

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

**Corso di Laurea Magistrale
in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili**

Tesi di Laurea Magistrale

Sintesi di superfici eteronucleanti per la cristallizzazione di farmaci



Relatori

prof. Roberto Pisano

dott.ssa Fiora Artusio

Candidato

Alexandre Yuri Kitamukai

Ottobre 2019

Indice

1. Introduzione	1
1.1 Cristallizzazione	1
1.2 Materiali cristallini	2
1.2.1 Abito cristallino	3
1.3 Teoria della cristallizzazione	4
1.3.1 Solubilità e Sovrasaturazione	4
1.3.2 Nucleazione	6
1.3.3 Fase di crescita dei cristalli	10
1.4 Il processo di cristallizzazione nell'industria farmaceutica	11
1.4.1 Tecniche di cristallizzazione nell'industria farmaceutica	11
1.4.2 Controllo della dimensione e morfologia dei cristalli	12
1.4.3 Purificazione del prodotto finale	13
1.5 Cristallizzazione indotta da superfici	13
1.5.1 Tipologie di superfici	14
1.6 Funzionalizzazione di una superficie attraverso self-assembled monolayer	15
1.6.1 Definizione di monostrato auto-assemblato	16
1.6.2 Meccanismo di formazione	16
1.6.3 Scelta del substrato	17
1.6.4 Scelta del precursore del SAM	17
1.7 Cristallizzazione di API su SAM	17
1.7.1 Meccanismo di cristallizzazione su SAM	18
1.8 Obiettivo ed organizzazione della tesi	18
2. Materiali e Metodi	21
2.1 Materiali	21
2.2 Metodi	23
2.2.1 Sintesi dei self-assembled monolayer (SAM)	23
2.2.2 Caratterizzazione delle superfici	24
2.2.3 Cristallizzazione	27
3. Risultati	31
3.1 Caratterizzazione dei SAM	31
3.1.1 Angolo di contatto	31
3.1.2 Potenziale zeta di superficie	38
3.2 Cristallizzazione	45
4. Conclusioni	61
Lista dei simboli	63
Abbreviazioni	65
Bibliografia	67
Ringraziamenti	73

1. Introduzione

1.1 Cristallizzazione

La cristallizzazione è una delle più antiche operazioni unitarie che si conoscono nel campo della ingegneria chimica e permette di ottenere un'ampia varietà di materiali le cui applicazioni riguardano prevalentemente l'industria farmaceutica e quella alimentare. Nel corso degli anni la crescita industriale e l'avanzamento delle tecnologie hanno permesso di capire più a fondo alcuni aspetti importanti del processo, migliorando il design delle apparecchiature e il controllo dello stesso processo. Questo si è tradotto in un migliore controllo delle caratteristiche del prodotto finale in termini di dimensione, forma, stabilità e solubilità dei cristalli. Ad oggi la comprensione dei fondamenti della nucleazione, la produzione e lo scale-up di nuovi solidi cristallini e lo sviluppo di nuovi processi in continuo rappresentano le principali aree di ricerca e sviluppo, soprattutto nell'ambito della cristallizzazione di farmaci [1]. D'altra parte, dal punto di vista industriale, vi è l'esigenza di ottenere prodotti ad elevata purezza, stabilità e aventi granulometria e forma definita [2]. Queste ultime sono un aspetto fondamentale nella produzione e vendita di prodotti cristallini, principalmente perché delineano le proprietà chimico-fisiche del cristallo, ma allo stesso tempo sono essenziali per una gestione efficiente di tutti i processi a valle della produzione come filtrazione, essiccamento e macinazione [3]. La cristallizzazione è un'operazione fortemente sensibile alle condizioni di processo per cui averne il controllo è un punto cruciale per conseguire un prodotto altamente specifico. Sono infatti sufficienti piccole variazioni dei parametri di processo, o l'introduzione di disturbi esterni come contaminazioni, per influire sulle proprietà chimico-fisiche dei cristalli prodotti. Nell'industria farmaceutica la cristallizzazione è indispensabile per produrre e isolare il principio attivo dei farmaci; purtroppo data la complessità della struttura chimica e della composizione di alcuni composti, difficilmente è possibile gestirne alcuni requisiti agendo unicamente sui parametri di processo, il che porta ad alcune problematiche riguardanti la morfologia cristallina o la comparsa di altre forme cristalline di uno stesso farmaco, che in molti casi risulta essere incompatibile con le normative riguardanti il commercio di farmaci [4]. Un esempio è quello del Talidomide, un farmaco venduto negli anni Cinquanta e Sessanta come sedativo e ipnotico, usato in particolar modo dalle donne in gravidanza come agente antinausea. Il prodotto era ottenuto da una miscela racemica e successivamente si scoprì che uno dei due enantiomeri risultava teratogenico e venne quindi ritirato dal mercato [5,6]. Altri casi più recenti sono quelli del Ritonavir, un farmaco utilizzato nel trattamento del virus HIV, e della Rotigotina (Neupro) che è stata usata nel trattamento della malattia di Parkinson. Entrambi i farmaci presentavano una forma polimorfa che alterava le proprietà del farmaco [7,8]. L'interesse nel risolvere queste problematiche ha portato ad un maggiore interesse verso lo studio e il miglioramento del processo di cristallizzazione mediante la ricerca di nuove tecniche di cristallizzazione e lo sviluppo di tecnologie alternative che possano permettere di monitorare e gestire il processo in tempo reale, permettendo un miglior controllo della granulometria e del polimorfismo [3].

Tra le tecniche in via di sviluppo più promettenti vi è la nucleazione indotta da superfici, in cui si agisce sul design di una superficie solida per imporre una via di cristallizzazione ben

specifica e garantire la forma e dimensione desiderata. In più, in certi casi è possibile ridurre anche i tempi di nucleazione. Inoltre, la possibilità di ingegnerizzare la superficie in base al farmaco da cristallizzare rappresenta una interessante possibilità di ricerca in questo campo.

1.2 Materiali cristallini

Un cristallo è un materiale solido caratterizzato da una struttura, detta reticolo cristallino, che si ripete in modo ordinato e periodico nello spazio come mostrato in Figura 1.1. Un reticolo è costituito da un insieme di celle uguali che si ripetono in maniera ordinata nello spazio, in modo che le facce piane di ciascuna cella corrispondano alle facce delle celle adiacenti. Una distinzione importante è quella tra materiale amorfo e cristallino, fisicamente entrambi i materiali sono solidi ma a livello atomico strutturale gli amorfi presentano una organizzazione spaziale disordinata.

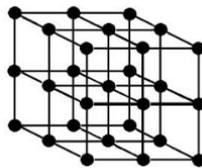


Figura 1.1 *Rappresentazione di un reticolo cristallino.*

La struttura di ogni reticolo dipende dalla disposizione delle molecole che costituiscono il solido e dalle forze intermolecolari e intramolecolari che li costituiscono.

Nel 1848 August Bravais individuò diverse strutture ordinate e le classificò in base alla disposizione che gli atomi assumevano nello spazio [9,10]. Le varie classi si distinguono per la forma delle singole celle del reticolo. Ciascuna forma è poi riconducibile ad uno dei sette sistemi cristallini fondamentali (monoclinico, triclinico, cubico, tetragonale, esagonale, ortorombico, romboedrico) e dalla presenza o meno di punti nel centro della struttura o nelle facce di questa.

In cristallografia è più comune fare riferimento ai piani cristallini attraverso gli indici di Miller. Questi indici sono una rappresentazione convenzionale di un piano attraverso l'uso di tre parametri h , k , l che sono definiti come i reciproci delle intersezioni del piano con gli assi del cristallo. Per esempio, se un piano è parallelo all'asse il suo indice di Miller è 0. Alcuni esempi sono mostrati in Figura 1.2.

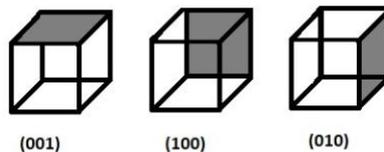


Figura 1.2 *Indici di Miller in un sistema cubico.*

La conoscenza dei piani cristallini permette di identificare la faccia di crescita preferenziale durante la fase di crescita del cristallo.

Una medesima specie chimica può cristallizzare in più forme cristalline, fenomeno noto come polimorfismo. Quando si formano più cristalli polimorfici, la loro natura chimica rimane invariata mentre le proprietà fisiche, come quelle ottiche, durezza, conducibilità e densità, possono essere differenti. Le varie forme cristalline sono comunemente identificate attraverso la tecnica di diffrazione a raggi X (XRD).

Nei processi di cristallizzazione le sostanze che presentano polimorfismo sono problematiche, in quanto è molto difficile determinare le condizioni di processo che permettono di ottenere la forma cristallina desiderata. D'altro canto, è possibile che il prodotto successivamente possa variare di forma anche solo con piccole variazioni di temperatura, tendendo, ad esempio, a trasformarsi nella forma cristallina più stabile e dando luogo ad una transizione polimorfica. Questa trasformazione rappresenta un problema soprattutto nell'industria farmaceutica, in quanto una variazione della forma cristallina può incidere sulle proprietà del farmaco e quindi non può essere commercializzato. In più, alcune sostanze possono dare forma a due cristalli diversi che sono l'immagine speculare dell'altra, questo fenomeno è detto enantiomorfismo. Esso è tipico di molecole enantiomere che hanno la stessa struttura chimica ma la disposizione nello spazio degli atomi non permette la sovrapposizione delle immagini speculari. Un esempio di enantiomorfismo è mostrato in Figura 1.3 per l'Acido Tartarico.

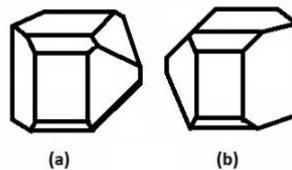


Figura 1.3 Enantiomorfismo di cristalli di Acido Tartarico, (a) destrogiro e (b) levogiro. Figura tratta da [10] con modifica.

I cristalli che presentano questa peculiarità si distinguono per la differente capacità di ruotare il piano della luce polarizzata. In base alla direzione in cui viene ruotata la luce polarizzata si distinguono in destrogiro (D) o levogiro (L), corrispondente a destra e sinistra. Una miscela di forme D e L viene detta racemica e nei processi industriali una delle problematiche è proprio la separazione delle forme nei singoli puri. Infine, sostanze differenti tra loro ma che cristallizzano nella medesima forma cristallina vengono dette isomorfe. Questo avviene di solito quando due specie diverse presentano una struttura atomica molto simile e gli atomi tendono ad occupare le stesse posizioni nel reticolo cristallino. In una soluzione, che contiene due specie isomorfe, le due specie potrebbero cristallizzare insieme formando un cristallo misto, rendendo difficile la separazione delle due specie.

1.2.1 Abito cristallino

L'abito cristallino è la forma con cui si presenta il cristallo dopo il processo di cristallizzazione. Nei processi industriali è di notevole importanza la conoscenza di come si presenta un cristallo nella forma finale in quanto questa caratteristica influenza: le proprietà reologiche della soluzione, l'efficienza di filtrazione o centrifugazione, la massa volumica apparente e la

viscosità apparente della soluzione [9]. Perciò è molto importante il controllo dell'abito cristallino nonché della distribuzione della dimensione dei cristalli.

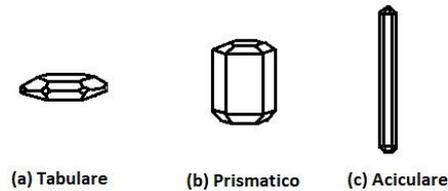


Figura 1.4 Esempi di abito cristallino. Figura tratta da [10] con modifica.

Un modo qualitativo di rappresentare un cristallo è attraverso le caratteristiche che lo rappresentano come: numero di facce presenti e le relative aree, la lunghezza rispetto le tre direzioni nello spazio, gli angoli tra le facce e il fattore di forma che definisce un fattore di volume α e un fattore di area β .

Anche se i cristalli presentano una struttura reticolare identica le facce presenti potrebbero non crescere allo stesso modo e questo permette di ottenere abiti diversi, per cui il fenomeno non dipende solo dalla struttura interna ma anche dalla velocità di crescita delle singole facce [9]. I fattori che più incidono sulla forma finale del prodotto finale sono: la velocità di crescita, la presenza di impurezze e il tipo di solvente utilizzato.

Secondo la regola di Bravais, le facce che governano la morfologia di un cristallo sono quelle con la maggiore densità reticolare e maggiore distanza interplanare [10].

1.3 Teoria della cristallizzazione

La cristallizzazione è un processo di separazione di fase in cui è possibile ottenere un solido cristallino a partire da una soluzione liquida o gassosa, nella quale per soluzione si intende un sistema di due o più specie che formano una singola fase omogenea. La cristallizzazione da soluzione non è l'unica via; è possibile ottenere lo stesso risultato utilizzando un fuso, una sostanza che a temperatura ambiente è solido, ma se riscaldato si comporta come un liquido. Il meccanismo di cristallizzazione è costituito da due stadi consecutivi tra loro: la nucleazione e la crescita. Il primo è lo stadio di formazione di una nuova fase solida mentre il secondo è quello di crescita del cristallo. Sia nucleazione che crescita necessitano di una forza motrice che è rappresentata dalla sovrasaturazione della soluzione. Il prodotto finale ottenuto dipende dal rapporto tra le velocità di nucleazione e crescita. Se la velocità del primo stadio è maggiore del secondo si otterranno tanti cristalli, ma di dimensione molto piccola; viceversa, nel caso in cui la velocità di nucleazione è minore della velocità di crescita, si ottengono pochi cristalli ma di elevata dimensione.

1.3.1 Solubilità e Sovrasaturazione

Una soluzione è definita satura ad una determinata temperatura quando raggiunge le condizioni di equilibrio termodinamico tra soluto e solvente, cioè quando il soluto non è più in grado di dissolversi nel solvente.

La solubilità è la quantità di soluto richiesta per raggiungere le condizioni di saturazione di una soluzione in determinate condizioni di temperatura e pressione. La solubilità dipende fortemente dalla temperatura, ma anche dalla tipologia di solvente. In generale la solubilità di un soluto è rappresentata attraverso la curva di solubilità, un diagramma che riporta la concentrazione in funzione della temperatura. La curva di solubilità divide il campo di concentrazione e temperatura in due zone distinte una di stabilità (soluzione insatura) e una di instabilità (soluzione sovrasatura).

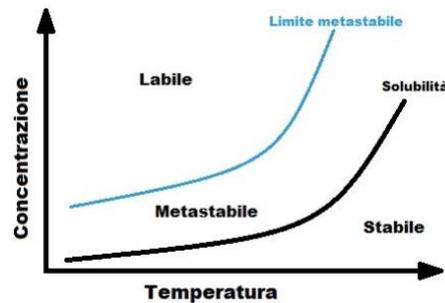


Figura 1.5: Curva di solubilità e limite metastabile. Figura tratta da [10] con modifica.

Per sovrasaturazione si intende una condizione di instabilità del sistema. Quando il sistema si trova in una condizione di instabilità tende a ristabilire le condizioni di equilibrio attraverso la cristallizzazione della soluzione dopo un certo periodo di tempo, detto tempo di induzione alla nucleazione. E' quindi possibile definire la condizione di sovrasaturazione come metastabile [9]. Come mostrato in Figura 1.5, il campo di metastabilità della soluzione non si estende su tutta la zona di instabilità, ma esiste un valore limite di sovrasaturazione oltre il quale la formazione del cristallo è istantanea [10].

Nel 1897 Ostwald introdusse i termini “labile” e “metastabile” per classificare le diverse condizioni di una soluzione sovrasatura [10].

In modo particolare distinse tre zone come riportato in Figura 1.5:

1. Stabile (non satura): la cristallizzazione è impossibile.
2. Metastabile (sovrasatura): la cristallizzazione è improbabile a meno della presenza di un cristallo già presente nella soluzione.
3. Labile o instabile (sovrasatura): la cristallizzazione spontanea è probabile, ma non inevitabile.

La sovrasaturazione è la forza spingente del processo di cristallizzazione e generalmente viene espressa in diversi modi: differenza di concentrazione Δc (1.1), rapporto tra concentrazioni S (1.2) o sovrasaturazione relativa σ (1.3).

$$\Delta c = c - c^* \quad (1.1)$$

$$S = \frac{c}{c^*} \quad (1.2)$$

$$\sigma = \frac{\Delta c}{c^*} = S - 1 \quad (1.3)$$

dove c è la concentrazione della soluzione e c^* è la solubilità ad una data temperatura.

1.3.2 Nucleazione

La nucleazione è il meccanismo con il quale un sistema risponde ad una variazione delle condizioni di equilibrio verso quella di instabilità. All'interno del sistema la concentrazione di soluto deve rimanere costante e, di conseguenza, la risposta si tramuta nella formazione di una nuova fase termodinamica per riportare il sistema a condizioni di equilibrio. Per cui è possibile definire la nucleazione come la formazione di una fase solida all'interno di una soluzione sovrasatura.

Il fenomeno è quindi caratterizzato da un cambiamento di fase dovuto alla formazione di nuclei, ovvero aggregati di atomi, ioni o molecole che, raggiunta la dimensione sufficiente alla formazione di un nucleo stabile, può successivamente procedere con l'accrescimento.

In generale si distinguono due meccanismi di nucleazione diversi tra loro: primario e secondario.

La nucleazione primaria si divide ulteriormente in omogenea (spontaneo nel bulk) ed eterogenea (indotta da superfici), mentre la secondaria implica la presenza di un cristallo e la sua interazione con il sistema.

La nascita di un nucleo è condotta dalle fluttuazioni statistiche delle molecole che si aggregano per dare origine ad un cluster, per cui si pensa che questo fenomeno sia un fenomeno probabilistico piuttosto che deterministico [3].

Pur conoscendo la termodinamica del sistema abbiamo solo informazioni sul suo stato di equilibrio, ma non conosciamo nulla sulla velocità di formazione del cristallo e dunque il tempo con cui il sistema risponde alle fluttuazioni dovute ad una condizione di instabilità [9].

La nucleazione è il fenomeno chiave per il processo di cristallizzazione e, a tutt'oggi, non è ancora del tutto chiaro come si evolve nel corso del processo. Diverse sono le teorie che vengono adottate: la teoria classica di nucleazione (CNT) [11,12], la nucleazione a due stadi [13] e quella del liquido denso [14].

Infine, la nucleazione secondaria si verifica quando la presenza di un cristallo nella soluzione ha un effetto catalizzante sulla cinetica di nucleazione, agendo da promotore della formazione dei cristalli. Diversi sono i meccanismi e cinetiche di nucleazione secondaria studiate e proposte, ma in generale risultano troppo complesse e poco comprensibili, in quanto è possibile che la nucleazione primaria e quella secondaria avvengano contemporaneamente, rendendo ancora più difficile l'interpretazione.

Nucleazione Omogenea

La nucleazione omogenea avviene in modo spontaneo nel bulk della soluzione, nella pratica raramente si verifica a causa della competitività con la nucleazione eterogenea dovuta a impurità disciolte nella soluzione e dalla presenza di superfici fisiche.

Secondo la teoria CNT la formazione di un cluster è dovuta ad un meccanismo di addizione di singole molecole o cluster:

$$\begin{aligned}
 a + a &= a_2 \\
 a + a_2 &= a_3 \\
 a + a_3 &= a_4 \\
 a_2 + a_2 &= a_4 \\
 &\dots \dots \\
 a_{c-m} + a_m &= a_c
 \end{aligned}
 \tag{1.4}$$

L'addizione continua fino a quando non si raggiunge la dimensione critica; la cinetica è assimilabile a quella di Arrhenius (1.5):

$$J_0 = A \exp\left(-\frac{\Delta G_{cr}}{k T}\right)
 \tag{1.5}$$

dove J_0 è la velocità di nucleazione, ovvero il numero di nuclei formati nell'unità di tempo e di volume, A è il fattore pre-esponenziale, k la costante di Boltzmann, T la temperatura e ΔG_{cr} la variazione di energia libera critica di formazione del nucleo.

La termodinamica della nucleazione omogenea è stata descritta da Gibbs (1928), Volmer (1939) ed altri [9]. La variazione di energia libera (1.6) per la formazione di nuova fase è la somma di due contributi: uno di superficie (positivo) e uno di volume (negativo):

$$\Delta G = \Delta G_s + \Delta G_v = S \times \Delta g_s + V \times \Delta g_v
 \tag{1.6}$$

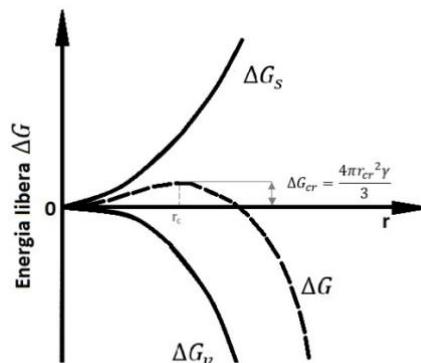


Figura 1.6 Energia libera in funzione del raggio del nucleo. Figura tratta da [10] con modifica.

Se consideriamo i nuclei con una geometria sferica la (1.6) si riscrive nella (1.7):

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v \quad (1.7)$$

dove r è il raggio del nucleo e γ è l'energia di superficie.

Per valutare la dimensione critica valutiamo l'energia libera minima rispetto al raggio:

$$\frac{d(\Delta G)}{dr} = 8\pi r_{cr} \gamma + 4\pi r_{cr}^2 \Delta G_v = 0 \quad (1.8)$$

$$\Delta G_v = -\frac{2\gamma}{r_{cr}} \quad (1.9)$$

Sostituendo la (1.9) nella (1.7):

$$\Delta G_{cr} = \frac{4\pi r_{cr}^2 \gamma}{3} \quad (1.10)$$

La variazione del raggio del cluster è governata secondo l'equazione di Gibbs-Thompson:

$$\ln\left(\frac{c}{c^*}\right) = \ln S = \frac{2\gamma v}{kTr} \quad (1.11)$$

dove v è il volume della molecola.

Riscrivendo la (1.10) con la (1.11):

$$\Delta G_{cr} = \frac{16\pi\gamma^3 v^2}{3(kT \ln S)^2} \quad (1.12)$$

Sostituendo la (1.12) nella (1.5):

$$J_0 = A \exp\left(-\frac{16\pi\gamma^3 v^2}{3(\ln S)^2 (kT)^3}\right) \quad (1.13)$$

Dalla formula (1.13) ottenuta è possibile evincere come la cinetica di nucleazione sia influenzata da tre parametri: la tensione superficiale, la temperatura e il grado di sovrasaturazione del sistema.

Nucleazione Eterogenea

Quando nel sistema è presente un substrato inerte questo influisce sulla cinetica di nucleazione diminuendo l'energia necessaria alla formazione del cluster di un fattore ϕ .

$$\Delta G_{eterogenea} = \phi \Delta G_{omogenea} \quad (1.14)$$

Nella termodinamica del meccanismo di nucleazione lo sfavorevole contributo dovuto alla formazione di nuova superficie viene ridotto grazie all'angolo di contatto tra le molecole di soluto e il substrato.

Considerando il sistema formato, Figura 1.7, da superficie, soluto e solvente e le rispettive tensioni interfaciali in equilibrio, è possibile ricavare la relazione che li lega all'angolo di contatto.

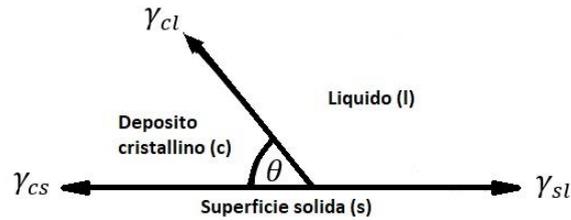


Figura 1.7 Tensioni interfaciali tra le fasi: liquido, solido e cristallo. Figura tratta da [10] con modifica.

$$\gamma_{sl} = \gamma_{cs} + \gamma_{cl} \cos \theta \quad (1.15)$$

dove γ_{sl} , γ_{cs} e γ_{cl} sono rispettivamente le tensioni interfaciali tra le fasi solido-liquido, cristallo-solido e cristallo-liquido; θ è l'angolo di contatto.

La relazione di Volmer (1939), permette di esprimere il fattore ϕ in funzione dell'angolo di contatto θ :

$$\phi = \frac{(2 + \cos \theta)(1 - \cos \theta)^2}{4} \quad (1.16)$$

L'equazione (1.16) è rappresentata in Figura 1.8, dove è possibile stabilire che quando l'angolo θ è inferiore di 180° il fattore ϕ è minore di 1, per tanto l'energia libera richiesta nella nucleazione eterogenea è inferiore a quella omogenea.

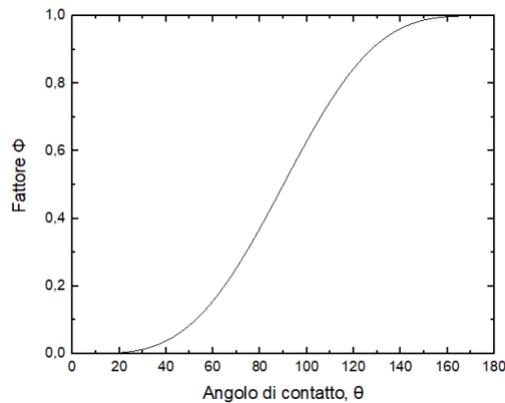


Figura 1.8 Variazione del fattore ϕ al variare dell'angolo di contatto θ .

Teoria della nucleazione a due stadi

Negli ultimi anni è stato proposto un nuovo meccanismo di nucleazione per la quale il processo non si sviluppa con un unico stadio, come proposto nella teoria classica, ma in due stadi come rappresentato in Figura 1.9.

La nucleazione a due stadi prevede una prima formazione di una fase liquida densa di molecole di soluto disordinate dovuto alle fluttuazioni nella soluzione, successivamente i cluster metastabili si riorganizzano nello spazio per dare la struttura cristallina [13]. Seguendo quest'ordine sono due le barriere energetiche che si devono superare per riuscire ad ottenere un nucleo stabile.

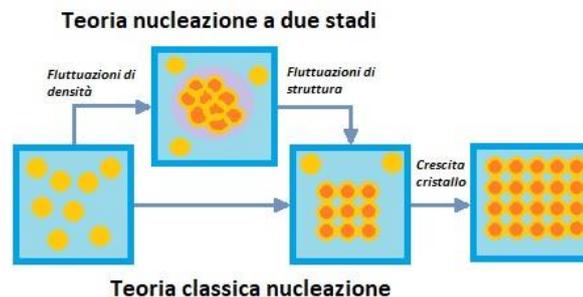


Figura 1.9 Meccanismo di nucleazione a due stadi. Figura tratta da [3] con modifica.

1.3.3 Fase di crescita dei cristalli

La crescita è lo stadio successivo alla nucleazione, quando la dimensione di un nucleo raggiunge quella critica, inizia la fase di crescita dello stesso, ovvero un aumento della sua dimensione nel tempo. Ovviamente questo processo avviene in condizioni di sovrassaturazione.

La cinetica di crescita è spesso descritta da modelli piuttosto complessi sia dal punto di vista intuitivo che matematico. Un modello semplice e utile per la comprensione del fenomeno prevede di assumere la velocità di crescita lineare. Questa assunzione ci permette di vedere il fenomeno solo attraverso la variazione della dimensione caratteristica del cristallo nel tempo, ma in realtà la velocità di crescita varia a seconda della faccia preferenziale del cristallo, per cui la dimensione di ciascuna faccia varia con velocità diverse [9].

Il modello lineare descrive la crescita attraverso due meccanismi: uno diffusivo e uno di reazione con la superficie come illustrato in Figura 1.10.

Il meccanismo di diffusione è dovuto ad un gradiente di concentrazione di soluto dal bulk del sistema fino all'interfaccia con la superficie del cristallo, in cui le molecole di soluto diffondono verso la superficie. Il meccanismo di reazione dipende dal grado di adsorbimento delle molecole ma anche da caratteristiche della superficie che possono favorire il processo o meno.

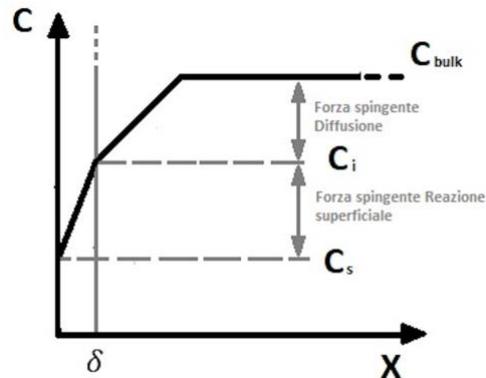


Figura 1.10 Forze spingenti del meccanismo di crescita lineare del sistema concentrazione in funzione della distanza x dalla superficie. C_i concentrazione all'interfaccia, C_s concentrazione alla superficie, δ spessore film all'interfaccia. Figura tratta da [10] con modifica.

1.4 Il processo di cristallizzazione nell'industria farmaceutica

La particolarità dell'industria farmaceutica, a differenza di altri campi di applicazione della cristallizzazione, è quella di utilizzare molecole molto complesse dal punto di vista chimico e ciò influisce sulla termodinamica e cinetica della cristallizzazione. Queste molecole hanno la caratteristica di avere una determinata funzione biologica che ha differenti effetti sul soggetto che le assume. Esse comunemente vengono chiamate principi attivi (API). L'obiettivo del processo di cristallizzazione è quello di ottenere un prodotto di elevata purezza e con granulometria specifica, per cui si richiede uno stretto controllo sui meccanismi di nucleazione e crescita [9]. La biodisponibilità è fortemente influenzata dalla dimensione dei cristalli del farmaco e non solo dalla sua natura, inoltre la purezza ne determina la stabilità dopo la commercializzazione che è estremamente importante in quanto il medicinale deve essere attivo quando viene utilizzato dal paziente.

Per il controllo del processo è necessario conoscere come varia la solubilità e il limite di metastabilità della soluzione, nonché regolare le condizioni di sovrasaturazione che influenzano l'evoluzione sia della nucleazione che della crescita.

1.4.1 Tecniche di cristallizzazione nell'industria farmaceutica

La forza motrice della cristallizzazione è la sovrasaturazione della soluzione per cui è molto importante capire la termodinamica di quest'ultima in funzione della solubilità. Le modalità con cui sono raggiunte le condizioni necessarie alla nucleazione sono: raffreddamento a concentrazione costante, evaporazione a temperatura costante o l'aggiunta di un antisolvente che modifica la solubilità del soluto.

Per capire quale metodologia applicare è importante conoscere come varia la solubilità in funzione di determinati parametri e in presenza di altre sostanze nella soluzione (additivi o impurezze).

Effetto della temperatura

In generale molte delle sostanze biologiche usate come soluto aumentano la solubilità all'aumentare della temperatura, però l'intervallo di temperatura in cui è possibile lavorare diventa limitato in quanto alcuni composti possono degradarsi ad alte temperature o la soluzione congelarsi a temperatura basse. Inoltre, la temperatura influisce sulla cinetica del processo e quindi sulla struttura del prodotto finale.

Effetto del pH

Alcune molecole, come ad esempio gli amminoacidi o antibiotici, presentano una solubilità fortemente dipendente dal pH, in quanto la presenza di ioni idrogeno può influenzare lo stato fisico-chimico della sostanza. Molte delle molecole utilizzate presentano un comportamento come in Figura 1.11, con una solubilità che varia in funzione del pH; l'intervallo in cui la curva è circa costante è quella che rappresenta lo stato di zwitterione ed è quello più preponderante.

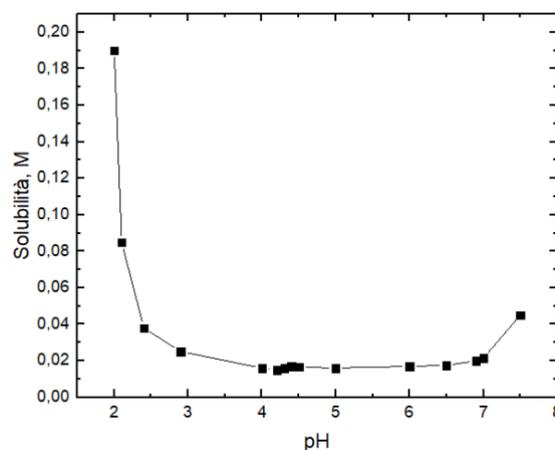


Figura 1.11 Solubilità dell'Amoxicillina al variare del pH. Figura tratta da [9] con modifica.

Effetto dell'aggiunta di un antisolvente e di un sale

L'uso di una sostanza miscibile con la soluzione, come un antisolvente, è molto comune nell'industria farmaceutica e permette di portarsi rapidamente nelle condizioni di sovrasaturazione rispetto alla variazione di temperatura. A seconda delle operazioni con cui si esegue il processo e dalla tipologia di antisolvente, è possibile recuperare la sostanza per distillazione e riutilizzarla. Per cui ai fini del controllo del processo è necessario controllare la quantità di antisolvente che si usa nel sistema per gestire nucleazione e crescita. L'aggiunta di un sale nella soluzione può stabilizzare o destabilizzare la molecola di soluto nella soluzione e questo fa variare la solubilità del sistema a seconda del tipo di interazione tra il soluto e il sale utilizzato; in generale gli ioni con carica opposta hanno un maggiore effetto sulla solubilità.

1.4.2 Controllo della dimensione e morfologia dei cristalli

Nell'industria farmaceutica è importante che la distribuzione della dimensione dei cristalli sia ben controllata e ristretta verso una dimensione desiderata che possa facilitare la dissoluzione

dei cristalli in breve tempo e quindi una migliore biodisponibilità. Per controllare le caratteristiche desiderate del prodotto finale occorre gestire in modo efficace le velocità di nucleazione e di crescita, per cui è necessario conoscere la termodinamica del sistema, la struttura reticolare del cristallo e qual è la faccia preferenziale di crescita. Il problema principale in questo campo riguarda la scarsa conoscenza di dati utili alla cristallizzazione per molte delle sostanze utilizzate in ambito farmaceutico in quanto la loro complessità rende difficile prevedere il loro comportamento al variare delle condizioni termodinamiche del sistema, inoltre la necessità di avere dimensioni di cristalli molto ridotte richiede elevate sovrasaturazioni della soluzione che risultano difficilmente applicabili [9].

1.4.3 Purificazione del prodotto finale

La purificazione del prodotto ottenuto per cristallizzazione riguarda essenzialmente la separazione e la rimozione del solvente. L'efficienza del processo riguarda la presenza o meno di impurità nel cristallo come: occlusione del solvente, co-cristallizzazione e l'incorporazione di impurezze dal soluto. Questi fenomeni sono soprattutto dovuti alla dimensione delle molecole da cristallizzare che quindi influisce sulla struttura del reticolo stesso, rendendo più probabile la presenza di difetti e quindi una più facile interazione con le sostanze contenute nella soluzione. La loro presenza è un problema grave in quanto potrebbero avere una certa tossicità e quindi causare danni ai consumatori.

In generale l'occlusione del solvente si presenta nello stadio di crescita ed è dovuto alla presenza di una faccia del cristallo instabile che porta all'intrappolamento del solvente all'interno del cristallo. Maggiore è la velocità di crescita e maggiore sarà la presenza di solvente coinvolto. Questa problematica porta ad ulteriori costi di essiccamento dei cristalli.

D'altro canto, la presenza di più specie di soluto in una soluzione che si trova nelle condizioni di sovrasaturazione può portare alla formazione di un cristallo la cui struttura reticolare è formata da più specie. Un'ulteriore problematica molto comune nell'industria farmaceutica è la presenza di polimorfismo e, come discusso in precedenza, le proprietà del cristallo possano variare a seconda della forma in cui si trova. La previsione di questo fenomeno non è ancora del tutto compresa e difficilmente si riesce a trovare dati sufficienti a descrivere il polimorfismo di molte delle sostanze biologiche usate nell'industria farmaceutica.

1.5 Cristallizzazione indotta da superfici

La presenza di una superficie inerte nella soluzione da cristallizzare permette di effettuare il processo in condizioni di sovrasaturazione non troppo elevate, in quanto diminuisce la barriera energetica per ottenere un nucleo stabile mediante la riduzione del contributo di superficie e di ridurre il tempo di formazione della fase cristallina, come introdotto nella sezione §1.3.2. Un altro grande vantaggio è quello di poter indirizzare la cristallizzazione verso dimensioni e morfologie specifiche senza alterare le condizioni termodinamiche della soluzione. Inoltre, se la superficie è funzionale, ovvero interagisce con il sistema soluto-solvente, è possibile ridurre i tempi di nucleazione ottimizzando il processo, in quanto la nucleazione è lo stadio che richiede più tempo [3].

Molti studi e applicazioni di questo metodo di cristallizzazione hanno permesso lo screening, l'isolamento e la scoperta di polimorfismo a bassi livelli di sovrasaturazione della soluzione [3] nonché di nuovi meccanismi di nucleazione [15].

Nonostante molti vantaggi, le difficoltà che ne comporta riguarda la sintesi di queste superfici: le tempistiche possono essere lunghe e di non facile riproducibilità, in quanto per controllare l'introduzione di una determinata funzionalità occorre lavorare su scala nanometrica. Queste applicazioni richiedono innumerevoli tentativi per riuscire a capire la migliore combinazione tra superficie e soluto, in quanto la nucleazione è un meccanismo per lo più stocastico, e dunque sono ancora a livello di studio e ricerca.

L'uso di superfici funzionali permette di gestire e guidare il processo di cristallizzazione tramite il controllo chimico-fisico delle interazioni tra la superficie e la molecola da cristallizzare. Nucleazione, crescita e polimorfismo sono i meccanismi che vengono influenzati dalla presenza della superficie. In generale, le superfici eteronucleanti possono essere utilizzate per modificare il tempo medio di nucleazione (τ), la dimensione e la forma del cristallo [3,16]. A seconda della morfologia di superficie impiegata e dal tipo di interazione tra essa e le molecole presenti nel sistema, le variabili sopracitate possono variare in modo evidente anche nelle stesse condizioni di temperatura, pH e sovrasaturazione.

1.5.1 Tipologie di superfici

La tipologia di superficie può influenzare il processo di cristallizzazione mediante due proprietà: la morfologia e la chimica [3]. Queste caratteristiche giocano un ruolo fondamentale nelle interazioni che si instaurano tra la superficie e la soluzione, che a seconda delle proprietà del substrato possono generare un effetto sinergico favorevole ai meccanismi di cristallizzazione. Un ruolo determinante è quindi dato dall'affinità tra le caratteristiche di morfologia e chimica della superficie con le molecole da cristallizzare nella soluzione: maggiore è l'affinità e maggiore sarà l'effetto "catalizzante".

Per quanto riguarda l'influenza della morfologia della superficie, un contributo determinante è dato la presenza di imperfezioni superficiali a livello della nanoscala. Questi difetti possono presentarsi in modo regolare o irregolare e, a seconda del grado di rugosità, variare la sua bagnabilità e quindi l'angolo di contatto tra il substrato e la soluzione. I difetti possono essere ingegnerizzati con micro o nano pori controllati e aventi geometrie diverse, per cui la combinazione tra il motivo, dimensione dei pori e l'angolo di contatto che si instaura può contribuire al superamento della barriera energetica che porta alla formazione di nuclei stabili e favorire la crescita preferenziale di una data forma cristallina. Allo stesso tempo, se il *template* scelto per la superficie non è affine ad alcune caratteristiche del cristallo, come ad esempio la forma, è possibile inibirne la cinetica di nucleazione. Un esempio riguarda il caso di pori sferici che si presume siano incompatibili con la promozione della nucleazione [3].

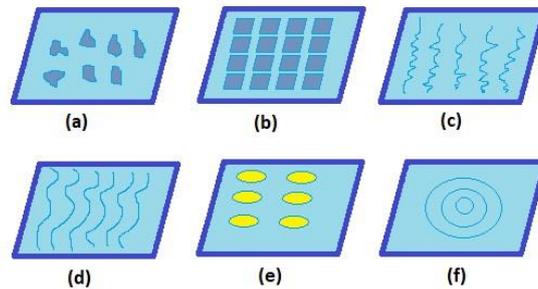


Figura 1.12 Esempio di morfologia di alcune superfici adottate per lo studio del controllo della cristallizzazione: (a) pori irregolari, (b) matrice periodica di pori, (c) rugosità superficiale, (d) nanopieghe, (e) nano-isole, (f) modello geometrico regolare. Figura tratta da [3] con modifica.

La chimica della superficie è invece determinata dalla natura gruppi esposti sulla superficie. In base ai gruppi superficiali, l'interazione tra il substrato e le molecole può essere di tipo elettrostatico, adsorbimento fisico non specifico o ponti idrogeno [3,17,18]. La forza di interazione che si instaura può promuovere l'arrangiamento delle molecole di soluto e, come mostrato in alcuni studi, orientare il processo verso una crescita preferenziale [16].

Le superfici si possono dividere in due gruppi: cristalline e amorfe. Le superfici cristalline promuovono il fenomeno della epitassia, ovvero la cristallizzazione su superfici caratterizzate da una struttura definita e periodica che impartisce una organizzazione e dunque una orientazione specifica nella fase di crescita. In questo caso si ha corrispondenza tra la struttura del reticolo del cristallo e quella della superficie. Le superfici amorfe possono essere polimeriche a base di carbonio o vetrose a base di silicio. Le prime hanno particolarità di essere sintetizzate come un film polimerico su un substrato attraverso diverse tecniche di rivestimento o deposizione. Un punto a favore è sicuramente il fatto di poter scegliere monomeri da polimerizzare con caratteristiche specifiche che possono essere affini con la molecola di soluto e che sono insolubili nella soluzione [3]. Le superfici vetrose possono essere funzionalizzate con silani, acrilati e altre specie per modificare le proprietà triboelettriche della superficie o alternativamente possono essere modificate o sintetizzate con opportune tecniche per creare diversi pattern con pori di forme e/o dimensioni variabili.

1.6 Funzionalizzazione di una superficie attraverso self-assembled monolayer

Il continuo miglioramento delle tecniche e degli strumenti di caratterizzazione delle superfici hanno aperto il cammino alle nanoscienze e alla loro importanza nel capire da cosa dipendono e come si possono controllare le proprietà interfacciali di un materiale solido a livello molecolare. Il monostato auto-assemblato (self-assembled monolayer, SAM) è uno dei sistemi più semplici e flessibili per la produzione di uno strato superficiale con ben definite proprietà tribologiche come, ad esempio, la bagnabilità, adesione, compatibilità chimica, conducibilità, corrosione, attrito. Sin dalla loro introduzione negli anni Ottanta, dagli studi di Nuzzo e Allara [19] e Maoz e Sagiv [20], ad oggi sono innumerevoli i campi di applicazione delle SAM come, ad esempio, la microelettronica, optoelettronica, sensori chimici e

biosensori, rivestimenti protettivi, nanotecnologie, biofilm, adsorbimento di proteine, adesione di cellule e altre [21]. Il punto di forza di queste superfici è sicuramente la stabilità e l'uniformità del monostrato che, grazie ad un forte legame covalente con il substrato, le permette di perdurare nel tempo, ma anche la possibilità della scelta di una buona gamma di molecole organiche, in genere silani, che si possono utilizzare o modificare in seguito per ottenere prestazioni personalizzate. Un possibile svantaggio è sicuramente la sensibilità di alcuni gruppi funzionali a condizioni esterne come la luce, temperatura e umidità [21].

1.6.1 Definizione di monostrato auto-assemblato

Un monostrato auto-assemblato è uno strato assemblato e organizzato di molecole organiche chemiassorbite in modo spontaneo sulla superficie di un substrato solido, con una forte e specifica composizione affine all'adsorbato, che può essere un metallo, ossido o vetro. Nella preparazione del monostrato sono utilizzate sostanze dette anfifiliche, in quanto caratterizzate sia da un gruppo idrofilo che da uno lipofilo. La duplice natura della molecola le permette di ancorarsi al substrato mediante un legame covalente con il gruppo di testa (idrofilico), mentre il gruppo di coda (idrofobo) attraverso interazioni di Van der Waals consente alla struttura di riorganizzarsi rispetto alla superficie in modo uniforme, compatto ed ordinato. In generale, molte delle molecole tensioattive utilizzate come SAM sono provviste di un gruppo terminale esposto alla superficie che genera la funzionalizzazione chimica dello stesso monostrato [21].

Uno dei modi più semplici e comuni per preparare un SAM è quello di immergere il substrato precedentemente trattato, per renderlo attivo all'adsorbimento, in una soluzione ricca del tensioattivo scelto come monostrato. Alternativamente si può adottare il metodo della deposizione chimica da vapore che è altrettanto molto usata.

1.6.2 Meccanismo di formazione

Il meccanismo di formazione del monolayer assemblato come mostrato in Figura 1.13 avviene in diversi step: diffusione dal bulk alla superficie, adsorbimento sul substrato e successiva organizzazione bidimensionale delle molecole sulla superficie. Durante la fase di ancoraggio le molecole chemiassorbite formano una massa disordinata detta *Lying Down Phase* che, dopo un periodo di tempo, si riorganizza formando uno strato ordinato di strutture cristalline o semicristalline fino a quando non si copre tutta la superficie del substrato con strutture impacchettate e compatte [22].



Figura 1.13 Meccanismo di formazione di una SAM. Figura tratta da [32] con modifica.

La cinetica di formazione del SAM dipende da diversi fattori quali le condizioni di preparazione, il tipo di substrato e di adsorbato [22]. Nella scelta dell'adsorbato va considerato in modo particolare il gruppo di testa in quanto deve essere il più affine possibile alla superficie. L'organizzazione e configurazione finale dell'impacchettamento della struttura dipende dalla lunghezza della catena idrocarburica, per cui si tende a scegliere molecole a catene corte per permettere alle forze di van der Waals di auto-orientare le molecole in modo normale alla superficie del substrato e quindi promuovere l'impaccamento delle catene [24].

Altri fattori che possono influenzare la formazione del monostrato sono il processo di pulitura e attivazione della superficie, la rugosità e la presenza di eventuali difetti sulla superficie da trattare, nonché la purezza delle sostanze che vengono utilizzate nei vari trattamenti. Infatti, la presenza di impurezze nei reagenti potrebbe destabilizzare la struttura del SAM [22]. Anche la scelta del tempo necessario per la realizzazione dello strato assemblato è un parametro molto importante in quanto molte delle molecole scelte presentano tempi di formazione differenti. La durata di esposizione deve essere sufficiente da permettere l'adsorbimento superficiale e l'orientamento delle catene, altrimenti si possono trovare zone eterogenee che riducono la qualità del processo [25].

1.6.3 Scelta del substrato

Come discusso nella sezione precedente, la preparazione della superficie è una delle fasi fondamentali per ottenere un buon risultato nella formazione dei SAM. Fattori come la rugosità, impurezze e difetti possono influenzare in modo qualitativo gli stadi successivi, ma anche la chimica della superficie può influenzare il processo di attivazione del substrato. Per ottimizzare il processo di deposizione del monostrato, esso deve subire un trattamento tale da eliminare tutte le contaminazioni mediante solventi come, ad esempio, etanolo, toluene, acetone o metanolo. Per un maggiore impacchettamento bisogna avere una superficie molto liscia, per cui si ricorre a trattamenti abrasivi per migliorarne le prestazioni. L'attivazione del substrato può avvenire mediante metodi meccanici oppure si utilizzano soluzioni di perossido di idrogeno o soluzioni piranha che idrolizzano la superficie garantendo l'affinità chimica con le molecole da adsorbire [22]. Generalmente le superfici vetrose sono le più utilizzate in quanto facilmente disponibili, versatili e a basso costo.

1.6.4 Scelta del precursore del SAM

La selezione della molecola anfifilica da utilizzare si basa innanzitutto sul gruppo che dovrà chemiassorbirsi in superficie in modo che sia fortemente affine ad essa e che garantisca la stabilità del monolayer. Inoltre, la sua purezza deve essere tale da non permettere di avere contaminanti nel meccanismo di formazione del SAM. Per quanto riguarda la lunghezza del gruppo di coda, quest'ultima influenza le interazioni Van der Waals che si instaurano tra le catene e quindi la tendenza ad orientarsi alla conformazione più stabile e a compattarsi in modo uniforme, ma allo stesso tempo costituisce la dimensione dello spessore dello strato superficiale. Le molecole più comuni sono gli alchilosilani con gruppi di testa come triclورو, trimetossi o trietossi che possono legarsi in modo covalente con la superficie attiva.

1.7 Cristallizzazione di API su SAM

L'industria farmaceutica richiede degli standard ben precisi per i prodotti ad uso terapeutico. Le problematiche che si riscontrano sono diverse come la difficoltà di riuscire ad ottenere elevati livelli di sovrasaturazione, tempi lunghi di cristallizzazione, il controllo della granulometria, forma e polimorfismo selettivo [16]. Le superfici funzionalizzate sono un buon candidato da questo punto di vista in quanto permettono di lavorare in condizioni di sovrasaturazione non troppo elevate con un buon controllo sulle proprietà finali desiderati e agiscono sulla cinetica di cristallizzazione. La cristallizzazione sui monostrati auto-assemblati permette di creare un'interazione tra la superficie e le molecole di soluto, influenzando il loro modo di organizzarsi nella soluzione e quindi interagire nella formazione del cristallo finale.

Le forze scambiate tra il SAM e le molecole di soluto possono essere a ponte idrogeno o di tipo ionico; la specificità di queste interazioni permette la stabilizzazione di determinate facce cristalline [16]. Molti studi condotti hanno dimostrato come le superfici funzionalizzate permettano di modificare l'orientazione cristallina, morfologia, dimensione e in particolare di controllare il fenomeno del polimorfismo [26-29].

1.7.1 Meccanismo di cristallizzazione su SAM

E' stato dimostrato che la nucleazione per contatto indotta da superfici è simile alla nucleazione eterogenea indisturbata in cui le molecole sono stabilizzate ed organizzate dalla superficie. Diversi sono i meccanismi proposti per descrivere il fenomeno del contatto tra una superficie funzionale e le molecole di soluto. Ad esempio, Pouget et al. [30] hanno utilizzato un monostrato funzionale formato da molecole di acido stearico per stabilizzare e pre-nucleare localmente il carbonato di calcio. Harano et al. [31] hanno investigato come la nucleazione su superfici di nanotubi di carbonio sia un meccanismo a due stadi con la formazione di un aggregato disordinato ma mobile, che successivamente si stabilizza come mostra la Figura 1.14. Più recentemente Cui et al. [15] hanno osservato un meccanismo simile a quello descritto da Harano et al. Tuttavia, hanno anche osservato che la presenza di una forza di contatto induce ad un nuovo meccanismo di nucleazione secondario in cui il cluster disordinato si sgancia dalla superficie, nuclea e per gravità si riappoggia sulla superficie.



Figura 1.14 Meccanismo di cristallizzazione su superficie con un gruppo reattivo. Tratto da [31] con modifica.

1.8 Obiettivo ed organizzazione della tesi

L'obiettivo di questa tesi è lo studio della cristallizzazione di farmaci su diverse superfici funzionalizzate e sintetizzate mediante la tecnica del monostrato auto-assemblato.

In questo primo capitolo si è discusso l'applicazione della cristallizzazione nell'industria farmaceutica e le sue principali problematiche. Sono state inoltre discusse alcune delle tecniche che possono essere utilizzate per il controllo del processo di cristallizzazione, tra queste ci si è focalizzati alla tecnica della formazione del SAM e della sua applicazione per la cristallizzazione su queste superfici. Questa tecnica sarà poi oggetto di indagine nei capitoli che seguono.

Nel secondo capitolo si presentano i materiali e gli strumenti impiegati, esponendo in dettaglio le metodologie sperimentali adottate.

Nel terzo capitolo si analizzano i risultati delle prove di caratterizzazione delle superfici sintetizzate e delle prove di cristallizzazione sulle medesime.

Nel quarto capitolo si espongono le conclusioni a seguito dei risultati formulati nel terzo capitolo.

2. Materiali e Metodi

In questo capitolo vengono riportati i materiali e i metodi adoperati nelle sintesi e prove sperimentali, le strumentazioni e la descrizione dei fenomeni chimico-fisici che definiscono le misure analizzate per la caratterizzazione delle superfici funzionalizzate sintetizzate.

2.1 Materiali

La molecola modello utilizzata per lo studio della cristallizzazione indotta da superficie è l'aspirina (IUPAC: acido 2-(acetilossi) benzoico, CAS: 50-78-2) mostrata in Figura 2.1. L'aspirina è un farmaco antinfiammatorio non-steroidale della famiglia dei salicilati. Il farmaco è stato acquistato da Sigma-Aldrich (Cesano Maderno, Italia) con peso molecolare medio 180,16 g/mol, densità apparente 700 kg/m³ e purezza su base secca tra 99,5 ÷ 100 % .

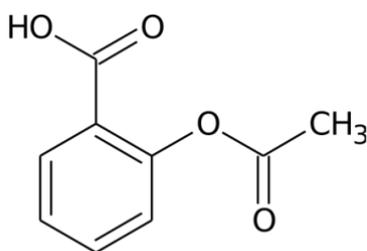


Figura 2.1 Formula di struttura dell'aspirina.

Per la preparazione della soluzione da cristallizzare sono state usate acqua ed etanolo. L'acqua utilizzata è quella per preparazioni iniettabili, priva di ioni e sterile, comperata da Fresenius Kabi. L'etanolo è stato acquistato da Sigma-Aldrich con purezza 99,8% e peso molecolare medio 46,07 g/mol.

Le molecole di silano adoperate per la sintesi dei monostrati auto-assemblati sono: (3-mercaptopropil)-trimetossisilano (MPTS), (3-amminopropil)-trimetossisilano (APTS), [3-(2,3-epossipropossi)-propil]-trimetossisilano (EPTS), 3-(trimetossisilil)-propilmetacrilato (TPM). Tutti i silani sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

L'MPTS (CAS: 4420-74-0), mostrato in Figura 2.2, è stato acquistato in forma liquida con purezza del 95%, peso molecolare medio 196,34 g/mol e densità a 25°C di 1057 kg/m³.

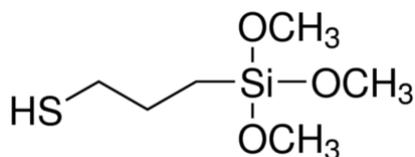


Figura 2.2 Formula di struttura (3-mercaptopropil)-trimetossisilano (MPTS).

L'APTS (CAS: 13822-56-5) mostrato in Figura 2.3 è stato acquisito in forma liquida con purezza del 97%, peso molecolare medio 179,29 g/mol e densità a 25°C di 1027 kg/m³.

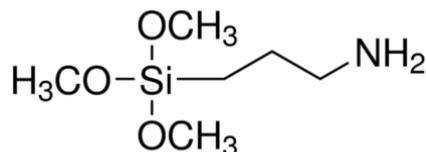


Figura 2.3 Formula di struttura (3-amminopropil)-trimetossisilano (APTS).

L'EPTS (CAS: 2530-83-8) mostrato in Figura 2.4 è stato comperato in forma liquida con purezza del 98%, peso molecolare medio 236,34 g/mol e densità a 25°C di 1070 kg/m³.

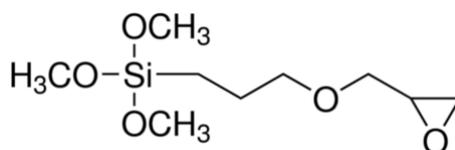


Figura 2.4 Formula di struttura [3-(2,3-epossipropossi)-propil]-trimetossi silano (EPTS).

Il TPM (CAS: 2530-85-0) mostrato in Figura 2.5 è stato acquistato in forma liquida con purezza del 98%, peso molecolare medio 248,35 g/mol e densità a 25°C di 1045 kg/m³.

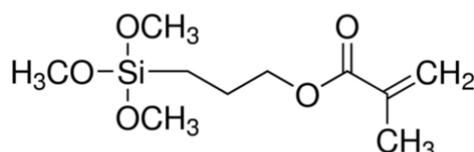


Figura 2.5 Formula di struttura metacrilato di 3-(trimetossisilil)-propile (TPM).

I solventi impiegati nella preparazione delle superfici sono toluene, sia nella versione anidra che non anidra ("reagent"), ed etanolo con le stesse specifiche descritte in precedenza.

Le due tipologie di toluene sono state comprate da Sigma-Aldrich e hanno peso molecolare medio pari a 92,14 g/mol e densità a 25°C di 865 kg/m³. La purezza è pari al 99,8% per l'anidro e 99,5% per il non anidro.

Per la preparazione della soluzione *Piranha* sono stati utilizzati acido solforico e perossido di idrogeno.

L'acido solforico è stato acquistato da Sigma-Aldrich con purezza del 95-98%, peso molecolare medio 98,08 g/mol e densità a 25°C di 1840 kg/m³.

Il perossido di idrogeno comprato da Sigma-Aldrich si trova in soluzione acquosa al 30% in peso, peso molecolare medio di 34,01 g/mol e densità a 25°C di 1110 kg/m³.

I vetrini usati come substrato di sintesi dei SAM sono stati acquistati da Fisher Scientific in forma circolare con diametro medio pari a 14 mm, compatibile con le piastre multiwell da 24 pozzetti acquistate da Fisher Scientific. La tipologia di vetro borosilicato è D263M.

2.2 Metodi

In questo paragrafo vengono riportate le procedure utilizzate per la sintesi e caratterizzazione delle superfici funzionalizzate, la cristallizzazione dell'aspirina su tali superfici e lo studio cristallografico dei cristalli ottenuti. Inoltre, vengono riportati tutti gli strumenti e metodi adottati per questo studio.

2.2.1 Sintesi dei self-assembled monolayer (SAM)

Per il processo di silanizzazione dei vetrini si è impiegato il metodo ad immersione, in cui si pretratta il vetrino con una soluzione *Piranha* e successivamente lo si immerge in una soluzione ricca di silani per il periodo necessario alla formazione e stabilizzazione del SAM. La soluzione *Piranha* è una miscela di acido solforico e perossido di idrogeno molto aggressiva e viene generalmente utilizzata per pulire superfici da sostanze organiche, ma è anche in grado di idrolizzare le superfici vetrose e quindi renderle affini e attive per l'ancoraggio dei gruppi di coda delle molecole di silano. Le fasi di preparazione adottate sono descritte di seguito. Tutte le operazioni descritte sono state eseguite sotto cappa.

Fasi preparazione del SAM

1. *Lavaggio preliminare in etanolo*: in questa fase si puliscono i vetrini in un beaker contenente etanolo per due cicli da 10 minuti in bagno di ultrasuoni (Bandelin, Sonorex, Germania) al fine di eseguire una prima pulizia grossolana dei vetrini. Al termine del lavaggio, i vetrini sono stati asciugati con una corrente di azoto gassoso.
2. *Pre-attivazione in soluzione Piranha*: in questa fase mentre si lasciano ad asciugare i vetrini si prepara una soluzione *Piranha* di 30 ml con un rapporto 5:1 di acido solforico e perossido di idrogeno, in cui si aggiunge il perossido goccia a goccia con una buona miscelazione della soluzione. Si inseriscono i vetrini perfettamente asciutti e si aspetta per un tempo di circa un ora.
3. *Risciacquo in acqua distillata*: i vetrini vengono prelevati dalla soluzione *Piranha* e lavati tre volte con acqua distillata al fine di rimuovere ogni residuo di soluzione. Al termine dei risciacqui, i vetrini sono stati asciugati con una corrente di azoto gassoso.
4. *Preparazione soluzione per la silanizzazione*: la soluzione per la silanizzazione è costituita da silano sciolto in toluene anidro. La concentrazione è stata fissata per tutte le molecole di silano ed è pari a 0.054 M. Una volta preparata la soluzione, si immerge il vetrino nella soluzione per un tempo che dipende dalla tipologia di silano utilizzato, vedi Tabella 2.1.

5. *Risciacquo finale e conservazione*: l'ultima fase consiste nel risciacquo sequenziale del vetrino dapprima nel medium di reazione (toluene non anidro), successivamente in una miscela 1:1 di toluene non anidro ed etanolo ed infine in etanolo puro. Per concludere, si asciuga con azoto e si conservano i vetrini in un luogo asciutto.

Gli strumenti utilizzati nelle fasi di preparazione sono: guanti protettivi in butile (Butoflex 650, Mapa professionnel, Francia) per il maneggiamento degli acidi, miscelatore e agitatore magnetici, micropipetta e pipette.

La concentrazione di silano utilizzata è stata valutata in funzione dell'area totale del vetrino in modo che il numero di molecole di silano sia compatibile con il ricoprimento totale del substrato [33]. Il volume di toluene impiegato è pari a 5 ml. Il tempo di incubazione in soluzione è stato adattato a ciascuna molecola come riportato in Tabella 2.1.

Tabella 2.1 *Volume e tempi di stabilizzazione dei silani per la formazione dei SAMs.*

Silano	Volume (μl)	Tempo
MPTS	49	15 ore
APTS	46	30-35 minuti
EPTS	59	15 ore
TPM	63	15 ore

2.2.2 Caratterizzazione delle superfici

Le tecniche di caratterizzazione utilizzate nello studio delle superfici dei SAM sono l'angolo di contatto e il potenziale zeta. Per la misura del potenziale zeta è stata adoperata la tecnica dello scattering dinamico della luce (DLS), una tecnica non invasiva che permette di valutare la velocità di particelle sottoposte al moto browniano.

Potenziale zeta di superficie

La tecnica prevede che il campione venga illuminato da un raggio laser, e le variazioni d'intensità della luce diffusa vengono misurate al variare del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono dovute al movimento browniano delle particelle conseguente la diffusione dinamica della luce. Un auto-correlatore permette di misurare la velocità delle variazioni d'intensità e il coefficiente di diffusione delle particelle è calcolato dalla funzione di correlazione. L'equazione di Stokes-Einstein consente poi di convertire il coefficiente di diffusione in diametro idrodinamico medio [36,38].

Il DLS utilizzato è un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK) e l'elaborazione dei dati è stata condotta con il relativo software Zetasizer. In particolare, per lo studio del potenziale zeta, è stato usato un accessorio aggiuntivo (Surface Zeta Potential Cell) sempre dello stesso produttore che permette di misurare il potenziale zeta di piccole superfici piatte utilizzando una soluzione acquosa contenente microparticelle di polistirene (Zeta Potential Transfer STD, DTS1235). Le particelle hanno potenziale zeta di $-42 \pm 4,2$ mV e conduttività $0,23 \div 0,40$ mS/cm.

La tecnica di misura del potenziale zeta di superficie, come mostra la Figura 2.6, consiste nell'applicare un campo elettrico e valutare la mobilità apparente delle particelle che dipende da due fenomeni elettrocinetici in competizione tra di loro: il flusso elettro-osmotico alla superficie e la mobilità elettroforetica delle particelle. Vicino alla superficie la mobilità delle particelle sarà dominata dal flusso superficiale elettro-osmotico mentre a distanze maggiori dalla superficie sarà dominato dal movimento elettroforetico delle particelle [34,35].

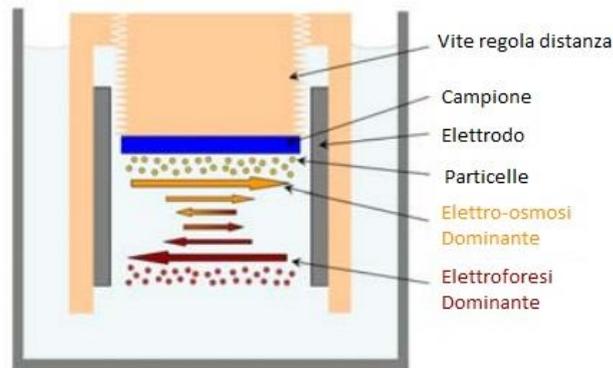


Figura 2.6 Schema della zona di misurazione del potenziale zeta di superficie. Tratto da [34] con modifica.

L'accessorio mostrato in Figura 2.7 consente di fissare una superficie su un portacampione di dimensioni non superiori a 7x4 mm (lunghezza x larghezza) che viene inserito tra due elettrodi di palladio. Quando lo strumento viene immerso nella soluzione contenente le particelle, è possibile applicare un campo elettrico e il potenziale zeta, o la mobilità delle particelle, viene misurato alle distanze di 125, 250, 375, 500 μm e infine a 1000 μm . Quest'ultima posizione corrisponde alla misura del potenziale delle sole particelle, il cui moto non risente più dell'influenza della superficie inserita.

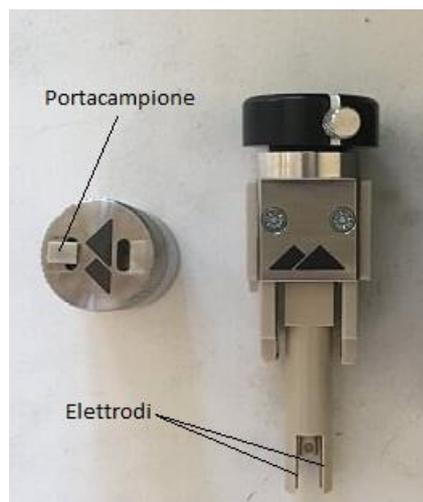


Figura 2.7 Fotografia dell'accessorio per la misura del potenziale zeta di superficie.

I punti corrispondenti alle varie posizioni vengono interpolati con una retta e la relazione che lega la mobilità delle particelle al potenziale zeta di superficie può essere estrapolata al punto di spostamento nullo, ovvero, l'intercetta della retta interpolante alla posizione zero [34,35]. Dal momento che i potenziali misurati includono sempre un componente di moto elettroforetico, l'intercetta misurata includerà necessariamente questo componente che deve essere tenuto conto. Per cui il potenziale zeta di superficie è calcolato secondo l'equazione:

$$\text{Potenziale zeta di superficie} = \text{Potenziale zeta particelle} - \text{intercetta} \quad (2.1)$$

Angolo di contatto

La misura dell'angolo di contatto permette di valutare la bagnabilità di una superficie. L'angolo di contatto può essere definito geometricamente come l'angolo formato da un liquido al confine di tre fasi che si intersecano [32,36,37] come mostrato in Figura 2.8.

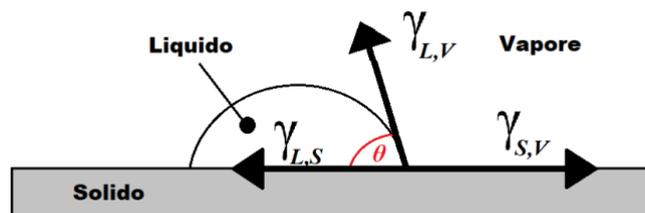


Figura 2.8 Angolo di contatto formato da un sistema all'equilibrio di tre fasi: solido, liquido e gas. Tratto da [36] con modifica.

Il valore dell'angolo di contatto θ è indice di idrofobia o idrofilia di una superficie, se $\theta < 90^\circ$ si dice che il solido è parzialmente bagnato dal liquido, se $\theta > 90^\circ$ il solido è poco bagnato dal liquido [32,36,37].

L'angolo di contatto si divide in statico e dinamico. Nel primo caso l'angolo viene indentificato da un liquido statico o fermo su una superficie solida piana orizzontale, mentre nel secondo caso il liquido è in movimento su una superficie inclinata, il che permette di valutare due angoli definiti come di avanzamento e di recessione [32,36,37]. La differenza tra l'angolo di contatto di avanzamento e di recessione viene definito come isteresi. La presenza di isteresi su una superficie solida è indice di una non idealità superficiale del materiale e quindi dalla presenza di imperfezioni come la rugosità e la eterogeneità della superficie [32,36,37].

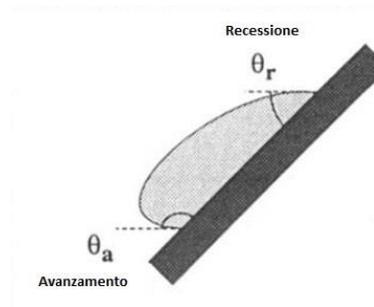


Figura 2.9 Angolo di contatto dinamico. Tratto da [36] con modifica.

Uno dei modi più comuni di misurare l'angolo di contatto è quello di osservare una goccia statica su una superficie solida orizzontale, conosciuto come metodo della goccia sessile. Il metodo della goccia sessile è una tecnica ottica in cui si applica una goccia su una superficie solida piana impermeabile e si misura l'angolo formato dalla base della goccia e tangente al contorno della goccia stessa. La misura dell'angolo di contatto può essere eseguita direttamente con un goniometro o attraverso una immagine della goccia catturata da una videocamera il cui contorno viene fittato da un computer che calcola l'angolo [32].

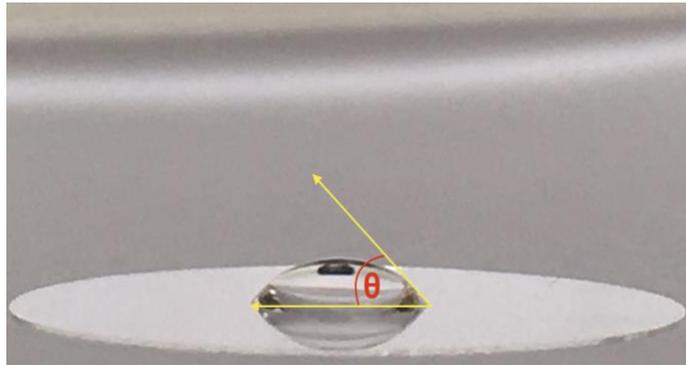


Figura 2.10 Rappresentazione angolo di contatto di una goccia statica.

Lo strumento (MSE DigiDrop, GBX Scientific Instrumentation, France) permette di valutare l'angolo che si forma con una goccia applicata con una siringa su un campione ed attraverso diversi fotogrammi un software elabora i dati dei vari scatti e calcola l'angolo di contatto. L'acqua distillata è stata selezionata come liquido di prova. Il volume della goccia è pari a 3 μ l. Il profilo della goccia è stato fittato manualmente, fissando i due punti di contatto tra goccia e superficie e l'apice della goccia. Il valor medio è stato calcolato da un minimo di 12 misure per campione.

2.2.3 Cristallizzazione

Lo studio della cristallizzazione consiste nel valutare il tempo di induzione alla nucleazione, ovvero il tempo necessario ad osservare la comparsa di una nuova fase cristallina dopo la sovrasaturazione del sistema. La nucleazione di un pozzetto è casuale e avviene generalmente in tempi diversi nei vari pozzetti, per cui è necessario avere una mappatura di ogni pozzetto a tempi specifici in modo da visualizzare la cristallizzazione della soluzione e valutare il tempo di induzione.

L'esperimento di cristallizzazione di aspirina sulle superfici funzionalizzate viene effettuato mediante il metodo a raffreddamento del sistema. La prova viene effettuata in continuo all'interno di un contenitore progettato appositamente per essere integrato a un microscopio ottico che per tutta la durata del test è in grado di acquisire immagini ad alta risoluzione a posizioni e tempi prestabiliti. Inoltre, il contenitore è stato coibentato in modo da ridurre al minimo lo scambio di calore con l'esterno e mantenere la temperatura stabile al suo interno. Il fluido refrigerante è costituito da azoto gassoso. E' previsto di un ingresso ed uscita per la corrente di azoto e può contenere fino a due piastre multipozzetto contenenti 24 campioni ciascuna.

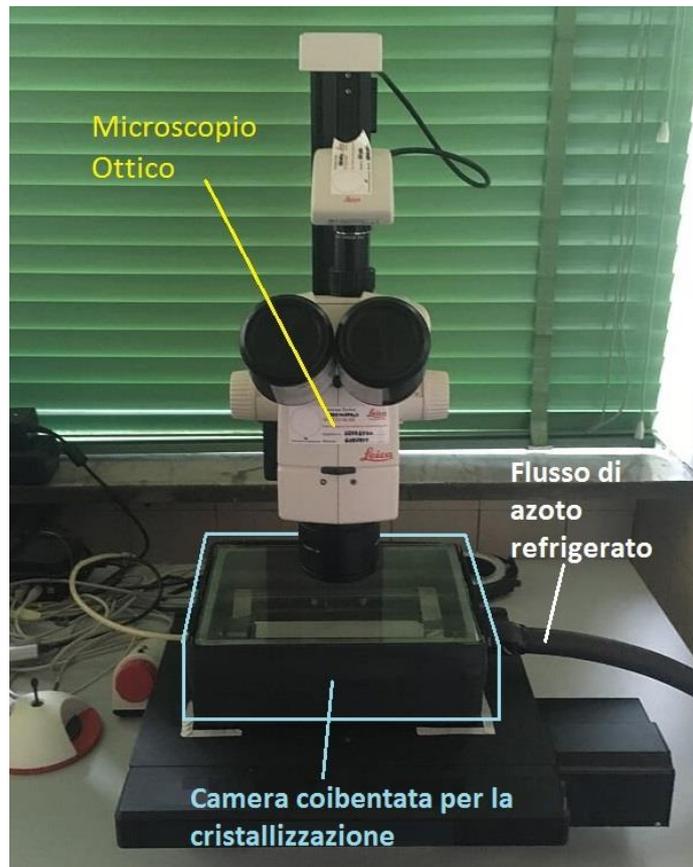


Figura 2.11 Schema dell'impianto di cristallizzazione.

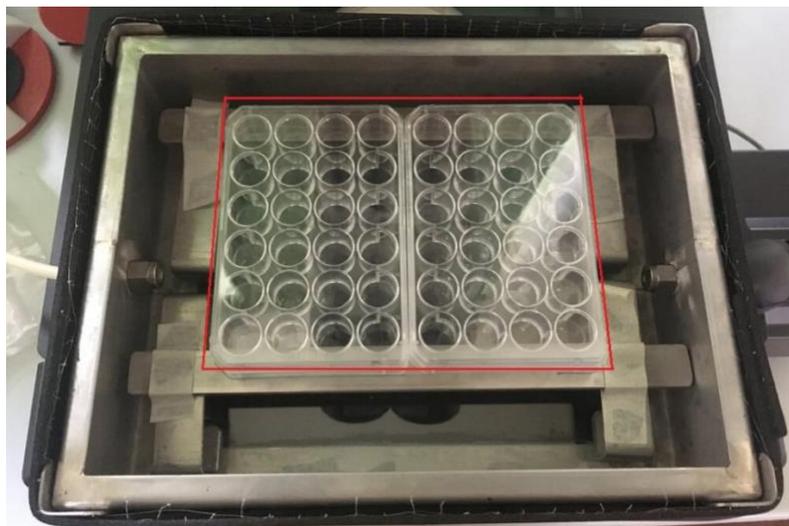


Figura 2.12 Interno della camera per la cristallizzazione con le piastre multipozzetto. La zona delineata in rosso è quella di acquisizione di immagine del software associato al microscopio ottico.

Il controllo di temperatura all'interno del sistema viene eseguito da un controllore di temperatura che attraverso un misuratore di temperatura rileva la temperatura della soluzione da cristallizzare in un pozzetto di riferimento collocato in una delle due piastre e la regola gestendo una portata di azoto raffreddata da uno scambiatore di calore immerso in azoto liquido.

La soluzione da cristallizzare viene preparata aggiungendo e agitando una specifica quantità di aspirina ad una miscela di acqua ed etanolo il cui rapporto in volume è rispettivamente 62:38 (V/V). Quando il farmaco si è solubilizzato completamente nella soluzione, questa viene filtrata per togliere ogni traccia di impurezza. A questo scopo sono stati utilizzati due filtri a siringa con cut-off 0,45 μm (SFNY-245-100, BranchiA) e 0,22 μm (Millex, Merck Millipore Ltd, Irlanda). Infine, con l'uso di una micropipetta automatica (Eppendorf), si raccoglie la soluzione e si iniettano volumi uguali in ogni pozzetto contenente una superficie funzionalizzata.

Per lo studio di questa tesi si è deciso di lavorare con una sovrasaturazione S pari a 1.8 che corrisponde, alla temperatura di 15°C selezionata per lo studio, ad una concentrazione di aspirina $C=31,3$ mg/ml. Ogni pozzetto contenente un campione è riempito con lo stesso volume di soluzione $V=125$ μl .

Gli strumenti utilizzati per la prova sono uno stereomicroscopio ottico (M125C, Leica, Germania) e il software LAS-X per l'elaborazione e gestione delle immagini, un sistema di controllo gestito da LabVIEW collegato a due regolatori di portata (Bronkhorst, Germania) e al misuratore di temperatura (termocoppia tipo T).

3. Risultati

In questo capitolo vengono riportati i risultati ottenuti nelle prove sperimentali condotte in laboratorio, nonché le scelte e motivazioni che hanno portato alle formulazioni e condizioni operative adottate per la sintesi delle superfici funzionalizzate e per la cristallizzazione dell'aspirina su tali superfici. Lo studio della sintesi dei monostati auto-assemblati (SAM) si focalizza sulla discussione dei risultati ottenuti a seguito delle caratterizzazioni dei campioni con potenziale zeta di superficie e angolo di contatto. Seguono i risultati ottenuti con gli studi di cristallizzazione sulle diverse superfici sintetizzate. In particolare, sono stati valutati i tempi di induzione alla nucleazione a seconda del tipo di superficie utilizzata ed è quindi stato discusso il legame tra chimica superficiale del SAM e chimica del farmaco da cristallizzare.

3.1 Caratterizzazione dei SAM

Lo studio di caratterizzazione delle superfici permette di confermare l'avvenuta funzionalizzazione della superficie attraverso il confronto con il corrispettivo non trattato, ma anche di valutare il diverso comportamento che assumono i silani utilizzati per la sintesi dei SAM. In primo luogo, verranno esposti i risultati emersi dalla caratterizzazione con angolo di contatto. In seguito, verranno illustrati i dati relativi al potenziale zeta di superficie. Infine, verrà presentata una panoramica generale dei risultati ottenuti confrontando le caratteristiche delle varie superfici utilizzate nel presente studio.

3.1.1 Angolo di contatto

L'angolo di contatto è stato calcolato su una base di 12 misure effettuate per ciascun silano utilizzato nella sintesi delle superfici. Dai dati ottenuti è stato valutato un valor medio finale e la relativa deviazione standard. Prima di ogni misura le superfici sono state pulite con etanolo per eliminare ogni traccia di contaminazione.

Dalle misure effettuate su un campione non trattato (CLEAN) come mostrato in Figura 3.1 è risultato che l'angolo di contatto ha un valore medio di $62,9 \pm 5,4^\circ$ indicando una superficie scarsamente bagnabile dall'acqua. Il valore ottenuto è il riferimento che verrà utilizzato per il confronto dei diversi SAM sintetizzati.

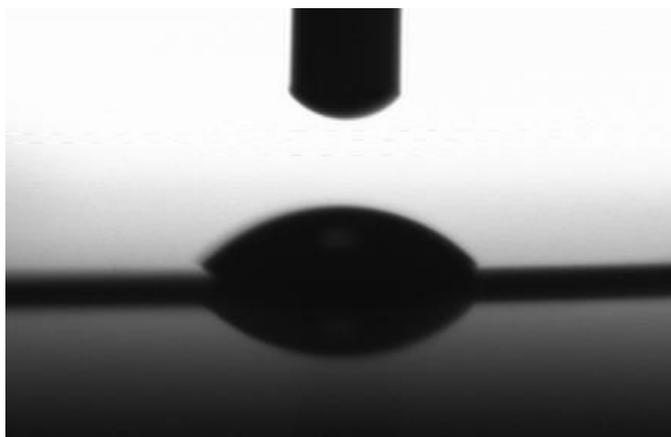


Figura 3.1 Immagine di una goccia di acqua depositata su una superficie di vetro non funzionalizzato (CLEAN).

La valutazione della bagnabilità di una superficie mediante angolo di contatto rappresenta un utile strumento per il monitoraggio dell'efficacia dei singoli step che compongono la sintesi di un SAM. Infatti, il primo step di attivazione della superficie e il successivo di funzionalizzazione della stessa mediante ancoraggio di molecole di silano modificano in modo significativo le proprietà superficiali del substrato. Di conseguenza, una misura di tipo macroscopico quale l'angolo di contatto fornisce informazioni riguardo un'eventuale modifica superficiale che invece avviene a livello della nanoscala.

Attivazione della superficie mediante utilizzo di soluzione piranha

La variazione di bagnabilità della superficie è stata valutata subito dopo il trattamento con la soluzione *Piranha*. Risulta particolarmente importante misurare l'angolo di contatto immediatamente dopo il periodo di immersione e conseguenti risciacqui, in quanto il decadimento dell'idrossilazione superficiale è particolarmente rapido. Come mostra la Figura 3.2, l'angolo di contatto tende a zero e ciò è indice di una superficie estremamente idrofila, dimostrando l'avvenuta idrossilazione del substrato da parte della soluzione. In media, è stato ottenuto un valore di angolo di contatto inferiore a 2° .

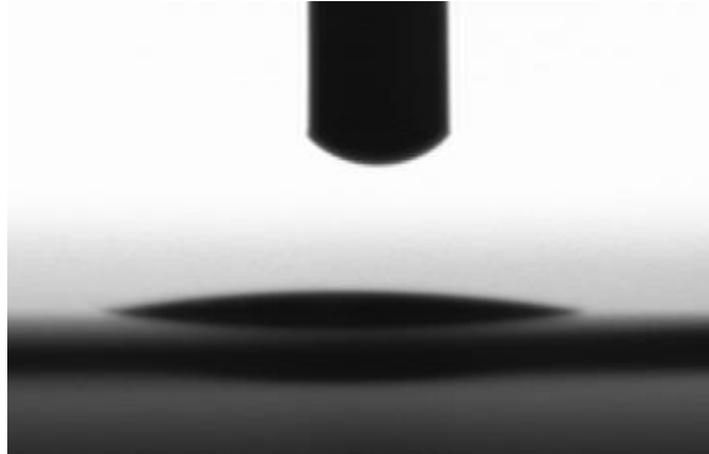


Figura 3.2 Immagine di una goccia di acqua depositata su una superficie di vetro trattata con soluzione Piranha.

Funzionalizzazione con (3-mercaptopropil)-trimetossisilano (MPTS)

L'MPTS è un organosilano il cui gruppo funzionale caratteristico è il tiolo (-SH). Applicazioni di SAM con questa molecola si estendono al campo dei sistemi microelettromeccanici come agente accoppiante. Il gruppo tiolo può essere facilmente ossidato in un gruppo idrossisolfonile (-SO₃H) che è molto affine con i metalli di transizione [39,41,42]. Può essere rivestito con TiO₂, CeO₂ e La₂O₃ per la protezione contro la corrosione di sculture in bronzo quaternario in ambiente atmosferico [72].

Dai risultati ottenuti è stato calcolato un valore medio dell'angolo di contatto di $70,4 \pm 1,1^\circ$, il che corrisponde ad una superficie parzialmente idrofila come mostra la Figura 3.3. Il valore calcolato è consistente con i risultati ottenuti da altri studi [39-43]. Se confrontata con il vetrino non trattato, risulta che la superficie è diventata leggermente più idrofoba. La differenza tra i due risultati e il riscontro con i valori trovati in letteratura indicano la buona riuscita della sintesi del SAM. Inoltre, un'ulteriore conferma dell'effettiva funzionalizzazione della superficie con MPTS riguarda la marcata riduzione di bagnabilità confrontando i dati relativi alla superficie idrossilata e funzionalizzata con SAM.

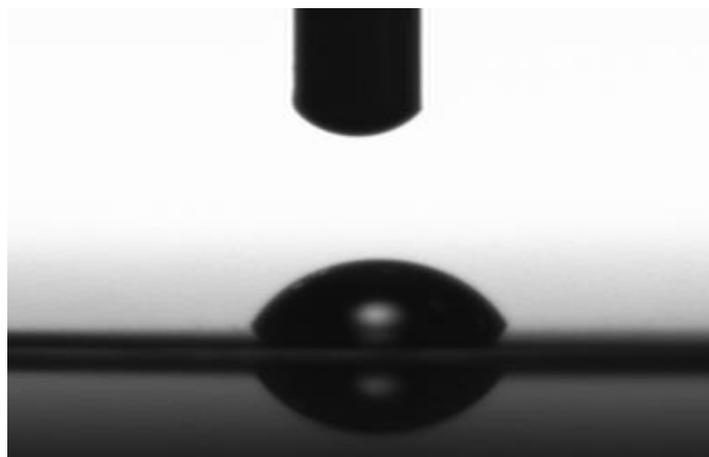


Figura 3.3 Immagine di una goccia di acqua depositata su una superficie di vetro funzionalizzata con il MPTS.

Funzionalizzazione con [3-(2,3-epossipropossi)-propil]-trimetossisilano (EPTS)

Il EPTS è un organosilano che presenta un gruppo funzionale epossido, ovvero sia un etere ciclico. In alcune delle loro applicazioni, gli epossisilani come l'EPTS sono stati impiegati per migliorare l'integrità e la stabilità delle interfacce polimero/materiale inorganico e immobilizzare biomolecole come il DNA e proteine in microarray [44].

Dai risultati ottenuti è stato calcolato un valore medio di angolo di contatto di $62,8 \pm 1,5^\circ$, indicante una parziale idrofilia della superficie come mostra la Figura 3.4 e confrontabile con i risultati ottenuti da altri studi che riportano valori variabili tra 52° e 75° [44-47]. Il valore risulta analogo a quello della superficie CLEAN indicando un comportamento simile delle superfici. In quest'ottica, per una reale conferma di avvenuta funzionalizzazione della superficie, è necessario caratterizzare la superficie mediante altre tecniche, quali il potenziale zeta, come riportato nella sezione §3.1.2.

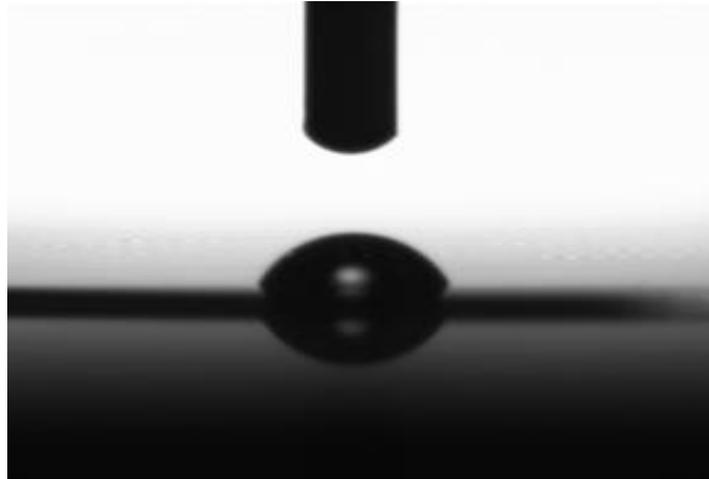


Figura 3.4 Immagine di una goccia di acqua depositata su una superficie di vetro funzionalizzata con il EPTS.

Funzionalizzazione con 3-(trimetossisilil)-propilmetacrilato (TPM)

Il TPM è un organosilano il cui gruppo funzionale caratteristico è il metacrilato (-OCO-C₃H₅). Applicazioni di questo monomero possono essere la sintesi e la funzionalizzazione di microparticelle colloidali [48] o l'utilizzo come agente accoppiante nelle matrici polimeriche nella produzione di compositi per il restauro dentale [50].

Dai risultati ottenuti è stato calcolato un valore medio di angolo di contatto di $65,4 \pm 1,7^\circ$ che corrisponde ad una superficie parzialmente idrofila come mostra la Figura 3.5. Il valore è paragonabile con i risultati ottenuti da altri studi [49,51,52] ed è leggermente superiore a quello della superficie non funzionalizzata indicando una piccola variazione della bagnabilità e di idrofobia.

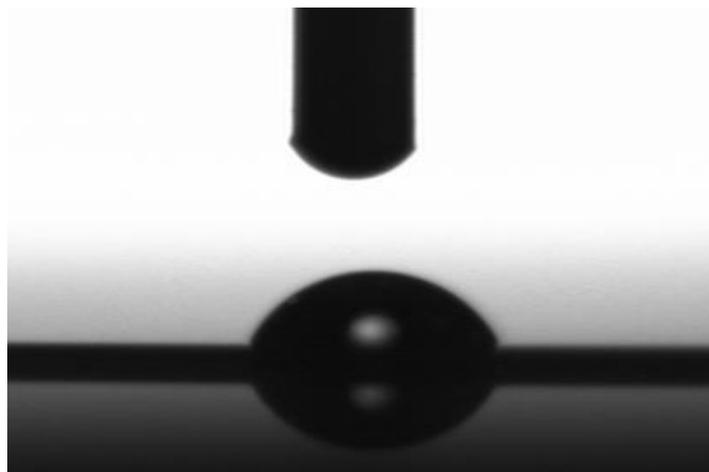


Figura 3.5 Immagine di una goccia di acqua depositata su una superficie di vetro funzionalizzata con il TPM.

Funzionalizzazione con (3-amminopropil)-trimetossisilano (APTS)

L'APTS è un tensioattivo il cui gruppo caratteristico è amminico ($-NH_2$). Generalmente è utilizzato come agente accoppiante su superfici per aumentare l'adesione di compositi di resine vetrose o per promuovere l'adesione di cellule e proteine su impianti biologici [53]. La presenza del gruppo amminico lo rende piuttosto reattivo con la maggior parte dei gruppi funzionali e, quindi, estremamente versatile e di interesse per molte applicazioni. D'altra parte, però, questo comporta una progressiva destabilizzazione della superficie nel tempo a causa dell'attrazione di impurità dall'ambiente esterno [54]. Questo si evidenzia negli studi effettuati da Siqueira Petri et al. [53] e Zeng et al. [55] in cui il valore dell'angolo di contatto varia nel tempo dopo la sintesi del SAM. Secondo Siqueira Petri et al. [53] per ottenere una maggiore stabilità del SAM questo deve essere sintetizzato in condizioni di sottovuoto.

Per la valutazione dell'angolo di contatto del SAM funzionalizzato APTS si sono confrontati i valori di angolo di contatto subito dopo la sintesi della superficie e dopo 7 giorni. Nel primo caso il valore medio di angolo di contatto ottenuto è di $36,6 \pm 3,9^\circ$ che rispecchia la forte natura polare del gruppo amminico e dunque una superficie piuttosto idrofila. Al contrario, dopo 7 giorni il valore sale a $70,7 \pm 3,1^\circ$ indicando una maggiore idrofobia, come mostrato nelle Figure 3.6 e 3.7. I risultati ottenuti sono confrontabili con alcuni studi effettuati su SAM contenenti lo stesso adsorbato dove il valore varia a seconda del momento in cui viene effettuata la misura [56-59]. Confrontando il valore ottenuto subito dopo la sintesi con quello della superficie CLEAN, si evince una maggiore idrofilia della superficie trattata APTS.

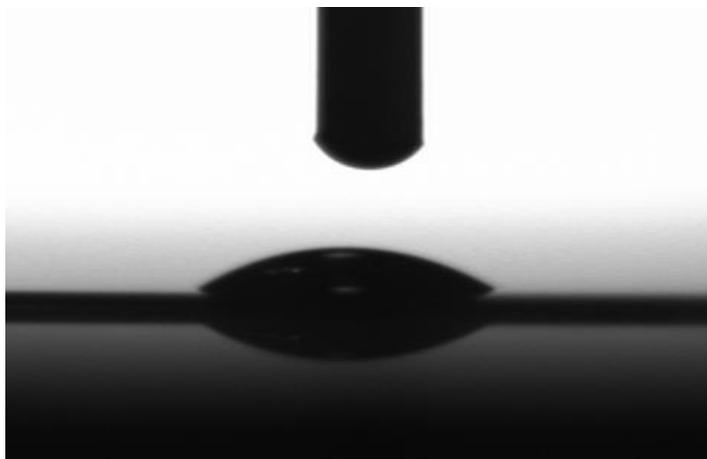


Figura 3.6 Immagine di una goccia di acqua depositata su una superficie di vetro funzionalizzata con il APTS.

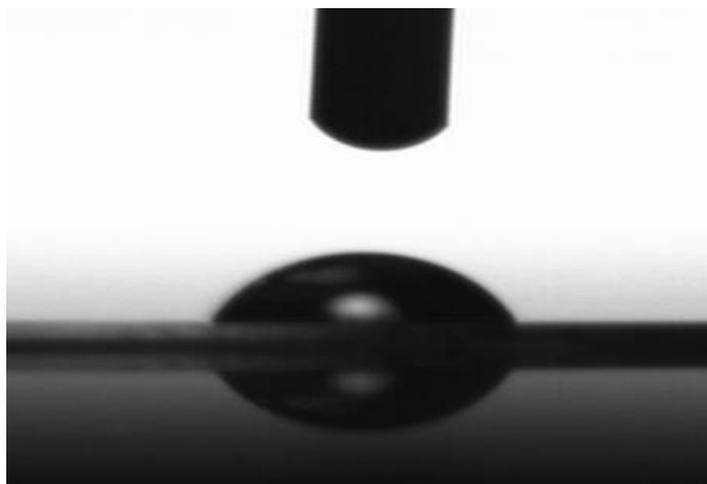


Figura 3.7 Immagine di una goccia di acqua depositata su una superficie di vetro funzionalizzata con il APTS dopo 7 giorni la sintesi.

Tabella 3.1 Valore medio angolo di contatto delle superfici funzionalizzate con il APTS e relativa deviazione standard. *a* subito dopo la sintesi, *b* 7 giorni dopo la sintesi.

Silano	Angolo di contatto (°)	Dev. Std (°)
APTS _a	36,6	3,9
APTS _b	70,7	3,1

Confronto dei risultati di angolo di contatto

Come mostrato in Figura 3.8 tre superfici su quattro presentano un comportamento simile alla superficie non funzionalizzata indicando una tendenza ad un comportamento idrofobico, mentre l'unica superficie idrofila è quella funzionalizzata con l'APTS. Questa differenza dipende dal tipo di gruppo funzionale terminale esposto dal SAM, infatti la natura polare del gruppo amminico porta ad una superficie più affine con l'acqua, mentre per gli altri gruppi che sono meno polari risulta una maggiore idrofobia. Da un punto di vista termodinamico ciò si può tradurre come una forte energia superficiale per i gruppi polari e una debole per quelli apolari. Per quanto riguarda la sintesi dei campioni i risultati rispecchiano la natura dei gruppi di testa indicando in un certo modo la corretta esposizione di questi ultimi. E' quindi possibile supporre che l'adsorbimento sul substrato sia avvenuto nell'orientazione desiderata e che l'impaccamento delle molecole dovuto alle catene propiliche abbia permesso che ciò avvenisse.

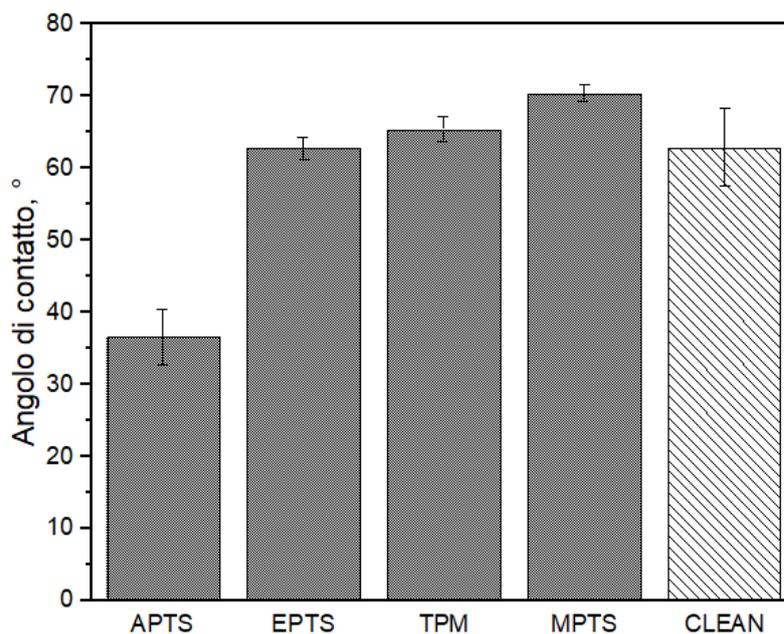


Figura 3.8 Confronto valore medio angolo di contatto delle diverse superfici.

3.1.2 Potenziale zeta di superficie

Lo studio del potenziale zeta di superficie permette di capire la natura dell'interazione elettrostatica in ambiente acquoso tra la superficie funzionalizzata e il tracciante. La valutazione del valore di potenziale zeta di superficie è stata operata calcolando il valore medio del potenziale misurato per ogni distanza e successivamente è stata calcolata la retta interpolante i valori medi, se ne è valutata l'intercetta e si è applicata la formula (2.1). Il potenziale zeta di superficie è funzione del pH della soluzione: in questo caso la soluzione contenente le microparticelle è acquosa e il pH è nell'intervallo tra 6,5-7. Prima di ogni misura i campioni sono stati lavati con etanolo per eliminare ogni traccia di contaminazioni.

Dalle misure effettuate su campioni non trattati (CLEAN) come mostrato in Figura 3.9 è risultato che il valore del potenziale zeta di superficie è di $-14,6 \pm 3,9$ mV come indicato in Tabella 3.2. Il segno negativo della misura è in linea con la chimica della superficie borosilicata del vetrino. Generalmente i materiali ossidi come i silicati seguono un meccanismo di formazione della carica superficiale di dissociazione del gruppo in superficie [32], che nel caso presente è la dissociazione dei gruppi silanoliche con conseguente negatività della carica nelle condizioni di pH esercitate [73]. Il valore ottenuto è il riferimento utilizzato per il confronto con i potenziali zeta di superficie dei SAM.

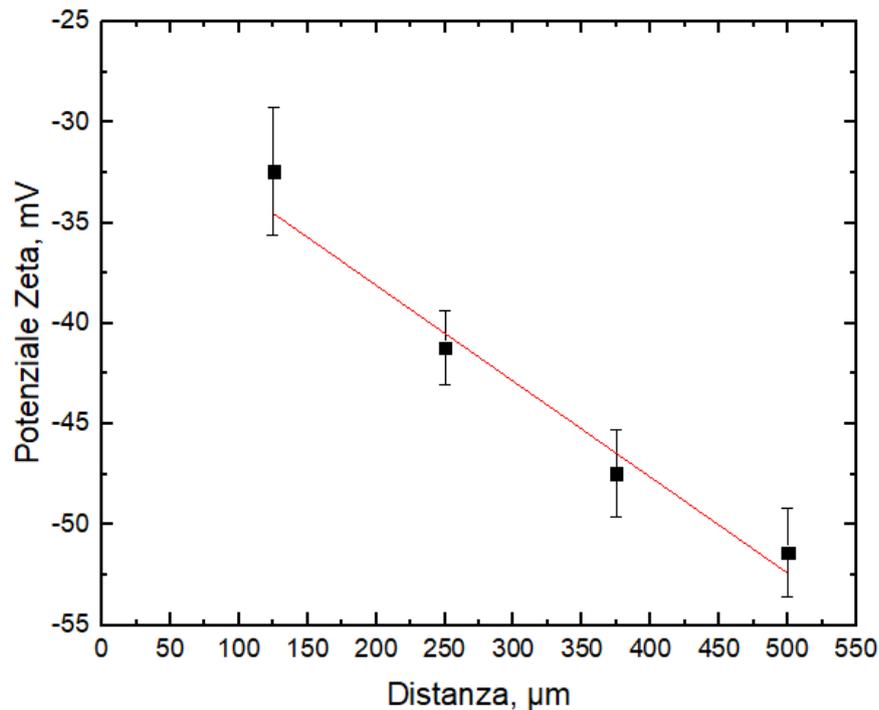


Figura 3.9 Potenziale zeta misurato al variare della distanza dalla superficie nel caso di vetri non trattati (CLEAN). La linea rossa rappresenta la retta interpolante i punti.

Tabella 3.2 Potenziale zeta medio calcolato per l'intercetta, microparticelle e superficie, con relativa deviazione standard.

	Potenziale zeta (mV)	Dev. Std (mV)
Intercetta	-27,3	3,2
Microparticelle	-41,9	1,0
CLEAN	-14,6	3,9

Come mostra la Figura 3.9 il valore di potenziale zeta misurato nelle prossimità della superficie è quello con maggiore imprecisione. Il potenziale zeta viene misurato in modo indiretto dalla competitività tra il fenomeno di elettro-osmosi della superficie e l'elettroforesi delle particelle. L'interferenza della carica superficiale del campione con le microparticelle è più marcata vicino alla superficie e si traduce in una minore precisione della misura. A distanze più lontane le misure sono più precise e se confrontate con il valore del potenziale delle particelle indicano come l'influenza dell'effetto elettro-osmotico della superficie persiste debolmente a 500 μm. Inoltre, il valore del potenziale zeta delle particelle è concorde con quello indicato dal produttore, che è di $-42,0 \pm 4,2$ mV.

Funzionalizzazione con (3-mercaptopropil)-trimetossisilano (MPTS)

Dai risultati ottenuti dalle misure di potenziale zeta, come mostrato in Figura 3.10 e Tabella 3.3, è stato calcolato un valore di potenziale zeta di superficie medio di $-41,2 \pm 5,4$ mV. Il

segno negativo è concorde con la natura della molecola in quanto il gruppo tiolo in ambiente acquoso tende a deprotonarsi e caricarsi negativamente (-S-); la presenza dello zolfo che è un elemento molto elettronegativo da ragione anche alla grandezza in modulo del risultato. Se si consultano i risultati in letteratura [60-64] il potenziale zeta di superficie del SAM con il MPTS è confrontabile con i valori consultati. La differenza con il risultato calcolato con i campioni CLEAN è netta, indicando la funzionalizzazione del substrato.

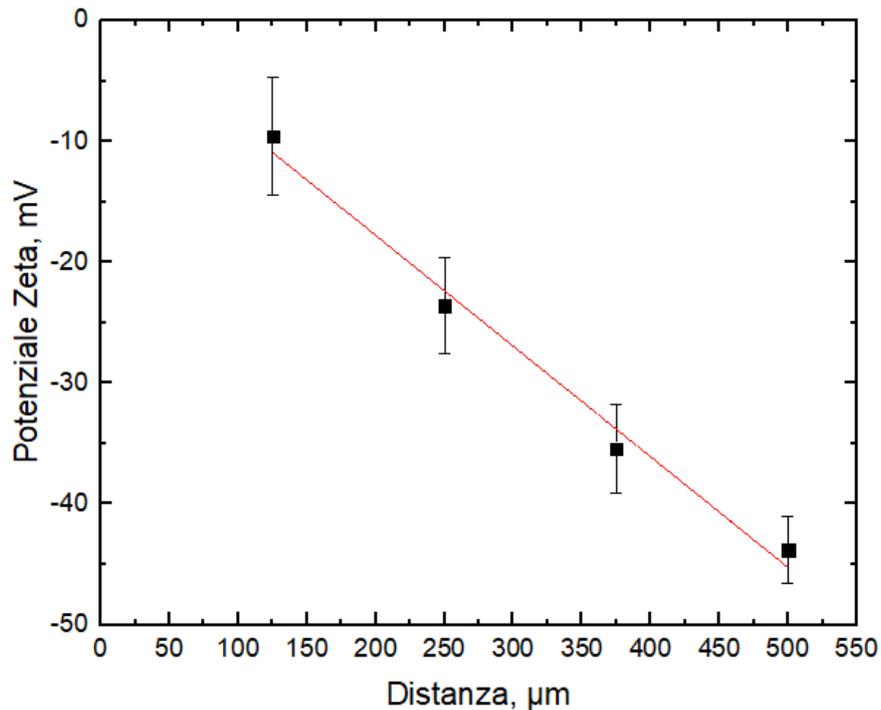


Figura 3.10 Potenziale zeta misurato al variare della distanza dalla superficie nel caso di vetrini funzionalizzati con l'MPTS. La linea rossa rappresenta la retta interpolante i punti.

Tabella 3.3 Potenziale zeta medio calcolato per l'intercetta, microparticelle e superficie, con relativa deviazione standard.

	Potenziale zeta (mV)	Dev. Std (mV)
Intercetta	0,5	3,2
Microparticelle	-40,7	1,6
MPTS	-41,2	5,4

Come mostra la Figura 3.10 i valori di potenziale zeta misurati vicino alla superficie sono quelli con maggiore imprecisione, probabilmente dovuto ad un maggiore effetto elettrostatico del gruppo tiolo del SAM. A 500 µm il valore del potenziale misurato è molto vicino a quello delle microparticelle indicando che l'effetto elettro-osmotico è quasi ininfluenza a quella

distanza. Il valore medio del potenziale zeta delle particelle è in linea con quello dichiarato dal produttore pari a $-42,0 \pm 4,2$ mV.

Funzionalizzazione con [3-(2,3-epossipropossi)-propil]-trimetossisilano (EPTS)

Dai risultati ottenuti dalle misure di potenziale zeta come mostrato in Figura 3.11 è stato calcolato un valore di potenziale zeta di superficie medio di $-24,7 \pm 3,9$ mV come indicato in Tabella 3.4. Il risultato è in linea con quelli consultati in letteratura [65-67] derivanti da altri studi effettuati su campioni funzionalizzati con la medesima molecola. La differenza con il potenziale zeta di superficie del vetrino CLEAN è evidente, confermando la buona esecuzione della funzionalizzazione. Come si è visto nel paragrafo §3.1.1, il solo risultato di angolo di contatto il cui valore era strettamente uguale al campione non trattato, non era sufficiente a dimostrare una effettiva funzionalizzazione del substrato.

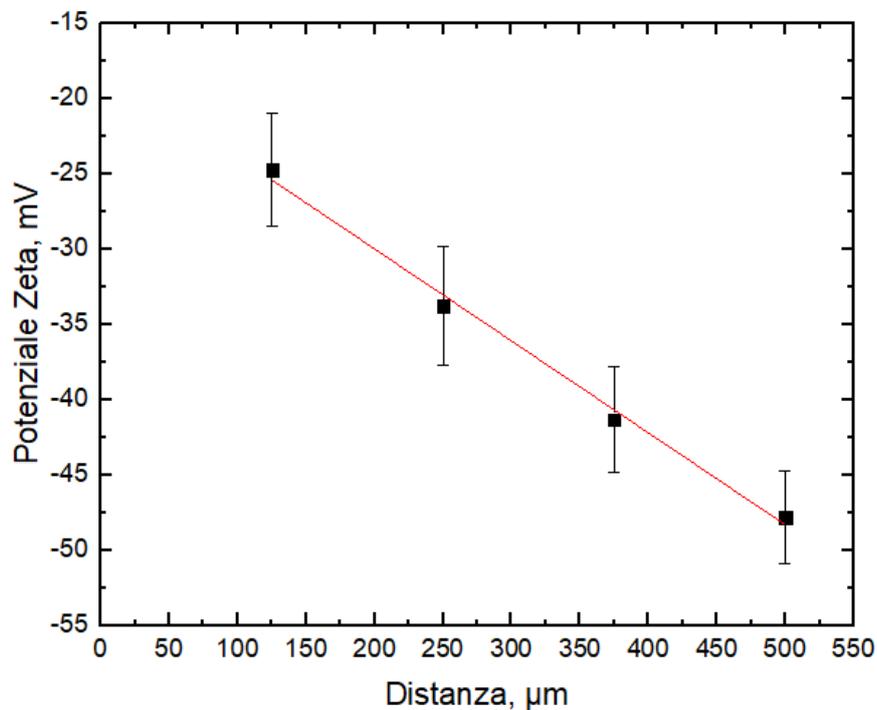


Figura 3.11 Potenziale zeta misurato al variare della distanza dalla superficie nel caso di vetrini funzionalizzati con l'EPTS. La linea rossa rappresenta la retta interpolante i punti.

Tabella 3.4 Potenziale zeta medio calcolato per l'intercetta, microparticelle e superficie, con relativa deviazione standard.

	Potenziale zeta (mV)	Dev. Std (mV)
Intercetta	-17,7	4,1
Microparticelle	-42,4	1,7
EPTS	-24,7	3,9

Come mostra la Figura 3.11 la precisione dei risultati è uniforme su tutte le distanze, anche a quelle vicine alla superficie, dove l'influenza del gruppo di testa del silano è più preponderante. Il potenziale misurato a 500 μm è superiore a quello delle particelle suggerendo un debole effetto della carica superficiale. Il valore del potenziale delle particelle è in linea con quello indicato dal produttore di $-42,0 \pm 4,2$ mV.

Funzionalizzazione con 3-(trimetossisilil)-propilmetacrilato (TPM)

Dai risultati ottenuti dalle misure di potenziale zeta come mostrato in Figura 3.12 è stato calcolato un valore di potenziale zeta di superficie medio di $-21,3 \pm 2,5$ mV come indicato in Tabella 3.5. Il risultato ottenuto, se confrontato con quello del vetrino CLEAN, indica come la sintesi del SAM sia stata efficace.

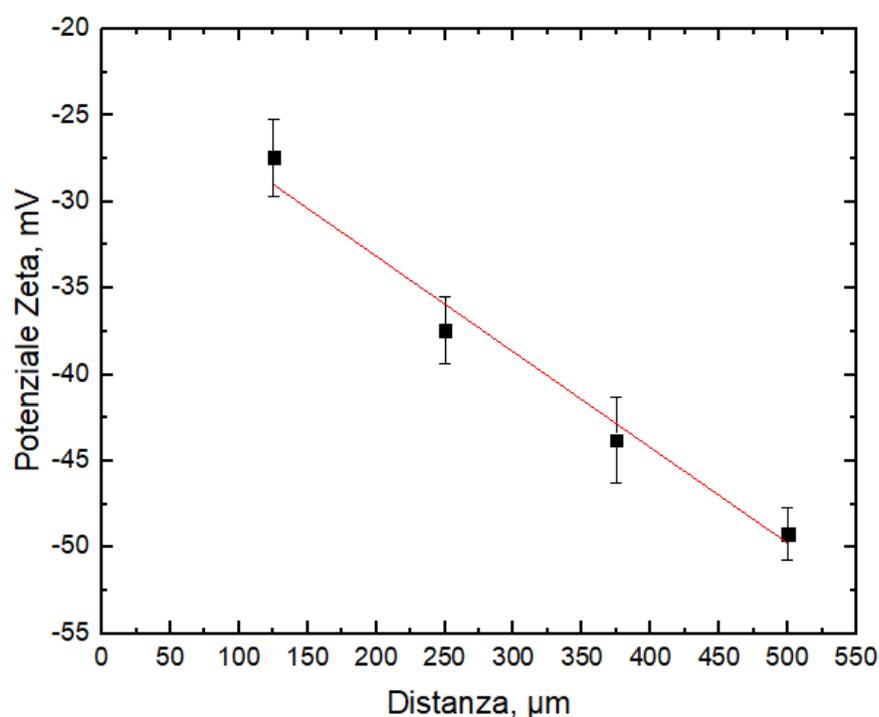


Figura 3.12 Potenziale zeta misurato al variare della distanza dalla superficie nel caso di vetrini funzionalizzati con il TPM. La linea rossa rappresenta la retta interpolante i punti.

Tabella 3.5 Potenziale zeta medio calcolato per l'intercetta, microparticelle e superficie, con relativa deviazione standard.

	Potenziale zeta (mV)	Dev. Std (mV)
Intercetta	-21,5	2,7
Microparticelle	-42,8	1,0
TPM	-21,3	2,5

Come mostra la Figura 3.12 la precisione dei risultati è quasi uniforme su tutte le distanze anche a quelle vicine alla superficie. Rispetto ai risultati con i silani precedenti la prima misura a 125 μm sembra non risentire l'influenza del gruppo di testa metacrilato. Il potenziale misurato a 500 μm è superiore a quello delle particelle suggerendo un debole effetto della carica superficiale. Il valore del potenziale delle particelle è in linea con quello indicato dal produttore di $-42,0 \pm 4,2$ mV.

Funzionalizzazione con (3-amminopropil)-trimetossisilano (APTS)

Come indicato nella sezione §3.1.1 i SAM sintetizzati con il APTS sono molto instabili a causa della forte reattività del gruppo amminico, per cui le prove sono state effettuate subito dopo la sintesi delle superfici.

Dai risultati ottenuti dalle misure di potenziale zeta come mostrato in Figura 3.13 è stato calcolato un valore di potenziale zeta di superficie medio di $10,22 \pm$ mV come indicato in Tabella 3.6. Il segno positivo è concorde con la natura della molecola in quanto il gruppo amminico in ambiente acquoso tende a protonarsi e caricarsi positivamente ($-\text{NH}_3^+$). Il risultato calcolato è in linea con quelli consultati in letteratura [60,61,68-70]. La differenza tra con il potenziale calcolato per il vetrino non trattato è netta in quanto il segno della carica è opposta, indicando una chiara funzionalizzazione del substrato.

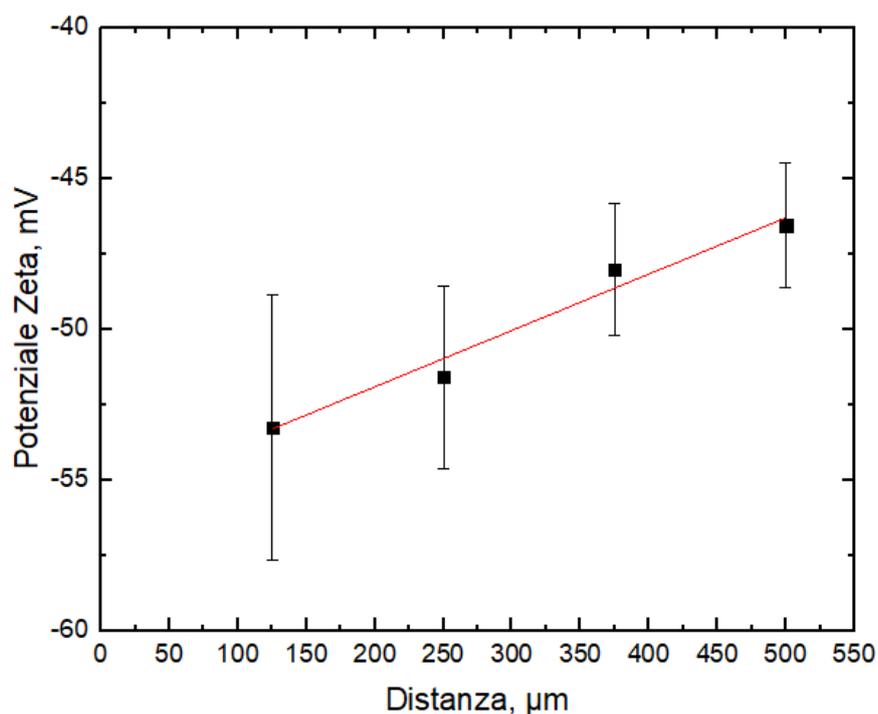


Figura 3.13 Potenziale zeta misurato al variare della distanza dalla superficie nel caso di vetrini funzionalizzati con l'APTS. La linea rossa rappresenta la retta interpolante i punti.

Tabella 3.6 Potenziale zeta medio calcolato per l'intercetta, microparticelle e superficie, con relativa deviazione standard.

	Potenziale zeta (mV)	Dev. Std (mV)
Intercetta	-55,8	4,5
Microparticelle	-41,4	1,8
ATPS	14,4	4,9

Come mostra la Figura 3.13 la deviazione standard valore del potenziale zeta diminuisce con l'aumentare della distanza allontanandosi dalla superficie. Infatti, la misura maggiormente vicina alla superficie è quella più incerta, probabilmente a causa dell'effetto elettrostatico del gruppo di testa del silano. L'incertezza della prima misura può risultare decisiva nel calcolo del potenziale, in quanto i potenziali misurati hanno valori molto vicini e l'incertezza della prima misura può cambiare la pendenza della retta, come mostra la Figura 3.14, il cui valore dell'intercetta è inferiore a quello del tracciante e applicando la formula (2.1) il potenziale zeta calcolato risulta con segno negativo. Questa evidenza è stata riscontrata in alcune misure effettuate il giorno successivo alla sintesi del SAM dove il potenziale calcolato è risultato negativo, indicando la presenza di contaminazioni. A 500 μm il valore del potenziale misurato è molto vicino a quello delle microparticelle indicando che l'effetto elettro-osmotico è quasi ininfluenza a tale distanza. Il valore medio del potenziale zeta delle particelle è in linea con quello dal produttore di $-42,0 \pm 4,2$ mV.

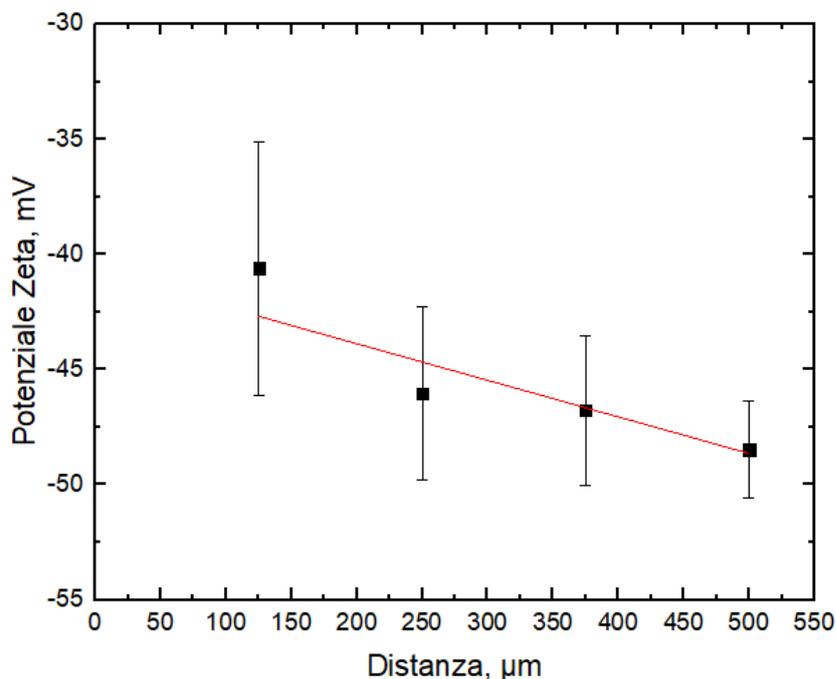


Figura 3.14 Potenziale zeta misurato al variare della distanza dalla superficie dei vetrini trattati con APTS. L'analisi è stata condotta il giorno successivo alla sintesi. La curva rossa rappresenta la retta interpolante i dati sperimentali.

Confronto dei risultati dei potenziali zeta di superficie

Da tutti i risultati ottenuti, come mostrato in Tabella 3.7, è possibile verificare come il potenziale di tutte le superfici sintetizzate siano distanti dal valore dei campioni non trattati CLEAN, segno di una buona funzionalizzazione delle superfici. Tre superfici su quattro mostrano un potenziale Z di superficie negativo mentre solo una è positiva. Inoltre, solo la superficie funzionalizzata con il MPTS presenta valore in modulo del potenziale di circa due volte superiore rispetto agli altri SAM.

Tabella 3.7 Potenziale zeta medio calcolato per ogni superficie e relativa deviazione standard.

	Potenziale zeta (mV)	Dev. Std (mV)
CLEAN	-14,60	3,89
MPTS	-41,25	5,35
EPTS	-24,69	3,92
TPM	-21,26	2,46
APTS	14,38	4,90

3.2 Cristallizzazione

Lo studio sulla cristallizzazione dell'aspirina sulle superfici funzionalizzate si focalizza nella valutazione e confronto dei diversi tempi di induzione alla nucleazione τ . Tale grandezza è definita come il tempo trascorso tra l'istante in cui si ha il raggiungimento della sovrasaturazione desiderata del sistema e la formazione di una nuova fase. Di conseguenza, essa è la somma di tre contributi: t_{tr} il tempo di transizione richiesto dal sistema per raggiungere una condizione di nucleazione quasi stazionaria, t_n il tempo necessario alla formazione di un nucleo stabile e t_g il tempo di crescita del cristallo [9,10].

Nell'eseguire il processo di cristallizzazione bisogna tenere presente alcune considerazioni: la natura stocastica degli eventi di nucleazione richiede la trattazione statistica del tempo di induzione, il tempo di induzione alla nucleazione è estremamente sensibile alla temperatura, alla concentrazione iniziale di soluto, al grado di sovrasaturazione, alla velocità di raffreddamento e a eventuali disturbi esterni. Infine, la presenza di impurezze nella soluzione influisce fortemente sulla nucleazione [71].

Per ridurre al minimo la presenza di impurezze nella soluzione è stata condotta una filtrazione preliminare della stessa con due microfiltri in serie. Tutte le prove eseguite sono state effettuate sotto le stesse condizioni di temperatura e volume di soluzione contenuto in ciascun pozzetto. La temperatura è stata mantenuta al valore desiderato da un sistema di controllo per mantenere la condizione di sovrasaturazione costante.

Le misure del tempo di induzione alla nucleazione sono state condotte alla temperatura di 15°C che corrisponde ad una sovrasaturazione S di 1.8 per l'aspirina. Ogni prova di cristallizzazione è stata eseguita con almeno due tipologie campioni simultaneamente per un totale di 48 pozzetti, 24 pozzetti per ciascuna tipologia di superficie, riempite con volumi di 125 μ l di

soluzione filtrata per ricoprire interamente l'area di ogni campione con un sottile film di liquido, in modo da sopprimere il più possibile la nucleazione nel bulk e, al tempo stesso, massimizzare la probabilità di interazione delle molecole di soluto con le superfici studiate. Solo la frazione di pozzetti in cui la nucleazione è avvenuta a partire dalla superficie del SAM è stata considerata nel calcolo delle probabilità di nucleazione in funzione del tempo. Viceversa, sono stati esclusi dal trattamento statistico dei dati i pozzetti in cui la nucleazione eterogenea è stata promossa da impurezze residue in soluzione o da altre fonti di contaminazione, in quanto affetti da fenomeni estranei a quelli oggetto di studio.

La probabilità che un evento di nucleazione si verifichi entro un tempo t è stato approssimato dalla frazione di pozzetti in cui la cristallizzazione si è verificata entro il tempo t , assumendo che tutti i campioni dello stesso tipo siano identici. Questa approssimazione è applicabile quando la velocità di scambio di calore nel sistema è sufficientemente grande da raggiungere la condizione di sovrasaturazione in tempi brevi e la velocità di crescita del cristallo è sufficientemente alta. Quest'ultima ipotesi permette di considerare che, una volta formatosi un nucleo, esso cresce talmente in fretta da diventare osservabile in tempi brevissimi, così da poter ritenere che t_g sia trascurabile rispetto al tempo di formazione di un nucleo stabile [71]. Entrambe le condizioni sono verificate in quanto la portata di azoto refrigerante utilizzata è abbastanza alta da sottrarre calore al piccolo volume impiegato per ciascuno pozzetto; inoltre, la crescita dei cristalli di aspirina avviene in tempi nell'arco dei minuti come mostra la Figura 3.15 ed è dunque trascurabile rispetto al tempo di nucleazione che si aggira nell'ordine di grandezza delle ore.

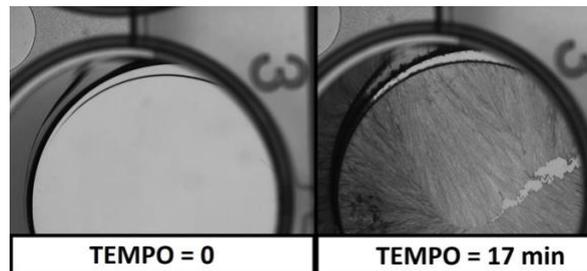


Figura 3.15 Fase di crescita dei cristalli nel caso di una soluzione di aspirina con sovrasaturazione $S=1.8$. I tempi indicati si riferiscono al momento in cui sono state acquisite.

Il calcolo del tempo di nucleazione τ è stato statisticamente descritto assumendo che la descrizione statistica degli eventi di nucleazione segua la distribuzione di Poisson (3.1).

$$f(\lambda; n) = \frac{\lambda^n e^{-\lambda}}{n!} \quad (3.1)$$

Dove λ è il numero medio di eventi attesi per intervallo di tempo, mentre n è il numero esatto di eventi per intervallo di tempo di cui si vuole la probabilità.

Impostando $n = 0$ e $\lambda = t/\tau$ si ricava la probabilità di non osservare alcun evento di nucleazione P_0 al tempo t [71].

$$P_0 = e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.2)$$

Per cui la probabilità di osservare un evento di nucleazione P risulta:

$$P(t) = 1 - P_0 = 1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (3.3)$$

La determinazione della probabilità cumulativa $P(t)$ è stata calcolata sperimentalmente con la seguente relazione:

$$P(t) = \frac{M^*(t)}{M} \quad (3.4)$$

Dove M è il numero totale di eventi verificatosi e $M^*(t)$ è il numero di eventi verificatosi al tempo t .

Infine, per ricavare il valore medio di τ è stata valutata la retta interpolante i punti ottenuti sperimentalmente secondo la relazione:

$$\ln(1 - P(t)) = \ln\left(e^{-\frac{t}{\tau}}\right) = -\frac{t}{\tau} \quad (3.5)$$

in cui sull'asse delle ordinate abbiamo la relazione logaritmica e sull'asse delle ascisse il tempo. La pendenza della retta equivale all'inverso del valore medio del tempo di induzione alla nucleazione.

L'analisi della probabilità cumulativa $P(t)$ è stata condotta grazie all'acquisizione di immagini ad alta risoluzione acquisite mediante un microscopio ottico ogni 2 ore per tutta la durata delle prove.

Sistema di controllo

Il sistema di controllo gestisce la temperatura attraverso un controllore proporzionale, il set-up è stato impostato a 15 °C con un off-set di $\pm 0,1$ °C. La dinamica del processo è illustrata nella Figura 3.16 dove mediamente il tempo necessario per raggiungere la temperatura desiderata è di circa 9 minuti. Durante il tempo di assestamento al set-point, si verificano oscillazioni di temperatura il cui overshoot massimo è di circa 0,30 °C. Superato il momento di assestamento, la temperatura rimane stabile per tutta la durata della prova nei margini di off-set impostati.

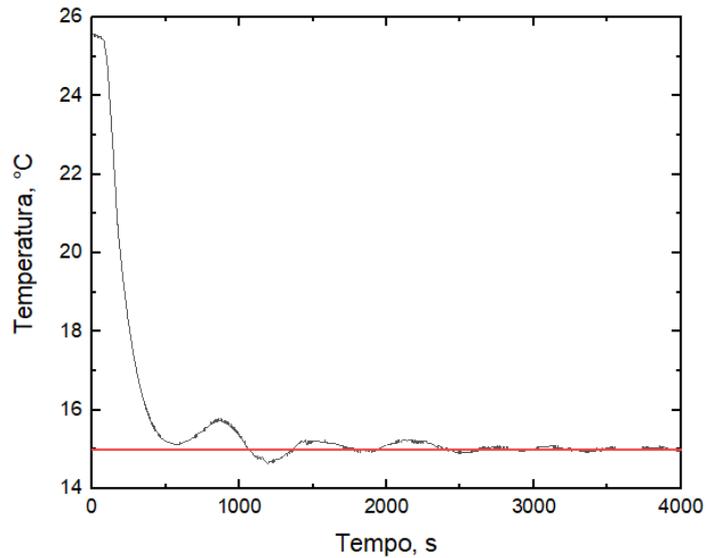


Figura 3.16 Dinamica del transitorio iniziale del processo di raffreddamento.

Cristallizzazione sulla superficie non trattata (CLEAN)

La prova di cristallizzazione sulla superficie CLEAN è durata circa 22 giorni, l'andamento del processo è mostrato in Figura 3.17, in cui è possibile evidenziare la presenza di un tempo di ritardo e che il trend dei punti valutati con la (3.4), esclusi i primi tre, seguono bene la curva esponenziale data dalla relazione (3.3).

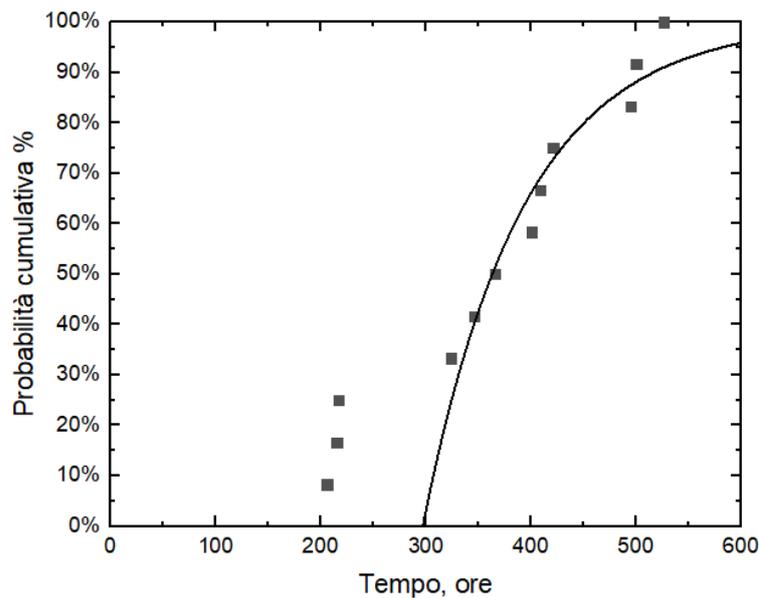


Figura 3.17 Probabilità cumulativa che si verifichi un evento di nucleazione in funzione del tempo e sua descrizione con la relazione di Poisson (3.3) nel caso di cristallizzazione di una soluzione di aspirina con saturazione $S=1.8$ e in presenza di una superficie non trattata (CLEAN).

Il tempo di ritardo evidenziato è assimilabile al tempo di transizione che il sistema richiede per raggiungere le condizioni di nucleazione stazionaria. Questa fase di transizione dipende maggiormente da fenomeni diffusivi nel bulk che, nel processo di cristallizzazione mediante raffreddamento della soluzione, risulta essere piuttosto marcato. Ciò è dovuto al fatto che la diffusione di un soluto in un liquido è funzione della temperatura e, di conseguenza, risulta rallentata a basse temperature. Tuttavia, quando i tempi per la cristallizzazione sono molto lunghi è possibile che si possano verificare altri fenomeni, evidenziati durante le prove, che possono influenzare il processo. Tra questi vi possono essere una parziale evaporazione della soluzione con un aumento della sovrasaturazione oppure nucleazione indotta dal contributo delle pareti del pozzetto con conseguente cristallizzazione sul bordo. Difatti, durante la valutazione di τ sono stati esclusi i primi tre valori in quanto non seguivano il trend di quelli successivi, probabilmente dovuto proprio alle problematiche descritte precedentemente.

La valutazione del tempo di induzione alla nucleazione è stata eseguita mediante l'interpolazione dei punti valutati con la (3.5) in funzione del tempo come mostra la Figura 3.18. Il tempo medio di induzione alla nucleazione τ calcolato è di 95 ± 12 ore e con un tempo di ritardo di 297 ± 14 ore.

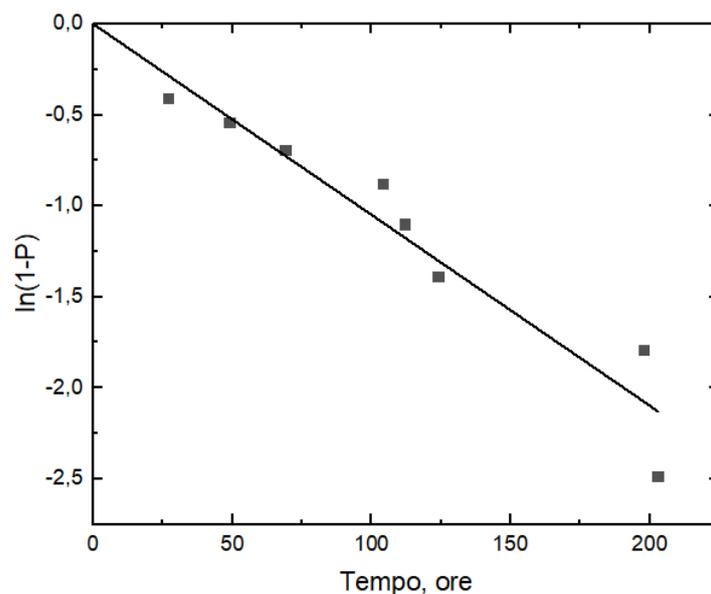


Figura 3.18 Interpolazione dei punti valutati con la (3.5), a meno del tempo di ritardo, all'origine, per la superficie non trattata (CLEAN).

Cristallizzazione sulla superficie funzionalizzata con il TPM

La prova di cristallizzazione con la superficie funzionalizzata con il TPM ha avuto una durata di circa 7 giorni, tre volte minore rispetto al campione CLEAN. Si evince che la silanizzazione della superficie sia benefica nei confronti dei processi nucleativi del farmaco. La curva di probabilità cumulativa evidenzia come si sia verificata sia una riduzione di τ che del tempo di ritardo come mostra la Figura 3.19.

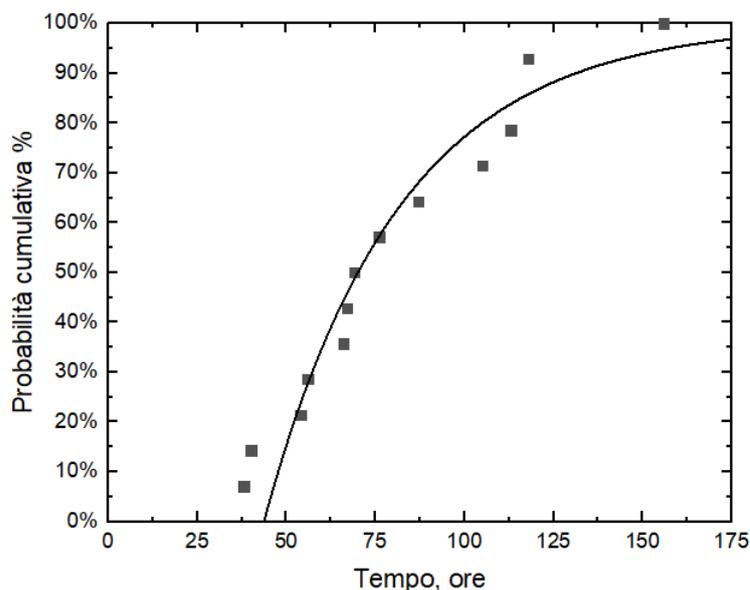


Figura 3.19 Probabilità cumulativa che si verifichi un evento di nucleazione in funzione del tempo e sua descrizione con la relazione di Poisson (3.3) nel caso di cristallizzazione di una soluzione di aspirina con saturazione $S=1.8$ e in presenza di una superficie funzionalizzata con il TPM.

In questo caso i primi punti seguono bene l'andamento della curva esponenziale evidenziando come il tempo di ritardo non sia stato influenzato da fenomeni estranei, come per la superficie non trattata, e quindi possiamo indentificarlo come un puro momento di transizione del sistema dovuto alla sola diffusione delle molecole di soluto verso la superficie funzionalizzata. È possibile dedurre che la diminuzione dei tempi misurati sia dovuta alla presenza del gruppo funzionale metacrilato. Infatti, a livello di struttura molecolare, esso presenta una similitudine, e dunque una certa affinità, con il gruppo acetossi della molecola di aspirina. Supponendo che la cristallizzazione sia descritta con un meccanismo a due stadi, la presenza di un gruppo affine alla molecola da cristallizzare permette di superare più facilmente le barriere energetiche dovute alle fluttuazioni di densità e di struttura. Nel primo stadio è possibile supporre che le molecole di aspirina tendono all'aggregazione più facilmente per via della corrispondenza tra il gruppo di testa del silano e la molecola di aspirina. Successivamente, nel secondo stadio, le stesse molecole potrebbero essere facilitate ad organizzarsi nello spazio grazie all'azione di *mimicking* molecolare della superficie recante una funzionalità analoga.

Per quanto riguarda la diffusione delle molecole nel bulk, la presenza di una superficie funzionalizzata può sovrapporre effetti attrattivi di natura elettrostatica che possono ridurre i tempi di transizione, maggiormente marcati grazie ad un'affinità fra funzionalità della superficie e aspirina.

Attraverso la regressione dei punti linearizzati della funzione di probabilità cumulativa in funzione del tempo riportata in Figura 3.20, è stato valutato un tempo medio di induzione alla nucleazione τ pari a 38 ± 5 ore e un tempo di ritardo di 44 ± 5 ore.

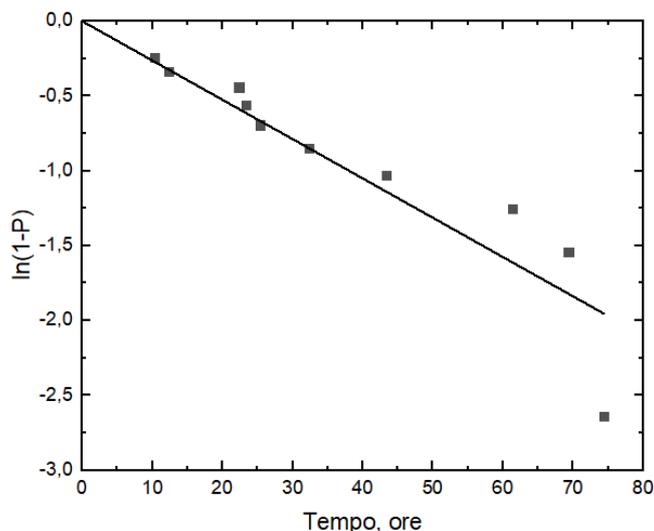


Figura 3.20 Interpolazione dei punti valutati con la (3.5), a meno del tempo di ritardo, all'origine, per la superficie funzionalizzata con il TPM.

Cristallizzazione sulla superficie funzionalizzata con l'APTS

La prova di cristallizzazione con la superficie funzionalizzata con l'APTS è durata poco più di 8 giorni, in linea con quanto osservato per i campioni trattati con il TPM. Anche per questa superficie l'effetto della silanizzazione ha dato esito positivo con una riduzione di τ e del tempo di ritardo come mostrato in Figura 3.21 in cui i dati sperimentali seguono bene la distribuzione esponenziale di Poisson.

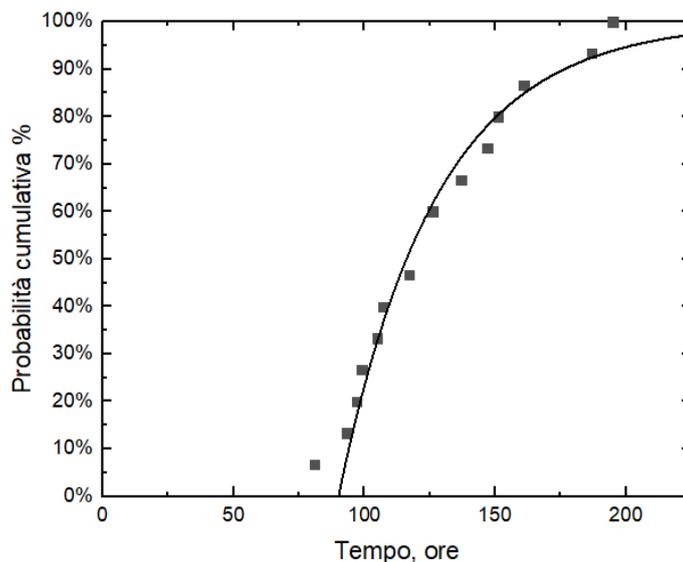


Figura 3.21 Probabilità cumulativa che si verifichi un evento di nucleazione in funzione del tempo e sua descrizione con la relazione di Poisson (3.3) nel caso di cristallizzazione di una soluzione di aspirina con saturazione $S=1.8$ e in presenza di una superficie funzionalizzata con l'APTS.

Tra tutte le superfici, quella con il gruppo amminico è l'unica che presentava potenziale zeta di superficie positivo. Il tempo di ritardo non è molto lungo per cui si possono trascurare gli effetti di fenomeni estranei e indesiderati, confermato anche da una minore incertezza dei punti misurati. Di conseguenza, l'avvenimento di un evento nucleativo dipende solamente dalla diffusione delle molecole di farmaco dal bulk verso la superficie, che può essere a sua volta facilitata dall'attrazione elettrostatica tra superficie e molecole. Per quanto riguarda la nucleazione è possibile supporre che la polarità del gruppo amminico sia compatibile con il gruppo carbossilico della molecola di aspirina e, quindi, questa affinità permetta di superare più facilmente le barriere energetiche richieste per la cristallizzazione.

Attraverso la linearizzazione dei punti valutati con la probabilità cumulativa risulta che il fitting lineare dei punti in funzione del tempo come mostra la Figura 3.22 porti ad un valore medio di τ di 37 ± 2 ore e un tempo di ritardo di 90 ± 2 ore.

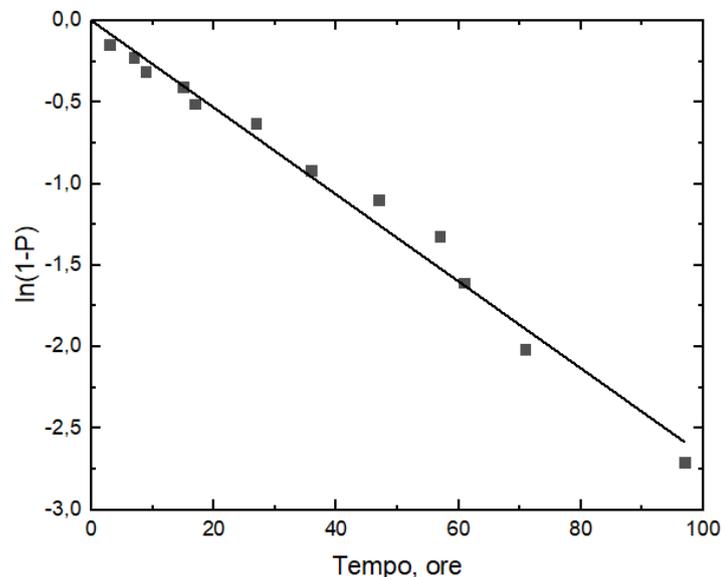


Figura 3.22 Interpolazione dei punti valutati con la (3.5), a meno del tempo di ritardo, all'origine, per la superficie funzionalizzata con l'APTS.

Cristallizzazione sulla superficie funzionalizzata con l'EPTS

La prova di cristallizzazione con la superficie funzionalizzata con l'EPTS è durata circa 14 giorni, quasi il doppio dei SAM precedenti ed evidenziando un maggiore tempo di induzione alla nucleazione e di tempo di ritardo come mostra la Figura 3.23. I punti seguono abbastanza bene l'andamento della curva esponenziale escludendo i primi tre punti.

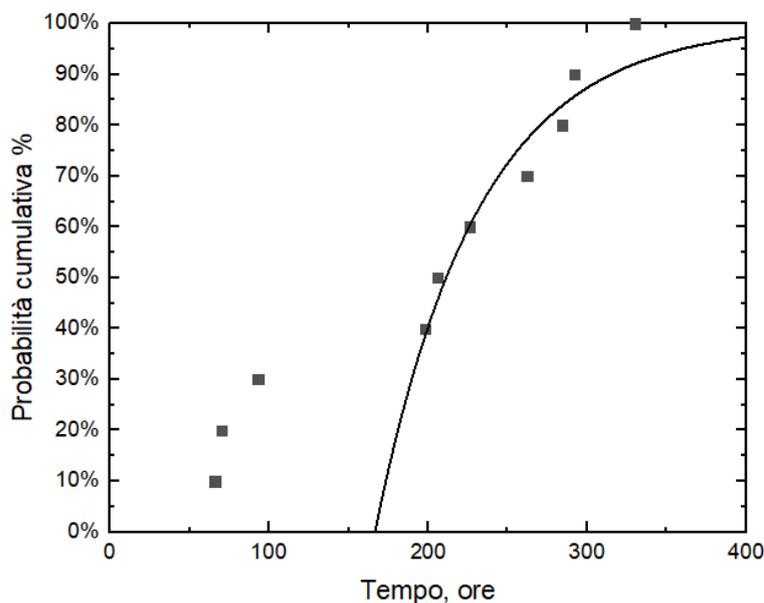


Figura 3.23 Probabilità cumulativa che si verifichi un evento di nucleazione in funzione del tempo e sua descrizione con la relazione di Poisson (3.3) nel caso di cristallizzazione di una soluzione di aspirina con saturazione $S=1.8$ e in presenza di una superficie funzionalizzata con l'EPTS.

Se si confrontano i risultati calcolati con quelli della superficie CLEAN, la τ e il tempo di ritardo sono minori, ma non in modo significativo. In questo caso i tempi di transizione sono molto lunghi e la possibilità che si presentino altri fenomeni estranei è più alta, infatti i primi tre punti misurati non rientrano nel trend dei punti successivi, indice di come i dati siano stati in qualche modo influenzati da disturbi esterni. Inoltre, il gruppo funzionale epossidico non presenta a livello di struttura molecolare un'affinità con la molecola di aspirina. Di conseguenza, in termini di cinetica di nucleazione, è possibile supporre come la superficie funzionalizzata in questo caso abbia un effetto negativo, quasi come se fosse inerte, similmente al caso della superficie non trattata. Questo si ripercuote sul meccanismo di nucleazione che non è favorito per via di una affinità strutturale tra il gruppo di testa del SAM e il farmaco. In un certo modo la funzionalizzazione della superficie influisce sui tempi di transizione se si considera che il potenziale zeta di superficie dell'EPTS è maggiore in modulo rispetto a quello CLEAN e quindi presenta una maggiore forza attrattiva che però non compensa la mancanza di affinità con l'aspirina. Tuttavia non è dato a sapere se effettivamente l'effetto elettrostatico possa influenzare negativamente le fluttuazioni di densità e di struttura.

Il tempo di induzione alla nucleazione τ è stato calcolato dalla regressione dei punti probabilistici linearizzati in funzione del tempo come mostra la Figura 3.24 e risulta essere di 65 ± 12 ore con un tempo di ritardo di 165 ± 16 ore.

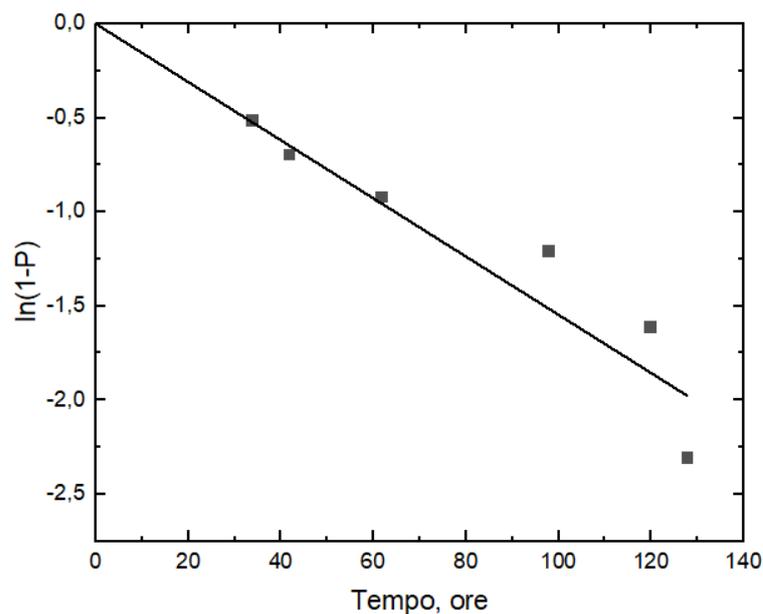


Figura 3.24 Interpolazione dei punti valutati con la (3.5) normalizzati all'origine, per la superficie funzionalizzata con l'EPTS.

Cristallizzazione sulla superficie funzionalizzata con l'MPTS

Dopo 22 giorni di prova sperimentale i campioni funzionalizzati con l'MPTS hanno presentato un comportamento anomalo in quanto solamente tre pozzetti hanno portato a cristallizzazione. In più, la nucleazione è avvenuta in tempi che non mostrano un collegamento tra di loro, come mostra la Figura 3.25. Nello stesso arco temporale la superficie non funzionalizzata aveva portato all'ottenimento di cristalli di aspirina in quasi tutti i campioni analizzati. Questi risultati preliminari potrebbero indicare un effetto inibitorio del gruppo funzionale tiolo nei confronti della cristallizzazione di aspirina. Un risultato simile si era riscontrato con una prova effettuata con le stesse superfici condotta a circa 4 °C, corrispondente a una sovrasaturazione S di 2.4. Una possibile ipotesi potrebbe riguardare una diffusione delle molecole di soluto molto lenta a temperature così basse, senza spiegare però la mancata nucleazione di alcuni pozzetti ad una sovrasaturazione più alta. La sola osservazione dei possibili eventi di nucleazione non è sufficiente a descrivere questo fenomeno.

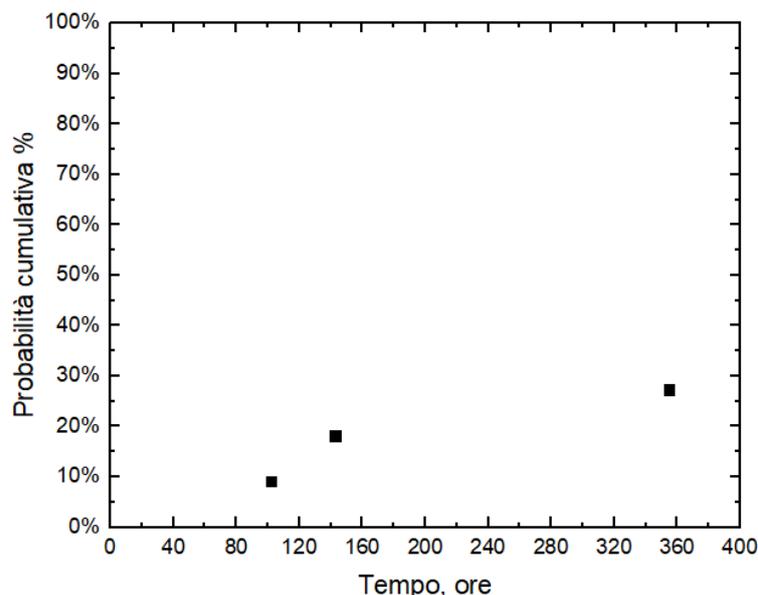


Figura 3.25 Probabilità cumulativa che si verifichi un evento di nucleazione in funzione del tempo nel caso di cristallizzazione di una soluzione di aspirina con saturazione $S=1.8$ e in presenza di una superficie funzionalizzata con l'MPTS.

Confronto dei risultati di cristallizzazione sulle superfici funzionalizzate

Dal confronto dei risultati ottenuti come mostra la Tabella 3.12 e in Figura 3.26 è possibile evidenziare come due superfici funzionali su quattro hanno un effetto positivo sul meccanismo nucleativo dell'aspirina, riducendo di quasi tre volte il tempo di induzione rispetto alla superficie CLEAN.

L'APTS e il TPM hanno quasi lo stesso valore di τ e sono indice di come la presenza di un gruppo funzionale affine alla molecola da cristallizzare abbia un effetto "catalizzante" sul tempo di nucleazione, mentre per i tempi di transizione, che sono differenti, potrebbero dipendere dalla carica superficiale. Il TPM presenta un t_{tr} quasi due volte minore a quello dell'APTS e valutando i valori di potenziale zeta di superficie dei due SAM, Tabella 3.8, è possibile notare come il valore in modulo sia maggiore per il TPM probabilmente indicando un maggiore effetto elettrostatico della superficie.

Per quanto riguarda le superfici con l'EPTS ed MPTS la presenza di un gruppo funzionale non affine porta risultati negativi in termini di tempi di nucleazione in quanto l'effetto della *mimicking* molecolare è poco applicabile e di conseguenza, la superficie ha un comportamento molto simile alla superficie non trattata.

Tabella 3.8 Tempo di induzione alla nucleazione τ , tempo di transizione t_{tr} e tempo di induzione totale τ^* , calcolati per tutte le superfici.

	τ (ore)	t_{tr} (ore)	τ^* (ore)
CLEAN	95 ± 12	297 ± 14	392
TPM	38 ± 5	44 ± 5	82
APTS	37 ± 2	90 ± 2	127
EPTS	65 ± 12	165 ± 16	230

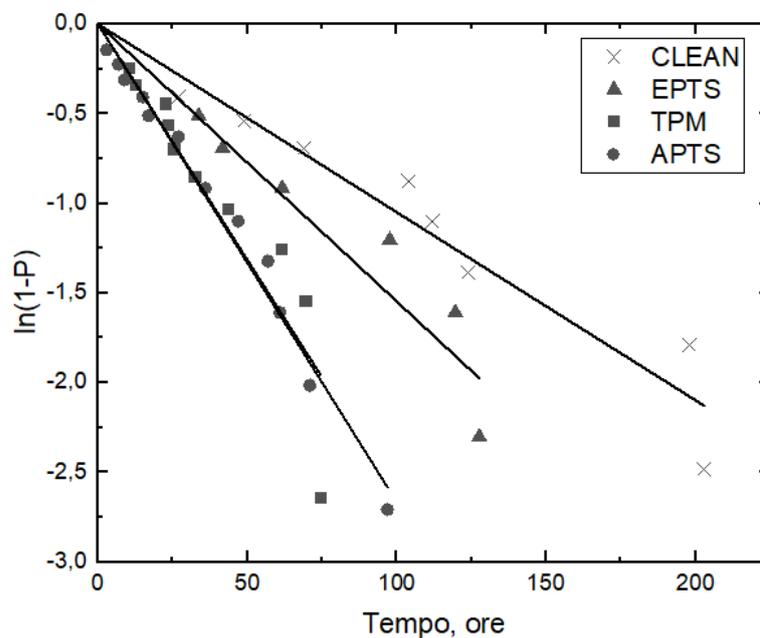


Figura 3.26 Interpolazione dei punti valutati con la (3.5), a meno del tempo di ritardo, all'origine, di tutte le superfici studiate.

Effetto della cristallizzazione eterogenea sull'aspirina

Dalle prove sperimentali effettuate è stato possibile indentificare la forma assunta dai cristalli di aspirina quando la cristallizzazione avviene nel bulk della soluzione e dunque trascurando l'effetto della superficie. La Figura 3.27 mostra come generalmente la forma assunta dai cristalli sia esagonale con dimensioni molto variabili indicando come il controllo su questi cristalli sia quasi nullo; inoltre il numero di cristalli è sempre limitato.

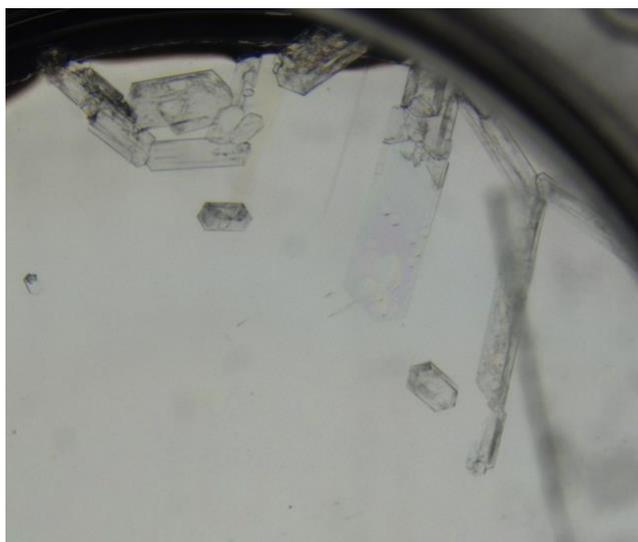


Figura 3.27 *Cristalli di aspirina nucleati nel bulk della soluzione.*

Quando la cristallizzazione avviene sulla superficie, vedi Figura 3.28, è possibile vedere come i cristalli coprano quasi interamente la superficie del vetrino, un comportamento nettamente diverso rispetto alla nucleazione nel bulk, inoltre è possibile notare come si abbia un certo orientamento nella crescita dei cristalli, come se la direzione preferenziale fosse radiale.

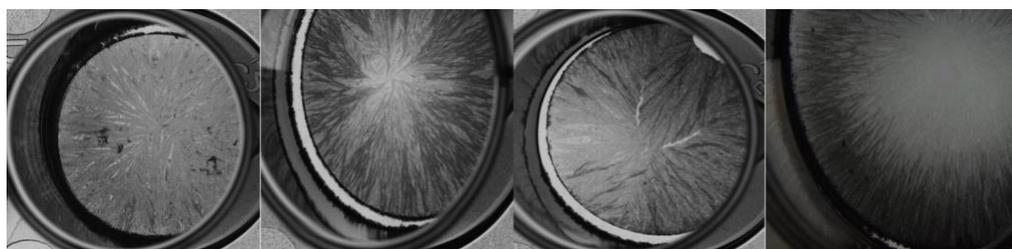


Figura 3.28 *Cristallizzazione sulla superficie di diversi campioni.*

Questo comportamento è stato visto su tutte le superfici utilizzate nelle prove di sperimentali, indicando come il meccanismo eterogeneo imponga dei vincoli nel modo di cristallizzare. Attraverso le immagini ad una risoluzione maggiore, Figure 3.29, 3.30, 3.31, 3.32, 3.33, è stato possibile confermare come i cristalli tendano ad una direzione preferenziale di crescita, il numero di cristalli sia nettamente maggiore rispetto alla nucleazione in bulk, probabilmente ciò è dovuto dalla presenza di più centri di nucleazione, la dimensione dei cristalli sia più uniforme, indicando un certo controllo sulla formazione dei cristalli, e la forma cui si presentano rimanga sempre quella esagonale. In conclusione, è possibile affermare che l'introduzione di una superficie all'interno del sistema influisca il tempo di induzione alla nucleazione e la direzione preferenziale di crescita cristallina di aspirina, senza però modificarne la forma cristallina.

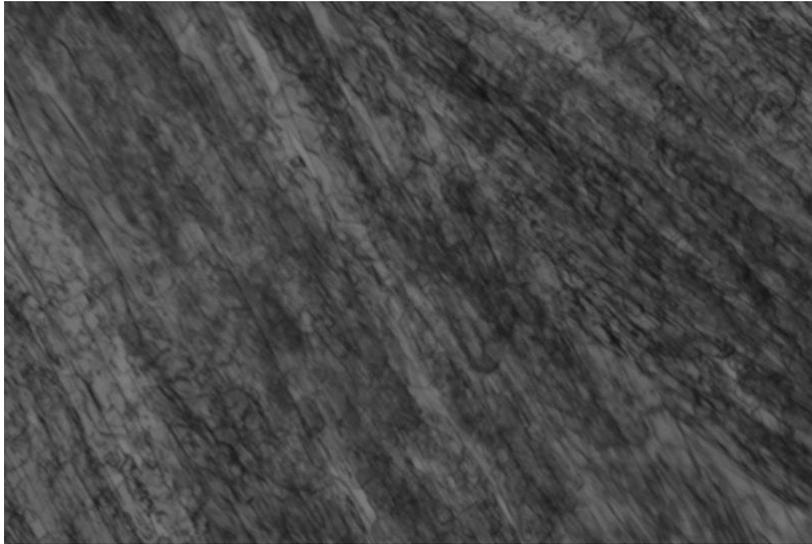


Figura 3.29 *Cristalli di aspirina sulla superficie funzionalizzata con il TPM.*

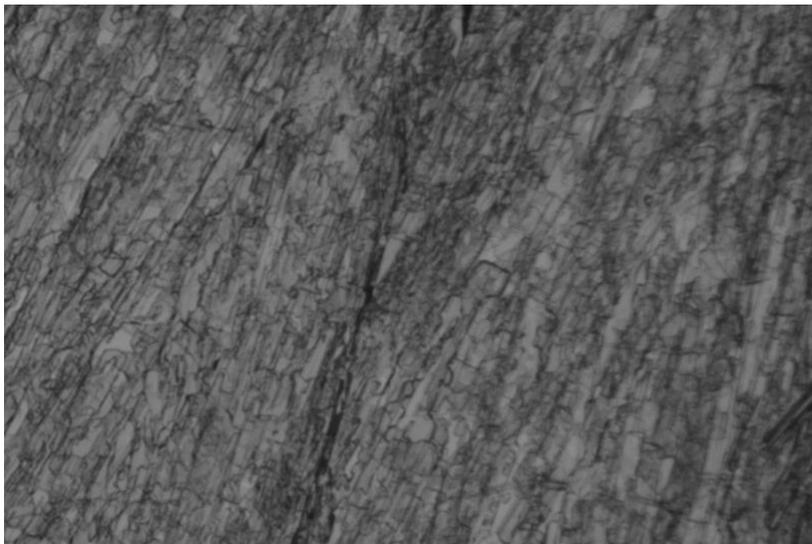


Figura 3.30 *Cristalli di aspirina sulla superficie funzionalizzata con l'EPTS.*

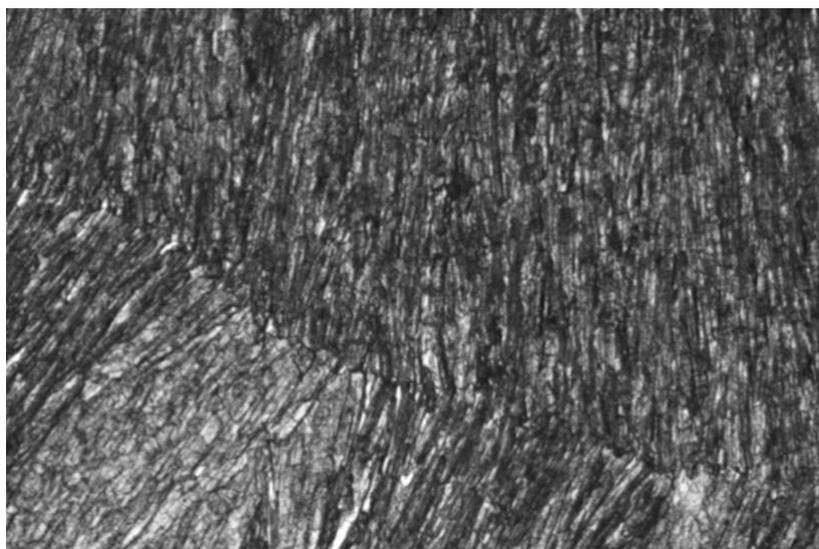


Figura 3.31 *Cristalli di aspirina sulla superficie funzionalizzata con l'APTS.*



Figura 3.32 *Cristalli di aspirina sulla superficie funzionalizzata con l'MPTS.*



Figura 3.33 *Cristalli di aspirina sulla superficie non tratta CLEAN.*

4. Conclusioni

L'obiettivo della tesi è lo studio della cristallizzazione di farmaci, in questo caso dell'aspirina, su diverse superfici funzionalizzate con il metodo del monostrato auto-assemblato (SAM). Le superfici sono state modificate in modo da esibire differenti bagnabilità e cariche superficiali con l'utilizzo di differenti silani: (3-mercaptopropil)-trimetossisilano (MPTS), (3-amminopropil)-trimetossisilano (APTS), [3-(2,3-epossipropossi)-propil]-trimetossisilano (EPTS), 3-(trimetossisilil)-propilmetacrilato (TPM).

Un primo studio di caratterizzazione delle superfici ha permesso di valutare le diverse proprietà superficiali dei SAM nonché la conferma dell'efficacia del protocollo di sintesi dei campioni per la successiva prova di cristallizzazione, anche grazie al confronto con una superficie non funzionalizzata (CLEAN). Dai risultati delle prove di caratterizzazione di angolo di contatto e di potenziale zeta di superficie è stato possibile verificare come i campioni studiati rispecchino la natura dei gruppi funzionali esposti indicando come la sintesi sia avvenuta nel modo corretto e confermando la scelta di utilizzare silani a catena corta. Questi, infatti, mostrano un buon impaccamento su tutta la superficie. Inoltre, le tempistiche di sintesi sono ottimali così come le concentrazioni utilizzate. Dei quattro silani utilizzati l'APTS è l'unico che esibisce un comportamento opposto rispetto agli altri, mostrando un comportamento idrofilo con il test di angolo di contatto e un potenziale zeta di superficie positivo. I silani restanti hanno un comportamento leggermente idrofobico, quindi un maggiore angolo di contatto e un potenziale zeta di superficie negativo e solo l'MPTS ha un valore in modulo nettamente maggiore rispetto agli altri.

In seguito, lo studio di cristallizzazione dell'aspirina sulle superfici funzionalizzate è stato condotto attraverso il raffreddamento della soluzione contenente il farmaco e la valutazione del tempo medio di induzione alla nucleazione τ . Questo è stato stimato mediante una trattazione statistica dei campioni che esibiscono una cristallizzazione sulla superficie. Attraverso la distribuzione di Poisson (3.1) è stato possibile descrivere gli eventi di cristallizzazione in termini probabilistici e da questi valutare un valore medio di τ . Dai risultati ottenuti è stato possibile verificare come il raffreddamento della soluzione porti ad un tempo di ritardo, che è dovuto dalla diffusione delle molecole di soluto dal bulk verso la superficie, e come esso sia influenzato sia dalla tipologia del gruppo funzionale di testa del silano che dal potenziale zeta di superficie che esibisce. Inoltre, è stato possibile dimostrare come l'affinità tra il gruppo funzionale di testa del silano e uno dei gruppi funzionali della molecola di aspirina porti ad avere un effetto "catalizzante" sui tempi di cristallizzazione indicando come le barriere energetiche di densità e struttura siano più facili da superare. Infatti, i silani APTS e TPM presentano una affinità rispettivamente con i gruppi carbossilico e acetilossi dell'aspirina riducendo di quasi tre volte i tempi di cristallizzazione rispetto alla superficie non funzionalizzata. Quando non vi è alcuna affinità, come per l'EPTS, i tempi di cristallizzazione sono paragonabili a quelle della superficie CLEAN di riferimento, mentre per l'MPTS è stato possibile portare ad una inibizione della nucleazione e quindi esercitare un controllo del processo sia in termini di accelerazione che depressione della cinetica di cristallizzazione.

Infine, si è valutato l'effetto della cristallizzazione eterogenea, indicando come i cristalli che si formano sulla superficie abbiano una orientazione preferenziale con un buon grado di ordine e come la dimensione dei cristalli sia quasi uniforme, indicando un certo controllo del processo.

In conclusione, l'utilizzo di superfici funzionali per la cristallizzazione di un prodotto farmaceutico, nello specifico di aspirina, ha avuto esito positivo per due superfici su quattro evidenziando come nella scelta del silano da utilizzare bisogna tenere conto dell'affinità tra il gruppo di testa e la molecola da cristallizzare al fine di ridurre notevolmente i tempi di cristallizzazione e acquisire un buon livello di controllo sul processo di cristallizzazione. Da questo punto di vista le prospettive future per applicazioni con l'utilizzo di SAM nel processo di cristallizzazione sono promettenti. Le tempistiche di sintesi sono veloci e molto stabili, per cui non si escludono possibili applicazioni in continuo per uno scale-up industriale.

Lista dei simboli

A	Fattore pre-esponenziale
a	Cluster
C	Concentrazione
C^*	Solubilità
G	Energia libera di Gibbs
G_{cr}	Energia libera critica
G_s	Energia libera di superficie
G_v	Energia libera di volume
J_0	Velocità di nucleazione
k	Costante di Boltzmann
M	Numero totale di eventi verificatosi per intervallo di tempo
M^*	Numero di eventi verificatosi per istante di tempo
n	Numero esatto di eventi per intervallo di tempo
P	Probabilità cumulativa
P_0	Probabilità di non osservare alcun evento
r	Raggio nucleo
r_{cr}	Raggio critico
S	Sovrasaturazione
T	Temperatura
t	Tempo

t_g	Tempo di crescita
t_n	Tempo di formazione nucleo stabile
t_{tr}	Tempo di transizione
V	Volume
v	Volume molecola
α	Fattore di volume
β	Fattore di area
γ	Tensione superficiale
γ_{cl}	Tensione interfacciale cristallo-liquido
γ_{cs}	Tensione interfacciale cristallo-solido
γ_{sl}	Tensione interfacciale solido-liquido
θ	Angolo di contatto
λ	numero medio di eventi per intervallo di tempo atteso
σ	Sovrasaturazione relativa
τ	Tempo di induzione alla nucleazione
τ^*	Tempo di induzione totale
ϕ	Fattore di riduzione di energia libera

Abbreviazioni

API	Active Pharmaceutical Ingredient
APTS	(3-amminopropil)-trimetossisilano
CLEAN	Superficie non funzionalizzata
D	Destrogiro
Dev. Std	Deviazione standard
DLS	Dynamic Light Scattering
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
HIV	Human Immunodeficiency Virus
EPTS	[3-(2,3-eossipropossi)-propil]-trimetossisilano
L	Levogiro
MPTS	(3-mercaptopropil)-trimetossisilano
SAM	Self-assembled monolayer
TPM	3-(trimetossisilil)-propilmetacrilato
XRD	X-ray Diffraction

Bibliografia

- [1] Chen J., Sarma B., Evans J. M. B., Myerson A. S., 2011. Pharmaceutical Crystallization. *Crystal Growth & Design*, 11(4), 887-895.
- [2] Ulrich J., Froberg P., 2013. Problems, potentials and future of industrial crystallization. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 7(1), 1-8.
- [3] Artusio F., Pisano R., 2018. Surface-induced crystallization of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 547(1), 190-208.
- [4] Gao Z., Rohani S., Gong J., Wang J., 2017. Recent developments in the crystallization process: toward the pharmaceutical industry. *Engineering*, 3(3), 343-353.
- [5] D'Amato R. J., Loughnan M. S., Flynn E., Folkman J., 1994. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (9), 4082-4085;
- [6] Wnendt S., Finkam M., Winter W., Ossig J., Raabe G., Zwingenberger K., 1996. Enantioselective inhibition of TNF- α release by thalidomide and thalidomide-analogues. *Chirality*, 8(5), 390-396.
- [7] Bauer J., Morris J., Henry R., 2001, Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism. *Pharmaceutical Research*, 18(6), 859-866.
- [8] Santos O. M. M., Reis M. E. D., Jacon J. T., Lino M. E. de Sousa, Simões J. S., Doriguetto A. C., 2014. Polymorphism: an evaluation of the potential risk to the quality of drug products from the Farmácia Popular Rede Própria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(1), 1-24
- [9] Myerson A., Erdemir D., Lee A., 2019. Handbook of Industrial Crystallization. Cambridge University Press, Cambridge, USA.
- [10] Mullin J. W., 2001. Crystallization. 4th edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK.
- [11] Vollmer, M., 1939. Kinetik der Phasenbildung. Verlag Theodor Steinkopff: Dresden.
- [12] Nielsen A. E., 1964. Kinetics of Precipitation. Pergamon Press, New York, 1964.
- [13] Myerson A. S., Trout B. L., 2013. Chemistry. Nucleation from solution. *Science*, 341(6148), 855-856.
- [14] Vekilov, P. G., 2004. Dense liquid precursor for the nucleation of ordered solid phases from solution. *Crystal Growth & Design*, 4(4), 671-685.
- [15] Cui Y., Stojakovic J., Kijima H., Myerson A. S., 2016. Mechanism of contact-induced heterogeneous nucleation. *Crystal Growth & Design*, 16 (10), 6131-6138.
- [16] Ejgenberg M., Mastai Y., 2012. Crystallization on Self-Assembled Monolayers. Advances in Crystallization Processes, IntechOpen, London, UK.
- [17] Fermani S., Falini G., Minnucci M., Ripamonti A., 2001. Protein crystallization on polymeric film surfaces. *Journal of Crystal Growth*, 224(3), 327-334.
- [18] Diao Y., Harada T., Myerson A.S., Alan Hatton T., Trout B.L., 2011. The role of nanopore shape in surface-induced crystallization. *Nature Materials*, 10(11), 867-871.

- [19] Nuzzo R.G., Allara D.L., 1983. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 105(13), 4481-4483.
- [20] Maoz R., Sagiv J., 1984. On the formation and structure of self-assembling monolayers. I. A comparative at-wettability study of Langmuir—Blodgett and adsorbed films on flat substrates and glass microbeads. *Journal of Colloid and Interface Science*, 100(2), 465-496.
- [21] Hänsch C., 2009. Surface chemistry on self-assembled monolayers. Tesi di dottorato, Università Tecnica di Eindhoven.
- [22] Mastrangelo F., Fioravanti G., Quaresima R., Vinci R., Gherlone E., 2011. Self-assembled monolayers (SAMs): Which perspectives in implant dentistry? *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2, 533-543.
- [23] Azzaroni O., Vela M. E., Martin H., Creus A. H., Andreasen G., Salvarezza R. C., 2001. Electrodesorption kinetics and molecular interactions at negatively charged self-assembled thiol monolayers in electrolyte solutions. *Langmuir*, 17(21), 6647-6654.
- [24] Sawaguchi T., Sato Y., Mizutani F., 2001. Ordered structures of self-assembled monolayers of 3-mercaptopropionic acid on Au(111): in situ scanning tunneling microscopy study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3(16), 3399-3404.
- [25] Schwartz D. K., 2001. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. *Annual Review of Physical Chemistry*, 52(1), 107-137.
- [26] Hiremath R., Basile J. A., Varney S. W., Swift J. A., 2005. Controlling molecular crystal polymorphism with self-assembled monolayer templates. *Journal of the American Chemical Society*, 127(51), 18321-18327.
- [27] Yang X., Sarma B., Myerson A. S., 2012. Polymorph control of micro/nano-sized mefenamic acid crystals on patterned self-assembled monolayers islands. *Crystal Growth & Design*, 12(11), 5521-5528.
- [28] Singh, A.; Lee, I. S.; Myerson, A. S., 2009. Concomitant crystallization of ROY on patterned substrates: using a high throughput method to improve the chances of crystallization of different polymorphs. *Crystal Growth & Design*, 9(2), 1182-1185.
- [29] Kulkarni, S. A.; Weber, C. C.; Myerson, A. S., ter Horst, J. H., 2014. Self-association during heterogeneous nucleation onto well-defined templates. *Langmuir*, 30(41), 12368-12375.
- [30] Pouget E. M., Bomans P. H. H., Goos J. A. C. M., Frederik P. M., de With G., Sommerdijk N. A. J. M., 2009. The initial stages of template-controlled CaCO₃ formation revealed by Cryo-Tem. *Science*, 323(5920), 1455-1458.
- [31] Harano, K.; Homma, T.; Niimi, Y.; Koshino, M.; Suenaga, K.; Leibler, L.; Nakamura, E., 2012. Heterogeneous nucleation of organic crystals mediated by single-molecule templates. *Nature Materials*, 11(10), 877-881.
- [32] Butt H.J., Graf K., Kappl M., 2003. *Physics and Chemistry of Interfaces*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- [33] Preparing Self-Assembled Monolayers (SAMs) A Step-by-Step Guide for Solution-Based Self-Assembly, Sigma-Aldrich Manual. Consultato il 03 settembre 2019

<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/materials-science/preparing-self-assembled.html>

[34] Malvern instruments Ltd – Measuring Surface Zeta Potential using the Surface Zeta Potential Cell, Malvern Zetasizer Nano application note. Consultato il 03 settembre 2019 <https://particular.ie/wp-content/uploads/2011/03/Planar-Cell1.pdf>

[35] Malvern instruments Ltd – Surface Zeta Potential cell (ZEN1020) MANO483 issue 1.0. Consultato il 3 settembre 2019. <https://www.materials-talks.com/wp-content/uploads/2014/08/Man0483-1.0-Surface-Zeta-Potential-Cell.pdf>

[36] Hiemenz P.C., Raj R., 1997. Principles of colloid and surface chemistry. Marcel Dekker, New York, USA.

[37] Myers D., 1991. Surfaces, interfaces, and colloids: principles and applications. VCH Publishers, New York, USA.

[38] Malvern instruments Ltd - Dynamic Light Scattering Training Achieving reliable nano particle sizing. Consultato il 3 settembre 2019. <http://149.171.168.221/partcat/wp-content/uploads/Malvern-Zetasizer-LS.pdf>

[39] Bai T., Cheng X., 2008. Preparation and characterization of 3-mercaptopropyl trimethoxysilane self-assembled monolayers. *Journal of University of Science and Technology Beijing, Mineral, Metallurgy, Material*, 15(2), 192-196.

[40] Du Y., Wood L. L., Saavedra S. S., 1999. Growth behavior and structure of alkyltrichlorosilane monolayers bearing thioacetate and acetate tailgroups. *Materials Science and Engineering: C*, 7(2), 161-169.

[41] Li J., 2008. Preparation and tribological characteristics of sulfonated self-assembled monolayer of 3-mercaptopropyl trimethoxysilane TiO₂ films. *Journal of Experimental Nanoscience*, 3(4), 307-317.

[42] Wang J., Yang S., Liu X., Ren S., Guan F., Chen M., 2004. Preparation and characterization of ZrO₂ thin film on sulfonated self-assembled monolayer of 3-mercaptopropyl trimethoxysilane. *Applied Surface Science*, 221(1), 272-280.

[43] Bai T., Cheng X., 2006. Investigation of the tribological behavior of 3-mercaptopropyl trimethoxysilane deposited on silicon. *Wear*, 261(7), 730-737.

[44] Cao T., Wang A., Liang X., Tang H., Auner G. W., Salley S. O., Simon Ng K. Y., 2008. Functionalization of AlN surface and effect of spacer density on Escherichia coli pili-antibody molecular recognition. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 63(2), 176-182.

[45] Purcar V., Șomoghi R., Nițu S. G., et al., 2017. The effect of different coupling agents on nano-ZnO materials obtained via the Sol-gel process. *Nanomaterials (Basel)*, 7(12),439.

[46] Kumar S., Singh J., Agrawal V. V., Ahamad, M., Malhotra B. D., 2011. Biocompatible self-assembled monolayer platform based on (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane for total cholesterol estimation. *Analytical Methods*, 3, 2237-2245.

[47] Luzinov I., Julthongpipit D., Liebmann-Vinson A., Cregger T., Foster M. D., Tsukruk V.V., 1999. Epoxy-terminated self-Assembled monolayers: molecular glues for polymer layers. *Langmuir*, 16(2),504-516.

- [48] van der Wel C., Bhan R. K., Verweij R. W., Frijters H. C., Gong Z., Hollingsworth A. D., Sacanna S., Kraft D. J., 2017. Preparation of colloidal organosilica spheres through spontaneous emulsification. *Langmuir*, 33 (33), 8174-8180.
- [49] Liu Z., Zhang B., et al., 2008. Construction of nonbiofouling biofunctional glass surface by self-Assembled monolayer and graft hydrophilic polymer. *Advanced Materials Research*, 47-50, 1343-1346.
- [50] Stansbury J., Bowman C., 2010. The progress in development of dental restorative materials. *Material Matters*, 5(3), 73.
- [51] Bressy C., Ngo V. G., Ziarelli F., Margailan A., 2012. New insights into the adsorption of 3-(Trimethoxysilyl)propylmethacrylate on hydroxylated ZnO nanopowders. *Langmuir*, 28 (6), 3290-3297.
- [52] González-Henríquez C. M., Veliz-Silva D. F., Sarabia-Vallejos M. A., Del Campo-García A., Rodríguez-Hernández J., 2019. Micrometric wrinkled patterns spontaneously formed on hydrogel thin films via argon plasma exposure. *Molecules*, 24(4), 751.
- [53] Howarter J. A., Youngblood J. P., 2006. Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. *Langmuir*, 22 (26), 11142-11147.
- [54] Siqueira Petri D. F., Wenz G., Schunk P., T Schimmel T., 1999. An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers. *Langmuir*, 15 (13), 4520-4523.
- [55] Zeng X., Xu G., Gao Y., An Y., 2011. Surface wettability of (3-Aminopropyl)triethoxysilane self-assembled monolayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115 (3), 450-454.
- [56] Satyanarayana N., Sinha S. K., Shen L., 2007. Effect of molecular structure on friction and wear of polymer thin films deposited on Si surface. *Tribology Letters*, 28(1), 71-80.
- [57] Asher T., Inberg A., Glickman E., Fishelson N., Shacham-Diamond Y., 2009. Formation and characterization of low resistivity sub-100 nm copper films deposited by electroless on SAM. *Electrochimica Acta*, 54(25), 6053-6057.
- [58] Wang A., Tang H., Cao T., Salley S. O., Simon Ng K. Y., 2005. In vitro stability study of organosilane self-assemble monolayers and multilayers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 291(2), 438-447.
- [59] Albutt D. J., 2013. Surface chemistry modification of glass and gold for low density neural cell culture. Tesi di dottorato, Università di Nottingham.
- [60] Kuo C., Chang H., Liu C., Lee S., You Y., Shyue J., 2011. Effect of surface chemical composition on the surface potential and iso-electric point of silicon substrates modified with self-assembled monolayers. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 13(9), 3649-53.
- [61] Majewski P., 2006. Reactions between contaminants and functionalized organic self-assembled monolayers in aqueous solutions. Report finale, Istituto di ricerca Ian Wark, Università dell'Australia meridionale.

- [62] Nakamura M., Ishimura K., 2007. Synthesis and characterization of organosilica nanoparticles prepared from 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane as the single silica source. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111 (51), 18892-18898.
- [63] Wondergem C., van Swieten T., Geitenbeek R., Erne B., Weckhuysen B., 2019. Extending surface-enhanced raman spectroscopy to liquids using shell-isolated plasmonic superstructures. *Chemistry A European Journal*.
- [64] Bauman M., Kosak A., Lobnik A., Petrinic I., Luxbacher T., 2013. Nanofiltration membranes modified with alkoxy silanes: surface characterization using zeta-potential. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 422, 110–117.
- [65] Rosen J. E., Gu F. X., 2011. Surface functionalization of silica nanoparticles with cysteine: a low-fouling zwitterionic surface. *Langmuir*, 27 (17), 10507-10513.
- [66] Wach A., Natkański P., Drozdek M., Dudek B., Kustrowski P., 2017. Functionalization of mesoporous SBA-15 silica by grafting of polyvinylamine on epoxy-modified surface. *Polimery*, 62(7), 516-524.
- [67] Altankov G., Richau K., Groth T., 2003. The role of surface zeta potential and substratum chemistry for regulation of dermal fibroblast interaction. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 34(12), 1120 - 1128.
- [68] Shyue J., De Guire M. R., Nakanishi T., Masuda Y., Koumoto K., Sukenik C. N., 2004. Acid-base properties and zeta potentials of self-assembled monolayers obtained via in situ transformations. *Langmuir*, 20(20), 8693-8698.
- [69] Lin Y., Yu B., Lin W., Chen Y., Shyue J., 2008. Site-selective deposition of gold on photo-patterned self-assembled monolayers. *Chemistry of Materials*, 20(21), 6606-6610.
- [70] Masuda Y., Koumura T., Okawa T., Koumoto K., 2003. Micropatterning of Ni particles on a BaTiO₃ green sheet using a self-assembled monolayer. *Journal of colloid and interface science*, 263(1), 190-195.
- [71] Diao Y., Myerson A. S., Hatton T. A., Trout B. L., 2011. Surface design for controlled crystallization: the role of surface chemistry and nanoscale pores in heterogeneous nucleation. *Langmuir*, 27 (9), 5324-5334.
- [72] C. Chiavari, A. Balbo, E. Bernardi, C. Martini, F. Zanotto, I. Vassura, M.C. Bignozzi, C. Monticelli, 2015. Organosilane coatings applied on bronze: Influence of UV radiation and thermal cycles on the protectiveness. *Progress in Organic Coatings*, 82(2), 91-100.
- [73] Iler R. K., 1979. The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry. John Wiley and Sons, New York, USA.
- [74] Dubois L. H., Nuzzo R. G., 1992. Synthesis, structure, and properties of model organic surfaces. *Annual Review of Physical Chemistry*, 43(1), 437-463.

Ringraziamenti

Questo lavoro è la fine di un percorso fatto di tanti sacrifici e altrettanta passione, di momenti difficili ma anche di immensa gioia. In tutto questo periodo ho sempre avuto il supporto delle persone a me vicine; vorrei dedicare a loro tutti i miei più sentiti e sinceri ringraziamenti.

Desidero innanzitutto ringraziare i miei relatori: il Professore Roberto Pisano per avermi dato la possibilità di poter lavorare e scrivere questa tesi, per la grandissima professionalità e cortesia dimostratemi, e per tutto il supporto nei momenti di bisogno, la Dott.ssa Fiore Artusio per i preziosi insegnamenti e consigli profusi in questi mesi e che terrò molto a cuore, ma soprattutto per l'attenzione e la cura con cui mi ha seguito nella stesura di questo lavoro.

Un ringraziamento speciale ad Andrea, per la sua smisurata gentilezza e disponibilità, e per tutto l'aiuto in laboratorio, alla dolcissima Claudia per i bei momenti passati in laboratorio tra chiacchiere, risate e preziosi consigli.

Ai miei genitori, le persone a cui mi sono sempre ispirato e che con il loro amorevole ed instancabile sostegno mi hanno trasmesso il coraggio e la forza di superare ogni ostacolo, e di avermi fatto arrivare a dove sono ora.

Grazie a mio padre Massimo per avermi cresciuto con affetto e, a tratti, la necessaria severità volta a rendermi una persona forte e consapevole del fatto che solo dimostrando di dare tutto fino all'ultimo respiro l'impossibile diventa possibile; sei la persona che più ammiro e rispetto e non saprò mai come poterti ripagare di tutto ciò che hai fatto per me, se non forse regalandoti quella famosa barca che desideri tanto. Grazie a mio padre Yoshikazu che non mi ha mai fatto mancare niente nonostante tutte le difficoltà e che ancora oggi è il mio migliore amico: so che se avrò bisogno lui ci sarà sempre, te amo molto.

Grazie a mia madre Vera: la donna più forte, incredibile e amorevole che esista in questo mondo: se sono l'uomo che sono oggi lo devo tutto a te, perché ogni mia battaglia è una tua battaglia, ogni mia gioia è una tua gioia, ogni mia sconfitta è una tua sconfitta e l'unico modo di poterti ringraziare è dandoti tutto l'amore del mio cuore, sei tutto per me.

Un grazie speciale alla mia sorellina Winy, per aver sempre creduto in me e per essere sempre stata la sorella che, nei momenti più difficili, ha saputo essere un essenziale sostegno: sei sempre stata al mio fianco e ti voglio un mondo di bene e di amore.

Un grazie alla mia carissima e dolcissima nonna Maria, *vó obrigado por todo o amor e carinho que a senhora me deu, te amo muito.*

Grazie a tutti i membri della mia famiglia che finora non ho direttamente citato, un ringraziamento speciale a mia zia Vani per il suo amore e al mio carissimo fratello Jeto.

Vorrei ringraziare i miei colleghi di corso, Livio e Giuseppe, per questi incredibili due anni, senza di voi non ce l'avrei mai fatta: tra mille difficoltà, sofferenze e paranoie abbiamo sempre combattuto tutti insieme senza mai mollare. Grazie, ragazzi: per tutti i bellissimi momenti e le risate che abbiamo condiviso insieme e che mi mancheranno tantissimo.

Grazie a tutte le persone con cui, in questi anni di università, ho avuto il piacere di condividere momenti piacevoli e straordinari: Fede, Ted, Baggins, Kala, Nik, Anto, Ste, Giuse, Gammo, Jovi, Andre, Oana, Adriana, Irene, Ambra, Irina, il mitico Gio, Mirko, Oussy, Leo, Laura e, dato che questa lista potrebbe essere molto lunga, tutti quelli di cui mi sono dimenticato.

Infine, se ho ringraziato coloro i quali hanno condiviso un pezzo della faticosa strada del politecnico con me, è mio desiderio ringraziare anche gli indimenticabili amici che mi accompagnano da quando questa strada non avevo iniziato a percorrerla: li ringrazio per tutto il supporto che mi hanno dato in questi anni di università e mi scuso per tutte quelle volte in cui ho scelto lo studio piuttosto che una bella bevuta tutti insieme.

Un grazie speciale a Pedrito e Simo, siete dei fratelli per me. Grazie a Pisa e Ines, Bonny, Ale detto "Yamato", Edo, Gubbio, il Gatto, Claudio, Lolo, Amos, tutti gli amici "di zona" e tutti gli altri che, se non sono presenti in questa lista, lo sono sicuramente nel mio cuore, che è pieno di affetto e amicizia nei loro confronti.

