, P., Eglin, D., Rohde, K. & Perry, C. C. Modern biomaterials: A review - Bulk properties and implications of surface modifications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 1263–1277 (2007).
10. Lampin, M., Legris, C. & Degrange, M. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration - Lampin - 1998 - Journal of Biomedical Materials Research.pdf. *J. Biomed. Mater. Res.* **36**, 99–108 (1997).
11. Cao, B., Peng, Y., Liu, X. & Ding, J. Effects of Functional Groups of Materials on Nonspecific Adhesion and Chondrogenic Induction of Mesenchymal Stem Cells on Free and Micropatterned Surfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 23574–23585 (2017).
12. Marie, P. Physiology of bone tissue. *Immuno-analyse Biol. Spécialisée* **7**, 17–24 (1992).
13. Le, C. *et al.* Advances in Bone Tissue Engineering. *Regen. Med. Tissue Eng.* 599–614 (2013).
14. Younger, E. M. & Chapman, M. W. Morbidity at Bone Graft Donor Sites. *J. Orthop. Trauma* **3**, 192–195 (1989).
15. El-Rashidy, A. A., Roether, J. A., Harhaus, L., Kneser, U. & Boccaccini, A. R. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models. *Acta Biomater.* **62**, 1–28 (2017).
16. Koga, N., Strnad, Z., Šesták, J. & Strnad, J. Thermodynamics of non-bridging oxygen in silica bio-compatible glass-ceramics mimetic material for the bone tissue substitution. *J. Therm. Anal. Calorim.* **71**, 927–937 (2003).
17. Hench, L. L. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 1487–1510 (1991).
18. Hench, L. L. The story of Bioglass®. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17**, 967–978 (2006).
19. Fiume, E., Barberi, J., Verné, E. & Baino, F. Bioactive glasses: From parent 45S5

- Composition to Scaffold-Assisted Tissue-Healing Therapies. *J. Funct. Biomater.* **9**, (2018).
20. Massera, J. & Hupa, L. Influence of SrO substitution for CaO on the properties of bioactive glass S53P4. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **25**, 657–668 (2014).
 21. Tadashi KOKUBO, Masazumi SHIGEMATSU, Yukihiro NAGASHIMA, Megumi TASHIRO, Takashi NAKAMURA, Takao YAMAMURO, S. H. Apatite- and Wollastonite-Containing Glass-Ceramics for Prosthetic Application. *News.Ge Bull. Inst.* <https://news.ge/anakliis-porti-aris-qveynis-momava> (1982).
 22. Sautier, J. M. *et al.* Bioactive glass-ceramic containing crystalline apatite and wollastonite initiates biomineralization in bone cell cultures. *Calcif. Tissue Int.* **55**, 458–466 (1994).
 23. Kokubo, T. *Bioactive glass-ceramics. Bioceramics and their Clinical Applications* (Woodhead Publishing Limited, 2008). doi:10.1533/9781845694227.2.284.
 24. Elbourne, A. *et al.* Bacterial-nanostructure interactions: The role of cell elasticity and adhesion forces. *J. Colloid Interface Sci.* **546**, 192–210 (2019).
 25. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia* **12**, 9–16 (1996).
 26. Parvate, S., Dixit, P. & Chattopadhyay, S. Superhydrophobic Surfaces: Insights from Theory and Experiment. *J. Phys. Chem. B* **124**, 1323–1360 (2020).
 27. Park, J., Lim, H., Kim, W. & Ko, J. S. Design and fabrication of a superhydrophobic glass surface with micro-network of nanopillars. *J. Colloid Interface Sci.* **360**, 272–279 (2011).
 28. Brassard, J. D., Sarkar, D. K. & Perron, J. Fluorine based superhydrophobic coatings. *Appl. Sci.* **2**, 453–464 (2012).
 29. Lathe, S. S., Terashima, C., Nakata, K. & Fujishima, A. Superhydrophobic surfaces developed by mimicking hierarchical surface morphology of lotus leaf. *Molecules* **19**, 4256–4283 (2014).
 30. Jaggessar, A., Shahali, H., Mathew, A. & Yarlagaadda, P. K. D. V. Bio-mimicking nano and micro-structured surface fabrication for antibacterial properties in medical implants. *J. Nanobiotechnology* **15**, 1–20 (2017).
 31. Watson, G. S. *et al.* A gecko skin micro/nano structure - A low adhesion, superhydrophobic, anti-wetting, self-cleaning, biocompatible, antibacterial surface. *Acta Biomater.* **21**, 109–122 (2015).
 32. Suo, Z., Avci, R., Deliorman, M., Yang, X. & Pascual, D. W. Bacteria survive multiple puncturings of their cell walls. *Langmuir* **25**, 4588–4594 (2009).
 33. Cho, J. Y., Kim, G., Kim, S. & Lee, H. Replication of surface nano-structure of the wing of dragonfly (*Pantala Flavescens*) using nano-molding and UV nanoimprint lithography. *Electron. Mater. Lett.* **9**, 523–526 (2013).
 34. Lansdown, A. B. Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J. Wound Care* **11**, 125–130 (2002).
 35. Zhang, D. *et al.* Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **93**, 475–483 (2010).
 36. Xiao, X. H. *et al.* Antibacterial silver-containing silica glass prepared by ion implantation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**, 6424–6427 (2010).
 37. Liu, J., Rawlinson, S. C. F., Hill, R. G. & Fortune, F. Strontium-substituted bioactive glasses in vitro osteogenic and antibacterial effects. *Dent. Mater.* **32**, 412–422 (2016).
 38. Richardson, J. J., Björnmalm, M. & Caruso, F. Technology-driven layer-by-layer assembly

- of nanofilms. *Science* (80-.). **348**, (2015).
39. Förch, R., Zhang, Z. & Knoll, W. Soft plasma treated surfaces: Tailoring of structure and properties for biomaterial applications. *Plasma Process. Polym.* **2**, 351–372 (2005).
 40. Chu, P. K., Chen, J. Y., Wang, L. P. & Huang, N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **36**, 143–206 (2002).
 41. Germany, T. Atmospheric Plasma vs Low Pressure Plasma. <https://www.thierry-corp.com/plasma-knowledgebase/atmospheric-plasma-vs-low-pressure-plasma>.
 42. Plasma parameters. https://en.wikipedia.org/wiki/Plasma_parameters#Electron_temperature.
 43. Germany, T. What is plasma density? <https://www.thierry-corp.com/plasma-knowledgebase/what-is-plasma-density>.
 44. Schütze, A. *et al.* The atmospheric-pressure plasma jet: A review and comparison to other plasma sources. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **26**, 1685–1694 (1998).
 45. Park, J. H., Lee, N. E., Lee, J., Park, J. S. & Park, H. D. Deep dry etching of borosilicate glass using SF₆ and SF₆/Ar inductively coupled plasmas. *Microelectron. Eng.* **82**, 119–128 (2005).
 46. Kolari, K., Saarela, V. & Franssila, S. Deep plasma etching of glass for fluidic devices with different mask materials. *J. Micromechanics Microengineering* **18**, (2008).
 47. Thiry, D., Konstantinidis, S., Cornil, J. & Snyders, R. Plasma diagnostics for the low-pressure plasma polymerization process: A critical review. *Thin Solid Films* **606**, 19–44 (2016).
 48. Klein, M. O. *et al.* Submicron scale-structured hydrophilic titanium surfaces promote early osteogenic gene response for cell adhesion and cell differentiation. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* **15**, 166–175 (2013).
 49. Wang, D. *et al.* Design of robust superhydrophobic surfaces. *Nature* **582**, 55–59 (2020).
 50. Yu, E., Kim, S. C., Lee, H. J., Oh, K. H. & Moon, M. W. Extreme wettability of nanostructured glass fabricated by non-lithographic, anisotropic etching. *Sci. Rep.* **5**, 2–7 (2015).
 51. Yoon, S. M., Lee, Y. A., Park, K. C., Nahm, S. & Moon, M. W. Subwavelength Hollow-Nanopillared Glass with Gradient Refractive Index for Ultralow Diffuse Reflectance and Antifogging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 6234–6242 (2020).
 52. Oehr, C., Müller, M., Elkin, B., Hegemann, D. & Vohrer, U. Plasma grafting - A method to obtain monofunctional surfaces. *Surf. Coatings Technol.* **116–119**, 25–35 (1999).
 53. Mansur, H. S. *et al.* Surface functionalization of porous glass networks: Effects on bovine serum albumin and porcine insulin immobilization. *Biomacromolecules* **1**, 789–797 (2000).
 54. Kvítek, O., Bot, M. & Švorčík, V. Gold nanoparticles grafting on glass surface. *Appl. Surf. Sci.* **258**, 8991–8995 (2012).
 55. Isakov, K., Kauppinen, C., Franssila, S. & Lipsanen, H. Superhydrophobic Antireflection Coating on Glass Using Grass-like Alumina and Fluoropolymer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 49957–49962 (2020).
 56. Mastanaiah, N., Johnson, J. A. & Roy, S. Effect of Dielectric and Liquid on Plasma Sterilization Using Dielectric Barrier Discharge Plasma. *PLoS One* **8**, (2013).
 57. Kapica, R., Markiewicz, J. & Tyczkowska-siero, E. Artificial Superhydrophobic and

- Antifungal Surface on Goose Down by Cold Plasma Treatment. 1–16 (2020).
58. Luo, F. *et al.* Polytetrafluoroethylene based, F8261 modified realization of Li₂SnMg_{0.5}O_{3.5} filled composites. *Appl. Surf. Sci.* **503**, 144088 (2020).
 59. SciMed. A Brief Introduction to SEM (Scanning Electron Microscopy). <https://www.scimed.co.uk/education/sem-scanning-electron-microscopy/>.
 60. Colpan, C. O., Nalbant, Y. & Ercelik, M. Fundamentals of Fuel Cell Technologies. *Compr. Energy Syst.* **4–5**, 1107–1130 (2018).
 61. Luo, F., Tang, B., Yuan, Y., Fang, Z. & Zhang, S. Microstructure and microwave dielectric properties of Na_{1/2}Sm_{1/2}TiO₃ filled PTFE, an environmental friendly composites. *Appl. Surf. Sci.* **436**, 900–906 (2018).
 62. Luxbacher, T. The ZETA Guide (Luxbacher 2014).pdf.
 63. Buzzini, P. & Stoecklein, W. FORENSIC SCIENCES | Paints, Varnishes, and Lacquers. in *Encyclopedia of Analytical Science* 453–464 (Elsevier, 2005). doi:10.1016/B0-12-369397-7/00201-6.
 64. Kokubo, T. & Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* **27**, 2907–2915 (2006).
 65. Antonio Alves Júnior, J. & Baptista Baldo, J. The Behavior of Zeta Potential of Silica Suspensions. *New J. Glas. Ceram.* **04**, 29–37 (2014).