



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale in Scienza dei Materiali

Tesi di Laurea

—
Ca' Foscari
Dorsoduro 3246
30123 Venezia

Polimerizzazione via plasma di film sottili biocompatibili

Relatore

Ch. Prof. Alvisè Benedetti

Correlatore

Dott. Alessandro Patelli

Laureando

Roberto Olivotto

Matricola 824282

Anno Accademico

2011 / 2012

A mia madre ...

Indice

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT | 3 |
| 1 INTRODUZIONE | 4 |
| 1.1 Materiali biocompatibili e loro applicazioni | 4 |
| 1.2 Rivestimenti biocompatibili ottenuti tramite PECVD | 9 |
| 2 LA TECNICA PECVD | 16 |
| 2.1 Cenni di teoria e tecnologia del vuoto | 16 |
| 2.2 Il plasma..... | 20 |
| 2.3 Plasma in regime DC | 25 |
| 2.4 Plasma in radiofrequenza | 28 |
| 2.5 Plasma <i>etching</i> | 30 |
| 2.6 Attivazione superficiale | 31 |
| 2.7 Polimerizzazioni via plasma | 31 |
| 2.8 Modalità pulsata e <i>duty cycle</i> | 35 |
| 3 STATO DELL'ARTE | 38 |
| 3.1 Deposizione di film con funzionalizzazione carbossilica | 38 |
| 3.2 Copolimerizzazione | 47 |
| 3.3 Proprietà dei rivestimenti a funzionalizzazione carbossilica | 49 |
| 4 PROCEDURE SPERIMENTALI | 54 |
| 4.1 Materiali e strumenti | 54 |
| 4.1.1 Substrati | 54 |
| 4.1.2 Precursori e gas di processo | 55 |
| 4.1.3 L'impianto di deposizione PECVD | 55 |
| 4.2 Procedura di deposizione | 57 |
| 4.2.1 Preparazione dei substrati | 57 |
| 4.2.2 Attivazione superficiale | 57 |
| 4.2.3 Deposizione del film | 58 |

| | |
|--|------------|
| 4.3 Procedura di caratterizzazione | 59 |
| 4.3.1 Profilometria | 59 |
| 4.3.2 Misura dell'angolo di contatto | 59 |
| 4.3.3 Spettroscopia FT – IR | 60 |
| 4.3.4 Analisi TBO | 60 |
| 4.3.5 Adesione di oligonucleotidi e anticorpi | 61 |
| 4.3.6 Coltura cellulare | 63 |
| 4.3.7 SEM e AFM | 64 |
| 4.3.8 Ellissometria | 64 |
| 5 RISULTATI..... | 66 |
| 5.1 Studio degli effetti della concentrazione di etilene | 66 |
| 5.2 Studio degli effetti della potenza | 72 |
| 5.3 Studio degli effetti della concentrazione di acido metacrilico | 74 |
| 5.4 Studio degli effetti della concentrazione di ossigeno..... | 77 |
| 5.5 Morfologia del deposito: microscopia SEM e AFM..... | 80 |
| 5.6 Proprietà ottiche del deposito: ellissometria | 84 |
| 5.7 Interazioni biologiche | 85 |
| 5.7.1 Adsorbimento chimico di oligonucleotidi..... | 85 |
| 5.7.2 Adsorbimento chimico di anticorpi..... | 87 |
| 5.7.3 Adesione cellulare..... | 88 |
| 6 CONCLUSIONI..... | 92 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 93 |
| RINGRAZIAMENTI..... | 101 |

Abstract

Sono stati preparati diversi depositi a funzionalizzazione carbossilica, mediante polimerizzazione via plasma di acido metacrilico, variando diversi parametri di processo. I campioni ottenuti sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico–fisico al fine di individuare i parametri atti a controllare le caratteristiche dei film prodotti. Le analisi effettuate comprendono: profilometria, spettroscopia IR, angolo di contatto, ellissometria, microscopia SEM e AFM. Particolare attenzione è stata dedicata al controllo della densità di funzionalizzazione e alla stabilità della stessa al contatto con l'ambiente acquoso. La densità dei gruppi carbossilici, presenti su ogni campione, è stata valutata mediante analisi TBO. Si sono quindi preparate due serie di campioni che sono state caratterizzate dal punto di vista della risposta all'ambiente biologico, tramite adesione di oligonucleotidi di DNA, anticorpi e cellule epiteliali.

1 Introduzione

1.1 Materiali biocompatibili e loro applicazioni

Lo studio, la progettazione e la realizzazione di materiali biocompatibili sono settori in fortissima crescita e costituiscono la base di molti progressi in campo medico. Lo sviluppo di questa disciplina è testimoniato dall'incremento degli addetti ai lavori: una cinquantina di anni fa il numero dei ricercatori impegnati in questo campo era stimabile in poche decine, mentre oggi la ricerca sui materiali biocompatibili è diventata un ramo di ricerca maturo, che costituisce uno dei fondamenti di tutta l'ingegneria biomedica [1]. La crescita del settore è stata accompagnata anche da un aumento del numero e dell'importanza dei testi relativi all'argomento e delle riviste specializzate in questo settore [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10].

Il rapido evolversi delle conoscenze acquisite e delle tecniche utilizzate in questo campo ha causato un'evoluzione del concetto stesso di biomateriale, che ha avuto diverse definizioni:

- *Un Biomateriale è una sostanza inerte, sia nei confronti dell'organismo ospite che dal punto di vista farmacologico, progettata per essere impiantata o incorporata in un sistema vivente.* (6th Annual International Biomaterial Symposium, 1974).
- *Un Biomateriale è una sostanza o una combinazione di sostanze di origine sintetica o naturale, diversa da un farmaco, che può essere impiegata per qualsiasi periodo di tempo da sola o come parte di un sistema, che tratta, aumenta o sostituisce un qualsiasi tessuto organo o funzione del corpo.* (Consensus Conference on the Clinical Applications of Biomaterials, National Institute of Health, Bethesda, USA, 1984).
- *Un Biomateriale è una sostanza non vivente utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con un tessuto vivente.* (European Society of Biomaterials, Chester, UK, 1986).

La definizione di "biomateriale" attualmente più riconosciuta [11] è quella stabilita nel corso della II International Consensus Conference on Biomaterials, tenutasi a Chester (Gran Bretagna) nel 1991:

- *"Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici al fine di valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo".*

Va ricordato comunque che i concetti di biomateriale e di biocompatibilità non devono intendersi come assoluti, ma vanno valutati in base al buon funzionamento in una specifica applicazione; accade così che un dispositivo considerato biocompatibile per un certo utilizzo possa risultare inadeguato o addirittura dannoso se utilizzato in un diverso ambiente biologico o per un diverso scopo.

La classica suddivisione dei materiali in base alla loro composizione è stata a volte adottata anche per quelli dedicati ad applicazioni biologiche e mediche. Rispetto a questo tipo di distinzione, le classi di materiali più importanti in applicazioni biologiche sono rappresentate da:

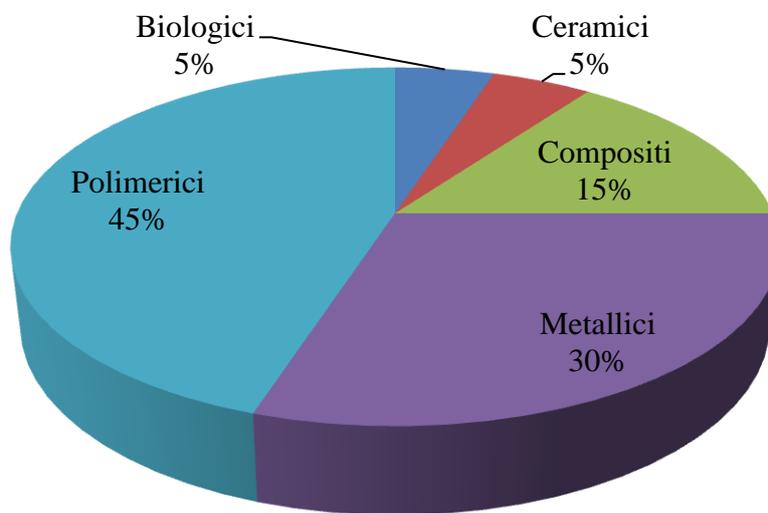


Figura 1: Utilizzo relativo delle varie tipologie di biomateriali [12]

Ognuna delle categorie citate è costituita materiali molto diversi tra loro, ciascuno con le proprie peculiarità, è possibile comunque individuare alcuni pregi, difetti e applicazioni privilegiate comuni ad ogni tipologia di materiale. Una panoramica generale di queste proprietà è riportata in Tabella 1. Le definizioni adottate per il termine biomateriale negli anni più recenti (dal 1986 in poi) mettono in risalto l'importanza del rapporto tra il materiale e l'ambiente biologico; si può notare infatti che viene evidenziato in esse il ruolo chiave giocato dall'interfaccia tra questi due componenti. Questo testimonia come sia maturata, nel tempo, la consapevolezza che l'interfaccia tra materiale e ambiente biologico gioca un ruolo chiave nello stabilire le prestazioni del materiale stesso.

| Materiali | Vantaggi | Svantaggi | Applicazioni |
|---|--|---|---|
| Metallici (acciai, titanio e sue leghe, cobalto e sue leghe). | Elevate caratteristiche meccaniche, resistenza all'usura. | Scarsa biocompatibilità, alta densità, facilità di corrosione in ambiente biologico. | Mezzi di osteosintesi, protesi per ortopedia e odontoiatria. |
| Polimerici (siliconi, poliuretani, polietilene, Acrilati, fluorurati, poliesteri). | Tenacia, bassa densità, facilità di lavorazione. | Bassa resistenza meccanica, degradabilità a lungo termine. | Suture, cateteri, drenaggi, protesi cardiovascolari, cementi per ossa, dispositivi per il trattamento del sangue. |
| Ceramici (ossidi di alluminio, alluminati di calcio, ossidi di titanio, carboni). | Buona biocompatibilità, inerzia chimica, elevata resistenza alla compressione e alla corrosione. | Bassa affidabilità meccanica, bassa resistenza alla trazione impulsiva, alta densità, fragilità, difficoltà di lavorazione. | Protesi d'anca, protesi dentali, dispositivi percutanei. |
| Compositi (metalli rivestiti con ceramici, matrici rinforzate con fibre). | Buona biocompatibilità, inerzia chimica, buone caratteristiche meccaniche, resistenza alla corrosione. | Scarsa coesione tra i componenti, difficoltà di lavorazione. | Protesi valvolari cardiache, protesi del ginocchio. |
| Biologici (vene, pericardio, valvole cardiache). | Ottima biocompatibilità. | Scarsa affidabilità meccanica, difficoltà di trattamento e conservazione. | Protesi vascolari, protesi valvolari, rivestimenti. |

Tabella 1: proprietà generali delle principali classi di biomateriali

Ciò implica che lo studio e l'ingegnerizzazione degli strati superficiali del materiale sono aspetti fondamentali per migliorare i substrati attuali e progettare di nuovi; i trattamenti e i rivestimenti più comuni in questo campo interessano, infatti, spessori che vanno dai pochi nanometri a qualche micron.

I fenomeni che interessano l'interazione tra biomateriale e ambiente biologico possono essere analizzati dal punto di vista di uno dei due componenti nei confronti dell'altro. In questo modo si ottiene una diversa e più interessante classificazione, non più basata sulla composizione, ma sugli effetti prodotti dall'utilizzo di questi materiali.

Osservando gli effetti dell'ambiente biologico sul biomateriale si possono distinguere:

- Materiali biostabili
- Materiali biodegradabili

Osservando gli effetti del biomateriale sull'ambiente biologico si possono distinguere:

- Materiali biotossici
- Materiali bioinerti
- Materiali bioattivi
- Materiali biorisorbibili

Un materiale viene definito biostabile se, all'interno dell'ambiente biologico di destinazione, non subisce nel tempo alterazioni di composizione e struttura. Il termine biodegradabile indica invece un materiale che da tale ambiente viene attaccato, modificato o addirittura scomposto in molecole semplici e bioprocessabili. La biotossicità indica la capacità del materiale di scatenare reazioni negative da parte dell'ambiente biologico, mentre si può definire bioinerte un materiale che svolge il proprio compito senza generare reazioni negative di rilievo. Un materiale bioattivo è in grado di provocare reazioni fisiologiche controllate, mentre un materiale viene definito riassorbibile se si degrada chimicamente all'interno del tessuto che lo ospita, venendo gradualmente assorbito e sostituito dal tessuto stesso. Nella letteratura specializzata si trova spesso questo tipo di terminologia ed è interessante come, tramite la stessa, sia possibile riassumere l'evoluzione del concetto di biomateriale in tre fasi principali, che si caratterizzano per i diversi requisiti considerati necessari da parte di un biomateriale:

1. Biomateriali di prima generazione, il cui requisito fondamentale è di essere *bioinerti*.
2. Biomateriali di seconda generazione, a cui viene chiesto di essere *bioattivi* oppure *bioriasorbibili*.
3. Biomateriali di terza generazione, *bioattivi* e *bioriasorbibili*, essi rappresentano l'oggetto principale della ricerca attuale e futura [13].

Molti materiali biocompatibili utilizzati in passato e alcuni di quelli tuttora in uso non sono stati sviluppati a scopo biomedico, ma sono stati scelti tra quelli già disponibili in commercio, in virtù di alcune loro proprietà, utili a risolvere un problema clinico. Questa ricerca di soluzioni già presenti, offre un vantaggio dal punto di vista della rapidità operativa, ma difficilmente fornisce la risposta migliore alla problematica affrontata, comportando, in alcuni casi notevoli complicazioni [14]. Di conseguenza l'evoluzione della ricerca nel settore ha richiesto sempre più spesso lo sviluppo *ex novo* di soluzioni originali, dotate di caratteristiche più adatte alla destinazione d'uso.

Lo studio necessario a progettare un biomateriale parte dall'osservazione di come si comportano tessuti biologici, singole cellule e biomolecole (tra le quali le proteine giocano un ruolo fondamentale) a contatto con la superficie di un materiale non biologico. È stato infatti osservato che spesso, con l'utilizzo di un materiale artificiale, si ottengono risposte diverse rispetto a quelle riscontrate in ambiente biologico, anche avendo a disposizione composizione e condizioni apparentemente molto simili. La vasta gamma di possibili interazioni in gioco non è stata ancora del tutto compresa, ma è chiaro che, controllando proprietà come composizione chimica, morfologia ed

energia della superficie dei materiali utilizzati, è possibile influenzare le reazioni biologiche in applicazioni *in vitro* e *in vivo* [15].

Tra le possibili reazioni ottenibili in seguito ad un'adeguata preparazione superficiale, lo sviluppo di *adesione cellulare* costituisce un'importante traguardo, essendo alla base della possibilità della realizzazione di colture cellulari, dell'integrazione con l'organismo ospite di apparecchi impiantati e di altre importanti applicazioni. Ci sono due tipi di adesione cellulare: quella che si stabilisce tra cellula e cellula, grazie a sistemi di giunzione di vario genere [16] e quella tra cellula e la matrice extracellulare che funge da struttura di crescita del tessuto. In sistemi di coltura cellulare *in vitro* o di tipo protesistico, il ruolo svolto dalla matrice extracellulare è a carico di un substrato solido, definito biomateriale. Per quanto riguarda il fenomeno di adesione tra cellula e substrato, è stato osservato che tale fenomeno è sempre preceduto dall'adsorbimento di proteine sul substrato. Lo scopo principale della superficie del biomateriale è quindi quello di adsorbire nel modo corretto le proteine responsabili della successiva adesione cellulare, mediata da molecole come le integrine che coinvolgono complessi meccanismi, visibili in Figura 2, di cui non verrà analizzato il dettaglio

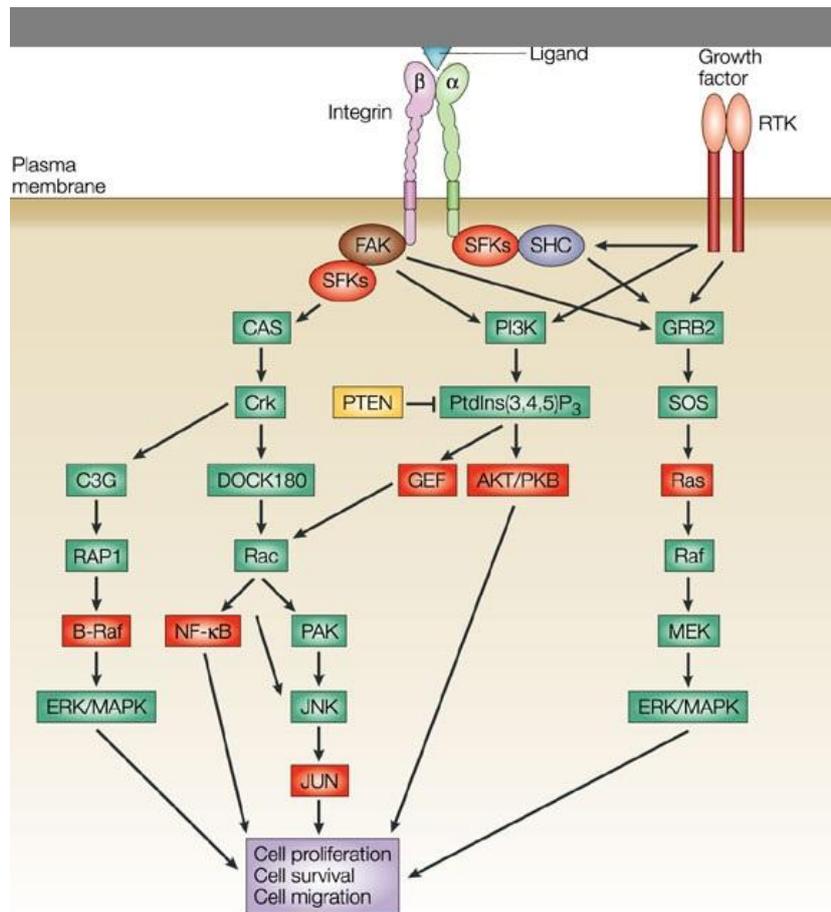


Figura 2: Meccanismo di adesione cellulare ad un substrato solido ed relativi effetti biologici [17]

Si può ottenere ancoraggio di recettori chimici attraverso diversi fenomeni, tra i quali i più comuni sono l'adsorbimento fisico su di una superficie solida, l'adesione chimica tramite legami covalenti, la formazione di legami per affinità specifica (chimica o fisica) di specie a contatto e l'intrappolamento tramite una matrice. Tra questi fenomeni quello che fornisce il legame più solido e più controllabile è senza dubbio il legame chimico covalente. Molecole biologiche fondamentali, tra cui le proteine, presentano spesso diversi gruppi funzionali in grado di formare legami chimici. Tra questi alcuni dei più comuni sono i gruppi di tipo amminico, carbossilico, fenolico, aldeidico e idrossido. Il substrato deve quindi assicurare una funzionalizzazione complementare, avente composizione, morfologia e stabilità perfettamente controllate, ma risulta molto difficile soddisfare tutte queste richieste insieme ai requisiti di natura meccanica ed economica richiesti dall'applicazione del biomateriale. La risposta più comune e più efficace a questo problema è l'utilizzo di due materiali diversi per il corpo principale del materiale (spesso definito materiale di *bulk*) e la superficie del biomateriale. In primis va effettuata la scelta di un materiale di *bulk* avente caratteristiche fisiche adatte, tra cui geometria, densità, carico di rottura e modulo elastico. Tale materiale influenza anche la possibilità e le prestazioni dei trattamenti successivi [18] e va quindi scelto anche in funzione dello stato di superficie da ottenere. Una volta formato e preparato il materiale di *bulk*, questo può essere trattato con tecniche che vadano a modificarne la superficie (come l'impianto ionico o la diffusione termica), oppure si può depositare su di esso un film che presenti le caratteristiche superficiali desiderate e che resti ad esso aderente. Questo secondo approccio risulta particolarmente promettente ed è stato quello seguito nello svolgimento di questo lavoro di tesi.

1.2 Rivestimenti biocompatibili ottenuti tramite PECVD

Il primo incontro tra scienze biologiche e tecniche di generazione di plasmi fu probabilmente negli anni '50, in occasione del celebre esperimento in cui Stanley Miller ricostruì un'atmosfera come quella probabilmente presente nelle prime fasi dell'evoluzione terrestre, rappresentata da una miscela di componenti inorganici come metano, ammoniaca, idrogeno e vapor acqueo. L'esperimento dimostrò che, in tale ambiente, l'innescò di forti scariche elettriche, capaci di ionizzare il gas e scatenare meccanismi di reazioni tipici della chimica dei plasmi, può generare semplici molecole biologiche, come gli aminoacidi [19][20].

La progettazione di questo esperimento si basò sulla conoscenza delle capacità di sintesi e ricombinazione molecolare dei plasmi, le cui prime osservazioni risalgono al 1796 [21] e la prima

applicazione al 1863, con la sintesi dell'acetilene tramite arco elettrico da parte di M. Berthelot [22].

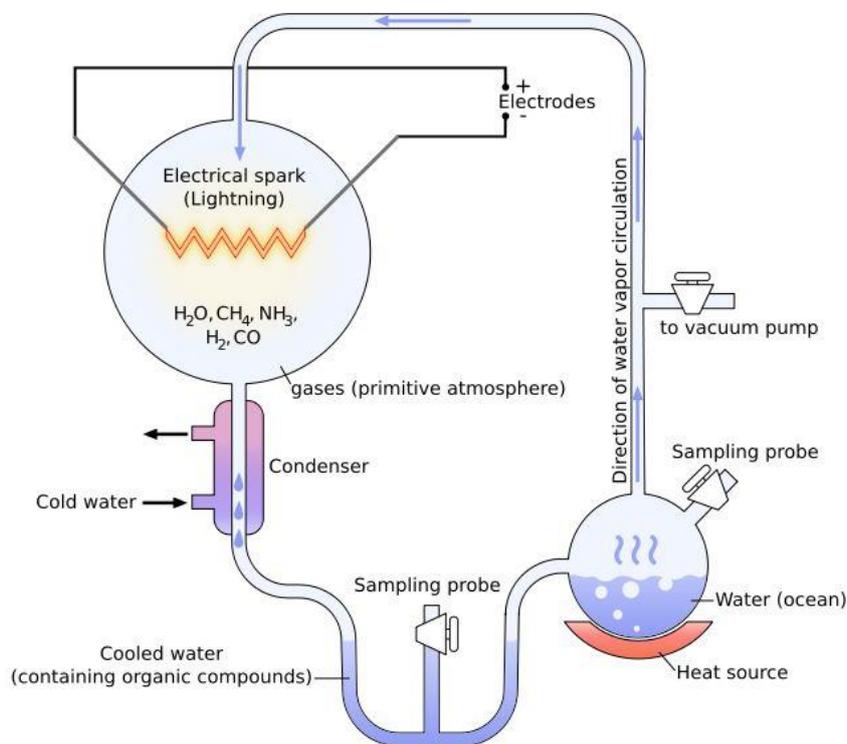


Figura 3: Schema dell'apparato sperimentale utilizzato da Miller

La tecnica PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition) sfrutta in pieno le potenzialità della chimica dei plasmi ed è caratterizzata da una notevole versatilità. Essa permette, variando reagenti utilizzati, detti precursori, e i parametri di processo, di ottenere una vasta gamma di film di diversa composizione e morfologia. Tramite questa tecnologia è possibile ottenere, su substrati di ogni tipo e a bassa temperatura, rivestimenti e trattamenti funzionali ad elevate prestazioni, potendo contare su una riproducibilità elevata e un'affidabilità molto buona. Grazie a queste caratteristiche e alla buona eco sostenibilità dei processi PECVD, questa tecnica trova largo impiego in diversi settori produttivi [23].

La natura della tecnica, che lavora a bassa temperatura e su strati superficiali, permette di rispettare la morfologia e le proprietà del materiale di bulk, che può quindi essere preparato senza particolari requisiti, tranne quello di poter essere trattato in medio vuoto. Una panoramica delle potenzialità di questa tecnica è visibile in Tabella 2.

| Tipo di film | Gruppo funzionale caratteristico | Monomeri utilizzabili come precursori | Proprietà del film |
|-------------------------|--|--|---|
| Carbossilici | -COOH | Acido acrilico, acido metacrilico | Acido, fornisce adesione cellulare e ritenzione proteica |
| Idrossido | -OH | 2-propenolo, alcol isopropilico | Fornisce adesione cellulare e ritenzione proteica |
| Aldeidici | -CHO | Acetaldeide, capronaldeide | Fornisce adesione cellulare e ritenzione proteica |
| Amminici | -NH ₂ | Allilammina, eptilammina | Basico, fornisce adesione cellulare e ritenzione proteica |
| PEO ¹ - like | -CH ₂ - CH ₂ - O - | CH ₃ O(CH ₂ CH ₂ O) _n CH ₃ (n=2 - 4) | Fornisce repellenza a cellule e proteine. |
| Teflon - like | CF _x | Fluorocarburi con o senza H ₂ | Idrofobico, inerte, scivoloso, liscio o a isole. |
| Silice - like | SiO _x | Silossani con O ₂ | Idrofilico, duro, antigraffio, trasparente, effetto barriera ai gas, protettivo contro la corrosione. |
| Silicone - like | SiC _x H _y O _k | Silossani (HMDSO ² , TEOS ³ ecc.) | Idrofobico. |
| DLC ⁴ | CH _x | Idrocarburi (CH ₄ ecc.) | Molto duro, inerte. |
| Nanocompositi | Clusters nanometrici in una matrice PECVD | Trattamenti PECVD accoppiato con PVD ⁵ o con clusters metallici/ceramici. | Effetto catalitico (es. Pt), antibatterico (Ag, Cu, Zn) ecc. |

Tabella 2: Esempi di films ottenibili mediante la tecnica PECVD[15]

L'utilizzo di questa tecnica è diventato molto comune anche nella preparazione di superfici destinate al contatto con ambienti biologici, come testimoniato dall'abbondanza degli articoli scientifici pubblicati a riguardo. Gli studi meno recenti sono stati spesso rivolti alla preparazione di superfici, film e polimeri destinati al contatto diretto con l'ambiente biologico, cercando di ottenere le reazioni desiderate in modo diretto. La maggior parte dei lavori di ricerca più recenti è volta, invece, ad ottenere superfici da utilizzare come strati di adesione per molecole che a loro volta

¹ Polietilen ossido

² Esametildisilossano

³ Tetraetossisilano

⁴ DLC = Diamond - like carbon

⁵ Physical vapour deposition

andranno a generare la risposta biologica voluta [24]. Gli approcci utilizzati sono diversi e le caratteristiche dei film ottenuti ricoprono un ampio spettro, ma i risultati più interessanti, come anticipato, sono legati all'immobilizzazione tramite legami covalenti di proteine o altre molecole bioattive. I film più studiati a questo scopo sono quelli a carattere carbossilico, idrossido, amminico e aldeidico. Il primo tipo di funzionalizzazione sarà oggetto di questo studio e sarà trattato nel dettaglio in seguito.

La preparazione dei film avviene mediante complessi meccanismi di polimerizzazione via plasma che sono stati studiati fin dagli anni '30 [25], ma che devono ancora essere del tutto compresi. Insieme alla polimerizzazione avviene sempre anche un meccanismo di erosione (*etching*) dovuto al bombardamento ionico cui è sottoposto il campione. Il plasma, come noto, genera inoltre un irraggiamento elettromagnetico anche nello spettro ultravioletto, che fornisce una sterilizzazione intrinseca dei campioni preparati ed è particolarmente gradita in applicazioni biomediche.

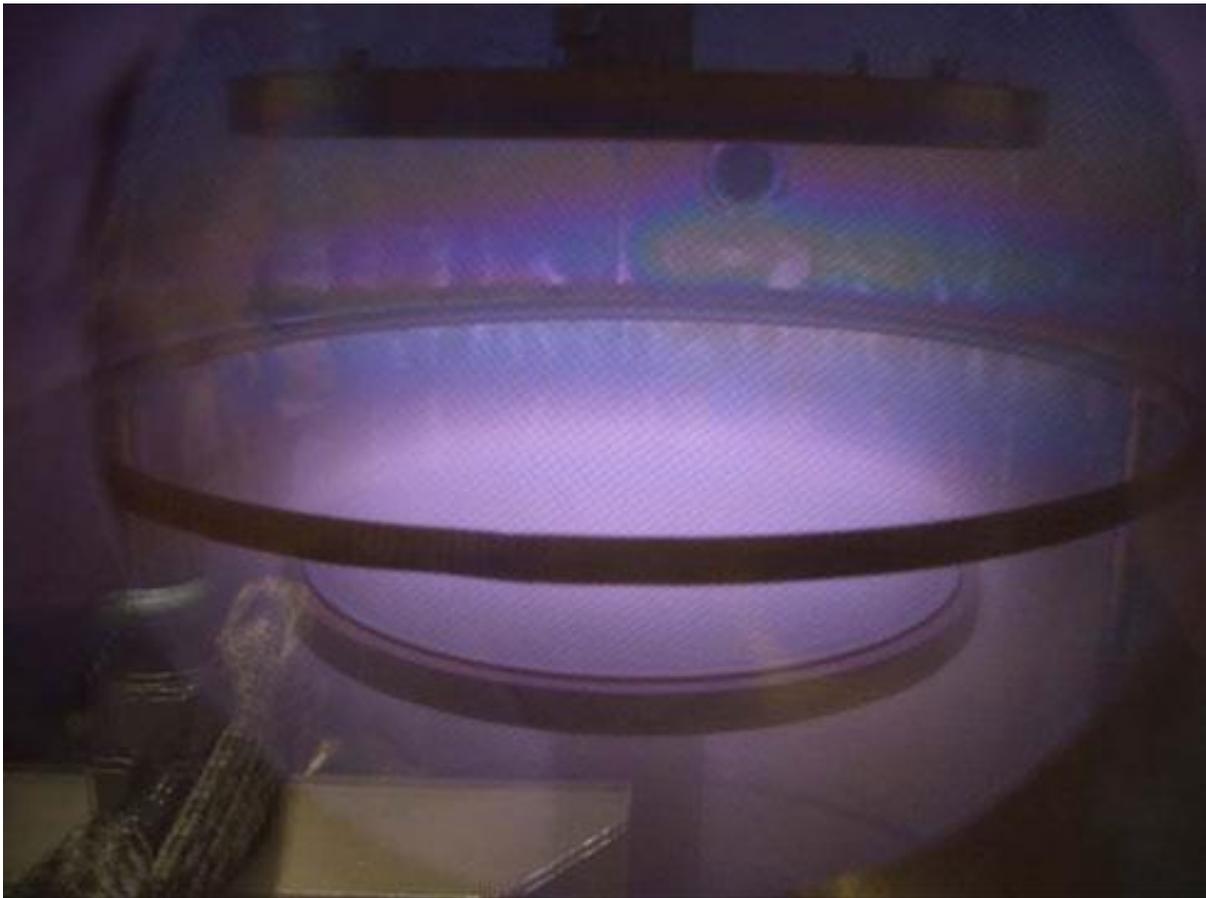


Figura 4: Aspetto tipico di un plasma contenente ossigeno [26]

Oltre a quelle elencate in Tabella 2, le specie chimiche più comunemente utilizzate in questi processi sono gas come Ar, N₂, O₂ ed NH₃. L'inconveniente maggiore di questa tecnica è l'elevata energia presente nel plasma capace di frantumare le molecole dei monomeri causando scissioni omolitiche con conseguente presenza di radicali, frammenti a basso peso molecolare e notevole differenziazione dei gruppi presenti nel film rispetto a quelli posseduti dai precursori utilizzati [27]. Varie soluzioni sono state adottate per limitare questo fenomeno, come l'utilizzo di plasmi a bassa potenza o l'utilizzo di plasmi in modalità pulsata e altre tecniche ideate *ad hoc* per ogni singola applicazione. I risultati ottenuti sono incoraggianti ed il controllo della composizione chimica degli strati depositati con questa tecnica ha portato miglioramenti nell'adesione cellulare, nella diffusione cellulare seguente e nella funzionalità delle biomasse ancorate a tali film [28]. I requisiti più importanti per ottenere un buon ancoraggio di molecole bioattive sono:

- Il legame deve essere di tipo covalente in modo da rimanere stabile durante tutta la vita utile del materiale, senza venire rimosso dalle interazioni con l'ambiente biologico. In questo ambito la resistenza in ambiente acquoso gioca un ruolo fondamentale.
- Il substrato deve essere in grado di legare la molecola bioattiva utilizzando gruppi presenti in essa, che siano stericamente lontani dalla zona biologicamente attiva di essa.
- Il sito attivo della biomolecola deve, dopo l'ancoraggio al substrato, essere affacciato verso l'ambiente biologico.
- Il legame di ancoraggio deve essere specifico verso i gruppi desiderati della molecola bioattiva.
- L'ancoraggio non deve denaturare o indurre cambiamenti conformazionali che inibiscano la funzione della molecola bioattiva.

A volte è possibile utilizzare molecole spaziatrici per evitare la denaturazione [29] o per evitare un eccessivo ingombro sterico, che comprometterebbe la funzionalità della biomolecola [30]. Attraverso opportuni accorgimenti è possibile controllare, oltre alla composizione, altre caratteristiche del deposito. Ad esempio la distribuzione dei gruppi funzionali depositati può essere controllata localizzando il plasma e i flussi dei precursori, il meccanismo di crescita del film può essere variato in modo da ottenere depositi lisci, rugosi, a isole, si possono utilizzare maschere per ottenere depositi con geometrie particolari. Le proprietà come idrofilia, idrofobia ed carica superficiale contribuiscono a definire densità e orientamento delle proteine adsorbite al film.

In Figura 5 è illustrata la morfologia di due ricoprimenti a funzionalizzazione carbossilica ottenuti durante lo svolgimento del lavoro di tesi. Nell'immagine a sinistra è visibile, a 5000 ingrandimenti

sia la zona depositata sia il substrato di silicio (rispettivamente a sinistra e a destra), mentre nell'immagine a destra è visibile un dettaglio (25000x) del deposito. Si può notare un'elevata compattezza, assenza di difetti e aspetto estremamente liscio dei depositi ottenuti.

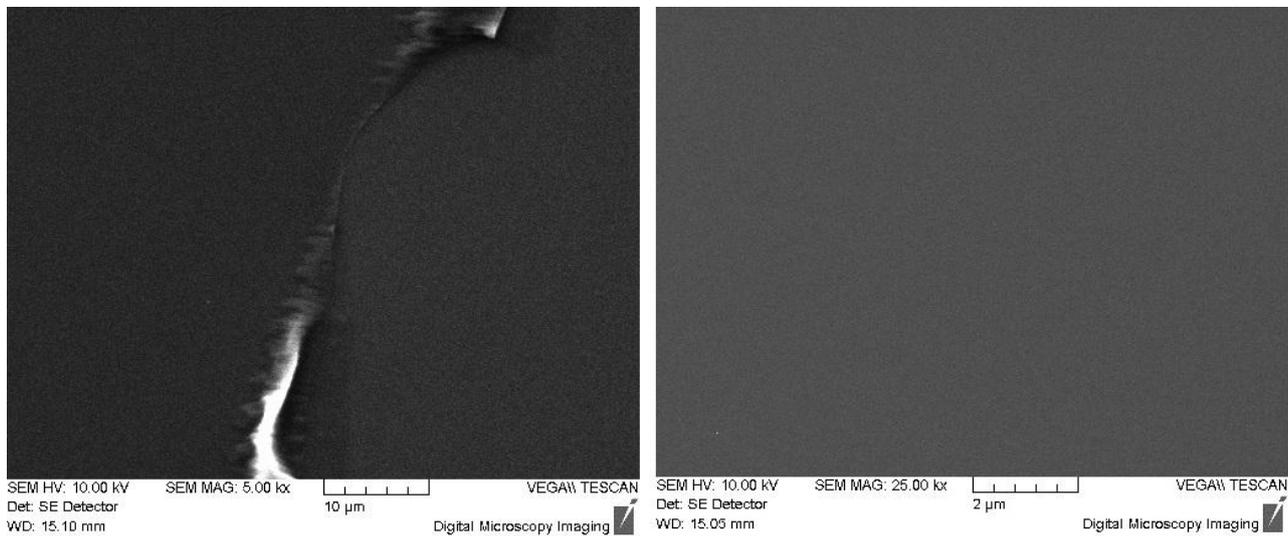


Figura 5: Micrografie SEM ad elettroni secondari di film carbosilici preparati tramite PECVD

Esempi di applicazioni commerciali in cui sono stati utilizzati trattamenti al plasma per ottenere superfici idrofiliche stabili nel tempo sono lenti a contatto siliconiche adatte all'uso prolungato e piatti per colture cellulari in polistirene. Particolare attenzione è richiesta per ottenere stabilità del film all'ambiente acquoso perché spesso la bassa potenza richiesta per ottenere la composizione chimica voluta rischia di compromettere la stabilità e l'adesione del film, specialmente in ambiente acquoso. I depositi ottenuti in condizioni altamente energetiche invece si presentano spesso lisci, ben adesi al substrato, ben reticolati, privi di difetti puntiformi, detti *pinholes*, e scarsamente dilavabili.

Infine si ricorda che, oltre all'adesione cellulare, i depositi e i trattamenti ottenuti tramite PECVD si possono prestare anche ad altri scopi, anche opposti come nel caso dei rivestimenti teflon – like e PEO – like, che hanno ottime proprietà anti adesive nei confronti di unità biologiche. Plasmi a base di ossigeno sono utilizzati in molte applicazioni con scopo decontaminante e sterilizzante, anche grazie alle radiazioni UV generate dal plasma. Plasmi atmosferici, applicati direttamente su tessuti viventi, sono oggetto di studio per ottenere metodi di sterilizzazione di pelle, ferite e per la cura delle ferite stesse, nonché per terapie oncologiche, dando origine al campo della *medicina dei plasmi*.

In questo lavoro di tesi si è cercato di sfruttare le potenzialità della tecnica PECVD per ottenere substrati a funzionalizzazione carbossilica, resistenti all'ambiente acquoso, a concentrazione controllata di gruppi funzionali. I campioni preparati sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico – fisico ed è stata valutata la loro capacità di generare diverse risposte da parte di sistemi biologici tramite prove di adesione cellulare e valutando la densità di oligonucleotidi di DNA e di anticorpi capaci di legarsi al substrato.

2 La tecnica PECVD

2.1 Cenni di teoria e tecnologia del vuoto

Il termine vuoto, in scienza, è utilizzato con due diversi significati:

- Il concetto teorico di assenza di materia
- Una regione dello spazio occupata da aeriformi a pressione minore di quella atmosferica

La prima accezione del termine ha avuto un'interessante sviluppo storico, essendo stato un concetto affrontato diffusamente già da Aristotele [31], venendo poi ripreso da vari autori, per assumere infine aspetti particolarmente interessanti con i modelli atomici più moderni (da Rutherford [32] in poi) e con la teoria quantistica dei campi. Il secondo significato attribuito al termine "vuoto" ha, invece, connotazione prettamente tecnologica ed è quello a cui faremo riferimento in questo lavoro di tesi. Più in particolare ci riferiremo a diversi "tipi" di vuoto [33] per indicare intervalli di pressione distinti, come è riportato in Tabella 3.

Le deposizioni ottenute mediante tecnica PECVD nella parte sperimentale di questa tesi, sono tutte state effettuate in "vuoto medio", tra i 5 e i 7 Pa.

| Caratteristica | Unità di misura | Basso vuoto | Vuoto medio | Alto vuoto | Ultra-alto vuoto |
|-----------------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| Pressione | [Pa] | $10^5 - 10^2$ | $10^2 - 10^{-1}$ | $10^{-1} - 10^{-5}$ | $< 10^{-5}$ |
| Densità numerica di particelle | $[\text{cm}^{-3}]$ | $10^{19} - 10^{16}$ | $10^{16} - 10^{13}$ | $10^{13} - 10^9$ | $< 10^9$ |
| Libero cammino medio | [cm] | $< 10^{-2}$ | $10^{-2} - 10$ | $10 - 10^5$ | $> 10^5$ |
| Tempo di formazione del monolayer | [s] | $< 10^{-5}$ | $10^{-5} - 10^{-2}$ | $10^{-2} - 10^2$ | $> 10^2$ |
| Tipo di flusso | | Viscoso | "di Knudsen" | molecolare | molecolare |

Tabella 3: Intervalli di pressione tipici della tecnologia del vuoto

La forte spinta al miglioramento delle tecnologie da vuoto è derivata da esigenze puramente scientifiche ma anche e soprattutto da precise richieste di alcuni settori della di produzione. Le tecniche di produzione del vuoto si applicano, infatti, ad un grande numero di impianti con scopi e

necessità di livello di vuoto anche molto diversi come appare, a titolo d'esempio, nella Tabella 4 [34].

| Applicazione | Pressione richiesta (Pa) |
|---|--------------------------|
| Preparazione di film sottili | $10^{-1} - 10^{-8}$ |
| Simulazione spaziale | $10^5 - 10^{-4}$ |
| Tubi elettronici (cinescopi, valvole termoioniche, collettori solari) | $10^{-1} - 10^{-6}$ |
| Metallurgia (fusioni e leghe sotto vuoto, metallizzazione, ecc.) | $10^5 - 10^{-1}$ |
| Macchine acceleratrici di particelle | $10^{-4} - 10^{-11}$ |
| Fisica dei plasmi e macchine per fusione nucleare | $10^{-5} - 10^{-8}$ |
| Studio di superficie (struttura, composizione) | $10^{-4} - 10^{-9}$ |
| Liofilizzazione | $10^1 - 10^{-1}$ |
| Isolamento termico | $10^{-1} - 10^{-3}$ |

Tabella 4: Livelli di vuoto richiesti per alcune applicazioni

La produzione del vuoto è legata agli effetti che tale ambiente produce sui componenti situati al suo interno, le proprietà de vuoto di maggiore interesse tecnologico sono:

- Il rallentamento o virtuale sospensione dei processi chimico – fisici (tra cui quelli corrosivi) legati alla presenza di gas atmosferici. Tale effetto è particolarmente utile nelle tecniche che utilizzano, insieme al vuoto, elevate temperature.
- L'inibizione dei processi di decomposizione legati ad agenti aerobici (imballaggio e confezionamento sotto vuoto).
- Aumento considerevole del libero cammino medio di molecole allo stato gassoso o di vapore, per consentire alle stesse il raggiungimento di siti voluti senza interazioni con altre molecole (ad esempio nei processi PVD e negli acceleratori di particelle).
- Incrementare l'isolamento termico eliminando le componenti conduttive e convettive della trasmissione del calore.
- Degasaggio e deidratazione dei materiali e delle superfici sottoposti a vuoto.
- Capacità di simulazione di ambienti in assenza di atmosfera, utili nelle applicazioni spaziali.

I dispositivi utilizzati per produrre il vuoto prendono il nome di pompe da vuoto, anche nel caso di dispositivi non comunemente associati al termine, come nel caso delle pompe criogeniche. Si ricorda che la pressione finale ottenuta è funzione delle pompe utilizzate, ma anche dei condotti in cui scorre il gas evacuato, delle dimensioni e della tenuta dei sistemi di guarnizione della camera. Tra le molteplici tipologie di pompe da vuoto esistenti si riporta breve descrizione di quelle in dotazione all'apparecchiatura sperimentale utilizzata. L'impianto PECVD di Nanofab è equipaggiato con una pompa primaria a vite, destinata a portare la pressione da quella atmosferica a pochi Pa. Ad essa è collegabile, in serie, una pompa *roots* o una pompa turbo molecolare, con le quali è possibile raggiungere pressioni inferiori al Pa. Le caratteristiche di questi tre tipi di pompa sono qui brevemente illustrati.

La pompa a vite comprime ed espelle il gas grazie alla riduzione del volume dello stesso, forzata dall'azione della viti a passo variabile presenti in questo tipo di pompa. Tali viti ruotano su due assi paralleli, senza entrare in contatto, ma con tolleranze molto ridotte che richiedono una precisa sincronizzazione del movimento, legata alla precisione meccanica degli elementi elicoidali e degli ingranaggi che li muovono. La compressione del gas rende necessario un sistema di raffreddamento, come visibile in Figura 6. Il vuoto finale prodotto da queste pompe dipende dal numero di eliche nella vite dalle tolleranze tra le eliche e tra esse e lo statore.

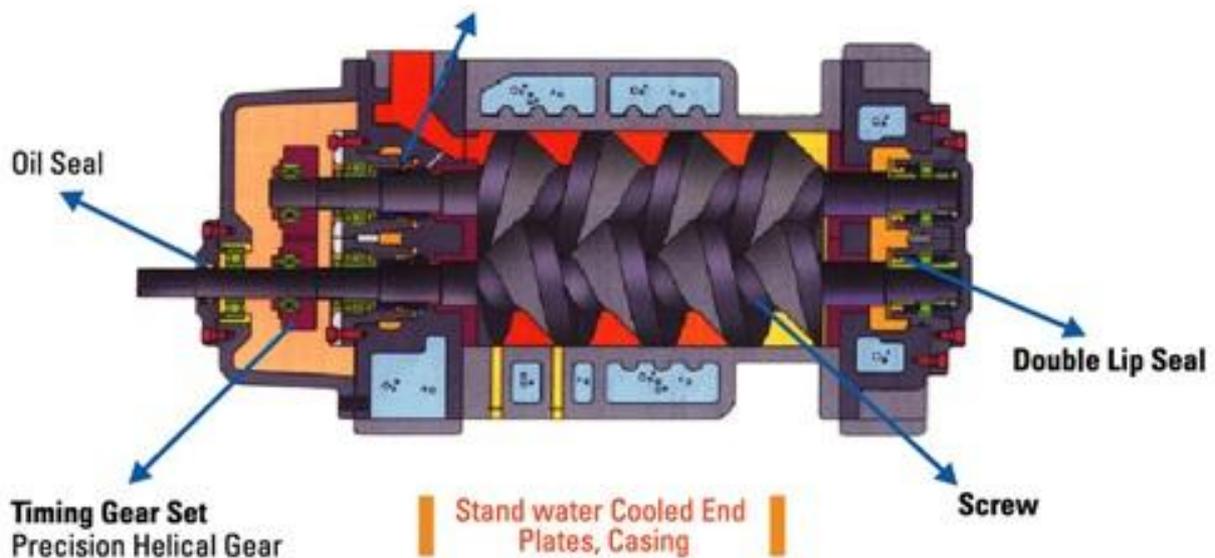


Figura 6: Schema di una pompa a vite [35]

La *roots* è una pompa a spostamento di parete, che sposta un volume di gas per effetto della rotazione di due lobi sagomati rotanti, visibili in Figura 7. Questo tipo di pompe viene utilizzato per aumentare le prestazioni della pompa primaria a cui esse sono collegate. Anche in questo caso le prestazioni sono legate alle tolleranze dimensionali della camera e dei lobi della pompa.

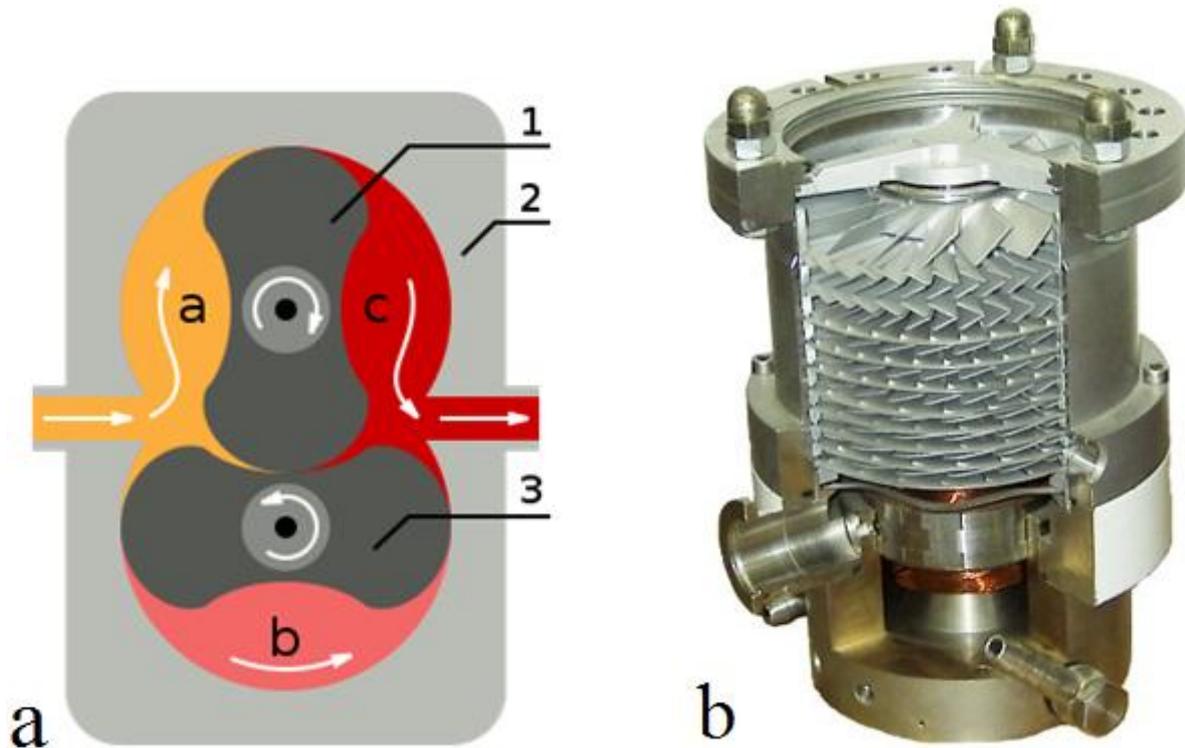


Figura 7: Schema di funzionamento di una pompa roots (a) e immagine di una pompa turbomolecolare (b)

La pompa turbomolecolare si basa sul principio di trasferimento di energia cinetica dalle palette, in rapida rotazione, alle molecole del gas da evacuare. Vengono raggiunte velocità di rotazione dell'ordine di 10^4 giri al minuto e velocità periferica della pala di 300 m/s. Il sistema è costituito da una serie di palette, controrotanti a coppie, di inclinazione e direzione variabili lungo la sezione della pompa (Figura 7). Si tratta di una pompa prettamente secondaria, che necessita di un vuoto primario medio o superiore, e permette, in alcuni dispositivi, di arrivare a pressioni finali dell'ordine di 10^{-7} Pa, con una velocità di pompaggio costante a tutte le pressioni di utilizzo. Questo modello di pompa garantisce, al contrario della pompa rotativa, la totale assenza di inquinamento del vuoto, data l'assenza di olio, infatti anche la riduzione degli attriti meccanici è ottenuta senza l'ausilio di lubrificanti, essendo affidata a un sistema di cuscinetti magnetici.

2.2 Il plasma

Il termine “plasma” deriva dal greco $\pi\lambda\alpha\sigma\mu\alpha$, che significa sostanza modellabile. Il termine venne utilizzato inizialmente solo per indicare la componente liquida e trasparente del sangue già dagli inizi dell’800. Fu il premio nobel Irving Langmuir il primo ad utilizzare questo termine nel campo della fisica, nel 1927, col significato di seguito riportato.

Un plasma è un gas parzialmente ionizzato, contenente un ugual numero di particelle cariche positivamente e negativamente, e da particelle neutre [36]. Esso risulta quindi neutro nel suo complesso ma non lo è a livello locale; il suo contenuto di particelle cariche conferisce proprietà distinte da quelle di un gas e identifica il plasma come il quarto stato della materia. A dispetto della scarsa familiarità con questo elemento esso costituisce la stragrande maggioranza della materia visibile nell’universo, essendo il componente principale di stelle e nubi interstellari. Gli insiemi delle particelle positive e di quelle negative, presenti nel plasma, possono essere considerati come due fluidi tra i quali si esercitano forti interazioni elettrostatiche che inducono uno stato di neutralità su scala macroscopica. L’unità di misura di riferimento delle lunghezze, in un plasma, è la *lunghezza di Debye* λ_D :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 k_B T}{n_e e^2}} \quad (2.1)$$

In cui ϵ_0 è la costante dielettrica del vuoto, k_B è la costante di Boltzmann, T la temperatura elettronica in K, n_e la densità elettronica ed e la carica elementare.

Il valore di λ_D è definito considerando solo il contributo elettronico, visto che il contributo ionico è trascurabile essendo la mobilità elettronica maggiore di almeno tre ordini di grandezza rispetto a quella ionica. La *lunghezza di Debye* esprime la distanza tipica entro la quale il plasma riesce ad “annullare”⁶ l’effetto di un campo elettrico esterno [37] e rappresenta la misura di lunghezza caratteristica di un plasma.

⁶ Attenuare di un fattore pari a $\frac{1}{e}$.

La Frequenza di plasma, definita come:

$$\omega_p = \sqrt{\frac{n e^2}{m \varepsilon_0}} \quad (2.2)$$

rappresenta invece la scala temporale caratteristica dei plasmi. Essa corrisponde alla frequenza tipica di oscillazione della densità di carica di una data specie, dovuta alle forze elettrostatiche che si generano in seguito ad una piccola separazione di carica imposta dall'esterno.

Come appare chiaro dalla formula, questa frequenza dipende dalla particella considerata, a causa della dipendenza dalla massa e dalla carica della stessa. Il termine massa compare al denominatore, perciò la frequenza di plasma ionica è molto inferiore a quella elettronica e l'effetto di schermaggio risulta quindi principalmente a carico degli elettroni. Quest'ultima caratteristica è il motivo per cui con la locuzione "frequenza di plasma" viene indicata la frequenza di plasma elettronica, se non diversamente specificato.

Ci sono due tipi di plasma di utilizzo tecnologico: i plasmi "caldi", utilizzati nella fusione nucleare e i plasmi freddi che si suddividono in categorie in base alla pressione a cui vengono innescati. In un plasma "caldo" le diverse popolazioni presenti nel plasma, quali elettroni, ioni e gas neutro, sono in equilibrio termico, in un plasma freddo invece non si è in presenza di equilibrio termodinamico e solo gli elettroni hanno una elevata temperatura, definita in termini di energia cinetica:

$$T = \frac{mv^2}{3k_B} \quad (2.3)$$

Tale espressione della temperatura è stata ricavata semplicemente uguagliando l'energia cinetica a quella termica e viene detta perciò *temperatura cinetica*. A parità di carica, un elettrone e uno ione subiscono la stessa forza elettrostatica dal campo e data la massa molto maggiore dello ione ne deriva una accelerazione molto minore per esso, da cui una velocità altrettanto inferiore. Risulta quindi che la *temperatura cinetica* elettronica è molto superiore a quella ionica e questa differenza risulta, in alcune applicazioni, dell'ordine di grandezza di 10^4 K [38]. Nei plasmi caldi le temperature si riequilibrano grazie alle interazioni (urti) tra le diverse popolazioni. In vuoto invece

questa situazione di equilibrio non è possibile in virtù della difficoltà di trasferimento dell'energia elettronica ad altre componenti del plasma. Questo fenomeno è legato all'elevato cammino libero medio delle particelle condizioni di bassa pressione. In plasmi di tipo *glow discharges*, come quelli utilizzati nella parte sperimentale di questo lavoro, i dati sperimentali indicano temperature elettroniche di circa 23.000 K e temperature ioniche intorno ai 500 K. Tali temperature corrispondono a energie di 2 eV e 0.04 eV, rispettivamente. Le particelle neutre, che costituiscono la grande maggioranza del gas di processo, hanno temperature pari a quella ambientale, sotto ai 300 K. Quest'ultima caratteristica, insieme alla possibilità di trattare materiali termolabili senza indurre alterazioni, è all'origine del nome *plasma freddo*.

Per generare ionizzazione in un gas è necessaria una fonte di energia, essa è fornita, nei plasmi coinvolti nei processi PECVD e in molte altre applicazioni, tramite un intenso campo elettrico.

Tale campo agisce sugli elettroni (e ioni) liberi accelerando queste particelle cariche. Gli elettroni accelerati risultano molto energetici e possono collidere con molecole neutre del gas, ionizzandole, liberando così altri elettroni in un processo a catena. Questo processo sostiene l'accensione del plasma, generando anche fenomeni di eccitazione elettronica, consistenti nella promozione di elettroni in stati ad elevata energia.

Per sostenere il plasma sono necessarie collisioni all'interno del gas, perciò la distanza tra gli elettrodi d , il potenziale minimo di accensione del plasma V_{min} e la pressione del gas p sono legati tra loro. La relazione che esprime questa dipendenza è la legge di Paschen:

$$V_{min} = \frac{B p d}{\ln\left(\frac{A p d}{\ln \gamma^{-1}}\right)} \quad (2.4)$$

Dove A, B sono coefficienti empirici relativi al gas utilizzato e γ è il coefficiente di emissione di elettroni secondari. Per aria alla pressione di 1 Pa, l'andamento di V_{min} in funzione di d è quello illustrato in Figura 8.

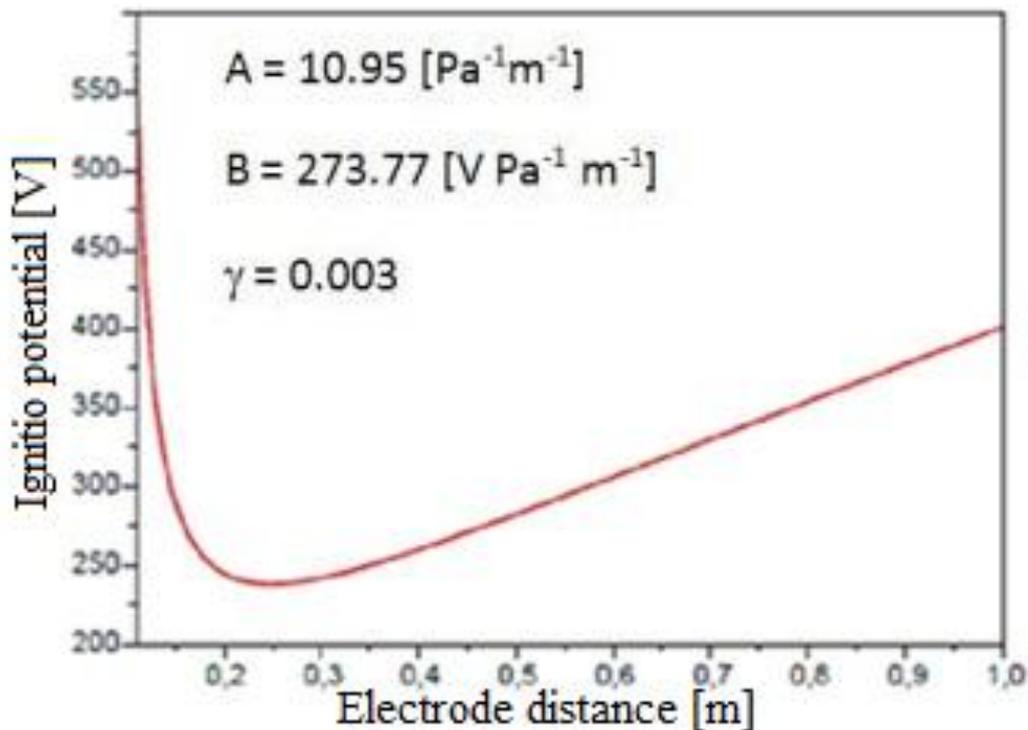


Figura 8: Andamento del potenziale di accensione di un plasma in funzione della distanza tra gli elettrodi

In regime stazionario i fenomeni di ionizzazione ed eccitazione devono avvenire con la stessa velocità dei processi inversi, rispettivamente di ricombinazione e rilassamento.

Questi fenomeni giocano un ruolo fondamentale nel determinare le proprietà del plasma e possono essere riassunti ed esemplificati in:

- Ionizzazione: $e^- + Ar \longrightarrow 2e^- + Ar^+$
- Ricombinazione: $e^- + Ar^+ \longrightarrow Ar$
- Eccitazione: $e^- + Ar \longrightarrow e^- + Ar^*$
- Rilassamento: $Ar^* \longrightarrow Ar + h\nu$
- Dissociazione: $e^- + CF_4 \longrightarrow CF_3^+ + F + 2e^-$

L'ultimo fenomeno descritto, di cui è stato dato solo un esempio dei molteplici meccanismi possibili, è alla base delle interessanti proprietà chimiche dei plasmi.

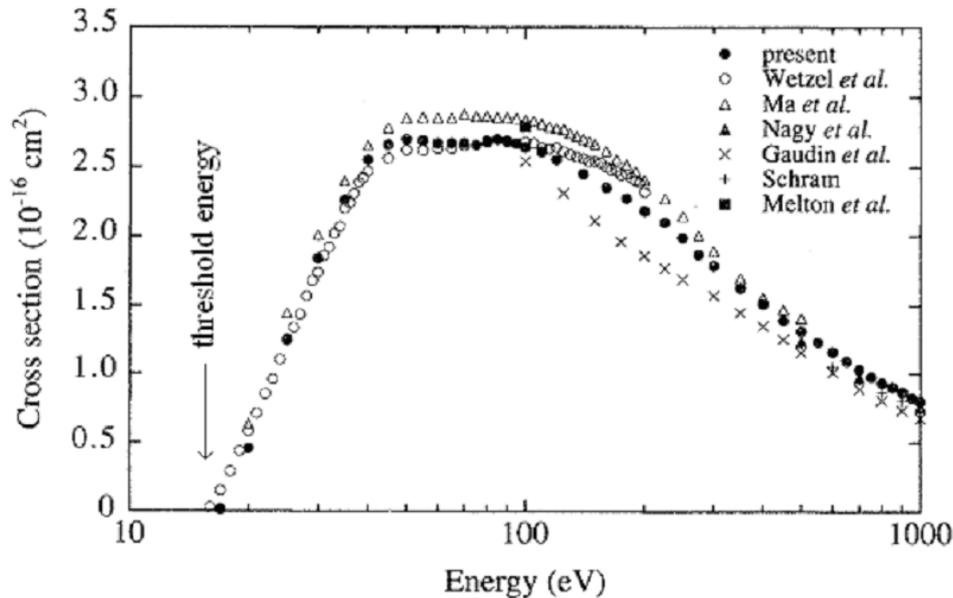


Figura 9: Andamento della sezione d'urto totale per il fenomeno di ionizzazione di atomi di argon, a causa di collisione di elettroni[38]

Lo sviluppo della tecnologia dei microcircuiti e delle celle fotovoltaiche sono tra i fattori determinanti nel promuovere l'espansione della scienza e della tecnologia dei plasmi freddi, ma i campi di impiego di questa tecnica sono numerosi e in continua crescita.

I plasmi *glow discharge* utilizzati nella tecnica PECVD si ottengono tipicamente a pressioni di pochi pascal, possiedono una bassa frazione di ionizzazione, detta *densità del plasma*, dell'ordine di 10^{-4} .

Le specie presenti in un plasma di questo tipo sono rappresentate da atomi, molecole neutre, ioni mono e poliatomici, radicali, elettroni e fotoni, mentre in plasmi caldi le specie molecolari sono assenti.

Il campo elettrico utilizzato per generare un plasma può essere statico, venendo generato da un circuito in corrente continua (*direct current*, DC) o variabile, se viene creato da un circuito in regime alternato (*alternate current*, AC). La seconda soluzione è molto utilizzata nelle applicazioni in quanto permette la anche deposizione di strati isolanti. La frequenza utilizzata più comunemente è di 13.56 MHz (*radiofrequency*, RF), essa presenta il vantaggio di essere adibita ad uso industriale; a tale frequenza è quindi permesso liberare una discreta potenza, senza interferire con i sistemi di telecomunicazione. In letteratura sono presenti anche studi eseguiti utilizzando altre frequenze, generalmente tra 20 e 300 kHz, che presentano alcuni vantaggi per scopi specifici [39][40][41].

2.3 Plasma in regime DC

Applicando una sufficiente differenza di potenziale tra due elettrodi si ottiene la ionizzazione del gas presente tra gli stessi.

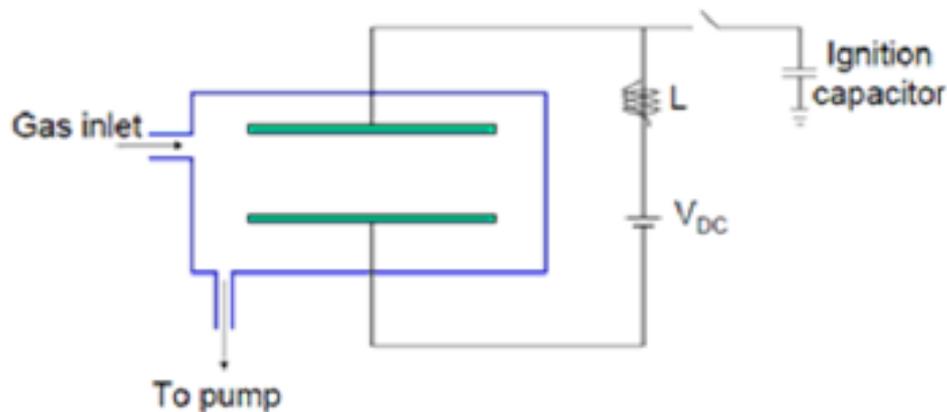


Figura 10: Schema essenziale di un impianto per la generazione di plasma DC

In queste condizioni l'elevata mobilità degli elettroni, oltre a rendere il plasma un buon conduttore, causa un rapido accumulo di elettroni all'anodo, generando una carica non bilanciata sullo stesso. Questa carica è fonte di un campo elettrico che ostacola l'ulteriore arrivo di elettroni. Nel frattempo avvengono altri importanti fenomeni all'interno del plasma, tra questi il bombardamento del catodo da parte di cationi, che causa emissione di elettroni secondari, collisioni di elettroni energetici su molecole presenti nel gas che generano altre ionizzazioni ed eccitazioni, secondo i meccanismi descritti, che sostengono il plasma. La situazione si evolve finché il sistema raggiunge uno stato di equilibrio dinamico, in cui il corpo centrale del plasma è neutro e privo di campo elettrico (esso infatti è un conduttore). La diversa mobilità di ioni ed elettroni genera, nelle regioni adiacenti a ciascun elettrodo, due zone aventi carica netta positiva. Queste regioni vengono dette *sheaths* e hanno spessori dell'ordine di grandezza della *lunghezza di Debye*.

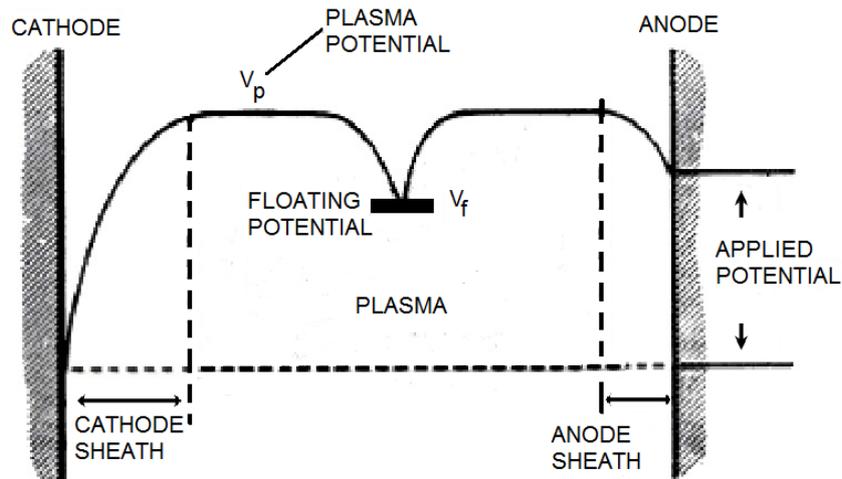


Figura 11: Andamento del potenziale all'interno di un plasma

In Figura 11 è chiaramente visibile la formazione delle *sheaths* agli elettrodi, si può notare anche come il corpo principale del plasma sia ad un potenziale maggiore di ogni altra superficie ad esso affacciata. Le *sheaths* sono caratterizzate da una scarsa presenza di elettroni e non presentano quindi la luminosità tipica del corpo centrale del plasma, la situazione descritta è rappresentata in Figura 12.

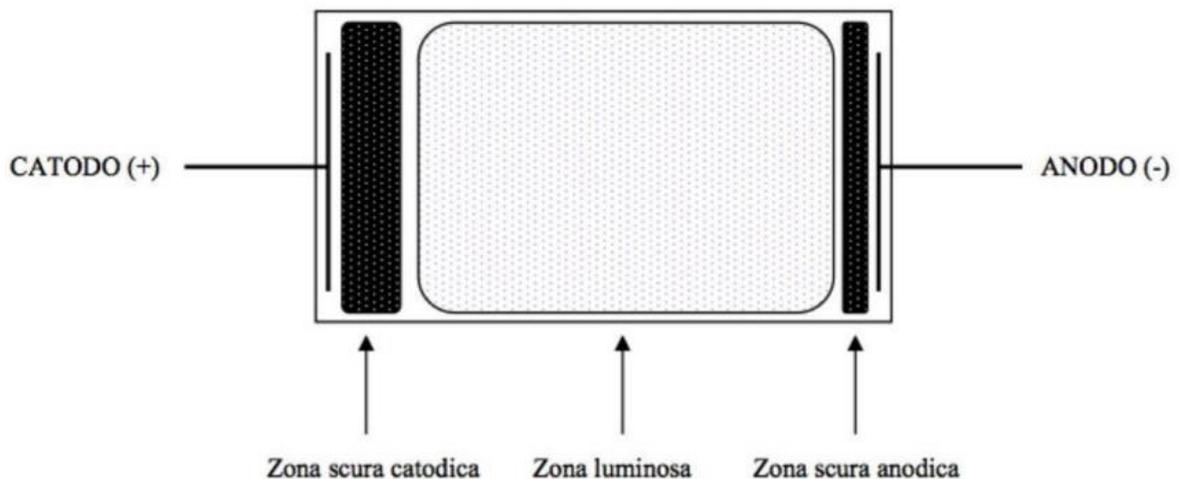


Figura 12: Aspetto del plasma in una possibile configurazione elettrodica

Un substrato isolato eventualmente presente si trova nella situazione illustrata al centro, e assume un potenziale detto *floating potential* di poche decine di volt inferiore a quello del plasma, tale potenziale è ciò che permette, all'equilibrio, di eguagliare la corrente elettronica e la corrente ionica.

La densità di corrente elettronica (negativa) che raggiunge il substrato è pari a:

$$j_e = -e\phi = -e \frac{1}{4} n_e \bar{v}_{e,f} = -\frac{1}{4} e n_e \bar{u}_e \exp\left(\frac{eV_f}{k_B T_e}\right) \quad (2.5)$$

Dove e è la carica elementare, ϕ è il flusso degli elettroni, n_e è la densità elettronica al bordo della *sheath*, $\bar{v}_{e,f}$ è la velocità media con cui gli elettroni colpiscono il substrato elettronico V_f è il potenziale flottante e \bar{u}_e è la velocità elettronica media secondo la distribuzione di Maxwell-Boltzmann:

$$\bar{u}_e = \sqrt{\frac{8k_B T_e}{\pi m_e}} \quad (2.6)$$

Mentre la corrente ionica è data da:

$$j_i = \bar{Q} e n_i \bar{u}_i \quad (2.7)$$

Dove \bar{Q} è la carica media degli ioni e \bar{u}_i la velocità media degli stessi sul bordo della *sheath*. Tale velocità viene anche definita *velocità di Bohm*:

$$\bar{u}_i = u_{Bohm} = \sqrt{\frac{k_B T_e}{m_i}} \quad (2.8)$$

Questa velocità è maggiore di quella causata dalla accelerazione nella zona tra il corpo principale del plasma e la *sheath*, zona detta *presheath*. Imponendo la condizione:

$$j_e = j_i \quad (2.9)$$

Si può calcolare il potenziale flottante come:

$$V_f = -\frac{k_B T_e}{2e} \ln\left(\frac{m_i}{2\pi m_e}\right) \quad (2.10)$$

Un plasma in regime DC non può venire utilizzato per trattare campioni isolanti, una superficie isolante agisce, infatti, come un substrato flottante. Essa viene caricata fino a raggiungere l'equilibrio tra flusso di cariche positive e negative incidenti su di essa. A questo punto il plasma si spegne. Questo inconveniente può essere risolto utilizzando plasmi in radiofrequenza, come illustrato di seguito.

2.4 Plasma in radiofrequenza

L'utilizzo di una polarizzazione alternata in radiofrequenza permette di evitare il problema del caricamento delle superfici isolanti e quindi permette il sostentamento del plasma. In questo modo si può depositare su substrati isolanti o far crescere strati isolanti. Al di sopra dei 100 kHz di frequenza, per massimizzare il trasferimento di energia dal generatore alla scarica e minimizzare la potenza riflessa, è necessario un circuito di accoppiamento capacitivo (*matching*), visibile in Figura 13.

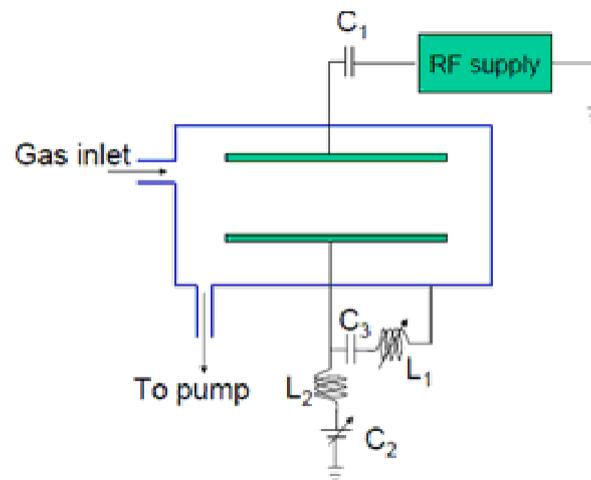


Figura 13: Schema essenziale di un impianto per la generazione di plasma RF

L'andamento ciclico del potenziale di un elettrodo è costituito da una sinusoide simmetrica, come visibile nella parte sinistra di Figura 14. In pochi cicli però, a causa della grande mobilità degli elettroni, il substrato isolante accumula un eccesso di carica negativa. Questo fenomeno sovrappone al potenziale del generatore un potenziale negativo, finché si raggiunge una situazione come quella illustrata nella parte a destra di Figura 14, in cui il potenziale medio dell'elettrodo raggiunge un valore sufficientemente negativo, tale che sulla superficie dell'isolante la corrente ionica equivale quella elettronica.

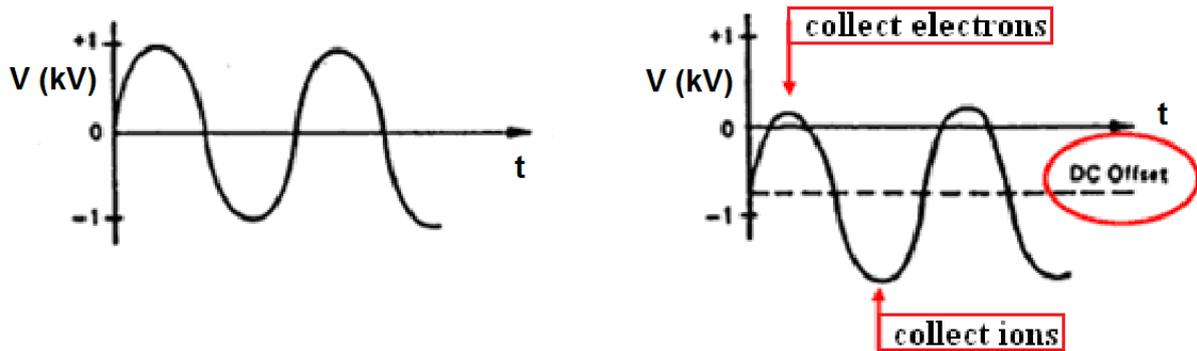


Figura 14: Andamento temporale del potenziale di elettrodo in un plasma RF

Infatti in questo modo i cicli presentano una piccola parte positiva e un maggior tempo trascorso a potenziale negativo, permettendo così al flusso ionico, più lento, di compensare quello elettronico. L'elettrodo polarizzato viene chiamato catodo, anche se per una piccola parte del tempo agisce come anodo.

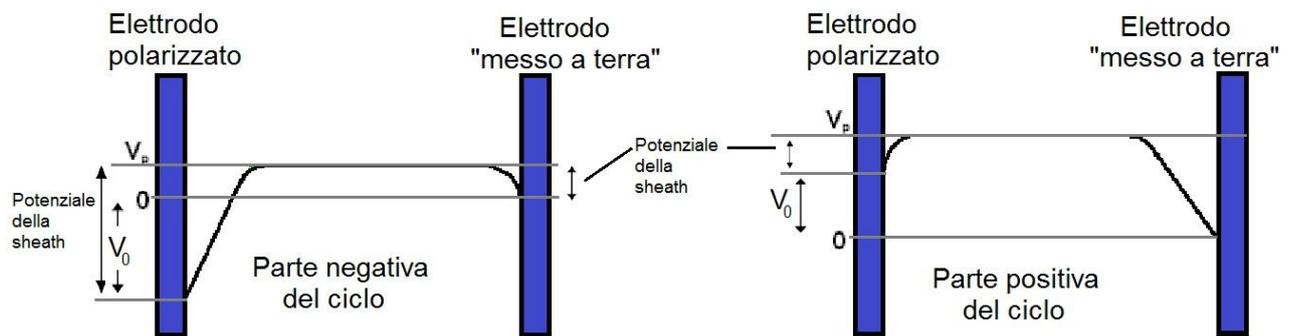


Figura 15: Andamento del potenziale nel plasma durante le fasi di un ciclo RF

L'andamento del potenziale del plasma in questa situazione è rappresentato in Figura 16, in cui si vede che esso mantiene comunque un valore più positivo di tutto l'ambiente circostante.

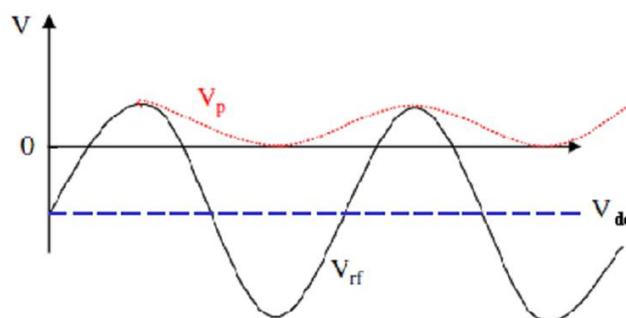


Figura 16: Andamento temporale del potenziale di un plasma RF

Spesso gli apparecchi PVD e PECVD, che utilizzano plasmi in regime RF, presentano catodi di area nettamente inferiore alla superficie anodica, che generalmente è collegata “a terra”. Questa configurazione produce una caduta di potenziale più marcata nella zona catodica, su cui è posto il campione da trattare, rendendo il plasma più denso in quella zona, in modo da ottimizzare la resa e la velocità dei processi. Questo è dovuto al fatto che nel circuito elettrico la stessa corrente deve passare tra i due elettrodi, per cui sull’elettrodo di area minore dovrà passare una densità di corrente maggiore. Per avere una maggiore densità di corrente l’elettrodo di area inferiore, per la limitazione del numero di portatori, dovrà raggiungere un potenziale maggiore in valore assoluto. Il rapporto tra i potenziali degli elettrodi dipende dai rapporti delle rispettive superfici secondo la relazione:

$$\frac{V_1}{V_2} = \left(\frac{A_2}{A_1} \right)^x \quad (2.11)$$

Dove x dipende dalla configurazione geometrica degli elettrodi e generalmente rispetta la condizione: $1.5 < x < 4$.

2.5 Plasma *etching*

Il campo elettrico presente nei pressi degli elettrodi li rende soggetti ad un continuo bombardamento. Tale fenomeno coinvolge anche specie chimicamente reattive, tipicamente presenti in plasmi di processi PECVD. I parametri fondamentali in un trattamento di *etching* sono [42]:

- Uniformità
- Anisotropia
- Selettività.

Ci sono diversi tipi di *etching* in processi sotto vuoto, sviluppati principalmente per l’industria dei circuiti integrati. In questa tesi il termine *etching* si riferirà al processo di *etching* chimico che comporta l’ablazione di materiale dagli elettrodi, che reagiscono con le specie attive del gas di processo per formare composti volatili. In configurazione asimmetrica, con area catodica nettamente inferiore a quella anodica, l’*etching* a spese dell’anodo può venire trascurato rispetto a quello catodico.

Il processo di *etching* è utilizzato principalmente, come anticipato, nell'industria dei circuiti integrati, in cui permette di scolpire wafer di silicio o altri materiali con precisione nanometrica [43].

Nei trattamenti PECVD l'*etching* chimico è sfruttato principalmente per pulire i substrati di ogni tipo da contaminanti organici. Il processo di *etching* chimico non va confuso con lo sputtering, che è di natura prettamente fisica, e costituisce il fenomeno alla base dei depositi ottenuti mediante tecnica PVD.

2.6 Attivazione superficiale

Il contatto della superficie di un materiale con un plasma reattivo, non contenente specie filmogene, induce modifiche superficiali di natura chimica e fisica. Alcuni degli effetti di questo fenomeno sono la produzione di siti attivi superficiali e, per alcuni tipi di substrato, modifiche allo stato di reticolazione e di peso molecolare medio superficiale [27]. Queste modifiche permettono di ottenere proprietà desiderate e di controllarne altre, come la bagnabilità, effetto barriera e adesione.

Questo tipo di trattamento è particolarmente utile quando sia necessaria la successiva deposizione di film a cui viene richiesta stabilità in ambienti aggressivi.

L'attivazione superficiale rappresenta anche il primo passo di ogni procedura di plasma *grafting*. Il trattamento descritto, come tutti gli altri processi PECVD, ha il vantaggio di non alterare le proprietà di bulk del materiale.

L'attivazione superficiale viene generalmente eseguita in presenza di gas come O_2 , N_2 , NH_3 e gas nobili [44].

2.7 Polimerizzazioni via plasma

La tecnica PECVD permette di rivestire praticamente ogni tipo di substrato con film sottili, di composizione e struttura controllabile mediante la definizione dei parametri di processo. Questa tecnica, come anticipato, è caratterizzata da grande versatilità, bassissimo consumo di reagenti, assenza di solventi nonché semplice implementazione su scala industriale.

I processi PECVD, che si svolgono a bassa pressione, sono caratterizzati anche da un elevato controllo e da automatica sterilizzazione del materiale trattato [15]. I parametri principali che possono essere modificati individualmente, indagandone l'influenza individuale o di gruppo per ogni applicazione, sono riassumibili in:

- Composizione dei precursori
- Flusso di ciascun precursore
- Potenza applicata
- Pressione
- *Duty cycle*
- Temperatura
- Geometria e configurazione de reattore
- Natura del substrato
- Frequenza del generatore
- Posizione e orientamento del substrato nei confronti del flusso del gas di processo

I precursori, spesso indicati col termine *monomeri*, devono essere disponibili come gas o vapori per essere introdotti in camera. Nel caso si debbano utilizzare sostanze allo stato liquido è necessario che queste presentino un'elevata tensione di vapore, per poter essere utilizzabili. In questo caso tali sostanze vengono generalmente introdotte in camera attraverso un sistema di flussimetro, miscelatore ed evaporatore, in cui vengono riscaldate e fatte evaporare prima di entrare in camera di deposizione. La perfetta evaporazione dei monomeri è notevolmente agevolata anche dalla bassa pressione presente nella camera.

Le polimerizzazioni via plasma coinvolgono complessi e molteplici tipi di fenomeni, sono stati proposti molti meccanismi di reazione [45], che possono essere riassunti in:

- Polimerizzazione per reazioni (chimiche) radicaliche, che si innescano a partire da frammenti radicalici prodotti dal plasma. In questo modo di formano omopolimeri lineari o ramificati, comunque aventi struttura regolare.
- Polimerizzazione ionica (cationica o anionica), che porta alla formazione di prodotti lineari o ramificati.
- Reazioni ione – molecola
- Frammentazione e poli – ricombinazione del monomero, che forma una polimero dalla struttura irregolare
- Conversione dei monomeri a intermedi adatti a polimerizzare con elementi strutturali parzialmente definiti
- Frammentazione e ricombinazione di più monomeri, che formano un “copolimero” avente struttura irregolare e non comparabile con un copolimero classico

- Copolimerizzazione radicalica con formazione di copolimeri lineari o ramificati, simili alle controparti classiche, con blocchi alternati o struttura di tipo aggraffato
- Aggraffaggio chimico su radicali o gruppi funzionali di polimeri ottenuti via plasma o polimeri trattati al plasma (copolimeri aggraffati)

Generalmente, con questo tipo di processi, non è possibile ottenere strutture particolarmente regolari del polimero, nonostante ciò sono state sviluppate numerose applicazioni di questa tecnica e numerosi accorgimenti per migliorarne i risultati[45].

Fin dagli anni '60 fu osservata la formazione di gruppi insaturi, recanti doppi e tripli legami di tipo $C=C$ e $C\equiv C$. L'insolubilità dei depositi ottenuti fu attribuita alla reticolazione dei depositi e si documentò come i radicali presenti nel film reagiscano con l'ossigeno atmosferico [46]. L'assenza di catene di tipo $(-CH_2-CH_2-)_n$, con $n > 4$ fu accertata tramite spettroscopia IR [47]. Con l'utilizzo di precursori organici un ruolo chiave nella polimerizzazione sembra essere giocato dalla formazione di specie di tipo acetilenico nel plasma fu sostenuto da diversi studiosi, che rilevarono anche l'abbondanza di radicali nei polimeri ottenuti [48].

La complessità di questo tipo di processi deve tener conto anche della concorrenza tra svariati fenomeni, come illustrato schematicamente in Figura 17

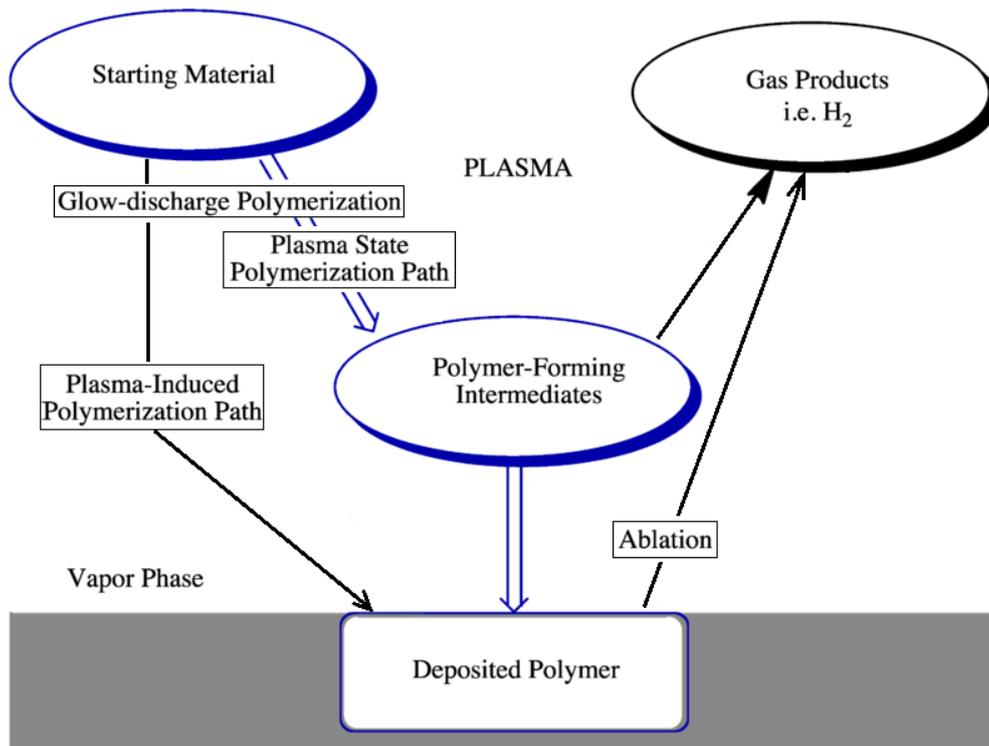


Figura 17: Quadro generale dei principali processi coinvolti in una polimerizzazione assistita da plasma

Negli anni successivi si intuì che la struttura del deposito finale è legata all'energia del plasma, in particolare alla quota energetica disponibile per unità di massa di monomero presente.

Tale relazione è riassunta nell'espressione del fattore di Yasuda [27]:

$$Y = \frac{W}{F \cdot M} \quad (2.12)$$

In cui W rappresenta la potenza applicata al plasma, F il flusso del monomero ed M il peso molecolare dello stesso. Lo stesso Yasuda propose il modello della "polimerizzazione atomica" per descrivere le polimerizzazioni ottenute con elevati valori di Y . Tale meccanismo prevede un'elevata frammentazione, spesso spinta fino ai singoli atomi, del monomero da parte del plasma. La seguente ricombinazione casuale dei frammenti porta alla formazione di un film avente elevata stabilità e reticolazione, ma con una scarsa ritenzione della struttura e dei gruppi funzionali caratteristici del monomero. L'irregolarità della struttura è causata anche dal continuo bombardamento del substrato da parte di ioni energetici e radiazioni UV [49] [50].

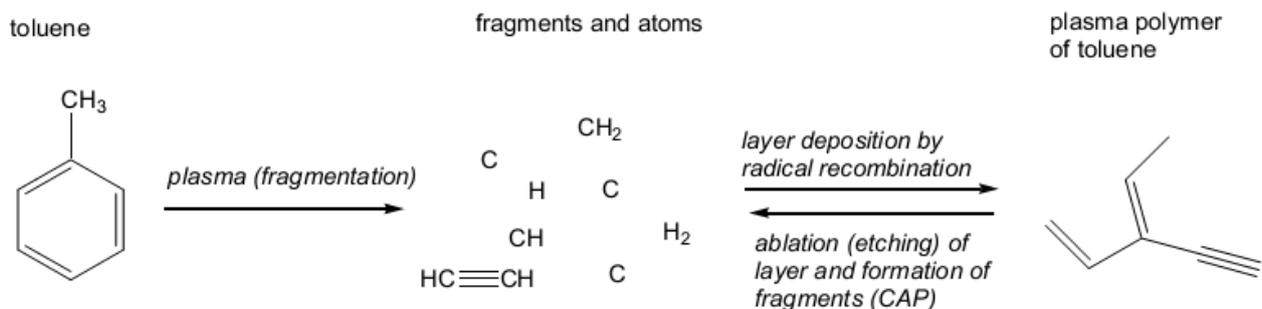


Figura 18: Esempio di polimerizzazione "atomica" secondo il modello di Yasuda [45]

Vari autori osservarono che, utilizzando basse potenze di plasma, è possibile ottenere depositi di struttura più regolare e più simile a quella dei polimeri tradizionali, ma con inclusione nella stessa di monomeri e oligomeri [48][51][52]. Questa frazione a basso peso molecolare può evaporare a temperature inferiori ai 100 °C e compromettere così la stabilità termica del deposito [53].

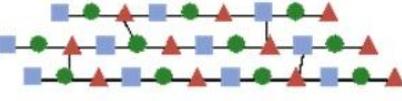
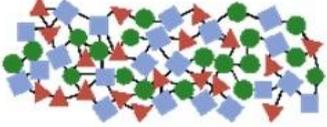
| | |
|---|---------------------------------|
|  | Monomero |
|  | Polimero tradizionale |
|  | Polimero ottenuto tramite PECVD |

Figura 19: Strutture tipiche ottenute con polimerizzazioni tradizionali e con tecnica PECVD

L'introduzione di plasma in regime pulsato da parte di Tiller [54] e Yasuda [55] e lo sviluppo di questa tecnica rappresentano un'importante passo avanti per ottenere depositi con buona ritenzione di gruppi funzionali e buona stabilità. Questo accorgimento, utilizzato anche nel presente lavoro, verrà discusso più in dettaglio nel prossimo paragrafo.

Nelle polimerizzazioni via plasma si assiste, in generale, ad una conservazione dei gruppi funzionali maggiore rispetto a quella della struttura generale del monomero, che difficilmente è riconoscibile come unità ripetitiva nel deposito [45]. Nonostante l'aspetto molto "statistico" della struttura di questi polimeri, la tecnica PECVD ha permesso di preparare film con elevata densità gruppi funzionali e una buona selettività degli stessi. Questi film hanno trovato vasta applicazione come promotori di adesione per molecole o altri film e sono stati utilizzati con successo anche per successive reazioni di *grafting*.

Oltre alle applicazioni menzionate, ricordiamo che la continuità, riproducibilità e assenza di difetti dei film depositati tramite polimerizzazione assistita da plasma sono caratteristiche che li rendono adatti per molte applicazioni, come le membrane per batterie nucleari che vennero ottenute mediante questa tecnica già nel 1960 [56].

2.8 Modalità pulsata e *duty cycle*

L'utilizzo della modalità pulsata rappresenta uno degli accorgimenti utilizzati con maggiore successo per evitare l'eccessiva deviazione composizionale dei film depositati rispetto ai precursori utilizzati. Questa tecnica prevede la rapida accensione e spegnimento di un plasma abbastanza energetico con l'effetto di innescare i meccanismi descritti lasciando, tra un'accensione e l'altra, del tempo in assenza di stimoli in cui il sistema può reagire in modo convenzionale. L'energia risulta

così sufficiente ad evitare un'eccessiva ritenzione di monomero/oligomero nel deposito, ma i tempi di *plasma off* permettono la rapida ricombinazione dei frammenti molecolari con l'effetto di una ritenzione di gruppi funzionali nettamente migliore. Un impulso di plasma della durata di pochi microsecondi è sufficiente ad innescare produzione di radicali, di specie viniliche e acriliche e generare il fenomeno di polimerizzazione. Finito tale impulso i radicali formati intraprendono un meccanismo di reazione a catena di natura puramente chimica. In questo modo i prodotti presentano caratteristiche intermedie tra quelle di un deposito PECVD in plasma continuo e il prodotto di una polimerizzazione classica. Il parametro *duty cycle* (*d.c.*) fornisce una misura di quanto il prodotto sia simile all'uno o all'altro tipo di struttura. Si definisce *d.c.* il rapporto:

$$d.c. = \frac{t_{on}}{t_{tot}} \quad (2.13)$$

In questa relazione t_{on} rappresenta il tempo di accensione del plasma in ogni periodo, mentre $t_{tot} = t_{on} + t_{off}$ rappresenta la durata di un intero periodo, somma tra tempo di accensione e di pausa.

La frequenza dei cicli on – off può essere variata da pochi cicli al secondo a migliaia di Hz. Essa non va confusa con la radiofrequenza (13.56 MHz) con cui viene invertito il potenziale applicato agli elettrodi. La differenza di almeno 3 ordini di grandezza assicura che in ogni periodo di accensione il potenziale del plasma venga alternato tante volte da poter rendere valide tutte le considerazioni fatte nel paragrafo “2.4 Plasma in radiofrequenza” a pag.28 e illustrate in Figura 14 e seguenti. In modalità pulsata riveste particolare importanza la velocità relativa dei processi competitivi di ricombinazione che si instaurano allo spegnimento del plasma. All'aumentare della durata del periodo t_{off} le reazioni radicale – radicale, molto veloci, si esauriscono, favorendo le combinazioni radicale – monomero.

In Tabella 5 sono riportati alcuni tipici valori utilizzati per realizzare polimerizzazioni in regime pulsato, le celle evidenziate sono relative ai parametri utilizzati nella parte sperimentale del lavoro di tesi.

| d.c. | Frequenza (Hz) | t_{on} (s) | d.c. | Frequenza (Hz) | t_{on} (s) |
|-------------|----------------|--|------|----------------|---------------------|
| 0.20 | 30 | $6.7 \cdot 10^{-3}$ | 0.20 | 500 | $4.0 \cdot 10^{-4}$ |
| 0.10 | 30 | 3.3×10^{-3} | 0.10 | 500 | $2.0 \cdot 10^{-4}$ |
| 0.05 | 30 | $1.7 \cdot 10^{-3}$ | 0.05 | 500 | $1.0 \cdot 10^{-4}$ |
| 0.20 | 100 | $2.0 \cdot 10^{-3}$ | 0.20 | 1000 | $2.0 \cdot 10^{-4}$ |
| 0.10 | 100 | $1.0 \cdot 10^{-3}$ | 0.10 | 1000 | $1.0 \cdot 10^{-4}$ |
| 0.05 | 100 | $5.0 \cdot 10^{-4}$ | 0.05 | 1000 | $5.0 \cdot 10^{-5}$ |

Tabella 5: Tempi di accensione, *duty cycles* e relative frequenze

Un ulteriore vantaggio di questa modalità è rappresentato dalla maggiore facilità di applicazione industriale, dovuta al minor carico del sistema capacitivo di accoppiamento e alla conseguente diminuzione dei costi dello stesso [57].

3 Stato dell'arte

3.1 Deposizione di film con funzionalizzazione carbossilica

I depositi a funzionalizzazione carbossilica preparati con la tecnica PECVD hanno dimostrato buone proprietà di adesione cellulare [58][59] [60]. A questo riguardo lo scopo più comune, nella preparazione di questo tipo di superfici, è quello di ottenere immobilizzazione di molecole bioattive contenenti gruppi amminici tramite la chimica delle carbodiimmidi. Tra le molecole che sono state legate con successo su queste superfici possiamo citare alcuni esempi di interesse biologico:

- Oligopeptide Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)[61]
- Collagene [62][63][64]
- Anticoagulanti come la trombomodulina [65] [66] [67]
- Il complesso eparina – albumina [68][69][70]
- L'enzima urochinasi [71].

La deposizione di film a funzionalizzazione carbossilica può essere eseguita tramite quattro strategie principali, che possono essere riassunte schematicamente in:

1. Polimerizzazione via plasma, utilizzando come precursori:
 - Acido acrilico
 - Acido propanoico
 - Acido metacrilico (e altri acidi carbossilici)
2. Trattamenti al plasma a base di CO₂ e CO.
3. *Plasma grafting* per irradiazione diretta, consistenti in trattamenti al plasma di argon su superfici pretrattate con:
 - Dodecanoato di sodio
 - sodio 10-undecanoato
 - Polietilenossido con –COOH terminale
 - Acido undecilenico
4. *Plasma grafting* per post – irradiazione utilizzando:
 - Acido acrilico su depositi di n-epitilamina polimerizzati via plasma
 - Anidride succinica su trattamenti al plasma di NH₃
 - β – propiolattone su trattamenti al plasma di NH₃ o allilamina
 - Acido acrilico su trattamenti al plasma di O₂ o Ar o CO₂ o H₂O
 - Acrilammide su trattamenti al plasma di Ar

I trattamenti al plasma di anidride carbonica o monossido di carbonio sembrano produrre diversi meccanismi di reazione in base al substrato al quale vengono applicati, nonostante ciò si possono individuare alcuni aspetti generali. Questi trattamenti non hanno il solo effetto di produrre gruppi carbossilici, ma generano anche altri gruppi funzionali contenenti carbonio e ossigeno, come idrossidi, aldeidi chetoni ed esteri. La superficie del materiale trattato risulta comunque a carattere acido e questo, assieme ad altre evidenze sperimentali, tra cui l'analisi XPS (*X-ray Photoemission Spectroscopy*), testimonia l'onnipresenza dei gruppi carbossilici in questi depositi [72] [73] [74].

In Figura 20 è visibile un esempio dell'analisi dei picchi XPS, con fit per separare i singoli contributi al segnale totale ed interpretare la struttura molecolare del campione.

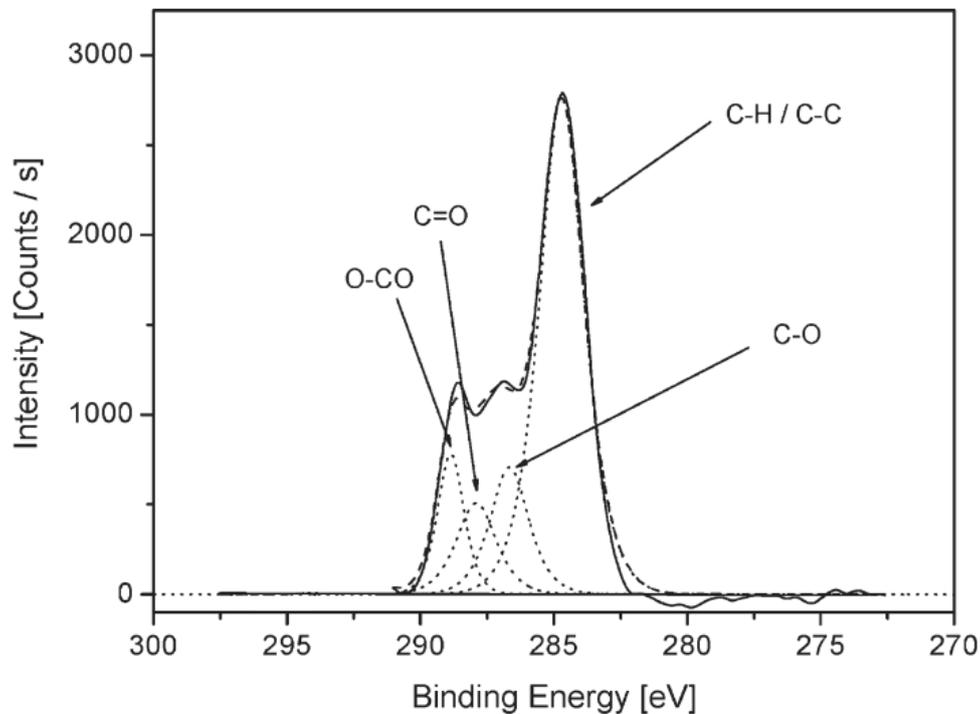


Figura 20: Esempio di spettro XPS con fit dei picchi e relativa interpretazione strutturale [75]

Le reazioni indotte da questi trattamenti dipendono anche dal substrato, per esempio nei trattamenti di poliimmidi in plasma di CO_2 si verifica la scissione dei gruppi immide, per formare gruppi carbossilici e ammidici [76]. I trattamenti effettuati su polisulfoni generano reazioni più complesse e molteplici rotture di catena e successiva reticolazione [73]. Trattamenti al plasma eseguiti su polipropilene isotattico inducono la degradazione selettiva della fase sindiotattica presente in superficie [77], come è testimoniato dall'aumento dei segnali infrarossi a 1256 e 2723 cm^{-1} , associati alla fase isotattica. In seguito al trattamento sono stati individuati anche oligomeri ossidati

del polipropilene. Trattamenti in plasmi di anidride carbonica su polistirene portano alla degradazione degli anelli aromatici [72].

| Monomero - gas | Substrato | Rapporto O/C iniziale | Rapporto O/C finale | riferimento |
|-----------------|------------|-----------------------|---------------------|-------------|
| O ₂ | Poliimmide | 0.201 | 0.419 | [76] |
| CO | Poliimmide | 0.201 | 0.382 | [76] |
| CO ₂ | Poliimmide | 0.201 | 0.469 | [76] |
| CO ₂ | PET | 0.37 | 0.43 | [78] |
| CO ₂ | LDPE | Non disponibile | 0.389-0.695 | [79] |
| CO ₂ | PS | 0.03 | 0.298-0.364 | [72] |

Tabella 6: Rapporti O/C di diversi substrati prima e dopo trattamento con plasmi di O₂, CO₂ e CO

In Tabella 6 sono riportati alcuni risultati delle analisi XPS eseguite in articoli di letteratura; i dati mostrano che il tipo di trattamenti in questione causa un aumento del rapporto O/C nella maggior parte dei polimeri. Un'eccezione a questa regola è rappresentata dal polimetilmetacrilato (PMMA, comunemente noto col nome commerciale "Plexiglas[®]") in cui si assiste ad una diminuzione del rapporto O/C, dovuta alla degradazione dei gruppi esterei presenti [80].

In tutti i casi, nel periodo immediatamente seguente al trattamento al plasma, si osserva un rapido incremento del rapporto tra ossigeno e carbonio, generalmente imputabile all'ossidazione causata dall'ossigeno atmosferico. I trattamenti su LDPE effettuati mostrano che l'incremento della potenza del plasma ha l'effetto di incrementare il rapporto considerato, effetto dovuto alla maggiore frammentazione molecolare e concentrazione delle specie reattive presenti durante il processo [79]. In ogni caso la presenza di gruppi carbossilici è responsabile di una piccola parte, compresa tra il 4.8 e il 7.6%, del picco XPS relativo al livello 1s del carbonio (picco C1s) nella maggior parte dei trattamenti considerati [76].

Un'altra stima dell'efficienza con cui si ottiene funzionalità carbossilica è fornita dal rapporto tra l'ossigeno coinvolto in tali gruppi e l'ossigeno totale presente nel film. Alcuni autori, in seguito ad analisi effettuate su LDPE trattato in plasma di CO₂, hanno stimato che, utilizzando questo tipo di trattamenti, risulta che solamente il 14% dell'ossigeno totale presente è dovuto al contributo dei gruppi -COOH [74], ad ulteriore conferma della molteplicità di percorsi di reazione che vengono coinvolte in questi processi e relativi prodotti.

Quanto detto evidenzia la bassa efficienza nel produrre depositi carbossilici posseduta da plasmi di anidride carbonica. L'effetto di tale gas nell'uso combinato con altri monomeri non fornisce, tuttavia, risultati necessariamente negativi, come ci si potrebbe aspettare. Infatti la quantità dei gruppi carbossilici ottenuti utilizzando un gas di processo contenente solo acido acrilico è circa la metà di quella che si ottiene aggiungendo ad esso un uguale numero di moli di anidride carbonica [81].

L'utilizzo dell'acido acrilico come monomero per la deposizione di film carbossilici è ampiamente documentato in letteratura; generalmente questo tipo di deposito viene effettuato a bassa potenza e quindi con scarse velocità di deposizione, inoltre la funzionalizzazione ottenuta risulta instabile e scarsamente resistente all'invecchiamento e al contatto con l'acqua. Questo problema è stato affrontato con successo utilizzando vari accorgimenti, tra cui la copolimerizzazione di questo acido con altri monomeri, come verrà illustrato in seguito [59][60] [81] [82][83]. Nonostante i problemi illustrati, presentati dai depositi di ppAA (*plasma polymerized acrylic acid*), in letteratura si trovano numerosi esempi di studi effettuati sulla polimerizzazione assistita da plasma di acido acrilico utilizzato in assenza di altri monomeri (omopolimerizzazione) [84][85][86][87][88][89].

Altri monomeri contenenti gruppi $-COOH$, utilizzati per produrre funzionalizzazione carbossilica mediante polimerizzazione al plasma sono l'acido propanoico [89] e l'acido propinoico [90].

La polimerizzazione assistita da plasma è in grado di garantire densità di funzionalizzazione più elevata rispetto ai trattamenti al plasma di anidride carbonica visti in precedenza. Con il metodo della polimerizzazione l'incidenza del contributo dovuto ai gruppi carbossilici sul segnale totale relativo al picco C 1s nell'analisi XPS può superare il 20% [87] [89].

Il confronto dei depositi ottenuti utilizzando come monomero acido acrilico e di quelli preparati con acido propanoico fornisce un interessante esempio di studio delle polimerizzazioni assistite da plasma, che presentano notevole complessità a causa dei molteplici meccanismi coinvolti, come schematicamente illustrato in Figura 21.

Con l'utilizzo di acido acrilico alcuni autori hanno ottenuto velocità di deposizione cinque volte superiori a quelle garantite dall'utilizzo di acido propanoico [89]. La differenza è attribuibile ai diversi percorsi di polimerizzazione seguiti nei due casi.

L'apertura del legame $C=C$ richiede minore energie (2.74 eV) rispetto alla rottura del legame $C-C$, che richiede 3.61 eV [91], perciò la polimerizzazione dell'acido acrilico ad opera del plasma avviene, almeno in parte, seguendo un meccanismo classico. Il prodotto finale è caratterizzato,

pertanto, da un aspetto decisamente più lineare rispetto a quelli ottenuti da monomeri privi di legami multipli.

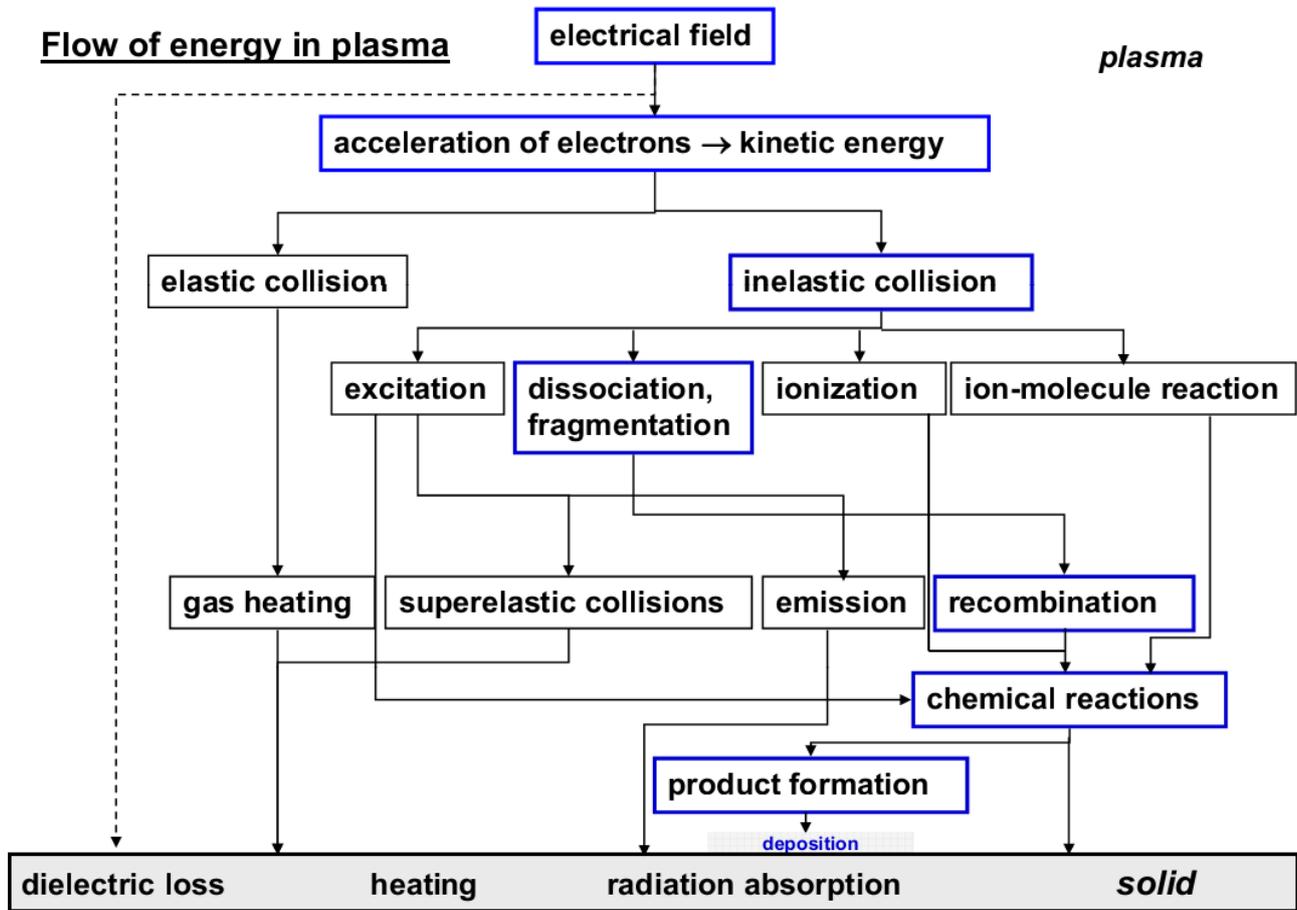


Figura 21: Situazione energetica in un plasma e meccanismi attivi durante il processo [45]

A basse potenze la polimerizzazione dell'acido acrilico sembra coinvolgere un notevole contributo di addizione radicalica al legame C=C [91], con meccanismo simile ad una polimerizzazione cationica [89].

Nel caso dell'acido propanoico invece i dati spettroscopici evidenziano una molteplicità di strutture presenti, conseguenza dell'assenza di un percorso di reazione predominante, in questo caso si osserva anche un maggiore grado di *branching* del polimero. Il confronto tra le velocità di deposizione di acido acrilico e acido propanoico in Figura 22 conferma la dipendenza della polimerizzazione dalla presenza di doppi legami, mentre l'andamento non lineare nei confronti del *duty cycle* mostra come, per bassi valori di questo parametro, si possa ottenere una buona velocità di processo, oltre ad una struttura molto più regolare [75].

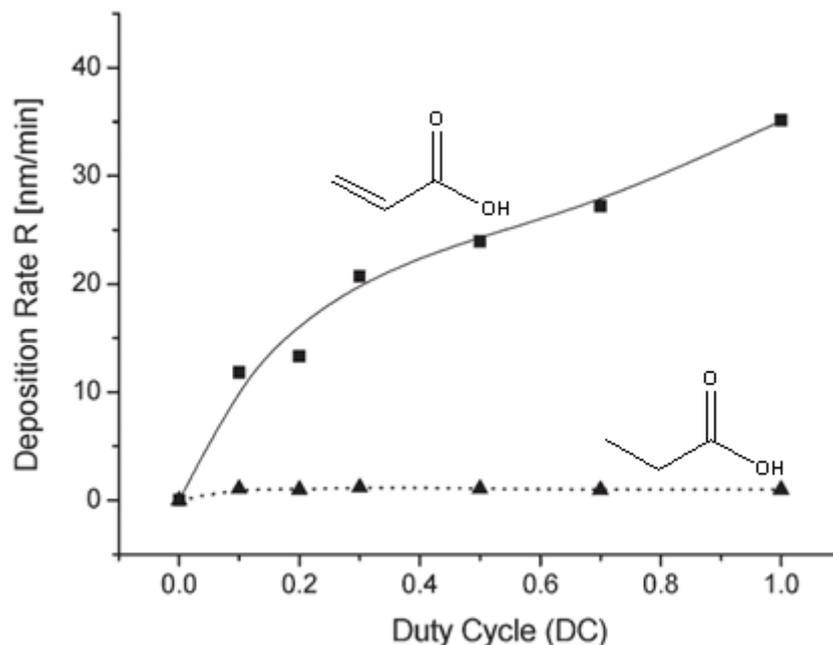


Figura 22: Andamento della velocità di deposizione in relazione al duty cycle per i monomeri acido acrilico (quadrati) e acido propanoico (triangoli) [75]

Con l'utilizzo dell'acido propanoico si osserva una maggiore influenza della potenza utilizzata sulla struttura del deposito, che con l'uso di elevate potenze differisce in modo più marcato dalla struttura del polimero convenzionale.

Elevate potenze utilizzate nella polimerizzazione dell'acido acrilico fanno prevalere i meccanismi di reazione di radicali liberi [89], con ritenzioni di $-COOH$ relative solo al 9.7 % del picco C1s, tali modesti valori sono causati da un'elevata dissociazione molecolare, per dare specie come CO e CO_2 . In queste condizioni alcuni autori, utilizzando la spettroscopia ottica in emissione, hanno utilizzato con successo la concentrazione della specie CO come indice per ottimizzare la densità dei gruppi carbossilici sul polimero finale [88]. La massima ritenzione di gruppi funzionali, pari al 20.5% del picco C1s, è comunque stata documentata in depositi ottenuti a potenza limitata, come testimoniano svariati studi [89] [88][91] [92]. In queste condizioni la maggior parte dei gruppi $O-C=O$ sono di natura carbossilica, mentre a potenze più elevate si formano quantità maggiori di altri composti, tra cui esteri [92].

Un'altra strategia che permette di aumentare la ritenzione dei gruppi $-COOH$ nel deposito è il raffreddamento del substrato mediante azoto liquido [93].

Gli effetti della potenza utilizzata si estendono anche sul grado di reticolazione, che risulta elevato ad alte potenze, impedendo addirittura la formazione di strutture lineari di lunghezza maggiore alle

due unità ripetitive, come è dimostrato da analisi SIMS statiche, le quali hanno individuato, per basse potenze, strutture fino alle cinque unità lineari [92].

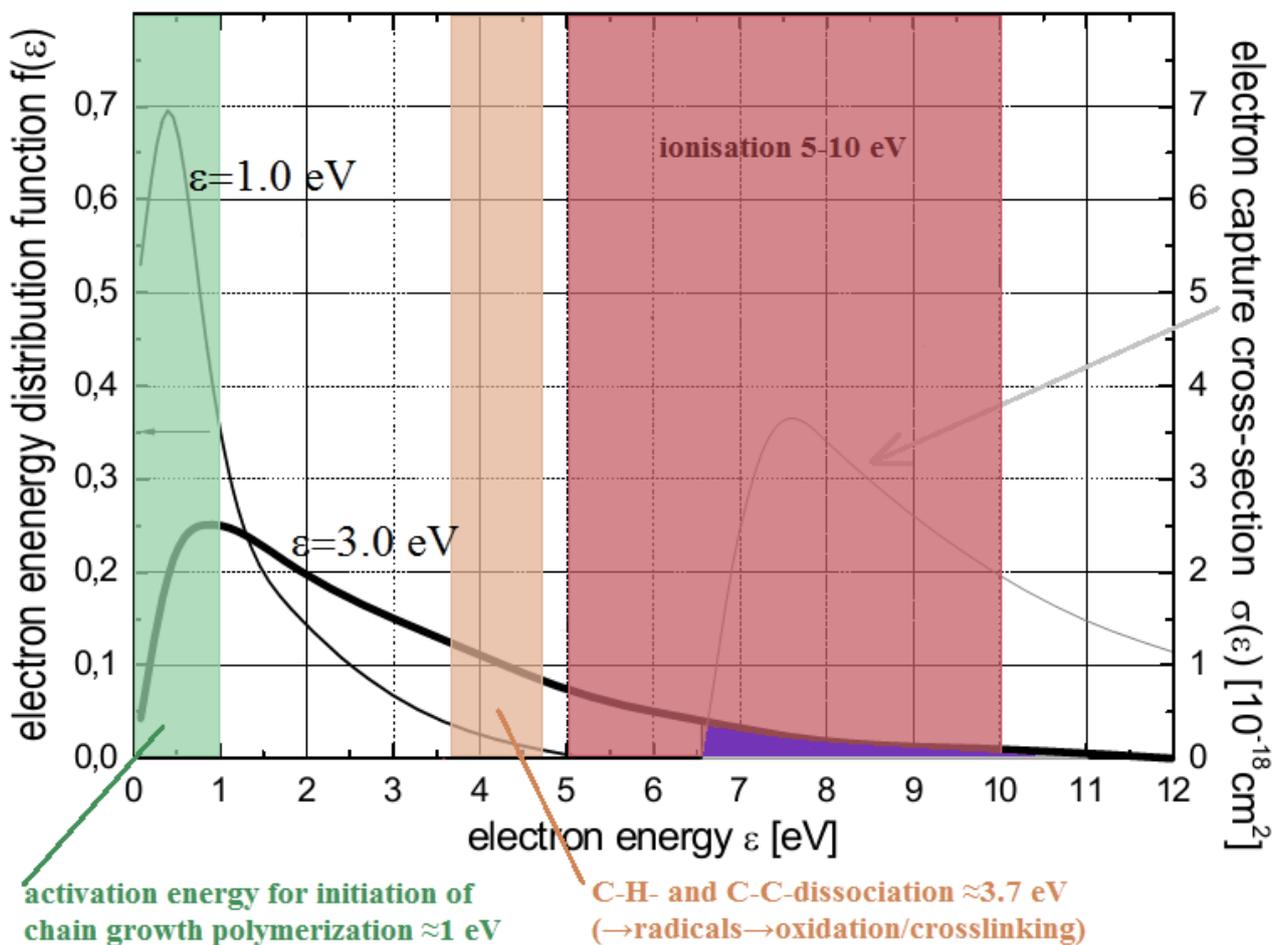


Figura 23: Confronto tra curva di distribuzione delle energie elettroniche, sezione d’urto relativa alla molecola di benzene ed energie di dissociazione di legami chimici di particolare interesse [94].

Dall’analisi della Figura 23 risulta chiaro come i plasmi più energetici siano in grado di generare dissociazione di ogni tipo di legame, la scissione di un anello aromatico richiede, infatti, un’energia di circa 8 eV, disponibile con plasmi che presentano energia elettronica media di 3 eV. Altre energie di dissociazione, relative ad alcuni legami chimici interessanti dal punto di vista delle polimerizzazioni in esame, sono visibili in Tabella 7, tali energie sono evidenziate nella fascia colorata centrale di Figura 23.

| Legame | E (kJ/mol) | E (eV) | Legame | E (kJ/mol) | E (eV) |
|--|------------|--------|-------------------------------------|------------|--------|
| $\text{CH}_3 - \text{CH}_3$ | 370 | 3.84 | $\text{CH}_3\text{CH}_2 - \text{H}$ | 411 | 4.27 |
| $(\text{CH}_3)_3 - \text{CH}$ | 385 | 4.00 | $\text{CH}_3 - \text{H}$ | 435 | 4.51 |
| $(\text{CH}_3)_2 \text{CH} - \text{H}$ | 396 | 4.11 | $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{H}$ | 458 | 4.75 |

Tabella 7: energie di dissociazione standard per alcuni legami tipici di molecole organiche[94]

La tecnica del *plasma grafting* è stata utilizzata ed esplorata a fondo con lo scopo di aumentare la concentrazione e la specificità della funzionalizzazione carbossilica ottenuta. I primi tentativi utilizzarono principalmente il metodo di irradiazione diretta su superfici trattate con acido acrilico con l'intento di fissare gruppi $-\text{COOH}$. Questi studi furono effettuati usando solventi di varia natura per rigonfiare il polimero prima di eseguire il trattamento con plasma a base gas quali azoto, argon, ammoniaca o acetilene [95] [96]. Durante il periodo di questi studi non era ancora diffusa la tecnica di analisi XPS, perciò le caratterizzazioni venivano eseguite con metodi indiretti, come quelli gravimetrici o mediante reazioni con molecole coloranti, metodi affetti da limiti intrinseci. Infatti studi successivi dimostrarono che già nei primi secondi di esposizione a un plasma comunemente utilizzato, come quello a base di argon, si verifica un'estesa decarbossilazione dell'acido acrilico [97] [98].

La difficoltà maggiore, relativa a questo metodo, risiede nella ricerca di agenti surfattanti che siano in grado di resistere ad esposizioni più prolungate a plasmi di Ar. In questo campo sono stati ottenuti risultati positivi con l'utilizzo di sostanze come il sale sodico dell'acido undecilenico [99], il sodio 10-undecanoato [100][101][102][103] utilizzato anche in combinazione con altre molecole.

I tempi di trattamento utilizzati con maggior successo sono molto limitati, generalmente tra i cinque e i dieci secondi, con perdite di gruppi funzionali comunque elevate, comprese tra il 71 e il 94% [100], ma con il pregio di ottenere un'elevata selettività per i gruppi carbossilici. Le analisi XPS hanno infatti evidenziato che il 47 % dei gruppi contenenti ossigeno, presenti nei depositi ottenuti con questa tecnica, sono di tipo carbossilico [100] [103]. I parametri più importanti per la buona riuscita di questi processi sono:

- La bagnabilità del substrato da parte del surfattante usato [102]
- Il grado di insaturazione del substrato [101]
- Il grado di insaturazione del surfattante [101]
- La lunghezza di catena della molecola del surfattante [104]
- La presenza e le caratteristiche della radiazione elettromagnetica durante il processo [103]

È stato osservato che l'utilizzo di un tensioattivo che non sia in grado di bagnare bene il substrato inibisce il fissaggio dei gruppi funzionali. Per risolvere questo problema può essere utile miscelare il surfattante con un solvente organico, come l'esanolo o il cloroformio, o pretrattare la superficie del substrato con plasma di argon. Quest'ultimo accorgimento garantisce le stesse prestazioni del primo, accompagnate da una maggiore riproducibilità. La presenza nel substrato di legami multipli e di struttura amorfa promuove il fissaggio dei gruppi funzionali, dal momento che tale fenomeno è legato alla facilità di formazione di radicali [101], anche se va considerato che la presenza di radicali ravvicinati può causare ricombinazione reciproca prima che avvenga la reazione col surfattante. Questo comportamento di auto-inibizione è stato osservato con l'utilizzo di poli cis-butadiene come substrato. Legami multipli nel tensioattivo invece hanno invariabilmente l'effetto di promuovere l'adesione dei gruppi funzionali [100] [101]. Questo comportamento conferma la dipendenza dell'adesione dei gruppi carbossilici dalla formazione via plasma di radicali, favorita su legami insaturi. Tra le varie metodologie adottate per ottenere *plasma grafting* su polimeri va citata la tecnica di trattamento con plasma al fine di ottenere perossidi sulla superficie del substrato, seguita dall'utilizzo degli stessi per produrre *grafting* di composti recanti gruppi carbossilici terminali o per fissare gruppi amminici su cui successivamente legare composti carbossilici. Alcuni esempi sono costituiti dal trattamento con plasma a carattere amminico, utilizzando precursori come NH_3 [79], allilammina [29][79] o eptilammina [105], seguito da esposizione a molecole contenenti gruppi $-\text{COOH}$, come β - propiolattone [79], anidride succinica [29] o acido acrilico [105]. Diversi autori hanno utilizzato questo tipo di processi a due stadi, spinti da motivazioni diverse, la più frequente delle quali è la capacità di inserire molecole spaziatrici tra il substrato e le molecole bioattive.

Una tecnica di *plasma grafting* diversa prevede l'applicazione, su substrati polimerici, di trattamenti al plasma seguiti da fissaggio di acido acrilico. Il trattamento iniziale, in questi casi, deve garantire un compromesso ottimale tra la formazione di perossidi e l'assenza di eccessiva ablazione della superficie del campione. Per ottenere buoni risultati i gas utilizzati nel processo vanno scelti in relazione al substrato da trattare, infatti è stato osservato che il politetrafluoroetilene (PTFE) non viene trattato nel modo corretto da plasmi di ossigeno. Questo comportamento è stato attribuito all'incapacità di tale polimero di assorbire l'emissione a 130.5 nm, tipica dei plasmi di ossigeno [106]. Trattamenti con plasma di acqua [71] o di anidride carbonica [65] [67] sono invece in grado di fornire buoni prestazioni di fissaggio di acido acrilico su PTFE. Diversi substrati, tra i quali il polietilene (PE) e il polietilentereftalato (PET), si prestano ad essere trattati con plasmi di aria [62] [63] e di argon [107] prima di essere sottoposti a *grafting* con acido acrilico.

Si possono ottenere gruppi carbossilici anche in modo indiretto, per esempio tramite grafting dell'acrilammide su substrati trattati con plasmi di argon, ossigeno, aria secca e idrogeno [108] [109]. Infatti le molecole di acrilammide sono soggette a idrolisi basica, con generazione di gruppi carbossilici [108].

I fattori che influenzano la densità dei gruppi $-COOH$ superficiali sul prodotto finale sono molteplici, essendo il processo legato alla quantità di perossidi o ammine generati, nonché all'efficienza della reazione di *grafting*. La resa di *grafting* è influenzata dalla temperatura di reazione, dalla concentrazione dei reagenti, dal tempo di reazione e dalla presenza o assenza di molecole usate come attivatori. Generalmente l'utilizzo di potenze elevate e tempi lunghi di trattamento fornisce densità di funzionalizzazione maggiori, ma si sono osservate anche eccezioni a questa regola [65] [107].

L'interesse particolare dei polimeri a funzionalizzazione carbossilica ottenuti tramite tecnica PECVD è in buona parte dovuto all'efficacia che questi hanno dimostrato in applicazioni biomediche, compreso il campo dei biosensori e quello dell'adesione cellulare [110]. I gruppi carbossilici, assieme ad altri gruppi funzionali polari, hanno dimostrato capacità intrinseca di promuovere l'adesione cellulare, inoltre essi possono essere utilizzati per legare in modo covalente molecole bioattive quali peptidi, glucidi, antibiotici, etc. [111] [112]. Queste applicazioni richiedono, evidentemente, la preparazione di depositi resistenti all'ambiente acquoso e perciò sono state sviluppate diverse strategie per ottenere questa caratteristica. Uno degli accorgimenti più efficaci consiste nella copolimerizzazione di due monomeri, di cui generalmente uno è portatore dei gruppi funzionali voluti, mentre l'altro ha lo scopo di controllare la struttura del deposito.

3.2 Copolimerizzazione

La copolimerizzazione di due diversi monomeri ha dimostrato ottime prestazioni nel migliorare la stabilità e la resistenza in ambiente acquoso dei depositi carbossilici. Questa tecnica è risultata anche efficace per ottenere il controllo della densità superficiale dei gruppi $-COOH$ nel deposito finale [60] [82] [83] [113]. I depositi preparati tramite polimerizzazioni via plasma di acido acrilico hanno dimostrato una elevata tendenza alla decarbossilazione e una limitata stabilità all'ambiente acquoso. L'introduzione di anidride carbonica nel processo di polimerizzazione sembra migliorare il processo [81], mentre in studi più recenti le copolimerizzazioni dell'acido acrilico sono state spesso condotte con composti organici insaturi, come l'etilene, il butadiene e l'1,7-ottadiene [82][59][60] [83] o esano[113]. Tali ricerche hanno riportato buoni successi nel modulare la densità superficiale dei gruppi funzionali e in alcuni casi anche notevoli miglioramenti per quanto riguarda

la stabilità in ambiente acquoso [60]. In assenza di un deposito aderente le analisi relative ad adesione cellulare e adsorbimento chimico di biomolecole risultano prive di valore, in quanto in questi casi il segnale può dipendere più dal comportamento del substrato sottostante che dalle caratteristiche del film.

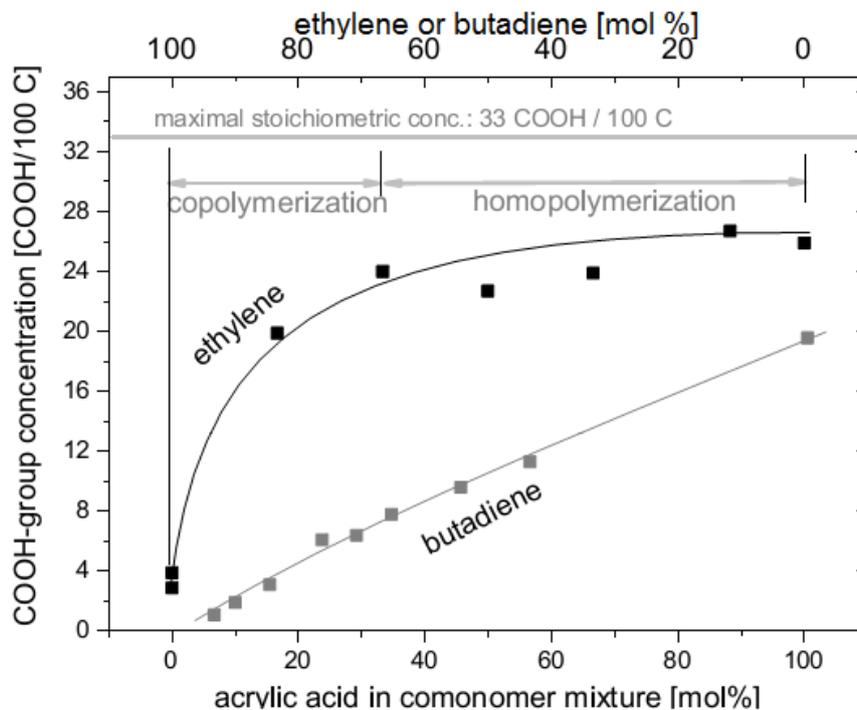


Figura 24: Influenza delle quantità relative dei due monomeri in una tipica copolimerizzazione via plasma [94]

In Figura 24 si può vedere che l'utilizzo di etilene, come agente copolimerizzante, permette di raggiungere, in regime di copolimerizzazione, concentrazioni di gruppi -COOH sostanzialmente uguali a quelle ottenuta dall'omopolimerizzazione dell'acido acrilico. L'utilizzo di butadiene, invece, diminuisce notevolmente tale concentrazione.

L'importanza di poter disporre di rivestimenti stabili al contatto con l'acqua ha spinto autori ad indagare in tale direzione. Utilizzando acido acrilico omopolimerizzato in regime di plasma pulsato, con un'attenta ottimizzazione di potenza e *duty cycle*, è stata ottenuta una funzionalizzazione che, dopo il contatto con l'acqua, ha mantenuto tra il 3 e il 4% dei gruppi carbossilici [114]. Anche attraverso l'utilizzo di modalità continua di sono ottenuti valori simili [115].

Tramite copolimerizzazione, con l'utilizzo di 1,7-ottadiene e acido acrilico ad elevate potenza è stato misurato un sensibile aumento di stabilità in ambiente acquoso, che ha consentito di rilevate percentuali di gruppi carbossilici dopo il lavaggio pari al 6% [116].

I processi di copolimerizzazione garantiscono anche un notevole controllo sulla densità dei gruppi funzionali presenti sul deposito [110]. Anche questa è una caratteristica importante per regolare la risposta biologica a film dedicati ad espletare funzioni di supporto e adesione cellulare. La copolimerizzazione permette di usufruire dei vantaggi propri legati all'utilizzo di diversi precursori e delle interazioni che questi hanno nel processo di polimerizzazione [117]. La strategia che ha dato i risultati più incoraggianti è quella di utilizzare due precursori, uno dei quali contiene il gruppo funzionale che si vuole mantenere sul film depositato, mentre l'altro agisce come agente polimerizzante o reticolante nei confronti del primo. Un esempio di interesse specifico è l'utilizzo di acido acrilico con etilene o stirene o altri composti insaturi [116] [83] [60], in cui sono state ottenute densità di gruppi –COOH superficiali da 10^{14} a 10^{18} gruppi / cm^2 .

L'analisi XPS di film depositati con copolimerizzazione di etanolo e acido acrilico (pdEtAA, *plasma deposited Ethylene – Acrylic Acid*) ha evidenziato una notevole resistenza all'acqua, infatti il contributo al picco C1s dovuto ai gruppi carbossilici è diminuito molto poco, passando dal 12.7 all'11.5% [110].

3.3 Proprietà dei rivestimenti a funzionalizzazione carbossilica

Per preparare depositi con caratteristiche controllate è fondamentale uno studio approfondito delle relazioni che legano i parametri di processo al risultato finale. Alcuni esempi sono già stati forniti, essendo necessari per illustrare i meccanismi generali coinvolti nelle polimerizzazioni assistite da plasma. In questo paragrafo l'attenzione sarà invece focalizzata sui depositi ppAA (*plasma polymerized acryli acid*), ottenuti dall'omopolimerizzazione di acido acrilico [75].

In Figura 22 a pagina 43 è stata illustrata l'andamento della velocità di crescita del film al variare del duty cycle e si è confrontato il comportamento dell'acido acrilico con quello dell'acido propionico. L'aumento della velocità di deposizione non è lineare, risulta quindi interessante studiare l'andamento di tale velocità nei confronti del tempo effettivo di accensione del plasma, a diversi valori di *duty cycle*.

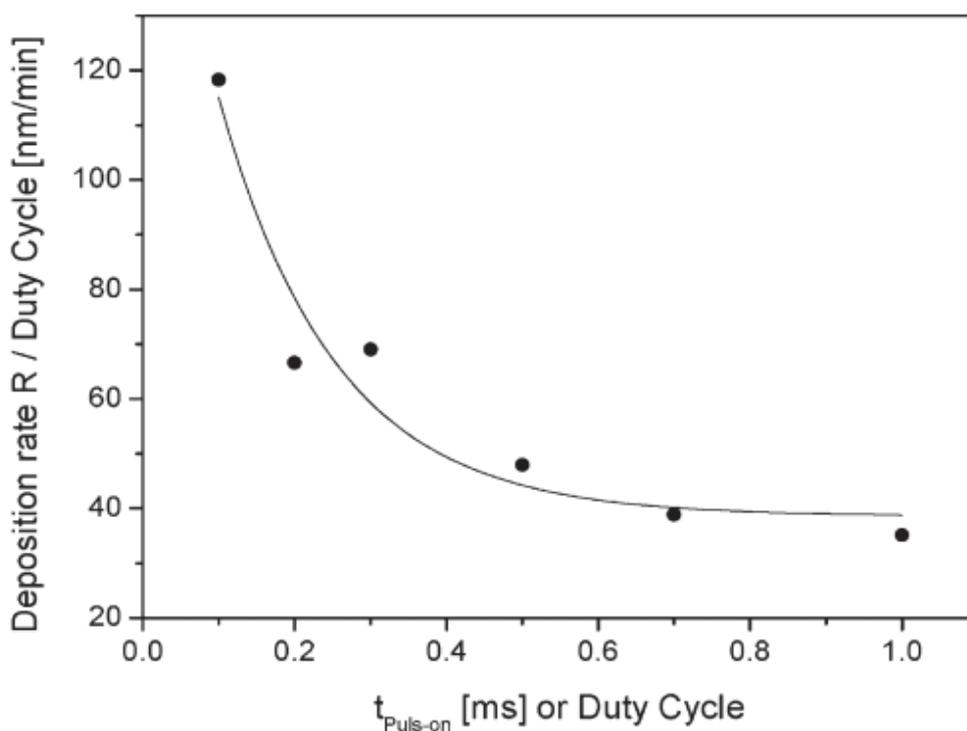
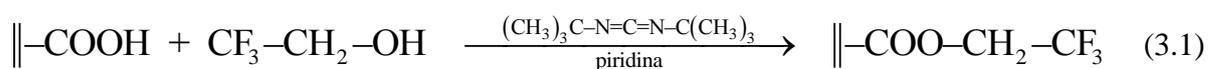


Figura 25: Velocità di deposizione normalizzata rispetto al duty cycle [75]

Dal grafico in Figura 25 si può notare come la velocità di deposizione effettiva cresce al diminuire del *duty cycle*. Tale comportamento sottolinea il ruolo rivestito, in questi processi, dai fenomeni di polimerizzazione che avvengono durante i tempi in cui il plasma è spento. Valori bassi di *duty cycle*, inoltre portano alla formazione di film dalla struttura più regolare, come già si è accennato.

Il *duty cycle* influenza anche la densità dei gruppi funzionali presenti nel ppAA, che comunque rimane inferiore al valore teorico, posseduto dal polimero lineare ideale, rappresentato in Figura 26 a. In tale configurazione esattamente un terzo degli atomi di carbonio presenti fa parte di un gruppo carbossilico, il valore percentuale del numero dei gruppi carbossilici rispetto al numero totale degli atomi di carbonio è, dunque, del 33%. Con un valore di d.c. pari a 0.1 la percentuale raggiunta dal ppAA arriva al 18.3%. La misura è stata eseguita tramite derivatizzazione dei gruppi –COOH con TFE (trifluoroetanolo), secondo la reazione:



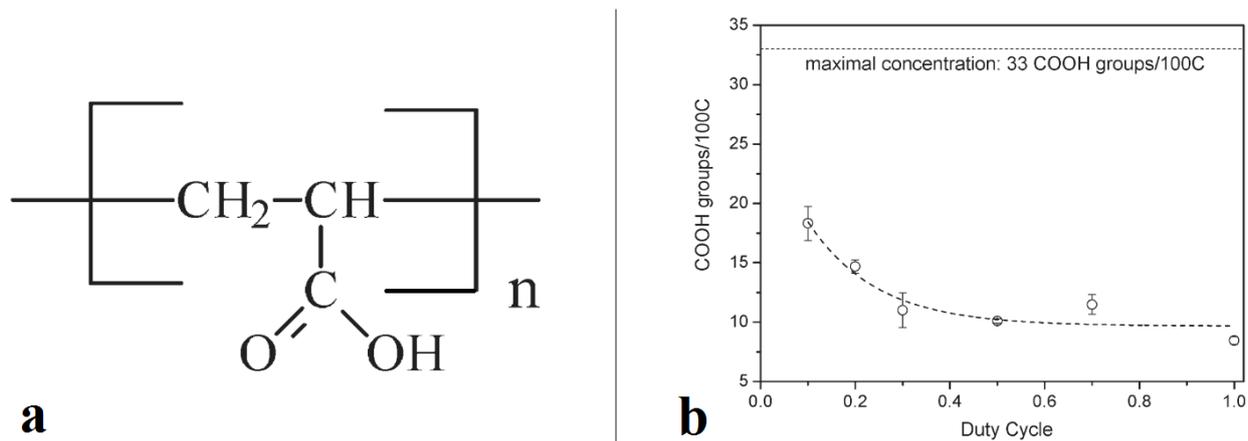


Figura 26: Struttura del polimero dell'acido acrilico e ritenzione dei gruppi $-COOH$ nel ppAA[75]

Anche se la densità dei gruppi carbossilici del ppAA è inferiore a quella del polimero classico, l'identità chimica del polimero si rivela piuttosto simile all'analisi FT-IR.

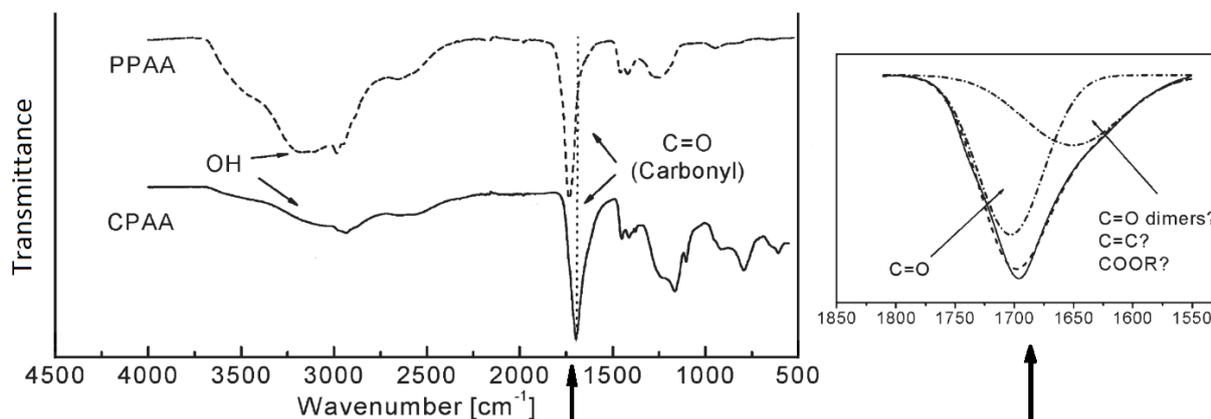


Figura 27: Spettri IR del polimero classico (CPAA) e di quello ottenuto tramite PECVD (ppAA) [75]

In Figura 27 si può notare il segnale relativo allo stretching dei gruppi $-OH$, costituito dall'ampia banda indicata, è maggiore nel ppAA rispetto al polimero tradizionale, come ci si può aspettare vista la molteplicità delle strutture chimiche generate dal plasma. Il segnale sotto ai 1450 cm^{-1} è dovuto al *bending* dei gruppi CH (1451 – 1412 cm^{-1}) e dei gruppi C–O–H (1234 – 1167 cm^{-1}).

Il dettaglio della regione tra i 1800 e i 1550 cm^{-1} mostra come non sia presente, nel caso del ppAA, un picco singolo. Infatti oltre all'assorbimento di stretching del legame C=O è presente almeno un altro contributo, attribuito a dimeri formati dal gruppo C=O, a doppi legami C=C o a gruppi esterei generati da auto condensazioni del monomero. L'analisi di questo assorbimento tramite fit con due gaussiane e stima del peso relativo dei due contributi ha restituito risultati confrontabili con quelli

forniti dall'analisi XPS. La curva di assorbimento è stata modellata tramite 3 gaussiane, la principale, centrata 1735 cm^{-1} è attribuita a legami C=O estranei al gruppo carbossilico, quella centrata a 1703 cm^{-1} ai gruppi $-\text{COOH}$ mentre la terza (1651 cm^{-1}) ai dimeri indicati in precedenza. Il peso (A) con cui vanno sommate le gaussiane per simulare il picco è stato utilizzato per stimare la concentrazione (k) dei gruppi secondo la relazione:

$$k = \frac{A_{1703}}{A_{1735}} \quad (3.2)$$

Ottenendo i risultati in Figura 28

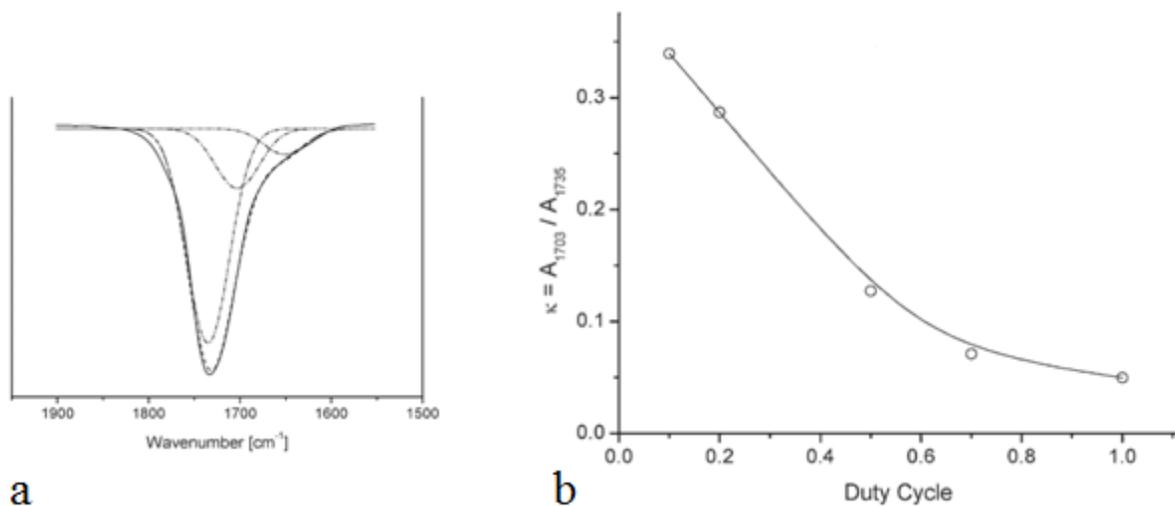


Figura 28: Fit del picco dello spettro IR (a) e stima della concentrazione dei gruppi carbossilici (b)[75]

Tutte le evidenze sperimentali hanno dimostrato che per ottenere elevate concentrazioni di gruppi carbossilici è consigliato l'utilizzo di una polimerizzazione a plasma pulsato, con valori bassi di *duty cycle* e un'accurata ottimizzazione di tutti i parametri di processo, valutando sempre l'effetto sinergico degli stessi, vista la loro molteplicità e le loro complesse interazioni con i fenomeni attivi in seno al plasma.

Altri autori hanno effettuato la misura del grado di funzionalizzazione tramite analisi TBO (*toluidine blue-O test*), che si basa sulla capacità di un colorante cationico di legarsi, in ambiente basico, ai gruppi carbossilici deprotonati. Sono stati indagati in questo modo gli effetti sulla funzionalizzazione, e sulla resistenza all'ambiente acquoso della stessa, dell'utilizzo di diverse

potenze di plasma nella copolimerizzazione di acido acrilico ed etilene [110], riportando i risultati indicati in Figura 29.

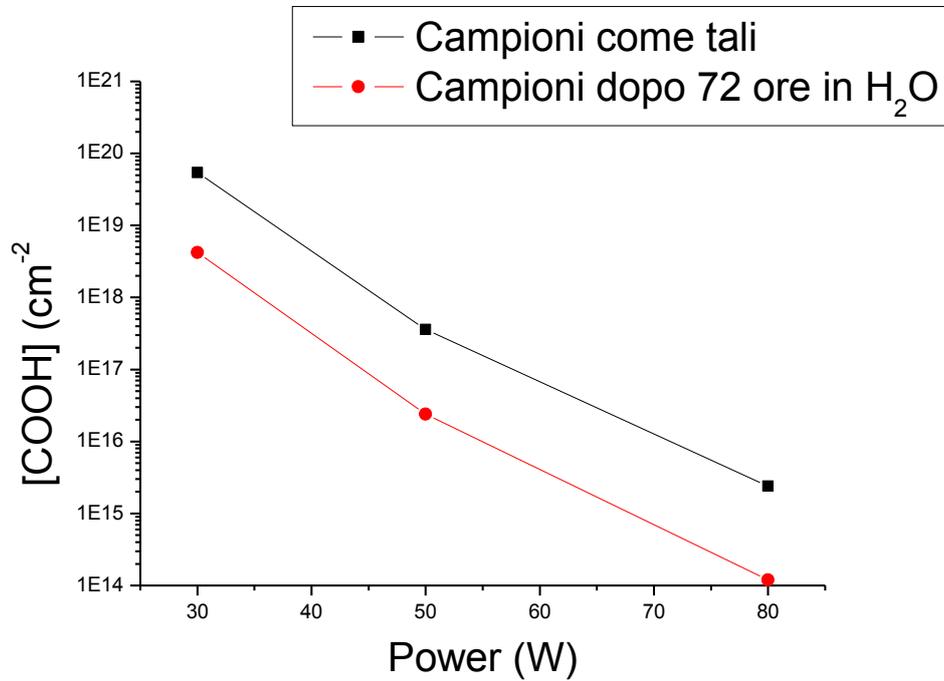


Figura 29: Grado di funzionalizzazione misurato tramite TBO [110]

I risultati indicano una buona stabilità in ambiente acquoso, non particolarmente influenzata dalla potenza usata nel processo di polimerizzazione, che invece incide notevolmente sulla quantità di gruppi carbossilici presenti nel deposito.

4 Procedure sperimentali

4.1 Materiali e strumenti

4.1.1 Substrati

Le deposizioni di film a funzionalizzazione carbossilica sono state effettuate su due differenti substrati:

- Wafer di silicio monocristallino, di tipo P con orientazione $\langle 100 \rangle$, fornito da Si-Mat. Lo spessore del wafer utilizzato è di $525 \pm 25 \mu\text{m}$ e la resistività del materiale compresa tra i 10 e i $20 \Omega \cdot \text{cm}$;
- Vetrini portaoggetti standard (25 mm x 75 mm) in vetro borosilicato.

È stato scelto effettuare la maggior parte dei depositi su wafer di silicio in quanto l'elevata omogeneità, la rugosità dell'ordine dell'angstrom e la trasparenza nell'IR ne fanno in questo caso un ottimo substrato analitico che permette di focalizzare l'analisi sulle caratteristiche dei rivestimenti depositati. Questo tipo di supporto, inoltre, ha comportamento inerte nei confronti dell'esposizione al vuoto e non libera composti organici che possano interferire con la polimerizzazione durante l'accensione del plasma. Queste caratteristiche permettono di ottenere la minima interazione con il film depositato, in modo da non ottenere falsi segnali in fase di caratterizzazione. L'elevata levigatezza superficiale del supporto di silicio ha permesso di apprezzare al meglio le caratteristiche morfologiche del deposito, anche tramite analisi AFM (*atomic force microscopy*). I depositi hanno presentato, a loro volta, bassissima rugosità ed elevata omogeneità. Tale caratteristica è stata utile anche per la misura dell'area superficiale dei campioni, essenziale per valutare la concentrazione dei gruppi funzionali depositati tramite test TBO (toluidine blue-O test).

I vetrini portaoggetti, di forma rettangolare, sono stati utilizzati per favorire le analisi, essendo adatti all'uso negli strumenti di caratterizzazione dedicati alle misure di fluorescenza, effettuate su microarray. Il carattere standardizzato di tali campioni permette, inoltre, un facile confronto con i dati precedentemente ottenuti e con quelli trovati in letteratura.

4.1.2 Precursori e gas di processo

Nel processo di attivazione superficiale sono stati utilizzati:

- Azoto (N_2)
- Idrogeno (H_2)

Per effettuare la deposizione dei film sottili sui substrati sono stati utilizzati:

- Acido metacrilico (MAA al 99.5%, stabilizzato della Acros Organics)
- Etilene (C_2H_4)
- Ossigeno (O_2)
- Argon (Ar)

Tutti i gas utilizzati sono stati forniti da Sapio Srl.

4.1.3 L'impianto di deposizione PECVD

L'impianto PECVD utilizzato per le deposizioni è un modello PORTA 900 (visibile in Figura 30) prodotto dalla Plasma Electronic con sede in Neuenburg (Germania).



Figura 30: Impianto PECVD utilizzato per le procedure sperimentali

La camera è di forma cubica, con lato pari a 0.9 m e permette grazie, alle notevoli dimensioni, un'ampia flessibilità di utilizzo per la preparazione di campioni voluminosi o di serie di numerosi campioni. L'apparecchio è dotato di 4 linee di gas, gestite da flussimetri a capacità termica della MKS e dedicate all'introduzione dei gas stessi in camera e di un sistema di miscelazione ed evaporazione che permette di introdurre, in fase aeriforme, monomeri che in condizioni ambientali si trovano allo stato liquido. Il sistema di evaporazione e miscelazione è composto da due flussimetri, una camera di miscelazione e una resistenza dotata di termostato, il tutto controllato via software. I flussimetri (Bronkhorst) sono gestiti da un programma (Flowview 1.17) che regola i flussi tramite un algoritmo PDE (*proportional, differential, integrative*) che permette di controllare il flusso di liquido con una sensibilità di 1 g/h. Il sistema di evacuazione della camera è costituito da una pompa a vite, una pompa *roots* e una pompa turbomolecolare. La pompa a vite viene utilizzata per generare il vuoto primario e può quindi venire affiancata ad una delle altre due pompe per raggiungere la pressione operativa; tale pressione può venire controllata anche mediante una valvola regolabile capace di parzializzare la conduttività dei condotti di evacuazione.

Il plasma è stato ottenuto mediante un generatore di radiofrequenza equipaggiato con sistema capacitivo di accoppiamento, come descritto nel paragrafo "2.4 Plasma in radiofrequenza" con possibilità di lavorare in regime pulsato e relativa regolazione del *duty cycle*.

La configurazione utilizzata è asimmetrica, con il catodo costituito dalla piastra orizzontale visibile in Figura 31.



Figura 31: Configurazione interna della camera di deposizione

Si può notare come l'area catodica sia notevolmente minore di quella anodica, che è rappresentata dalla superficie di tutte le pareti della camera, costituite da pannelli metallici intercambiabili. Il catodo poggia su supporti in teflon, che assicurano l'isolamento elettrico.

4.2 Procedura di deposizione

4.2.1 Preparazione dei substrati

I campioni di wafer di silicio monocristallino sono stati tagliati con punta di diamante innescando una cricca agli estremi del pezzo. In questo modo il campione ha subito il minor contatto possibile con superfici estranee ed è stata così facilitata e migliorata la fase di pulizia pretrattamento. Il carattere monocristallino del substrato ha permesso di ottenere superfici di frattura perfettamente rettilinee e perpendicolari tra loro. I campioni sono stati tagliati cercando di riprodurre il più fedelmente possibile delle forme quadrate, con lato di 2 cm. L'area di ciascun campione è stata misurata sia con metodi geometrici, sia per pesata, in modo di poter poi calcolare la densità dei gruppi funzionali depositati. Prima dell'introduzione in camera i campioni sono stati puliti con un flusso di CO₂, in modo da eliminare possibili polveri e impurezze depositate sulla superficie del campione.

I vetrini portaoggetto sono stati puliti con una soluzione di ammoniaca e acqua ossigenata al 50% in ultrasuoni, lavati in acqua Milli-Q e immersi in alcol etilico e infine asciugati in flusso di azoto. Tali campioni sono stati quindi preparati a fasce, con 4 depositi diversi, come illustrato in Figura 35, schermando di volta in volta la restante superficie con wafer di silicio e assicurando l'adesione dello stesso al substrato sottostante mediante nastro adesivo di *Kapton* (4,4'-ossidifenilene-piromellitimide). Questo film poliammidico è caratterizzato da elevata stabilità in un ampio intervallo di temperature e pressioni e non libera sostanze volatili che potrebbero influenzare il processo PECVD.

4.2.2 Attivazione superficiale

Questa procedura, effettuata con idrogeno e azoto, è stata eseguita per provocare un leggero *etching* superficiale del substrato e una funzionalizzazione amminica dello stesso. Lo scopo di questo trattamento è quello di ottenere micropulizia, attivazione e funzionalizzazione del materiale, ottimizzando così l'adesione del film carbosilico che verrà depositato immediatamente dopo questo processo.

L'attivazione superficiale è stata effettuata tramite plasma in radio frequenza (13.56 MHz), modalità continua, applicando una potenza di a 200 W, per 600 secondi. La capacità di pompaggio del sistema da vuoto è stata regolata per ottenere pressioni di circa 20 Pa. La composizione e la pressione del gas di processo, così come la potenza e la durata del trattamento, sono stati scelti sulla base dei risultati di precedenti ricerche per ottenere la migliore funzionalizzazione del substrato. In base ai dati a disposizione la massima funzionalizzazione amminica si ottiene con un rapporto molare tra azoto e idrogeno di 2 a 1[118].

4.2.3 Deposizione del film

I depositi ottenuti in questo lavoro di tesi sono stati preparati per copolimerizzazione di acido metacrilico con etanolo e per polimerizzazione di MAA in presenza di ossigeno. È stato utilizzato acido metacrilico, al posto di acido acrilico, per cercare di ottenere la massima stabilità in ambiente acquoso, riuscendo contemporaneamente a calibrare la concentrazione dei gruppi carbossilici depositati. Come è stato detto la resistenza al contatto con l'ambiente acquoso è legata al grado di reticolazione del polimero e la molecola di MAA ha una possibilità maggiore di generare strutture reticolate in virtù della sua struttura lievemente più complessa.

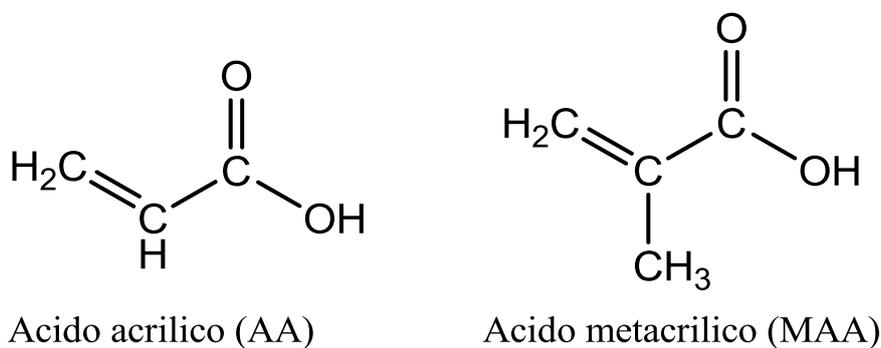


Figura 32: Confronto tra la struttura dell'acido acrilico e dell'acido metacrilico

La deposizione del film è stata sempre effettuata immediatamente dopo la fase di attivazione superficiale, utilizzando plasma in radiofrequenza, in regime pulsato, con *duty cycle* pari a 0.1.

La durata delle deposizioni è stata di 600 secondi per tutti i campioni, ottenendo depositi dagli spessori variabili tra 30 e 127 nm, in base ai parametri di processo utilizzati.

Sono state preparate diverse serie di campioni, variando la potenza, il flusso dei monomeri, la scelta degli stessi e le loro concentrazioni relative, al fine di individuare la strategia più adatta ad ottenere stabilità al contatto con l'acqua e concentrazione modulabile di gruppi funzionali.

Tutti i precursori sono stati prelevati direttamente allo stato gassoso, tranne l'acido metacrilico, che è stato introdotto in camera tramite evaporatore termostato a 45 °C insieme ad un flusso di argon regolato a 300 sccm (*standard cubic centimeters per minute*).

4.3 Procedura di caratterizzazione

I campioni preparati sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico – fisico e morfologico ed è stata testata la risposta biologica al contatto con alcuni di essi. La metodologia delle analisi strumentali viene qui descritta in modo conciso, limitandosi agli aspetti salienti o particolari che la hanno caratterizzata. Dove non diversamente specificato si sono seguite procedure standard di analisi. Le procedure che hanno comportato una manipolazione chimica sono invece descritte nel dettaglio.

4.3.1 Profilometria

Lo strumento utilizzato è un profilometro a stilo “Alpha-Step IQ Surface Profiler” di KLA Tencor, equipaggiato con stilo avente punta con raggio di 2 µm e angolo conico di 40°.

Sono state effettuate scansioni lineari dei profili lungo percorsi di 2 mm, registrando il profilo e lo spessore del film depositato. Ogni campione è stato analizzato in cinque diverse zone rappresentative dell'intero pezzo e i dati sono stati mediati, riportando valori di deviazione standard tra i 2 e i 4 nm.

4.3.2 Misura dell'angolo di contatto

Lo strumento FTA 1000, di First Ten Angstrom, ha permesso di valutare l'energia superficiale dei campioni, mediante misura dell'angolo di contatto. Questo apparecchio permette l'analisi, tramite un software di interpretazione di immagine, del profilo della goccia, della linea di base e dell'angolo di contatto.

La bagnabilità dei film depositati è stata valutata nei confronti di acqua Milli-Q. Le misure sono state effettuate tramite cattura dell'immagine e analisi della stessa dieci secondi dopo il primo contatto della goccia col campione. In caso di superfici molto idrofile è stato eseguito anche un fit profilometrico manuale, come nel caso illustrato nella sezione a destra di Figura 33.

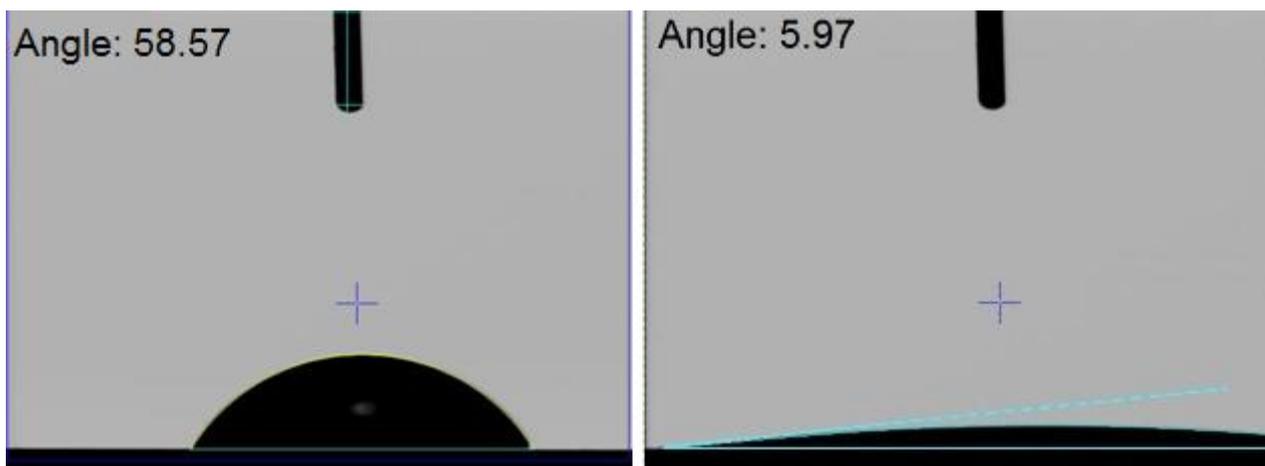


Figura 33: immagini catturate per la misura di bagnabilità

4.3.3 Spettroscopia FT – IR

Lo spettrometro in trasformata di Fourier utilizzato in fase di caratterizzazione è uno “Spectrum One” di Perkin Elmer. Tale strumento consente di analizzare materiali in film, polveri e liquidi, tramite analisi dei modi normali di vibrazione dei gruppi funzionali contenuti nelle molecole del campione. Gli spettri sono stati raccolti in trasmittanza, in un range compreso tra 4000 cm^{-1} e 700 cm^{-1} , effettuando 64 scansioni per ogni analisi.

4.3.4 Analisi TBO

L'analisi TBO (*toluidine Blue-O test*) è stata eseguita per valutare la quantità di gruppi carbossilici presenti su ogni campione. Il blu di toluidina è un colorante cationico che ha la capacità di legarsi in rapporto 1:1 ai gruppi carbossilici, attraverso interazioni ioniche, quando questi si trovano nella forma deprotonata, come avviene in ambiente basico (pH 10) [108].

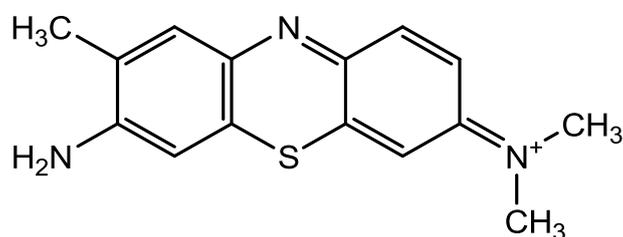


Figura 34: molecola TBO (toluidine blue-O)

Per eseguire questo test si è preparata una soluzione $5 \times 10^{-4}\text{ M}$ di TBO tramite dissoluzione del prodotto in polvere (Sigma Aldrich) in una soluzione acquosa di NaOH a pH 10. I campioni sono stati quindi immersi in tale soluzione e incubati a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 5 ore. Dopo tale periodo i campioni

sono stati estratti dal colorante e sciacquati abbondantemente con soluzione acquosa di NaOH a pH 10 per rimuovere tutte le molecole di TBO non legate ai gruppi carbossilici. Ogni campione è quindi stato risciacquato in una provetta tramite un volume calibrato di soluzione di acido acetico al 50% . Infine si è determinata la densità ottica di tale soluzione tramite spettrofotometro (Implen, München, Germany) e, tramite retta di tarature si è risaliti al numero di gruppi carbossilici presenti sul campione. La superficie di ciascun campione è stata misurata sia per pesata (prima della deposizione) sia tramite misure geometriche, rendendo infine possibile calcolare la concentrazione di gruppi carbossilici ottenuta su ogni campione. I campioni sono stati immersi nella soluzione colorante a pH 10 tramite l'utilizzo di una rastrelliera porta vetrini adattata all'uso con i campioni di silicio, in questo modo è stato possibile effettuare tutte le analisi in due tornate cercando così di ottenere dati il più confrontabili possibile.

4.3.5 Adesione di oligonucleotidi e anticorpi

Dopo aver determinato i parametri di processo da utilizzare, mediante i dati raccolti sui campioni di silicio, sono state preparate due serie di vetrini portaoggetto. Su una serie di vetrini sono state depositate 4 fasce di ppMAA (*plasma polymerized Methacrylic Acid*) preparate a diverse potenze, mentre sull'altra serie le 4 fasce differiscono per la concentrazione di ossigeno presente nel gas di processo, come illustrato in Figura 35. Tali campioni sono stati successivamente utilizzati per deposizione di microarray.

| | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Fascia preparata senza O ₂ | Fascia con O ₂ a 50 sccm | Fascia con O ₂ a 100 sccm | Fascia con O ₂ a 150 sccm |
| Fascia preparata a 500 W | Fascia preparata a 1000 W | Fascia preparata a 1500 W | Fascia preparata a 2000 W |

Figura 35: Aspetto schematico dei campioni preparati a fasce graduate

I risultati della caratterizzazione sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando vetrini commerciali funzionalizzati (e-surf LifeLine slides - 25 mm × 75 mm - LifeLineLab, Pomezia, Italy). I campioni preparati con tecnica PECVD hanno consentito di legare molecole a funzionalità amminica in seguito ad attivazione dei gruppi carbossilici superficiali. Il prodotto commerciale,

invece, permette il legame diretto di oligonucleotidi ammino – modificati, attraverso la funzionalizzazione di tipo NHS (N-idrossisufosuccinimide) presente.

I campioni su cui è stato effettuato il deposito carbossilico tramite PECVD sono stati trattati con EDC (1-etil-3-[dimetilamminopropil]carbodiimide cloridrato, Sigma Aldrich) e con S-NHS (sulfo N-idrossisufosuccinimide, Sigma Aldrich) per attivare I gruppi carbossilici e migliorare l'efficienza della reazione di accoppiamento.

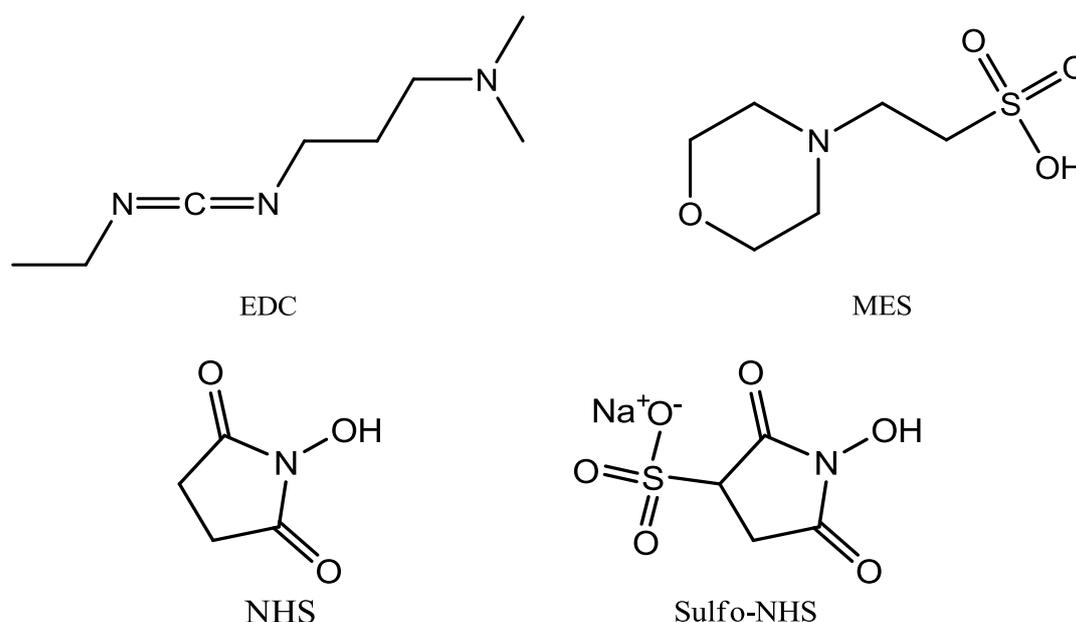


Figura 36 Molecole utilizzate per l'analisi di fluorescenza su microarray

I campioni sono state quindi immersi in una soluzione 5 mM di EDC and S-NHS in un buffer di MES (0.1 M acido 2-[N-morfolino] etanosulfonico e NaCl 0.5M, a pH 6), per 15 minuti, risciacquati con acqua deionizzata – MilliQ e asciugati in centrifuga. La deposizione è stata eseguita immediatamente sia sui campioni sperimentali attivati, sia su quelli commerciali con la procedura descritta di seguito.

Un oligonucleotide di DNA coniugato con fluoroforo Cy3 al terminale 3' e ammino modificato (NH₂) al terminale 5' (fornito da IDT, Tema Ricerca, Bologna, Italy) è stato diluito in un buffer di stampa (concentrazione del buffer di stoccaggio: 300 mM fosfato di sodio, 0.02% Triton X-100 pH 8.5 diluito 4 volte per arrivare alla concentrazione d'uso) fino a raggiungere una concentrazione finale di 20 µM. Si è quindi caricata la soluzione in una piastra da 384 pozzetti e sottoposta a deposizione tramite il Microarray Spotter (Versarray Chip Writer Pro System, BioRad), utilizzando aghi di spottaggio Telechem SMP3 (Arrayit, Sunnyvale, CA, USA). Con la stessa tecnica sono stati

depositati vetrini con un anticorpo secondario Goat anti-Mouse IgG H&L (Chromeo™ 546) coniugato a fluoroforo (Abcam, Cambridge, UK). L'anticorpo è stato diluito in buffer di spottaggio (0.1M Na₃PO₄, 0.3M NaCl 0.01% Triton X-100, pH 7.2) alla concentrazione finale di 1mg/ml.

Finita la deposizione dell'oligonucleotide o dell'anticorpo, i vetrini sono stati incubati per una notte in una camera igrostatata al 75% di umidità relativa (μ Box, Quantifoil Instrument, Jena, Germany).

I vetrini sono stati analizzati appena conclusa la fase di incubazione e dopo 4 e 120 ore di immersione in tampone contenente SSC 330mM (Sodio Citrato) a temperatura ambiente. I vetrini sono stati scansionati utilizzando uno scanner laser GenePix 4000B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), e il software "GenePix Pro", per quantificare ed elaborare i segnali di fluorescenza normalizzati tramite sottrazione del background locale. Per ogni serie di spot sono state registrate le intensità di fluorescenza a 532 nm e calcolati i segnali medi e la deviazione standard, intesi come la media delle intensità medie degli spot relativi ad un unico trattamento.

Le prove di adesione e stabilità di acidi nucleici e anticorpi sono state eseguite con la collaborazione del gruppo biosensori di Nanofab.

4.3.6 Coltura cellulare

L'analisi della morfologia e dell'adesione cellulare sui substrati a funzionalizzazione carbossilica è stata eseguita tramite un esperimento di adesione alla superficie di una linea cellulare epiteliale.

Le cellule A549 derivanti da un carcinoma polmonare umano (A549, CCL-185™) sono state acquistate da ATCC (American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)). Le cellule sono state coltivate come suggerito da ATCC (terreno F12, siero fetale bovino al 10% e antibiotici - fornitori Lonza e GIBCO™, Life Technologies, Milano, Italia) e mantenute in atmosfera umida al 5% w/w di CO₂ e alla temperatura di 37°C. Per sterilizzare i campioni, prima della semina delle cellule, si è effettuata un'irradiazione UV per 1 ora. Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 10⁴ cellule vitali/cm² e il supporto è stato controllato per l'adesione e la morfologia cellulare dopo 4, 24 e 48 ore dalla semina. Come controllo di adesione sono state osservate cellule seminate alla stessa densità su supporti trattati per l'adesione (Sarstedt, Verona, Italy), mentre il controllo negativo è stato effettuato su vetrini portaoggetto non trattati.

La verifica dell'adesione cellulare è stata condotta presso i laboratori ECSIN (European Center for the Sustainable Impact of Nanotechnology).

4.3.7 SEM e AFM

Il microscopio elettronico a scansione utilizzato è un modello “VEGA TS 5130 LM” (Tescan).

Le analisi SEM sono state effettuate per controllare la morfologia dei depositi, i dati sono stati raccolti mediante il segnale fornito dagli elettroni secondari. Alcune immagini sono state raccolte su campioni parzialmente mascherati al fine di controllare l’aspetto del deposito in diretto confronto con il substrato sottostante.

Le analisi AFM sono state effettuate con un microscopio Ntegra, della NT-MDT equipaggiato con scanner piezoelettrici integrati. Questo strumento permette di effettuare scansioni in una regione di $75 \times 75 \times 75 \mu\text{m}^3$. Le immagini sono state elaborate tramite software SPIP (*Scanning Probe Image Processor*) ed è stato calcolato il coefficiente di rugosità del deposito insieme al profilo tridimensionale di alcuni campioni.

4.3.8 Ellissometria

Le ellissometrie sono state eseguite, su alcuni dei campioni preparati, con un ellissometro GES-5 (Sopra), in grado di effettuare misure a lunghezze d’onda comprese tra 250 e 2000 nm e con angoli di incidenza tra 7° e 90° . Le caratteristiche quantificabili con questo strumento sono: indice di rifrazione, porosità, rugosità e spessore di film o *multilayer* di svariati materiali. Le misure sperimentali sono state effettuate ad un angolo di 70° . I dati raccolti sono stati elaborati tramite software WinElli II (Sopra), che ha permesso il fit tramite modello di Cauchy, il quale esprime l’indice di rifrazione tramite la relazione:

$$n(\lambda) = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} + \dots \quad (4.1)$$

Questo modello è stato adottato per la sua capacità di simulare materiali trasparenti ed ha dimostrato di essere adeguato ai film analizzati, come si vede dalla coincidenza tra curva sperimentale e teorica (calcolata) dei parametri α e β in Figura 37.

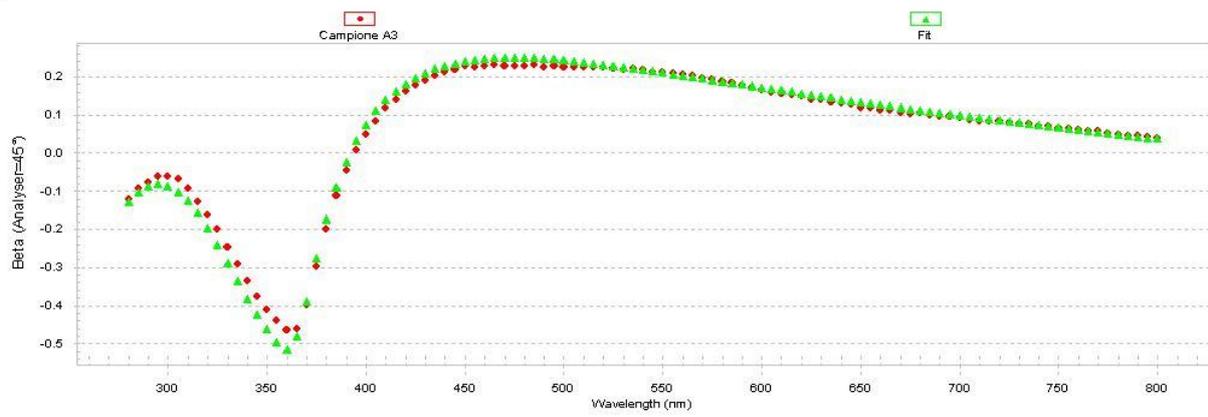
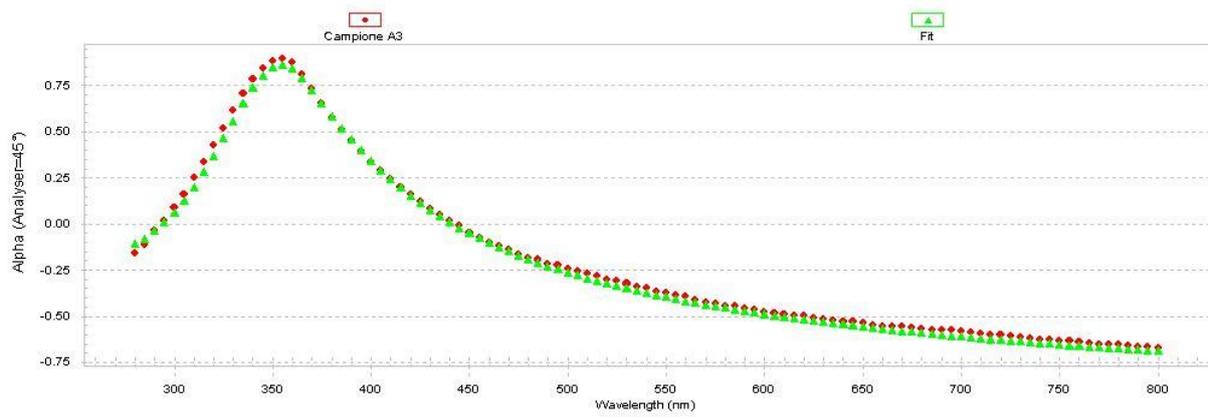


Figura 37: Fit tramite modello di Cauchy

5 Risultati

La caratterizzazione delle serie di campioni preparati ha fornito una notevole mole di dati, si è quindi deciso di esporre solo i risultati più significativi, cercando di individuare le correlazioni tra parametri di processo e caratteristiche del deposito.

Le misure riportate in fase di caratterizzazione hanno presentato deviazioni standard (σ) molto simili tra i diversi campioni, si è scelto quindi di riportare tali valori separatamente e di non ripeterli in ogni tabella, nei grafici invece sono visibili barre di errore che illustrano i dati sperimentali ricavati in ogni singola misura. Nella lettura delle tabelle va considerato che:

- Le misure di spessore del deposito presentano un valore di deviazione standard medio di 2 nm.
- Le misure degli angoli di contatto presentano un $\bar{\sigma} = 0,6^\circ$.
- L'errore sulle misure di concentrazione dei gruppi carbossilici, effettuate mediante analisi TBO, sono affette da un errore pari al 10% circa della misura.

L'analisi profilometrica ha testimoniato l'estrema compattezza, l'assenza di difetti e la bassissima rugosità dei depositi. Uno dei componenti di ogni serie di campioni è stato trattato dopo essere stato parzialmente schermato tramite nastro adesivo *Kapton*, in modo di poter effettuare la misura dello spessore del film depositato che verrà riportata nelle tabelle riassuntive presenti in questa sezione.

Il presente lavoro di tesi si basa sulle conoscenze acquisite in letteratura e sui risultati sperimentali ottenuti, sulla omopolimerizzazione assistita da plasma di acido metacrilico, dal gruppo di ricerca PECVD di Veneto Nanotech. I dati raccolti da tale gruppo di ricerca indicano che, utilizzando MAA al posto di AA, si ottiene un miglioramento della resistenza all'ambiente acquoso, ma tale vantaggio viene ottenuto soltanto utilizzando potenze medie o elevate. Nella fase iniziale di questo lavoro si è voluto indagare l'effetto dell'aggiunta di diverse concentrazioni di etilene nel gas di processo, per ottenere una copolimerizzazione ed eventualmente maggiore stabilità in acqua anche per depositi preparati a potenza modesta. Inizialmente gli altri parametri di processi sono stati mantenuti ai livelli risultati ottimali per la omopolimerizzazione di film di ppMAA, in particolare una potenza pari a 500 W e un flusso di acido metacrilico pari a 10 g/h.

5.1 Studio degli effetti della concentrazione di etilene

L'utilizzo di flussi crescenti di etilene ha fornito una serie di campioni dalle caratteristiche piuttosto simili, come si può vedere in Tabella 8.

| Deposizione | | | Caratterizzazione | | | |
|-------------|--------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|--|---|
| Potenza (W) | ϕ_{MAA} (g/h) | $\phi_{etilene}$ (sccm) | Spessore | Angolo di contatto (°) | Densità COOH (gruppi/cm ²) | Densità COOH dopo 72h in H ₂ O (gruppi/cm ²) |
| 500 | 10 | 0 | 62 | 46,3 | 1,3E+16 | 9,5E+15 |
| 500 | 10 | 30 | 55 | 48,6 | 1,3E+16 | 9,9E+15 |
| 500 | 10 | 50 | 59 | 47,4 | 1,3E+16 | 1,1E+16 |
| 500 | 10 | 70 | 74 | 47,2 | 1,2E+16 | 1,2E+16 |

Tabella 8: Risultati della caratterizzazione della serie di campioni prodotti con diversi flussi di etilene

In particolare si può osservare che la concentrazione di etilene influenza molto poco la velocità di crescita del film e gli effetti sono misurabili solo nel film prodotto con il flusso più elevato, che è risultato più spesso, per effetto della maggiore quantità di monomeri presente e forse anche grazie ad una maggiore resistenza del deposito rispetto ai fenomeni di *etching* chimico, sempre attivi nel plasma.

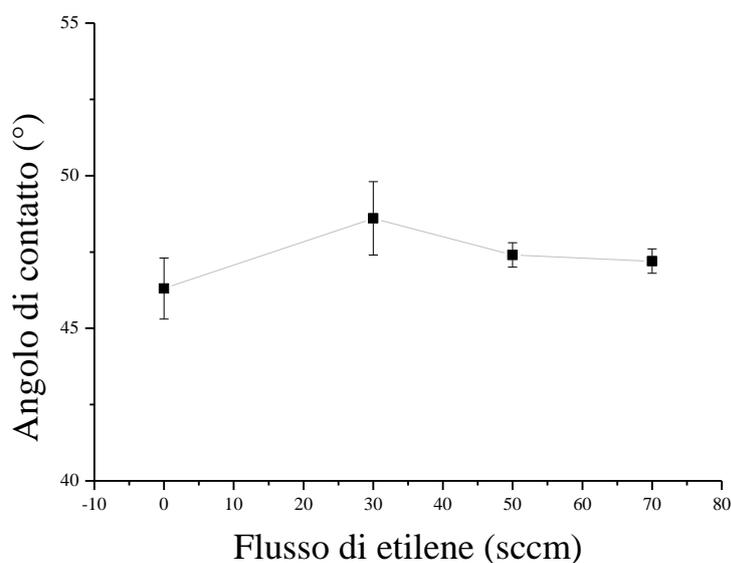


Figura 38: Angoli di contatto in funzione del flusso di etilene utilizzato

La misura dell'angolo di contatto dei campioni in esame ha restituito valori molto simili tra loro, come visibile in Figura 38, fornendo una prima indicazione circa la similitudine funzionale degli stessi.

L'analisi TBO dei campioni prima del contatto con l'acqua (indicatori neri in Figura 39) ha testimoniato una densità funzionale molto simile in tutti i casi, tanto che essa può essere considerata costante, dal momento che ogni misura rimane entro i margini di errore sperimentale delle altre.

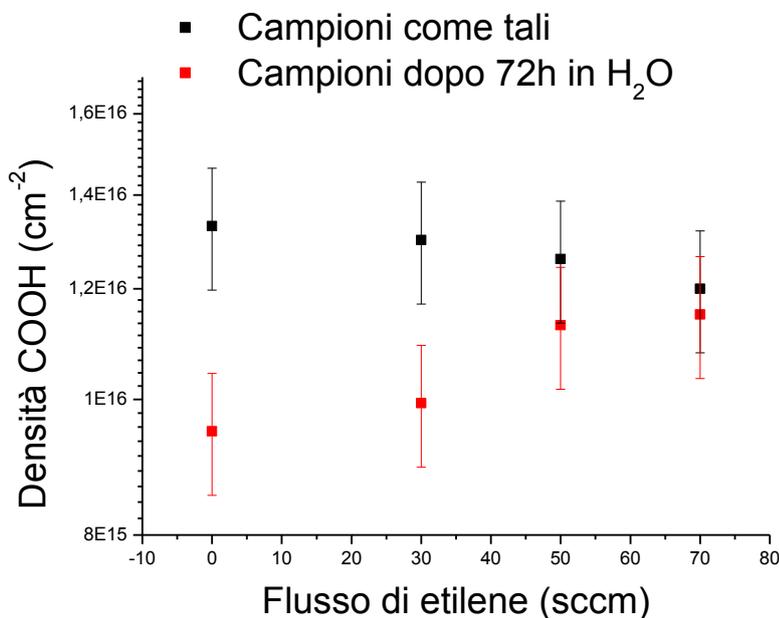


Figura 39: Analisi TBO dei campioni preparati con diversa concentrazione di etilene

I risultati ottenuti dopo 72 ore di permanenza dei campioni in acqua Milli-Q, invece, mostrano valori diversi tra loro, con una concentrazione maggiore al crescere della concentrazione di etilene nel gas di processo. Il flusso massimo utilizzato, in particolare, ha fornito campioni che non mostrano alcuna perdita di funzionalizzazione in seguito al contatto con l'ambiente acquoso. L'effetto è probabilmente attribuibile alla capacità dell'etilene di promuovere la reticolazione del film polimerico. La resistenza generale dei depositi all'ambiente acquoso rimane comunque buona, anche senza l'utilizzo di agente copolimerizzante, a differenza di quanto accade con l'acido acrilico, come è testimoniato da molteplici studi in letteratura.

Gli spettri infrarossi di questa serie di campioni si presentano molto simili. L'unica differenza chiaramente visibile tra le diverse misure è la progressiva scomparsa, per flussi di etilene crescenti, del picco a 1100 cm^{-1} (Figura 40). Questo segnale è dovuto allo stretching dei legami C–O, che possono far parte di un gruppo carbossilico, di un etere, di un estere o di un alcol.

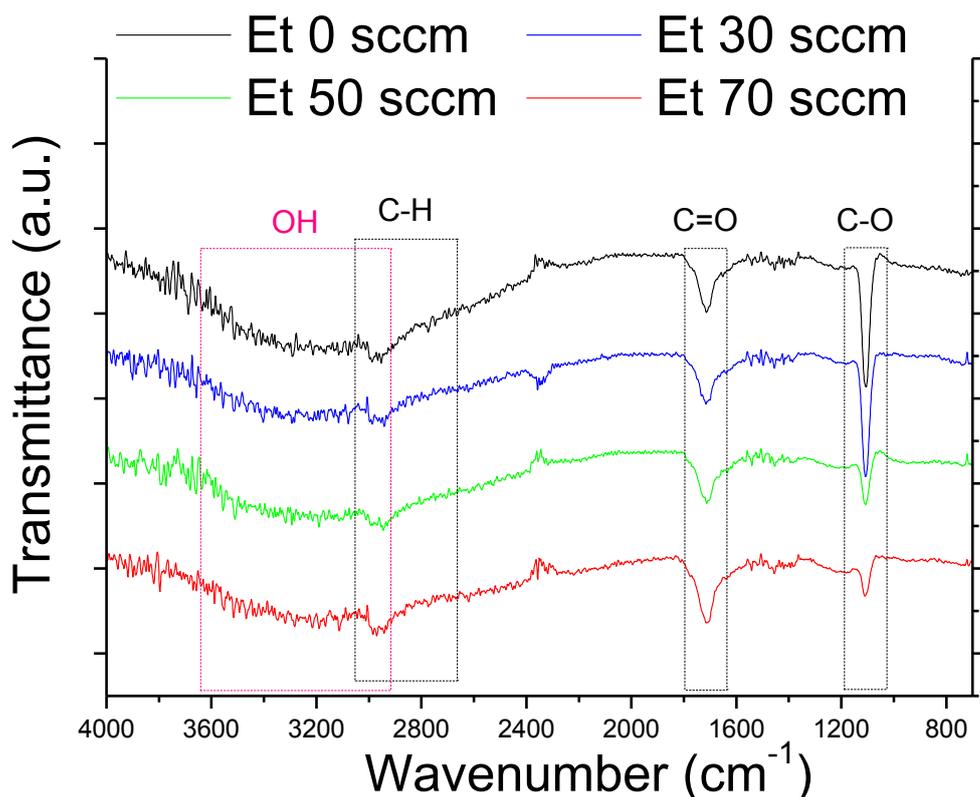


Figura 40: Confronto degli spettri IR dei campioni preparati con diversi flussi di etilene

La stabilità del picco relativo allo stretching del C=O ($1650 - 1750 \text{ cm}^{-1}$) e i risultati dell'analisi TBO, indicano una presenza di gruppi carbossilici costante. La diminuzione del segnale a 1100 cm^{-1} è stata quindi attribuita alla graduale scomparsa di legami C–O appartenenti a gruppi diversi da quello carbossilico. Tale comportamento è probabilmente legato alla minore disponibilità energetica, per unità di massa, presente a causa del flusso di monomero crescente, tale situazione potrebbe favorire i fenomeni meno energetici, inibendo invece la formazione di gruppi funzionali diversi da quelli presenti nei monomeri utilizzati.

L'analisi dei risultati raccolti ha suggerito di verificare se l'introduzione di etilene, nel gas di processo, possa influenzare le proprietà dei depositi ottenuti a potenza inferiore rispetto a quella usata fino a questo momento. Quest'ultima, pari a 500 W , aveva permesso di preparare i depositi di omopolimero ppMAA col migliore compromesso tra elevata densità di funzionalizzazione e stabilità al contatto con l'acqua. Utilizzando una potenza minore ci si aspetta una struttura del polimero più regolare e una maggiore selettività della funzionalizzazione ottenuta. Affiancare a queste caratteristiche una buona resistenza all'ambiente acquoso sarebbe auspicabile e rappresenta lo scopo di questa fase del lavoro sperimentale.

Sono state preparate tre serie di campioni a 200 W, ognuna con diversi flussi di etilene. Le caratteristiche dei depositi preparati a potenza analoga, in assenza di etilene, sono note dagli studi precedenti e non indicano sufficiente stabilità per applicazioni in ambito biologico. Il quadro generale dei risultati ottenuti è presentato in Tabella 9.

| Deposizione | | | Caratterizzazione | | | |
|-------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------|------------------------|--|---|
| Potenza (W) | ϕ_{MAA} (g/h) | ϕ_{etilene} (sccm) | Spessore | Angolo di contatto (°) | Densità COOH (gruppi/cm ²) | Densità COOH dopo 72h in H ₂ O (gruppi/cm ²) |
| 200 | 10 | 30 | 95 | 6,8 | 1,3E+15 | 9,9E+14 |
| 200 | 10 | 70 | 96 | 12,9 | 1,3E+15 | 1,1E+15 |
| 200 | 10 | 100 | 79 | 10,6 | 1,3E+15 | 1,1E+15 |

Tabella 9: Risultati della caratterizzazione della serie di campioni prodotti con diversi flussi di etilene a 200 W

Gli spessori di questi depositi sono risultati superiori a quelli dei film preparati precedentemente, probabilmente grazie alla minore incidenza dei fenomeni di *etching* causato dal plasma meno energetico.

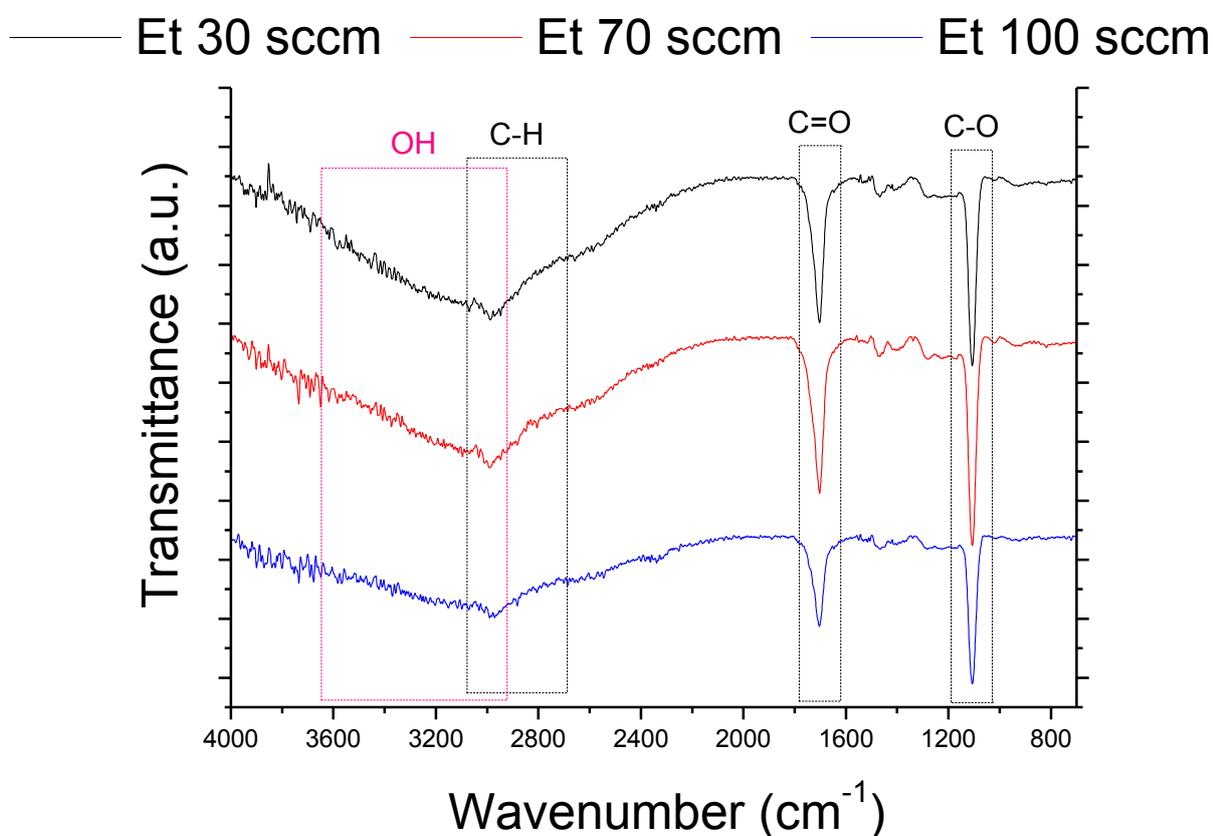


Figura 41: Spettri IR dei campioni preparati a 200 W

La bagnabilità di questi film risulta estremamente elevata, probabilmente per la presenza di una quota elevata di gruppi OH, testimoniata dall'intensa banda, tra i 3600 e i 2800 cm^{-1} (zona degli stretching O-H, C-H ed N-H) presente negli spettri IR in Figura 41. Tale banda si presenta estremamente allargata e piuttosto intensa, di difficile interpretazione anche per la molteplicità dei segnali, tutti allargati, presenti in questa zona. Dal confronto con i risultati ricavati in precedenza si nota che la definizione dei picchi risulta molto superiore a quella relativa a campioni preparati a 500 W. Questo comportamento è in accordo con quanto atteso da un plasma meno energetico, che produce polimeri con struttura e funzionalizzazione più definite.

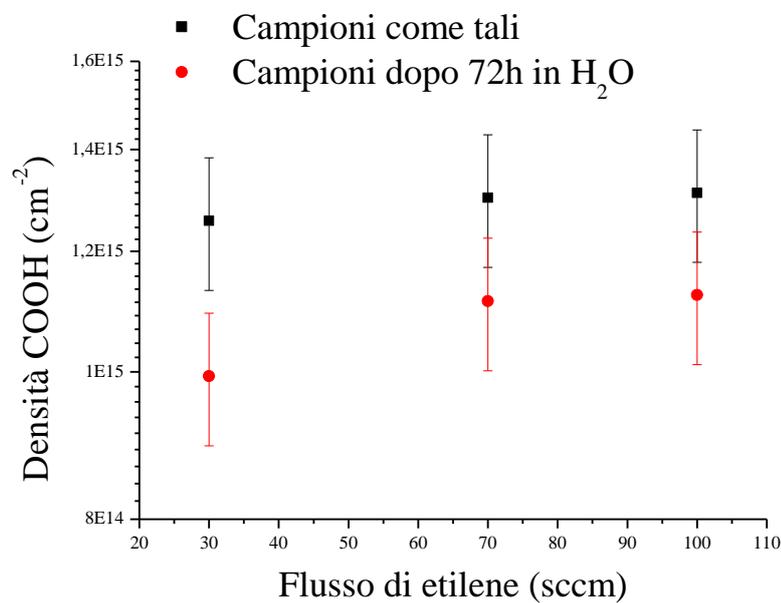


Figura 42: Densità dei gruppi COH della serie di campioni preparati a 200 W e con diversi flussi di etilene

Le analisi TBO mostrano valori minori di un ordine di grandezza rispetto a quelli ottenuti a potenza superiore, ma l'andamento con la crescita del flusso di etilene è analogo. I risultati di questa procedura analitica indicano una buona resistenza all'ambiente acquoso. Anche in questo caso, per flussi di etilene pari o superiori a 70 sccm, si ottiene una perdita di funzionalizzazione carbossilica che ricade nell'intervallo di incertezza sperimentale e quindi trascurabile.

Nonostante la stabilità misurata con il test TBO, l'aspetto dei film dopo il contatto con l'acqua testimonia un'estesa rimozione del deposito. Questi due risultati, apparentemente contrastanti, potrebbero essere attribuiti alla bassa stabilità coesiva del film, legata probabilmente ad una reticolazione insufficiente, accompagnata però da una buona adesione tra il film e la funzionalizzazione amminica depositata sul wafer di silicio. Questo potrebbe causare una

dissoluzione del film in acqua, mantenendo soltanto una funzionalizzazione carbossilica superficiale del substrato, spiegando così le caratteristiche osservate. La permanenza di funzionalizzazione carbossilica va attribuita all'effetto dell'etilene, dal momento che i depositi analoghi, ottenuti per omopolimerizzazione di acido metacrilico, non offrono resistenza al contatto con l'acqua.

Prima della permanenza in acqua, le densità di gruppi carbossilici presenti su questi campioni sono quasi coincidenti con quelle dei campioni preparati in modo analogo, ma senza etilene, mentre dopo 72 ore di immersione si osservano valori sensibilmente diversi. Nel caso dell'omopolimero, infatti, il decremento funzionale è stato pari al 63% (da $1.0 \cdot 10^{15}$ gruppi/cm² a soli $3.7 \cdot 10^{14}$), mentre con la copolimerizzazione si raggiunge stabilità più marcata. I dati forniti dall'analisi TBO mostrano che il grado di funzionalizzazione dei campioni preparati a 70 sccm di etilene è analogo a quello relativo ad un flusso di 100 sccm, così come la stabilità all'acqua; si è dunque scelto il flusso di 70 sccm come parametro di riferimento.

La dissoluzione del film al contatto con l'acqua e la densità funzionale ottenuta, minore di quella relativa a potenze maggiori, hanno indotto a non approfondire ulteriormente lo studio dei film preparati a basse potenze, che potrà eventualmente essere sviluppato in lavori di ricerca successivi.

5.2 Studio degli effetti della potenza

Nel caso dei copolimeri acido acrilico – etilene, la variazione della potenza del plasma ha permesso di preparare depositi con densità funzionale variabile su oltre 4 ordini di grandezza [110]. Si è quindi voluto indagare in tal senso anche per quanto riguarda il comportamento dei copolimeri contenenti acido metacrilico.

| Deposizione | | | Caratterizzazione | | | |
|-------------|---------------------------|--------------------------------|-------------------|------------------------|--|---|
| Potenza (W) | ϕ_{MAA} (g/h) | ϕ_{etilene} (sccm) | Spessore | Angolo di contatto (°) | Densità COOH (gruppi/cm ²) | Densità COOH dopo 72h in H ₂ O (gruppi/cm ²) |
| 200 | 10 | 70 | 96 | 12,9 | 1,3E+15 | 1,1E+15 |
| 350 | 10 | 70 | 69 | 20,8 | 2,3E+15 | 1,9E+15 |
| 500 | 10 | 70 | 74 | 47,2 | 1,2E+16 | 1,2E+16 |
| 1000 | 10 | 70 | 70 | 58,2 | 1,7E+15 | 1,7E+15 |

Tabella 10: Analisi dell'effetto di potenze diverse sulle caratteristiche dei depositi ppEtMAA

I risultati ottenuti dall'analisi dell'angolo di contatto e dalla spettroscopia infrarossa indicano, come atteso, una graduale scomparsa dei gruppi OH all'aumentare della potenza di processo. Si osserva anche la netta diminuzione dei picchi a circa 1100 cm^{-1} , relativo ai gruppi C-O, che in questo caso è legata alla maggiore formazione, ad elevata potenza, di composti volatili, come CO_2 e CO . Questo comportamento dei plasmi energetici è testimoniata dalle spettroscopie di massa effettuate nei lavori di ricerca precedenti. Nei grafici si osserva anche che il picco corrispondente allo stretching dei legami C=O (e dei legami C=C) viene attenuato e subisce un allargamento. Tale comportamento si può probabilmente attribuire a causa della minore presenza di doppi legami tra atomi di carbonio e della struttura meno definita del deposito generati dall'esposizione a plasmi più energetici.

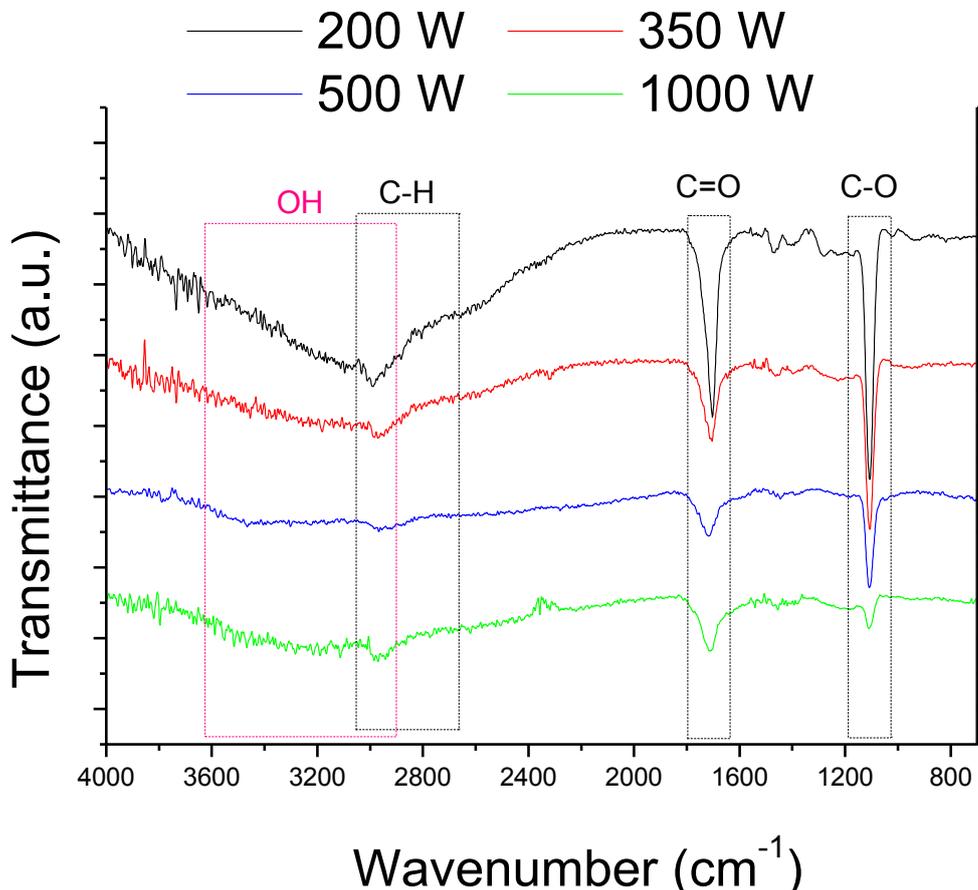


Figura 43: Spettri IR dei campioni preparati con diversa potenza

L'andamento della densità funzionale del deposito non è monotono, ma presenta un massimo in corrispondenza della potenza di 500 W, mentre a potenza doppia la diminuzione osservata è pari a un fattore 10, mentre in letteratura, per il copolimero ppEtAA, è stata misurata una variazione di

due ordini di grandezza passando da 30 a 50 W [110]. Va sottolineato che le potenze utilizzate in questo lavoro non sono confrontabili con altre in letteratura, essendo completamente diverse le dimensioni e la geometria degli impianti PECVD utilizzati.

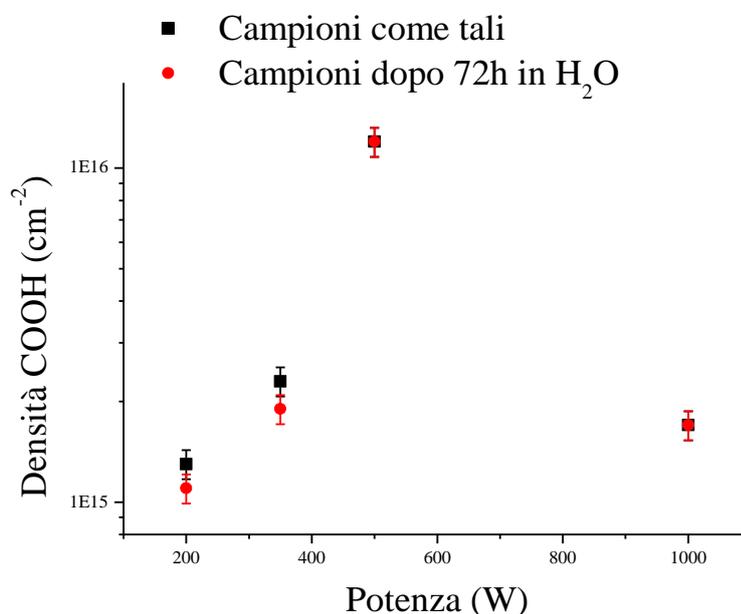


Figura 44: Analisi TBO della serie di campioni preparati con diversa potenza

I risultati di Figura 44 mostrano l'ottima stabilità in acqua di questi depositi, in quanto il grado di funzionalizzazione si può considerare inalterato dopo 72 ore di immersione per tutti i campioni. I campioni preparati con potenza pari a 500 e 1000 W, dopo permanenza in acqua, mostrano valori di densità di gruppi carbossilici uguali a quelli misurati prima dell'immersione. Questo comportamento è talmente evidente che gli indicatori relativi alle due misure appaiono totalmente sovrapposti nel grafico di Figura 44, come le rispettive barre di errore.

5.3 Studio degli effetti della concentrazione di acido metacrilico

In questa sezione si prosegue l'indagine riguardante i fattori di controllo del processo di copolimerizzazione analizzando l'effetto di diverse concentrazioni di acido metacrilico nel gas di processo, mantenendo il flusso di etilene costante a 70 sccm.

Una panoramica generale dei risultati ottenuti è presentata in Tabella 11.

| Deposizione | | | Caratterizzazione | | | |
|-------------|--------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|--|---|
| Potenza (W) | ϕ_{MAA} (g/h) | $\phi_{etilene}$ (sccm) | Spessore | Angolo di contatto (°) | Densità COOH (gruppi/cm ²) | Densità COOH dopo 72h in H ₂ O (gruppi/cm ²) |
| 500 | 5 | 70 | 49 | 62,0 | 8,6E+14 | 8,1E+14 |
| 500 | 10 | 70 | 74 | 47,2 | 1,2E+16 | 1,2E+16 |
| 500 | 15 | 70 | 78 | 24,2 | 1,8E+15 | 1,6E+15 |
| 500 | 20 | 70 | 127 | 7,0 | 1,7E+15 | 1,6E+15 |

Tabella 11: Analisi degli effetti di diverse concentrazioni di MAA nel gas di processo

I risultati della caratterizzazione presentano andamento in accordo con le previsioni teoriche, considerando che, nel determinare la quota energetica disponibile per unità di massa, un flusso maggiore di monomero ha effetti simili a quelli generati da una situazione di minore potenza, come previsto dalla teoria riassunta nell'espressione del fattore di Yasuda (paragrafo 2.7).

Flussi crescenti di acido metacrilico hanno permesso di preparare campioni molto simili, per angolo di contatto, densità funzionale e stabilità al contatto con l'acqua, a quelli preparati con potenza decrescente. Un confronto delle similitudini descritte è fornito in Tabella 12.

| Potenza (W) | ϕ_{MAA} (g/h) | Angolo di contatto (°) | Densità COOH (gruppi/cm ²) | Densità COOH dopo 72h in H ₂ O (gruppi/cm ²) | Y (W·h/g) |
|-------------|--------------------|------------------------|--|---|-----------|
| 1000 | 10 | 58,2 | 1,7E+15 | 1,7E+15 | 68 |
| 500 | 5 | 62,0 | 8,6E+14 | 8,1E+14 | 52 |
| 350 | 10 | 20,8 | 2,3E+15 | 1,9E+15 | 24 |
| 500 | 15 | 24,2 | 1,8E+15 | 1,6E+15 | 25 |
| 200 | 10 | 12,9 | 1,3E+15 | 1,1E+15 | 14 |
| 500 | 20 | 7,0 | 1,7E+15 | 1,6E+15 | 20 |

Tabella 12: confronto tra campioni con simile valore di Y

La variazione del flusso di etilene non aveva causato un effetto così marcato, ma questo comportamento viene spiegato dal confronto delle quantità di monomero in gioco, ottenuto convertendo i flussi in unità di misura omogenee tra loro⁷.

Un flusso di 100 sccm di etilene corrisponde a soli 7.41 g/h, mentre le variazioni della quantità di acido metacrilico effettuate coprono un intervallo di ampiezza superiore e generano quindi effetti più evidenti.

Le caratteristiche di stabilità in ambiente acquoso si sono mantenute a livelli ottimi in tutti i campioni considerati, come si può notare dai dati in Figura 45, che presenta valori praticamente coincidenti prima e dopo la permanenza in acqua dei campioni.

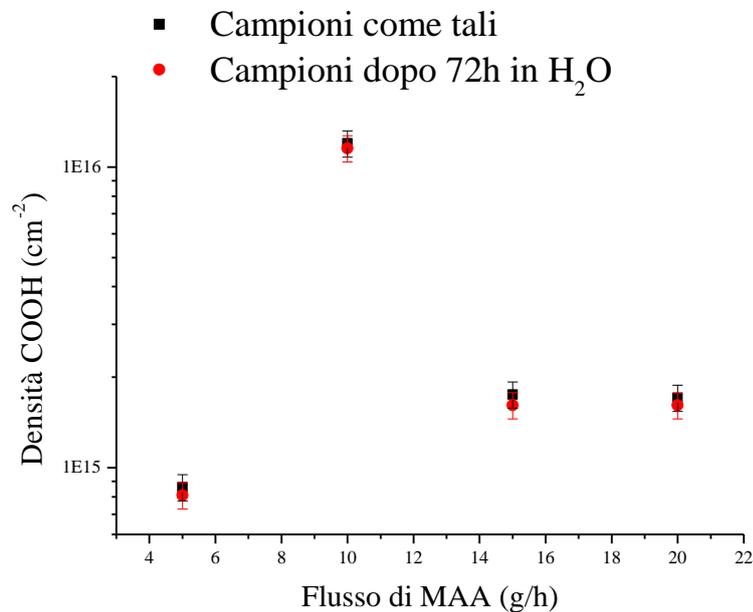


Figura 45: Analisi TBO della serie di campioni preparati con diversa concentrazione di MAA

7

$$STP: T = 273K, P = 1.00 \cdot 10^5 Pa, \Phi_{Et} = 100 sccm \rightarrow V_{Et} = 100 cm^3 = 1.00 \cdot 10^{-4} m^3$$

$$n_{Et} = \frac{PV}{RT} = \frac{1.00 \cdot 10^5 \cancel{Pa} \cdot 1.00 \cdot 10^{-4} \cancel{m^3}}{8.31 \frac{\cancel{Pa} \cdot \cancel{m^3}}{mol \cdot K} \cdot 273 \cancel{K}} = 4.41 \cdot 10^{-3} mol$$

$$\Phi_{Et} = 100 sccm = 4.41 \cdot 10^{-3} \frac{mol}{min} = 0.264 \frac{mol}{h} = 0.264 \frac{mol}{h} \cdot 28 \frac{g}{mol} = 7.41 \frac{g}{h}$$

I dati raccolti confermano l'ottima resistenza al contatto con l'acqua di tutti i film depositati per copolimerizzazione di acido metacrilico ed etilene, nonostante le notevoli differenze dei parametri di processo utilizzati nei diversi depositi. L'intervallo di variazione della densità di gruppi carbossilici si è esteso per poco più di un ordine di grandezza (da $8.6 \cdot 10^{14}$ a $1.3 \cdot 10^{16}$ COOH/cm²).

Un'analisi dei dati ottenuti, incrociata con informazioni di carattere biologico, ha portato all'ipotesi che una densità minore di funzionalizzazione possa essere utile per indurre una diversa risposta biologica. La fase successiva del lavoro sperimentale è stata perciò dedicata alla definizione di una metodologia volta a limitare la concentrazione della funzionalizzazione carbossilica ottenuta.

5.4 Studio degli effetti della concentrazione di ossigeno

La presenza di etilene ha mostrato effetti stabilizzanti a basse potenze di processo, ma le analisi effettuate non sono sufficienti per affermare l'applicabilità substrati preparati con tale metodo. Nei depositi effettuati a potenza più elevata, invece, gli effetti di tale monomero si rivelano poco sensibili, si è perciò scelto di preparare i nuovi depositi senza l'utilizzo di etilene. Nella miscela di reazione sono stati introdotti diversi flussi di ossigeno, al fine di ottenere una aggressione controllata della funzionalizzazione carbossilica, tramite l'elevata reattività dei radicali generati dall'ossigeno nel plasma.

I risultati ottenuti in fase di caratterizzazione sono riportati in Tabella 13.

| Deposizione | | | Caratterizzazione | | | |
|-------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------|------------------------|--|---|
| Potenza (W) | ϕ_{MAA} (g/h) | ϕ_{ossigeno} (sccm) | Spessore | Angolo di contatto (°) | Densità COOH (gruppi/cm ²) | Densità COOH dopo 72h in H ₂ O (gruppi/cm ²) |
| 500 | 10 | 0 | 62 | 46,3 | 1,3E+16 | 9,5E+15 |
| 500 | 10 | 30 | 50 | 25,7 | 6,8E+15 | 6,7E+15 |
| 500 | 10 | 50 | 42 | 8,0 | 1,4E+15 | 1,3E+15 |
| 500 | 10 | 70 | 32 | 5,6 | 1,1E+15 | 9,4E+14 |
| 500 | 10 | 100 | 31 | 6,8 | 1,2E+15 | 1,0E+15 |
| 500 | 10 | 150 | 30 | 6,2 | 4,1E+14 | 3,1E+14 |

Tabella 13: Serie di campioni preparati a diversa concentrazione di ossigeno

L'effetto di *etching* chimico da parte dell'ossigeno, sia in fase vapore sia sulla superficie del film, è testimoniato dalla diminuzione degli spessori di deposito ottenuti con flussi maggiori di tale gas. Questo effetto sembra comunque raggiungere un valore limite e non subire incrementi oltre la soglia dei 70 sccm di ossigeno, come illustrato in Figura 46.

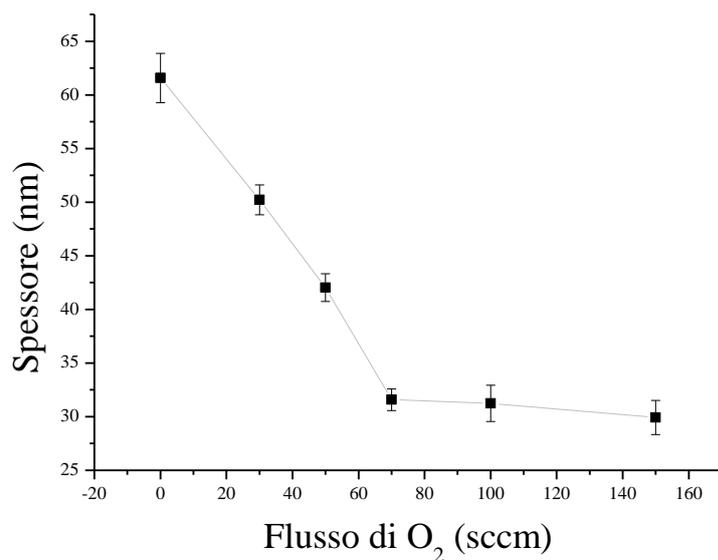


Figura 46: Spessore del deposito in funzione del flusso di ossigeno utilizzato

L'analisi degli spettri IR testimonia un incremento marcato della banda appartenente ai gruppi ossidrilici per flussi di ossigeno maggiori, in accordo con l'elevata idrofilicità di questi campioni.

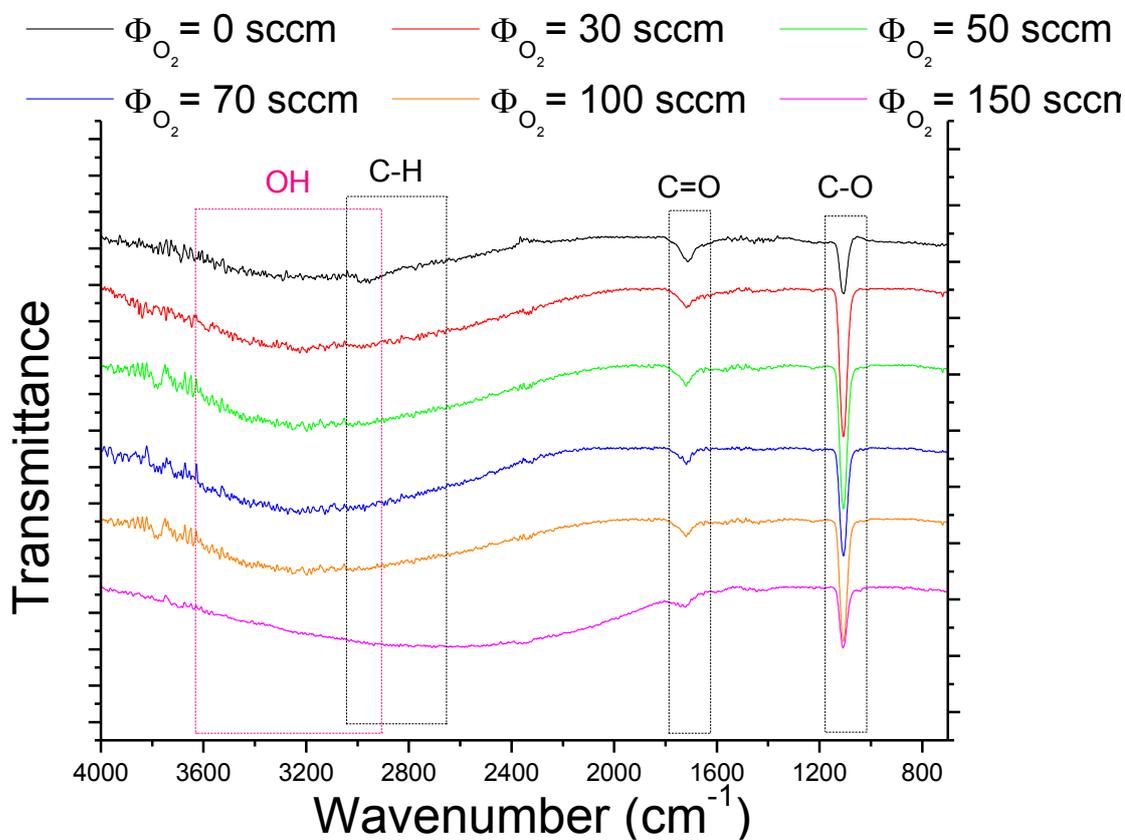


Figura 47: Spettri IR dei campioni preparati con diversi flussi di ossigeno

Contemporaneamente si assiste alla diminuzione e alla perdita di definizione del picco caratteristico del C=O. Ci si aspetta quindi, per flussi di ossigeno maggiori, un andamento decrescente della densità di gruppi carbossilici sulla superficie dei campioni.

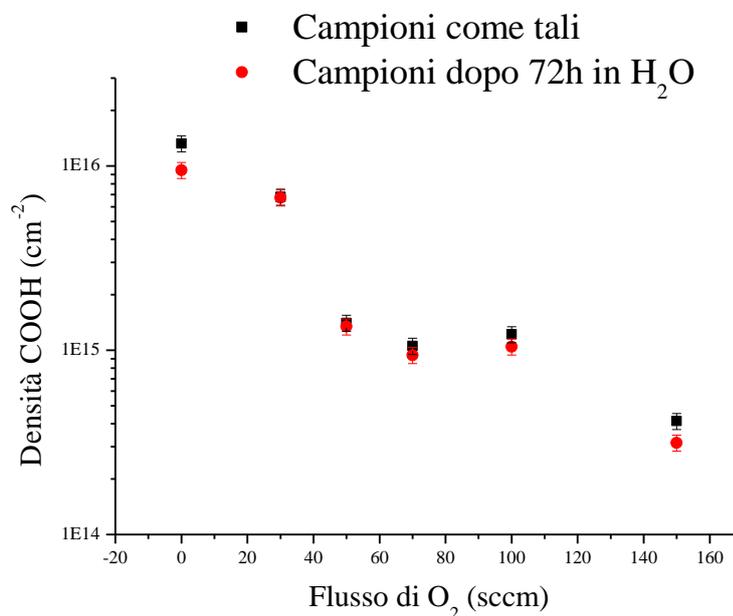


Figura 48: Analisi TBO della serie di campioni preparati con diversa concentrazione di ossigeno

L'analisi TBO fornisce definitiva conferma di questo comportamento, come visibile in Figura 48.

In tale grafico è possibile notare che l'utilizzo di ossigeno ha permesso di variare la densità dei gruppi carbossilici in un intervallo che si estende per quasi due ordini di grandezza. Un'ulteriore e importante caratteristica dei depositi preparati con quest'ultima strategia è la capacità di mantenere inalterata la densità di funzionalizzazione carbossilica, anche dopo 72 ore di immersione in acqua.

Si è quindi deciso di utilizzare la concentrazione di ossigeno come parametro per controllare la funzionalizzazione di una serie di campioni da caratterizzare rispetto alla risposta a elementi biologici.

Oltre alla serie di campioni preparati a diversi flussi di ossigeno è stata prodotta una serie di campioni di ppMAA (omopolimero) per verificare le caratteristiche di questi depositi al contatto con componenti biologiche. La caratterizzazione di questi campioni è stata effettuata nei lavori di ricerca precedenti al presente e tra le analisi effettuate è presente anche quella relativa alla tecnica XPS, che ha fornito i risultati in Figura 49

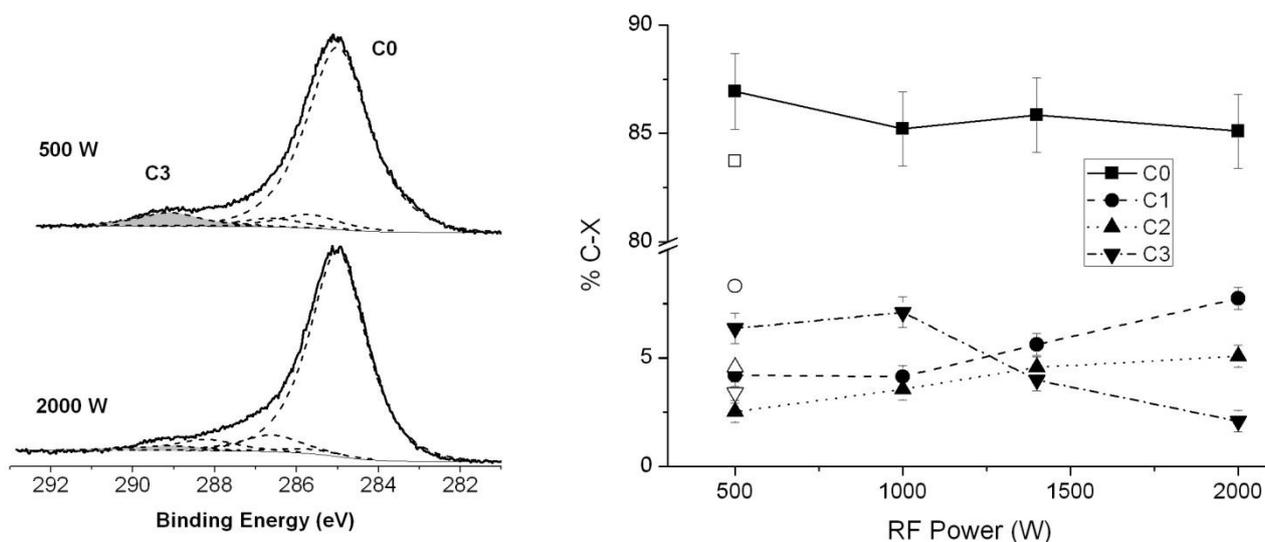


Figura 49: analisi XPS su campioni di ppMAA

Nella parte destra di Figura 49 sono riportate le abbondanze relative di atomi di carbonio aventi intorno chimico diverso. Gli atomi di carbonio non legati ad atomi di ossigeno sono indicati con la sigla “C0” e, analogamente, sono presentati gli atomi di carbonio legati ad uno, due e tre atomi di ossigeno. Questi ultimi possono far parte di gruppi COOH o di gruppi esterei, sono perciò particolarmente interessanti per studiare la densità di funzionalizzazione carbossilica del substrato.

5.5 Morfologia del deposito: microscopia SEM e AFM

Dal punto di vista della morfologia superficiale si sono riscontrate caratteristiche molto simili in tutti i campioni preparati. I depositi si presentano densi, privi di discontinuità ed estremamente lisci, con una rugosità paragonabile a quella del supporto di silicio monocristallino. L’analisi al microscopio elettronico a scansione fornisce una visione immediata di queste caratteristiche.

Le immagini in Figura 50, che ritraggono l’interfaccia tra la zona depositata e quella non trattata (schermata con *Kapton*, poi rimosso), permettono di confrontare le caratteristiche del deposito con il wafer di silicio sottostante.

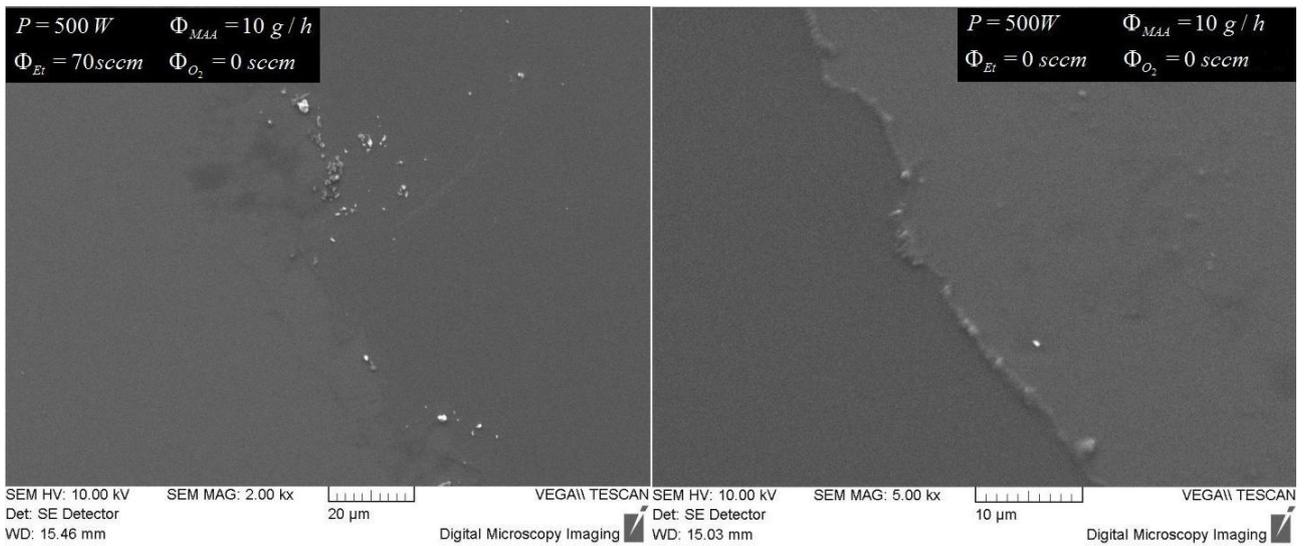


Figura 50: Immagini SEM di due campioni all'interfaccia tra deposito e substrato non trattato

Immagini più ingrandite della superficie del deposito ne illustrano la bassissima rugosità e l'assenza di difetti, come visibile in Figura 51.

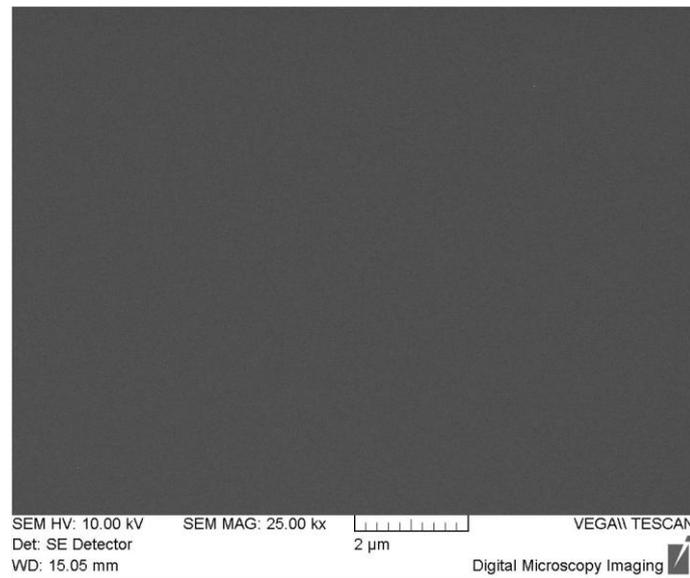


Figura 51: Dettaglio della superfici di un campione preparato con ossigeno (70 sccm)

L'analisi al microscopio a forza atomica ha permesso di ricavare informazioni più dettagliate riguardo allo stato superficiale dei campioni, le immagini raccolte tramite questo strumento sono visibili in Figura 52.

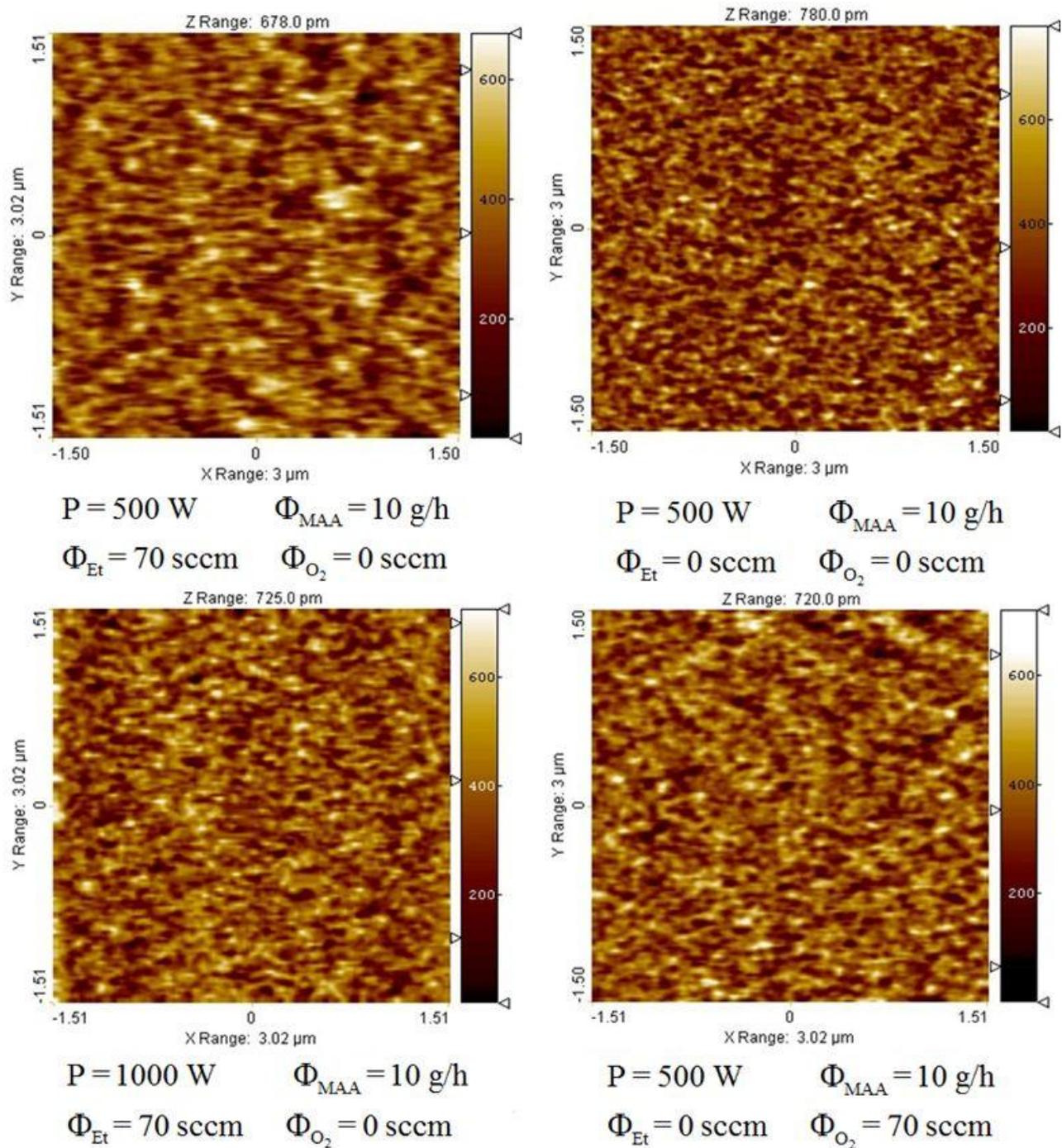


Figura 52: Immagini ottenute tramite microscopia AFM di alcuni film depositati su silicio monocristallino

L'elaborazione tramite software (SPIP) di queste immagini ha permesso di calcolare i profili tridimensionali dei campioni, di cui due esempi sono riportati in Figura 53. Come visibile il profilo superficiale dei campioni si estende per meno di un nanometro di altezza (asse Z nelle figure).

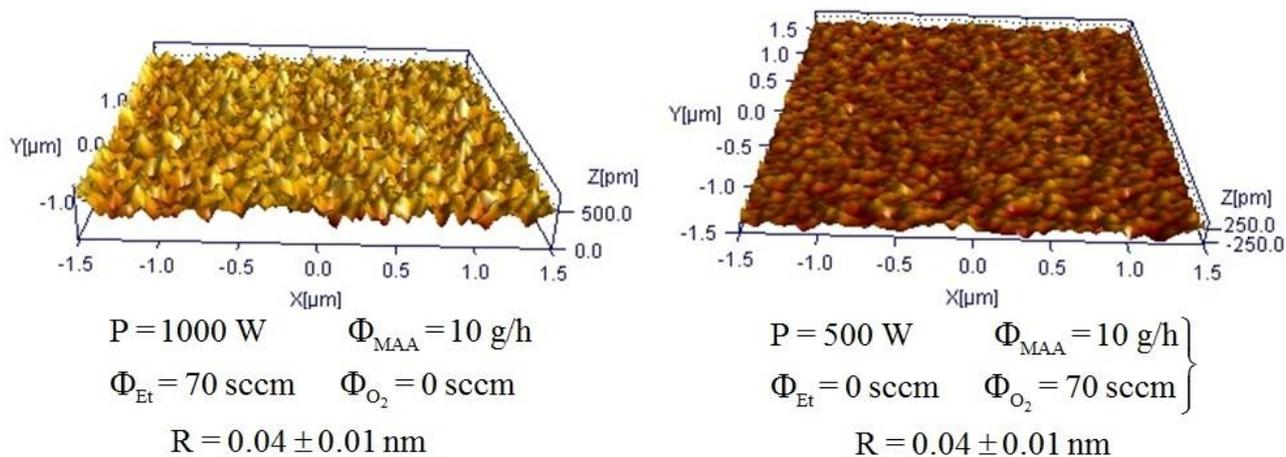


Figura 53: Profili tridimensionali della superficie di alcuni film depositati su silicio monocristallino

5.6 Proprietà ottiche del deposito: ellissometria

Per completare il quadro delle caratterizzazioni è stata eseguita anche l'analisi tramite ellissometria, che ha permesso di calcolare l'indice di rifrazione dei film depositati in funzione della lunghezza d'onda. Questa tecnica ha permesso anche di ottenere misure indirette dello spessore dei depositi, che si sono rivelate in accordo con le analisi effettuate tramite profilometro a stilo. I risultati di queste analisi sono riportati in Figura 54.

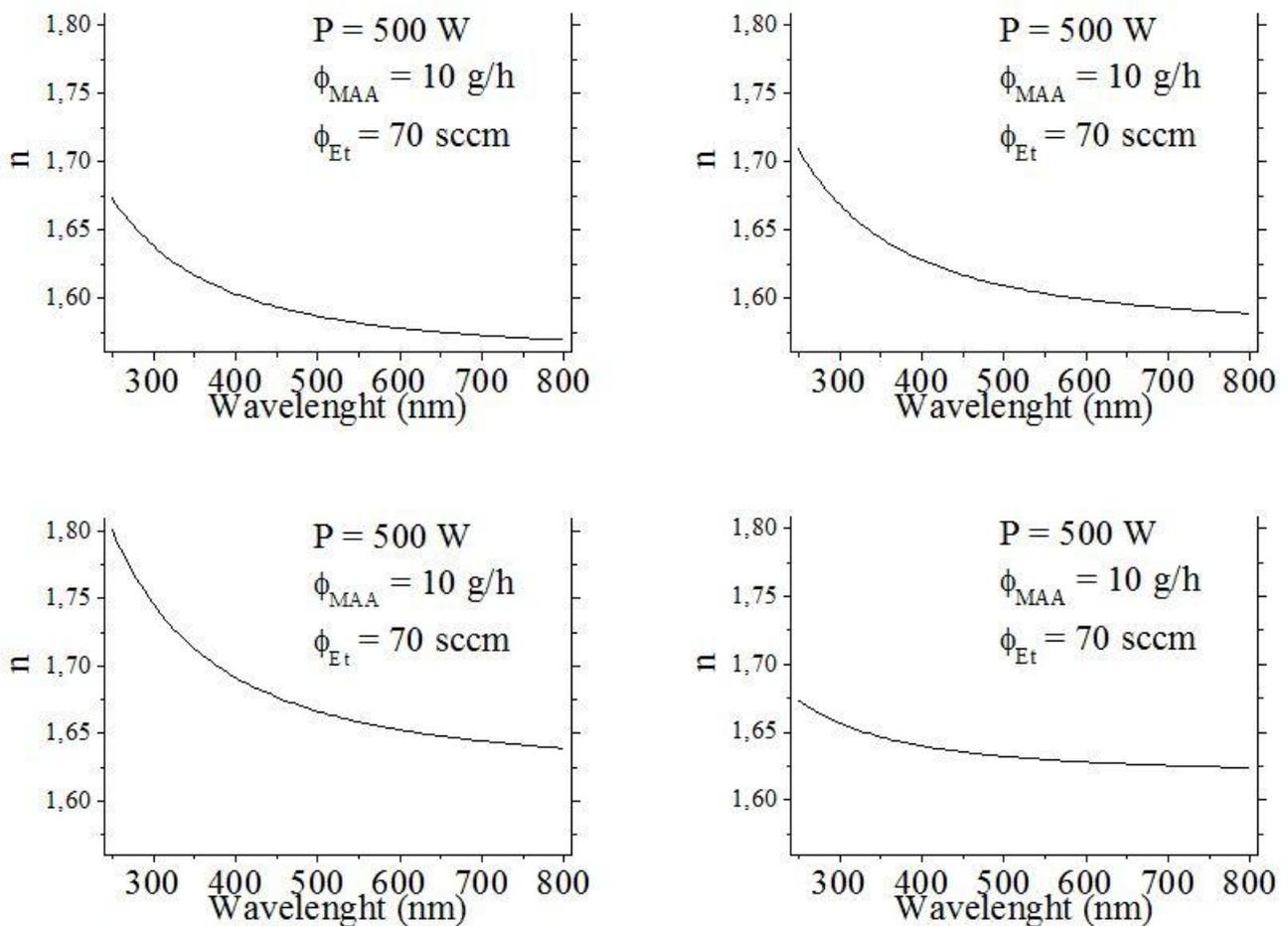


Figura 54: Indice di rifrazione in funzione della lunghezza d'onda calcolato tramite ellissometria

I film depositati appaiono tutti trasparenti, di colore giallo opaco e molto omogenei. La caratterizzazione in esame, inoltre, garantisce la possibilità di confronto tra i campioni preparati in questo lavoro di tesi con progetti futuri e dati presenti in letteratura.

5.7 Interazioni biologiche

I campioni preparati con acido metacrilico presentano angoli di contatto generalmente superiori a quelli misurati in letteratura su campioni a base di acido acrilico. Questa caratteristica costituisce un vantaggio nelle analisi tramite microarray, generando *spots* più definiti e di conseguenza segnali più netti e ben contrastati rispetto al fondo. La buona definizione delle immagini di fluorescenza è visibile in Figura 56, mentre l'aspetto generale del vetrino all'analisi di fluorescenza è riportato in Figura 55.

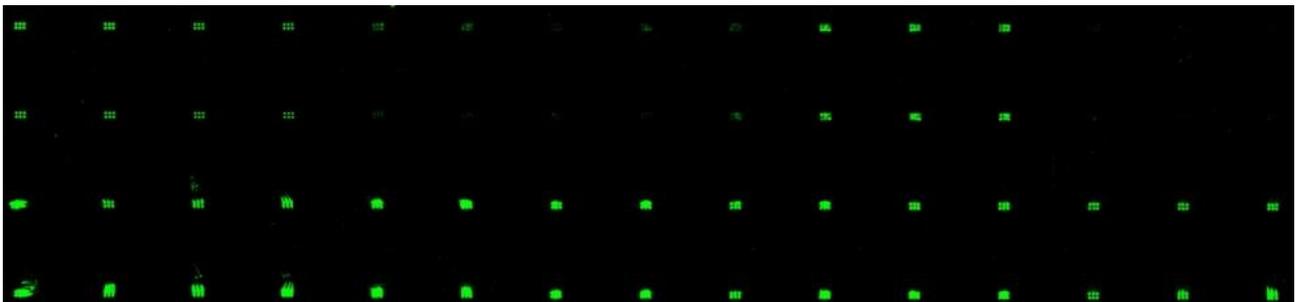


Figura 55: Vista complessiva di un vetrino utilizzato per misure di fluorescenza di *microarray*

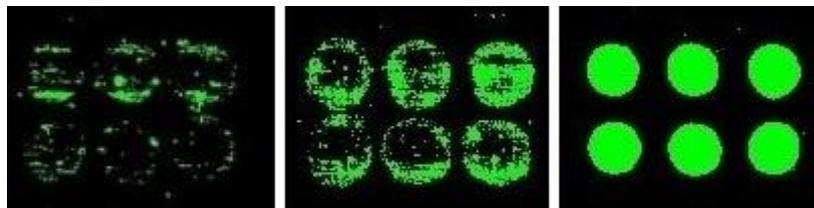


Figura 56: Dettaglio di tre serie di *spots* a intensità diversa

5.7.1 Adsorbimento chimico di oligonucleotidi

L'analisi TBO ha fornito indicazioni riguardo la densità di funzionalizzazione carbossilica del substrato, ognuna di queste molecole genera interazione con un singolo gruppo carbossilico. In ambito biologico, invece, le interazioni con i gruppi carbossilici riguarderanno molecole molto più complesse e stericamente più voluminose: proteine, anticorpi e cellule danno luogo a interazioni multiple e più complesse. La fase conclusiva di questo lavoro di tesi si è quindi concentrata sullo studio delle interazioni tra diversi film, preparati tramite le tecniche PECVD illustrate, e molecole di interesse biologico. La procedura sperimentale eseguita è stata descritta nel paragrafo 4.3.5. Le misure di fluorescenza sono proporzionali alla densità di adesione degli oligomeri. I risultati di questi test sono illustrati nei grafici seguenti.

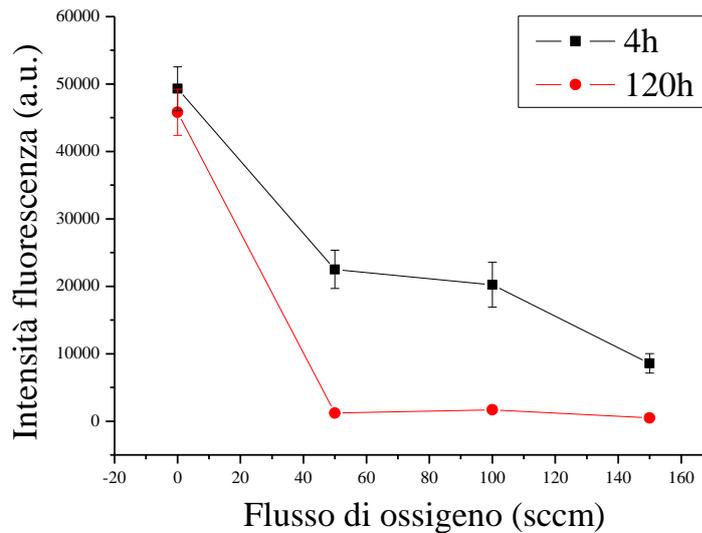


Figura 57: Densità di adesione di oligonucleotidi su fasce preparate con diversi flussi di ossigeno

Modificando il flusso di ossigeno sono stati ottenuti film che mostrano diversa capacità di legare gli oligonucleotidi di DNA utilizzati. Dopo 4 ore si osserva una modifica graduale della risposta, mentre dopo 120 ore si ottiene ottima stabilità sulla fascia trattata senza ossigeno, al contrario delle altre zone, che perdono completamente la capacità di adesione. Questi risultati sembrano offrire la possibilità, con questa tecnica, di determinare a breve termine il grado di adesione voluto, mentre per tempi più lunghi si potrebbe scegliere se promuovere o inibire tale adesione. Infine, con trattamenti a medio flusso di ossigeno si potrebbe ottenere un materiale capace di fissare gli oligonucleotidi in un primo momento, per poi effettuare un rilascio graduale. Tali caratteristiche andranno comunque verificate con analisi più dettagliate.

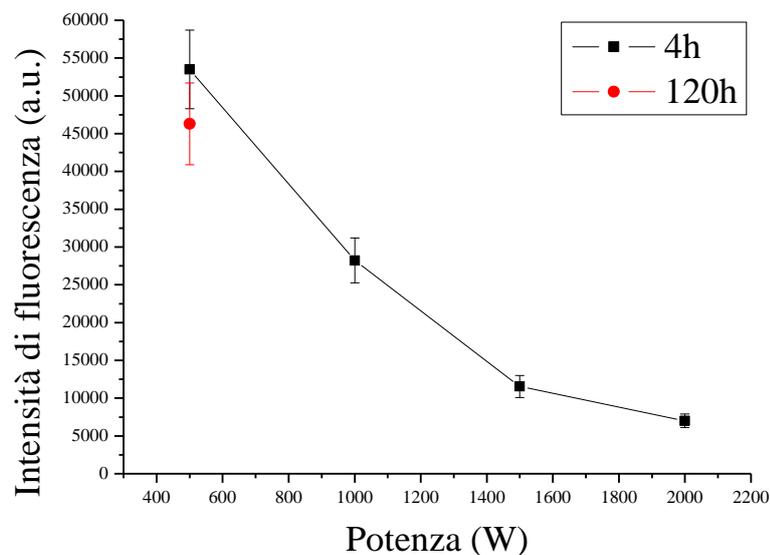


Figura 58: Densità di adesione di oligonucleotidi su fasce preparate con diversi flussi di ossigeno

I vetrini trattati a fasce con potenza diversa hanno indicato un comportamento simile a quelli trattati in potenza, con un'ottima stabilità della zona preparata a 500 W. Le altre aree del deposito, invece, dopo 120 ore hanno subito completi distacchi dei microarray depositati.

5.7.2 Adsorbimento chimico di anticorpi

Il comportamento di molecole più complesse appare diverso. I dati relativi a zone del deposito preparate con differenti flussi di ossigeno sono particolarmente interessanti. In Figura 59 sono riportate le misure effettuate, con i *fit* lineari delle stesse che presentano coefficienti di correlazione prossimi all'unità (0.98 e 0.99).

La presenza di gruppi ossidrilici nei campioni trattati con ossigeno, testimoniata dagli spettri IR, potrebbe contribuire alla capacità di adesione di queste molecole, che presentano una struttura complessa e ricca di gruppi polari.

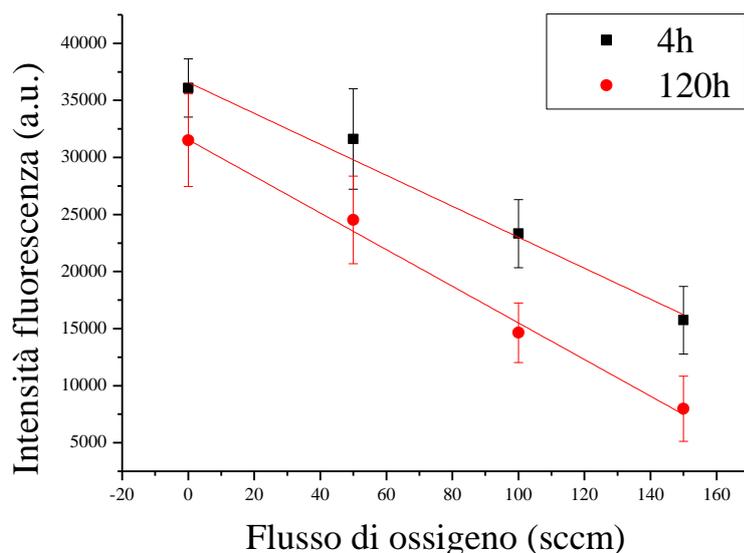


Figura 59: Risultati dell'analisi relativa all'adesione di anticorpi: effetto del parametro flusso di ossigeno

Il comportamento nei confronti dei campioni preparati a diversa potenza non esibisce la stessa stabilità dimostrata dai campioni precedenti, i risultati, in questo caso, ricalcano il comportamento degli oligonucleotidi. Si sono osservati distacchi dopo 120 ore in tutti i casi, tranne in quello a maggiore capacità di legame iniziale, che mantiene a 120 ore la stessa densità di anticorpi osservata a 4 ore dall'incubazione (Figura 60).

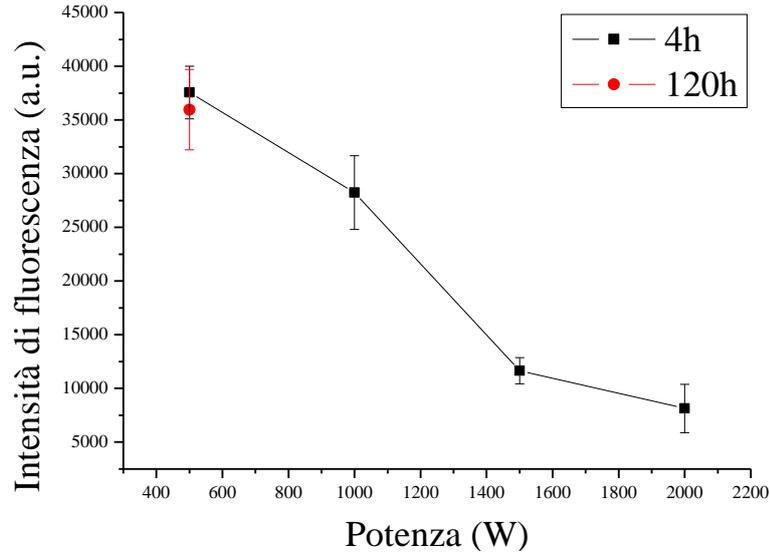


Figura 60: Risultati dell'analisi relativa all'adesione di anticorpi: effetto del parametro potenza

5.7.3 Adesione cellulare

Cellule A549 sono state seminate con densità pari a $10^4/\text{cm}^2$ e controllate 4, 24 e 48 ore dopo la semina. Il controllo positivo è stato eseguito nei confronti di un materiale polimerico trattato per coltura cellulare, mentre il controllo negativo è stato effettuato tramite vetrini portaoggetto in vetro borosilicato non trattati. Considerando i risultati dell'adesione di oligonucleotidi e di anticorpi, le prove di coltura cellulare sono state effettuate solo su vetrini trattati con diversi flussi di ossigeno. Per comodità, le diverse zone verranno indicate semplicemente tramite il flusso di ossigeno utilizzato per prepararle, mentre gli altri parametri ($P = 500 \text{ W}$, $\Phi_{MAA} = 10 \text{ g/h}$) verranno sottointesi.

L'aspetto della zona "0 sccm" è risultato molto simile a quello del controllo positivo, con cellule ben stese, poligonali o allungate. Tale comportamento è tipico di cellule aderenti al substrato.



Figura 61: Confronto tra l'adesione cellulare, a 4 ore dalla semina, sul materiale trattato per coltura cellulare (a sinistra), sul vetrino non trattato (al centro) e sulla zona "0 sccm" (a destra)

Sul vetrino non trattato (controllo negativo), invece, la morfologia cellulare più frequente è di tipo tondeggiante, segnale di scarsa adesione al substrato. Le zone “50 sccm” e “100 sccm” presentano generalmente un aspetto più simile a quello del controllo positivo, con buona adesione. La zona “150 sccm” invece presenta numerose cellule di forma sferica, mostrando comportamento simile al vetrino non trattato.



Figura 62: Confronto tra l'adesione cellulare, a 4 ore dalla semina, sulla zona “50 sccm” (a sinistra), sulla zona “100 sccm” (al centro) e sulla zona “150 sccm” (a destra)

Sulla base di queste osservazioni sembra sia possibile esercitare, tramite diversi trattamenti PECVD, un certo controllo sulla adesione cellulare a breve termine.

Dopo 24 ore si osservano comportamenti meno diversificati, con cellule che riescono a stendersi su tutti i substrati. Il controllo positivo mostra una distribuzione cellulare più omogenea, mentre sugli altri supporti si nota la formazione di gruppi e zone vuote. La densità appare comunque leggermente inferiore nel caso del vetrino non trattato.

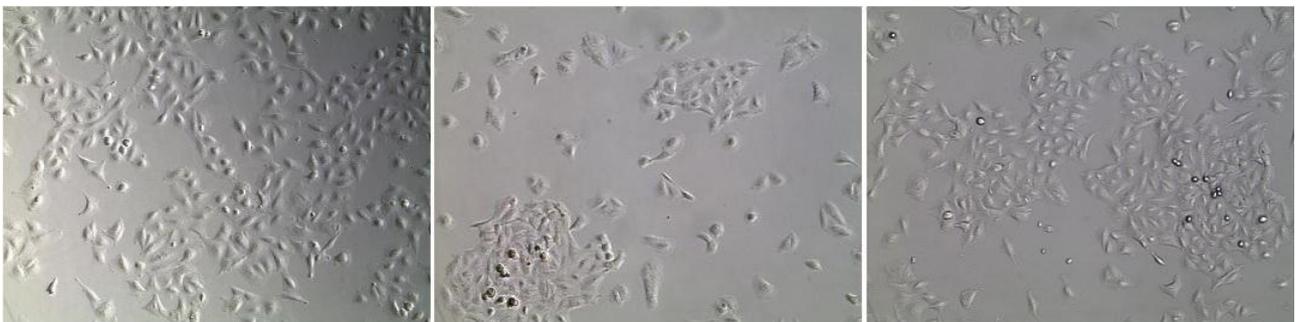


Figura 63: Confronto tra l'adesione cellulare, a 24 ore dalla semina, sul materiale trattato per coltura cellulare (a sinistra), sul vetrino non trattato (al centro) e sulla zona “0 sccm” (a destra)

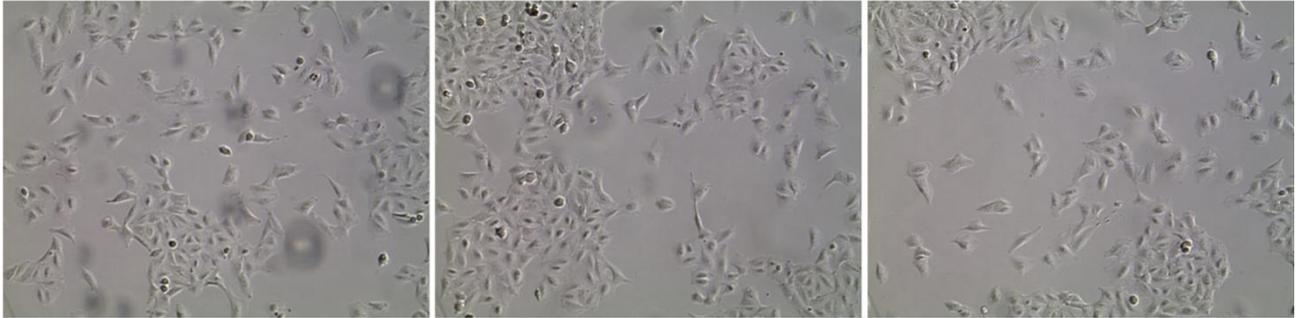


Figura 64: Confronto tra l'adesione cellulare, a 24 ore dalla semina, sulla zona "50 sccm" (a sinistra), sulla zona "100 sccm" (al centro) e sulla zona "150 sccm" (a destra)

Il vetrino controllo negativo mostra una certa adesione cellulare, con tendenza a formare gruppi, anche discreti, di cellule. Va sottolineato, comunque, che alcune linee cellulari hanno meno problemi a crescere anche su supporti non trattati appositamente per la coltura. Non si nota una netta differenza tra il vetrino controllo negativo e il vetrino trattato, almeno nella morfologia cellulare. Non si riesce a definire una differente capacità proliferativa sui diversi supporti, le cellule sono distribuite su tutta la superficie con zone più o meno popolate.

Parte delle uguaglianze di distribuzione e densità, rivelate nel vetrino trattato con PECVD, può essere spiegata dal fatto che il numero di gruppi COOH presenti nella zona "150 sccm" è probabilmente sufficiente per la densità cellulare seminata o presente dopo 24h di proliferazione. Bisogna anche considerare che il vetrino usato come controllo negativo non ha subito lo stesso processo di pulizia pre-trattamento a cui è stato sottoposto il vetrino trattato. Infine possiamo supporre che il vetro borosilicato presenti cariche superficiali intrinseche, che possono facilitare l'adesione cellulare.

Il controllo dopo 48 ore non sembra offrire differenze morfologiche significative rispetto a quanto osservato a 24 ore dalla semina. Il vetrino non trattato (controllo negativo) appare popolato in modo più omogeneo, così come le zone "50 sccm" e "100 sccm", mentre la zona "150 sccm" mantiene maggiormente la struttura a gruppi.

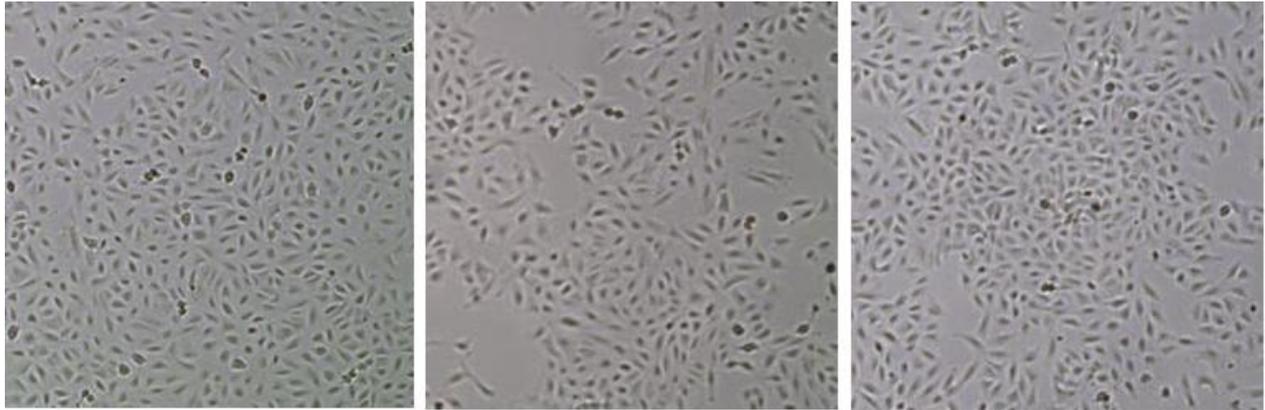


Figura 65: Confronto tra l'adesione cellulare, a 48 ore dalla semina, sul materiale trattato per coltura cellulare (a sinistra), sul vetrino non trattato (al centro) e sulla zona "0 sccm" (a destra)

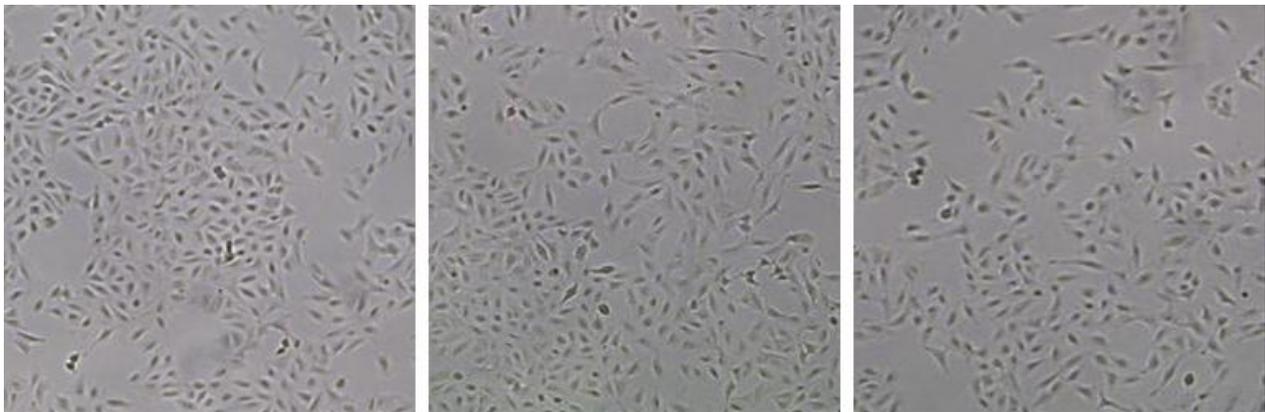


Figura 66: Confronto tra l'adesione cellulare, a 48 ore dalla semina, sulla zona "50 sccm" (a sinistra), sulla zona "100 sccm" (al centro) e sulla zona "150 sccm" (a destra)

Questo tipo di prove potrebbe essere eseguito, in futuro, su supporti polimerici, che presenterebbero il vantaggio di un controllo negativo con meno capacità di fornire adesione cellulare. In questo modo dovrebbe essere più semplice individuare gli effetti dei trattamenti PECVD nei confronti della risposta biologica.

Potrebbe anche essere interessante eseguire prove analoghe con linea cellulare HEP-G2, prevedendo, oltre al controllo dell'aspetto morfologico, anche esperimenti funzionali sullo stato di salute cellulare.

6 Conclusioni

Questo lavoro di tesi ha riguardato la produzione di film sottili a funzionalizzazione carbossilica, dalle proprietà controllate, ottenuti per polimerizzazione via plasma di acido metacrilico. Tale molecola è stata utilizzata sia da sola, sia in combinazione con altri monomeri, analizzando le caratteristiche chimico-fisiche dei film ottenuti con diversi parametri di processo. Questo studio ha permesso, nella seconda fase della ricerca, di ottenere depositi aventi proprietà predeterminate e di analizzare alcune interazioni tra questi e diverse componenti di tipo biologico.

I film ottenuti utilizzando acido metacrilico dimostrano stabilità all'ambiente acquoso nettamente superiore a quelli preparati con acido acrilico, ma i depositi preparati a bassa potenza non possiedono stabilità sufficiente per le applicazioni in ambito biologico.

La copolimerizzazione di MAA con etilene in generale migliora la resistenza all'acqua, ma, nel caso di depositi preparati a media e alta potenza, anche i film ottenuti dal solo acido metacrilico dimostrano ottima stabilità, quindi l'utilizzo dell'etilene non sembra necessario. Gli omopolimeri di MAA, preparati a potenza media, hanno una stabilità paragonabile a quella dei migliori copolimeri PECVD di acido acrilico ed etilene (o 1-7 ottadiene).

Uno studio approfondito delle caratteristiche dei copolimeri ppEtMAA preparati a bassa potenza potrebbe dare utili informazioni sulle potenzialità di questi depositi in ambito biologico, ancora non confermabili con i dati a disposizione. La presenza e la densità di gruppi carbossilici, sui depositi preparati in questo lavoro di tesi, è rimasta sempre buona, come la resistenza all'ambiente acquoso, indipendentemente dal tipo di substrato usato. Le analisi su microarray, riguardanti l'interazione dei campioni con molecole di interesse biologico, hanno mostrato come sia possibile modulare la loro adesione, tramite depositi preparati con diversi parametri di processo. L'utilizzo dell'ossigeno, per limitare la densità di funzionalizzazione, ha fornito i risultati migliori, sia per stabilità, sia per capacità di dosare la risposta "biologica" ottenuta.

L'adesione cellulare ai substrati preparati è stata simile a quella osservata su supporti commerciali trattati per tale fine. Zone di substrato a densità carbossilica diversa hanno generato comportamento cellulare leggermente differenziato. Lo sviluppo di una metodologia volta ad ottenere densità di gruppi carbossilici più basse, per stimolare risposte maggiormente differenziate, potrebbe essere oggetto di prossimi lavori di ricerca; assieme all'utilizzo di diverse tipologie cellulari nei test di adesione. I risultati ottenuti potrebbero portare a future applicazioni nel trattamento di materiali inerti, come l'idrossiapatite, per promuovere su di essi risposte biologiche controllate.

Bibliografia

- [1] M. V. Sefton e N. A. Peppas, «Molecular and cellular foundations of biomaterials,» in *Advances in Chemical Engineering*, Elsevier academic press, 2004.
- [2] «Acta Biomaterialia,» [Online]. Available: <http://www.journals.elsevier.com/acta-biomaterialia/>.
- [3] «Biomaterials,» [Online]. Available: <http://www.journals.elsevier.com/biomaterials/>.
- [4] «Bio-Medical Materials and Engineering,» [Online]. Available: <http://www.iospress.nl/journal/bio-medical-materials-and-engineering/>.
- [5] «Journal of Applied Biomaterials,» [Online]. Available: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1549-9316](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1549-9316).
- [6] «Journal of Biomaterials Applications,» [Online]. Available: <http://jba.sagepub.com/>.
- [7] «Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,» [Online]. Available: <http://www.tandfonline.com/toc/tbsp20/current>.
- [8] «Journal of Biomedical Materials Research,» [Online]. Available: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1552-4965](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1552-4965).
- [9] «Journal of Materials Science: Materials in Medicine,» [Online]. Available: <http://www.springer.com/materials/biomaterials/journal/10856>.
- [10] «Society For Biomaterials,» [Online]. Available: <https://www.biomaterials.org/publications.cfm>.
- [11] «www.treccani.it,» [Online]. Available: [http://www.treccani.it/enciclopedia/biomateriali_\(Enciclopedia_Novecento\)/](http://www.treccani.it/enciclopedia/biomateriali_(Enciclopedia_Novecento)/).
- [12] «<http://www.ing.unitn.it/>,» [Online]. Available: http://www.ing.unitn.it/~colombo/COBALTO%20D_AMATO/4.I%20metalli%20biocompatibili.htm.
- [13] B. Ratner, A. S. Hoffmann, F. J. Schoen e J. E. Lemons, *Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine*, Academic Press, 1996.

- [14] R. Langer e N. A. Peppas, «Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology,» *AIChE Journal*, vol. 49, n. 12, pp. 2990 - 3006, 2003.
- [15] P. Favia, «Plasma deposited coatings for biomedical materials and devices: Fluorocarbon and PEO-like coatings,» *Surface and Coatings Technology*, vol. 211, pp. 50-56, 2012.
- [16] G. Karp, *Cell and Molecular Biology*, Wiley, 2009.
- [17] <http://www.nature.com>, [Online]. Available: http://www.nature.com/nrm/journal/v5/n10/box/nrm1490_BX1.html.
- [18] P. R. Van Tassel, «Biomolecules at interfaces,» in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, 2005, pp. 285-307.
- [19] S. Miller, «A Production of Amino Acids under Possible Primitive Earth Conditions,» *Science*, vol. 117, n. 3046, pp. 528 - 529, 1953.
- [20] S. Miller, «Production of some organic compounds under possible primitive Earth conditions,» *Journal of the American Chemical Society*, n. 77, pp. 2351-2361, 1955.
- [21] Bondt, Deimann, P. v. Trostwijk e Lauwerenburg, in *J. Fourcroy, Ann. Chem.*, vol. 21, p. 58, 1976.
- [22] M. Berthelot, *Ann. Chim. Phys.*, vol. 6/7, p. 53, 1863.
- [23] «<http://www.nanofab.it>,» [Online]. Available: <http://www.nanofab.it/it/tecnologie/pvd-e-pecvd/63>.
- [24] K. S. Siow, L. Britcher, S. Kumar e H. J. Griesser, «Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review,» *Plasma Process. Polym.*, n. 3, pp. 392-418, 2006.
- [25] E. Linder e A. Davis, «Reactions of hydrocarbons in the glow discharge,» *J. Phys. Chem.*, vol. 35, 1931.
- [26] «<http://www.ipe.ethz.ch>,» [Online]. Available: http://www.ipe.ethz.ch/laboratories/ltr/research/index_EN.
- [27] H. Yasuda, *Plasma Polymerization*, Academic Press, 1985.
- [28] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts e J. Watson, *Molecular Biology of Cells*, Garland Publication Inc, 1994.

- [29] D. Puleo, R. Kissling e M. Sheu, *Biomaterials*, vol. 23, p. 2079, 2002.
- [30] M. Mason, K. Vercruyse, K. Kirker, R. Frisch, D. Marecak, G. Prestwich e W. Pitt, *Biomaterials*, vol. 21, p. 31, 2000.
- [31] Aristotele, Fisica.
- [32] E. Rutherford, «The Scattering of α and β Particles by Matter and the Structure of the Atom,» *Philosophical Magazine*, vol. 21, pp. 669-688, 1911.
- [33] W. Umrath, *Fundamentals of vacuum technology*, Leybold, 1998.
- [34] F. Ricci, «Dispense di fisica e tecnologia del vuoto,» *Corso di laboratorio di termodinamica - Università La Sapienza, Roma*, 2004.
- [35] <<http://www.vps-drypump.com/>,> [Online]. Available: http://www.vps-drypump.com/en/vacuum_pump_p_series_01.html.
- [36] B. Chapman, *Glow Discharge Processes*, Wiley-Interscience, 1980.
- [37] R. Fitzpatrick, *Plasma Physics*, The University of Texas at Austin.
- [38] G. Battaglin, «Physical Vapor Deposition,» *Corso di Trattamenti e Caratterizzazione delle Superfici - Università Ca'Foscari, Venezia*, 2010.
- [39] R. Jafari, M. Tatoulian, W. Morscheidt e F. Arefi-Khonsari, «Stable plasma polymerized acrylic acid coating deposited on polyethylene (PE) films in a low frequency discharge (70 kHz),» *Reactive & Functional Polymers*, n. 66, pp. 1757-1765, 2006.
- [40] E. Abadjieva, A. van der Heijden, Y. Creyghton e J. van Ommen, «Fluorocarbon Coatings Deposited on Micron-Sized Particles by Atmospheric PECVD,» *Plasma Process and Polymers*, n. 9, pp. 217-224, 2012.
- [41] S. Peter, M. Günther, S. Berg, A. Clausner e F. Richter, «Mid-frequency PECVD of a-SiCN:H films and their structural, mechanical and electrical properties,» *Vacuum*, n. 90, pp. 155-159, 2013.
- [42] S. Samukawa e T. Mieno, «Pulse-time modulated plasma discharge for highly selective, highly anisotropic and charge-free etching,» *Plasma Sources Sci. Technol.*, n. 5, p. 132, 1996.
- [43] D. Manos e F. D.L., *Plasma Etching: An Introduction*, Academic Press, 1989.

- [44] O. Goossens, E. Dekempeneer, D. Vangeneugden, R. Van de Leest e C. Leys, *Surf. Coatings Technol.*, n. 474, pp. 142-144, 2001.
- [45] J. Friedrich, «Mechanisms of Plasma Polymerization Reviewed from a Chemical Point of View,» *Plasma Process. Polym.*, vol. 8, p. 783–802, 2011.
- [46] K. Jesch, J. Bloor e P. Kronick, *J. Polym. Sci.*, p. 1487, 1966.
- [47] F. Vastola e J. Wightman, *J. Appl. Chem.*, n. 14, p. 69, 1964.
- [48] D. Neiswender, *Adv. Chem. Ser.*, n. 80, p. 338, 1969.
- [49] R. Hansen e H. Schonhorn, *J. Polym. Sci.*, n. B4, p. 203, 1966.
- [50] M. Hudis, «*J. Appl. Polym. Sci.*,» p. 2397, 1972.
- [51] A. Bradley, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, n. 9, p. 101, 1979.
- [52] A. Westwood, *Eur. Polym. J.*, n. 7, p. 363, 1971.
- [53] H. Kobayashi, A. Bell e M. Shen, *J. Appl. Polym. Sci.*, n. 17, p. 885, 1973.
- [54] J. Meisel e H. Tiller, *Z. Chem.*, n. 7, p. 275, 1972.
- [55] H. Yasuda e T. Hsu, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, n. 15, p. 81, 1977.
- [56] J. Goodman, «The formation of thin polymer films in the gas discharge,» *J. Polym. Sci.*, n. 44, p. 551–552, 1960.
- [57] Z. Zhang, Surface Modification by Plasma Polymerization and application of Plasma Polymers as Biomaterials, PhD Dissertation, 2003.
- [58] R. Daw, I. Brook, A. Devlin, R. Short, E. Cooper e G. Legget, *J. Mater. Chem.*, n. 8, p. 2583, 1998.
- [59] D. Haddow, R. France, R. Short, S. ManNeil, R. Dawson, G. Legget e E. Cooper, *J. Biomed. Mater. Res.*, n. 47, p. 379, 1999.
- [60] R. Daw, S. Candan, A. Beck, A. Devlin, I. Brook, S. MacNeil, R. Dawson e R. Short, «Plasma copolymer surfaces of acrylic acid/1,7 octadiene: Surface characterisation and the attachment of ROS 17/2.8 osteoblast-like cells,» *Biomaterials*, n. 19, pp. 1717-1725, 1998.
- [61] Y. Ito, M. Kajihara e Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.*, n. 25, p. 1325, 1991.
- [62] Y. Kinoshita, T. Kuzuhara, M. Kirigakubo, M. Kobayashi, K. Shimura e Y. Ikada,

- Biomaterials*, n. 14, p. 546, 1993.
- [63] Y. Kinoshita, T. Kuzuhara, M. Kobayashi, K. Shimura e Y. Ikada, *Biomaterials*, n. 14, p. 209, 1993.
- [64] B. Gupta, C. Plummer, I. Bisson, P. Frey e J. Hilborn, *Biomaterials*, n. 23, p. 863, 2002.
- [65] V. Vasilets, G. Hermel, U. Konig, C. Werner, M. Muller, F. Simon, K. Grundke, Y. Ikada e H. Jacobasch, «Microwave CO₂ plasma-initiated vapour phase graft polymerization of acrylic acid onto polytetrafluoroethylene for immobilization of human thrombomodulin,» *Biomaterials*, n. 18, pp. 1139-1145, 1997.
- [66] A. Kishida, Y. Ueno, I. Maruyama e M. Akashi, *Biomaterials*, n. 15, p. 1170, 1994.
- [67] C. Sperling, G. Hermel, C. Werner, M. Muller, F. Simon, K. Grundke, H. Jacobasch, V. Vasilets e Y. Ikada, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, n. 8, p. 789, 1997.
- [68] C. van Delden, J. Lens, R. Kooyman, G. Engbers e J. Feijen, *Biomaterials*, n. 18, p. 845, 1997.
- [69] G. Bos, N. Scharenborg, A. A. Poot, G. H. M. Engbers, J. G. A. Terlingen, T. Beugeling, W. G. Van Aken e J. Feijen, *Tissue Eng.*, n. 4, p. 267, 1998.
- [70] G. W. Bos, N. M. Scharenborg, A. A. Poot, G. H. M. Engbers, T. Beugeling, W. G. Van Aken e J. Feijen, *J. Biomed. Mater. Res.*, n. 47, p. 279, 1999.
- [71] U. Konig, M. Nitschke, A. Menning, C. Sperling e F. Simon, *Surf. Coat. Technol.*, n. 116, p. 1011, 1999.
- [72] M. Wang, Y. Chang e F. Poncin-Epaillard, *Surf. Interface Anal.*, n. 37, p. 348, 2005.
- [73] I. Gancarz, G. Pozniak e M. Bryjak, *Eur. Polym. J.*, n. 35, p. 1419, 1999.
- [74] J. G. A. Terlingen, H. F. C. Gerritsen, A. S. Hoffman e J. Feijen, *J. Appl. Polym. Sci.*, n. 57, p. 969, 1995.
- [75] A. Fahmy, R. Mix, A. Schönhals e J. Friedrich, «Structure of Plasma-Deposited Poly(acrylic acid) Films,» *Plasma Process. Polym.*, n. 8, pp. 147-159, 2011.
- [76] N. Inagaki, S. Tasaka e K. Hibi, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, n. 30, p. 1425, 1992.
- [77] F. Poncin-Epaillard, B. Chevet e J. C. Brosse, *Eur. Polym. J.*, n. 26, p. 333, 1990.
- [78] R. Cueff, G. Baud, M. Benmalek, J. P. Besse, J. R. Butruille e M. Jacquet, *Appl. Surf. Sci.*,

n. 115, p. 292, 1997.

- [79] T. M. Ko, J. C. Lin e S. L. Cooper, *J. Colloid Interface Sci.*, n. 156, p. 207, 1993.
- [80] P. Groening, O. M. Kuettel, M. Collaud-Coen e G. S. L. Dietler, *Appl. Surf. Sci.*, n. 89, p. 83, 1995.
- [81] N. Inagaki e M. Matsunaga, *Polym. Bull.*, n. 13, p. 349, 1985.
- [82] R. France, R. Short, R. Dawson e S. MacNeil, *J. Mater. Chem.*, n. 8, p. 37, 1998.
- [83] R. Daw, T. O'Leary, J. Kelly, R. Short, M. Cambray-Deakin, A. Devlin, I. Brook, A. Scutt e S. Khotari, *Plasma Polym.*, n. 4, p. 113, 1999.
- [84] P. Favia, F. Palumbo, R. d'Agostino, S. Lamponi, A. Magnani e R. Barbucci, «Immobilization of heparin and highly-sulphated hyaluronic acid onto plasma-treated polyethylene,» *Plasmas Polym.*, n. 3, p. 77, 1998.
- [85] T. Ko e S. L. Cooper, *J. Appl. Polym. Sci.*, n. 47, p. 1601, 1993.
- [86] S. Swaraj, U. Oran, A. Lippitz, J. F. Friedrich e W. E. S. Unger, *Surf. Coat. Technol.*, n. 200, p. 494, 2005.
- [87] J. D. Whittle, R. D. Short, C. W. I. Douglas e J. Davies, *Chem. Mater.*, n. 12, p. 2664, 2000.
- [88] F. Palumbo, P. Favia, A. Rinaldi, M. Vulpio e R. d'Agostino, *Plasmas Polym.*, n. 4, p. 133, 1999.
- [89] L. O'Toole, A. J. Beck e R. D. Short, «Characterization of Plasma Polymers of Acrylic Acid and Propanoic Acid,» *Macromolecules*, vol. 29, n. 15, p. 5172, 5172 - 5177.
- [90] K. Yoshimura, K. Hozumi, T. Tatsuta, M. Sawai e O. Tsuji, «Preparation of hydrophilic plasma-polymers derived from oxygen-containing organic monomers,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 59, n. 6, pp. 1033 - 1042, 1996.
- [91] D. L. Cho, P. M. Claesson, C. G. Goelander e K. Johansson, *J. Appl. Polym. Sci.*, n. 41, p. 1373, 1990.
- [92] M. R. Alexander e T. M. Duc, «The chemistry of deposits formed from acrylic acid plasmas,» *Journal of Materials Chemistry*, vol. 4, n. 8, pp. 937-943, 1998.
- [93] G. P. Lopez, A. Chilkoti, D. Briggs e B. D. Ratner, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, n. 30, p. 2427, 1992.

- [94] J. Friedrich, *Plasma Polymerization Mechanism*, Plasma Processes and Polymers, 2011.
- [95] A. Moshonov e Y. Avny, *J. Appl. Polym. Sci.*, n. 25, p. 89, 1980.
- [96] Y. L. Hsieh, C. Pugh e M. S. Ellison, *J. Appl. Polym. Sci.*, n. 29, p. 3547, 1984.
- [97] J. G. A. Terlingen, G. A. J. Takens, F. J. Van Der Gaag, A. S. Hoffman e J. Feijen, *J. Appl. Polym. Sci.*, n. 52, p. 39, 1994.
- [98] J. G. A. Terlingen, A. S. Hoffman e J. Feijen, *J. Appl. Polym.*, n. 50, p. 1529, 1993.
- [99] C. J. van Delden, J. P. Lens, R. P. H. Kooyman, G. H. M. Engbers e J. Feijen, *Biomaterials*, n. 18, p. 845, 1997.
- [100] J. P. Lens, J. G. A. Terlingen e G. H. M. F. J. Engbers, *Langmuir*, n. 13, p. 7052, 1997.
- [101] J. P. Lens, J. G. A. Terlingen, G. H. M. Engbers e J. Feijen, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, n. 36, p. 1829, 1998.
- [102] J. P. Lens, J. G. A. Terlingen, G. H. M. Engbers e J. Feijen, *Langmuir*, n. 14, p. 3214, 1998.
- [103] J. P. Lens, B. Spaay, J. G. A. Terlingen, G. H. M. Engbers e J. Feijen, *Plasmas Polym.*, n. 4, p. 159, 1999.
- [104] J. P. Lens, P. F. H. Harmsen, E. M. Ter Schegget, J. G. A. Terlingen, G. H. M. Engbers e J. Feijen, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, n. 8, p. 963, 1997.
- [105] P. Vermette e L. Meagher, *Langmuir*, n. 18, p. 10137, 2002.
- [106] E. M. Liston, L. Martinu e M. R. Wertheimer, *J. Adhesion Sci. Technol.*, n. 7, p. 1091, 1993.
- [107] B. Gupta, J. G. Hilborn, I. Bisson e P. Frey, *J. Appl. Polym. Sci.*, n. 81, p. 2993, 2001.
- [108] S. Sano, K. Kato e Y. Ikada, *Biomaterials*, n. 14, p. 817, 1993.
- [109] M. Suzuki, A. Kishida, H. Iwata e Y. Ikada, *Macromolecules*, n. 19, p. 1804, 1986.
- [110] B. R. Pistillo, A. Perrotta, R. Gristina, G. Ceccone, M. Nardulli, R. D'Agostino e P. Favia, «Water resistant ethylene/acrylic acid plasma-deposited coatings,» *Surface & Coatings Technology*, n. 205, pp. S534 - S536, 2011.
- [111] L. De Bartolo, S. Morelli, L. Lopez, L. Giorno, C. Campana, S. Salerno, M. Rende, P. Favia, L. Detomaso, R. Gristina, R. d'Agostino e E. Drioli, *Biomaterials*, n. 26, p. 4432, 2005.

- [112] M. Nardulli, M. Belviso, P. Favia, R. d'Agostino e R. Gristina, *J. Biomed. Mater. Res.*, n. 94B, p. 97, 2010.
- [113] A. Beck, F. Jones e R. Short, *Polymer*, n. 37, p. 5537, 1996.
- [114] L. Detomaso, R. Gristina, G. S. Senesi, R. d'Agostino e P. Favia, «Stable plasma-deposited acrylic acid surfaces for cell culture applications,» *Biomaterials*, n. 26, pp. 3831-3841, 2005.
- [115] V. Sciarratta, U. Vohrer, D. Hegemann, M. Muller e C. Oehr, «Plasma functionalization of polypropylene with acrylic acid,» *Surface and Coatings Technology*, n. 174-175, pp. 805-810, 2003.
- [116] M. R. Alexander e T. M. Duc, «A study of the interaction of acrylic acid/1,7-octadiene plasma deposits with water and other solvents,» *Polymer*, vol. 40, n. 20, pp. 5479 - 5488, 1999.
- [117] A. Kettle, A. Beck, L. O'Toole, F. Jones e R. Short, *Compos. Sci. Technol.*, n. 57, p. 1023, 1997.
- [118] G. Franceschin, *Funzionalizzazione carbossilica su substrati di nitruro di silicio*, Tesi di laurea triennale in Ingegneriadei Materiali, Università degli studi di Padova, 2011.
- [119] P. Favia, E. Sardella, R. Gristina, A. Milella e R. d'Agostino, «Functionalization of Biomedical Polymers by Means of Plasma Processes: Plasma Treated Polymers with Limited Hydrophobic Recovery and PECVD of COOH Functional Coatings,» *Journal of Photopolymer Science and Technology*, vol. 15, n. 2, pp. 341-350, 2002.

Ringraziamenti

Anna.

Ester.

Sono solo due nomi, che lasciano le rispettive righe alquanto vuote, ma chi conosce queste persone straordinarie sa che non basterebbero libri interi a contenere la ricchezza d'animo, il coraggio e la pura e semplice bontà di ognuna di queste due Donne.

Sicuramente in molti mi hanno aiutato e mi sono stati vicini e meritano i miei ringraziamenti; a costoro spero di avere modo di manifestare il mio riconoscimento di persona, ma voglio che solo questi due nomi restino scritti, anche se solamente in questo umile lavoro di tesi.

Sfortunatamente so quanto coraggio e quanta forza ci vogliono per aiutare chi si trova in seria difficoltà, a maggior ragione quando questa sfortuna capita ad una persona eccezionale, che è anche tua madre e tu sei troppo giovane per sopportare una tale situazione.

Resta sempre un profondo senso di ingiustizia ... ma non c'è mai dubbio sulla necessità di fare del proprio meglio per aiutare chi ha subito l'ingiustizia più grande. Non è il legame di parentela, ma quello affettivo che può esserci solo tra madre e figlio, che non lascia dubbi a proposito.

Quello che invece non so e che non riesco neanche ad immaginare è quanto Coraggio e quanto Amore siano necessari per affrontare volontariamente una situazione come quella eufemisticamente descritta, quando sarebbe legittimo non intervenire e fare la propria vita senza rischiare il biasimo di nessuno.

Molti dei pochi attimi di felicità che ha avuto mia madre, da quando sta male, sono esistiti grazie ad Anna e ad Ester.

È quindi a queste due Donne che vanno i miei ringraziamenti, il mio rispetto e la mia ammirazione.

Se ci fossero più persone così il mondo sarebbe sicuramente un posto migliore in cui vivere.

Roberto Olivotto