



**Politecnico
di Torino**

Politecnico di Torino
Corso di Laurea Magistrale in
Ingegneria Biomedica A.A. 2023/2024

Tesi di Laurea Magistrale
Marzo 2024

***Ottimizzazione di un rivestimento polimerico
fluorurato attraverso la tecnologia del plasma su vetri
inerti e bioattivi***

Relatrice:

Dott.ssa Marta Miola

Candidata:

Martina Masserano

Correlatrice:

Prof.ssa Enrica Verne



Si ringrazia IRIS S.r.l per avermi accolta in questi mesi di tesi e avermi dato la possibilità di svolgere una parte importante del lavoro e con essa anche la Dott.ssa Katiuscia Costabello per avermi seguita e fatto conoscere la tecnologia del plasma.

Un ringraziamento speciale va alla relatrice Dott.ssa Marta Miola per la costante supervisione e alla correlatrice, Prof.ssa Enrica Vernè per la disponibilità dimostrata.

Ringrazio con affetto tutti gli amici che mi hanno sempre sostenuta nei momenti più difficili.

Il ringraziamento più sentito va ai miei genitori, a mia sorella Alessia e ai nonni che ogni giorno mi hanno sostenuta in questo arduo percorso.

Infine, vorrei ringraziare Gabriele, felice di poter condividere questo nuovo traguardo insieme.

Sommario

Abstract (Versione Italiana).....	VII
Abstract (Versione Inglese)	IX
1. INTRODUZIONE.....	1
2. VETRI INERTI E VETRI BIOATTIVI.....	3
2.1 Introduzione al concetto di vetro.....	3
2.2 Vetri inerti	4
2.2.1 Tipologie di vetri.....	5
2.2.1.1 Vetro Borosilicato.....	5
2.2.1.2 Vetro Sodico-Calcico.....	6
2.2.2 Applicazioni mediche.....	6
2.2.2.1 Vetro per la ricerca clinica.....	6
2.2.2.2 Vetro come mezzo di protezione	7
2.3 Biomateriali e Vetri Bioattivi	8
2.3.1 Bioattività	10
2.3.2 Vetri Bioattivi.....	10
2.3.2.1 Metodi di produzione.....	11
2.3.2.2 Tipologie di vetri Bioattivi (Hench-Kokubo-Beall)	11
2.3.2.3 BIOGLASS® 45S5	14
2.3.4 Applicazioni mediche.....	15
3. PROPRIETA' ANTIBATTERICHE.....	19
3.1 Tipologie di superficie antibatteriche.....	20
3.1.1 Superficie antimicrobiche.....	20
3.1.2 Superficie antiadesive	21
3.2 Vetri con proprietà antibatteriche	22
4. TRATTAMENTI AL PLASMA	25
4.1 Parametri del plasma	25
4.2 Sorgenti al plasma	27
4.3 Tecniche di modifica superficiale via plasma	29
4.3.1 Effetti del trattamento al plasma	33
5. SEZIONE SPERIMENTALE	35
5.1 Materiali e metodi.....	35
5.1.1 Produzione dei vetri Bioattivi	35
5.1.2 Preparazione dei vetri inerti.....	37
5.1.3 Preparazione dei campioni ai trattamenti successivi.....	37
5.1.3.1 Pre-trattamento plasma dei campioni inerti.....	37

5.1.3.2 Preparazione dei campioni bioattivi.....	37
5.1.4 F8815	38
5.1.4.1 Preparazione della soluzione del monomero.....	40
5.1.5 Trattamenti di funzionalizzazione superficiale.....	40
5.1.5.1 Deposizione via PLASMA	40
5.1.5.2 Deposizione via DIP COATING	41
5.1.5.3 Deposizione DIP COATING + PLASMA	41
5.1.6 Ottimizzazione dei trattamenti eseguiti.....	41
5.1.6.1 Fase 1.....	41
5.1.6.2 Fase 2.....	42
5.1.6.3 Fase 3.....	43
5.1.6.4 Fase 4.....	44
5.2 Caratterizzazioni	45
6. RISULTATI E DISCUSSIONE	47
6.1 Bagnabilità: (WCA).....	47
6.2 Chimica superficiale: FTIR.....	58
6.3 Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico.....	65
6.4 Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS	72
6.5 Carica superficiale: potenziale zeta	75
6.6 Bioattività: test in SBF	76
6.7 Proprietà antiadesive: test batterici <i>in vitro</i>	86
7. CONCLUSIONI	89
Bibliografia	91

Abstract (Versione Italiana)

Numerosi articoli scientifici, consultati per approfondire il campo della mia tesi, riportano che l'era storica in cui stiamo vivendo è l'era del vetro, tanti sono gli oggetti di uso quotidiano realizzati con questo materiale, basti pensare allo schermo di smartphone e laptop divenuti ormai indispensabili e sempre presenti nella nostra vita, senza dimenticare gli oggetti domestici come contenitori e bicchieri, per passare ai vetri delle finestre o i vetri delle auto fino ad arrivare a strumenti o parti di strumenti utilizzati nel campo biomedicale. Il vetro è presente in ogni aspetto della nostra vita quotidiana e grazie alla sua struttura molecolare e le sue caratteristiche è molto versatile e per questo occorre sfruttare al meglio le sue potenzialità.

L'avvento della pandemia nel 2020 ci ha messo di fronte alla paura del contagio, qualunque oggetto poteva essere contaminato da qualcuno che lo aveva toccato in precedenza, da qui l'interesse di sfruttare la versatilità del vetro per renderlo anche un materiale con proprietà antiadesive e/o antibatteriche, in modo tale da essere facilmente pulibile e potenzialmente non veicolo di contagio.

Numerose sono le modifiche superficiali che si annoverano per rendere i materiali antifouling, tra cui anche la recente tecnica al plasma. Il trattamento al plasma è una tecnica multifunzionale che permette non solo di pulire e sterilizzare le superfici, ma anche di renderle idrofiliche oppure può essere utilizzato come mezzo per depositare coating polimerici su diverse tipologie di substrati.

Il mio lavoro di tesi si è concentrato sul rivestimento e il trattamento al plasma di vetri con un polimero fluorurato per rendere la loro superficie antiadesiva. In particolare la ricerca ha riguardato due tipologie di vetri: un vetro inerte da finestra e 2 vetri bioattivi, denominati SBA2 e S53P4.

I trattamenti superficiali tramite plasma si sono svolti in collaborazione con IRIS S.r.l presso i loro laboratori, mentre il resto delle analisi e caratterizzazioni si sono svolte presso i laboratori del Dipartimento di Scienza Applicata e Tecnologia (DISAT) del Politecnico di Torino.

Per raggiungere l'obiettivo di rendere la superficie dei vetri antifouling e antibatterica si è realizzato un *coating* con l'oligomero fluorosilano denominato F8815. I campioni inerti sono stati pre-trattati al plasma con He/O₂ per la fase di etching e successivamente immersi nel F8815 e poi post-trattati per ottimizzare la polimerizzazione con Ar, stessa cosa si è fatta per i campioni bioattivi, ad eccezione del pre-trattamento in quanto questo step iniziale li rendeva super-idrofilici. Per la fase di rivestimento al plasma numerose sono state le modifiche apportate, prima le tempistiche di trattamento e la temperatura e infine si è lavorato anche sulla frequenza di lavoro e la potenza del generatore.

A seguito dei trattamenti si sono svolte caratterizzazioni chimico-fisiche per investigare la chimica superficiale dei materiali e verificare la presenza del monomero, quali l'analisi spettroscopica in trasformata di Fourier nell'infrarosso (FTIR), il test statico dell'angolo di contatto con acqua (WCA), la valutazione del potenziale zeta e l'analisi al microscopio confocale.

Per verificare invece la bioattività dei campioni SBA2 e S53P4, si sono realizzate le prove di bioattività in soluzione fisiologica simulata (SBF), mentre per valutare il comportamento antibatterico di entrambe le tipologie di vetro, inerti e bioattivi, si sono svolti test batterici *in vitro*, in collaborazione con il CAAD Research Center di Novara.

Le prove svolte in questi mesi e le ottimizzazioni apportate ai protocolli eseguiti ci hanno permesso di capire che un primo rivestimento del campione per immersione nel monomero idrofobizzante seguito poi da un trattamento al plasma in Ar garantisce un rivestimento omogeneo e buone proprietà antifouling. L'obiettivo futuro sarebbe quello di eliminare la fase iniziale di immersione nel monomero e rivestire il campione solo tramite deposizione via plasma, tecnica più versatile e che accorcerebbe le tempistiche di lavoro.

Abstract (Versione Inglese)

Many scientific articles, consulted to explore the subject matter of my thesis, report that the historical era we are living in is the era of glass, given the multitude of everyday objects made of glass. Consider, for example, the screens of smartphones and laptops, now indispensable and always present in our lives, not to mention household items such as containers and glasses, and even the glass of windows or car windshields, extending to instruments or parts of them used in the biomedical field. Glass is present in every aspect of our daily lives, and thanks to its molecular structure and characteristics, it is highly versatile, making it essential to fully exploit its potential.

The advent of the pandemic in 2020 faced us with the fear of contagion, where any object could be contaminated by someone who had touched it before. Hence the interest to exploit the versatility of glass to make it a material with anti-adhesive and/or antibacterial properties, making it easily cleanable and potentially not a vehicle for contagion.

Numerous surface modifications exist to make materials antifouling, including the recent plasma technique. Plasma treatment is a highly flexible technique that not only cleans and sterilizes surfaces but can also render them hydrophilic or be used as a means to deposit polymeric coatings on various substrates.

My thesis work focused on the coating and plasma treatment of glasses with a fluorinated polymer to make their surface anti-adhesive. In particular, the research involved two types of glass: an inert window glass and 2 bioactive glasses, named SBA2 and S53P4.

Plasma surface treatments were conducted in collaboration with IRIS S.r.l. in their laboratories, while the rest of the analyses and characterizations were carried out at the laboratories of the Department of Applied Science and Technology (DISAT) at the Polytechnic University of Turin.

To achieve the goal of making the glass surfaces antifouling and antibacterial, a coating with the fluorosilane oligomer named F8815 was applied. Inert samples underwent plasma pre-treatment with He/O₂ for etching, followed by dipping in F8815 and post-treatment for polymerization optimization with Ar. The same procedure was followed for bioactive samples, except for pre-treatment, as this initial step made them super-hydrophilic. For the plasma coating stage, numerous changes were made, first the treatment times and temperature, and finally the working frequency and power of the generator were also worked on.

Following the treatments, chemical-physical characterisations were carried out to investigate the surface chemistry of the materials and verify the presence of the monomer, such as Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analysis, static water contact angle (WCA) testing, zeta potential evaluation and confocal microscope analysis

To verify the bioactivity of the SBA2 and S53P4 samples, bioactivity tests were carried out in simulated saline solution (SBF). Tests are also ongoing to assess the antibacterial behaviour of both glass types, inert and bioactive, while to evaluate the antibacterial behavior of both types of glass, inert and bioactive, bacterial tests were conducted in vitro in collaboration with the CAAD Research Center in Novara.

The tests completed in recent months and the optimisations made to the protocols performed have enabled us to understand that an initial coating of the sample by immersion in the water-repellent monomer followed by plasma treatment in Ar provides a homogeneous coating and good antifouling properties. The future aim would be to eliminate the initial phase of immersion in the monomer and to coat the sample only by plasma deposition, a more versatile technique that would speed up work times.

1. INTRODUZIONE

Il campo e soprattutto la tecnologia dei materiali è molto vasto e ricco di storia e di innovazioni che negli anni ha avuto uno sviluppo esteso e rapido. Le classi principali di materiali utilizzati sono i materiali metallici, i polimerici ed i ceramici.

Queste tre categorie di materiali ricoprono numerose applicazioni dall'automotive, all'aerospaziale, dall'elettronica, all'edilizia, e alcuni materiali di queste categorie li ritroviamo anche in numerose applicazioni mediche. Infatti alcuni materiali metallici come il titanio, leghe di cobalto-cromo-molibdeno vengono prevalentemente utilizzati nelle protesi di femore o placche per la chirurgia spinale, mentre i materiali polimerici per realizzare fili per sutura, lenti a contatto e cementi ossei e infine i ceramici in particolar modo negli impianti dentali e componenti di protesi ortopediche.

Ecco dunque che materiali diversi, con proprietà meccaniche, strutturali e chimiche differenti possono anche entrare a far parte del mondo biomedicale e quindi diventare materiali per la vita.

In questo lavoro di tesi ci si è concentrati sui materiali vetrosi, lavorando in parallelo con vetri inerti e vetri bioattivi (SBA2 e S53P4), innanzitutto per diversificarne il campo d'applicazione, i vetri inerti per l'uso quotidiano, i vetri bioattivi per applicazioni di medicina rigenerativa e inoltre per valutarne il loro comportamento a seguito di modifiche superficiali.

Per conferire a questi materiali specifiche proprietà è essenziale apportare particolari finiture utilizzando diverse tecniche di modifica superficiale tra cui si cita la innovativa e versatile tecnologia al plasma che permette di modulare la rugosità del substrato del campione trattato, consentendo al contempo l'aggraffaggio di gruppi funzionali.

L'intento è stato quello di conferire a questi materiali un effetto *antibiofouling* e antibatterico rivestendoli con un monomero fluorurato tramite la tecnica di deposizione via plasma. Tuttavia nel corso del processo di ottimizzazione dei parametri di lavoro, (frequenza, tensione, tempistica di trattamento e flusso del monomero nella camera) le caratterizzazioni eseguite (misura dell'angolo di contatto e analisi della chimica superficiale) hanno evidenziato numerose criticità, e per questo motivo al fine di raggiungere l'obiettivo, si è scelto di trattare la superficie dei vetri attraverso un processo il *dip coating* nel monomero di interesse, coadiuvato da un post-trattamento al plasma in Argon.

2. VETRI INERTI E VETRI BIOATTIVI

In questo progetto di tesi mi sono soffermata su un materiale in particolare: i vetri, mettendo a confronto vetri inerti e vetri bioattivi, in questo capitolo ci soffermeremo più nel dettaglio di questo sorprendente e versatile materiale.

Il campo della scienza e della tecnologia del vetro ha una storia straordinaria che abbraccia circa due secoli di ricerca, ma la storia dell'industria vetraria risale a più di 5000 anni fa, rendendo quindi il vetro uno dei materiali più importanti e di maggior impatto nella storia dell'umanità. In effetti, i materiali vetrosi hanno dimostrato di essere uno dei fattori chiave della civiltà umana moderna.

Zanotto et al. hanno realizzato e analizzato lo sviluppo delle ricerche nel campo del vetro e hanno valutato il tasso di pubblicazione dal 1850 al 2013, mostrando come il numero di pubblicazioni e quindi di ricerche sia cresciuto esponenzialmente a partire dalla metà degli anni '90. Per i vari tipi di applicazioni i compositi di vetro, i biovetri e le vetroceramiche sono ora i primi tre classificati per maggior numero di ricerche e pubblicazioni. (1)

2.1 Introduzione al concetto di vetro

Lo stato vetroso è stato recentemente definito come "*uno stato condensato di materia non in equilibrio, non cristallino, che presenta una transizione vetrosa*" (2)

La parola "vetro" è stata tradizionalmente associata ai prodotti inorganici della fusione che sono stati raffreddati fino a raggiungere una condizione rigida senza cristallizzare, una spiegazione che viene utilizzata in diverse procedure della tecnologia del vetro.

Per comprendere alcune delle caratteristiche principali e la natura dei vetri, è istruttivo partire da uno dei diagrammi più noti della scienza del vetro: il grafico dell'entalpia rispetto alla temperatura, a partire dal punto di fusione fino allo zero assoluto, riportato nella figura 2.1.

1. In equilibrio, i liquidi (liquid) termodinamicamente stabili esistono solo al di sopra del punto di fusione (T_m).
2. I liquidi sottoraffreddati (*supercooled liquid*) esistono tra T_m e la temperatura di transizione vetrosa, T_g (*glass-transition temperature*). In questa fase sono metastabili, cioè devono superare una barriera termodinamica perché avvenga la nucleazione del cristallo
3. I vetri (*glass*) esistono al di sotto della temperatura di transizione vetrosa. Sono termodinamicamente instabili e si rilassano spontaneamente verso lo stato liquido sottoraffreddato a qualsiasi temperatura.
4. I cristalli (*crystal*) sono veri e propri solidi con strutture atomiche ben organizzate a breve, medio e lungo raggio, termodinamicamente stabili al di sotto della T_m .

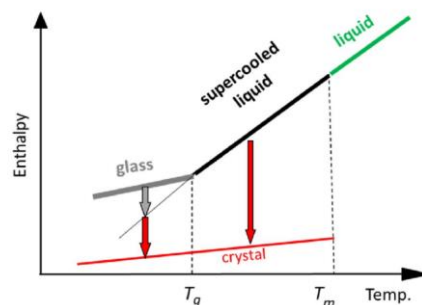


Figura 2.1 - Diagramma Entalpia-Temperatura dei vetri. (3)

Per molti decenni, i ricercatori hanno cercato di classificare il vetro o come solido o come liquido, tuttavia nessuna delle due classi rende giustizia alla reale complessità dello stato vetroso, che combina caratteristiche sia dei liquidi che dei solidi e porta con sé anche caratteristiche proprie. Il vetro appare certamente solido in una tipica scala temporale di osservazione: ha rigidità meccanica ed elasticità, può essere graffiato e persino fratturato, proprio come un solido. Tuttavia, a differenza di un solido, il vetro presenta un flusso viscoso e quindi una temperatura di transizione vetrosa e si rilassa continuamente verso lo stato di liquido sottoraffreddato. Questo comportamento di flusso viscoso è più simile a quello dello stato liquido, ecco quindi che si può affermare che i vetri rientrano in una categoria più ampia, quella dei liquidi sottoraffreddati. Le proprietà di un vetro dipendono quindi non solo dalla sua composizione e dalla temperatura a cui si trova, ma anche dall'intera storia termica e di pressione vissuta dallo stesso. Inoltre, a differenza dei solidi e dei liquidi, i vetri sono termodinamicamente instabili. (3)

2.2 Vetri inerti

Il vetro è un materiale ottenuto tramite la solidificazione di un liquido non accompagnata dalla cristallizzazione. I vetri sono solidi amorfi ovvero non possiedono un reticolo cristallino ordinato, ma presentano una struttura disordinata e rigida, composta da atomi legati covalentemente; tale reticolo disordinato permette la presenza di interstizi in cui possono essere presenti impurezze, spesso desiderate, date da metalli. Un esempio di vetro naturale è l'ossidiana, prodotta dal magma vulcanico.

Il confronto più noto che si può fare è quello tra vetro e quarzo, entrambi sono composti principalmente da biossido di silicio (SiO_2), ma hanno strutture molecolari diverse che li distinguono, il primo ha una struttura cristallina il secondo ha una struttura amorfa.

Come si vede nell'immagine di figura 2.2(a) il quarzo ha le unità di SiO_2 organizzate in un reticolo cristallino ben definito, che conferisce al quarzo molte delle sue proprietà cristalline, come la durezza e la regolarità nella disposizione degli atomi. In contrapposizione si vede in figura 2.2(b) il vetro in cui le unità di SiO_2 non sono organizzate in un reticolo cristallino ordinato.

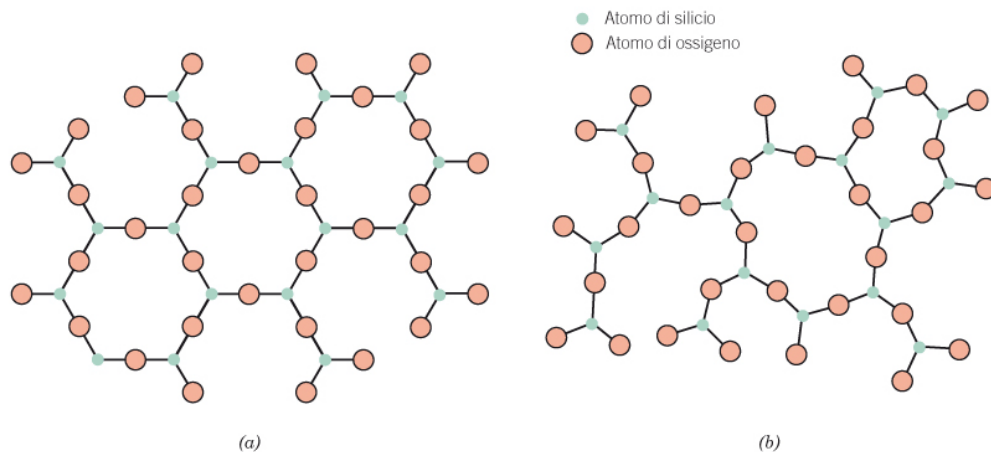


Figura 2.2 - Schematizzazione bidimensionale della struttura del biossido di silicio cristallino (a) e del biossido di silicio non cristallino (b). Immagine tratta da "Scienza ed ingegneria dei materiali", Callister William D. e Retwisch David G.

Nel linguaggio comune il termine vetro viene utilizzato in senso più stretto, riferendosi solamente ai vetri costituiti prevalentemente da ossido di silicio (vetri silicei).

Il vetro è trasparente, duro, pressoché inerte dal punto di vista chimico e biologico, presenta una superficie molto liscia. Queste caratteristiche ne fanno un materiale utilizzato in molti settori, dal campo dell'automotive, all'aerospaziale fino al campo medico. Tuttavia il vetro presenta anche degli svantaggi è molto fragile e tende a rompersi in frammenti taglienti. Questi aspetti negativi possono però

essere ovviati (in parte o interamente) con l'aggiunta di altri elementi chimici o per mezzo di trattamenti termici.

Altri elementi chimici che si possono aggiungere nella miscela sono i cosiddetti ossidi modificatori di reticolo, tra cui quelli di metalli alcalini (Na_2O , K_2O e Li_2O) o alcalino terrosi (MgO e CaO_3) che da soli non possono formare un vetro, ma ne trasformano la struttura.

Una delle caratteristiche più evidenti del vetro ordinario è la trasparenza alla luce visibile. La trasparenza è dovuta all'assenza di stati di transizione elettronici nell'intervallo energetico della luce visibile e al fatto che il vetro non ha disomogeneità di grandezza confrontabile o superiore alla lunghezza d'onda della luce, che provocherebbero scattering, come avviene di solito con i bordi di grano dei materiali policristallini.

2.2.1 Tipologie di vetri

Il vetro è principalmente composto da biossido di silicio miscelato con ossidi come calcio, sodio, potassio, alluminio e boro. La composizione di questi ossidi determina le proprietà del vetro poiché influenzano le proprietà chimiche e fisiche in termini di conducibilità, biocompatibilità, resistenza alle temperature, rigidità e trasparenza. I due tipi principali comunemente utilizzati sono il borosilicato e il vetro sodico-calcico. (4) Si riportano in tabella 2.1 le principali caratteristiche.

Tabella 2.1 - Tipologie di vetri inerti e loro caratteristiche. (4)

An overview of common glass types [11–14].							
Material	Composition (%Wt)	Advantages	Limitations	Applications	Young's Modulus (GPa)	Operating Temp. (°C)	Transparency (Wavelength)
Borosilicate	SiO_2 , 81% Na_2O , 3.5% Al_2O_3 , 2.5% B_2O_3 , 13%	Good chemical stability, low thermal expansion, and high hardness	Difficult to etch	Substrates for microfluidic devices	62.8	< 500	330–2500 nm
Soda Lime	SiO_2 , 81% Na_2O , 16% Al_2O_3 , 1% CaO , 5% SiO_2 , > 99.5%	Easy to fabricate, low melting temp., and ductile High optical	Low hardness, electrical and thermal resistivity	3D Printing	74	< 720	400–2500 nm

2.2.1.1 Vetro Borosilicato

Il vetro borosilicato è tra le tipologie di vetro più utilizzate per le sue caratteristiche di inerzia chimica e termica, quelli commercialmente noti sono Pyrex® e Duran®. Viene prodotto mediante sostituzione degli ossidi alcalini da parte dell'ossido di boro nel reticolo vetroso della silice, ottenendo così un vetro con un'espansione minore. Quando l'ossido di boro entra nel reticolo della silice, ne indebolisce la struttura (a causa della presenza di atomi di boro planari trivalenti) e ne abbassa considerevolmente il punto di rammollimento.

Presenta questa composizione chimica in percentuale peso (%wt) 70- 80%wt SiO_2 , 7-13%wt B_2O_3 , 4-8%wt ossidi di metalli alcalini (Na_2O e K_2O), 2-7%wt Al_2O_3 e 0-5%wt ossidi di metalli alcalini terrosi (CaO , MgO).

Considerando le caratteristiche fisiche i vetri boro-silicati hanno transizione vetrosa a 525°C e presentano una notevole resistenza agli sbalzi di temperatura (anche di 165°C , rispetto ai 55°C del soda-calcico) 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 temperatura. Tale caratteristica permette di fabbricare pentole e stoviglie da cucina resistenti agli shock termici. La presenza del Boro riduce la densità del Pyrex® (2.23 g/cm^3) rispetto ai vetri più comuni (soda-calcico) 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.

Considerando le applicazioni mediche, è ampiamente utilizzato come substrato per dispositivi microfluidici e come contenitore di sostanze chimiche.

2.2.1.2 Vetro Sodico-Calcico

E' la tipologia di vetro più comune ed è quello più facilmente riciclabile per via della molteplicità di volte in cui può essere rammollito e rifuso.

La sua composizione chimica è la seguente: 73-74%wt SiO₂, 13-14%wt Na₂O, 9-11%wt di CaO, 0.1-1.5%wt Al₂O₃, 0.2-4%wt MgO; possono essere presenti poi altri ossidi sottoforma di impurità come K₂O, Fe₂O₃ e TiO₂.

Considerando le caratteristiche fisiche presenta una temperatura di transizione vetrosa tra 564-573°C, densità 2.52-2.53 g/cm³, temperatura di fusione tra 1000-1040°C ed un coefficiente di espansione termica di $9-9.5 \cdot 10^{-6} K^{-1}$

Ha inoltre una buona resistenza chimica che lo rende adatto per la realizzazione di contenitori per sostanze chimiche e ha anche un 'ottima trasparenza. Il suo punto di forza è anche il costo, è tra i vetri più economici e questo lo rende una scelta conveniente per molte applicazioni comuni come: vetro da finestra, vetro per realizzare contenitori, recipienti e bottiglie mentre per l'ambito medico è utilizzato per la realizzazione di strumenti medici quali pipette e provette o componenti ottici di strumenti diagnostici.

2.2.2 Applicazioni mediche

Concentrandoci sulle applicazioni mediche del vetro inerte possiamo distinguere due classi di usi, una è relativa alla sperimentazione ovvero l'uso del vetro come contenitore o strumento per la ricerca biologica e fisiologica e in secondo luogo come mezzo di protezione per chi all'interno di un ospedale è soggetto a radiazioni o semplicemente come separatore tra due ambienti.

2.2.2.1 Vetro per la ricerca clinica

Nella ricerca clinica è diventato sempre più importante e fondamentale il rispetto del principio delle 3R, *Replacement, Refinement and Reduction* (sostituzione, affinamento e riduzione) e questo ha portato alla necessità di individuare modi e metodi alternativi per far procedere la ricerca clinica in maggior sicurezza e anche più rapidamente. Grazie alle ultime scoperte tecnologiche e all'avvento delle nanotecnologie sono nati i primi dispositivi di piccole dimensioni tramite i quali è possibile superare molti limiti della ricerca tradizionale e accelerare in termini di tempistiche e di campioni utilizzati. Sono nati quindi gli *Organ on a Chip* e i *Lab on a Chip* che si sono dimostrati una grande promessa nella diagnostica, nei test di farmaci, nella farmacologia e nelle scienze analitiche, sostituendosi alla ricerca su animale e rispettando così il principio delle 3R.

Organ-on-chip (OoC) è un chip multfluidico tridimensionale per colture cellulari 3-D che simula le attività, la meccanica e la risposta fisiologica di interi organi o sistemi di organi, rappresentando pertanto un modello in vitro di organo artificiale. OoC è oggetto di importanti ricerche nell'ingegneria biomedica, più precisamente nel campo dei *bio-MEMS*.

Tali sistemi integrano fluidica, elettronica, ottica e biosensori su chip di piccole dimensioni per combinare un microambiente ingegnerizzato con cellule umane, fornendo repliche economiche e precise della fisiologia umana, superiori agli studi preclinici precedenti.

I dispositivi *organ-on-chip* sono comunemente realizzati in PDMS, vetro e silicio. Tuttavia, il vetro è uno dei substrati preferibili e i motivi principali sono che il vetro è caratterizzato da un'elevata adesione cellulare, biocompatibilità, resistenza alla ri-sterilizzazione e bassa espansione termica. I due tipi di vetro comunemente utilizzati per i sistemi *OoC* sono il borosilicato e il Foturan. Il borosilicato come già detto in precedenza è resistente agli shock termici, con un elevato coefficiente di espansione termica. Il Foturan è utilizzato per creare strutture minuscole con tolleranze strette e con una rugosità di 1 μm . Il vantaggio superiore del vetro rispetto ad altri materiali è la sua trasparenza ottica infatti è possibile analizzare direttamente le colture cellulari tramite microscopia ottica.

Inoltre gli *OoC* realizzati in vetro si sono dimostrati utili per applicazioni a lungo termine, a differenza dei tradizionali sistemi di coltura in PDMS che peccano in stabilità a lungo termine. La possibilità di lavorare per lunghi periodi consente il monitoraggio per ampie durate temporali delle cellule, utile per lo studio dell'attività o della vitalità cellulare in risposta a determinati farmaci o fattori ambientali. Questa diversità è stata studiata e valutata da Funano et al. (5) in cui hanno osservato che le cellule legate ai substrati in vetro possono durare oltre una settimana, mentre le cellule attaccate ai substrati in PDMS durano solo alcuni giorni. Questo è dovuto al modulo di Young del substrato che ha una considerevole influenza sull'adesione cellulare, infatti lo spessore e il numero dei filamenti di actina formati dipendono proprio dalla rigidità del substrato. (4)

Lab-on-chip (LoC) è un dispositivo che integra in sé molteplici funzioni contemporaneamente che di norma vengono effettuate in laboratorio in maniera distinta e con tempistiche diverse. Il vantaggio quindi è che si possono svolgere tutte queste attività in un singolo chip che va da pochi millimetri a qualche centimetro quadrato di grandezza ed è capace di trattare volumi di fluidi estremamente piccoli, inferiori ai picolitri.

I *LoC* sono utilizzati per una varietà di applicazioni mediche, come la diagnosi precoce di malattie gravi e croniche. (4)

2.2.2.2 Vetro come mezzo di protezione

Oltre alle apparecchiature e strumentazioni in vetro, negli ospedali e nei laboratori clinici sono presenti molte vetrate, alcune sono destinate alla separazione degli ambienti, permettendo però al contempo la possibilità di osservare e assistere il paziente a distanza e altri deputati invece proprio a proteggere l'operatore che deve svolgere un'analisi che potrebbe mettere a rischio la sua persona.

Per i primi, deputati appunto a isolare i pazienti e separarli dal resto delle altre sale, sarebbe opportuno che fossero anche facili da pulire e igienizzare e perché no anche antibatterici per evitare e prevenire un possibile contagio nel caso in cui un paziente lo tocchi in prima persona o un medico o un parente in visita lo tocchi e porti all'interno della stanza qualche agente patogeno. L'ideale sarebbe che quindi il vetro fosse rivestito da una sostanza idrofobica, per far sì che la sua energia superficiale sia molto elevata e la polvere, la sporcizia o i microrganismi a contatto con esso scivolino via senza permanere su esso.

Per i secondi invece pensiamo alle radiazioni ionizzanti, ormai la maggior parte degli ospedali è provvista di aree dedicate ad alcune tipologie di esami che si fanno tramite l'ausilio di radiazioni, pensiamo alla TAC, alla risonanza magnetica e in ultimo anche alla PET. Le analisi di ultima generazione, in modo particolare quelle necessarie per individuare la presenza di un tumore, lavorano con l'utilizzo di isotopi radioattivi per *markare* la zona tumorale e renderla visibile e pertanto si ha l'esposizione a radiazioni ionizzanti.

Dunque con l'uso sempre più diffuso delle radiazioni ionizzanti in settori come la diagnostica medica e le terapie, segue la necessità di proteggere l'operatore dalle radiazioni utilizzando materiali innovativi e non pericolosi, che lo salvaguardino. Questi materiali sono cruciali per preservare la salute umana e l'ambiente dagli effetti dannosi delle radiazioni ionizzanti. Le proprietà uniche del vetro, tra cui l'alta densità, la bassa espansione termica e la struttura amorfa, lo rendono un candidato ideale per le applicazioni di schermatura dalle radiazioni. (6)

A titolo di esempio si riporta la Tomografia a Emissione di Positroni (PET) che è una delle ultime procedure utilizzate per l'*imaging* molecolare diagnostico.

Quando i positroni interagiscono con il corpo per produrre raggi gamma, la macchina PET rileva i fotoni, tuttavia gli operatori possono essere esposti a tali fotoni, ecco quindi che come detto prima è necessario un mezzo di separazione tra luogo in cui si effettua tale analisi e lo spazio in cui si trova l'operatore.

Uno dei materiali comunemente utilizzati come materiale di schermatura dalle radiazioni è il piombo, grazie alle sue eccellenti proprietà di protezione, la sua alta densità, il numero atomico elevato e gli isotopi stabili. Tuttavia il piombo, in modo particolare i residui di polvere di piombo, è molto pericoloso e nocivo e quindi è necessario individuare un materiale alternativo per schermare le radiazioni al fine di proteggere l'uomo e l'ambiente dagli effetti pericolosi delle radiazioni.

Nella ricerca condotta da M. Zubair et al. (7) sono stati investigati materiali ad alta densità e alto coefficiente di attenuazione lineare, come i vetri silicatici (contenenti BiO, BaO o PbO), utilizzando simulazioni mediante il metodo di Monte Carlo tramite MCNP 6 utilizzando come controllo i primi mezzi di protezione ovvero vetri con piombo, per individuare il miglior vetro alternativo senza piombo per proteggere l'operatore dai raggi gamma e determinando la dose assorbita a cui l'operatore può essere esposto. I risultati ottenuti hanno dimostrato come drogando il classico vetro di silice con BiO che ha la più alta densità e il più alto coefficiente lineare di attenuazione si presenta la più elevata probabilità di attenuare i fotoni e di ridurre le percentuali di fotoni trasmessi.

Dunque in campo medico il vetro si è dimostrato essere un materiale adatto per numerosi dispositivi grazie alle sue eccellenti qualità ottiche, buone proprietà isolanti, elevata stabilità superficiale ed elevata compatibilità con i solventi.

2.3 Biomateriali e Vetri Bioattivi

I biomateriali possono essere classificati in modi diversi in base alla loro natura chimica; i biomateriali possono essere metallici come ad esempio i metalli preziosi come l'oro, oppure il titanio e le leghe cobalto, cromo e molibdeno ampiamente utilizzate in campo ortopedico. Possono anche essere polimerici come il polimetilmetacrilato (PMMA), il silicone medicale, il polietilene ad elevatissimo peso molecolare, oppure ceramici, ad esempio l'allumina e la zirconia utilizzate soprattutto in campo dentistico o ancora vetrosi come i vetri bioattivi utilizzati come piccoli sostituti ossei e infine i compositi, solitamente una matrice polimerica arricchita da altre fibre polimeriche o particelle ceramiche. (8)

Si individuano, poi, altre 4 classi di biomateriali:

- a) **BIOINERTI:** materiali inerti, che non interagiscono con l'organismo, e una volta impiantati non reagiscono e non si modificano, l'organismo tuttavia si accorge di questo corpo estraneo e come tale lo incapsula in una capsula fibrotica e così perde la sua funzionalità.
- b) **BIOATTIVI:** Materiali reattivi, la cui superficie promuove legami chimici tra sé e il tessuto interessato.
- c) **BIORIASSORBIBILI:** materiali che dopo l'impianto vengono assorbiti o meglio integrati interamente dall'organismo e sostituiti da tessuto di neoformazione sano. Si riporta come esempio il PLA l'acido polilattico sempre più utilizzato nell'ingegneria tissutale.
- d) **BIOMIMETICI:** Materiali che hanno subito modifiche superficiali o funzionalizzazioni per "apparire" cioè mimare il tessuto originale.

Quando si parla di biomateriali, si parla di un lungo processo di ricerca scientifica che ha portato a nuove scoperte e innovazioni, si possono dunque identificare nel corso di un secolo di storia tre generazioni di biomateriali e una quarta nella quale stiamo vivendo, come schematizzato nella figura 2.3.

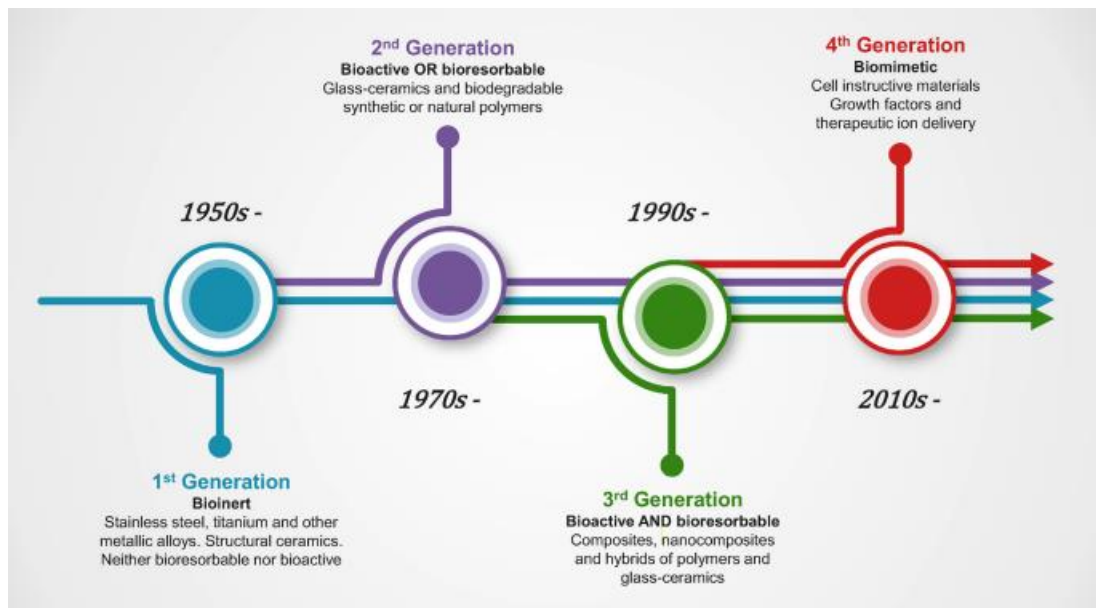


Figura 2.3 - Generazione dei biomateriali per la sostituzione, la riparazione e la rigenerazione del tessuto osseo (9)

La prima generazione si è concentrata sullo sviluppo di materiali con la più bassa reattività biologica cioè bioinerti, e gli obiettivi principali che si volevano risolvere erano il problema dell'usura e della frattura a fatica, quindi problemi prettamente strutturali e determinati dalle proprietà fisiche del materiale.

Alla fine degli anni 60 del novecento l'enfasi sulla bioinerzia inizia ad essere sostituito dal sempre più crescente interesse per il concetto di biointegrazione, nato quando il professor Larry Hench ha avviato una ricerca sistematica sul vetro bioattivo (BioGlass, BG), scoprendo che era possibile sintetizzare materiali inorganici in grado di suscitare attivamente la risposta desiderata in vivo, determinata dalla genesi di un forte legame tra l'osso e il materiale di neosintesi indotto da reazioni chimiche e biologiche che avvengono sulla sua superficie. Quindi la seconda generazione di biomateriali, è legata al concetto di "bioattività", capacità del materiale di "dialogare" con l'organismo, interagire e integrarsi con esso.

I BG sono stati sintetizzati in un'ampia gamma di composizioni, con proprietà fisico-chimiche e biologiche personalizzate a seconda delle esigenze. Tuttavia, i BG, come la maggior parte dei materiali inorganici vetrosi e ceramici, sono molto fragili per sopportare la maggior parte delle sollecitazioni a cui l'osso è soggetto e pertanto le sue applicazioni sono sempre limitate a porzioni ossee piccole e non soggette a carichi e sforzi meccanici elevati.

Durante la seconda generazione di biomateriali, non solo i vetri vennero analizzati con grande entusiasmo, ma anche i polimeri grazie ai progressi nella chimica che hanno portato allo sviluppo di nuove strutture polimeriche con un comportamento meccanico e di degradazione controllabile in condizioni fisiologiche. Si riporta come esempio l'introduzione della sutura biodegradabile Dexon® (acido poli(glicolico) PGA) i polimeri biorisorbibili sono ampiamente utilizzati in ortopedia e traumatologia come dispositivi per la riparazione delle fratture, ma anche nell'industria farmaceutica come dispositivi per la somministrazione di farmaci.

Tuttavia, i polimeri bioassorbibili presentano ancora alcuni svantaggi nella pratica clinica, si possono rompere durante l'inserimento dell'impianto e i loro prodotti di degradazione possono causare reazioni da corpo estraneo e quindi la nascita di un processo infiammatorio per poi arrivare ad una cronicizzazione dell'infiammazione, probabilmente a causa della natura acida dei sottoprodotti.

Le limitazioni dei biomateriali di seconda generazione sono state superate con lo sviluppo di una terza generazione di biomateriali, che si pone come obiettivi quelli della rigenerazione funzionale del tessuto e comprende materiali che sono contemporaneamente sia bioattivi che biorisorbibili.

Le proprietà di bioattività e biodegradabilità hanno iniziato a essere combinate insieme in strutture composite per superare le limitazioni dei biopolimeri e delle bioceramiche considerate separatamente, al fine di soddisfare il complesso e interconnesso insieme di requisiti dell'ingegneria tissutale, evolvendosi da materiali sostitutivi ossei a materiali per la rigenerazione ossea.

Nascono così i materiali compositi, compositi organici/inorganici preparati disperdendo una fase particolare bioattiva in una matrice polimerica. I compositi che nella fase dispersa contengono particelle di BG per esempio raggiungono una delle migliori approssimazioni delle proprietà meccaniche dell'osso offrendo contemporaneamente bioattività, osteoconduttività, effetto angiogenico, attività antibatterica e osteostimolazione. La matrice polimerica, d'altra parte, fornisce alta resilienza e lavorabilità, consentendo la lavorazione termoplastica in forme complesse. La combinazione di polimeri biorisorbibili e BG in compositi ha iniziato ad essere investigata circa 20 anni fa ed è stata introdotta come una strategia promettente per bilanciare le carenze dei materiali presi singolarmente, creando interazioni benefiche in termini di miglioramento delle proprietà meccaniche (ad esempio, il BG fragile bilancia la mancanza di rigidità dei poliesteri) e biocompatibilità.

Infine la quarta generazione che ha avvio a partire dal primo decennio del ventunesimo secolo ed è tutt'ora in evoluzione, si pone come obiettivo quello di realizzare materiali biomimetici, traendo ispirazione dalla natura. I materiali biomimetici sono spesso definiti intelligenti, in quanto immunologicamente inerti e in grado non solo di sostituire il tessuto originario, ma anche di scambiare segnali con le cellule dell'ospite. (10) (9)

2.3.1 Bioattività

Concentrandosi sui materiali bioattivi, come detto poc'anzi essi inducono attivamente una risposta specifica da parte dell'organismo, e sono in grado di generare interazioni di tipo chimico e fisico con il sito o tessuto in cui è collocato.

Presentano un comportamento intermedio tra materiali bioinerti e biorisorbibili e creano un'interfaccia compatibile con il tessuto circostante, dialogando con esso.

La bioattività può essere misurata in funzione del tempo impiegato dal materiale a formare un legame con l'interfaccia.

Il parametro caratteristico è l'*Indice di bioattività*

$$I_B = \frac{1000}{t_{0,5bb}}$$

Dove $t_{0,5bb}$ è il tempo necessario affinché il 50% della superficie dell'impianto sia legato al tessuto. (2)

2.3.2 Vetri Bioattivi

Analizzate le varie classi e categorie di biomateriali, nel corso del paragrafo successivo focalizziamo l'attenzione sui vetri bioattivi, quindi quei materiali sintetici che si è scoperto essere in grado di legarsi con tempistiche abbastanza brevi al tessuto osseo.

Il meccanismo di rigenerazione del tessuto osseo è determinato dalla degradazione della porzione più superficiale dei vetri che reagendo con i fluidi biologici produce idrossiapatite e nel contempo favorisce il rilascio di ioni, calcio e potassio per incoraggiare la proliferazione delle cellule ossee, garantendo l'osteogenesi e l'angiogenesi. Dunque il BG si integra con il tessuto e forma con esso un saldo legame in cui lo strato di idrossiapatite (HAp) funge da interfaccia tra i due.

2.3.2.1 Metodi di produzione

Per la produzione dei vetri bioattivi vi sono due metodi, uno convenzionale chiamato *melt and quencing* e uno alternativo di tipo chimico (sol-gel)

Il primo metodo prevede la miscelazione di polveri di ossidi in forni ad elevate temperature (1100-1400°C), contenute in crogioli di materiale alto fondente come il platino. Successivo alla fusione è il processo di tempra del fuso in acqua oppure di ricottura in stampi in ottone sempre ad alta temperatura, ma inferiore a quella di fusione.

Il processo alternativo sfrutta la transizione sol-gel a temperatura ambiente, prevede tre fasi principali: la preparazione della soluzione contenente il precursore che rappresenta la fase sol, poi la gelificazione del sol tramite una reazione di idrolisi, e infine una fase di invecchiamento che prevede la rimozione di solventi e sali attraverso un trattamento termico a 600-700 °C che ne determina anche una stabilizzazione strutturale.

Il processo sol-gel consente un maggiore controllo fisico e chimico del prodotto finale, e quindi un migliore controllo della microstruttura, dell'omogeneità e delle dimensioni delle particelle. Inoltre, la microporosità e l'elevata superficie specifica dei vetri derivati dal metodo sol-gel stimolano una rapida dissoluzione e una formazione accelerata di HA_p sulla superficie del vetro. (2)

2.3.2.2 Tipologie di vetri Bioattivi (Hench-Kokubo-Beall)

I vetri bioattivi possono essere di tre categorie, base silice, con un contenuto di questo ossido quasi del 50% oppure base boro con presenza di B₂O₃, oppure base fosforo.

In questa sezione ci concentriamo sui vetri bioattivi base silice, con un contenuto di questo ossido di circa il 60%, a cui si aggiungono ossidi modificatori di reticolo come Na₂O, CaO e P₂O₅ con elevato rapporto CaO/ P₂O₅

Esistono 3 tipologie di vetri bioattivi a base silice, che prendono nome dai loro ricercatori:

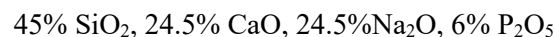
1. CLASSE DI HENCH
2. CLASSE DI KOKUBO
3. CLASSE DI BEALL

Tre tipologie che si differenziano per il meccanismo di bioattività e di composizione.

1. CLASSE DI HENCH

Pioniere dei biovetri, la scoperta di questi materiali è dovuta proprio a lui.

La composizione del primo vetro, commercialmente noto come Bioglass®, o 45S5 è la seguente:



Il meccanismo di bioattività è descritto nei 5 stage successivi rappresentati nella figura 2.4:

STAGE 1: Scambio ionico tra ioni modificatori del vetro Ca²⁺ e Na⁺ e ioni idrogenione H⁺, presente nei liquidi fisiologici che più correttamente si dovrebbero indicare con H₃O⁺.

STAGE 2: A seguito di questo scambio ionico si verifica un aumento del pH che rende l'ambiente più aggressivo tanto da provocare il rilascio in soluzione di Si⁴⁺ e la formazione in superficie di silanoli (Si-OH)

STAGE 3: Si ha la condensazione dei silanoli tra di loro con la formazione del gel di silice amorfa, ovvero Si-O-Si, con ossigeno pontante. I silanoli presenti in superficie possono condensare tra di loro in quanto hanno gli OH, cioè possono condensare creando una molecola di acqua e formando una

struttura silicio-ossigeno; dunque si riforma la silice con rilascio di una molecola d'acqua che intrappola la silice e si crea lo strato gelatinoso di silice.

STAGE 4: Si verifica la migrazione degli ioni Ca^{2+} e HPO_3^{2-} dal fluido al gel di silice; essi penetrano nel gel di silice e si forma uno strato amorfo ricco di calcio e fosforo.

STAGE 5: Infine gli ioni Ca^{2+} e HPO_3^{2-} che inizialmente sono organizzati in maniera disordinata, piano piano si riorganizzano e si forma uno strato ordinato e compatto che non è più amorfo, ma crea uno strato di HAp.

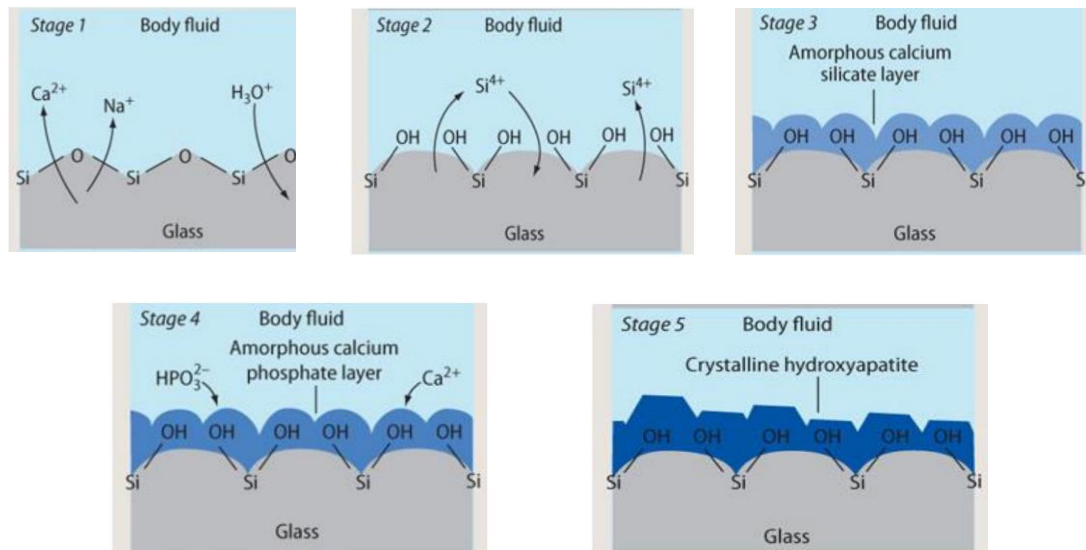


Figura 2.4 - Rappresentazione schematica dei 5 stage del processo di bioattività per la classe di vetri bioattivi di Hench. (11)

In vivo, durante gli STAGE 3 e STAGE 4, il gel di silice attira anche cellule, macrofagi e fattori di crescita che trovano una superficie compatibile su cui aderire e proliferare. Le cellule progenitrici lasciano poi lo spazio agli osteoblasti che generano la matrice ossea che con il tempo calcifica e diventa osso.

Nella figura 2.5 è rappresentato l'andamento delle concentrazioni di Si, Ca, e P in funzione della distanza tra sito dell'impianto del vetro e osso, quindi si analizza cosa accade all'interfaccia e possiamo osservare che, avvicinandosi all'osso si ha inizialmente una crescita della Si, e una riduzione di Ca in quanto quest'ultimo viene rilasciato per formare i primi strati amorfi, P invece resta costante; poi in seguito, nel layer di nuova formazione si ha un' inversione di tendenza, si riduce la quantità di Si e aumentano Ca e P, componenti principali dell'osso.

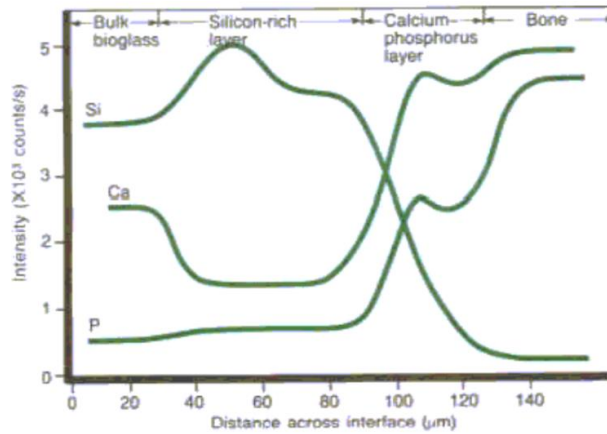


Figura 2.5 - Andamento delle concentrazioni di Si, Ca e P all'interfaccia tra vetro e osso (11)

Dunque la silice e gli ioni rilasciati dal vetro innescano un meccanismo di differenziamento cellulare e la generazione di nuova matrice ossea, il biovetro infatti viene rivestito da osso di neo-formazione. Questo meccanismo è definito osteoinduttivo.

Un materiale è definito osteoinduttivo se è in grado di inviare segnali, ovvero stimolare in maniera attiva l'organismo, in questo contesto, la formazione di nuovo osso a partire dallo stesso materiale ospite, si verifica quindi un rimodellamento stimolato.

Il concetto di osteoinduttivo, si contrappone invece a quello di osteoconduttivo; un materiale è definito tale se fa da superficie di base per l'ancoraggio di cellule, ovvero fa da supporto per la colonizzazione di cellule che proliferano su esso e si differenziano in nuovo osso, ma in questo caso si parla di una superficie con ottime proprietà di adesione e chimicamente simile a quello che viene sostituito, e si parla dunque di rimodellamento fisiologico, e appartiene a questa classe l'idrossiapatite. (11)

2. CLASSE DI KOKUBO

Kokubo realizza invece un vetro-ceramico, sempre a base di SiO_2 , noto come Cerabone® realizzato tramite trattamenti termici che portano alla vetrificazione con nucleazione di fasi cristalline.

E' anche noto come vetro-ceramico A/W, dalle iniziali delle fasi cristalline che vi nucleano, Apatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{F}_2, \text{O})$ e Wollastonite (CaSiO_3).

La composizione percentuale è 38% di Apatite e 24% di Wollastonite e la restante percentuale è fase amorfa.

Si arriva alla genesi di questo vetroceramico perché la presenza della Wollastonite conferisce al materiale migliori proprietà meccaniche del vetro di Hench, mentre l'apatite gli garantisce la peculiarità di essere osteoconduttivo.

Si differenzia dal Bioglass® perché manca come ossido modificatore, l'ossido di sodio e, per via della sua composizione, presenta un duplice meccanismo: è sia osteoinduttivo per la presenza della fase amorfa che osteoconduttivo per l'apatite, come accennato poc'anzi.

In questo caso il meccanismo di bioattività è caratterizzato da 4 STEP:

STEP1: Dissoluzione di Ca^{2+} , dal vetro-ceramico ai fluidi biologici, con conseguente aumento del pH. In questo caso la dissoluzione di ioni calcio è più lenta, perché vi è una concentrazione maggiore di CaO nel vetro-ceramico.

STEP2: Migrazione di ioni idrogenioni sulla superficie del vetro-ceramico e formazione dei silanoli in superficie, ma sono in quantità inferiore e quindi non si ha la formazione del gel di silice. I silanoli

costituiscono siti preferenziali per la precipitazione e la crescita dell'apatite in quanto grazie alla loro carica dovuta alla polarizzazione del legame richiamano ioni dalla soluzione che arrivano per differenza di concentrazione.

STEP3: Afflusso di ioni Ca^{2+} e PO_4^{4-} che sono attratti dagli $-\text{OH}$ dei silanoli.

STEP4: Nucleazione dei cristalli di idrossiapatite, che avviene direttamente sui silanoli.

In questo caso la bioattività è consentita dal rilascio di ioni presenti nella fase amorfa residua. A differenza del Bioglass® ha proprietà meccaniche migliori per via della presenza di apatite e Wollastonite, ha anche energia di frattura maggiore. Inoltre tale tipologia ha un'integrazione più lenta perché si ha un minore rilascio ionico di Ca^{2+} , ma nel tempo l'ancoraggio è reso più stabile. (11)

3. CLASSE DI BEALL

Questa terza classe ideata da Beall, nasce con l'intenzione di realizzare dei materiali vetro-ceramici con caratteristiche meccaniche più importanti, ma allo stesso tempo più facilmente lavorabili all'utensile.

La migliore lavorabilità è data dall'aggiunta nella miscela di polveri di mica ($(\text{Na,K})\text{Mg}_3(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})\text{F}_2$).

I vetro-ceramici di questa classe sono commercialmente noti come Bioverit e ne esistono di tre tipologie i primi due sono Bioverit I e Bioverit II e presentano questa composizione in percentuale peso:

30.5% SiO_2 , 15.9% Al_2O_3 , 14.8% MgO , 14.4% CaO , 11.4% P_2O_5 , 2.3% Na_2O , 5.8% K_2O , 4.9% F.

La mica che contiene allumina, conferisce al biovetro una maggiore e migliore stabilità e resistenza meccanica, inoltre si riduce la percentuale di silice, e si aumenta la percentuale di NaO che lo rende più riassorbibile e di P_2O_5 . Questa composizione vede, nel vetroceramico, la nucleazione contemporanea di mica e apatite.

Nelle versioni successive del Bioverit, si è ridotta la percentuale di SiO_2 e aumentata la percentuale di P_2O_5 allo scopo di formulare un vetroceramico che fosse privo di silice, composto estraneo all'organismo. In questo modo si va a prediligere un meccanismo osteocunduttivo dovuto alla presenza dell'apatite come fase cristallina rispetto al meccanismo osteoinduttivo.

Questo è l'inizio della fase di passaggio da vetri base Silice a vetri base Fosfato con la nascita di Bioverit III. (11)

2.3.2.3 BIOGLASS® 45S5

Larry Hench, ricercatore all'Università della Florida dove studiava speciali vetri a base di fosforo e vanadio pensati per l'elettronica e capaci di resistere alle radiazioni ad alta energia, è il pioniere della moderna scienza dei biomateriali. Era l'estate del 1967, quando, per caso, si ritrova ad essere l'inventore del primo vetro bioattivo. In quel periodo incontrò un colonnello dell'esercito degli Stati Uniti durante un viaggio in autobus per la Conferenza sulla Ricerca di Materiali dell'Esercito degli Stati Uniti. Il colonnello, che aveva subito molte amputazioni, chiese a Hench perché, se gli scienziati che erano in grado di creare materiali in grado di resistere a radiazioni ad alta energia non erano in grado di produrre materiali capaci di resistere all'ambiente biologico del corpo umano. Infatti, all'epoca, nella maggior parte dei casi per i soldati, l'amputazione degli arti era l'unica opzione. Pertanto, Hench iniziò dapprima nel campo della medicina, per capire da cosa fosse costituito l'osso e si rese conto che l'osso era costituito da una componente inorganica a base di calcio e fosforo, chiamata idrossiapatite, che conferisce all'osso la sua tipica durezza e rigidità. Lui da ingegnere conosceva l'idrossiapatite in termini di fosfato di calcio e quindi appartenente alla famiglia dei materiali ceramici e così si rese conto, che l'osso era un materiale ceramico vivente.

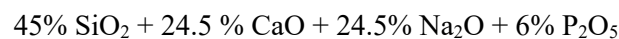
Capì quindi che il segreto per la realizzazione di un biomateriale che potesse essere compatibile con i fluidi biologici e garantire anche la rigenerazione ossea stava proprio nell'idrossiapatite. L'idea era

quindi quella di trovare un materiale che una volta impiantato nell'organismo e in contatto con i fluidi biologici potesse produrre idrossiapatite, e riconosciuto successivamente dall'organismo come parte di sé, l'impianto si poteva poi legare all'osso e integrarsi con esso.

Nel 1968 con grande fortuna ottenne i fondi necessari per avviare il suo progetto, e scelse come materiale su cui fare ricerca il vetro.

Il vetro presentava un grande vantaggio, poichè essendo un materiale amorfo è possibile modificare la sua composizione inserendo quasi qualsiasi tipo di elemento e dosando in modo opportuno la miscela di materie prime da fondere è possibile ottenere vetri molto attivi. Hench aveva bisogno che il suo vetro oltre ad essere reattivo contenesse anche calcio e fosforo, elementi principali dell'idrossiapatite. Nella realizzazione del suo vetro decise di partire proprio da questi due elementi calcio e fosforo, oltre che silice, e poichè la temperatura di fusione per fondere la silice è di oltre 1700°C e siccome nei laboratori dell'epoca non era possibile raggiungere quelle temperature, aggiunse come additivi detti "fondenti" il carbonato di sodio e carbonato di calcio, in maniera tale da abbassare la temperatura di fusione. Quindi Hench abbassò il contenuto di silice, aumentò quello del carbonato di sodio, aggiunse anche il carbonato di calcio e aggiunse infine una materia prima per conferire al vetro un certo tenore di fosforo. (12)

Questa è la composizione percentuale in peso utilizzata da Hench per realizzare il primo vetro bioattivo chiamato 4525 Bioglass®:



Nel 1970 Hench diede il suo vetro al collega Ted Greenlee per impiantarli nel femore di un ratto, e il risultato fu sorprendente il collega scoprì che i campioni di 45S5 si erano ancorati all'osso, era la prima volta che un materiale accanto alla biocompatibilità manifestava anche bioattività.

Da quel momento in avanti Hench si occupò esclusivamente di biomateriali.

2.3.4 Applicazioni mediche

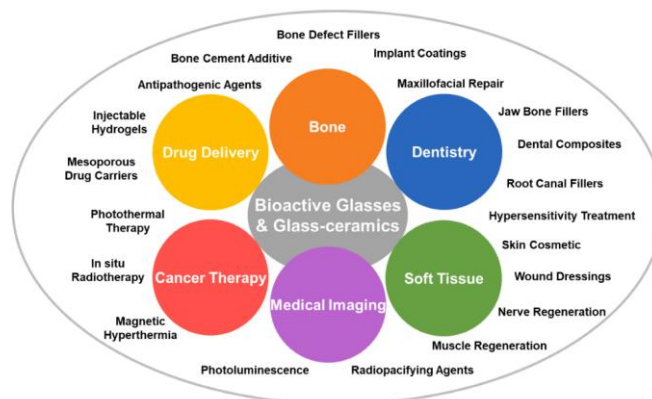


Figura 2.6 - Rappresentazione grafica delle diverse applicazioni dei vetri bioattivi e vetro-ceramici (2)

Finora abbiamo parlato dei vetri bioattivi in relazione alla loro intrinseca bioattività, ovvero capacità di rivestirsi di idrossiapatite e partecipare attivamente alla rigenerazione ossea, tuttavia negli anni gli scienziati hanno ampliato le loro applicazioni anche al di fuori della rigenerazione dei tessuti duri, mostrando morfologie, applicazioni e composizioni multiple in cui la conversione in idrossiapatite non era più l'unico fattore determinante. Ricerche successive hanno portato alla scoperta che i vetri bioattivi sono utili anche nella rigenerazione dei tessuti molli e sulla guarigione delle ferite grazie alla loro capacità di stimolare l'*up-regulation* genico.

Si passa dunque dalla sola di idea di applicare i biovetri nell'*Hard Tissue*, ovvero come sostituto osseo, al *Soft Tissue*, cioè alla rigenerazione di tessuti molli ricchi di collagene.

Nel 1981 la Dottoressa Wilson (12) scoprì che il 45S5 appena inventato da Hench era in grado di legarsi anche ai tessuti come la cartilagine e le gengive. Il merito era di nuovo dell'idrossiapatite che si formava superficialmente e su cui attecchiva il collagene, abbondante nei tessuti connettivi. Fu questa scoperta che nel 1984 portò alla prima vera applicazione commerciale del Bioglass® “Bioglass® Ossicular Reconstruction Prosthesis”, come sostituzioni degli ossicini dell'orecchio medio.

Altre applicazioni mostrano dati preliminari promettenti per dispositivi basati su vetri bioattivi nell'ambito della rigenerazione di nervi/muscoli, somministrazione di farmaci e terapie contro il cancro

Se si modifica la composizione dei vetri bioattivi aggiungendo elementi della tavola periodica di Mendeleev in corrette concentrazioni e rapporti si possono conferire al materiale diverse caratteristiche desiderabili per stimolare differenti processi biologici ed essere quindi utili in diversi campi applicativi.

Nella figura 2.7 infatti è rappresentata la tavola periodica e ciascun elemento è colorato di un colore diverso in funzione dell'attività che promuove. Elementi osteogenici come lo stronzio (Sr) possono contribuire alla segnalazione di proteine per sopprimere l'attività osteoclastica o promuovere la ricrescita ossea da parte degli osteoblasti, lo Sr infatti è in grado di attivare il recettore del Ca negli osteoblasti (13)

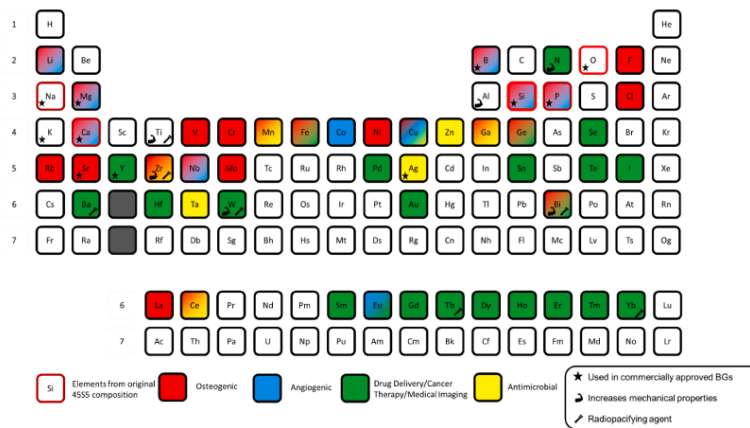


Figura 2.7 - Tavola periodica degli elementi usati nei vetri bioattivi, evidenziati in colori diversi in funzione delle proprietà strutturali e biologiche che possiedono (2)

Elementi angiogenici come il rame (Cu) aiutano nella ri-epitelizzazione, nella formazione di matrici extracellulari e nella nuova genesi di vasi sanguigni danneggiati. Alcuni elementi invece hanno dimostrato di fornire effetti terapeutici contro le cellule tumorali, oppure sono stati utilizzati per aiutare nell'*imaging* medico attraverso effetti di fotoluminescenza. Infine, diversi metalli, in primis l'argento (Ag), ma anche lo zinco (Zn) hanno dimostrato di agire come agenti antipatogeni, aiutando a prevenire la crescita di batteri gram-positivi e gram-negativi, virus e funghi. Gli ioni metallici di questi elementi sono in grado di uccidere i microrganismi attraverso diversi meccanismi, tra cui la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Particolarmente interessanti e all'avanguardia sono le ricerche nel campo delle applicazioni per sconfiggere il cancro, sia in aiuto alla terapia fototermica, sia magnetotermica che con somministrazione locale di farmaci antitumorali. Riporto di seguito alcuni esempi che ho ritenuto particolarmente significativi.

Il rame e il bismuto sono elementi biologicamente attivi, con proprietà di conversione fototermica e per questa ragione sono stati incorporati nei vetri bioattivi, che vengono utilizzati nella terapia fototermica, perché assorbendo la luce nel vicino infrarosso (NIR), la convertono in calore che va a danneggiare le cellule cancerose. Figura 2.8 (14)

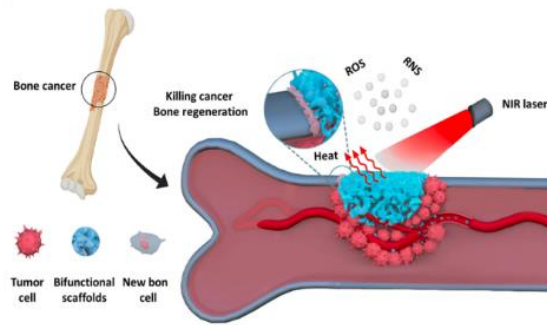


Figura 2.8 - Applicazione del vetro bioattivo nella terapia foto-termica (14)

Inoltre i vetri mesoporosi bioattivi (MBG) possono trattare in modo più mirato i tumori, in quanto nelle loro porosità intrinseche è possibile caricare e controllare il rilascio di farmaci. I sistemi emergenti di somministrazione di farmaci tramite MBG sono basati sul rilascio controllato in risposta al pH e sono progettati per potenziare selettivamente la chemioterapia di farmaci basati sulla differenza di pH tra i tessuti normali e quelli cancerosi. Figura 2.9 (14)

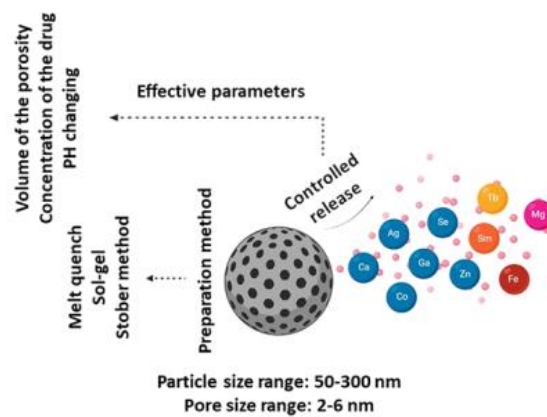


Figura 2.9 - Processo di rilascio controllato di molecole terapeutiche da un vetro mesoporoso bioattivo (14)

3. PROPRIETA' ANTIBATTERICHE

Negli ultimi 20 anni il tema dell'antibiotico resistenza ha destato molto clamore, l'antibiotico resistenza è quel meccanismo che si origina a seguito dell'utilizzo smodato e in certi casi non corretto degli antibiotici, che non sono più in grado di uccidere alcuni ceppi batterici che si sono evoluti e sono in grado di resistere alla loro azione, provocando così un'infezione sempre più aggressiva all'interno dell'organismo.

Per questo motivo i ricercatori e gli scienziati di tutto il mondo hanno iniziato a cercare un'alternativa agli antibiotici, individuando materiali o proprietà dei materiali che potessero sostituirsi o integrarsi con quelli da sempre utilizzati, ma che avessero un potere antibatterico intrinseco aiutando a risolvere la grave problematica dell'antibiotico resistenza. (15)

I batteri in microbiologia, sono un regno comprendente microrganismi unicellulari, le loro dimensioni sono solitamente dell'ordine di pochi micrometri. I batteri si possono distinguere in due classi Gram-positivi (G+) e Gram-negativi (G-) dal nome della tecnica colorimetrica che ne permette la distinzione. La colorazione di Gram è una delle metodologie più utilizzate e si basa sulla distinzione delle caratteristiche della parete batterica. I batteri G+ presentano una spessa parete cellulare il cui lato esterno è costituito da un voluminoso strato di peptidoglicani (20-80 nm di spessore) che se soggetti alla colorazione di Gram risultano di un color blu/viola, mentre i batteri 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-(figura 3.1); il colorante non è in grado quindi di raggiungere questo strato e di conseguenza i batteri risultano di colore rosso.

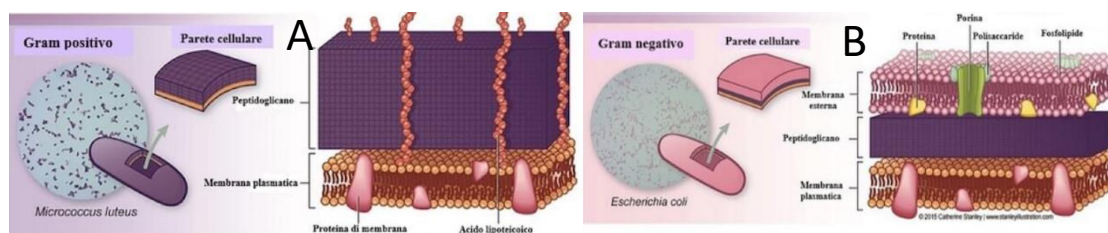


Figura 3.1 - Rappresentazione di un batterio Gram + (A), e Gram - (B), con dettaglio della parete cellulare. (15)

Gli antibiotici possono svolgere un'attività batteriostatica, cioè bloccare la proliferazione del batterio, impedendogli di aggregarsi e formare poi il biofilm ancora più difficile da attaccare, oppure un'attività battericida, ovvero uccidere direttamente il batterio.

La modalità d'azione nel primo caso è quello di interferire sul "quorum sensing", che è il meccanismo con cui i batteri "dialogano" tra loro e permette loro di auto-organizzarsi e proliferare, nel secondo caso l'azione è di tipo fisica ovvero l'antibiotico agisce direttamente sulla parete del batterio, penetra in esso colpendo gli acidi nucleici e gli enzimi cellulari.

Considerando i biomateriali impiantabili, in modo particolare per il campo ortopedico e dentistico, l'antibiotico resistenza potrebbe causare un fallimento dell'impianto, di qualunque materiale esso sia, perché se si crea un'infezione e l'antibiotico non è in grado di sconfiggerla, l'infezione determina il richiamo di macrofagi e citochine che mettono in allerta l'organismo e portano alla generazione della capsula fibrotica attorno al materiale impiantato, rischiando così un suo scollamento settico.

L'alternativa all'utilizzo degli antibiotici è quello di lavorare sulle superfici dei biomateriali in modo da renderle antimicrobiche. Le superfici così modificate possono essere distinte in due categorie, in funzione dell'effetto che producono sul microrganismo:

- Superficie antiadesive (anti-biofouling): superfici che impediscono l'adesione dei patogeni ostacolando la formazione di una colonia batterica;
- Superficie antimicrobiche: il loro meccanismo di azione entra in gioco solo successivamente all'adesione. Si distinguono due classi: superficie antimicrobiche batteriostatiche, ovvero che non permettono la proliferazione dei batteri adesi alla superficie o battericide, che inducono la morte del patogeno.

3.1 Tipologie di superficie antibatteriche

Esistono diverse tecniche per la realizzazione di superfici che rendono il biomateriale intrinsecamente antibatterico, per ottenere questo effetto si lavora su modifiche chimiche e fisiche delle superfici. È stato appurato che alcune molecole e particolari morfologie impediscano l'adesione batterica; in particolare, è possibile ricreare delle topografie che mimano quelle naturali osservate su piante e animali che mostrano un notevole potere antibatterico. (16)

3.1.1 Superficie antimicrobiche

L'effetto battericida 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 dei materiali impiantandovi specie chimiche di nota tossicità contro questi microrganismi. Considerando la topografia, in natura numerosi sono gli esempi da cui trarre ispirazione, per esempio le ali di alcuni insetti (libellula, farfalla ecc..) che presentano scarsa suscettibilità all'attacco batterico. 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 infatti un pattern costituito da *nanopillar*, piccole strutture nanometriche, di diverse geometrie e distribuzioni superficiali, come è esemplificato nella figura 3.2. (16) 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*.

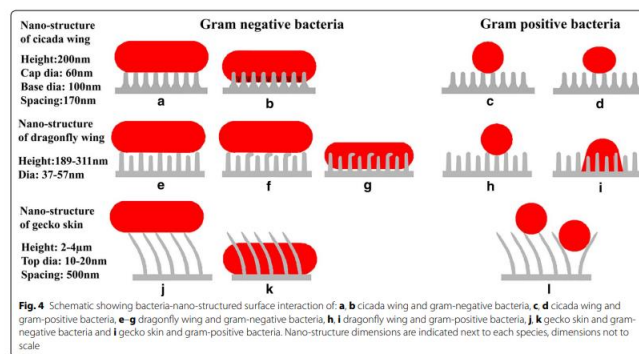


Figura 3.2 - Rappresentazione schematica delle interazioni di batteri Gram-positivi e Gram-negativi con le nanostrutture presenti su ali di cicala (a-d), ali di libellula (e-i) e pelle di gecko (j-l). (2)

Il secondo metodo per rendere una superficie antimicrobica è la funzionalizzazione superficiale del materiale con ioni o molecole terapeutiche che uccidono i batteri interagendo con i suoi pathway metabolici. I meccanismi di funzionalizzazione possono essere l'aggraffaggio chimico, l'aggiunta nel bulk di un additivo chimico oppure la deposizione di un monostrato autoassemblato (*Self Assembly Monolayer, SAM*). L'aggiunta di queste sostanze interagiscono con il batterio e con il suo ciclo vitale portandolo all'apoptosi, oppure interferendo con il *quorum sensing*, impedendogli di aggregarsi.

Uno tra gli elementi più noti per il suo effetto antibatterico è l'argento, in modo particolare il suo ione Ag^+ . Gli ioni, infatti, hanno un'elevata affinità per i gruppi elettrondonatori, come i gruppi sulfidrilici, amminici, imidazolici, fosfatici e carbonilici, ampiamente presenti sulle membrane cellulari o sulle proteine. Gli ioni d'argento infatti possono legarsi ai gruppi tiolici (ASH) delle proteine formando legami stabili ASHAg, che possono alterare la struttura tridimensionale delle proteine e bloccare i siti di legame attivi, come si vede nella figura 3.3. Pertanto, gli ioni d'argento sono in grado di compromettere il trasporto e il rilascio di ioni potassio (K^+) dalle cellule microbiche e di bloccare la sintesi di ATP. Inoltre, gli ioni d'argento possono facilmente coordinarsi con un'ampia gamma di altre biomolecole, come DNA, RNA e peptidi, formando composti insolubili e ostacolando così la divisione e la riproduzione cellulare. (17)

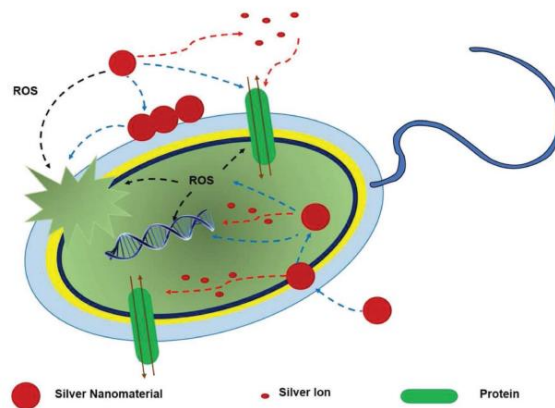


Figura 3.3 - Meccanismo d'azione antibatterica di nanomateriali in argento (17)

3.1.2 Superficie antiadesive

Le superfici antiadesive sono caratterizzate, invece, da una bassa energia superficiale che fa sì che qualunque cosa si depositi su di essa viene allontanata, ecco perché sono anche definite autopulenti. Per ottenere superfici a bassa adesione si può sfruttare la topografia microscopica tipica di alcune superfici superidrofobiche presente in natura. Ne sono un esempio le foglie di loto, figura 3.4 capaci di allontanare efficacemente l'acqua dalla loro superficie formando con questa un angolo di contatto statico elevato.



Figura 3.4 - Foglia di loto (15)

La misura dell'angolo di contatto statico è la misura quantitativa più rapida che si può effettuare per dire se la superficie è antiadesiva. Tramite la sua misura infatti si possono distinguere superfici superidrofiliiche (sWCA compreso tra 0° e 10°), idrofiliiche (sWCA compreso tra 10° e 90°), idrofobiche (sWCA compreso tra 90° e 150°) e superidrofobiche (sWCA $> 150^\circ$). In figura 3.5 si riporta uno schema delle classi di bagnabilità.

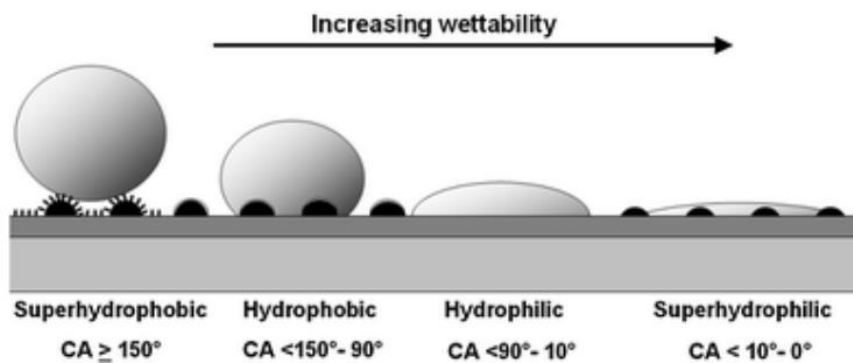


Figura 3.5 - Rappresentazione delle classi di bagnabilità da sinistra a destra in ordine di decremento dell'angolo di contatto e quindi di aumentata idrofilia. (15)

Un'altra misura d'interesse è quella dell'isteresi dell'angolo di contatto (*contact angle hysteresis*, CAH), figura 3.6, 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).

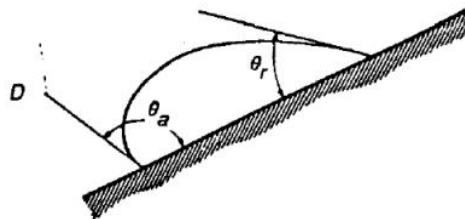


Figura 3.6 - Angolo di isteresi, dettaglio dell'angolo di avanzamento θ_a e retrocessione θ_r . (15)

3.2 Vetri con proprietà antibatteriche

Dunque l'effetto battericida può essere trasferito sulla superficie dei materiali progettandole con geometrie particolari con una combinazione ottimale dei parametri di altezza e larghezza dei *nanopillar*. Le tecniche utilizzate per replicare queste topografie particolari sono la litografia soft, la litografia a fascio di elettroni, litografia a raggi x e molte altre ancora; tecnologie innovative utilizzate proprio per conferire alle superfici proprietà nano-strutturate.

Interessante e innovativa è la litografia a nanorilievo (NIL), è una forma di litografia a contatto che utilizza uno stampo per duplicare nano-strutture specifiche sulla superficie di un substrato. Uno strato di polimero liquido, noto come "*resist*", viene posto sulla superficie del substrato e premuto meccanicamente con il calco del pattern che si vuole trasferire, lasciando un'impronta nel substrato. Una volta rimosso lo stampo, il substrato può sottoposto a incisione ionica reattiva (RIE).

Questo procedimento è stato sfruttato per la replica nano-strutturata delle ali della libellula su substrati in silicio, vetro e polietilentereftalato (PET) a cui si è aggiunto inoltre anche un rivestimento fluorurato con la tecnica SAM. (16)

Considerando invece la funzionalizzazione chimica della superficie del vetro di particolare interesse sono le nanoparticelle, per esempio quelle di argento. Poiché la superficie della silice termina con gruppi silossanici (-Si-O-Si-) con atomi di ossigeno sulla superficie e gruppi silanolicci (-Si-OH), la silanizzazione è una delle tecniche più comunemente utilizzate per la modifica della superficie della silice, dove il gruppo funzionale di superficie desiderato può essere regolato utilizzando diversi tipi di polimeri organici, chiamati organosilani. Alcuni esempi includono l'uso di amminosilano e mercaptosilano. (18)

Agnihotri et al. (18) hanno immobilizzato nanoparticelle d'argento su una superficie di silice funzionalizzata, che potrebbe rivelarsi un promettente materiale antimicrobico sia contro i ceppi batterici Gram-positivi che Gram-negativi. La superficie antibatterica studiata si basa su un substrato di silice funzionalizzato con ammina, utilizzando il 3-(2-amminoetilaminopropil)trimetossisilano (AEAPTMS) come molecola reticolante, su cui sono state ancorate/immobilizzate nano-particelle d'argento. Per l'innesto di gruppi amino-funzionali sulla superficie del vetro, è stata adottata una procedura di silanizzazione in cui i silanoli (Si-OH) sulla superficie del vetro sono stati creati mediante idrolisi acida e successivamente i substrati sono stati essiccati sotto vuoto a 120 °C per 1,5 ore. I substrati disidratati sono stati immersi in una soluzione di AEAPTMS al 2% per 30 minuti, risciacquati con etanolo in eccesso e infine essiccati in atmosfera di argon. La condensazione dei legami silossanici è stata effettuata riscaldando i substrati a 120 °C per 30 minuti in atmosfera di argon. Successivamente, i vetri silanizzati sono stati incubati in sospensione di AgNP per una notte e risciacquati accuratamente. Infine, i substrati di vetro funzionalizzati con AgNP (AgNP-glass) sono stati sonicati per 5 minuti per garantire la completa rimozione delle AgNP non legate dalla superficie di vetro modificata. La figura 3.7 mostra l'immobilizzazione delle nanoparticelle d'argento sulla superficie di vetro funzionalizzata.

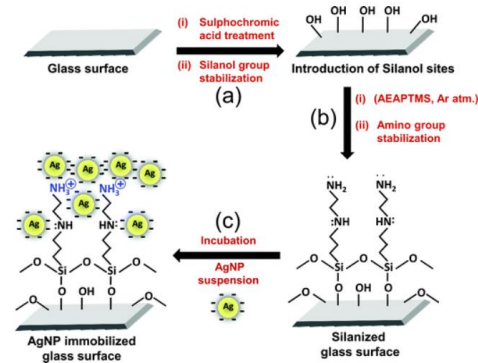


Figura 3.7 - Immobilizzazione delle nanoparticelle d'argento sulla superficie di vetro funzionalizzata con ammina (18)

Un altro esempio per rendere il vetro antibatterico, è quello di drogarlo con ioni di argento come in un lavoro di ricerca condotto da Miola et al (19), il cui focus era la realizzazione di un cemento osseo bioattivo per promuovere l'osteointegrazione e, allo stesso tempo, tale da rendere il materiale meno vulnerabile alla colonizzazione batterica, a questo proposito il cemento commerciale (Simplex™) è stato mescolato con vetro bioattivo SBA2 a sua volta drogato con Ag⁺ per conferirgli proprietà antibatteriche. Per drogare il vetro bioattivo con ioni Ag⁺ è stata scelta la tecnica dello scambio ionico in soluzione acquosa, tale processo consente l'introduzione di un contenuto di Ag controllato e assicura una distribuzione riproducibile degli ioni senza fenomeni di cristallizzazione indesiderata nel vetro o formazione di particelle colloidali, che non possono essere garantiti con il metodo convenzionale del *melt-quenching* o con la tecnica sol-gel. (19)

Considerando invece l'effetto antiadesivo e quindi *antibiofouling*, relativo sempre al vetro, il seguente lavoro presenta un rivestimento antiriflesso super-idrofobico. Come riportato in figura 3.8 il trattamento consiste in un primo rivestimento del vetro con allumina (Al_2O_3) tramite deposizione atomica per ottenere un film piatto e uniforme sulla superficie, il secondo passo è l'immersione in acqua deionizzata (DIW), che trasforma l' Al_2O_3 da film sottile a strato poroso e nano-strutturato simile ai fili d'erba (GLA, grass-like alumina). L'ultimo passaggio è poi la deposizione via plasma di un fluoropolimero. Per trattamenti plasma di 7 minuti si ottengono caratteristiche di superidrofobicità con angoli di 160° . (20)

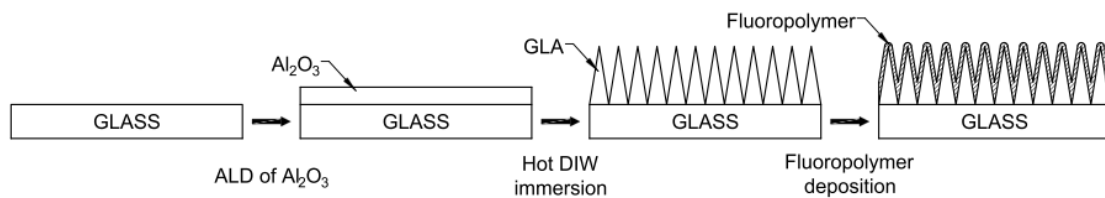


Figura 3.8 - Descrizione dei vari step per il rivestimento di vetro con alumina grass like (GLA) e un fluoropolimero. (20)

Sempre con deposizione via plasma si può citare un altro esempio di un rivestimento *antibiofouling* che garantisce anche buona biocompatibilità, un rivestimento di poliossazoline che sono una nuova classe promettente di polimeri per applicazioni biomediche. I sottili film a base di ossazolina sono stati depositati con successo su substrati di vetro tramite tecnica al plasma in configurazione a doppia barriera di dielettrico (DBD). E' stato utilizzato come gas di lavoro l'azoto che ha trasportato i vapori di 2-metil-2-ossazolina nella camera di deposizione. Questa composizione gassosa ha reso possibile ottenere una scarica omogenea, che ha portato alla deposizione di film sottili uniformi. Per migliorare le proprietà del film, è stato necessario aumentare la temperatura del substrato fino a 150°C durante la deposizione. (21)

4. TRATTAMENTI AL PLASMA

Quando la materia è continuamente alimentata con energia, la sua temperatura aumenta e modifica il suo stato dal solido al liquido fino al gassoso. Se l'alimentazione di energia continua, il guscio atomico esistente si rompe e appaiono delle particelle cariche (elettroni, carichi negativamente e ioni, carichi positivamente). (22) Questa miscela è descritta con il termine plasma o il "quarto stato della materia". Nella figura 4.1 è riportato uno schema degli stati della materia in funzione della temperatura.

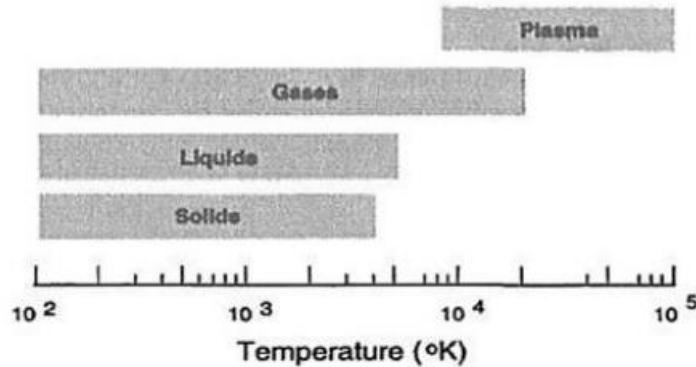


Figura 4.1 - Stati della materia (22)

Il plasma è quindi gas che viene eccitato a stati energetici elevati tramite 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 particolare, la modifica dell'energia superficiale dei materiali può migliorare la resistenza all'adesione, le proprietà superficiali e di rivestimento, e la biocompatibilità. (23)

Le tecniche basate sul plasma offrono i seguenti vantaggi nell'ingegneria dei biomateriali:

1. E'una tecnica generalmente affidabile, riproducibile, non richiede una visione diretta, è relativamente economica e applicabile a diverse geometrie di campioni e materiali come metalli, polimeri, ceramiche e compositi.
2. Il trattamento al plasma può provocare cambiamenti in una varietà di caratteristiche superficiali, ad esempio chimiche, tribologiche, elettriche, ottiche, biologiche e meccaniche.
3. Il processo al plasma può fornire superfici sterili e può essere facilmente implementato su scala industriale.

Quindi la modifica della superficie mediante plasma come tecnica di lavorazione economica ed efficace sta guadagnando popolarità nel campo biomedico.

4.1 Parametri del plasma

Il 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 includono la potenza, la tensione applicata, la temperatura, la frequenza, la pressione, la densità elettronica, le specie gassose adoperate ed i prodotti chimici polimerizzabili.

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 del secondo che lavora in ambiente aperto. Da questa distinzione scaturiscono pro e contro: nel caso di plasma a vuoto, si ottengono materiali ad elevata energia superficiale ed una chimica ultra-pulita all'interfaccia, utilizzando gas di lavoro corrosivi. Tuttavia, non è un processo continuo e richiede la formazione di vuoto spinto con conseguenti alti costi produttivi e di apparecchiature. Il plasma

atmosferico, invece 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, le tipologie di gas impiegabili sono limitate e serve una ventilazione forzata nella zona di lavoro in seguito alla formazione di ozono nell'area di lavoro.

Un parametro importante per avere una buona resa del trattamento al plasma è 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 invece 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.

Per permettere la generazione del plasma, fondamentale è la differenza di potenziale ai capi degli elettrodi che generano l'energia sufficiente per far accendere il plasma. L'andamento del potenziale è strettamente correlato anche alla pressione a cui si lavora. Nelle due figure sotto riportate si descrive la tensione in funzione della corrente in una scarica di gas a bassa pressione e quello per un gas a pressione atmosferica. (23)

In figura 4.2(A), relativa alla bassa pressione si osservano quattro regioni: (1) zona "oscura" prima dell'accensione della scintilla, (2) regione di "bagliore normale", (3) zona di "bagliore anomalo" e (4) area di "scarica ad arco" (il plasma diventa altamente conduttivo). Con l'aumento della pressione, le zone (2) e (3) tendono a ridursi. Nella figura 4.2(B), a pressione atmosferica, si osservano invece due 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 controllata.

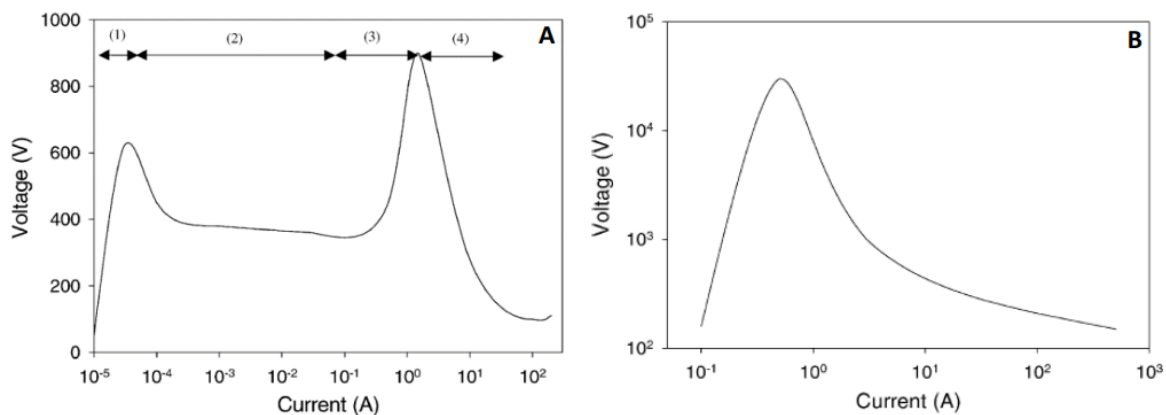


Figura 4.2 - Andamento corrente-tensione di una scarica di gas a bassa pressione (A) e a pressione atmosferica (B) (23)

In molti sistemi di generazione del plasma è anche possibile scegliere il metodo di lavoro, cioè se lavorare in continuo e lasciare sempre acceso il plasma per tutta la durata del trattamento oppure lavorare in modo pulsato, introducendo quindi un *duty cycle*, ovvero un'interruzione della generazione del plasma, impostando il periodo completo di trattamento e aggiungendo poi degli step time in cui il plasma è acceso (ON) e in cui è spento (OFF). Quest'ultimo è preferibile ed utile quando il trattamento al plasma è utilizzato per la deposizione di materiali a struttura polimerica. (24)

E' da tenere presente che la generazione di particelle cariche ed eccitate che compongono il plasma e che impattano all'interno della camera e sui substrati che si vogliono rivestire generano energia cinetica

che si traduce anche in incremento della temperatura e quindi riscaldamento della camera. Inoltre in alcuni sistemi di lavoro al plasma è possibile riscaldare la camera di lavoro per facilitare per esempio l'evaporazione di sostanze che si vogliono depositare.

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. In funzione della densità del plasma si possono distinguere due tipologie di plasma, plasma a caldo (HOT) in cui il gas è completamente ionizzato e ha una densità molto elevata di circa 10^{12} elettroni/cm³ oppure plasma a freddo (COLD), in cui si ha una densità inferiore di circa 10^8 elettroni/cm³

Considerando il plasma con sorgente gassosa, si distinguono due tipologie di gas di lavoro che si possono usare separatamente o anche contemporaneamente a seconda dell'obiettivo che si vuole ottenere. Gas inerti come He, Ne e Ar, inerti generano sul substrato da trattare una bassissima funzionalizzazione chimica, ma una forte pulizia della superficie il cosiddetto meccanismo di *cleaning e etching*, cioè le particelle che si liberano a seguito delle collisioni tra atomi e particelle cariche impattano sul substrato e tramite un'interazione meccanica con esso lo puliscono da eventuali contaminazioni. E poi ci sono i gas definiti reattivi, come O₂, N₂, NH₃ e CO₂, che a seguito dell'impatto delle loro cariche sul substrato creano delle pesanti funzionalizzazioni. Per esempio utilizzando come gas ossigeno o azoto si rende la superficie idrofila perché si creano sulla superficie del substrato siti reattivi per l'acqua -OH₂ e -NH₂

4.2 Sorgenti al plasma

Esistono molti tipi di sorgenti di plasma, tra cui quelle gassose, metalliche e basate su laser.

Considerando quelle di origine gassosa le più utilizzate sono la sorgente di plasma a scarica luminosa a radiofrequenza (RF), la sorgente di plasma a risonanza ciclotronica degli elettroni (ECR), la sorgente di plasma a scarica corona, la sorgente di plasma ad arco atmosferico e la sorgente a scarica con barriera di dielettrico (DBD). In questo paragrafo si descrivono solo due tipologie, la RF, quella più comune e ampiamente utilizzata, e la DBD perché utilizzata nei trattamenti al plasma effettuati per questo progetto di tesi.

Il plasma a radiofrequenza con scarica luminosa (*radiofrequency glow discharge* gdRF) è uno dei metodi più adoperati per la modifica superficiale e 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). Nel primo, l'energia RF viene trasferita al carico attraverso un condensatore, quindi l'energia viene accumulata nel campo elettrico e successivamente trasferita al carico. L'ICP implica, invece, il trasferimento di energia RF al carico attraverso un accoppiamento induttivo. In quest'ultimo, il campo magnetico indotto dalla radiofrequenza viene utilizzato per trasferire l'energia al plasma. La scelta tra l'accoppiamento capacitivo e quello induttivo dipende dalle specifiche esigenze dell'applicazione e dalle caratteristiche del sistema di scarica. (23)

Il plasma a barriera dielettrica (DBD) è un sistema di plasma a freddo composto da due elettrodi conduttori, con uno o entrambi gli elettrodi coperti da un materiale dielettrico, come polimeri, vetro o quarzo. Lo spessore e la costante dielettrica dello strato dielettrico determinano la tensione richiesta tra i due elettrodi per la generazione del plasma. Lo strato di dielettrico agisce come barriera per impedire l'arco diretto tra gli elettrodi, limitando la corrente di scarica e prolungando la durata del dispositivo. La presenza del dielettrico, inoltre, garantisce una scarica silenziosa, tale per cui questa tipologia è anche chiamata "plasma a scarica silenziosa" in contrasto con la scarica luminosa, che è accompagnata da riscaldamento e dalla generazione di rumore udibile. (25) Il plasma generato in un reattore con scarica silenziosa e con dielettrico è generalmente meno filamentare e più uniforme e viene chiamato "*Plasma Glow*". Questo sistema è fortemente vantaggioso se si devono trattare substrati delicati e facilmente

deteriorabili, infatti l'assenza di scariche rende il trattamento più omogeneo e meno aggressivo sul materiale.

I dispositivi a plasma DBD sono comunemente alimentati da tensione AC ad alta frequenza oppure tensione DC pulsata, microonde o alimentatori di potenza RF. In tale configurazione il plasma è alimentato da una tensione massima di 20 kV applicata a frequenze comprese tra 0,05 e 500 kHz. Sono ampiamente utilizzati in varie applicazioni come la sterilizzazione delle superfici, la modifica delle superfici, la tecnologia alimentare, la guarigione delle ferite e la purificazione dell'aria. I dispositivi a plasma DBD hanno una vasta gamma di configurazioni a seconda della disposizione degli elettrodi e della barriera dielettrica. Questi vantaggi rendono il plasma DBD versatile e adattabile a diverse esigenze.

La configurazione DBD più conosciuta ed ampiamente utilizzata è classificata come plasma DBD volumetrico (VDBD) rappresentata in figura 4.3(A). Il sistema è composto da due elettrodi metallici rivolti l'uno verso l'altro, con gli elettrodi coperti da una barriera dielettrica, il gas di lavoro può essere iniettato nello spazio tra gli elettrodi e il plasma è generato in questo spazio sotto l'azione di un campo elettrico elevato; in tale configurazione, il campione è posizionato nella regione di scarica. Per il dispositivo rappresentato nella figura 4.3(B), la barriera dielettrica invece è posta tra i due elettrodi. In questo caso, il plasma viene generato separatamente nelle due regioni tra gli elettrodi e i materiali dielettrici. Questo sistema è adatto per il trattamento di film sottili dove il campione può essere posizionato nella regione del plasma. Applicando lo stesso principio, il VDBD può essere costruito utilizzando materiali dielettrici cilindrici. Questo tipo di configurazione è chiamato plasma DBD cilindrico figura 4.3(C). Il plasma può essere generato all'interno del cilindro, tra gli elettrodi esterni e interni. Pur avendo molte configurazioni, le applicazioni pratiche del VDBD sono poche, poiché lo spazio di scarica è limitato dalle dimensioni dei dispositivi.

Per superare la limitazione dimensionale del VDBD, è stato sviluppato il DBD superficiale (SDBD), figura 4.3(D), impiegato per molteplici applicazioni, ed in campo medico specialmente per la disinfezione delle superfici e il trattamento delle ferite. Nel plasma SDBD, uno o entrambi gli elettrodi possono essere incorporati nella barriera dielettrica; in questa configurazione si ha un'ampia area di scarica superficiale.

Ultima configurazione e più innovativa è quella dei plasmi DBD con elettrodo galleggiante (FE-DBD), figura 4.3(F), progettati con un solo elettrodo ad alta tensione incorporato all'interno dello strato dielettrico. Il secondo elettrodo è il campione trattato, non connesso a terra. In questa configurazione, il campione è considerato come un "elettrodo flottante". Quando il campione è posizionato vicino alla superficie dello strato dielettrico, il plasma verrà generato dalla differenza di potenziale tra l'elettrodo ad alta tensione e l'elettrodo flottante. I dispositivi FE-DBD sono altamente sicuri e adatti per applicazioni biologiche e sanitarie. Grazie alla semplicità di avere un solo elettrodo connesso, l'architettura del FE-DBD è molto versatile.

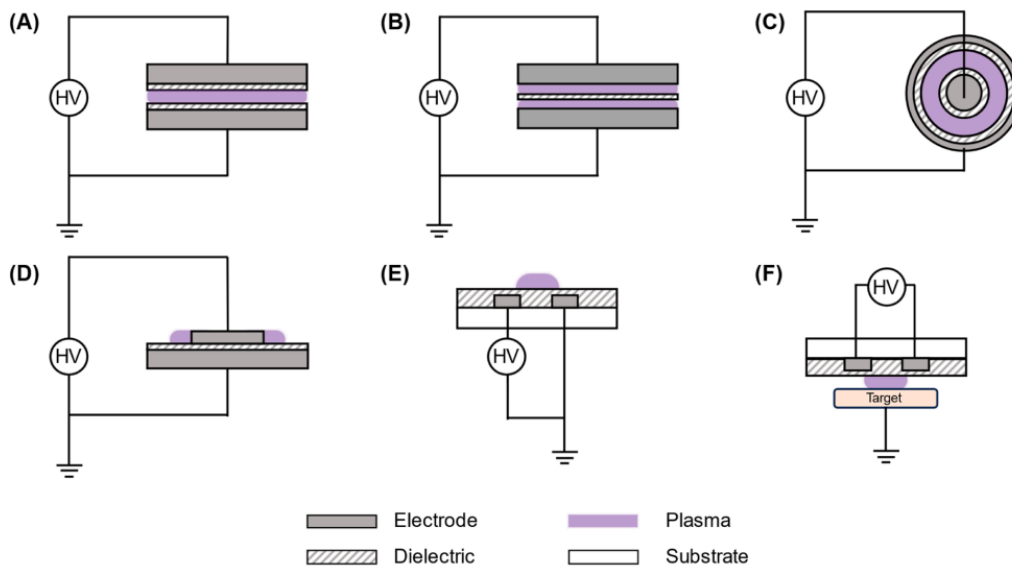


Figura 4.3 - Rappresentazione delle diverse tipologie di configurazioni del DBD (25)

La maggior parte dei DBD appena riportati utilizza materiali rigidi, tuttavia molti campioni da trattare possiedono superfici curve oppure piegate e queste tipologie di geometrie hanno difficoltà ad ottenere un trattamento uniforme attraverso i design rigidi dei DBD convenzionali. Una soluzione promettente per questo problema è la configurazione DBD flessibili (FXDBD), figura 4.4, che possono essere piegate o arrotolate. In linea di principio, il dispositivo a plasma FXDBD può essere facilmente realizzato sulla base della tecnologia dell'elettronica flessibile. Grazie alla flessibilità, il FXDBD può essere piegato, torcigliato o arrotolato attorno a superfici non piatte o curve, aumentando così l'uniformità su tutta l'area trattata. (25)

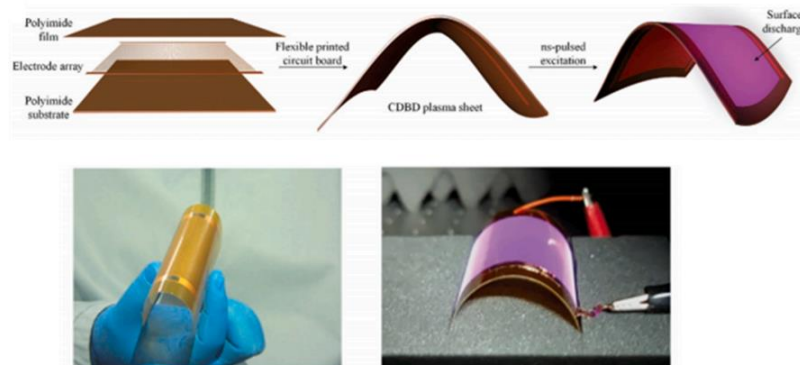


Figura 4.4 - Rappresentazione della configurazione DBD flessibile (FXDBD) (25)

4.3 Tecniche di modifica superficiale via plasma

A seconda della modalità di trattamento al plasma, è possibile conferire alla superficie del substrato trattato particolari caratteristiche chimiche, morfologiche e topografiche.

Le tecniche possono essere additive come l'implantation (impianto) e la deposition (deposizione) oppure sottrattive come l'etching (incisione) e lo sputtering (spruzzamento). (26)

Le tecniche sottrattive sono ampiamente utilizzate come pre-trattamento, per preparare il substrato a successivi processi, creando radicali liberi e quindi siti preferenziali per i successivi trattamenti, oppure per realizzare particolari *pattern* tridimensionali.

Lo *sputtering* prevede l'applicazione di un voltaggio negativo (da 1 a diversi kV) al substrato, 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 (figura 4.5). Grazie a queste ultime, alcuni atomi acquisiscono energia sufficiente riuscendo a fuggire dal substrato. Questo processo, è utilizzato per la sterilizzazione di biomateriali sensibili alla temperatura o alla radiazione, per la rimozione di contaminazioni superficiali e per la deposizione di sottili rivestimenti. Solitamente per la pulizia si adoperano gas inerti, in prevalenza argon (Ar) per la sua elevata resa di *sputtering* e per il costo contenuto.

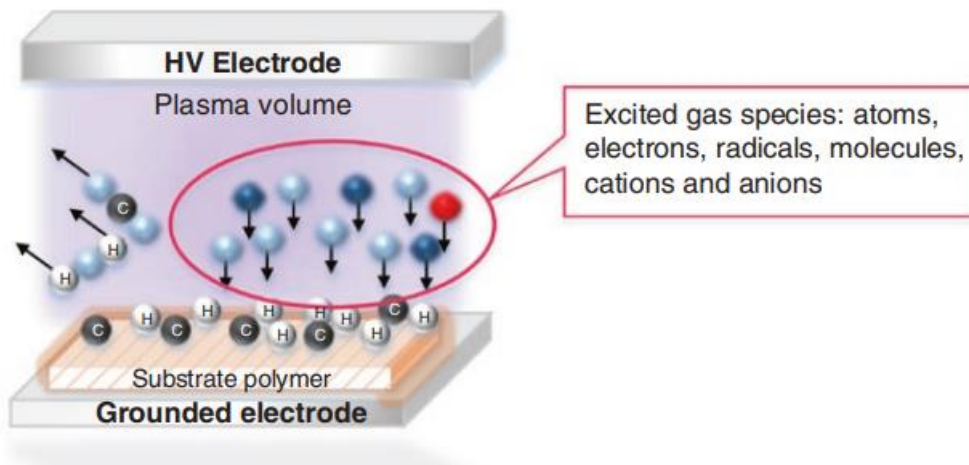


Figura 4.5 - Rappresentazione della tecnica plasma di sputtering (26)

Sempre sottrattivo è l'etching, processo in cui si ha un'infiltrazione degli ioni generati dal plasma più profonda e quindi in genere c'è una maggiore perdita di materiale ed è possibile rimuovere in maniera selettiva la parte più superficiale del substrato, ricreando un pattern (figura 4.6). Le modifiche con questi trattamenti non coinvolgono il bulk del materiale, di conseguenza il substrato possiede caratteristiche fisiche, chimiche e meccaniche simili al materiale di partenza, ciò che si modifica è solo il *layer* più superficiale.

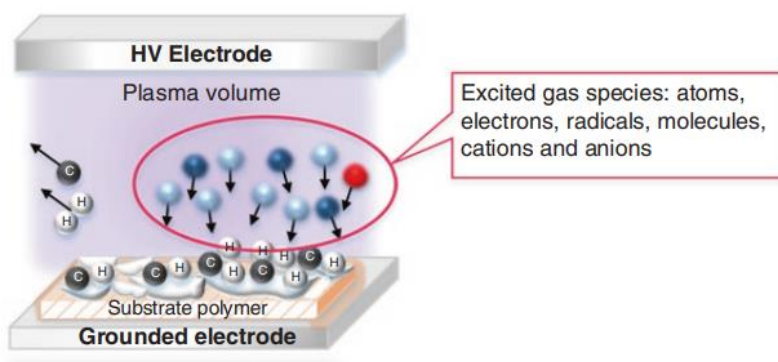


Figura 4.6 - Rappresentazione della tecnica plasma di etching (26)

Per quanto riguarda le tecniche additive invece troviamo l'impiantazione e la deposizione. L'*implantation* anche chiamata *plasma immersion ion implantation*, (PIII) è un processo in cui le specie eccitate presenti nel plasma reagiscono direttamente con la superficie del substrato da trattare e inducono l'innesto di nuovi gruppi chimici (ammine, idrossili ecc.). 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 che ha una maggiore densità di ioni positivi) e impiantati nella superficie del substrato (figura 4.7). Il vantaggio di questa tecnica è la possibilità di trattare uniformemente campioni di forma complessa.

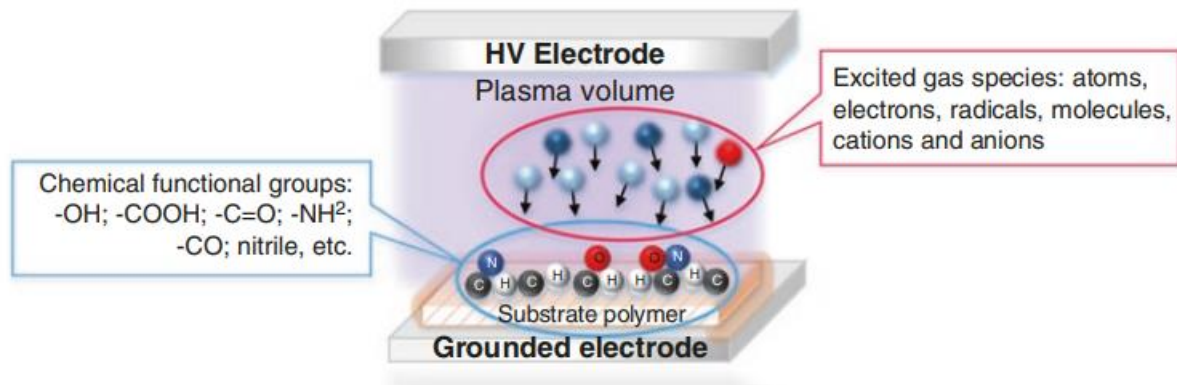


Figura 4.7 - Raffigurazione della tecnica plasma ion implantation (26)

Infine l'ultima tecnica di tipo additiva presentata è la deposizione, solitamente deposizione di materiali polimerici (figura 4.8).

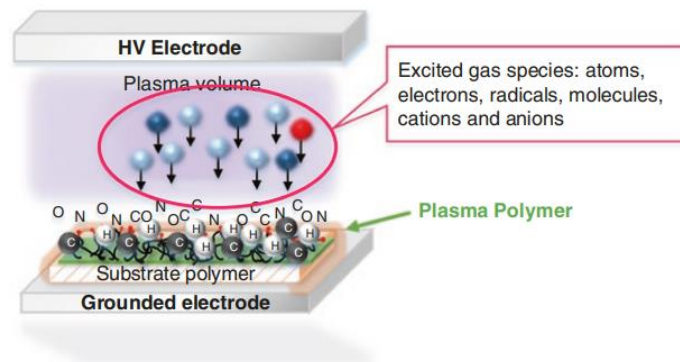


Figura 4.8 - Raffigurazione della tecnica plasma deposition (26)

Questa tecnica è possibile distinguere in 3 approcci differenti (27)

1. Innesto post-irraggiamento al plasma
2. Innesto sincronizzato post-irraggiamento al plasma
3. Polimerizzazione al plasma

1. La fase di pre-trattamento come precedentemente accennato serve anche a creare radicali liberi in superficie e queste funzionalità superficiali possono quindi essere utilizzate come siti di avvio per la polimerizzazione del monomero la sua completa polimerizzazione è poi garantita da un post-trattamento al plasma. È importante precisare che, in questo approccio, il monomero non viene mai sottoposto al plasma, ma solo quando la sua polimerizzazione è già iniziata come si può vedere in figura 4.9.

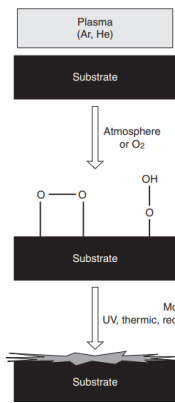


Figura 4.9 - Rappresentazione schematica del processo di innesto post-irraggiamento (27)

2. La strategia di polimerizzazione indotta dal plasma, è caratterizzata dal rivestimento del substrato con il monomero di interesse che poi viene fatto polimerizzare tramite il plasma che crea radicali che portano poi alla sua polimerizzazione in superficie (figura 4.10).

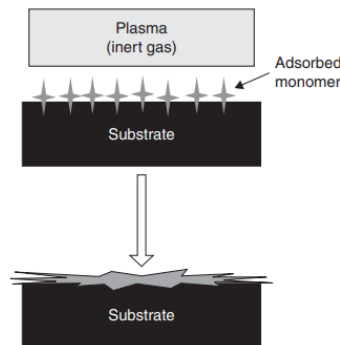


Figura 4.10 - Rappresentazione schematica del processo innesto sincronizzato post-irraggiamento al plasma (27)

3. La polimerizzazione al plasma invece è ancora diversa perché in questo specifico caso il monomero non è adsorbito sulla superficie del campione, ma il monomero entra nel plasma in fase vapore. Il monomero viene convertito dal plasma in frammenti reattivi, che si ricombinano in polimero in fase gassosa. Dato che il monomero originale viene frammentato nel plasma, il layer polimerico creato non avrà necessariamente una struttura e una composizione simili ai polimeri ottenuti dalla polimerizzazione convenzionale dello stesso monomero (figura 4.11).

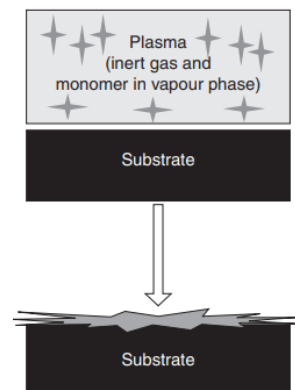


Figura 4.11 - Rappresentazione schematica del processo di polimerizzazione al plasma (27)

La principale differenza tra la polimerizzazione al plasma e l'innesto al plasma è che la polimerizzazione al plasma riveste il substrato invece di legare covalentemente le specie alla superficie del polimero modificato. Pertanto, se si utilizza lo stesso monomero, i componenti polimerizzati al plasma mostreranno proprietà chimiche e fisiche diverse rispetto ai polimeri ottenuti utilizzando un metodo di sintesi convenzionale.

4.3.1 Effetti del trattamento al plasma

La nanoscienza del plasma è un'area emergente e promettente, e una delle sue applicazioni è proprio nei biomateriali. Relativamente al campo biomedicale, i trattamenti al plasma apportano delle modifiche al substrato trattato che garantiscono un'ottimizzazione del *layer* superficiale tale da renderlo adatto a resistere all'interno dell'organismo umano e anche a renderlo più facilmente integrabile con esso. Gli effetti positivi che le diverse tipologie di trattamenti al plasma conferiscono ai biomateriali sono sia di natura chimica che di natura fisica. (28)

I nano-pattern indotti dalla modifica al plasma possono tradursi in proprietà antibatteriche e favorire l'adesione e la proliferazione delle cellule, creando quindi superfici antibatteriche e biocompatibili allo stesso tempo. Ad esempio, un micro-pattern ispirato alle scaglie della pelle dello squalo ha dimostrato di resistere alla formazione di *biofilm* e migliorare l'adesione e la proliferazione delle cellule sia animali, fibroblasti di topo (L929), che umane i cheratinociti (HaCaT). Mentre i nano-pattern ispirati alle ali degli insetti, come le ali di libellula, hanno dimostrato di possedere attività battericida e potenziare l'adesione e la proliferazione dei fibroblasti.

La nanostruttura superficiale può avere un effetto più evidente rispetto alla semplice rugosità e dovrebbe essere presa in considerazione quando si valutano approcci basati sulla morfologia per conferire attività antibatterica. La nanostruttura può essere conferita ad un substrato proprio grazie alla tecnica del plasma, utilizzato per esempio nella modalità di *etching*. Ad esempio, è noto che una rugosità superficiale su scala micrometrica aumenta l'adesione batterica. Tuttavia, Linklater et al. (29) hanno dimostrato che strutture su scala micrometrica formate attraverso la RIE (*Reactive Ion Etching*) del titanio (Ti) possono esibire attività antibatterica simile a strutture superficiali su scala nanometrica, inoltre, alcuni ceppi batterici, come *S. aureus* sono sensibili alla densità dei *micropillar*, mentre altri come ad esempio lo *P. aeruginosa* sono sensibili all'altezza dei *micropillar*, in linea con la generalizzazione che i batteri Gram-positivi sono più resistenti agli stress deformazionali rispetto ai batteri Gram-negativi.

L'adesione batterica e la formazione di biofilm possono essere prevenute anche introducendo specie chimiche superficiali che inibiscono la proliferazione batterica. Tali modifiche chimiche possono essere conferite ai substrati di interesse utilizzando vari precursori e sistemi al plasma. Rivestimenti basati su poli(etileneossido) sono ampiamente utilizzati per la generazione di superfici antibatteriche e sono considerati come il *gold standard* grazie alle loro eccellenti proprietà *anti-biofouling*. Rivestimenti simili al poli(etileneossido) possono essere depositati mediante la polimerizzazione al plasma, l'innesto, la silanizzazione e l'elettrodeposizione. Altra modalità è incorporare sulla superficie agenti antibatterici, sostanze antibatteriche naturali o agenti antibatterici inorganici. Le tecniche al plasma offrono il vantaggio della deposizione diretta di tali agenti, eliminando la necessità di procedure *multistep* che utilizzano elevate quantità di sostanze chimiche come solventi e agenti di reticolazione.

La tecnologia al plasma è stata analizzata e applicata proprio in questo progetto di tesi, inizialmente come deposizione del monomero idrofobicizzante di interesse tramite la tecnica del plasma deposition con configurazione DBD di un monomero fluorurato, successivamente come post trattamento dei substrati, già trattati con il suddetto monomero, perché si è valutato la sua capacità di conferire una topografia nanostrutturata alle superfici. Nel capitolo successivo si spiegano nel dettaglio i diversi approcci investigati e ottimizzati per rendere la superficie dei materiali di interesse anti adesiva.

5. SEZIONE SPERIMENTALE

Il mio lavoro di tesi si è svolto in collaborazione con IRIS s.r.l (denominata semplicemente IRIS di qui in avanti) in continuità con il lavoro svolto da precedente tesista Kevin Pontillo, il quale aveva modificato la superficie di vetri da finestra e vetri bioattivi(SBA2 e S53P4), funzionalizzandoli con esametildisilossano (HDMSO), monomero noto per le sue proprietà idrofobiche, con l'intenzione di conferire proprietà antibatteriche e antifouling per prevenire l'adesione di microrganismi e facilitare il lavaggio delle superfici.

La mia tesi si propone di sperimentare la funzionalizzazione degli stessi vetri usando però monomeri fluorosilanicici.

In IRIS sono stati svolti i trattamenti al plasma con i monomeri fluorurati, mentre nei laboratori del Dipartimento di Scienze Applicate e Tecnologia (DISAT) presso il Politecnico di Torino si è svolta la parte di produzione dei vetri bioattivi e di caratterizzazione e analisi dei campioni trattati.

5.1 Materiali e metodi

Si è lavorato in parallelo con due tipologie di vetro, vetri inerti, comune vetro da finestra forniti da IRIS e i vetri bioattivi prodotti nei laboratori del DISAT.

La scelta di lavorare con due tipologie di vetro ha radice nella volontà di analizzare come un uguale materiale, vetro base silice, ma con composizioni diverse possa in primis interagire con i trattamenti al plasma e i rivestimenti con monomeri fluorosilanicici e poi in secondo luogo come si comportano in due campi applicativi differenti.

Le due applicazioni a cui si fa riferimento sono, per il vetro da finestra ad esempio il vetro utilizzato negli ospedali per la strumentazione o le vetrine delle varie stanze di degenza, per cui l'intenzione sarebbe renderlo anti-fouling e anti batterico per ridurre la contaminazione batterica, mentre per i vetri bioattivi l'applicazione è rivolta al campo della medicina rigenerativa, come sostituti ossei grazie alla loro capacità interagire con l'organismo e integrarsi in esso con la produzione di idrossiapatite, ma al contempo ridurre la possibile infezione batterica a seguito dell'impianto.

Quindi il denominatore comune è la realizzazione di un *coating* idrofobico che garantisca quindi una diminuzione della probabilità di una contaminazione batterica. Il passo in più che si fa per i campioni bioattivi è valutare poi la loro capacità di rimanere tali nonostante la presenza del *coating*.

5.1.1 Produzione dei vetri Bioattivi

I vetri bioattivi scelti sono S53P4 e SBA2, entrambi vetri base silice, ma con composizioni differenti, come mostrato nella tabella 5.1.

Tabella 5.1 - Percentuale in peso dei componenti costituenti le due tipologie di vetri bioattivi

	%wt per <i>SBA2</i>	%wt per <i>S53P4</i>
SiO₂	46,53	53
Na₂O	18,02	23
CaO	27,14	20
P₂O₅	6,88	4
B₂O₃	0,48	-
Al₂O₃	0,94	-

Si nota come lo SBA2 differisca dal S53P4 per la presenza di ossido di boro (B₂O₃) e di allumina (Al₂O₃).

I due vetri bioattivi scelti appartengono alla classe dei vetri silicei di Hench, l'S53P4 è un vetro commerciale noto come BoneAlive®, mentre lo SBA2 è un vetro bioattivo non commerciale, la cui composizione è stata ideata dal gruppo di ricerca del dipartimento DISAT (J Mater Sci (2017) 52:5133–5146)

Il primo step è stata la produzione dei vetri bioattivi a partire dalla miscelazione delle polveri dei reagenti.

Nelle tabelle 5.2 e 5.3 sono riportati le quantità in peso di ciascun reagente per la sintesi dei vetri.

Tabella 5.2 - Peso dei reagenti per la sintesi di SBA2

Reagenti	Peso [g]
SiO ₂	46,53
Na ₂ CO ₃	30,82
CaCO ₃	33,92
Ca ₃ (PO ₄) ₂	15,02
H ₃ BO ₃	0,43
Al ₂ O ₃	0,94

Tabella 5.3 - Peso dei reagenti per la sintesi di S53P4

Reagenti	Peso [g]
SiO ₂	53
Na ₂ CO ₃	39,32
CaCO ₃	27,27
Ca ₃ (PO ₄) ₂	8,73

Ciascun reagente è stato pesato usando la bilancia situata sotto la cappa chimica. Dopo la pesata, i reagenti sono stati mescolati in opportuni recipienti e messi in un agitatore a rulli che ne ha permesso la miscelazione omogenea.

Successiva alla fase di miscelazione (durata una giornata intera) si è proceduto alla fase fusione e colata delle polveri appena preparate.

In giorni diversi si sono realizzate le barrette di SBA2 e S53P4.

Il procedimento seguito è stato quello di versare le polveri miscelate in un crogiolo in platino, inserito poi in forno (Nabertherm® LHT 04/18), successivamente, le polveri fuse sono state versate in uno stampo cilindrico di ottone per la fase di *annealing* e ricotte in un secondo forno (Manfredi® OVMAT 2009).

Per la produzione dello SBA2 il crogiolo è stato inserito nel primo forno a 1450°C per 1 ora, il fuso così ottenuto è stato poi colato nello stampo e la fase di *annealing*, nel secondo forno, è avvenuta a 500°C per altre 13 ore.

Per il S53P4 invece la fase di fusione delle polveri nel primo forno è durata 3 ore a 1360°C, mentre la fase di ricottura nel secondo forno solo 1 ora a 520°C

Successiva alla produzione delle due barrette cilindriche di vetro (SBA2 e S53P4) e la loro rimozione dagli stampi si è proseguito con la fase di taglio del vetro per ottenere i campioni desiderati. Per tagliare le barrette di vetro si è utilizzata la troncatrice (ATM® Brillant 220), dotata di lama in diamantate adatta proprio a tagliare i materiali vetrosi e vetro-ceramici.

I campioni che si ottengono sono dei campioni cilindrici di diametro 10 mm e altezza 4 mm.

Il passaggio seguente è stata la levigatura dei campioni, per fare questo si è utilizzata la lucidatrice (Struers® LaboPol-2) con diverse carte abrasive da quella più grossolana a quella più fine.

Innanzitutto è stato rimosso il difetto a gradino che si forma nel momento del taglio utilizzando la carta più grossolana, la P600, e poi si segna il lato del campione che non si andrà a lucidare con una matita dalla punta diamantata.

Successivamente si sono lucidati tutti i campioni con carta abrasiva a 500 rpm seguendo il protocollo: P800 per 30s, P1000 per 60s, P1200 per 90s, P2500 per 120s e P4000 per 150s.

5.1.2 Preparazione dei vetri inerti

I vetri inerti sono stati recapitati a IRIS da un loro fornitore e hanno dimensione 2 cm x 2 cm e spessore di 3 mm.

Si è deciso di fare i trattamenti con due set di campioni inerti, un set di campioni non lucidati e quindi tal quali come ci sono stati consegnati e la parte restante lucidata seguendo il protocollo di lucidatura eseguito per i campioni bioattivi. Questa distinzione è stata fatta, innanzitutto come metro di paragone con i vetri bioattivi, anch'essi lucidati allo stesso grado di rifinitura, e poi per verificare l'influenza della rugosità superficiale nei trattamenti al plasma e nelle prove biologiche di antibattericità.

5.1.3 Preparazione dei campioni ai trattamenti successivi

Per poter trattare i campioni con il plasma è necessaria una prima fase di pulizia dei campioni, e una loro attivazione ovvero la fase di etching, che permette di pulire e preparare i campioni per la deposizione via plasma.

5.1.3.1 Pre-trattamento plasma dei campioni inerti

In una prima fase, tutti i campioni inerti e bioattivi sono stati sottoposti alla fase di pretrattamento. La fase di *etching* prevede l'uso della combinazione di due gas inerti, He e O₂.

Si sono depositati sul piatto 4 campioni per volta e si accende poi il plasma.

I parametri utilizzati sono riportati in tabella 5.4:

Tabella 5.4 - Parametri e relativi valori del pre-trattamento al plasma in He e O₂

Parametri	Valori
Frequenza	5 kHz
Tensione	6 kV
Flusso di He	10 l/min
Flusso di O ₂	0,2 l/min

Come si vedrà poi nella sezione dei risultati, il pretrattamento eseguito sui campioni bioattivi conferisce loro super-idrofilia, tale che anche dopo il trattamento via plasma con il monomero idrofobizzante l'angolo di contatto statico (WCA) è basso e tendente all'idrofilia e non è l'obiettivo desiderato; quindi da una certa fase di ottimizzazione dei trattamenti il pretrattamento sarà eseguito solo sui vetri inerti, mentre per quelli bioattivi, si opta per un altro tipo di pulizia descritta nel paragrafo successivo.

5.1.3.2 Preparazione dei campioni bioattivi

I campioni bioattivi vengono pre-trattati in una maniera differente per evitare la super idrofilia superficiale. Ciascun campione viene lavato in acqua bidistillata con l'ausilio di un bagnetto a ultrasuoni a temperatura ambiente e per 2 minuti e poi li si lascia asciugare in stufa a 37 °C.

5.1.4 F8815

Il materiale che si è deciso di depositare sui campioni per ottenere l'effetto idrofobico e quindi *antifouling* è l'oligomero *Dynasylan*® F8815, è un oligosilossano fluoroalchile a base acquosa, da qui in avanti chiamato F8815.

Si riporta in figura 5.1 la sua struttura molecolare e nella tabella 5.5 le sue caratteristiche principali reperite dalla sua SDS (*Safety Data Sheet*).

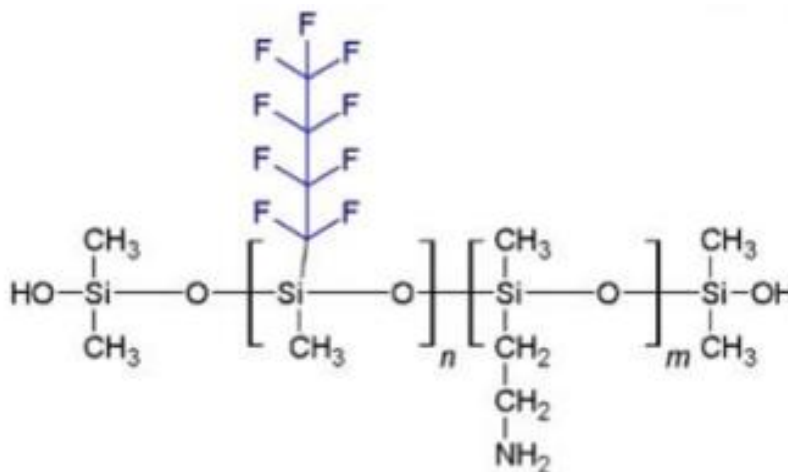


Figura 5.1 - Struttura molecolare dell'oligomero F8815 (30)

Tabella 5.5 - Scheda tecnica dell'oligomero F8815, reperita dal sito internet di Evonik, leading beyond the chemistry; https://www.dynasylan.com/en/product/PR_52000116

Technical data			
Properties and test methods	Value	Unit	Method
Density (20 °C)	approx. 1.058	g/cm ³	DIN 51757
Viscosity (20 °C)	approx. 1.6	mPa.s / cSt	-
Flash point	> 95	°C	DIN EN ISO 2719
Boiling point (1.013 hPa)	97	°C	ASTM D - 1120

Come descritto nel capitolo 3 per conferire proprietà idrofobiche a materiali che per loro natura non lo sono si deve agire sulla chimica superficiale del materiale; in particolare alcuni gruppi funzionali apolari che contengono fluoro si sono dimostrati ottimi in questo tipo di applicazione, abbassando l'energia superficiale e quindi aumentando l'angolo di contatto.

Si riportano nella tabella 5.6 i gruppi funzionali che garantiscono una bassa energia superficiale, e tra questi ci sono anche quelli contenenti il fluoro. (31) A questo proposito si è deciso di utilizzare un monomero fluorurato.

Tabella 5.6 - Elenco dei principali gruppi funzionali con relativo valore di energia superficiale (SFE) che conferiscono. (31)

Functional group	CH ₂	-CH ₃	CF ₂	-CF ₃
SFE (mN/m ⁻¹)	36	30	23	15

Nel lavoro di Jaqueline H. Yim et al. (32) è stato dimostrato che per i monomeri fluorurati, più è lunga la catena di atomi di F, maggiore è l'effetto idrofobizzante e quindi l'angolo di contatto statico che si può ottenere.

Nell'articolo infatti sono stati messi a confronto 3 monomeri differenti FAS 3, FAS 5 e FAS 17, con numero di atomi di F crescente, la cui struttura molecolare è riportata in figura 5.2.

FAS3: Trimethoxy(3,3,3-trifluoropropyl)silane → (CH₃O)₃SiCH₂CH₂CF₃

FAS5: Pentafluorophenyltriethoxysilane → F₅ArSi(OCH₂CH₃)₃

FAS17:(heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)triethoxysilane (CH₃CH₂O)₃SiCH₂CH₂(CF₂)₇CF₃

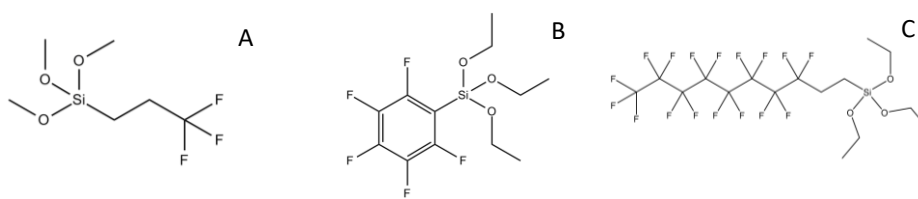


Figura 5.2 - Strutture molecolari di 3 monomeri fluorurati, FAS3 (A), FAS5 (B) e FAS17 (C)

Questi 3 monomeri diversi sono stati polimerizzati su un substrato di polietilene ad elevatissimo peso molecolare (UHMWPE), mediante deposizione di vapore chimico potenziata al plasma (PECVD).

FAS 3 e FAS 17 sono fluoroalchil-silani, mentre il FAS 5 è un fluoroaril-silano ovvero presenta un gruppo aromatico nella sua struttura molecolare.

A seguito delle caratterizzazioni, come l'angolo di contatto statico, la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier in modalità ATR e la spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS), è risultato che il gruppo aromatico presente nel FAS 5 non va a incidere sull'idrofobicità, ma ciò che incide è proprio la lunghezza della catena di atomi F.

E' stato quindi concluso che la deposizione via plasma di rivestimenti fluorurati con proprietà idrofobiche può essere ottenuta a condizioni atmosferiche utilizzando monomeri contenenti (CF₂)_n, dove n ≥ 7, e regolando i parametri del plasma.

A questo proposito la prima scelta era ricaduta sul FAS 17 visto che era quello a catena più lunga e con migliore effetto idrofobizzante, ma per via delle tempistiche di consegna molto lunghe si è optato per un altro monomero.

J.O.F. West et al. (31) nel loro lavoro di ricerca hanno utilizzato il F8815, non un monomero, ma un oligomero che applicato su un substrato in poliuretano, pre-trattato al plasma ossigeno/argon, e successivamente immerso in una soluzione del suddetto oligomero in soluzione acida con metanolo portava ad ottenere un angolo di contatto superficiale di 153°.

Quindi vista la potenzialità di questo oligomero, lo si è scelto come componente idrofobizzante per il mio lavoro.

Una nota da fare è che tale oligomero ha una catena di atomi F inferiore a quella del F8261 figura 5.3 usata in precedenza, tuttavia, visti i risultati, si è optato per utilizzarne uno nuovo, per testarne le sue caratteristiche e proprietà.

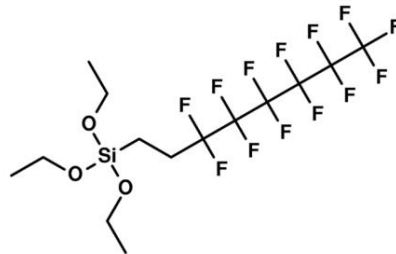


Figura 5.3 - Formula di struttura del F8261. Immagine ottenuta dall'editor Pub Chem Sketcher V2.4.

5.1.4.1 Preparazione della soluzione del monomero

Da letteratura si è compreso che per aiutare il monomero nella fase di polimerizzazione lo si può utilizzare in soluzione con metanolo e acido acetico. Per fare questo si realizza la soluzione dell'oligomero al 10% in metanolo. Per preparare 100 ml di soluzione si sono versati in un becher 90 ml di metanolo fornito dal Politecnico di Torino e 10 ml di F8815 fornito da *Evonik Silanes*

Si è messa la soluzione così preparata in un agitatore magnetico per 10 minuti a temperatura ambiente e velocità di agitazione 200 rpm

Il pH, appena preparata la soluzione, è di circa 7, trascorsi i primi 5 minuti di miscelazione si è iniziato ad aggiungere qualche goccia di acido acetico, si è misurato il pH e si è raggiunto il valore di 6.

Poco prima del termine dei 10 minuti totali di agitazione si sono aggiunte ancora alcune gocce di acido acetico per portare il pH a 5.

5.1.5 Trattamenti di funzionalizzazione superficiale

L'idea iniziale è stata quella di realizzare un *coating* tramite deposizione al plasma dei campioni appena descritti, tuttavia nel corso delle prove ci sono stati risultati negativi nella sola deposizione via plasma e diversi mal funzionamenti dello strumento che ci hanno portato a fare dei cambiamenti in corso d'opera e ottimizzare i vari protocolli di funzionalizzazione.

Nei 3 sotto-paragrafi successivi si descrivono le tre tappe fondamentali dell'ottimizzazione, mentre al paragrafo 5.1.6 si andrà nel dettaglio di tutti i parametri del plasma, e non solo, che sono stati modificati e ottimizzati per arrivare al protocollo finale.

5.1.5.1 Deposizione via PLASMA

Per la deposizione via plasma, realizzata da IRIS, si è utilizzato un generatore di plasma in configurazione DBD, con un solo elemento dielettrico.

Si è inserito l'oligomero in fase liquida nel bubbler, e utilizzando come gas di trasporto l'He si è cercato di depositare il prodotto idrofobizzante sui campioni situati all'interno della camera di lavoro.

Il problema principale riscontrato nelle prime fasi dell'applicazione della prima modalità di deposizione è stata la mancata presenza di gruppi $-CF_2$, caratteristici del F8815; successivamente, modificando i parametri si è riscontrato il successo della deposizione, tuttavia il *coating* polimerizzato non era presente in tutti i campioni e in maniera uniforme su ciascun campione. A seguito di problemi tecnici con lo strumento che hanno richiesto tempo per la riparazione si è optato per un altro metodo di deposizione.

5.1.5.2 Deposizione via DIP COATING

Il *Dip Coating* (rivestimento per immersione), consiste nella deposizione del F8815 in fase liquida direttamente sul campione.

Per questa fase, tenendo i campioni con una pinzetta si sono immersi i campioni per intero in un becher contenente l'oligomero. Dopo l'immersione, si è tolto l'eccesso inclinandolo leggermente e poi i campioni, così rivestiti, sono stati lasciati ad asciugare.

5.1.5.3 Deposizione DIP COATING + PLASMA

Poichè il focus della tesi era l'utilizzo del plasma, si è pensato di fondere i due meccanismi appena presentati, ovvero rivestire i campioni in due step successivi, prima l'immersione nel F8815 e dopo la sua asciugatura, un trattamento di polimerizzazione coadiuvata dal plasma.

5.1.6 Ottimizzazione dei trattamenti eseguiti

Come anticipato nel paragrafo precedente l'idea iniziale era la deposizione dell'oligomero tramite plasma, ma per via di alcuni inconvenienti non si è riusciti ad ottenere un buon risultato.

Si riportano in dettaglio i vari *step* attuati per giungere ad un'ottimizzazione del trattamento e alla scelta del trattamento ritenuto migliore per proseguire poi con le analisi e caratterizzazioni successive.

5.1.6.1 Fase 1

A partire dal primo trattamento fatto l'anno precedente dal mio collega, ma che non aveva dato i risultati desiderati si è cercato di ottimizzare tale protocollo, cambiando innanzitutto monomero, era stato usato il fluorosilano F8261, ed è stato sostituito dall'oligomero F8815, pensando in un primo momento che i risultati negativi ottenuti dipendessero dalla tipologia di monomero e non dai parametri di lavoro come poi si è riscontrato in fase di ottimizzazione.

Altre due modifiche che sono state apportate sono la temperatura di lavoro, si è optato per lavorare a caldo, ovvero riscaldando la camera del reattore al plasma per permettere una migliore diffusione del monomero e la tempistica di trattamento, trattando per un periodo di tempo maggiore.

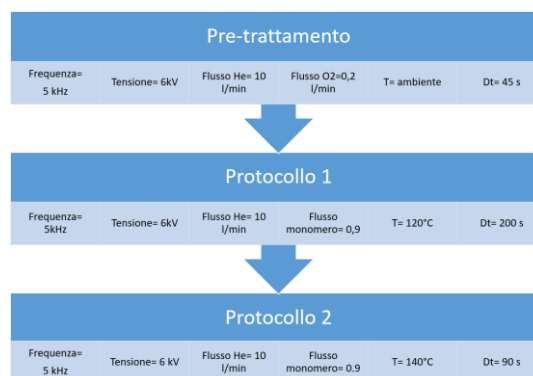
Si riportano in tabella 5.7 i parametri utilizzati con l'F8261

Tabella 5.7 - Parametri di lavoro del trattamento al plasma per il monomero F8261

Parametri	Valori
Frequenza	5 kHz
Tensione	6 kV
Flusso di He	8 l/min
Flusso di F8261 in He	0,4 l/min

In questa prima fase si seguono due protocolli differenti, riassunti nella tabella 5.8.

Tabella 5.8 - Schema dei Trattamenti eseguiti, un primo pre-trattamento e poi due protocolli differenti



Sia per i campioni inerti che per quelli bioattivi si realizza prima una fase di pre-trattamento He-O₂ e poi i 2 protocolli, questi ultimi si differenziano per tempo e temperatura, utilizzando l'oligomero F8815 tal quale.

Nel protocollo 1 si tiene la temperatura più bassa a 120°C, ma una durata del trattamento più lunga di 200 s, mentre nel protocollo 2 si fa l'opposto, si aumenta la Temperatura di lavoro a 140°C e si riducono le tempistiche a soli 90 s. Queste modifiche di tempo e temperatura si realizzano per verificare se essi entrano in gioco nella fase di polimerizzazione del monomero.

In questa fase i campioni vengono disposti al centro della camera, per i campioni bioattivi se ne posizionano 4 per volta, mentre per i campioni inerti, di superficie maggiore, solo 2 per volta.

5.1.6.2 Fase 2

Le prime analisi non hanno dato risultati soddisfacenti, soprattutto in termini di omogeneità del *coating* sui campioni, per ovviare a questa problematica si scelgono due strade distinte, una è quella di trattare i campioni per *dip coating* nell'oligomero e la seconda strada è utilizzare sempre la deposizione via plasma, ma apportando alcune correzioni e modifiche alla FASE1. Innanzitutto la correzione della posizione dei campioni nel piatto di lavoro in secondo luogo una modifica dei parametri di lavoro. In entrambi i metodi si decide di procedere non più con l'oligomero tal quale, ma in soluzione acida con metanolo.

Considerando la seconda strada intrapresa per verificare le posizioni in cui il *coating* dovrebbe essere uniforme ed omogeneo si fa una prova con un campione in policarbonato della stessa dimensione del piatto e si fa una deposizione via plasma di HDMSO per 900 s.

Si usa l'esametildisilossano perché si conosce che per trattamenti lunghi è possibile vederlo ad occhio nudo come un rivestimento bianco o come nel nostro caso di flange colorate in base all'inclinazione del campione alla luce.

Questa prova ci ha fatto comprendere che il monomero si andava a depositare in corrispondenza della circonferenza del catodo superiore, quindi verso l'esterno e non nella porzione interna dove erano stati depositati i campioni in FASE 1.

Si riportano ora i due protocolli eseguiti, DIP COATING e PLASMA.

1. DIP COATING

Tramite l'ausilio di una pipetta, si è fatto gocciolare la soluzione dell'oligomero sui campioni sia inerti che bioattivi e sempre prima pre-trattati.

Dopo di che i campioni così trattati sono stati messi ad asciugare vicino ad una lampada riscaldante per tre ore.

2. PLASMA

Si è introdotto nel *bubbler* la soluzione di F8815 e si sono sistemati i campioni nelle posizioni individuate come migliori, ovvero dove si è ipotizzato che il *coating* fosse più uniforme.

Questo processo di trattamento via plasma è stato caratterizzato da 5 prove per ottimizzare al meglio i parametri di lavoro: frequenza, tensione e tempistiche di trattamento. Per queste prove si sono utilizzati vetri inerti sia lucidati che non lucidati, ed entrambi i campioni bioattivi.

PROVA 0:

Si sono applicati gli stessi parametri della FASE 1, tuttavia la soluzione nel *bubbler* ha prodotto molte bolle, quindi si è abbassato il flusso di F8815 a 0,1-0,2 l/min, mantenendo il flusso di He a 4 l/min, la temperatura a 140 °C e si è aumentato il tempo di trattamento a 600 s.

Post-trattamento si è fatta una prova facendo cadere una goccia di acqua sul campione, la quale però si allargava molto sul substrato trattato, denotando l'idrofilia del campione e quindi l'assenza del *coating*.

PROVA 1:

Si è ridotto il flusso di He, perché se troppo elevato poteva disperdere maggiormente il F8815 e ridurre la sua capacità di "aggraffarsi" al campione. Si è fissato il flusso di He a 2 l/min, mantenendo costante quello del monomero, come anche i valori di temperatura, e tempo di trattamento.

Si è ripetuto il test della goccia che nuovamente si allargava molto sul substrato.

PROVA 2:

Si è modificato un altro parametro, questa volta un parametro del generatore, si è forzato il reattore a lavorare alla sua massima frequenza 20 kHz, mantenendo costante la tensione, i flussi sia di F8815 che del gas di trasporto, la temperatura e il tempo di trattamento.

Si è ripetuto il test della goccia d'acqua e si è notata una goccia più tondeggiante, ma dipendeva da dove la si faceva cadere, e quindi dalla posizione sul campione che dipendeva a sua volta dalla posizione in cui era situato nel piatto.

PROVA 3:

Si sono cambiati ulteriormente i parametri del generatore, questa volta forzandolo in tensione, si è alzato la tensione a 8 Kv, mantenendo costanti la frequenza, i flussi, la temperatura e il tempo di lavoro.

Tuttavia dopo metà del tempo (300 s) si è verificato un guasto e si è stati costretti a interrompere.

Nonostante il guasto, si è effettuata lo stesso la prova con la goccia di acqua e si è ottenuto un primo buon risultato, poiché la goccia era più tondeggiante, ed era visibile nelle posizioni dove si era ipotizzato che il flusso del monomero fosse più omogeneo, a conferma dell'ottimizzazione delle posizioni.

PROVA 4

Dopo la risoluzione del guasto si è deciso di lavorare ad una frequenza più bassa, 18 kHz, mantenendo costante la tensione e tutti gli altri parametri, ad eccezione del tempo, si è ridotta la durata a 300 s per evitare un eccessivo surriscaldamento della camera.

Si è fatto un ulteriore test con la goccia d'acqua e si formava di nuovo una goccia tondeggiante sempre in corrispondenza del punto in cui il campione era situato nella posizione di omogeneità del plasma.

La PROVA 4 è stata scelta come ottimizzazione migliore del processo, e si sono trattati campioni sia bioattivi che inerti in questa modalità.

Occorre fare un appunto, durante queste prove la temperatura della camera al momento in cui si avviava il trattamento era 140 °C, ma con il trascorrere del tempo, per le prime prove 600 s e poi 300 s, si è osservato un incremento elevato della temperatura anche fino a 170 °C per tempi lunghi e 160°C per tempi ridotti, quindi il sistema così ottimizzato non è termostato.

5.1.6.3 Fase 3

Anche in questa terza fase si è lavorato in due modalità differenti, una di *DIP COATING* a cui poi si è aggiunto un post-trattamento al plasma e una di sola deposizione via PLASMA.

1. DIP COATING + POST-TRATTAMENTO AL PLASMA

Si sono immersi i campioni nella soluzione di F8815, si sono lasciati asciugare per 24 ore e successivamente li si è tratta al plasma.

Il protocollo di trattamento è riportato in tabella 5.9.

Tabella 5.9 - Si riportano i parametri e i rispettivi valori per la fase di post-trattamento al plasma

Parametri	Valori
Frequenza	5 kHz
Tensione	6 kV
Flusso di Ar	10 l/min
Temperatura	20 °C
Tempo di trattamento	45 s

Si è utilizzato l'Ar perché genera meno idrofilia sul substrato trattato.

2. PLASMA

In questa fase si è di lavorare a due frequenze diverse per avere una modalità di confronto e verificare quale sia la migliore in termini di angolo di contatto sul campione.

I campioni sono stati posizionati nelle posizioni considerate le migliori nella FASE 2 e si sono usati i seguenti due protocolli. Il PROTOCOLLO 1 rappresentato nella tabella 5.10 e il PROTOCOLLO 2 rappresentato nella tabella 5.11.

Tabella 5.10 - Parametri e rispettivi valori utilizzati per il PROTOCOLLO 1

Parametri	Valori
Frequenza	18 kHz
Tensione	8 kV
Flusso di He	2 l/min
Flusso di F8815 in He	0,2 l/min
Temperatura	130 °C
Tempo di trattamento	600 s

Tabella 5.11 - Parametri e rispettivi valori utilizzati per il PROTOCOLLO 2

Parametri	Valori
Frequenza	12 kHz
Tensione	8 kV
Flusso di He	1 l/min
Flusso di F8815 in He	0,2 l/min
Temperatura	130 °C
Tempo di trattamento	600 s

Come si può osservare, rispetto al protocollo della FASE 2 si sono variati i flussi del monomero che si è nuovamente ridotto poiché creava troppe bolle nel *bubbler* e si è ridotta anche la temperatura nella camera per evitare un surriscaldamento eccessivo, sia per questioni di sicurezza sia per evitare una possibile denaturazione del monomero. Si è però aumentato il tempo di trattamento, con l'intenzione di depositare un *coating* più spesso. Si segnala che trascorsi i primi 300 s di trattamento, si interrompeva il trattamento per far raffreddare la camera di lavoro e riportarla a 130°C

5.1.6.4 Fase 4

In questa ultima fase si è proseguito il lavoro utilizzando l'F8815 puro e non in soluzione e nuovo fornito recentemente da Evonik, in quanto tramite l'analisi FTIR del F8815 tal quale ci si è accorti che l'oligomero che era stato utilizzato nelle FASI precedenti era parzialmente polimerizzato.

Anche in questa fase si è deciso di fare sia il procedimento via DIP COATING associato ad un post-trattamento al plasma sia il procedimento via PLASMA.

1. DIP COATING + POST-TRATTAMENTO PLASMA

Si sono immersi i campioni nel F8815 nuovo, da qui in avanti denominato F8815_new, e poi si è effettuato un post-trattamento al plasma per ottimizzare la polimerizzazione superficiale. I parametri utilizzati sono sempre gli stessi già utilizzati nella FASE 3.

2. VIA PLASMA

Si è deciso di provare a cambiare un altro parametro del reattore, la tensione e forzare così il sistema ad una tensione di 10 kV, tuttavia l'elevata tensione e scarica del plasma ha determinato la frattura del piatto in allumina.

A seguito dei numerosi fallimenti nella deposizione via plasma, principalmente dovuti a guasti, utilizzando frequenze o tensioni troppo elevate, che però hanno dimostrato dare i migliori effetti sulla polimerizzazione del monomero, si è deciso di proseguire la fase di caratterizzazioni con il protocollo di DIP COATING + PLASMA relativo alla FASE 4.

5.2 Caratterizzazioni

A seguito dei diversi trattamenti effettuati da IRIS, i campioni utilizzati per ciascun trattamento sono stati analizzati presso il Politecnico di Torino per studiare gli effetti che tali trattamenti hanno avuto sulle due tipologie di campioni.

Le analisi preliminari effettuate su tutti i campioni dalla FASE 1 alla FASE 4, per verificare la presenza o meno del *coating* fluorurato, sono stati il test statico dell'angolo di contatto con acqua (WCA) e la spettroscopia in trasformata di Fourier nell'infrarosso in modalità attenuata (ATR-FTIR). L'analisi WCA è servita ad avere una stima della bagnabilità della superficie e quindi come verifica della capacità del *coating* di rendere il substrato idrofobico, mentre l'analisi FTIR per investigare la chimica superficiale e riscontrare la presenza di gruppi -CF, caratteristici del F8815.

Dai risultati ottenuti da queste due prime analisi, effettuate al termine di ogni FASE di ottimizzazione, si sono modificati di conseguenza i parametri di deposizione passando poi alle FASI successive.

Considerando quindi i campioni della FASE 4, trattati con il protocollo ottimizzato, le analisi successive sono state: un'analisi al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) munito di spettroscopia a dispersione di energia (EDS) per investigare la morfologia e la composizione; per l'analisi topografica e profilometrica si è svolta un'osservazione al microscopio confocale a laser ottico; una misura del potenziale zeta per valutare la carica superficiale del materiale.

Per testare invece la reattività in vitro dei campioni bioattivi, SBA2 e S53P4, sono state realizzate prove di bioattività in soluzione fisiologica simulata (SBF) con studio della diffrazione dei raggi X (XRD), per verificare la presenza dell'idrossiapatite e nuovamente analisi morfologiche-composizionali. Inoltre, per caratterizzare le proprietà antiadesive e antibatteriche sono state svolte delle prove in vitro di coltura batterica nei laboratori di Novara al *CAAD research center*.

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 Bagnabilità: (WCA)

Il primo test che si è effettuato una volta rivestiti i campioni è stato la misura dell'angolo statico con acqua (WCA).

Distinguendo le varie FASI di ottimizzazione seguite, si riportano le misure più interessanti e salienti che hanno permesso di passare da uno step all'altro, nell'ottica di ottimizzare il processo di deposizione.

Prima di descrivere ciascuna fase si riportano nella figura 6.1 i valori medi e le rispettive deviazioni standard degli angoli di contatto statico con acqua (WCA) dei campioni tal quali, nel seguito riportati come NT.

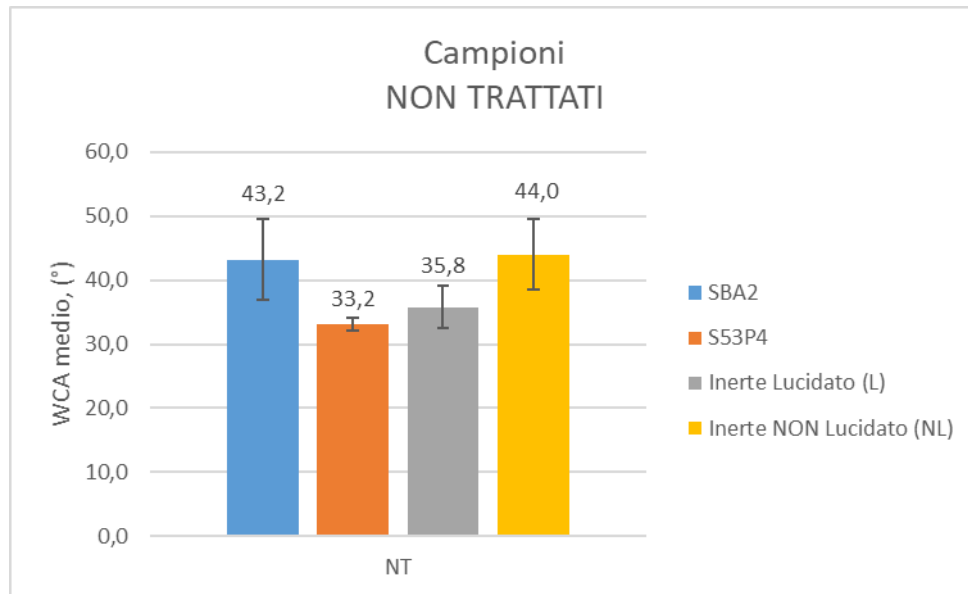


Figura 6.1 - Andamento dell'angolo di contatto e relativa deviazione standard, misurati sui campioni NT

FASE 1

Fase caratterizzata dalla deposizione via plasma, nelle condizioni riportate in Tabella, eseguendo due protocolli differenti per analizzare il comportamento del WCA in funzione di temperatura della camera e tempistiche di trattamento. Si sono posizionati i campioni al centro del piattello, i campioni bioattivi sono stati trattati quattro per volta, mentre i campioni inerti, che hanno una superficie maggiore sono stati trattati a coppie.

In questa fase, dei campioni bioattivi è stato analizzato solo il comportamento dello SBA2.

Considerando la figura 6.2, si vede che il campione di controllo non trattato (NT) ha un WCA quasi doppio a quello dei campioni trattati secondo i due protocolli differenti, si deduce quindi che sicuramente non c'è stata deposizione del *coating*, e poiché è addirittura inferiore al campione tal quale significa che il pre-trattamento ha prevalso sul trattamento di deposizione con F8815.

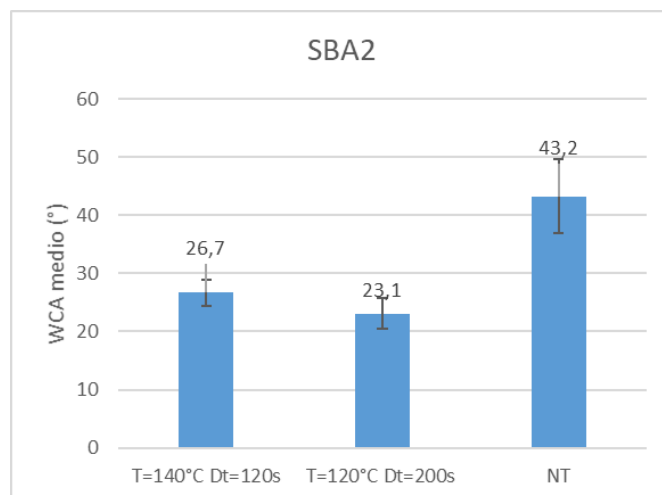


Figura 6.2 - Confronto del WCA tra i campioni trattati secondo il Protocollo 1 ($T=140^{\circ}\text{C}$ $Dt=120\text{ s}$) e Protocollo 2 ($T=120^{\circ}\text{C}$ $Dt=200\text{ s}$) rapportati sempre al campione di controllo NT

Diverso è il comportamento che si osserva nei vetri inerti da finestra (figura 6.3) sia per quelli lucidati che quelli non lucidati il valore di WCA è aumentato, in maniera particolare per il vetro lucidato (figura 6.3A) trattato per 200 s a 120°C che si discosta dal campione NT di circa il 30%.

Lo stesso fenomeno si nota anche nel caso del vetro non lucidato, ma è meno evidente (figura 6.3B).

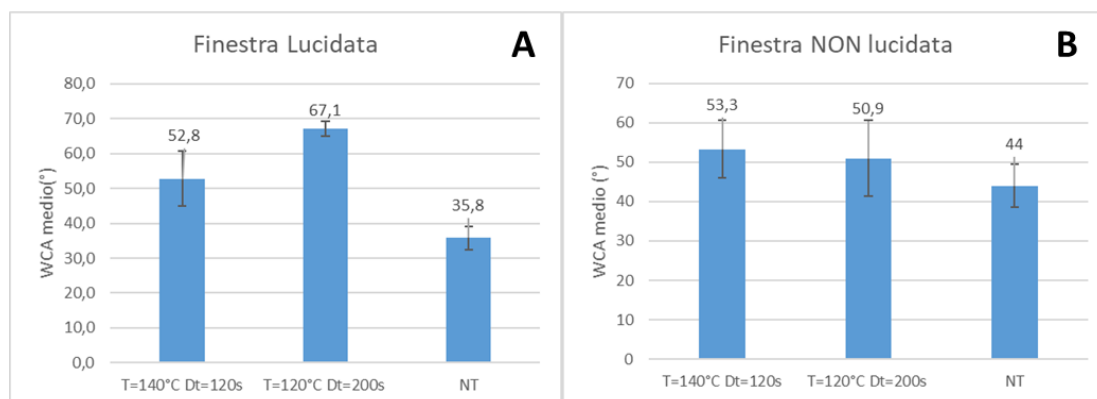


Figura 6.3 - Andamento del WCA per i vetri da finestra nei due protocolli distinti, in A per i campioni lucidati e in B per i campioni NON lucidati.

Si riporta infine in figura 6.4 il grafico di confronto tra vetri inerti lucidati e non lucidati, per mettere in evidenza quale dei due trattamenti sia quello che conferisce una maggiore proprietà idrofobizzante.

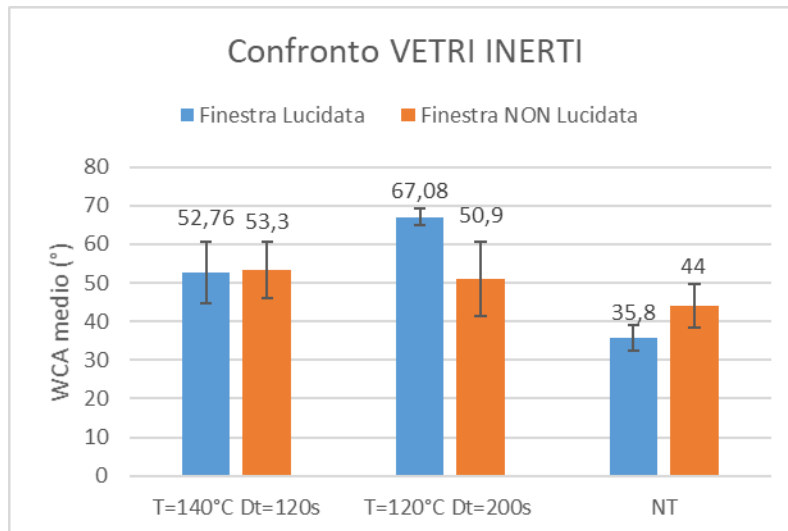


Figura 6.4 - Grafico complessivo di confronto tra campioni inerti lucidati e NON lucidati a seguito dei due protocolli di trattamento.

Dunque da questa analisi preliminare si deduce che sui campioni bioattivi di SBA2, il *coating* non si è depositato, mentre per i vetri inerti sembrerebbe che il protocollo 2, deposizione a temperatura più bassa, ma per un tempo più lungo, sia il migliore perchè, almeno nei campioni lucidati, fornisce una misura del WCA maggiore, anche se gli angoli misurati sono ancora molto più bassi di quelli riportati in letteratura (30)

FASE 2

La FASE 2 è caratterizzata da due modalità di deposizione utilizzando F8815 non più puro ma in soluzione acida con metanolo, in tabella sono riassunti i parametri usati per la deposizione via plasma.

Analizzando il protocollo di DIP COATING, si evince che il WCA sia per i campioni bioattivi (figura 6.5A) che inerti (figura 6.5B) è superiore ai 90°, quindi il *coating* realizzato conferisce al campione le proprietà idrofobiche tanto desiderate.

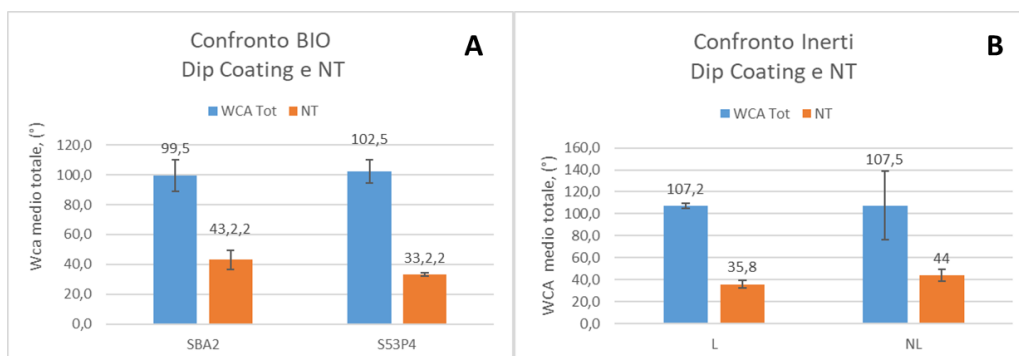


Figura 6.5 - Angoli di contatto a confronto con i campioni NT, in **A** per i vetri bioattivi e in **B** per i vetri inerti.

Si osserva che per i campioni bioattivi di piccole dimensioni, la deposizione di F8815, fatta tramite pipetta è più uniforme e questo lo si denota da una deviazione standard più bassa, perché il *coating* si è distribuito uniformemente sulla piccola superficie; questo non accade invece per i campioni inerti di superficie maggiore in cui la deposizione via pipetta e quindi facendo semplicemente gocciolare l'oligomero sul campione, ha creato dei pattern visibili in forma di aloni. La misura del WCA su questi

aloni risulta maggiore di quello in zone lontane; questa situazione è evidente sul campione non lucidato, in cui è ben visibile un alone sul quale si è provato a fare cadere due gocce in 2 posizioni differenti.

Quindi con questa procedura, sicuramente si conferisce idrofobicità al campione, ma non è ancora uniforme e quindi occorre ottimizzarla.

Analizzando invece il protocollo di deposizione via plasma, per i campioni bioattivi si ottengono i risultati riportati in figura 6.6 e si denota una grande differenza tra SBA2 e S53P4, per il primo si ha un incremento del WCA rispetto al campione di controllo e ci fornisce quindi una prima indicazione della deposizione del *coating*. Questo però non accade per il S53P4, che ha una grande deviazione standard, e il valore del WCA medio è paragonabile a quello del campione non trattato.

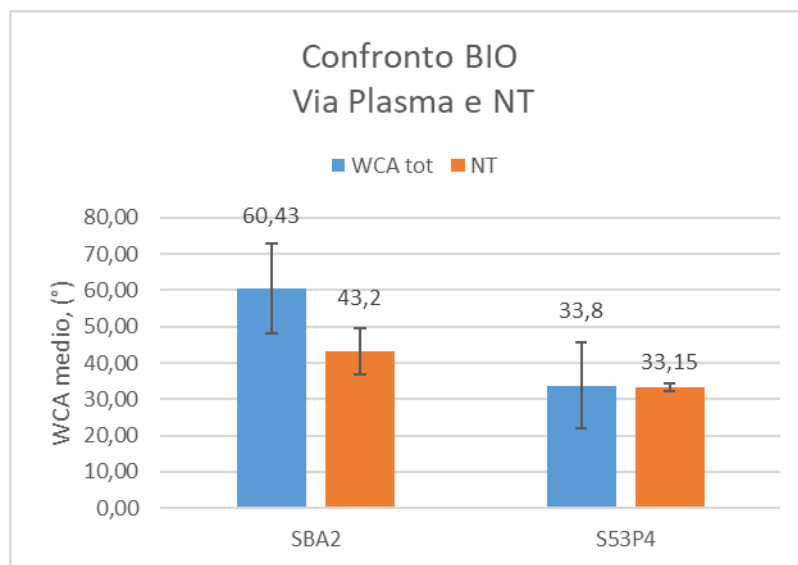


Figura 6.6 - WCA dei campioni bioattivi trattati tramite plasma

La situazione nei vetri inerti invece è notevolmente più complessa; come accennato al paragrafo 5.1.6.2 si individuano 3 posizioni (A, B, C) all'interno della camera dove si pensa che vi sia un flusso maggiore del F8815 e quindi una probabilità maggiore di una sua deposizione sui substrati.

Le posizioni scelte sono riportate in figura 6.7 e per ciascun vetro inerte trattato e analizzato si sono depositate 4 gocce di acqua in 4 posizioni diverse, denominati quadranti (quadrante 1, quadrante 2, quadrante 3, quadrante 4), in quanto in corrispondenza della circonferenza dell'elettrodo superiore della camera di trattamento, i quadranti esterni sembravano avere un'altonatura più evidente e quindi deposizione di *coating*, mentre i quadranti interni non sembravano essere luogo di deposizione dell'oligomero.

Si descrivono le ipotesi fatte

- posizione A: Alone più marcato nei quadranti 3-4
- posizione B: Alone più marcato nei quadranti 1-4
- posizione C: Alone più marcato nei quadranti 2-3

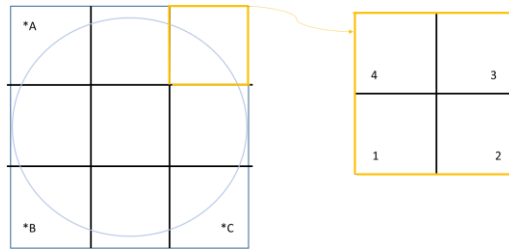


Figura 6.7 - Schema della configurazione del piatto in cui si depositano i campioni per il trattamento e dettaglio (in giallo) di un campione inerte diviso idealmente in 4 quadranti.

I parametri del plasma utilizzati sono stati due poiché in un primo momento si è alzata la frequenza a 20 kHz, ma in seguito ad un guasto si è dovuto abbassare a 18 kHz.

I campioni trattati a 20 kHz hanno dato dei buoni risultati, riportati in figura 6.8.

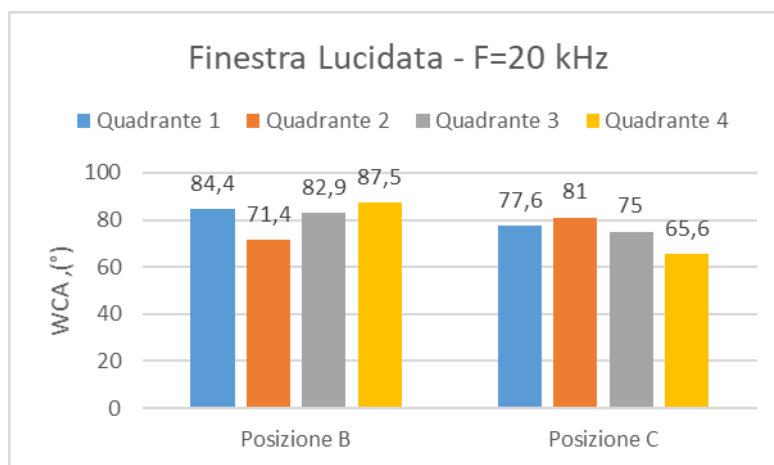


Figura 6.8 - WCA di due campioni inerti L nelle due posizioni B e C in funzione del quadrante in cui si è depositata la goccia. Trattamento al plasma con $F=20\text{ kHz}$

Le ipotesi fatte sulle posizioni e i quadranti sono rispettate per il campione in posizione B, in cui nei quadranti 1 e 4 si hanno più alti valori di WCA, raggiungendo nel quadrante 4 quasi i 90° ; nel campione in posizione C è rispettato nel quadrante 2 con un angolo di 81° .

Per visualizzare meglio questa differenza di WCA all'interno di uno stesso campione si sono realizzate anche grafici 3-D con l'ausilio del software Matlab. Si riporta in figura 6.9 un esempio del campione in posizione B.

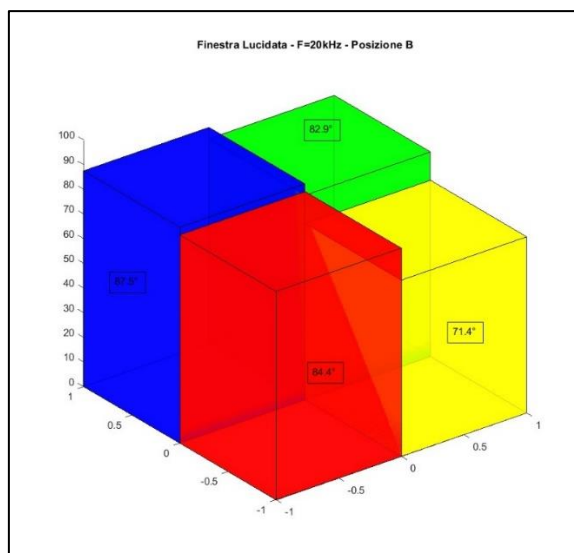


Figura 6.9 - Grafico 3D del WCA di un campione inerte L trattato a 20 kHz e sistemato nella posizione B. In colori diversi si evidenziano i 4 quadranti. Grafico realizzato tramite il software Matlab

Il quadrante in rosso è il quadrante 1, quello in giallo è il 2, quello in verde il 3 e infine quello in blu il 4 e ricordando che la posizione B è quella situata in basso a sinistra nel piattello, si nota bene come angoli maggiori e quindi maggiore effetto idrofobicizzante, sia presente nella porzione esterna della camera a discapito di quella interna, come se il flusso dell'oligomero tendesse a espandersi verso l'esterno anziché concentrarsi all'interno della camera.

A seguito del guasto si è dovuto modificare il parametro della frequenza abbassandola a 18 kHz, anche in questo caso si osserva nuovamente la presenza di un coating non uniforme sull'intera superficie del campione, ma come nel caso precedente si denota una distribuzione del WCA relativa alla posizione dei campioni nella camera, e altra cosa che si nota è una riduzione del WCA, se prima a frequenza di 20 kHz il WCA era superiore agli 80°, in corrispondenza dei quadrati in cui si ipotizzava la presenza del coating, in questo frangente il WCA decresce di una ventina di gradi.

In figura 6.10 si riporta come confronto il campione sempre nella posizione B ma di tipo non lucidato.

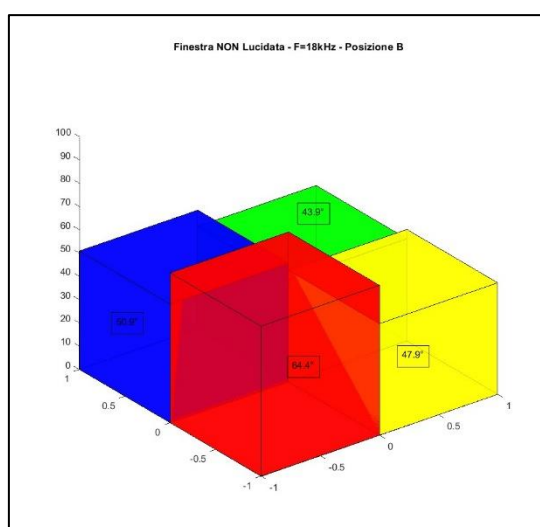


Figura 6.10 - Grafico 3D del WCA di un campione inerte NL trattato a 18 kHz e sistemato nella posizione B. In colori diversi si evidenziano i 4 quadranti. Grafico realizzato tramite il software Matlab.

Anche in questo caso i quadranti 1 e 4 hanno WCA maggiore dei restanti quadranti, ma un valore inferiore a quello trattato a 20 kHz.

Dunque l'analisi di questa FASE 2 ci ha portati a comprendere due fattori importanti per le ottimizzazioni successive, in primis le posizioni dei campioni all'interno della camera di lavoro sono da tenere in considerazione, perché in funzione di dove si sistema il campione, si avrà una maggiore o minore deposizione del *coating*. Questa osservazione porta anche all'idea di aumentare le tempistiche di trattamento, per dare più tempo a più monomero di depositarsi. Inoltre il fatto che il *coating* si disperda verso l'esterno della camera anziché restare in essa ha denotato la necessità di modificare e abbassare il flusso del gas di lavoro (He).

In secondo luogo il parametro della frequenza, anche se si sono effettuate un numero di prove inferiore con la frequenza settata a 20 kHz, ha dato risultati più promettenti, considerando che anche in letteratura sono utilizzate frequenze maggiori (31). Tuttavia, per il set-up presente in IRIS, l'utilizzo di frequenze troppo elevate non è possibile.

Si riporta a conclusione di questa FASE 2 un grafico (figura 6.11) di confronto relativo ai campioni inerti lucidati; solo quelli lucidati perché sono stati utilizzati in tutte le 4 condizioni di deposizione via plasma, due nella FASE1 usando come frequenza 5kHz e 2 nella FASE2 usando frequenze di 18kHz e 20kHz.

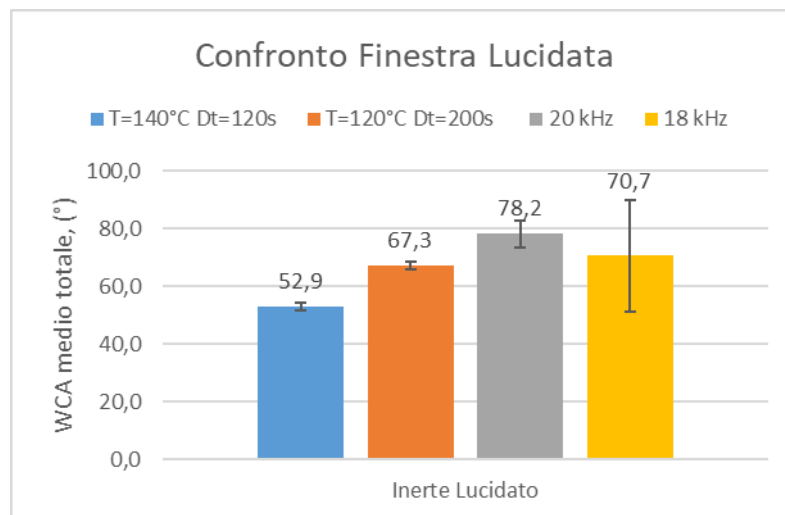


Figura 6.11 - Grafico di confronto per i WCA misurati nella FASE 1 con trattamento al plasma a 5 kHz (istogrammi azzurro e arancione) e nella FASE 2 alle due diverse frequenze, 18 kHz e 20 kHz.

FASE 3

A seguito dei risultati ottenuti nella FASE 2 si procede con un'ottimizzazione della deposizione via *dip coating*, immergendo direttamente il campione nella soluzione e successivamente lo si post-tratta al plasma.

Infine per il trattamento al plasma, si sono modificati alcuni parametri, tra cui i flussi di F8815, del gas di lavoro e le tempistiche e procedendo con 2 frequenze differenti a 18 kHz e a 20 kHz.

Per il protocollo di DIP COATING +PLASMA, i risultati che si ottengono sono riportati in figura 6.12 per i campioni bioattivi e in figura 6.13 per i campioni inerti.

Osservando la figura 6.12 lo SBA2 mostra un WCA ancora limitato, quindi si ipotizza che il post trattamento plasma possa interagire in qualche maniera, ancora non chiara, con lo stesso che è più reattivo rispetto al vetro S53P4 che invece presenta un buon aumento di WCA, valore in linea con i

valori di idrofobicità pensati per un campione bioattivo. Si ricorda che per i campioni bioattivi si vuole avere un rivestimento idrofobico, ma non eccessivo perché si vuole evitare l'adesione batterica, ma senza impedire l'adesione cellulare che anzi deve essere favorita.

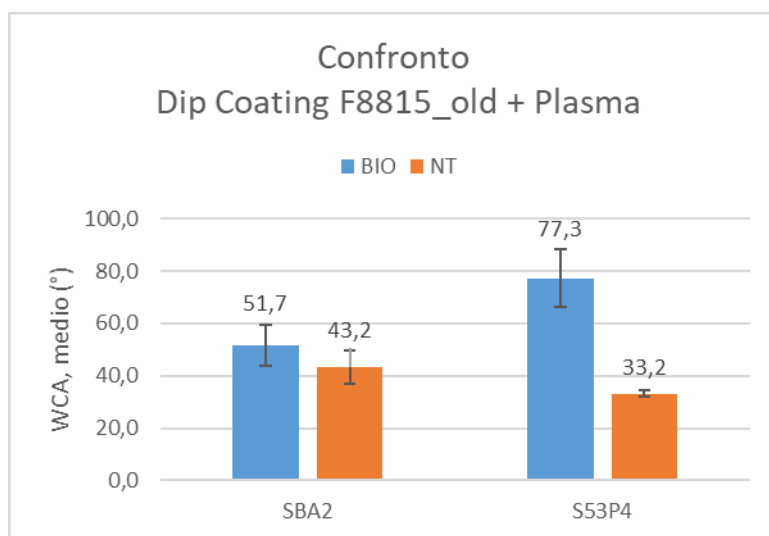


Figura 6.12 - WCA campioni bioattivi trattati via Dip Coating e post-trattati al plasma, con relativa deviazione standard

Per i vetri inerti in figura 6.13 si hanno degli ottimi risultati, sia per lucidato(L) che non lucidato (NL) il WCA è superiore ai 90°.

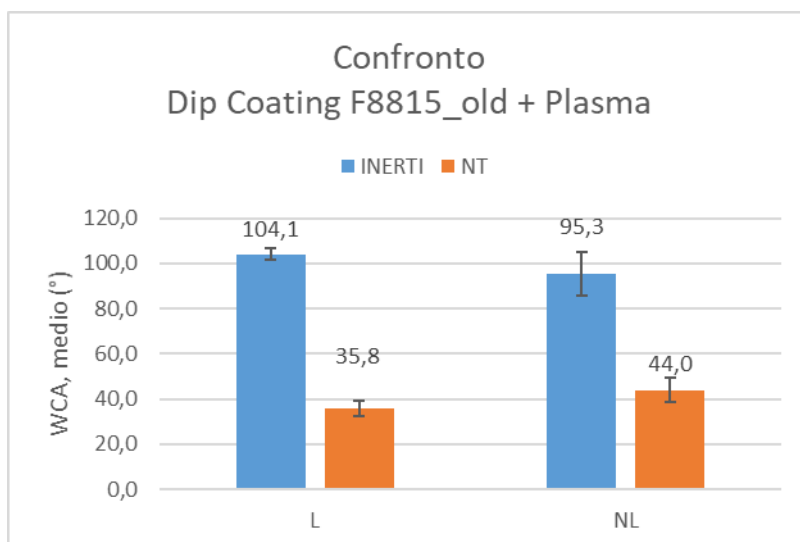


Figura 6.13 - WCA campioni inerti confrontando tra Lucidato e NON Lucidato, trattati via Dip Coating e post-trattati al plasma, con relativa deviazione standard.

Si considerino ora i protocolli di deposizione via plasma effettuati a 18 kHz e 20 kHz, sempre nelle 3 posizioni A, B, C, individuate nella FASE 2.

Si utilizzano sia campioni lucidati che non lucidati e per ciascun campione si fanno le 4 gocce nei 4 quadranti, e si osserva anche in questo caso una grande variabilità di angolo di contatto in funzione del quadrante in cui si effettua la misura.

Si riportano nella figura 6.14 la posizione A, in cui a 18 kHz si è lavorato su un campione lucidato (1) e a 20 kHz con un campione non lucidato (2).

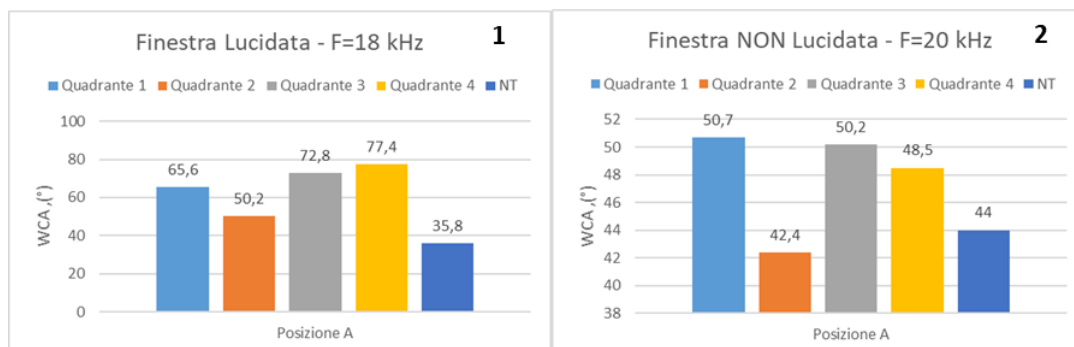


Figura 6.14 - Confronto dell'andamento del WCA su due campioni inerti sistemati nella stessa posizione A, ma di due tipologie diverse e trattati a due frequenze diverse. 1 - Campione lucidato trattato a 18 kHz. 2 - Campione NON lucidato trattato a 20 kHz.

Nella figura 6.15 la posizione B, in cui a 18 kHz si è lavorato su un campione non lucidato e a 20 kHz con un campione lucidato.

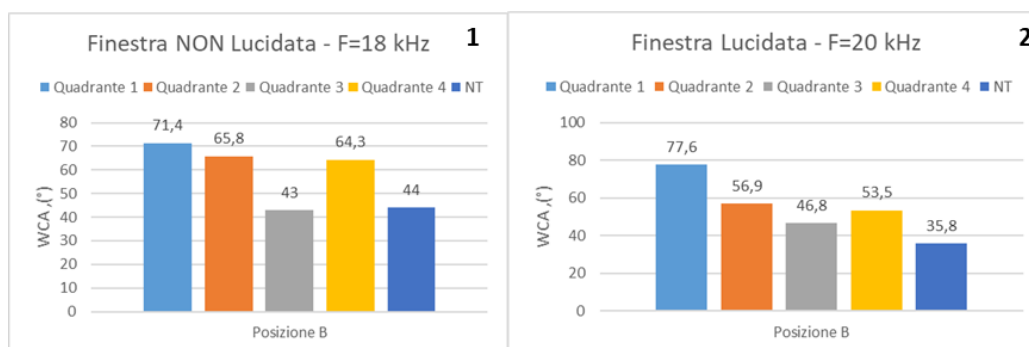


Figura 6.15 - Confronto dell'andamento del WCA su due campioni inerti sistemati nella stessa posizione B, ma di due tipologie diverse e trattati a due frequenze diverse. 1 - Campione NON lucidato trattato a 18 kHz. 2 - Campione lucidato trattato a 20 kHz.

Infine la posizione C, (figura 6.16) in cui a 18 kHz si è lavorato su un campione non lucidato e a 20 kHz con un campione lucidato.

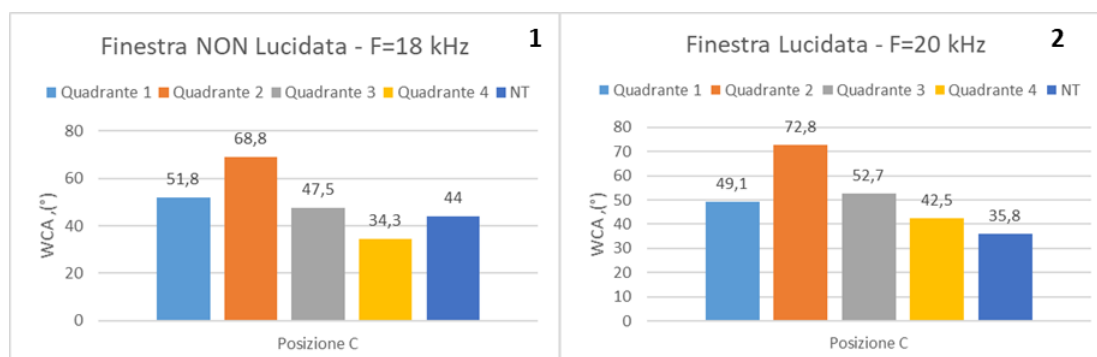


Figura 6.16 - Confronto dell'andamento del WCA su due campioni inerti sistemati nella stessa posizione C, ma di due tipologie diverse e trattati a due frequenze diverse. 1- Campione NON lucidato trattato a 18 kHz. 2- Campione lucidato trattato a 20 kHz.

E' possibile osservare che le variabili, posizione, angolo maggiore e quadrante sono rispettati nei due trattamenti, a 18 kHz e 20 kHz. Considerando la posizione C nella figura 6.16 al quadrante 2 corrisponde un angolo maggiore sia per il trattamento a 18 kHz sia per quello a 20 kHz, e ricordando le ipotesi, il quadrante 2 era quello dove sembrava si depositasse il *coating*, quindi resta confermata l'ipotesi delle posizioni dove è presente il F8815

La problematica che però si è presentata è che a frequenza maggiore non si ottengono più i risultati ottenuti in FASE 2, in media sui 90°.

Nella figura 6.17 si riportano i valori medi e le rispettive deviazioni standard di ciascuna posizione nel caso a 18 kHz e nel caso a 20 kHz, e da qui si può vedere come la deviazione standard è grande proprio a ribadire il concetto di non uniformità del trattamento in un singolo campione e poi come i WCA dei campioni a 18 kHz siano maggiori di quelli a 20 kHz.

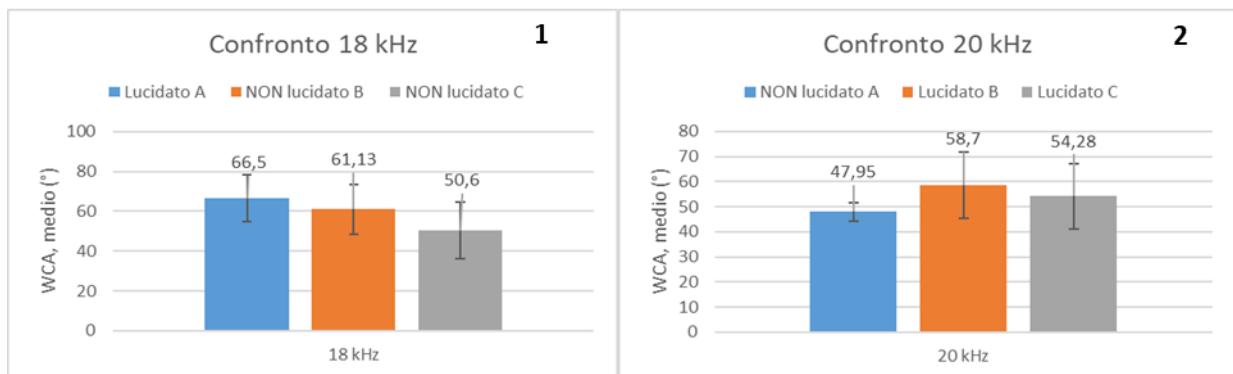


Figura 6.17 - WCA a confronto tra il trattamento a 18 kHz in 1 e quello a 20 kHz in 2 per campioni inerti differenti e in posizioni differenti.

Mentre nella figura 6.18 si riporta la media complessiva senza più tenere conto delle posizioni, anche in questo caso si evidenzia come a 20 kHz il WCA sia minore, in controtendenza a quello trovato nella fase precedente. La motivazione di questa situazione può dipendere innanzitutto dal numero di campioni analizzati, perchè nella FASE2 il trattamento a 20 kHz è stato applicato a soli due campioni entrambi lucidati e in due posizioni differenti, quindi la prova alla frequenza più elevata è stata fatta per un numero esiguo di campioni. In secondo luogo, si sono cambiati i parametri di flusso He e F8815, dato che l'oligomero presente nel *bubbler* sotto l'effetto del gas di trasporto generava bolle e per evitare che tali bolle arrivassero nella camera di lavoro si è dovuto abbassare il suo flusso.

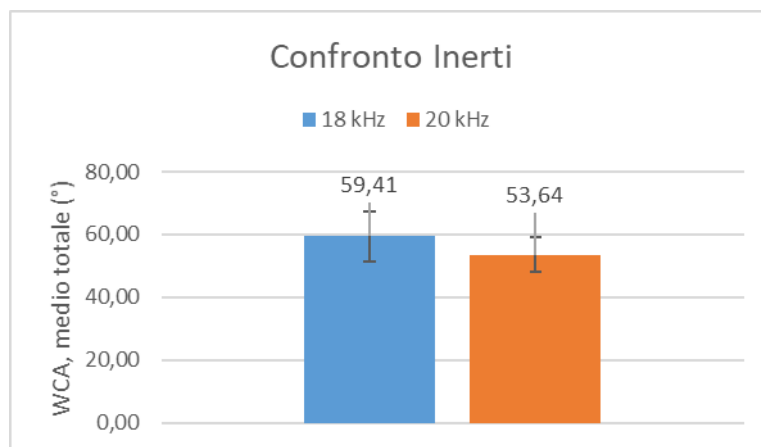


Figura 6.18 - WCA di confronto tra i due trattamenti senza tenere in considerazione la tipologia di campione inerte tra lucidato e NON lucidato e la sua posizione.

FASE 4

Poiché la deposizione via plasma ha continuato a dare problemi di uniformità e non si è stati in grado di ottimizzare al meglio i parametri non solo di flusso, ma anche di frequenza e tensione per successivi guasti che si sono verificati si è proceduto con il trattamento di *dip coating* + post-trattamento con plasma. Inoltre l'oligomero F8815 per la FASE 4 è stato sostituito con un campione nuovo, in quanto a seguito di analisi FTIR ci si è accorti che quello utilizzato per le prime 3 fasi presentava una iniziale cristallizzazione. In ultimo per questa fase l'oligomero denominato da qui in avanti F8815_new è stato utilizzato in forma pura e non più in soluzione acida con metanolo.

Nella figura 6.19 si riportano i campioni bioattivi e inerti trattati via *Dip Coating* e post-trattati plasma, con il F8815_new puro.

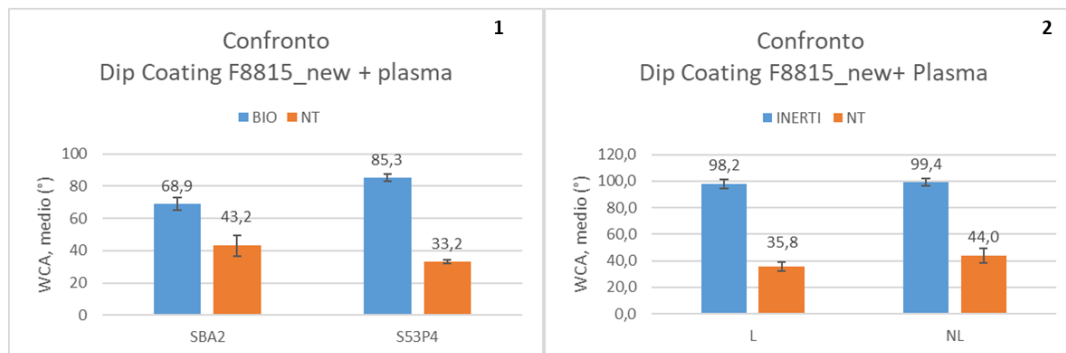


Figura 6.19 - WCA medio dei campioni bioattivi in 1 e inerti in 2 rapportati ai valori dei campioni di controllo.

Si riporta nella figura 6.20 il confronto diretto tra campioni trattati con F8815_old e F8815_new per osservarne meglio le differenze. Quello che si nota è che i campioni trattati con F8815_old hanno grande variabilità, visibile nella loro ampia deviazione standard, mentre i campioni trattati con F8815_new hanno deviazione standard inferiore. Inoltre è visibile che i campioni trattati con l'oligomero nuovo presentano un WCA maggiore, fatta eccezione per il campione lucidato, che presenta angolo maggiore e deviazione standard simile se trattato con F8815_old.

Si è deciso quindi di procedere con le analisi successive solo utilizzando questa classe di campioni, vetri bioattivi e inerti trattati via *dip coating* nell'oligomero nuovo e post-trattati al plasma.

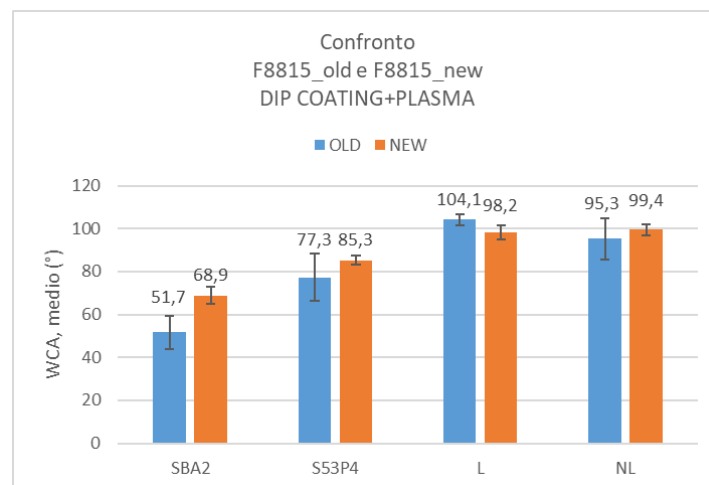


Figura 6.20 - WCA di confronto a seguito del trattamento *dip coating* + plasma, in azzurro utilizzando F8815_old in soluzione acida con metanolo e in arancione utilizzando F8815_new puro.

Al termine delle 4 FASI e alla luce dei risultati ottenuti, si è deciso quindi di procedere con le analisi successive solo utilizzando questa classe di campioni, vetri bioattivi e inerti trattati via *dip coating* nell'oligomero nuovo e post-trattati al plasma

6.2 Chimica superficiale: FTIR

Si riportano in figura 6.21 gli spettri FTIR del F8815 utilizzato nelle prime 3 fasi denominato F8815_old e quello dell'oligomero acquistato successivamente denominato F8815_new ed è possibile individuare alcune differenze che ci hanno permesso di capire che probabilmente l'oligomero F8815_old era in parte polimerizzato.

Per completezza si riporta in figura 6.22 lo spettro del F8815 ricavato in letteratura e che ci ha permesso di capire che l'F8815_old presentava non solo i picchi caratteristici del monomero ma anche altri picchi dovuti probabilmente ad una parziale polimerizzazione.

Dalla figura 6.21 si vede che lo spettro del F8815_old, presenta picchi nelle λ comprese tra 1000 e 1500 cm^{-1} , non presenti in quello in rosso (new).

I picchi caratteristici del F8815 che denotano la presenza del gruppo fluoroalchile sono i picchi nella banda 1241-1206 cm^{-1} dovuti allo *stretching* di CF e una banda più attenuata a 696 cm^{-1} associata allo *scissoring* del CF_2 .

Inoltre l'F8815, da struttura molecolare, presenta anche un ammino gruppo primario che si ritrova in due picchi uno a 806 cm^{-1} e l'altro a 776 cm^{-1} rappresentativi del *bending* e ancora un picco a 1639 cm^{-1} relativo al suo *stretching*. La presenza invece del gruppo $-\text{OH}$ lo ritroviamo nella banda tra 3000 e 3600 cm^{-1} .

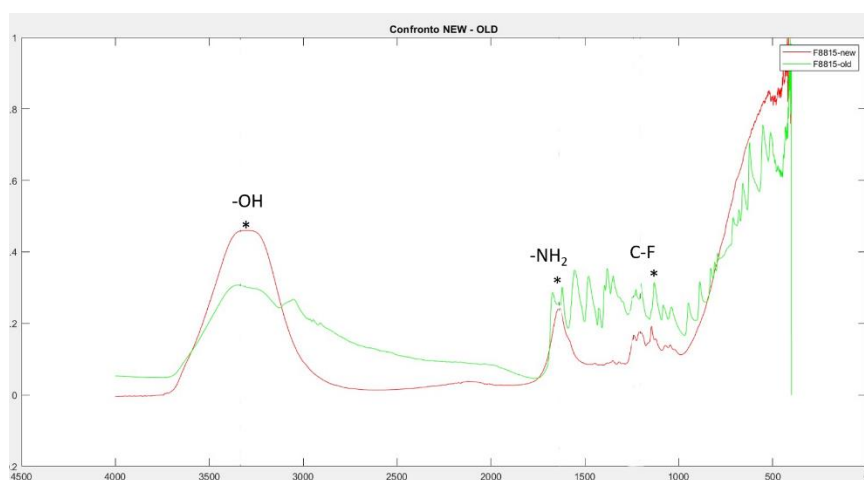


Figura 6.21 - Sovrapposizione dei due spettri F8815_old in verde e quello di F8815_new in rosso. Con * si indicano i picchi caratteristici del F8815: 1241 e 1206 cm^{-1} dello *stretching* del CF, 696 cm^{-1} dello *scissoring* del CF_2 , 1639 cm^{-1} dello *stretching* del NH_2 e la banda degli $-\text{OH}$ tra 3000 e 3600 cm^{-1}

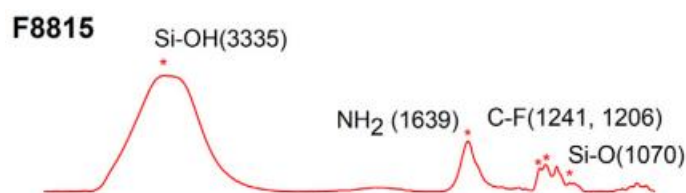


Figura 6.22 - Spettro FTIR dell'oligomero F8815. (30)

Di seguito, come fatto per l'analisi dell'angolo di contatto statico, per ogni fase si riportano gli spettri più rappresentativi delle varie FASI di ottimizzazione effettuate.

I gruppi funzionali con cui l'oligomero può legarsi al substrato vetroso sono i gruppi $-OH$ e i gruppi amminici $-NH_2$.

Per tutte le FASI di trattamento analizzate la banda dei gruppi $-OH$ tra 3000 e 3600 cm^{-1} non è mai presente, quindi c'è la certezza che il legame al substrato avvenga tramite i suddetti gruppi funzionali, come si riporta in figura 6.23. Per quanto riguarda invece i gruppi amminici, la situazione è diversa e dipende dal tipo di trattamento che si effettua per depositare il F8815 sul substrato, e verrà citato nel proseguo del paragrafo.

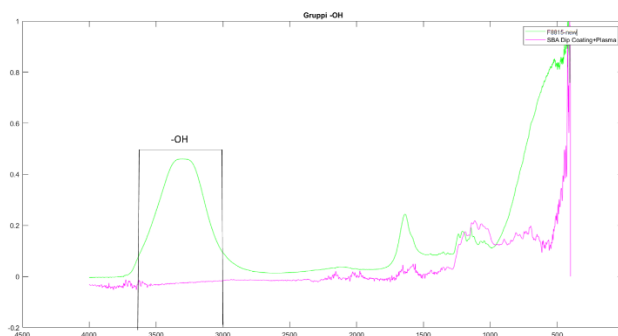


Figura 6.23 - Spettro FTIR del campione SBA2 trattato via Dip Coating + Plasma sovrapposta a quella del F8815_new a dimostrazione dell'assenza della banda dei gruppi $-OH$.

FASE 1

Dall'analisi FTIR, il primo picco che si è andato a cercare è stato quello del CF a 1241 cm^{-1}

Come si denota nella figura 6.24, gli spettri dei campioni sia inerti (campione lucidato) che bioattivi (campione SBA2), trattati con i 2 protocolli, seguono molto bene quello dei rispettivi campioni non trattati, quindi questo ha dimostrato la non presenza del *coating* sul substrato e quindi la necessità di apportare delle modifiche riportate poi nella FASE 2.

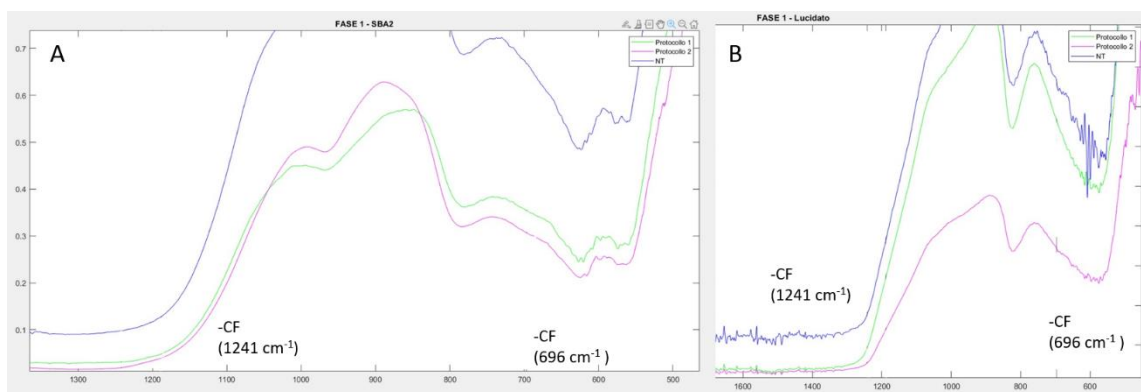


Figura 6.24 - Spettri FTIR zoomati alle λ $1600-600\text{ cm}^{-1}$ per centrare le λ di interesse del CF_2 . Si riportano le sovrapposizioni degli spettri FTIR dei due protocolli utilizzati, rilevati per il campione SBA2 in A e per il campione lucidato in B. Non si osservano picchi in corrispondenza delle λ di interesse.

FASE 2

Poiché nella fase precedente non si è osservata la presenza del picco del -CF, si è proceduto con i due protocolli già descritti di DIP COATING e PLASMA a frequenze maggiori.

In figura 6.25 si riporta per i campioni bioattivi la sovrapposizione dei due protocolli DIP COATING e PLASMA, per ciascuna tipologia di campione in modo tale da osservare bene la presenza o l'assenza dei picchi caratteristici del fluoroalchile.

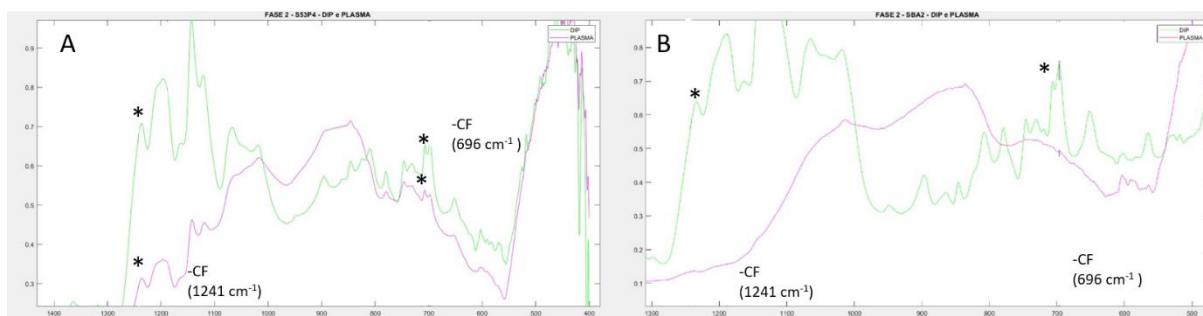


Figura 6.25 - Spettri FTIR zoomati alle λ 1300-400 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del CF_2 . Si riportano le sovrapposizioni degli spettri FTIR dei protocolli utilizzati in FASE 2 (Dip Coating in verde e Plasma in fuxia), rilevati per il campione SBA2 in A e per il campione lucidato in B. Contrassegnati con * si evidenziano i picchi del CF_2 ricercati.

Per il campione S53P4, i picchi di CF sono presenti sia nel caso di DIP COATING che nel caso del trattamento PLASMA, cosa ben diversa accade invece per il vetro SBA2, in cui i picchi caratteristici sono presenti solo nel metodo DIP COATING, e non sono visibili nel trattamento al plasma.

Anche per i vetri inerti il metodo DIP COATING risulta essere un buon protocollo in quanto, come si vede in figura 6.26, sia per il vetro lucidato che quello non lucidato si osservano i picchi caratteristici del CF_2 .

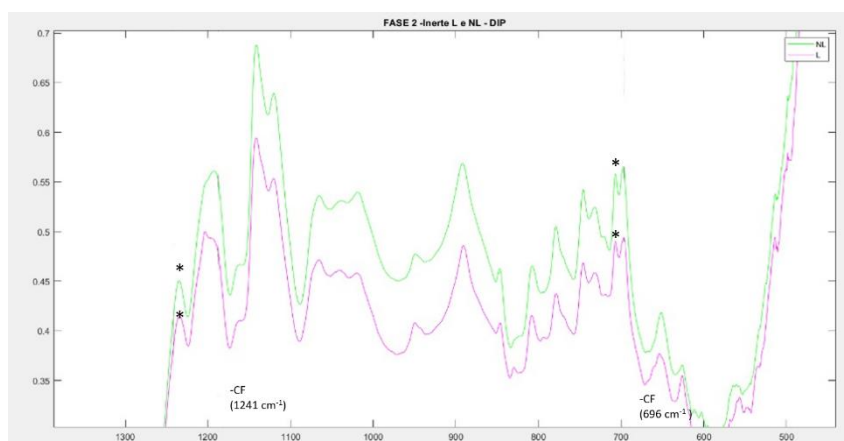


Figura 6.26 - Spettro FTIR zoomato alle λ 1300-500 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del CF_2 . Si riportano le sovrapposizioni degli spettri FTIR del protocollo dip coating per i campioni inerti, lucidato in fuxia e non lucidato in verde. Contrassegnati con * si evidenziano i picchi del CF_2 ricercati

Sempre considerando i vetri inerti, ma questa volta trattati al PLASMA, si considera lo spettro relativo al campione in posizione C, che ha fornito per il trattamento a 20 kHz un WCA ottimale, messo a confronto con un altro campione sempre in posizione C ma trattato a 18 kHz. Come si può vedere in figura 6.27, quello trattato a 20 kHz (fuxia) presenta dei picchi del CF_2 più marcati rispetto a quelli del

campione trattato ad una frequenza inferiore, ma pur sempre presenti. Questo rimarca il fatto che a frequenze più alte sui campioni inerti si ha deposizione del *coating* fluorurato.

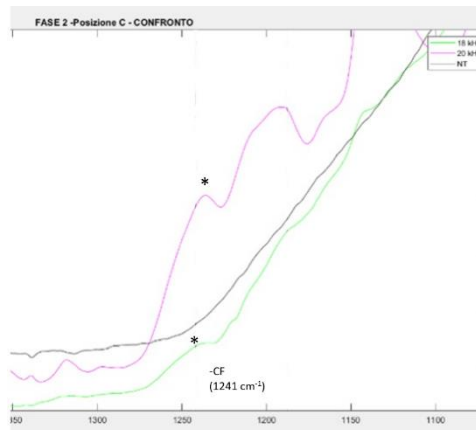


Figura 6.27 - Spettro FTIR zoomato alle λ 1300-1100 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del CF_2 . Si riportano le sovrapposizioni degli spettri FTIR dei protocolli utilizzati in FASE 2 relativi al trattamento Plasma, rilevati per il campione inerte sistemato nella posizione C e trattato a 20 kHz in fuxia e a 18 kHz in verde. In nero si riporta lo spettro del campione tal quale. Contrassegnati con * si evidenziano i picchi del CF_2 ricercati

Considerando invece i picchi relativi al gruppo amminico, si osserva che nei campioni trattati via DIP COATING i picchi caratteristici sono presenti, come evidenziato nella figura 6.28 che rappresenta i vetri bioattivi con sovrapposizione dello spettro via DIP COATING in verde e quello via PLASMA in fuxia, e in entrambi i vetri si osservano i picchi solo nello spettro del campione trattato per immersione nell'oligomero, quelli trattati al plasma hanno invece uno spettro piatto.

Gli stessi picchi si osservano anche per i campioni inerti Lucidato e non trattati via DIP COATING, nella figura 6.29.

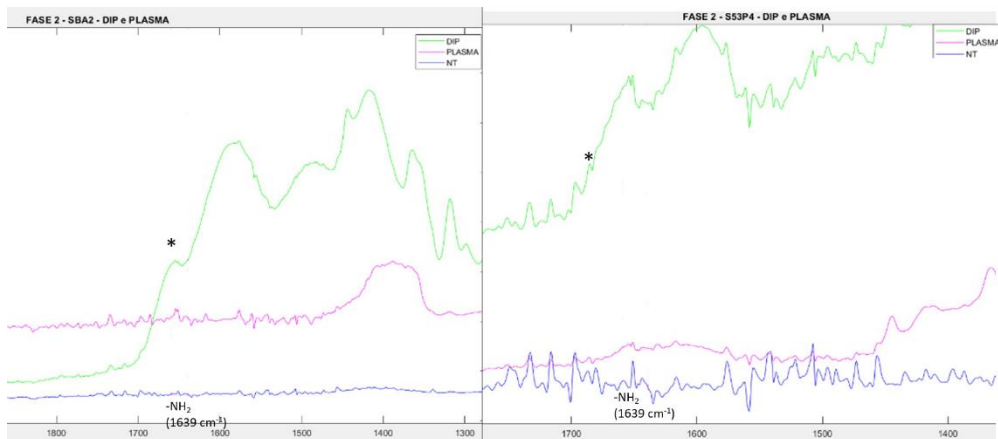


Figura 6.28 - Spettri FTIR zoomati alle λ 1800-1400 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del NH_2 . Si riportano le sovrapposizioni degli spettri FTIR dei protocolli utilizzati in FASE 2 (dip Coating in verde e Plasma in fuxia), rilevati per il campione SBA2 in A e per il campione S53P4 in B. Contrassegnati con * si evidenziano i picchi del NH_2 ricercati

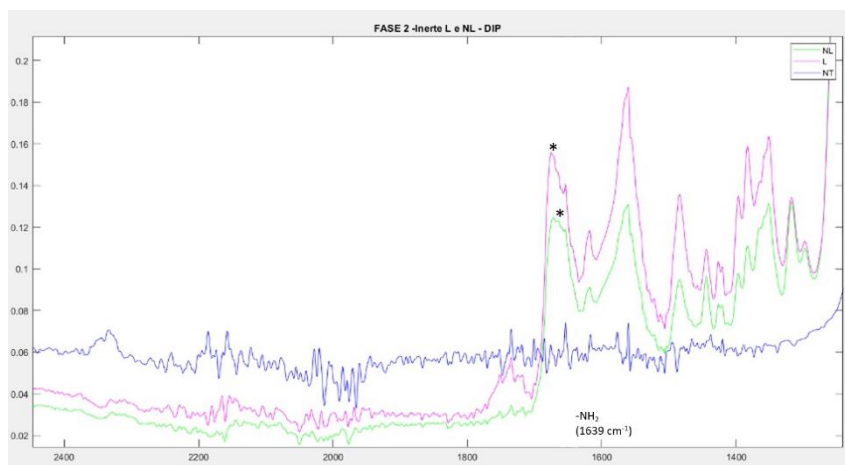


Figura 6.29 - Spettro FTIR zoomato alle λ 2400-1400 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del NH_2 . Si riportano le sovrapposizioni degli spettri FTIR del protocollo di Dip Coating utilizzato in FASE 2 rilevati per il campione non lucidato in verde e per il campione lucidato in fuxia. Contrassegnati con * si evidenziano i picchi del NH_2 ricercati.

I picchi del gruppo amminico non sono presenti, invece, nei campioni inerti trattati al plasma relativi al campione in posizione C, come si vede in figura 6.30.

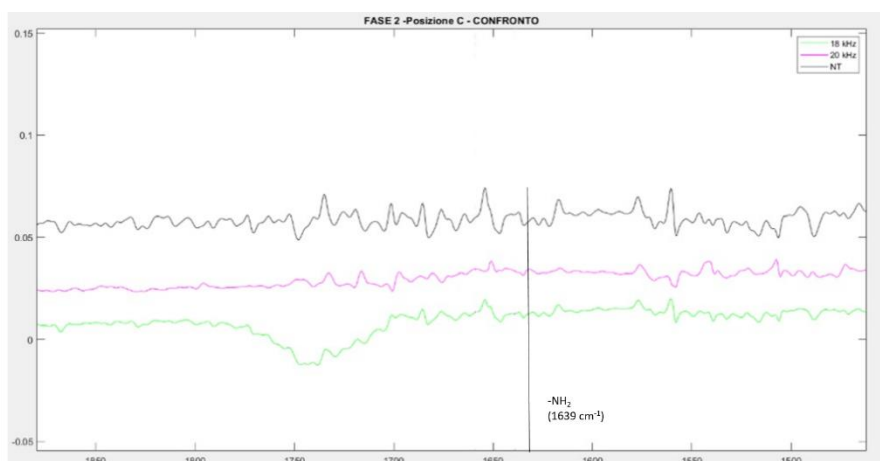


Figura 6.30 - Spettro FTIR zoomato alle λ 1800-1500 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del NH_2 . Si riportano le sovrapposizioni degli spettri FTIR dei due trattamenti plasma utilizzati in FASE 2 rilevati per il campione inerte sistemato in posizione C, trattato a 20 kHz in fuxia e a 18 kHz in verde. Contrassegnati con * si evidenziano i picchi del NH_2 ricercati.

Dunque da questa seconda analisi degli spettri FTIR, si sono tratte alcune osservazioni finali; innanzitutto la deposizione del coating via DIP COATING, garantisce l'adesione dell'oligomero al substrato, perché in tutti i campioni, bioattivi e inerti i picchi caratteristici del CF_2 sono presenti, non si può dire la stessa cosa nel caso del trattamento via PLASMA, in cui i picchi caratteristici del CF_2 sono presenti e ben visibili solo nel campione inerte trattato a 20 kHz e non in quelli bioattivi. Per quanto riguarda i picchi di NH_2 essi danno un'informazione relativa al meccanismo di adesione dell'oligomero al vetro e sembra che essi entrino a far parte della reazione di polimerizzazione e adesione del monomero al substrato quando si applica il trattamento al plasma, in quanto il picco sparisce dallo spettro, mentre è ben visibile nei campioni trattati via DIP COATING.

FASE 3

In questa terza fase si vanno a ricercare i picchi CF_2 e NH_2 nei due protocolli utilizzati, Dip Coating + Plasma e Plasma a due frequenze differenti.

Considerando il solo trattamento Plasma, si riportano in figura 6.31 gli spettri di un campione bioattivo S53P4 (A) e di un campione inerte sistemato nella posizione C (B) confrontando lo spettro a 18 kHz e 20 kHz per ciascuna tipologia di campione.

Come si può osservare, gli spettri nell'intorno delle λ caratteristiche del CF_2 sono piatti, denotando l'assenza del *coating* fluorurato.

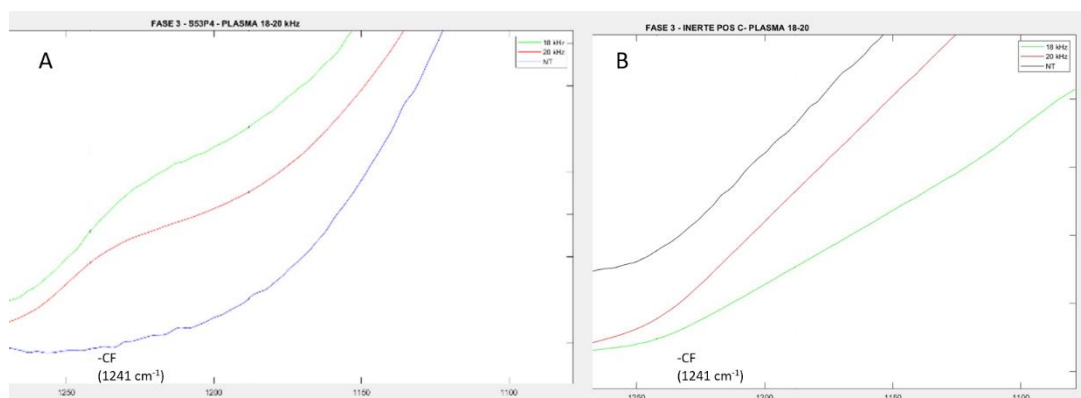


Figura 6.31 - Spettri FTIR zoomati alle λ 1200-1100 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del CF_2 . Si riportano le sovrapposizioni degli spettri FTIR dei due trattamenti plasma utilizzati in FASE 3 rilevati per il campione bioattivo S53P4 (A) e quello inerte(B) sistemato in posizione C, ognuno trattato a 20 kHz in rosso e a 18 kHz in verde

Si opera nello stesso modo per individuare i gruppi -NH_2 , ma in entrambi gli spettri non sono stati trovati, per questa ragione si è preferito non inserire alcuna immagine.

Considerando invece il trattamento *Dip Coating* + Plasma, per i campioni bioattivi sia il gruppo NH_2 che il gruppo CF_2 si sono individuati negli spettri, si riportano solo quelli relativi al campione SBA2 in Figura 6.32, il campione S53P4 presenta lo stesso comportamento.

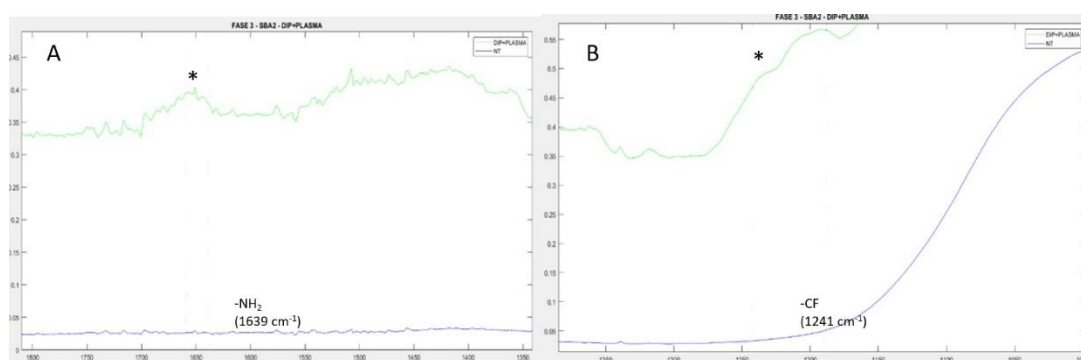


Figura 6.32 - Spettri FTIR del trattamento *Dip Coating* + Plasma per il campione bioattivo SBA2. In A lo zoom è alle λ 1800-1300 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del NH_2 , in B lo zoom invece è alle λ 1300-500 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del CF_2 . Contrassegnati con * si evidenziano i picchi del CF_2 e NH_2 ricercati.

Lo stesso si ripete per i campioni inerti in figura 6.33, sovrapponendo il caso del vetro lucidato e non lucidato. In questo caso il gruppo NH_2 in A sembra essere presente solo sul campione lucidato; mentre il gruppo CF_2 è presente in entrambi come si vede in B.

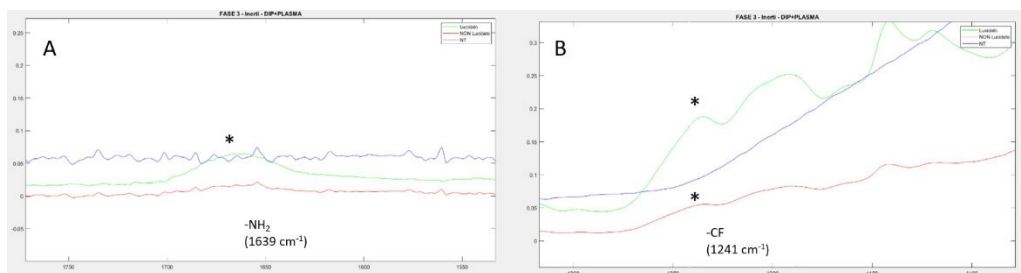


Figura 6.33 - Spettri FTIR del trattamento Dip Coating + Plasma per i campioni inerti. In A lo zoom è alle λ 1700-1500 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del NH_2 , in B lo zoom invece è alle λ 1300-1100 cm^{-1} per centrare le λ di interesse del CF_2 . Contrassegnati con * si evidenziano i picchi del NH_2 e del CF_2 ricercati.

Quindi al termine della terza fase si è compreso che le ottimizzazioni apportate ai parametri di lavoro del plasma (frequenza e tensione) non sono state sufficienti a permettere di comprendere la presenza o meno dell'oligomero sul substrato, poichè i picchi relativi al CF_2 , non si sono osservati su nessun campione caratterizzato. Le motivazioni dell'assenza dei picchi potrebbero essere innanzitutto la non uniformità del trattamento, come visto nei precedenti risultati del WCA, in funzione di dove si fa cadere la goccia il substrato presenta minore o maggiore idrofobicità e di conseguenza poichè la FTIR è una misura puntuale, ovvero si fa in un solo punto del campione, è possibile che nell'area sottoposta a FTIR il CF_2 non sia presente. Altra motivazione potrebbe essere uno spessore del *coating* troppo sottile e quindi non rilevabile dallo strumento.

Per il secondo tipo di trattamento affrontato, il *Dip Coating* associato ad un post trattamento plasma, i picchi del F8815 sono visibili in tutti i campioni e pertanto si è preferito procedere indagando questa tecnica di rivestimento.

FASE 4

Relativamente a questa fase si riporta un confronto tra l'utilizzo del F8815 in soluzione con metanolo denominato F8815_old applicato per le FASI 2 e 3 e l'oligomero identico, ma nuovo e puro denominato F8815_new, per verificare eventuali cambiamenti nello spettro.

Come esempio dimostrativo si riportano in figura 6.34 un vetro bioattivo in A e un vetro inerte in B, in entrambe le tipologie sia per lo spettro del trattamento con F8815_new che per quello con F8815_old sono presenti i picchi del CF_2 .

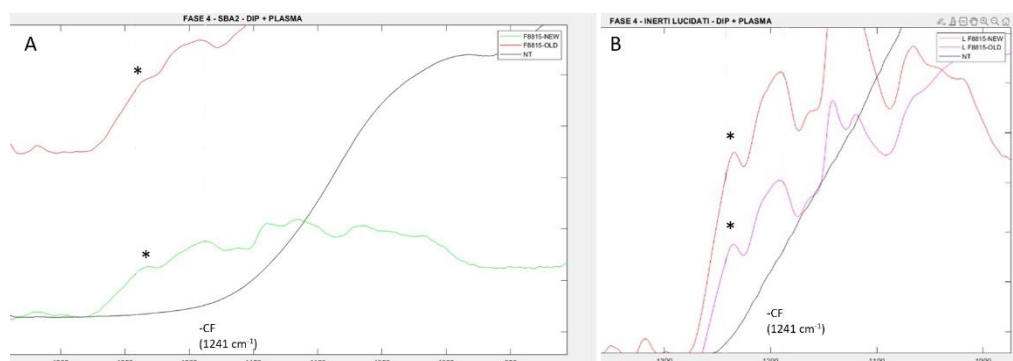


Figura 6.34 - Spettri FTIR del trattamento Dip Coating + Plasma per lo SBA2 in A e per il vetro inerte lucidato in B. In entrambi lo zoom è realizzato per centrare le λ tra 1300 e 1000 cm^{-1} per mostrare i picchi di interesse del F8815. Contrassegnati con * si evidenziano i picchi del CF_2 .

Da quest'ultimo confronto si è compreso che relativamente alla composizione chimica, utilizzare l'F8815_old oppure l'F8815_new non ha effetti, ma poiché quello "old" ha mostrato una parziale cristallizzazione e dalle analisi del WCA i campioni così trattati hanno anche angoli mediamente inferiori rispetto a quelli trattati con F8815_new, la scelta sul tipo di oligomero da utilizzare è ricaduta su quest'ultimo.

Tutte le caratterizzazioni descritte nei paragrafi successivi sono relative all'ultima ottimizzazione della FASE4, ovvero trattamento dei campioni bioattivi e inerti tramite *Dip Coating* in F8815_new e un successivo trattamento al plasma con Ar.

6.3 Topografia e rugosità: microscopia confocale a laser ottico

Per valutare l'effetto della topografia dei campioni a seguito del trattamento al plasma nella FASE 4 si è effettuato un confronto con i campioni trattati solo via DIP COATING.

Si riportano nell'istogramma in figura 6.35 i valori di rugosità estratti dalle misure eseguite al microscopio confocale

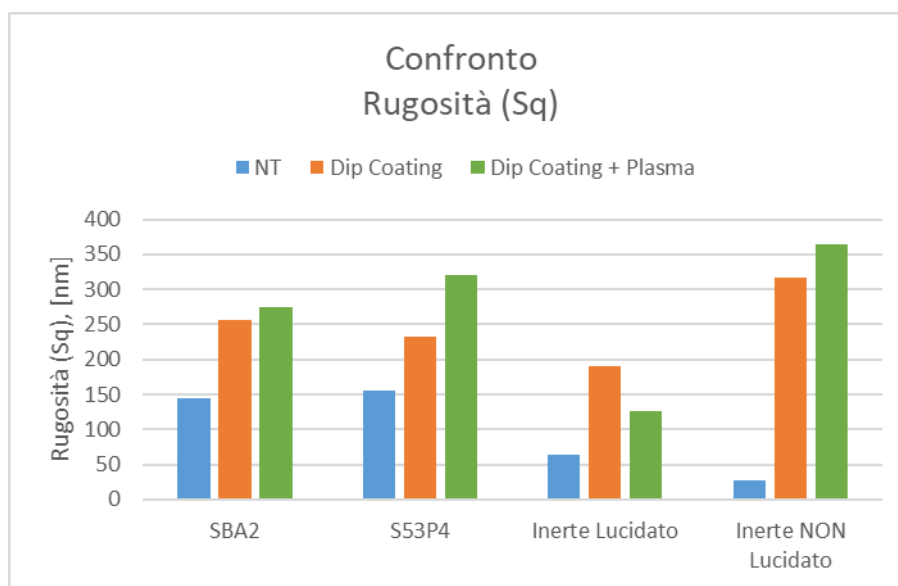


Figura 6.35 - Valori di rugosità in termini di media quadratica (Sq) misurati dal software. Si riportano per ciascuna tipologia di campione i valori prima del trattamento (NT) e dopo i due trattamenti (Dip Coating e Dip Coating+Plasma)

Si osserva per i due campioni bioattivi e per il campione inerte non lucidato lo stesso andamento di rugosità crescente dal campione tal quale al campione prima trattato solo via *dip coating* e poi post-trattato con plasma. Il vetro inerte lucidato, invece, è in controtendenza, ha rugosità inferiore sia per il primo trattamento (*dip-coating*) che per il secondo (*dip coating*+ plasma) inferiore a quello di tutti gli altri campioni, sarebbe necessario un altro campione per convalidare questo andamento.

Si riportano in figura 6.36 le catture svolte con il microscopio confocale in modalità ottica ad ingrandimento 30x, nelle tre condizioni NT, *Dip Coating* e *Dip Coating*+Plasma.

Come si può osservare per i campioni NT SBA2, S53P4 e inerte lucidato si osservano bene le righe di lucidatura, assenti nel campione non lucidato. Per i campioni trattati a questo ingrandimento la differenza tra trattamento di solo *Dip Coating* e quello di *Dip Coating* + Plasma non è così ben osservabile, sembrano molto simili, caratterizzati da zone a macchie o con piccoli forellini come se in quei punti il *coating* a seguito dell'asciugatura si fosse increspato.

Nei campioni trattati con *Dip Coating* si osserva anche un'opalescenza del substrato dovuto alla luce utilizzata dallo strumento per visualizzare i campioni, cosa che non si nota nei campioni *Dip Coating* + Plasma, questi ultimi presentano però una morfologia più omogenea, evidente osservando il campione S53P4 o i campioni inerti, in cui sembra ci sia un pattern superficiale uniforme.

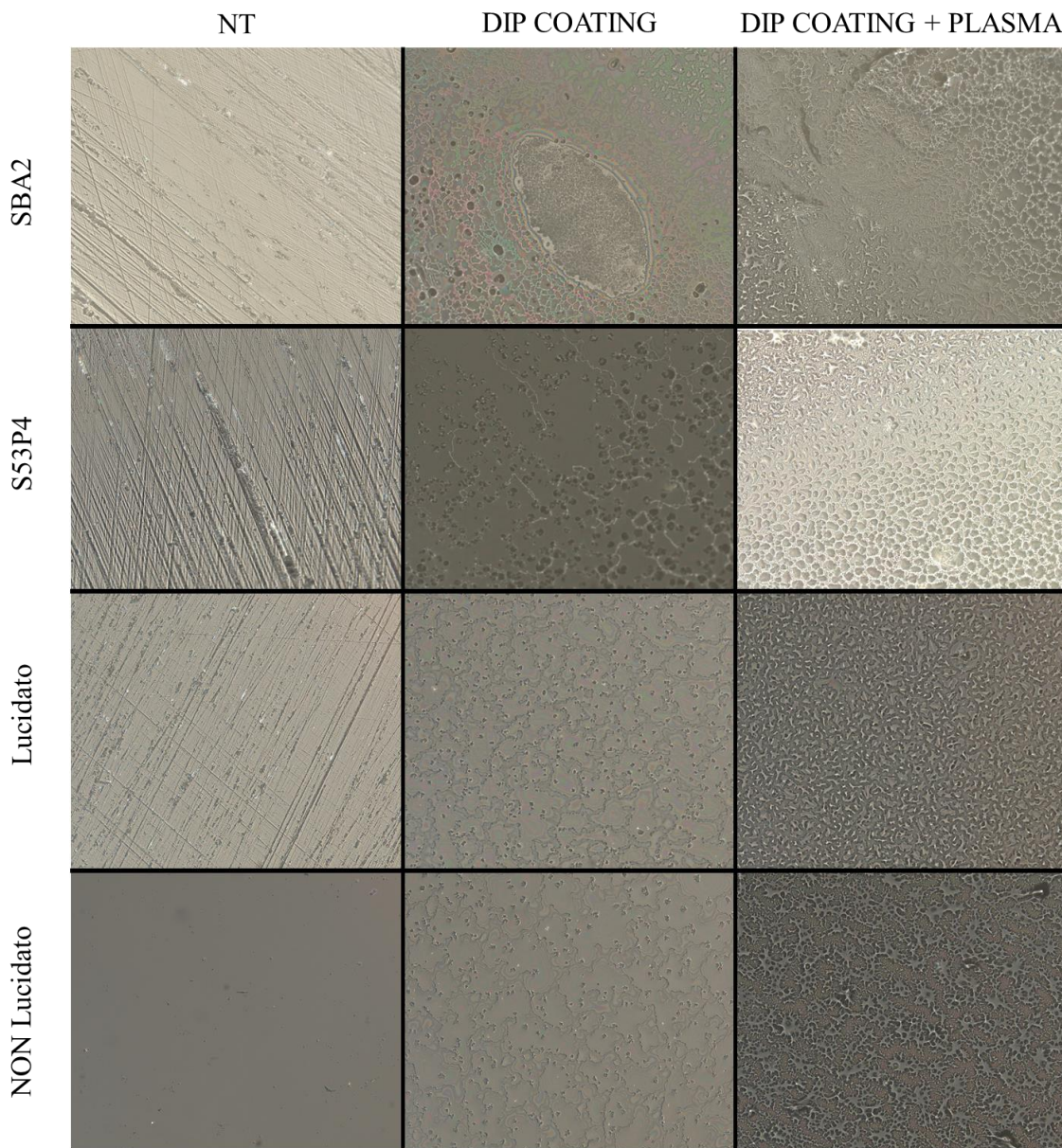


Figura 6.36 - Immagini ad ingrandimento 30x ottenute in microscopia ottica delle 4 tipologie di campioni, tal quali, prima colonna (NT), trattati via *Dip Coating* seconda colonna e trattati via *Dip Coating*+Plasma, nell'ultima colonna.

Questa leggera differenza osservata nell'effetto della morfologia superficiale a seguito dei due trattamenti diversi è stata confermata da un'analisi 3D dei campioni tramite l'utilizzo del laser che ha permesso di sezionare i campioni e fornire la rappresentazione tridimensionale di una loro porzione

Nelle figure seguenti, si riportano le 3D-View realizzate dal software per le 4 tipologie di campioni, mettendo a confronto le due tecniche di trattamento (*Dip-Coating* e *Dip-Coating*+Plasma).

Come si osserva nella figura 6.37 per lo SBA2 e nella figura 6.38 per l'S53P4, la successiva fase di post-trattamento al plasma sembra generare sulla superficie dei campioni un pattern più omogeneo caratterizzato da *pillar* come evidenziato nella figura 6.39 che mostrano il profilo di una sezione dei campioni. Dal profilo si può dire che in media i pillar del S53P4 sono dell'ordine del μm , mentre quelli dello SBA2 del centinaio di nanometro, inoltre questi ultimi sembrano conferire al substrato una topografia più fine.

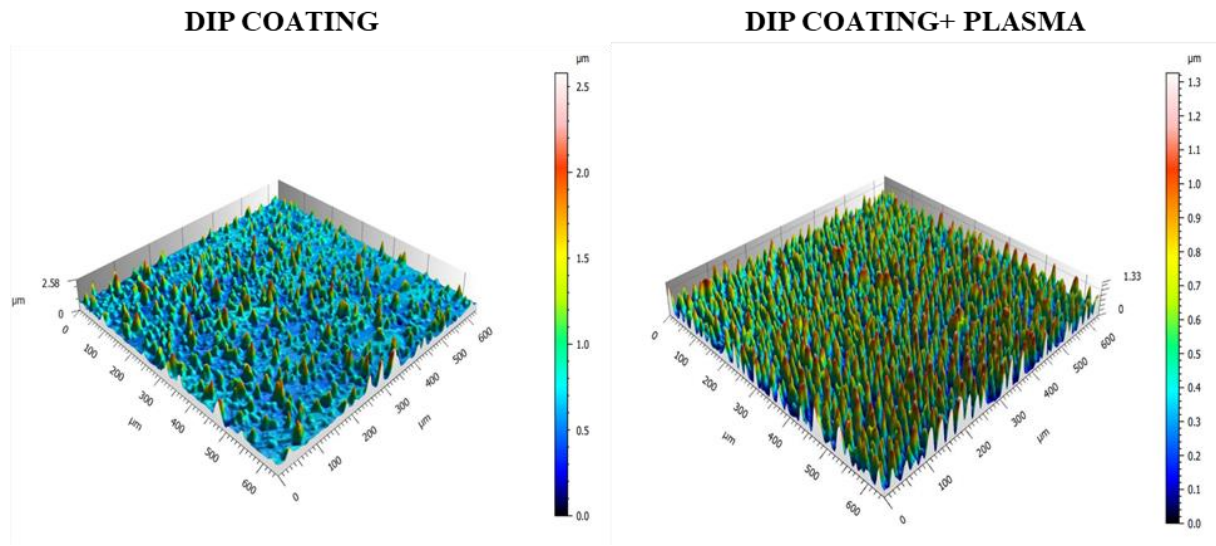


Figura 6.37 - rappresentazione 3D del coating presente sul campione SBA2 a seguito dei due differenti trattamenti. L'immagine è stata realizzata tramite una scansione 3D.

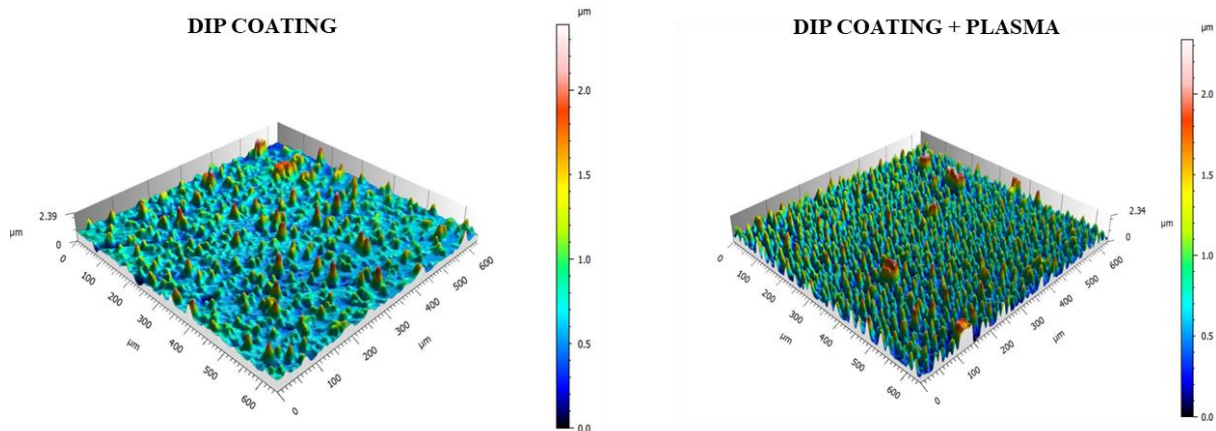


Figura 6.38 - Rappresentazione 3D del coating presente sul campione S53P4 a seguito dei due differenti trattamenti. L'immagine è stata realizzata tramite una scansione 3D.

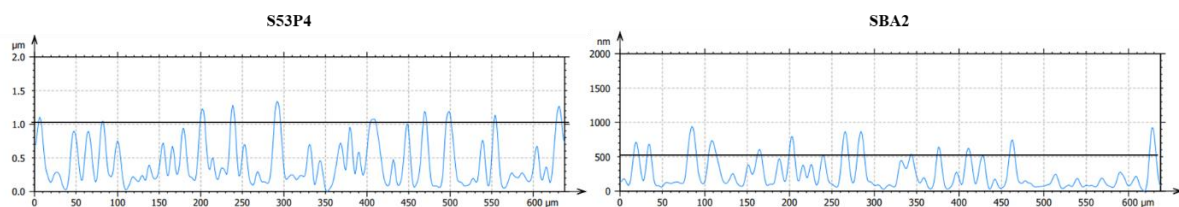


Figura 6.39 - Profilo estratto da una sezione del campione trattato via Dip Coating + Plasma, a sinistra per S53P4 e a destra per lo SBA2.

La stessa situazione si presenta anche nei vetri inerti Lucidati, dopo il post-trattamento al plasma si ha un effetto di uniformizzazione della superficie, che presenta una densità maggiore di pillar rispetto al caso di solo *dip coating*, come mostrato in figura 6.40.

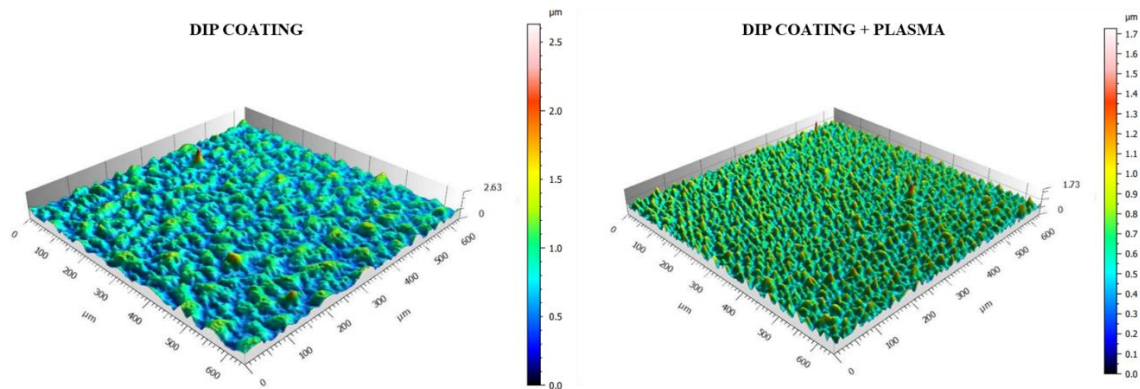


Figura 6.40 - Rappresentazione 3D del coating presente sul campione inerte lucidato a seguito dei due differenti trattamenti. L'immagine è stata realizzata tramite una scansione 3D.

Si riporta per completezza anche per il vetro inerte lucidato il profilo del campione trattato via *Dip Coating* + Plasma nella figura 6.41.

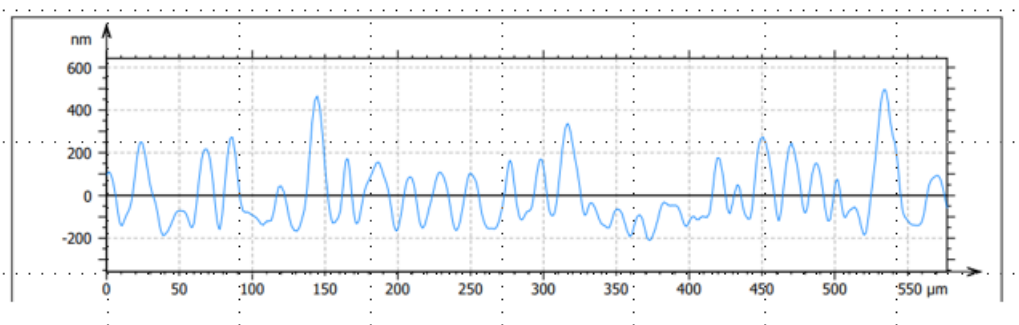


Figura 6.41 - Profilo estratto da una sezione del campione inerte lucidato trattato via *Dip Coating* + Plasma.

Diverso invece è il caso del vetro inerte non lucidato post-trattato al plasma riportato in figura 6.42A e 6.42B, in cui sono presenti delle rugosità maggiori rispetto al caso di solo *dip coating*, ma meno uniformi. Questo denota il fatto che la superficie di partenza (lucidata oppure no) influenza il risultato del successivo trattamento.

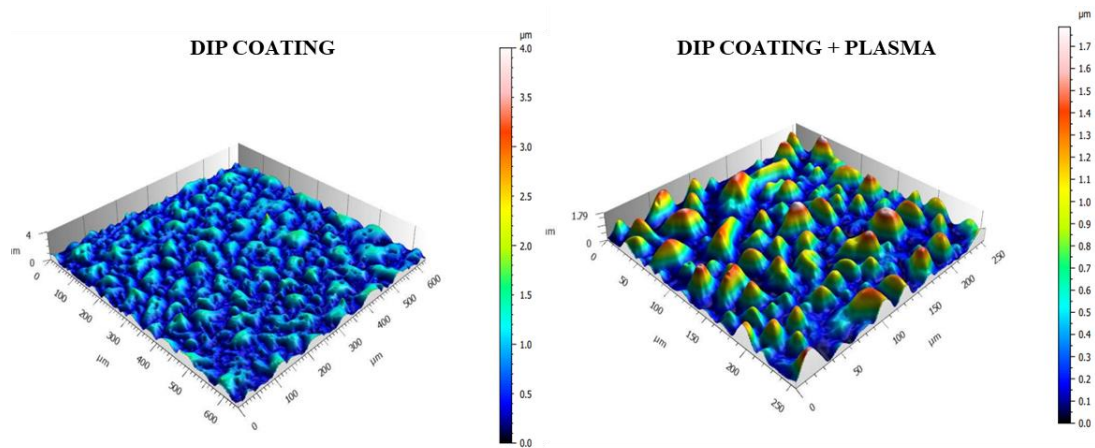


Figura 6.42A - Rappresentazione 3D del coating presente sul campione inerte non lucidato a seguito dei due differenti trattamenti. L'immagine è stata realizzata tramite una scansione 3D

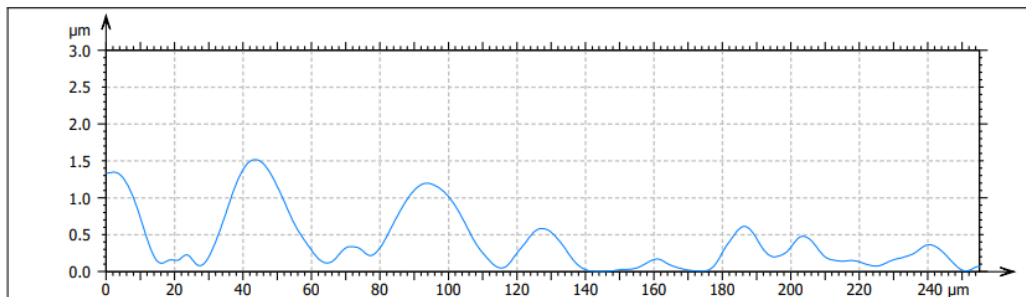


Figura 6.42B - Profilo estratto da una sezione del campione inerte non lucidato trattato via Dip Coating + Plasma.

Per visualizzare al meglio lo spessore del coating depositato nei due metodi differenti si sono utilizzati due campioni inerti uno non lucidato e uno lucidato entrambi trattati, il primo via Dip Coating + Plasma e il secondo solo via Dip-Coating.

Il campione non lucidato è stato mascherato per metà con un pezzo di scotch, e la parte non mascherata è stata trattata secondo il protocollo Dip-Coating + Plasma. Dopo il trattamento si è rimosso lo scotch e si è visualizzato il campione al microscopio confocale.

Nella figura 6.43 si riporta l'ingrandimento a 30 X nella zona a metà tra trattato e mascherato, la zona più scura è quella rivestita dal coating quella chiara è il vetro tal quale che essendo non lucidato è completamente piatto e liscio.

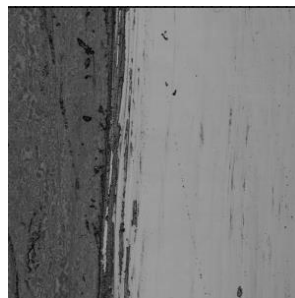


Figura 6.43 - Immagine ad ingrandimento 30x ottenuta in microscopia ottica di un campione inerte non lucidato mascherato con scotch prima di essere sottoposto al trattamento Dip Coating+Plasma

Mentre tramite la scansione laser si è generata la versione 3D riportata nella figura 6.44.

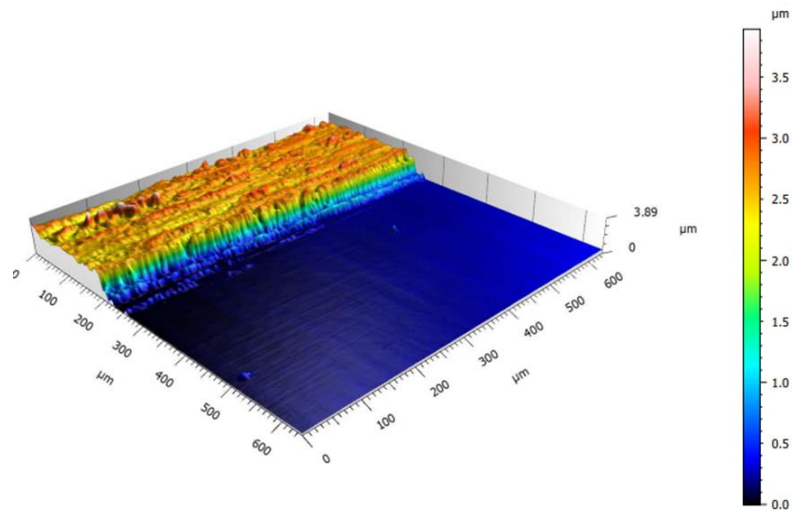


Figura 6.44 - Rappresentazione 3D del campione mascherato con scotch. L'immagine è stata realizzata tramite una scansione 3D.

Come si può osservare si vede bene la differenza in termini di spessore, tra la parte di vetro rivestita dal *coating* e quella del vetro tal quale

Nelle figure 6.45A e 6.45B si riportano rispettivamente in A la misura della distanza tra uno dei punti più alti del *coating* e uno dei più profondi (superficie del vetro), e in B il profilo del campione sezionandolo lungo l'orizzontale. Da entrambe si può ottenere il valore dello spessore del *coating*, intorno ai 3 μm .

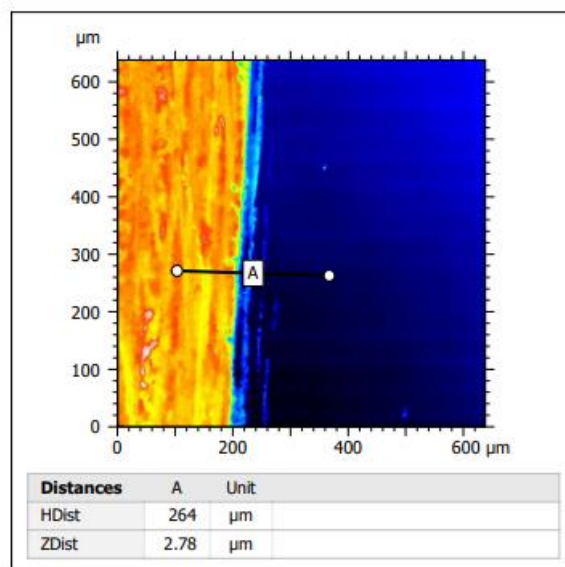


Figura 6.45A - Zoom della porzione di cui si vogliono effettuare delle misure di distanza. A indica la distanza in termini di asse Z, tra il punto più alto (il *coating*) e quello più profondo (il vetro).

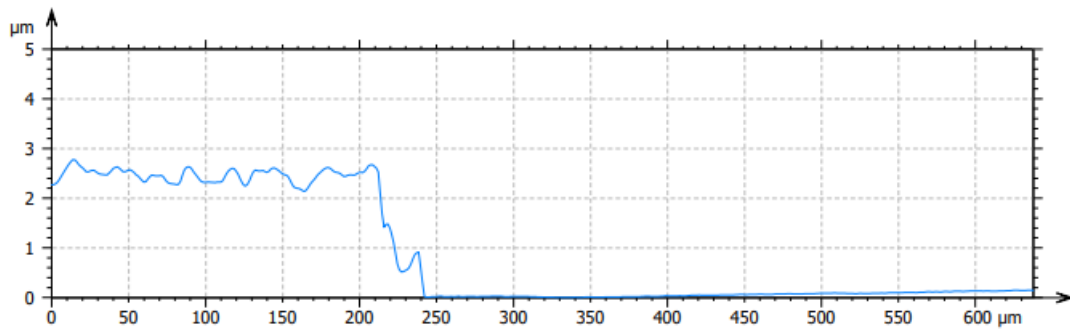


Figura 6.45B - Profilo estratto da una sezione del campione mascherato.

Per il campione Lucidato trattato solo via *Dip Coating* invece, si è preso un campione che presentava in superficie una frattura, come si evince dalla figura 6.46 ricavata sempre a 30 X.

In questo caso il punto 1 è il *coating*, mentre il punto 2 è il vetro lucidato tal quale, si possono osservare infatti le righe della lucidatura. Le parti attorno all'incavo contrassegnate con il numero 3 sono leggermente rialzate poiché il *coating* in quel punto era più spesso a causa di un accumulo dello stesso a seguito dell'immersione nell'oligomero.

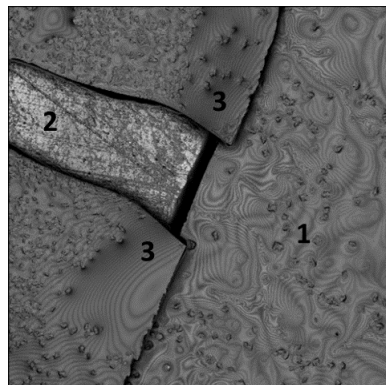


Figura 6.46 - Immagine ad ingrandimento 30x ottenuta in microscopia ottica di un campione inerte lucidato trattato via *Dip Coating*.

Si riporta invece nella figura 6.47 la rappresentazione 3D in cui si possono vedere bene le 3 zone distinte citate prima in figura 6.46.

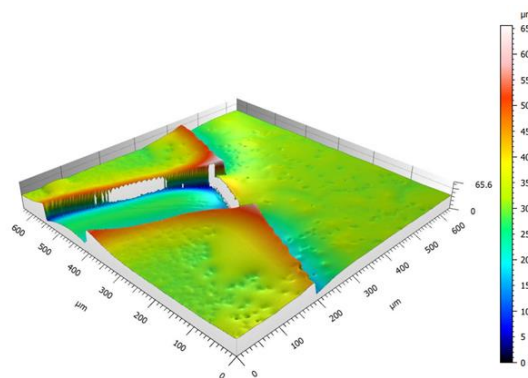


Figura 6.47 - Rappresentazione 3D del campione fratturato in superficie. L'immagine è stata realizzata tramite una scansione 3D.

Nella figura 6.48 invece si evidenziano le distanze caratteristiche che hanno permesso di capire lo spessore del *coating*.

1. La distanza A tra il punto 2 e il punto 3 di 6,86 μm ,
2. La distanza B tra il punto 1 e il punto 2 di 5,22 μm e
3. La distanza C tra il punto 1 e il punto 3 di 0,2 μm .

La misura più significativa è sicuramente la B relativa alla distanza tra *coating* non rotto e il vetro tal quale.

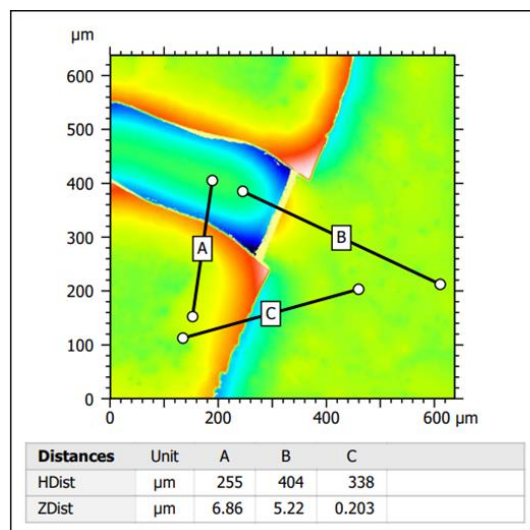


Figura 6.48 - Zoom della porzione di cui si vogliono effettuare delle misure di distanza.

Quindi per il trattamento di *Dip-coating* lo spessore è di circa 5 μm , mentre per il trattamento *Dip-Coating*+Plasma è di circa 3 μm . Sono spessori confrontabili e non si può tramite questi due campioni trarre una conclusione sull'effettivo contributo del post-trattamento al plasma relativamente allo spessore.

6.4 Morfologia e composizione: FE-SEM/EDS

Tramite il FE-SEM e l'EDS si sono analizzati solo i campioni trattati con *Dip Coating* + Plasma, per valutare la loro morfologia e la loro composizione superficiale confrontandoli sempre ai campioni tal quali.

Le immagini ottenute in microscopia elettronica hanno permesso di osservare a diversi ingrandimenti (500x, 2000x e 10000x) la morfologia del *coating* per i campioni trattati e le righe di lucidatura per i campioni tal quali sottoposti alla lucidatura.

Si riportano in due figure distinte il confronto tra vetri inerti lucidati e non lucidati, rivestiti e non rivestiti in figura 6.49, e il confronto tra vetri bioattivi SBA2 e S53P4 rivestiti e tal quali in figura 6.50.

Osservando la figura 6.49 la differenza tra campione trattato e non trattato è evidente, in quanto le righe di lucidatura in quello rivestito non sono più visibili, neanche all'ingrandimento maggiore (10000x), questo significa che il *coating* depositato ha rivestito ed è penetrato anche nelle tracce della lucidatura. Inoltre a ingrandimenti bassi (500x) si vedono macchie più scure e più chiare dovute alla coalescenza del F8815 a seguito dell'asciugatura dopo il *Dip Coating*. Confrontando gli ingrandimenti a 10000x sembra inoltre che il vetro lucidato trattato abbia una superficie più *smooth*, rispetto a quello non lucidato che sembra più rugosa.

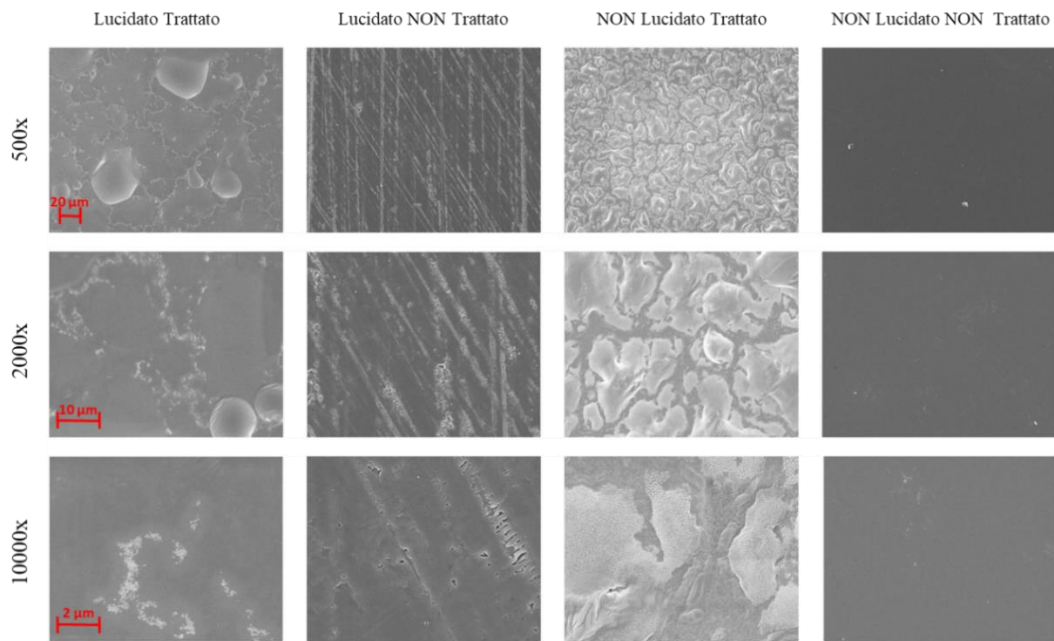


Figura 6.49 - Immagini a ingrandimenti crescenti (500x, 2000x e 10000x), ottenute al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) per i vetri inerti; in ordine si trovano lucidato trattato, lucidato tal quale, non lucidato trattato e non lucidato tal quale. La scala di grandezza è riportata in rosso e vale per tutte le immagini sulla stessa riga.

Considerando invece i campioni bioattivi riportati in figura 6.50, a bassi ingrandimenti per i campioni trattati si osserva una morfologia a bolle, probabilmente dovute all'asciugatura del *coating* e anche in questo caso non si osservano più le righe di lucidatura bene evidenti nei campioni non trattati. Nel vetro SBA2 trattato ad ingrandimento 10000x si sono osservati anche dei cristalli romboidali evidenziati tramite una freccia rossa, che con il passare del tempo di osservazione si sono scuriti, quindi si è ipotizzato fosse materiale organico che sottoposto al bombardamento elettronico si sia "bruciato".

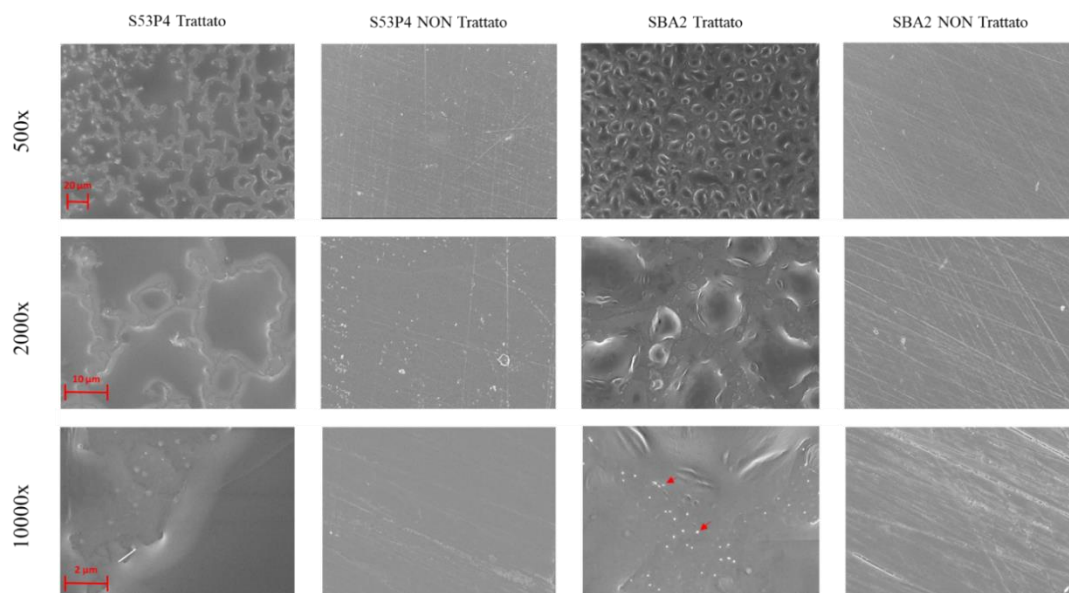
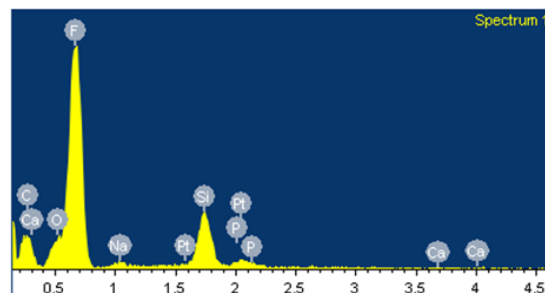


Figura 6.50 - Immagini a ingrandimenti crescenti (500x, 2000x e 10000x), ottenute al microscopio elettronico a scansione con emissione di campo (FE-SEM) per i vetri bioattivi; in ordine si trovano S53P4 trattato, S53P4 non trattato, SBA2 trattato e SBA2 non trattato. La scala di grandezza è riportata in rosso e vale per tutte le immagini sulla stessa riga. Le frecce rosse indicano la presenza di cristalli romboidali di materiale organico non noto.

Per quanto riguarda invece l'analisi composizionale dei vetri effettuata tramite l'EDS, è stato possibile riscontrare la presenza la percentuale in peso (%Wt) e la percentuale atomica (%At) delle componenti più superficiali dei campioni.

Nella figura 6.51 si riportano i dati composizionali dei campioni bioattivi trattati, in cui si nota sia per lo SBA2 che per l'S53P4 un'elevata quantità di F pari all'80 % del totale. Si riscontrano anche tracce di calcio e sodio dovuti agli ossidi modificatori di reticolo CaO e Na₂O.

S53P4 T				
Elemento	Wt%	std	At%	std
F	81,89	0,78	86,78	0,57
Na	1,96	0,12	1,72	0,12
Si	15,23	0,35	10,92	0,29
P	0,78	0,07	0,51	0,05
Ca	0,14	0,24	0,07	0,12



SBA2 T				
Elemento	Wt%	std	At%	std
F	82,09	0,19	87,24	0,12
Na	0,24	0,21	0,21	0,18
Si	16,33	0,23	11,74	0,18
P	0,93	0,09	0,61	0,06
Ca	0,42	0,07	0,21	0,03

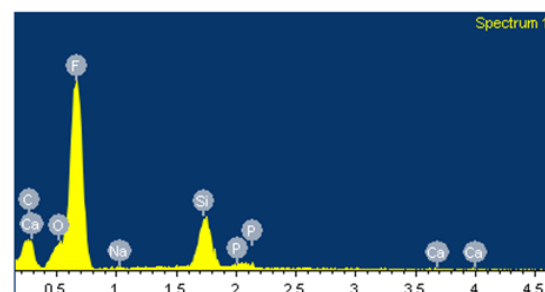
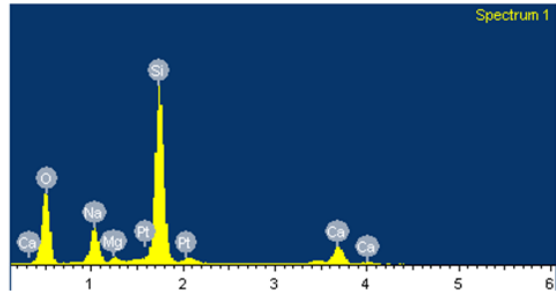


Figura 6.51 - Composizioni in peso (%Wt) e atomiche (%At) e spettri EDS di vetri bioattivi trattati. Si riportano i valori medi e le rispettive deviazioni standard.

Nella seguente figura 6.52 invece si riportano i campioni inerti tal quali, in cui spicca il contributo in peso Si circa del 35% a cui si aggiungono poi un 8% di Na, e tracce di Mg e Ca dovute agli ossidi modificatori di reticolo presenti nella miscela delle polveri.

Si osserva anche un 3% di Pt dovuto al processo di metallizzazione dei campioni effettuata per rendere i campioni conduttivi e quindi visibili al microscopio elettronico.

NL NT				
Elemento	Wt%	std	At%	std
O	42,39	0,64	58,18	0,31
Na	8,31	0,20	7,94	0,13
Mg	1,19	0,03	1,08	0,05
Si	36,08	0,75	28,21	0,25
Ca	7,23	0,47	3,96	0,20
Pt	3,64	0,23	0,41	0,03



L NT				
Elemento	Wt%	std	At%	std
O	44,94	1,12	58,75	2,80
Na	8,11	0,38	7,38	0,51
Mg	2,31	0,14	1,99	0,16
Si	34,76	1,11	25,89	1,39
Ca	5,32	0,22	2,77	0,18
Pt	2,86	0,25	0,31	0,03

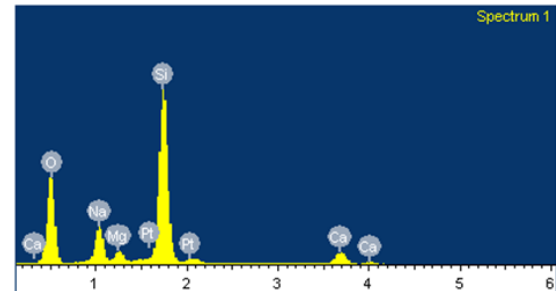


Figura 6.52 - Composizioni in peso (%Wt) e atomiche (%At) e spettri EDS di vetri inerti lucidati (L) e non lucidati (NL) non trattati. Si riportano i valori medi e le rispettive deviazioni standard.

6.5 Carica superficiale: potenziale zeta

Si riportano in un solo grafico (figura 6.54) i valori medi e la deviazione standard del Potenziale Zeta dei campioni trattati confrontati con quello dei rispettivi campioni tal quali.

E' evidente che per i campioni trattati il P.Z. sia positivo in tutto il range di pH analizzato, situazione completamente opposta a quella che si verifica nei campioni NT, in cui il PZ è decrescente a partire dal punto isoelettrico PI, a pH di 2,5-3 fino ad arrivare intorno a -60 mV a pH 9. Quindi il valore del PZ dei campioni trattati è sicuramente dovuto alla presenza del *coating* depositato. Non è visibile, inoltre, il plateau a pH basico presente nei vetri NT, determinato dalla presenza di gruppi -OH sul substrato vetroso che si deprotonano, non presenti in quelli trattati come confermato dalla FTIR.

Poichè il *coating* contiene legami C-F e il F è l'elemento più elettronegativo della tavola periodica, la carica superficiale positiva potrebbe essere fornita dai gruppi -NH₂ che non sono impegnati nel legame con il vetro, come osservato durante l'analisi FTIR. Infatti l'elevata differenza di elettronegatività tra fluoro e carbonio (4.0 per F e 2.5 per il carbonio) conferisce al legame C-F un certo grado di polarità, con una densità elettronica concentrata attorno al fluoro. Tuttavia l'atomo di azoto del gruppo amminico primario, possedendo un doppietto elettronico libero, come si riporta in figura 6.53, ha una forte tendenza ad attrarre idrogenioni dell'acqua, protonandosi:

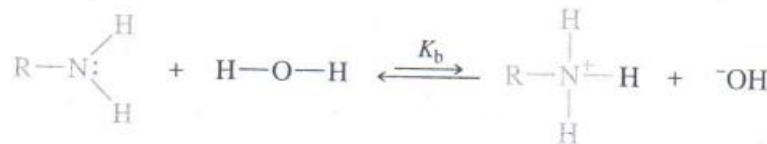


Figura 6.53 - Reazione del gruppo amminico con idrogenioni.

Per questo motivo possiamo aspettarci che possano esporre una carica positiva in un ampio intervallo di pH e che il loro effetto sulla carica superficiale sia prevalente rispetto alla polarizzazione dei legami C-F.

Infatti per i campioni trattati non si arriva al PI, ma tracciando una linea di tendenza si potrebbe arrivare ad un PI a circa pH 9.

E' possibile anche affermare che il *coating* soggetto a cicli di flussi acidi e basici sia resistente, in quanto dalle curve riportate non si intravede nessuna somiglianza con il vetro tal quale.

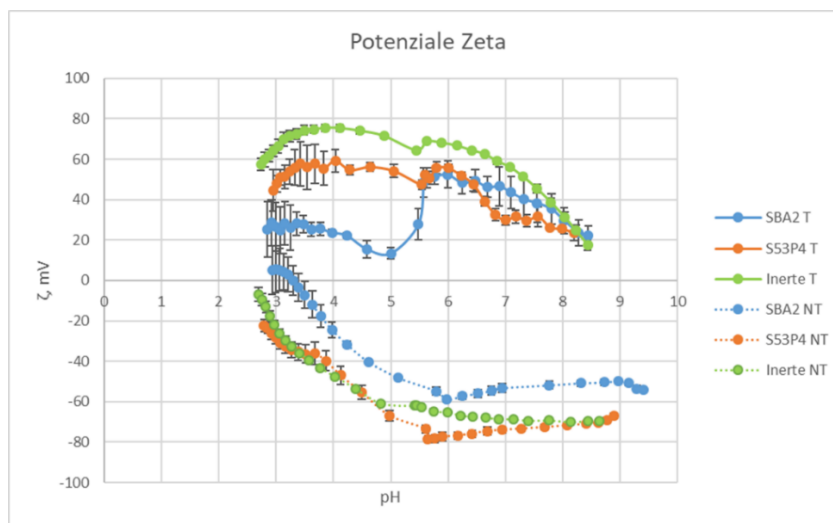


Figura 6.54 Confronto globale delle curve di potenziale zeta al variare del pH per il vetro inerte e i vetri bioattivi SBA2 e S53P4 prima e dopo il trattamento di Dip Coating + Plasma

6.6 Bioattività: test in SBF

La prima caratterizzazione che si è effettuata per valutare la bioattività dei campioni bioattivi trattati è stata la misurazione dell'andamento del pH della soluzione SBF in cui i campioni sono stati immersi per 3, 7 e 14 giorni come riportato in figura 6.55.

Per i campioni di controllo non trattati le misure sono state effettuate in duplicato, mentre per i campioni trattati sono state effettuate in triplicato.

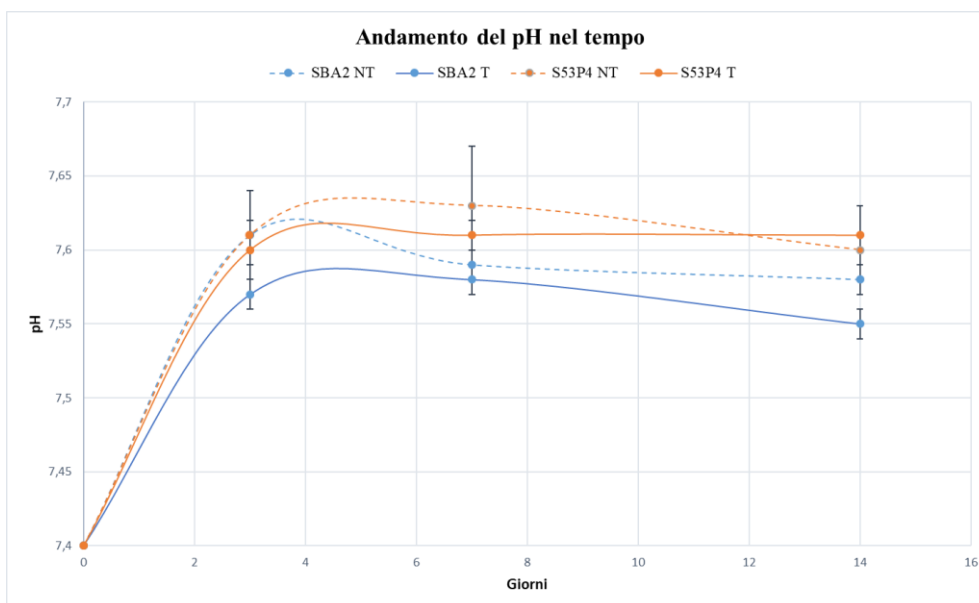


Figura 6.55 - Valori medi e deviazione standard del PH nel tempo rilevati nella soluzione SBF di immersione dei vetri bioattivi. Confronto tra vetri bioattivi trattati e non trattati.

Al giorno 0 il pH della soluzione era 7,4 e trascorsi i 3 giorni per entrambe le tipologie SBA2 e S53P4 il pH è aumentato a circa 7,6 per trattato e non trattato del S53P4 e per il non trattato dello SBA2, per il suo trattato è aumentato a 7.57. Al giorno 7, invece si è verificato per lo SBA2 non trattato una riduzione del pH di due decimi, mentre per gli altri campioni il pH è aumentato di un decimo ciascuno.

Infine a 14 giorni, lo SBA2 non trattato e l'S53P4 trattato hanno mantenuto lo stesso pH dei 7 giorni, mentre per gli altri due campioni si è verificata una lieve diminuzione.

In generale, il range di pH, trascorsi i primi 3 giorni è per tutti i vetri abbastanza costante e confinato a valori non citotossici e le diminuzioni citate prima sono minime e rientrano nella barra d'errore.

Per confermare ulteriormente la bioattività è stata condotta l'analisi della diffrazione a raggi X, che ha permesso di visualizzare il processo di produzione prima del gel di silice e poi di idrossiapatite.

Nella figura 6.56 si riportano i risultati dell'analisi XRD a 0, 7, 14 e 28 giorni di un vetro bioattivo base silice della classe di Hench. I picchi da tenere in considerazione sono:

1. L'alone amorfo tipico del vetro al punto (25-35 2° Theta)
2. L'alone del gel di silice visibile dopo 7 giorni (20-25 2° Thet)
3. I picchi dell'idrossiapatite visibili a 28 giorni (26 e 32 2° Theta) e a 56 giorni (26, 29,32,36, 58 2° Theta)

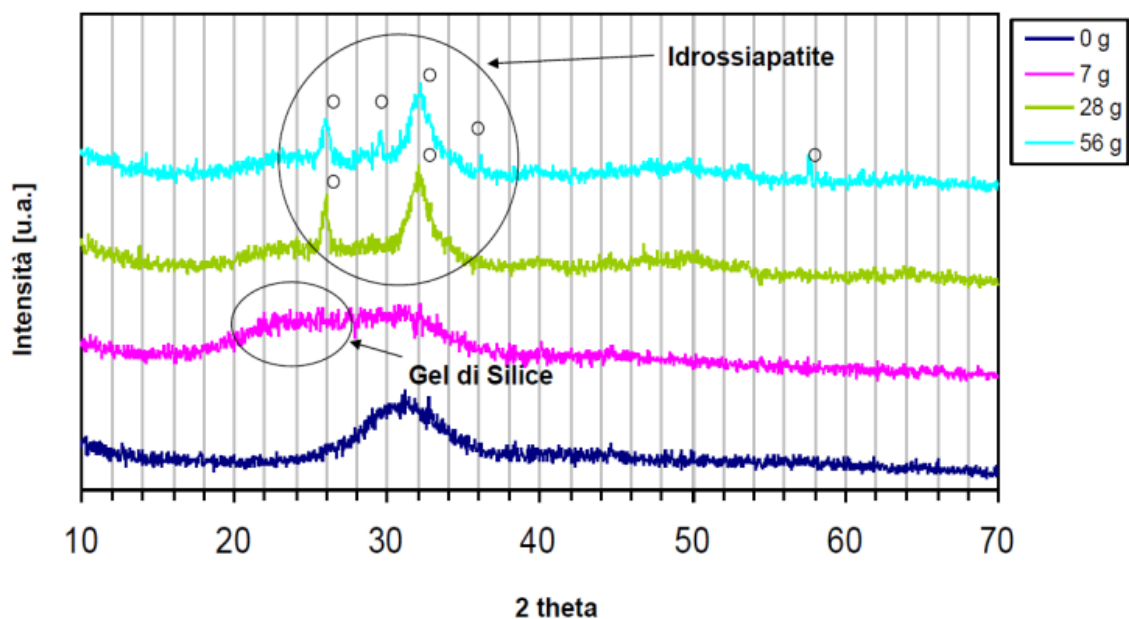


Figura 6.56 - Diffrazione a raggi X durante le fasi di reazione sulla superficie di un vetro bioattivo. (11)

Di seguito si riportano separatamente i confronti tra i campioni non trattati e trattati rispettivamente dello SBA2 nella figura 6.57 e del S53P4 nella figura 6.58.

Il campione SBA2 trattato presente nella figura 6.57B, a 0 giorni oltre ad avere il picco dell'alone amorfo tipico del vetro presenta intorno a 15-18° 2 Theta un alone relativo al *coating* depositato.

A 3 giorni è già possibile vedere due dei picchi caratteristici dell'idrossiapatite, non presenti invece nel vetro tal quale e ancora l'alone del polimero, ma più ampio fino a 25° 2 Theta, probabilmente sovrapposto a quello del gel di silice

Tale alone del polimero svanisce poi al 7° giorno, in cui si osservano i caratteristici picchi dell'idrossiapatite del campione non trattato al medesimo giorno e in più anche un picco, sempre dell'idrossiapatite, intorno a 50° 2Theta, cerchiato in figura.

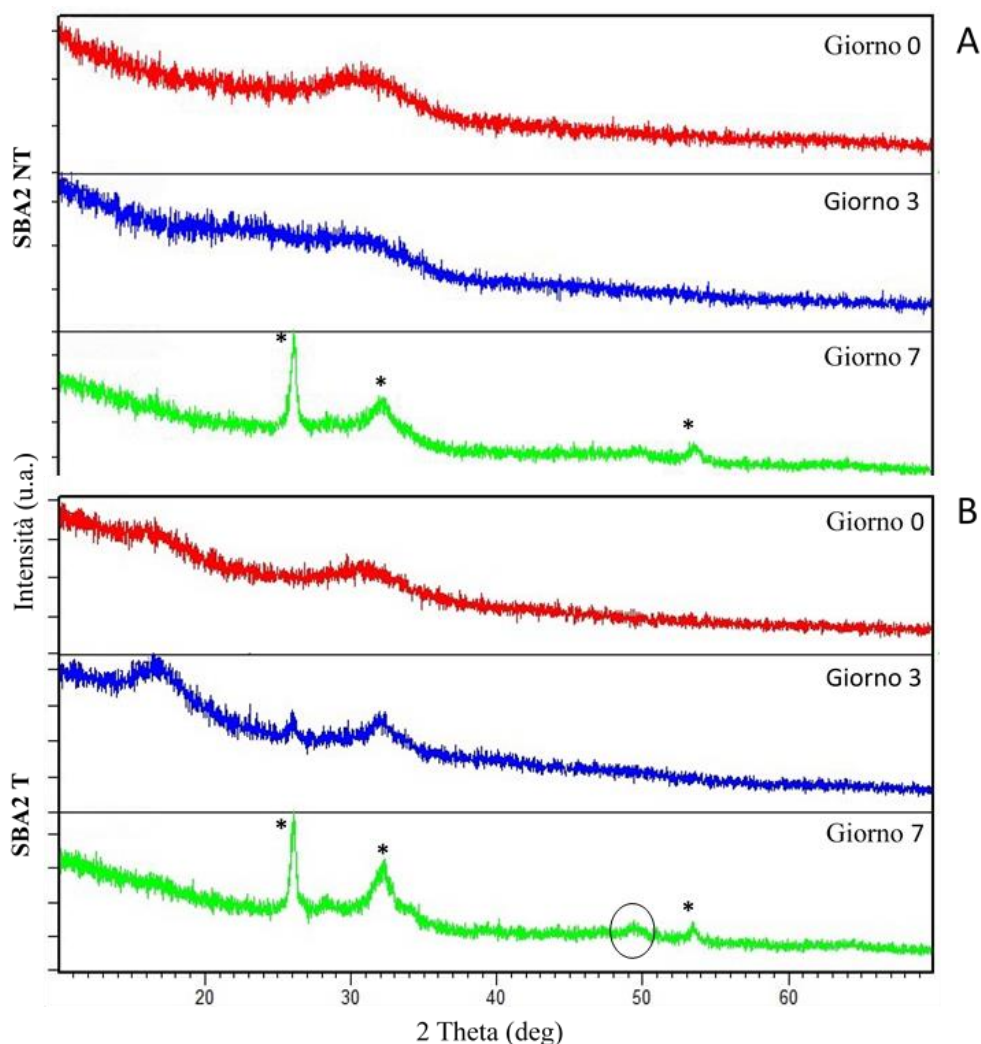


Figura 6.57 - Modelli di diffrazione per il vetro SBA2 non trattato in A e trattato in B prima dell'immersione in SBF e dopo 3 e 7 giorni. Gli * indicano i picchi caratteristici dello spettro XRD dell'idrossiapatite.

Per il campione S53P4 non trattato, si ripete più o meno simile lo stesso pattern di picchi visti per lo SBA2 tal quale. Per il campione trattato (FIG-D) si osserva a 0 giorni nuovamente l'alone caratteristico del polimero tra 15 e 18 °2 Theta, mentre al giorno 3 l'alone del polimero espande fino a 20 °2Theta sommandosi con quello del gel di silice. Anche per questo campione è già possibile individuare i picchi caratteristici dell'idrossiapatite. Infine al giorno 7, come per lo SBA2 l'alone del polimero svanisce e risaltano i picchi della sola idrossiapatite, senza il picco intorno a 50° 2Theta.

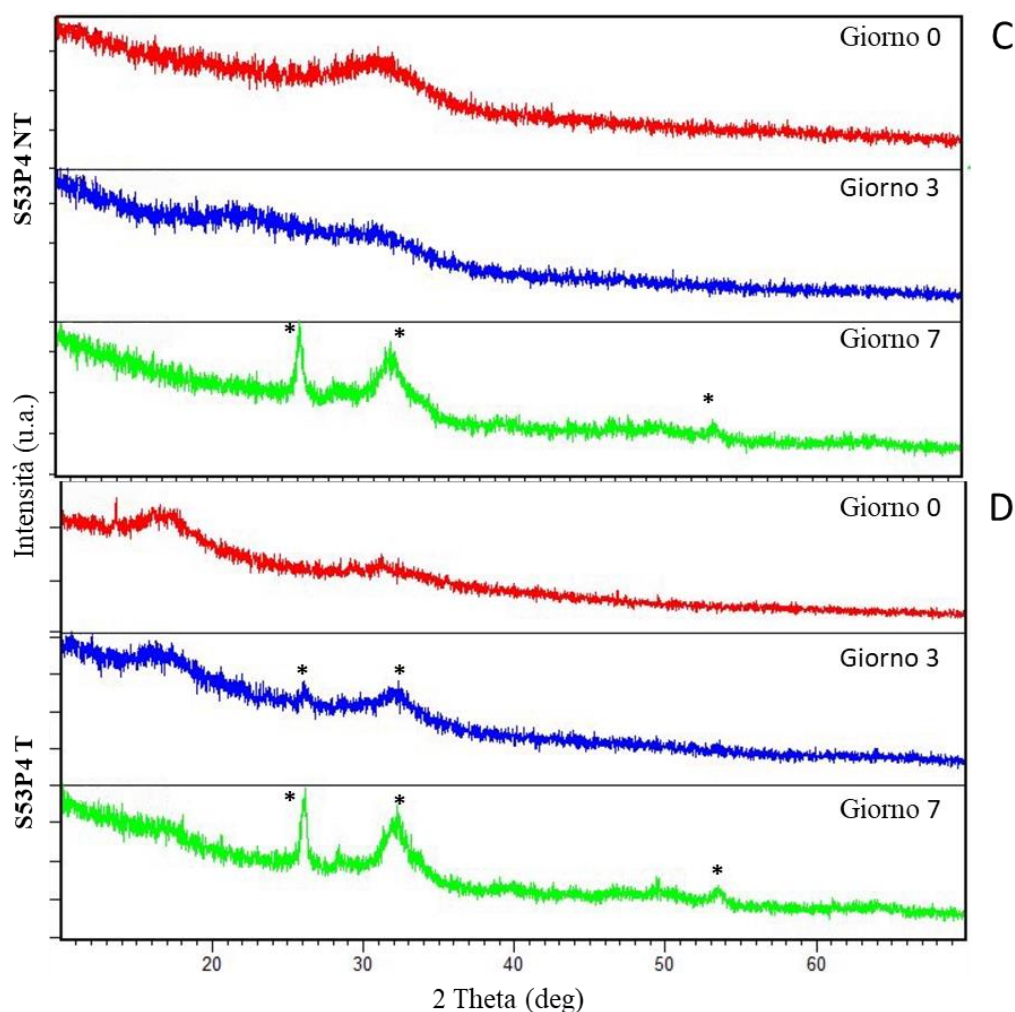


Figura 6.58 - Modelli di diffrazione per il vetro S53P4 non trattato in C e trattato in D prima dell'immersione in SBF e dopo 3 e 7 giorni. Gli * indicano i picchi caratteristici dello spettro XRD dell'idrossiapatite.

Questa analisi ha permesso di comprendere che il meccanismo di bioattività per i campioni trattati e quindi rivestiti da un *coating* spesso circa 3-5 μm , non subisce variazioni e la crescita di idrossiapatite si verifica ugualmente, con cinetiche anche leggermente più veloci perché come visto in Figura 6.57 – B e in Figura 6.58 -D relative ai campioni trattati essa si osserva già a partire dal terzo giorno, situazione che non si osserva in queste analisi per il vetro tal quale che inizia a presentare i picchi solo dopo 7 giorni. Un'ipotesi che è stata fatta per spiegare il motivo di questa cinetica più veloce potrebbe essere relativa alla presenza dei pillar in quanto questi ultimi potrebbero essere siti preferenziali di nucleazione e crescita di idrossiapatite.

Lo stesso processo caratteristico della bioattività e quindi formazione del gel di silice e successiva nucleazione di idrossiapatite è stata anche osservata tramite il FE-SEM e caratterizzata tramite l'EDS.

Tramite il FE-SEM è stato possibile osservare a diversi ingrandimenti la superficie dei campioni trattati e tal quali, e visualizzare meglio la rapidità con cui si è sviluppata la HAp.

Lo stesso processo caratteristico della bioattività e quindi formazione del gel di silice e successiva nucleazione di idrossiapatite è stata anche osservata tramite il FE-SEM e caratterizzata successivamente dall'EDS.

Tramite il FE-SEM è stato possibile osservare a diversi ingrandimenti la superficie dei campioni trattati e tal quali, e visualizzare in maniera ottimale la rapidità con cui si è sviluppata la HAp.

Nelle due figure seguenti si riportano i campioni bioattivi SBA2 figura 6.59 trattati e non trattati a 3 diversi ingrandimenti (500 X, 2000 X e 10000 X) per i 3 e 7 giorni di immersione in SBF e la stessa cosa è ripetuta per l'S53P4 in figura 6.60.

Da entrambe le figure è possibile fare un confronto sulla morfologia superficiale nel corso dei giorni e quindi sulla precipitazione dell'idrossiapatite. I passaggi chiave del meccanismo di bioattività sono la formazione del gel di silice e la nucleazione dell'idrossiapatite; il gel di silice è facilmente riconoscibile perchè a seguito della preparazione del campione, caratterizzata da estrazione dalla SBF, essiccazione, metallizzazione, si ritira lasciando sulla superficie una morfologia caratteristica simile a delle fratture, mentre i cristalli di idrossiapatite sono riconoscibili dalla loro morfologia globulare.

Considerando lo SBA2 (figura 6.59) al giorno 3 a basso ingrandimento (500 X) sia per il campione trattato che non trattato si osservano delle "fratture" superficiali che denotano proprio la presenza del gel di silice. Per il campione trattato si osservano anche macchie più scure e macchie più chiare che sono state poi analizzate più approfonditamente con l'EDS. A più alti ingrandimenti nel campione trattato è possibile già osservare i primi nuclei di idrossiapatite, non presenti invece nel campione non trattato.

A 7 giorni inizia a vedersi l'idrossiapatite anche sul campione non trattato, si vede molto bene la forma sferica all'ingrandimento 2000 x, mentre nel campione trattato a 10000 x si vede come i nuclei di idrossiapatite riescano a crescere nonostante la presenza del *coating*.

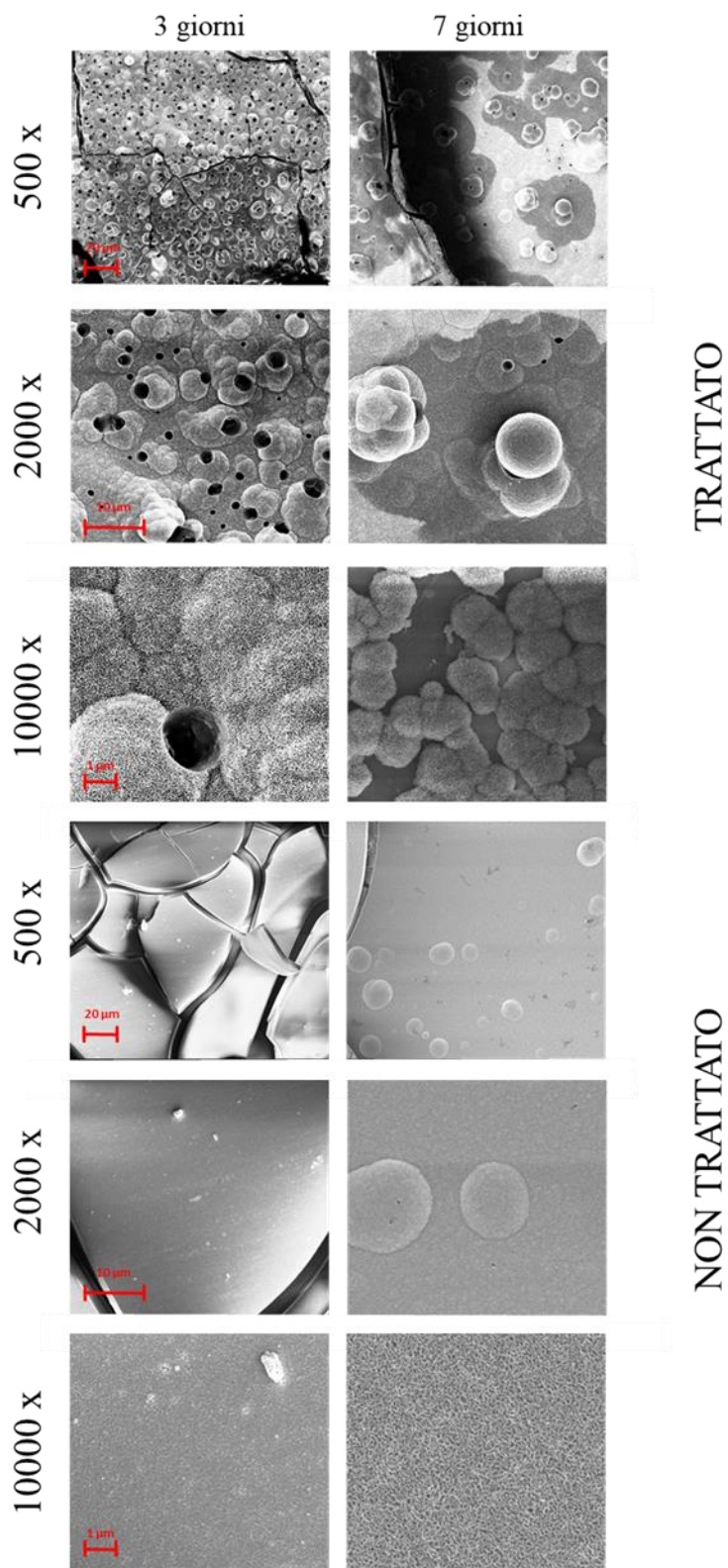


Figura 6.59 - Immagini al FE-SEM a ingrandimenti crescenti (500x, 2000x e 10000x) del vetro bioattivo SBA2 trattato e non trattato dopo 3 e 7 giorni in SBF. La scala di grandezza è riportata in rosso e vale per le immagini sulla stessa riga.

Osservando invece la figura 6.60 relativa al S53P4, anche in questo caso a basso ingrandimento (500 x) a 3 giorni sia per il trattato che il non trattato si vede la frattura del gel di silice, e anche i cristalli di

idrossiapatite, per il campione trattato sono visibili all'ingrandimento 10000x e per il non trattato anche a basso ingrandimento. A 7 giorni sia nei campioni trattati che non trattati si osserva bene la caratteristica forma globulare dell'idrossiapatite.

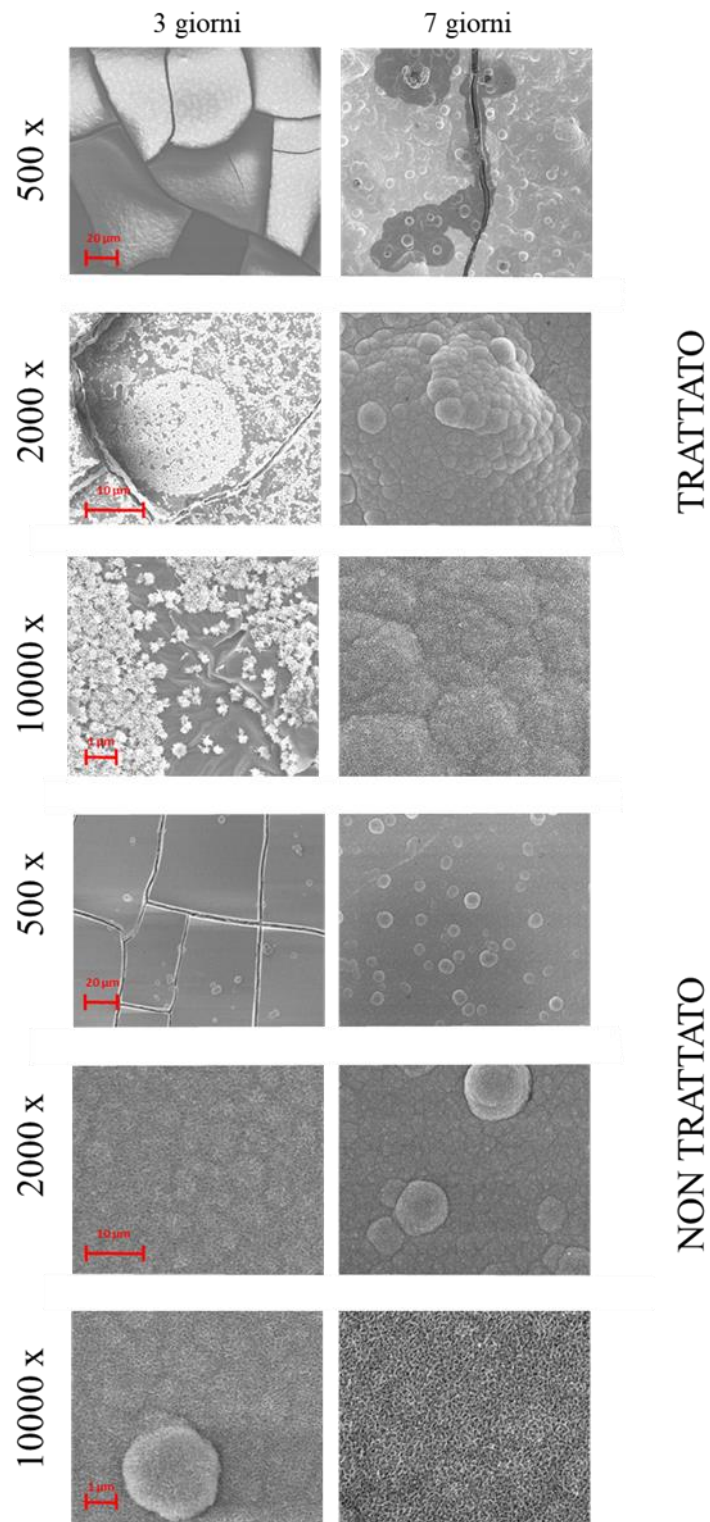


Figura 6.60 - Immagini al FE-SEM a ingrandimenti crescenti (500x, 2000x e 10000x) del vetro bioattivo S53P4 trattato e non trattato dopo 3 e 7 giorni in SBF. La scala di grandezza è riportata in rosso e vale per le immagini sulla stessa riga.

Per analizzare meglio le macchie scure e chiare ben visibili sia sul campione di SBA2 che su quello di S53P4 trattati, si è effettuata una misura tramite EDS delle composizioni percentuali proprio in quei due siti differenti.

In figura 6.61 si riporta l'istantanea del S53P4 trattato dopo 7 giorni in SBF a ingrandimento 1000x, in 1 si focalizza la misurazione sulla macchia chiara, mentre in 2 su quella scura.

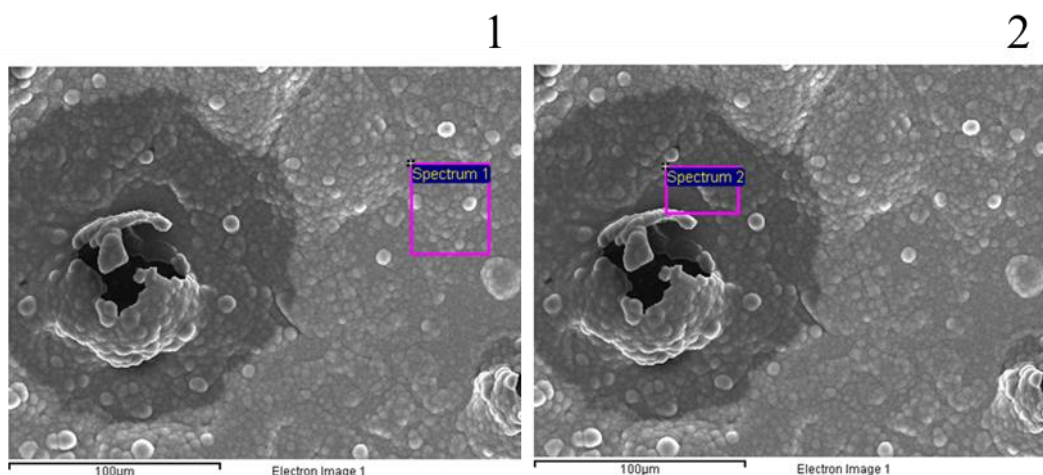


Figura 6.61 - Immagini al FE-SEM a ingrandimento 1000x del vetro bioattivo S53P4 trattato dopo 7 giorni in SBF. In 1 si preleva lo spettro EDS della zona chiara e in 2 della zona più scura.

In tabella 6.1 si riportano i valori misurati e si nota come per l'area chiara ci sia solo un 8% di F, mentre in quella scura 4 volte tanto.

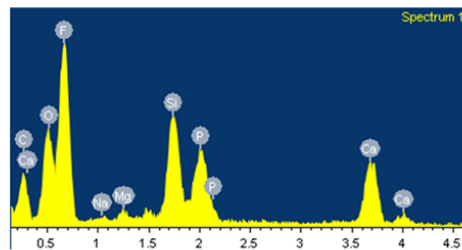
Tabella 6.1 - Composizione percentuale rilevata dall'EDS per la zona chiara 1 e per la zona scura 2. Si evidenzia in giallo l'elemento ricercato F.

	1	2
Elemento	Wt%	Wt%
C	9.36	12.98
O	36.18	17.60
F	8.31	30.55
Mg	0.98	1.57
P	15.10	11.75
Ca	30.07	25.55

Sempre tramite l'EDS, si sono quantificate le percentuali in peso (%Wt) e le percentuali atomiche (%At) dei 4 elementi caratteristici dello scambio ionico, Si, Ca, P, Na, a seguito del meccanismo di bioattività e l'andamento del F, a seguito della nucleazione di idrossiapatite.

In figura 6.62 si riportano le composizioni e i relativi spettri EDS della superficie dei campioni di vetro bioattivo SBA2 e S53P4 trattati (T) dopo 3 giorni in SBF.

SBA2 T 3d				
Elemento	Wt%	std	At%	std
F	57,06	3,21	69,56	2,71
Na	0,86	0,17	0,87	0,18
Si	13,74	0,64	11,34	0,68
P	10,80	0,93	8,09	0,83
Ca	17,53	1,66	10,15	1,13



S53P4 T 3d				
Elemento	Wt%	std	At%	std
F	65,54	3,93	76,29	3,06
Na	0,72	0,34	0,69	0,35
Si	12,69	0,41	10,00	0,53
P	8,36	0,92	5,99	0,79
Ca	12,69	2,34	7,02	1,45

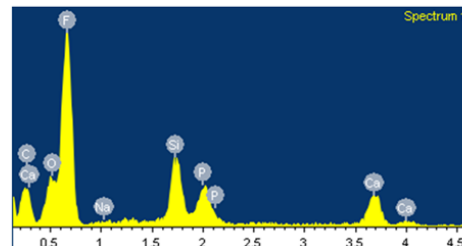
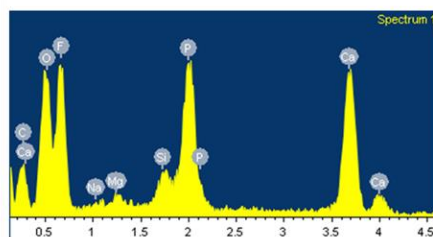


Figura 6.62 - Composizioni in peso (%Wt) e atomiche (%At) e spettri EDS di SBA2 e S53P4 trattati dopo 3 giorni in SBF. Si riportano i valori medi e le rispettive deviazioni standard.

Nella figura 6.63 successiva invece si riportano nuovamente le componenti percentuali e gli spettri EDS relativi ai campioni in SBF per 7 giorni, si può notare una diminuzione del F di circa la metà per l'S53P4, e una riduzione più lieve per lo SBA2. In contemporanea si verifica un incremento del Ca e del P a dimostrazione del processo di nucleazione dell'idrossiapatite.

SBA2 T 7d				
Elemento	Wt%	std	At%	std
F	49,52	2,76	64,69	2,58
Na	0,35	0,31	0,38	0,34
Si	3,11	0,30	2,75	0,23
P	16,68	1,39	13,39	1,32
Ca	30,34	1,36	18,80	1,14



S53P4 T 7d				
Elemento	Wt%	std	At%	std
F	28,11	2,71	42,50	3,26
Na	0,70	0,10	0,87	0,12
Si	1,54	0,06	1,57	0,03
P	23,79	0,73	22,11	1,15
Ca	45,87	2,14	32,94	2,25

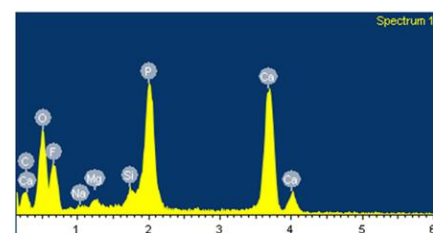
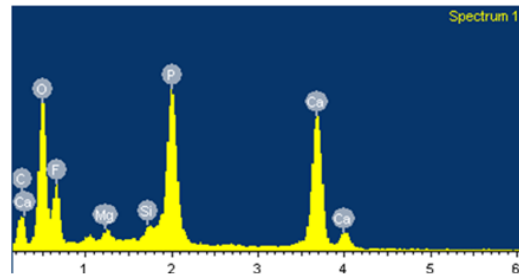


Figura 6.63 - Composizioni in peso (%Wt) e atomiche (%At) e spettri EDS di SBA2 e S53P4 trattati dopo 7 giorni in SBF. Si riportano i valori medi e le rispettive deviazioni standard.

Infine si riportano in figura 6.64 le componenti percentuali e gli spettri EDS per i campioni a 14 giorni in SBF, ultimo istante temporale analizzato.

E' evidente come la %Wt di Ca in questa fase sia notevolmente aumentata dal giorno 3, in maniera più accentuata per lo SBA2. Per l'S53P4 si osserva però un dato anomalo per il F che a 14 giorni è in %Wt maggiore del caso a 3 giorni.

SBA2 T 14 d				
Elemento	Wt%	std	At%	std
F	23,56	13,67	35,12	20,68
Na	1,32	0,42	1,72	0,43
Si	0,80	0,72	0,79	0,73
P	27,56	6,80	26,98	9,06
Ca	46,76	8,18	35,39	12,04



S53P4 T 14 d				
Elemento	Wt%	std	At%	std
F	48,21	1,22	63,71	1,13
Na	0,43	0,13	0,47	0,14
Si	2,79	0,23	2,50	0,21
P	15,70	0,36	12,73	0,38
Ca	32,87	0,85	20,60	0,68

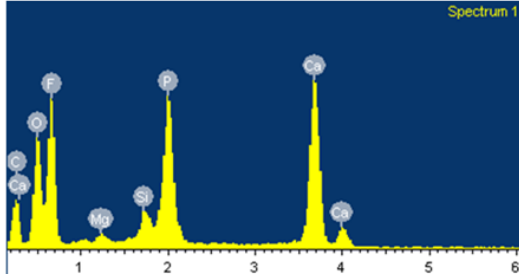


Figura 6.64 - Composizioni in peso (%Wt) e atomiche (%At) e spettri EDS di SBA2 e S53P4 trattati dopo 14 giorni in SBF. Si riportano i valori medi e le rispettive deviazioni standard.

Si riporta infine in figura 6.65 il grafico dell'andamento della composizione %Wt del F nel corso del periodo di osservazione dei campioni da 0 giorni fino a 14 giorni (periodo totale trascorso in SBF) sia per lo SBA2 che per l'S53P4.

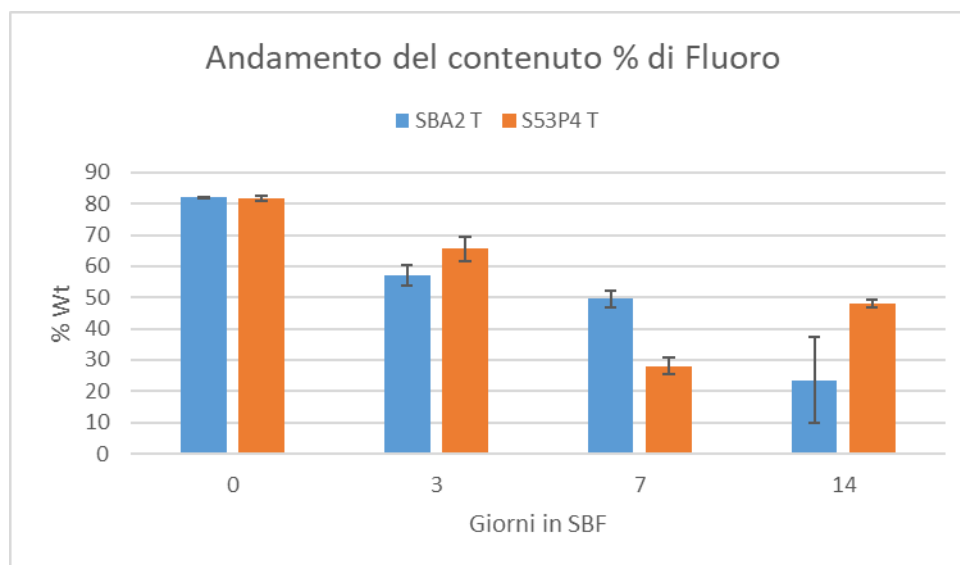


Figura 6.65 - Andamento del contenuto percentuale di fluoro superficiale, per SBA2 in azzurro e per S53P4 in arancione nell'arco temporale di conservazione dei campioni in SBF.

Per verificare il processo di nucleazione dell'idrossiapatite si riporta in figura 6.66 il grafico delle componenti % degli elementi che sono caratterizzanti il processo di bioattività, Si, Ca e P.

Nella stessa figura è possibile osservare il classico andamento di crescita di Ca e P dovuto alla nucleazione dell'idrossiapatite e la drastica riduzione del Si, che non è più rilevabile, perchè la superficie dei campioni viene rivestita da uno strato di HAp.

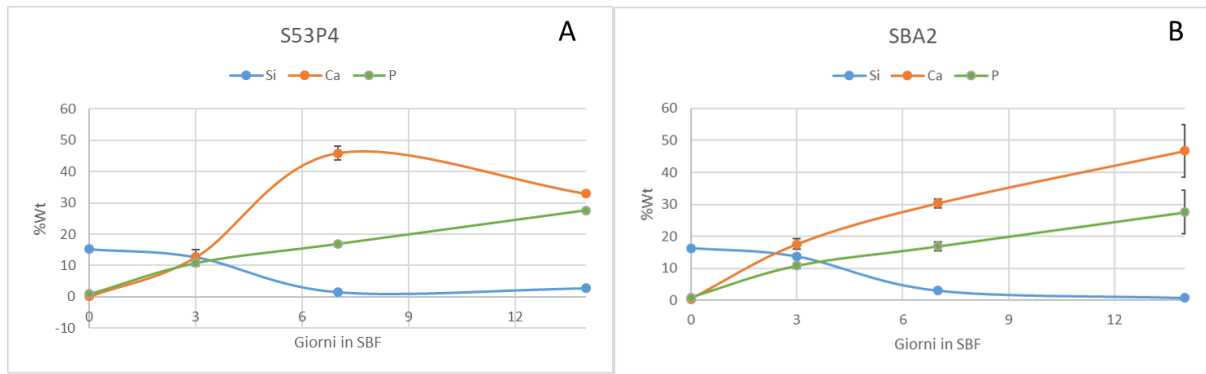


Figura 6.66 - Andamento delle percentuali in peso di tre componenti Si, Ca e P indici del processo di nucleazione dell'idrossiapatite, in A relativa al campione S53P4 e in B al campione SBA2.

6.7 Proprietà antiadesive: test batterici *in vitro*

A seguito della contaminazione delle 4 tipologie di vetri con *S.aureus*, si osserva un numero inferiore di batteri adesi ai campioni trattati compreso tra 1,5 e 3 ordini di grandezza rispetto ai campioni tal quali.

I risultati ottenuti sono rappresentati nel grafico in figura 6.67.

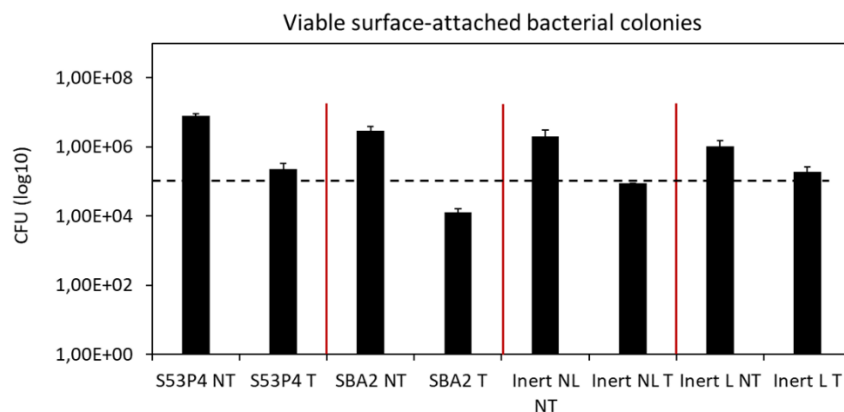


Figura 6.67 Conteggio delle colonie batteriche vive per i vetri bioattivi S53P4 e SBA2 trattati e non trattati e i vetri inerti lucidati e non lucidati trattati e non trattati.

Si riportano anche le immagini qualitative delle colonie batteriche che si sono formate a diverse diluizioni (1,2,3,4,5,6).

In figura 6.68 è evidente come le colonie batteriche nel campione T dello SBA2 siano presenti solo nelle prime 2 diluizioni e poi non siano più presenti, a ribadire il fatto che il *coating* abbia avuto un effetto antiadesivo nei confronti dei batteri.

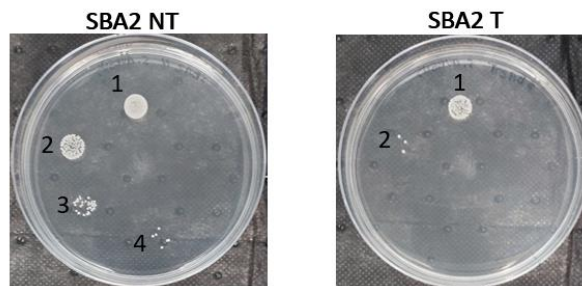


Figura 6.68 - Conteggio delle colonie batteriche vive per i campioni di SBA2 non trattato e trattato a diverse diluizioni: il numero riportato rappresenta la diluizione corrispondente.

Situazione diversa accade per i vetri inerti trattati in cui le colonie batteriche sono visibili anche fino alla 3° diluizione, come si vede in figura 6.69.

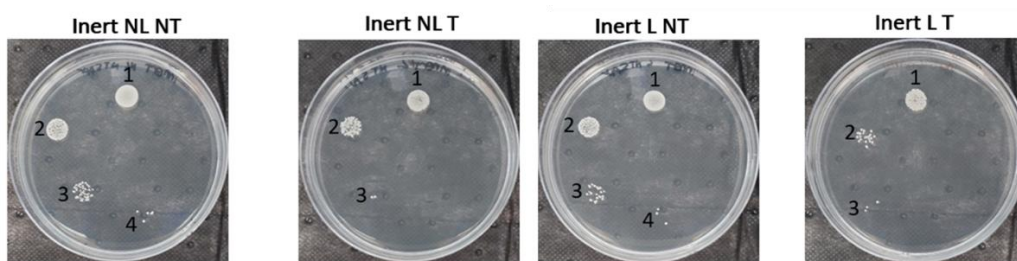


Figura 6.69 - Conteggio delle colonie batteriche vive per i campioni inerti non lucidato e lucidato, rispettivamente trattato e non trattato a diverse diluizioni: il numero riportato rappresenta la diluizione corrispondente.

Come ultimo caso si riporta l'S53P4, in cui si ha una conta delle CFU maggiore confermato dalla presenza di colonie batteriche anche fino alla 4° diluizione (figura 6.70).

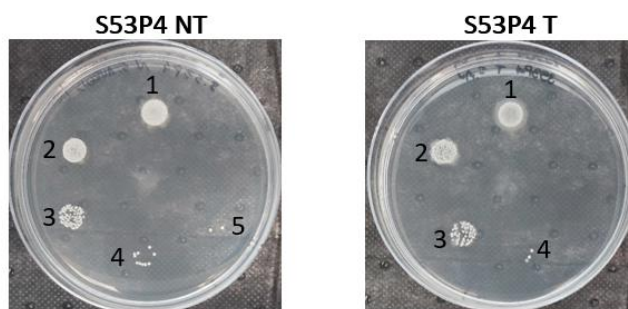


Figura 6.70 - Conteggio delle colonie batteriche vive per i campioni di S53P4 non trattato e trattato a diverse diluizioni: il numero riportato rappresenta la diluizione corrispondente.

7. CONCLUSIONI

L'obiettivo che ci si era posti inizialmente di depositare un monomero fluorurato su substrati vetrosi, bioattivi e non, è risultata più complicata del previsto e nonostante le varie ottimizzazioni effettuate nelle prime 3 fasi non si sono ottenuti i risultati desiderati in termini di angolo di contatto statico, spostando quindi il focus del lavoro su un primo trattamento di *dip coating* dei campioni del F8815 e un suo successivo trattamento al plasma.

Questo trattamento al plasma ha determinato una riduzione del WCA, ma non significativa per le proprietà idrofobiche desiderate, in particolar modo per i campioni bioattivi che devono svolgere un effetto antiadesivo e antiproliferativo nel caso dei batteri, ma al contempo permettere l'adesione cellulare.

Sempre il plasma, ha però conferito una morfologia superficiale particolare ai campioni come si è visto dall'analisi al microscopio confocale in cui erano presenti *pillar* di diverse dimensioni a seconda del tipo di vetro considerato.

Particolare ed assolutamente diversa dalla curva tipica del vetro è l'andamento del potenziale zeta, che ha valori positivi sia a pH acidi che basici, dovuti alla presenza dei gruppi amminici che non partecipano al legame con il substrato.

Nonostante uno spessore di 3-5 μm , la bioattività non è stata rallentata anzi sia per lo SBA2 che per l'S53P4 sembra essere stata accelerata, con presenza dei picchi caratteristici dell'idrossiapatite già dopo 3 giorni visibile grazie all'analisi ai raggi X e confermati anche dal FE-SEM e l'EDS.

Dalle diverse caratterizzazioni effettuate è stato possibile anche trarre una considerazione relativa alla resistenza del *coating*, tramite le misure del potenziale Z e della Bioattività, il *coating* sembra aver resistito bene sia a cicli di soluzione fortemente acida e basica per il primo test e ai 14 giorni in soluzione SBF per il secondo test. Dal potenziale zeta, sempre positivo, si deduce che il *coating* non si sia staccato nel processo di caratterizzazione e dall'EDS dopo i 14 giorni in SBF il contenuto di F è ancora consistente.

In conclusione, il lavoro svolto in questa tesi ha dimostrato la potenzialità del trattamento al plasma nel creare pattern nanostrutturati sui substrati di interesse e il monomero depositato via *dip coating* di ridurre l'energia superficiale, in particolar modo sui campioni inerti, anche se non ha dato ottimi risultati in termini di effetto antiadesivo e *antibiofouling* con la coltura batterica, infatti è risultato avere un effetto migliore lo SBA2, nonostante quest'ultimo abbia presentato un WCA inferiore.

Aspetto positivo e sorprendente è per i campioni bioattivi che mostrano un'accelerazione del processo di produzione di idrossiapatite e quindi un più rapido processo di osseointegrazione, effetto estremamente interessante per possibili applicazioni in campo ortopedico.

Per quanto riguarda invece i campioni inerti e le loro possibili applicazioni, tale trattamento ottimizzato potrebbe risultare poco versatile pensando alle dimensioni degli oggetti che si dovrebbero rivestire per renderli idrofobici via *dip coating*, per cui la tecnica della sola deposizione via plasma risulterebbe una scelta ottimale.

In seguito a tutte le considerazioni esposte si potrebbe orientare una futura ottimizzazione di una deposizione al plasma di un monomero fluorurato con sistema pulsato, impostando tempi di ON e OFF opportuni, per garantire le tempistiche migliori di polimerizzazione.

Bibliografia

1. **Edgar D. Zanotto, John C. Mauro.** *Two Centuries of Glass Research: Historical Trends, Current Status, and Grand Challenges for the Future.* s.l. : International Journal of Applied Glass Science. DOI:10.1111/ijag.12087.
2. **Adam Shearer, Maziar Montazerian, John C. Mauro.** *Modern definition of bioactive glasses and glass-ceramics.* s.l. : Journal of Non-Crystalline Solids, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2023.122228>.
3. **Edgar D. Zanotto, John C. Mauro.** *The glassy state of matter: Its definition and ultimate fate.* s.l. : Journal of Non-Crystalline Solids, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2017.05.019>.
4. **Hazem Hamed, Marwan Eldiasty, Seyed-Mahmoud Seyed-Sahebari, Jana D. Abou-Ziki.** *Applications, materials, and fabrication of micro glass parts and devices: An overview.* s.l. : Material Today, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2023.03.005>.
5. **S. I Funano, N. Tanaka, Y. o. Tanaka, Anal. Sci.** *Analysis of Long-term Morphological Changes of Micro-patterned Molecules and Cells on PDMS and Glass Surfaces.* 2017. <https://link.springer.com/article/10.2116/analsci.33.723>.
6. **Nada Alfryyan, Marzoqa M. Alnariri, Nissren Tamam, Z.A. Alrowaili, Sultan J. Alsufyani.** *Nuclear attenuation ability of ternary alumina-borate glass system for medical shielding applications.* s.l. : Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2023.100712>.
7. **Muhammad Zubair, Eslam Ahmed.** *Comparison of different glass materials to protect the operators from gamma-rays in PET using MCNP code.* s.l. : Radiation Physics and Chemistry, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2021.109818>.
8. **Nitesh R. Patel, Piyush P. Gohil.** *A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance.* s.l. : International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering, 2012.
9. **Lukas Gritsch, Eloise Perrin, Jean-Marc-Chenal, Yann Fredholm, Anthony LB Macon, Jerome Chevalier, Aldo R Boccaccini.** *Combining bioresorbable polyesters and bioactive glasses: Orthopedic applications of composite implants and bone tissue engineering scaffolds.* s.l. : Applied Materials Today, 2020.
10. **Valentina Vaghi, Lorenzo Lunelli, Cecilia Pederzoli, Cristina Potrich.** *Biocompatibilità dei materiali polimerici.*
11. **Verne', Enrica.** *Dispense del corso di Biomateriali - 05AFYMZ.* A.A. 2021/2022.
12. **Bellucci, Devis.** *Materiali per la vita, Le incredibili storie dei biomateriali che riparano il nostro corpo.* s.l. : Bollati Boringhieri, 2022.
13. **Vitale-Brovarone.** *Dispense del corso di Materiali e superfici ingegnerizzate per applicazioni in medicina.* A.A 2021-2022.
14. **Ali Moeini, Turan Hassanzadeh Chinijani, Adrine Malek Khachatourian, Marcus Vinicius Lia Fook, Francesco Baino, Maziar Montazerian.** *A critical review of bioactive glasses and glass-ceramics in cancer therapy.* s.l. : Applied glass science, 2022. DOI: 10.1111/ijag.16601.
15. **Gentile, Pier Giorgio.** *Dispense del corso di Sistemi Biomimetici - A.A. 2021/2022.*

16. **Alka Jaggesar, Hesam Shahali, Asha Mathew, and Prasad K. D. V. Yarlagadda**. *Bio-mimicking nano and micro-structured surface fabrication for antibacterial properties in medical implants*. Australia : Journal of Nanobiotechnology, 2017.
17. **Zheng, Shaoheng Tang and Jie**. *Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects*. 2018. DOI: 10.1002/adhm.201701503.
18. **Shekhar Agnihotri, a Soumyo Mukherjiabc and Suparna Mukherji**. *Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver*. 2013. DOI: 10.1039/c3nr00024a.
19. **Marta Miola, Giacomo Fucale, Giovanni Maina and Enrica Verné**. *Antibacterial and bioactive composite bone cements containing surface silver-doped glass particles*. 2015.
20. **Kirill Isakov, Christoffer Kauppinen, Sami Franssila, and Harri Lipsanen**. *Superhydrophobic Antireflection Coating on Glass Using Grass-like Alumina and Fluoropolymer*. 2020. <https://dx.doi.org/10.1021/acsami.0c12465>.
21. **Pavel St'ahel, V ěra Mazánková, Klára Tomečková , Petra Matoušková , Antonín Brablec , Lubomír Prokeš 1 , Jana Jurmanová 1 , Vilma Buršíková , Roman P ěribyl , Marián Lehocký , Petr Humpol ěcek , Kadir Ozaltin and David Trunec**. *Atmospheric Pressure Plasma Polymerized Oxazoline-Based Thin Films—Antibacterial Properties and Cytocompatibility Performance*. 2019.
22. **Dott.ssa, Carmagnola**. *Dispense del corso Formazione pratica in nanotecnologie biomediche e terapie avanzate*. 2021-2022.
23. **P.K Chu, J.Y. Chen, L.P. Wang, N. Huang**. *Plasma-surface modification of biomaterials*. s.l. : Materials Science and Engineering, 2002.
24. **meng-Dian Jiang, Ling-Yung Wang, Hong-Cheu Lin, Ta-Chin Wei, Shih-Hsien Yang, Cheng-Hsiang Chuang, Tsung-Pei Tseng**. *The influence of process parameters on the structure and morphology of pulsed plasma-polymerized octafluorotoluene films*. s.l. : Journal of the Chinese Institute of Engineers, 2010.
25. **Thu Minh Nguyen, Neha Kaushik, Tung Thanh Nguyen, Eun Ha Choi, Linh Nhat Nguyen, Nagendra Kumar Kaushik**. *The outlook of flexible DBD-plasma devices: Applications in food science and wound care solutions*. s.l. : Materials Today Electronics, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.mtelec.2023.100087>.
26. **Gospodinova, Todorka Gancheva Vladkova and Dilyana Nikolaeva**. *Plasma Based Approaches for Deposition and Grafting of Antimicrobial Agents to Polymer Surface*. s.l. : F. Soria et al. (eds.), Urinary Stents, , 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-031-04484-7_22.
27. **N. DE GEYTER, R. MORENT**. *Cold plasma surface modification of biodegradable polymer biomaterials*. 2014. 10.1533/9780857098104.2.202 .
28. **Ebru Akdogan, Hasret Tolga Sirin**. *Plasma surface modification strategies for the preparation of antibacterial biomaterials: A review of the recent literature*. s.l. : Materials Science & Engineering, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112474> .
29. **Linklater, Denver & Juodkazis, Saulius & Crawford, Russel & Ivanova**. *Mechanical inactivation of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa by titanium substrata with hierarchical surface structures*. . s.l. : Materialia, 2018. 10.1016/j.mtla.2018.100197.

30. **Daniel Angel Bellido-Aguilara, Shunli Zhenga, Xuejun Zhana, Yinjuan Huang, Xin Zhaoa.** *Effect of a fluoroalkyl-functional curing agent on the wettability, thermal and mechanical properties of hydrophobic biobased epoxy coatings.* 2019.

31. **J.O.F. West, G.W. Critchlow, D.R. Lake and R. Banks.** *Development of a superhydrophobic polyurethane-based coating from a two-step plasma-fluoroalkyl silane treatment.* 2016.

32. **Jaqueline H. Yim, Victor Rofriguez-Santiago, Andrè A. Williams, Theodosia Gougousi.** *Atmospheric pressure plasma enhanced chemical vapor deposition of hydrophobic coatings using fluorine-based liquid precursors.* 2013.