

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Füüsika Instituut

Liis Nurmis

**MIKRO- JA NANOSTRUKTUURSED PINNAD UUDSEL  
FAASIERALDUSEL PÕHINEVAL SOOL-GEEL-MEETODIL**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad: MSc Triin Kangur

TÜ FI teadur, PhD Martin Järvekülg

Tartu 2013

# Sisukord

1	Sissejuhatus.....	3
2	Ülevaade kirjandusest .....	5
2.1	Sool-geel-meetod .....	5
2.1.1	Faasieraldus sool-geel lahustes.....	6
2.2	Hüdrofoobsed ja hüdrofiilsed pinnad.....	8
3	Materjal ja meetodika .....	11
3.1	Katseobjektide valmistamine .....	11
3.2	Mõõtmismeetodid.....	12
4	Tulemused ja järeldused .....	14
4.1	Struktuuride tekkemehhanism.....	14
4.2	Pindade iseloomustamine skaneeriva elektronmikroskoobiga.....	16
4.2.1	Katmismeetod .....	16
4.2.2	Kontsentratsioonide varieerimise katseseeria .....	17
4.2.3	Vee ja alkoksiidi moolsuhte varieerimise katseseeria .....	21
4.2.4	Õhuniiskuse mõju .....	22
4.3	Vee kontaktnurga mõõtmised.....	23
5	Kokkuvõte.....	26
6	Summary .....	28
7	Kasutatud kirjanduse loetelu.....	30
8	Tänuavaldused .....	35
9	Lisad.....	36

# 1 Sissejuhatus

Sool-geel-meetod on oma olemuselt lihtne ja mitmekülgne viis keraamiliste materjalide valmistamiseks. Erinevate katmis- ja vormimistehnoloogiate abil võimaldab see valmistada eri kujuga materjale, mis on kasutatavad väga paljudes rakendustes, sealhulgas optilistes seadmetes [1], sensorites [2], biomaterjalides [3] ja mitmesuguste funktsionaalsustega pinnakatetena [4]. Praktilise rakendatavuse ja tööstusliku väärtuse aspektist on oluline materjalide valmistamise kiirus, hõlpsus ja odavus. Sool-geel-meetod on seetõttu vägagi sobilik, sest ei ole vaja kalleid ja keerulisi seadmeid ega ülikõrgeid temperatuure.

Tartu Ülikooli Füüsika Instituudis, eelkõige Nanostruktuuride füüsika laboris, on sool-geel-meetodit uuritud ja erinevate mikro- ja nanostruktuursete oksiidmaterjalide väljatöötamiseks rakendatud praeguseks juba üle 10 aasta. Valmistatud on näiteks Ti-, Zr-, Hf- ja Sn-oksiidist fiibreid [5]; süsiniknanotorudega lisandatud läbipaistvaid oksiidseid elektroode; oksiidseid teravikke [6]; fotoluminesceeruvaid kilesid ja pulbreid [7, 8] ning  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZrO}_2$  ja  $\text{HfO}_2$  mikrorulle [9]. Sool-geel süsteemis toimuva faasieraldusel põhineva meetodiga on valmistatud muudetava läbipaistvusega elektro-optilisi kilematerjale [10], milles tekivad vedelkristalli tilgad tahke geelmaatriksi sisse. Viimase rakenduse jaoks läbiviidud uurimis- ja arendustöö tulemuseks on patendiga kaitstud tehnoloogia, mis jõuab lähiajal tööstusliku tootmise faasi. Sool-geel lahuses toimuvat faasieraldust ja samu keemiliste ning füüsikaliste protsesside põhimõtteid on võimalik rakendada ka geelistuva aine tilkade moodustumiseks lahusti keskkonnas. Nendest tilkadest tekivadki kaetavale pinnale ümarad nano- või mikroskaalas oksiidseid struktuurid. Sellise uude lähenemise teel saadud struktuursetel pindadel võib olla mitmeid huvitavaid funktsionaalsusi.

Suhteliselt pehmetes tingimustes ja madalal temperatuuril läbiviidav materjali süntees võimaldab oksiidmaterjali lisandamist või modifitseerimist erinevate orgaaniliste rühmade, biopolümeeride või –molekulidega. Seetõttu on sool-geel-meetod sobilik biomaterjalide ning bio-piirpindade (inglise keeles *biointerface*) alaseks uurimis- ja arendustööks. Uudseid struktuursete pindu oleks võimalik kasutada erinevates meditsiinilistes uuringutes, sest rakkudega samas suurusjärgus pinnakonarused võivad mõjutada rakkude talitlust [11]. Bio-piirpindadeks loetakse ka bioinertseid pindu, mille puhul on oluline, et erinevad elusorganismid (vetikad, bakterid, vererakud) ei suudaks materjali pinnale kinnituda ning põhjustada oma elutegevuse tulemusena

materjali kahjustumist või soovimatu massi kuhjumist (näiteks vere hüübimine implantaatide pinnal, vetikate vohamine laevakeredel). Nende rakenduste puhul on üheks oluliseks pinna funktsionaalsust määravaks parameetrik märgumisomadused (hüdrofoobsus/-fiilsus, oleofoobsus/-fiilsus ja omnifoobsus). Nii märgumise kui ka bioaktiivsuse seisukohalt on pinnakeemia (pinnaenergia) kõrval kriitiline tähtsus ka mikro- ja nanotopograafial.

Pinnal asuvad ümarad nano- ja mikrostruktuurid, mis on kui miniatuursed mikroläätsed, võivad eeldatavasti mõjutada oluliselt materjali optilisi omadusi [12]. Uudsel meetodil saadud struktuurid pinnakatted võivad seega osutada multifunktsionaalseteks, kui ühes kihis kombineeritakse näiteks isepuhastuvus [13, 14] ning valgust hajutav või koondav toime. Meetodi lihtsusest tulenevalt oleks sellised pinnakatted väga atraktiivsed näiteks aknaklaasidel kasutamiseks.

Toodud rakenduste jaoks tuleb sool-geel faasialduse meetodit esmalt optimeerida ning hinnata selle piire ja võimalusi, sest kuigi meetod on lihtne, kiire ja odav, siis tulemus sõltub suurest hulgast parameetritest. Käesoleva töö eesmärgiks on selliste uudsete pinnakatete ja nende valmistamise meetodi esmane uurimine erinevate parameetrite mõju selgitamise teel ning meetodi piirangute, võimaluste ja sobivuse hindamine erinevates rakendustes kasutatavate materjalide valmistamiseks.

Parameetrite mõju uurimiseks kasutati käesoleva töö eksperimentaalses osas erinevaid lahusteid (metanool, etanool, propanool), varieeriti lahusti ja alkoksiidi koguste suhet ning alkoksiidi ja vee moolsuhet. Lisaks hinnati õhuniiskuse ja ümbritseva keskkonna temperatuuri mõju struktuursete pindade tekkimise protsessile. Lähteaine pinnalekandmiseks kasutati seejuures paralleelselt kahte laialdaselt kasutatavat pindamismeetodit - vurrkatmist ja pihustamist.

Valmistatud pindade iseloomustamiseks rakendati optilist mikroskoopi ja skaneerivat elektronmikroskoopi (SEM) ning määrati vee kontaktnurka.

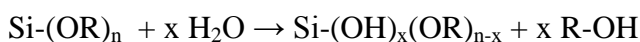
## 2 Ülevaade kirjandusest

### 2.1 Sool-geel-meetod

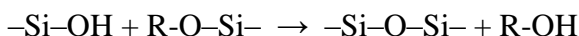
Sool-geel-meetod on keemiline sünteesimeetod, milles hüdrolüüsi- ja kondensatsioonireaktsioonide tulemusel tekib sooliks nimetatavast struktureerumata kolloidlahusest struktureerunud materjal ehk geel [15]. Lähteaineteks on metallide ja räni alkoksiidid ja soolad.

Käesolevas töös on lähteaineks tetraetüülortosilikaat (TEOS), keemilise valemiga  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ . Solvendis lahustatud alkoksiidi reageerimisel veega toimub hüdrolüüs. Lisatud vee kogust iseloomustatakse vee ja alkoksiidi moolsuhtega R. Reaktsiooni kontrollitumaks läbiviimiseks kasutatakse veega koos ka katalüsaatorit, käesolevas töös on selleks lämmastikhape. Vee lisamisel hakkavad toimuma järgmised reaktsioonid:

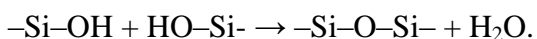
a) Hüdrolüüsil tekivad hüdrosüülrühmad



b) Kondensatsioon viib Si-O-Si sidemete tekkeni ja see võib toimuda kahel viisil - alkoholi eraldumisega



või vee eraldumisega



Ülaltoodud reaktsioonide esitus on lihtsustatud, sest reaalsuses on lahuses palju erinevaid osakesi ja reaktsioonid toimuvad paralleelselt. Reaktsioonide kineetikat ja tekkivate oligomeersete molekulide suurust ning struktuuri mõjutavad mitmed muutujad, nagu lisatud vee hulk, katalüsaatori kontsentratsioon, alkoksiidi tüüp ja kontsentratsioon, lahusti iseloom ja kontsentratsioon, reageerimise aeg, lahuse pH, keskkonna niiskus ja temperatuur.

Kondensatsioonireaktsioonide käigus tekivad osakestevahelised sidemed ja toimub materjali geelistumine ning viskoossest lahusest saab elastne geelmaterjal. Sool-geel-meetodiga on võimalik valmistada väga erineva kujuga materjale. Neist enim on uuritud kilesid, fiibreid, nano- ja mikroosakesi [16], monoliite [17], membraane ning arogeele [18]. Võimalik on saada

erinevaid puhtaid [19] ja dopeeritud oksiide [20, 21], oksiidide segusid ja hübriide [22]. Oksiidne koostis saadakse lähteaines toimuvate keemiliste reaktsioonide tulemusena, seetõttu on võimalik keraamiliste materjalide valmistamine temperatuuride juures, mis on vastavate oksiidide sulamistemperatuuridest oluliselt madalamad. Lisaks kujule on sool-geel-meetodiga võimalik muuta materjalide mikro- ja nanostruktuuri ning mehaanilisi, optilisi ja elektrilisi omadusi.

Materjali vormimisele järgneb kuivatamine ning vanandamine. Vanandamisel tekivad polümeersete ahelate vahele ristsidemed, materjal tiheneb ja pooride suurus väheneb. Enamasti järgneb veel termiline töötlus, et vabaneda orgaanilistest jääkidest ja saada oksiidne materjal.

### **2.1.1 Faasieraldus sool-geel lahustes**

Sool-geel-materjali pinnalekandmine või vormimine võib toimuda mitmel moel. Neist enim uuritud ja kasutatud on erinevate alusstruktuuride või -pindade katmine sukelduspindamise, vurrkatmise või pihustamise teel ja fiibrite valmistamine viskoosest soolist tõmbamise või elektroketruse (inglise keeles *electrospinning*) teel [23-25]. Faasieraldusel põhinevaid materjali vormimise viise on võrreldes aluspindade katmisega ja fiibrite valmistamisega uuritud oluliselt vähem. Siiani on faasieralduse meetodiga enamasti valmistatud poorseid materjale, mis koosnevad kahest pidevast faasist või kahest faasist, millest üks on eraldatud fragmentidena teise mikro- või mesoporse pideva faasi sees [26, 27]. Faasieralduse meetodiga valmistatud poorsete materjalide funktsionaalsus tuleneb nende pinna nano- ja mikrostruktuursusest [28]. Samas on meie töögrupile teada, et vaid ühes Jaapani patendis on kirjeldatud faasieralduse tulemusena tekkivaid ühes kihis ning üksteisest eraldatult pinnal asetsevaid nano- või mikroskaalas struktuurseid elemente ja sellest tulenevat pinna optilist funktsionaalsust [29].

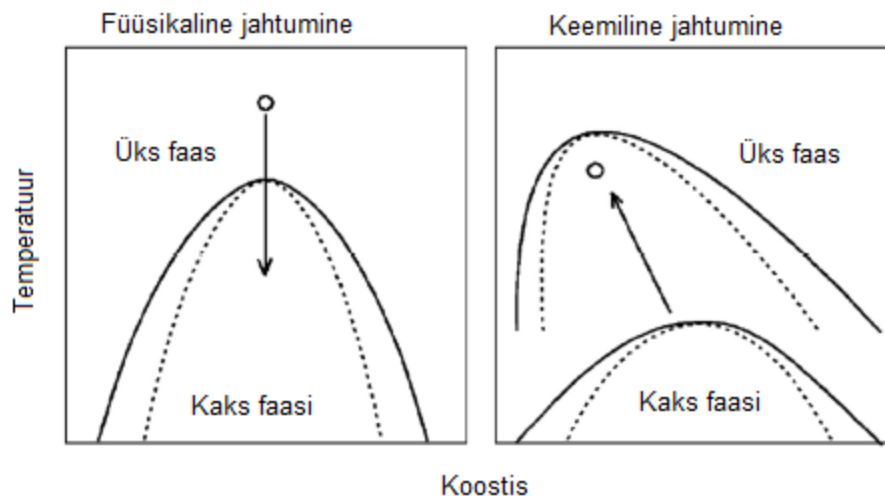
Juhul kui sool-geel protsessi viiakse läbi happelistes tingimustes, siis hüdrolüüsi- ja polükondensatsioonireaktsioonide tulemusel tekkivatel oligomeeridel on suhteliselt väike molekulmassi jaotus [30]. Kui lähteaine on pinnale kantud, jätkub ümbritsevast keskkonnast lisanduvast veest tingitud hüdrolüüsi- ja kondensatsioonireaktsioonide tulemusena oligomeeride keskmise molekulmassi kasv. Kui keskmine molekulmass kasvab, siis vastavalt termodünaamikale väheneb lahuses olevate komponentide vastastikune lahustuvus, mis

vähendab komponentide vahelist segamise entroopiat ning segamise vabaenergia  $\Delta G$  kasvab vastavalt võrrandile

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S,$$

kus  $\Delta H$  on entalpia muutus,  $T$  on temperatuur ning  $\Delta S$  on entroopiamuutus.

Faasieraldus on termodünaamiliselt võimalik, kui  $\Delta G$  väärtus saab positiivseks. Kui keemiliste sidemete arv soolis kasvab polükondensatsioonireaktsioonil, siis väheneb  $\Delta S$  liige, sest samaaegselt väheneb keemiliste konfiguratsioonide vabadus. Polümerisatsioon vastandub mõnedes mitmekomponentsetes süsteemides füüsikalise jahutamise (temperatuuri alandamisega) saavutatavale faasieraldusele. Mõlemal juhul liikme  $T\Delta S$  absoluutväärtus väheneb. Seega võib polümerisatsiooni vaadelda kui keemilist jahutamist. Füüsikalise ja keemilise jahutamise erinevust illustreerib joonis 1. Faasipiiri (pidev joon joonisel 1) ja spinodaaljoone (punktirjoon joonisel 1) vahel on süsteem metastabiilne – stabiilne väikestel muutustel, aga ebastabiilne suurtel muutustel [31].



Joonis 1. Füüsikalise ja keemilise jahtumise erinevus. Faasipiiri tähistab pidev ja spinodaalset joont punktirjoon. Füüsikalisel jahtumisel saab temperatuuri alanemisel ühest faasist kaks faasi. Keemiline jahtumine suurendab kahe faasi ala, sest suureneb keemiliste sidemete arv ühendis [26].

Selleks, et jõuda faasidiagrammil stabiilsest piirkonnast spinodaalsesse piirkonda, peab üleminek toimuma metastabiilse piirkonna või kriitilise punkti (punkt, kus kaks joont kattuvad, nagu näha joonisel 1) kaudu. Faasieraldus võib seejuures toimuda kahes erinevas režiimis – kas

metastabiilses olekus eralduva faasiosakese nukleatsiooni ja järgneva kasvu teel või spinodaalse lagunemise teel (inglise keeles *spinodal decomposition*). Tihti toimub üleminekul stabiilsest piirkonnast spinodaalsesse piirkonda metastabiilses alas faasisiire nukleatsiooni teel ja spinodaalset lagunemist ei ole märgata. Selleks, et näha spinodaalset lagunemist, peab polümerisatsioon olema väga kiire või üleminek toimuma kriitilise punkti kaudu. Metastabiilses olekus toimub faasiosakese kasv lokaalsest häiritusest või ebahomogeensusest tekkiva kasvutsentri ümber.

Spinodaalse lagunemise korral toimub faasieraldus samaaegselt kogu lahuses ja keemilised ühendid liiguvad kontsentratsioonigradiendile vastu ilma aktivatsioonibarjäärita. Tekib käsnaasarnane pidev struktuur, mis muutub ajas, sest esineb faasidevahelise energia erinevus. Selleks, et seda energiaerinevust vähendada, organiseerub struktuur nii, et faasidevaheline kokkupuuteala ja pinnaenergia oleksid väiksemad. Lõpuks viib see domeenide killustatuseni, eeldusel, et sool-geel üleminek ei ole selle hetkeni toimunud. Sool-geel üleminekul toimub järsk muutus viskoossuses ja soolist saab elastne tahkis. Seega ühelt poolt polümerisatsioon algatab ja suunab faasieraldust, kuid samal ajal peatab selle, kui jõutakse sool-geel üleminekuni. Pärast domeenide killustumist võib materjali struktuur sarnaneda nukleatsiooni ja järgneva kasvu teel tekkiva struktuuriga.

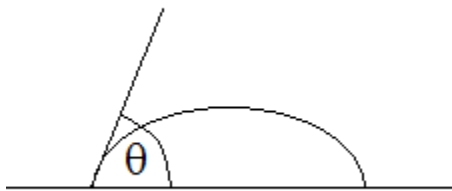
Käesolevas töös tekib struktuur arvatavasti nukleatsiooni teel ja selles on üks pidev faas, mille sees on teise faasi eraldatud fragmendid. Nukleatsioonikasvuga peaks töö eristuma teistest sama valdkonna töödest, kus peamiselt on tegemist spinodaalse lagunemisega, mille tagajärjel tekib kahe pideva faasiga poorne struktuur [10, 22, 28, 32].

## **2.2 Hüdrofoobsed ja hüdrofiilsed pinnad**

Huvi hüdrofiilsete ja hüdrofoobsete pindade vastu on kasvanud viimase kahekümne aasta jooksul, eriti pärast avastust, et vedelike laialivalgumist pinnal on lihtne kontrollida pinna kareduse ning mikro- ja nanotopograafia kaudu [33].



Kõige üldisemalt kirjeldavad hüdrofiilsus ja hüdrofoobsus ainete lahustumist vees – hüdrofiilsed ained lahustuvad kergesti vees, hüdrofoobsed mitte. Lahustumise põhjal saab seega tuvastada suure hulga aineid, millel võiks vastavalt olla hüdrofiilne või hüdrofoobne pind. Kuid lahustumine ei pruugi siiski kirjeldada nende ainete pindade omadusi, sest lahustumine on seotud vedeliku ja tahkise molekulide vaheliste jõududega ning entroopiamuutusega. Märgumise juures aga on olulised pinna-aatomite asetus ja suund ning funktsionaalrühmad. Kasutades lahustumise juures tuntud reeglit, et sarnane lahustab sarnast, saab ennustada mõnede pindade omadusi. Hüdrofiilsed on need pinnad, mis on polaarsed nagu vesi ehk mille molekulidel või funktsionaalrühmadel on elektriline dipool. See reegel aga ei ennusta õigesti kõigi pindade (metallid) hüdrofiilsust [34].



Joonis 2. Vedeliku kontaktnurk ( $\theta$ ) pinnal.

Mõõtmiste teel saab pinna hüdrofoobsust ja hüdrofiilsust hinnata kontaktnurga  $\theta$  alusel. Kontaktnurka mõõdetakse tahkis-vedelik-õhk süsteemis ja see on nurk, mille all vedeliku ja gaasi piirpind on kontaktis tahkise ja vedeliku piirpinnaga (joonis 2). Kontakt veega või teise polaarsete vedelikuga on hüdrofiilsel pinnal eelistatud mittepolaarsele faasile nagu õhk või õli. Hüdrofiilsetel pindadel on kontaktnurk  $\theta < 90^\circ$  ja hüdrofoobsetel pindadel  $\theta > 90^\circ$ .

Superhüdrofiilse pinna märgumisnurk on  $0^\circ$ . Siiani on superhüdrofiilsuse eesmärgil uuritud titaanoksiidi ja tsinkoksiidi tänu nende fotoindutseeritud isepuhastumisvõimele ning ränioksiidi tänu selle hüdrofiilsusele ja odavale hinnale [13]. Neid materjale valmistatakse lahusest alusele sadestamise, vurrkatmise ja pihustamise teel või kasvatatakse litograafia ja elektrokeemiliste meetoditega. Superhüdrofiilsed pinnad leiavad kasutamist mitte uduseks muutuvate pindadena näiteks ujumisprillides. Superhüdrofiilne pind ei muutu uduseks, sest veetiljade asemel tekib õhuke veekile [34]. Selline veekile mõjutab tugevasti pinna ja molekulide või mikroorganismide vahelist vastastikmõju ning superhüdrofiilseid pindu saaks kasutada mitte-saastuvate pindadena, kuhu ei kasva mikroorganismid, vetikad ega taimed. Superhüdrofiilsete materjalidega kaetakse ka meditsiiniseadmeid.

Superhüdrofoobse pinna märgumisnurk on suurem kui  $150^\circ$  [35]. Superhüdrofoobsele pinnale ei ei jää veetilgad püsima, vaid libisevad pinnalt ära ja ideaalsel juhul viivad kaasa ka pinnal oleva

mustuse. Teatud juhtudel võib vedelikutilk superhüdrofoobsele pinnale püsima jääda ja mitte sealt ära libiseda ka siis, kui aluspinna kaldenurka suurendatakse kuni  $90^\circ$ . Seetõttu mõõdetakse veetilga libisemisnurka (inglise keeles *sliding angle*) ehk aluspinna kaldenurka, mille all vedelikutilk pinnalt alla libisema hakkab [36]. See nurk sõltub veetilga suuruselt (massist) ja pinnakaredusest. Headel superhüdrofoobsetel pindadel on suur vee kontaktnurk ning väike veetilga libisemisnurk.

Lisaks sellele, kui hästi märgab pinda vesi, on paljudel juhtudel olulised ka teiste vedelike, nagu veelahused ja orgaanilised vedelikud (näiteks õlid), märgumisomadused [37]. Veelahused võivad pinnal käituda teisiti kui puhas vesi. Superoleofoobne on pind, millel orgaaniliste vedelike kontaktnurk on üle  $150^\circ$  [38]. Orgaanilistel vedelikel on väiksem pindpinevus kui veel ja seetõttu on väga raske superoleofoobseid pindu valmistada. Pindu, mis on samaaegselt superhüdrofoobsed ja superoleofoobsed, nimetatakse omnifoobseteks.

Superhüdrofoobsed pinnad on tihti inspireeritud looduses esinevatest pindadest, näiteks lootoselehelt [39]. Enamasti kombineeritakse vett, õli või neid mõlemat hülgevate pindade valmistamiseks pinnakeemiat ja struktuursust [40, 41]. Superhüdrofoobsed pinnad on tihti kahe-tasemelise topograafiaga, mikro- ja nanosuurusel pinnakonarustega. Sellised pinnad võiksid leida kasutust isepuhastuvate, mitte uduseks muutuvate või mitte korrodeeruvate pindadena [42].

### 3 Materjal ja metoodika

#### 3.1 Katseobjektide valmistamine

Struktuursed pinnad valmistati osaliselt hüdrolüüsunud tetraetüülortosilikaadist (TEOS). Kõik kemikaalid on ostetud firmast Sigma-Aldrich. Lahuste valmistamiseks mõõdeti esmalt pipetiga vajalik kogus lahustit, lisati TEOS, lasti neil veidi viaalis seguneda ja viimasena lisati vajalik kogus veelahust, mis sisaldas happelise katalüsaatorina 5,12% lämmastikhapet ( $\text{HNO}_3$ ). Parameetrite mõju uurimiseks kasutati katsetes erinevaid lahusteid, varieeriti lahusti ja alkoksiidi koguste suhet ( $S$ =lahusti:TEOS) ning vee ja alkoksiidi molaarsuhet ( $R$ ). Lahustitena kasutati etanooli, metanooli ja propanooli, mis erinevad polaarsuse ja lenduvuse poolest. Esimeses katseseerias valmistati kõigi kolme lahustiga viis erineva kontsentratsiooniga lahust ( $S=1, 5, 9, 13, 17$ ),  $R$ -i hoiti seejuures konstantsena ( $R=1.2$ ). Teises katseseerias valmistati kõigi lahustitega kuus erineva  $R$ -iga lahust (4, 2, 1.6, 1.2, 0.8 ja 0.4), kontsentratsiooni hoiti seejuures muutumatuna ( $S=9$ ). Kokku kahe katseseeria peale valmistati 33 erinevat lahust. Katseteks võetud ainete kogused on toodud tabelites 1 ja 2. Pärast lahuste kokkuvalamist lasti neil 1 tund magnetsegajal seguneda.

Seejärel kanti lahused 2,5 x 2,5 cm klaasist alustele vurrkatturiga ja pihustamisega. Aluste puhastamiseks töödeldi neid 15 minutit ultrahelivannis atsetooni lahuses ning seejärel loputati metanooliga ja kuivatati lämmastikuga. Vurrkatmisel kanti pipeti abil 60  $\mu\text{l}$  lahust alusele, mille liikumiskiirus oli 2000 pööret minutis. Objektidel lasti pöörelda 30 sekundit. Pihustamiseks võeti 2 ml süstlaga 400  $\mu\text{l}$  lahust. Pihustati käsitsi edasi-tagasi liikuvale alusele nii, et alus jõudis pihustist väljunud aerosooli lehviku alt läbi käia ühe korra. Järgnevalt lasti objektidel 2 minutit pihustuskambris kuivada. Kahe katmismetoodiga valmistati kokku 66 erinevat pinda. Suhteline õhuniiskus laboris oli kontsentratsioonide varieerimise katsete ajal vahemikus 15-21% ning  $R$ -i varieerimise katsete ajal 9-11%. Temperatuur püsis vahemikus 22-23°C. Pärast katmist lasti pindadel õhu käes kuivada ja viimase etapina kuumutati neid ahjus 200 °C juures 15 tundi.

Tabel 1. Kontsentratsioonide varieerimise katseteks võetud kogused. Kõigi kolme lahustiga valmistati kõigi toodud kontsentratsioonidega lahused.

Kontsentratsioon S	Lahusti	TEOS	H <sub>2</sub> O
1	800 µl	800 µl	80 µl
5	1500 µl	300 µl	30 µl
9	1800 µl	200 µl	20 µl
13	2600 µl	200 µl	20 µl
17	1700 µl	100 µl	10 µl

Tabel 2. R-i varieerimise katseteks võetud kogused. Kõigi kolme lahustiga valmistati kõigi toodud R-dega lahused.

R	Lahusti	TEOS	H <sub>2</sub> O
4	1800 µl	200 µl	67 µl
2	1800 µl	200 µl	33 µl
1.6	1800 µl	200 µl	27 µl
1.2	1800 µl	200 µl	20 µl
0.8	1800 µl	200 µl	13 µl
0.4	1800 µl	200 µl	6,6 µl

### 3.2 Mõõtmismeetodid

Valmistatud pindade iseloomustamiseks kasutati skaneerivat elektronmikroskoopi (SEM). SEM-iga saadakse objektist kujutis seda kõrge energiaga elektronkiirega skaneerides. Signaal saadakse elektronide interakteerumisel pinnaga. Laengu ärajuhtimiseks peavad proovid olema juhtivad. SEM-i piltide tegemiseks lõigati esmalt 2,5 x 2,5 cm objektid neljaks. Neist üks osa kinnitati objektihooldjale ning kaeti juhtivuse tekitamiseks 5 nm paksuse kullakihihiga, kasutades masinat SC7640 Auto/Manual High Resolution Sputter Coater. SEM-i pildid tehti Tescan VEGA II SBU elektronmikroskoobiga, kasutades kiirendavat pinget 10 kV ja sekundaarsete elektronide detektorit. SEM-i pildid kõikidest valmistatud pindadest on toodud lisa ning järgnevas peatükis on toodud illustreerivaid näiteid.

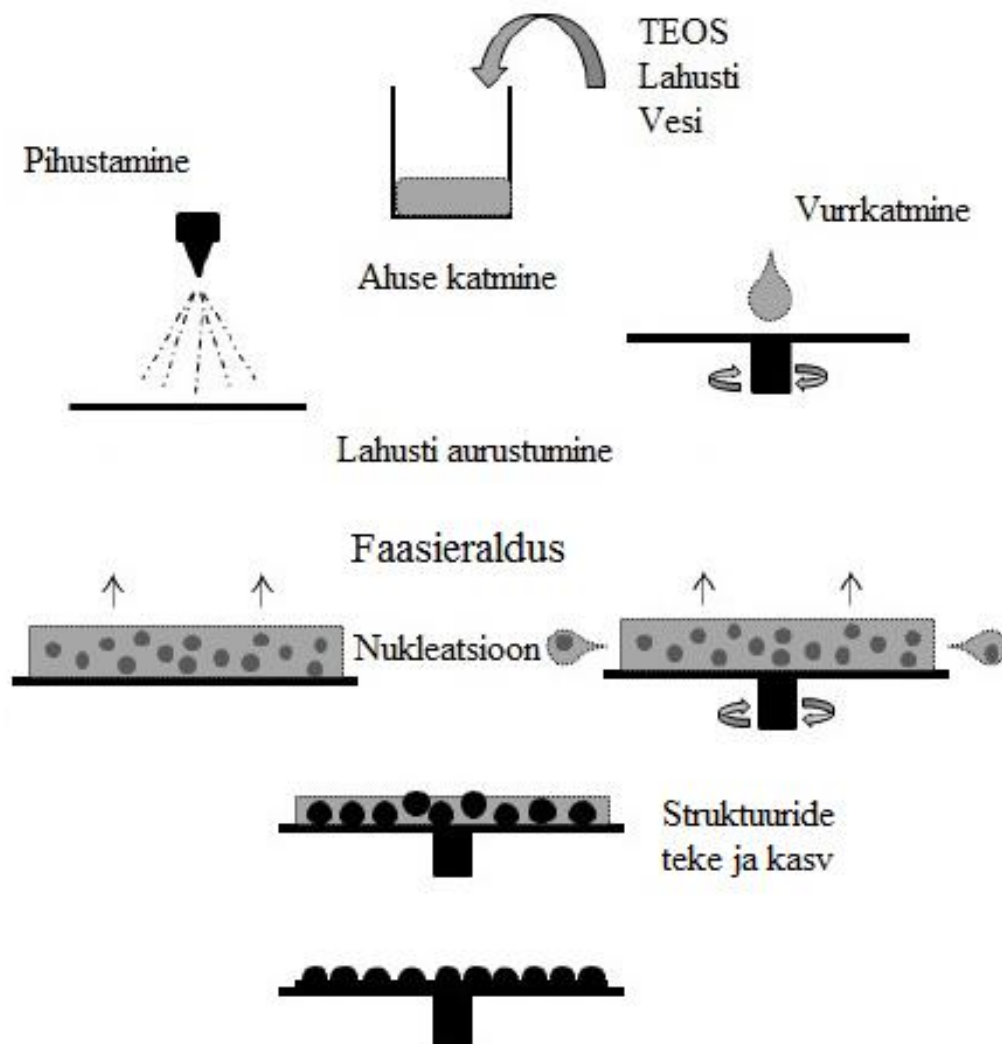
Vee kontaktnurga mõõtmiseks kasutati fotoaparaadist Canon EO5 650D, objektiivist Canon MP65 ja alusest koosnevat süsteemi. Mõõtmiseks tilgutati uuritavale pinnale pipetiga 4 µl

veetilk, millel lasti kõigi objektide korral enne pildistamist 45 sekundit seista, et tingimused oleksid võrreldavad. Samal ajal seadistati mõõtmisaparatuur ning seejärel tehti foto. Kontaktnurgad mõõdeti fotodelt veetilga mõlemalt poolt programmiga GIMP. Ühel objektil määrati kontaktnurka kolmest kohast ja keskmistati need. Saadud tulemused on toodud peatükis 4.3.

## 4 Tulemused ja järeldused

### 4.1 Struktuuride tekkemehhanism

Sool-geel faasialduse protsessi lähteainete (TEOS, alkohol ja vesi) kokkusegamisel hakkavad toimuma hüdroolüüsi- ja polümerisatsioonireaktsioonid, mille tulemusel tekivad üksikutest TEOSe molekulidest oligomeerid. Esmast polümerisatsiooni määra mõjutavad nii lisatud vee hulk kui ka reageerimisaeg. Polümerisatsiooni määr ja lahusti kontsentratsioon omakorda mõjutavad lahuse viskoossust. Sooli kiht kanti käesolevas töös alusele pihustamise või vurrkatmise teel. Lahusti kontsentratsioon määrab alkoksiidse aine hulga, mis protsessi alguses alusele sattub ning katmismeetod ja sooli viskoossus mõjutavad seda, kui suur osa sellest jääb katmise käigus pinnale. Pinnale allesjäänud kihis sisalduv räniorgaaniline ühend hüdroolüüsub ja polümeriseerub edasi ning sellest tulenevalt tema lahustuvus lahusti keskkonnas väheneb. See on üks põhjustest, miks hakkab toimuma faasialdus. Eeldatavasti toimub see käesoleva töö käigus täheldatud juhtudel metastabiilses piirkonnas ehk tasakaalutingimuste lähedal. Faasialdus algab sellisel juhul nukleatsiooniga ja räniühendi-rikka faasi tilgad tekivad pideva lahusefaasi sisse. Tekkinud tahke aine tilgakesed suurenevad polümerisatsiooni edasisel jätkumisel. Samal ajal lahusti pidevalt aurustub ja tilgakestest ei jõuagi pidevat faasi tekkida. Pinnale jäävad pärast pideva lahustifaasi aurustumist alles mikro- ja nanoskaalas tilgakesed, mis seejärel vähemal või rohkemal määral laiali vajuvad ja moodustavadki ümaraid pinnadetaile. Pinnadetailide kuju, suurust ja arvu mõjutab kasutatud lahusti, kuna lahustid erinevad lenduvuse ja polaarsuse poolest ning mõjutavad seetõttu erinevalt polümeriseeruva lähteaine lahustuvuse vähenemist. Kui lahusti aurustumise kiirus geelistumisega võrreldes on piisavalt aeglane, siis on pinnadetailid sfäärilisemad, sest tekkinud tilkade viskoossus on piisavalt suur, et säilitada ümarat kuju, kuni lahusti on täielikult aurustunud. Kui aga lahusti on lenduv, siis on see täielikult aurustunud enne tilkade geelistumist ja vedelad tilgad võivad pinnal liikuda ja moodustada suuremaid struktuure. Suurem vedel tilk aga ei suuda end suure tõenäosusega sfäärilisena hoida ja vajub palju rohkem laiali võrreldes väiksematega. Skemaatiliselt seletab faasialduse protsessi joonis 3.



Joonis 3. Ümarate pinnadetailidega kaetud pindade valmistamine sool-geel faasieralduse meetodiga.

## 4.2 Pindade iseloomustamine skaneeriva elektronmikroskoobiga

Selleks, et saada ülevaadet valmistatud pindade struktuurist, kasutati skaneerivat elektronmikroskoopi. Saadud pilte analüüsid leiti, et pihustamise ja vurrkatmise tulemusel saadi ümarad pinnastruktuurid, mille diameeter varieerus vahemikus 200 nm kuni 20 µm. Parameetrite varieerimine ei toonud kaasa lineaarset muutust pinnadetailide kujus ja suures. Erinevate lahustite puhul mõjutasid kontsentratsiooni S ja vee- alkoksiidi moolsuhte R muutused tekkivate pindade struktuursust erinevalt. Siiski, lahusti polaarsuse ja lenduvuse suurenemine (propanool < etanool < metanool) tõid kaasa struktuuride diameetri kasvu. Kõige väiksemad struktuurid saadi, kui lahustina kasutati propanooli, suuruselt järgmised saadi, kui lahustina kasutati etanooli ja kõige suuremad pinnastruktuurid saadi, kui lahustiks oli metanool. Täpsemalt on üldiseid tendentse katmismeetodi, lahusti, kontsentratsiooni ja R-i mõjust struktuuride suurusle, kujule ja tihedusele kirjeldatud ja analüüsitud järgnevates alapeatükkides.

### 4.2.1 Katmismeetod

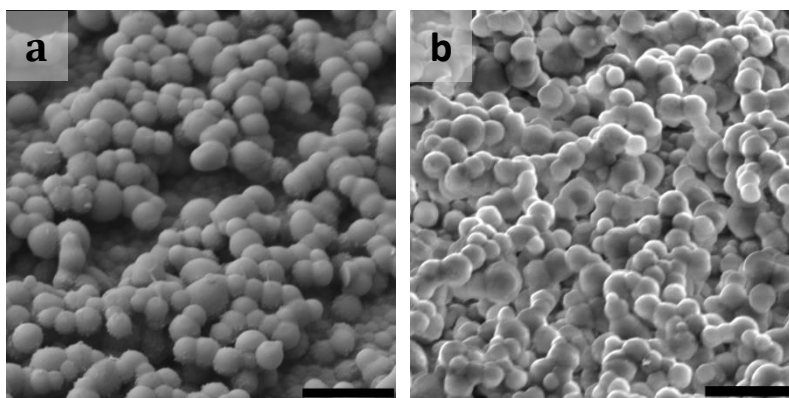
Kaks katmismeetodit, vurrkatmine ja pihustamine, viisid suhteliselt erinevate tulemusteni. Vurrkatmine on sooli koostise muutuste suhtes tundlikum, kuna alusele struktuure moodustava aine hulka mõjutab lisaks pinnale kantava lähteaine hulgale ka aluse pöörlemine. Seetõttu varieerub pinnadetailide suurus rohkem. Suurem osa materjalist, mis vurrkatmise alguses pinnale kantakse, visatakse tsentrifugaaljõudude mõjul aluse pöörlemise ajal sealt ära. Faasieraldus toimub alusele jäävas kihis ja selle kihi paksus sõltub lahuse viskoossusest. Viskoossust omakorda mõjutavad nii lahuse kontsentratsioon kui ka polümeerisatsioonaste. Pihustamisel jääb alusele alles kõik sinna kantud aine. Kuna see ainekiht on paksem kui vurrkatmisel alusele jäänud kiht, siis on ka struktuuride diameeter ja kõrgus suuremad kui vurrkatmisel. Üldiselt tekivad pihustamisel sfäärilisemad ja vurrkatmisel lamedamad struktuurid. Pihustamisel liigub alus ainult pikisuunas edasi-tagasi ja palju aeglasemalt võrreldes vurrkatturiga, mis pöörleb kiirusega 2000 pööret minutis. Seetõttu säilib pihustamisel tilkade sfääriline kuju, aga vurrkatmise puhul nähtavat pinnastruktuuride lamedamat kuju võib selgitada tsentrifugaaljõu



mõjuga pinnale jäänud tilkadele. Pindade erinevust võib põhjustada ka see, et vurrkatmisel kantakse sool alusele palju väiksemalt distantsilt kui pihustamisel. Seetõttu on pihustamisel lahus pikemat aega enne alusele jõudmist õhu käes ja see võib mõjutada geelistumisprotsessi.

#### 4.2.2 Kontsentratsioonide varieerimise katseseeria

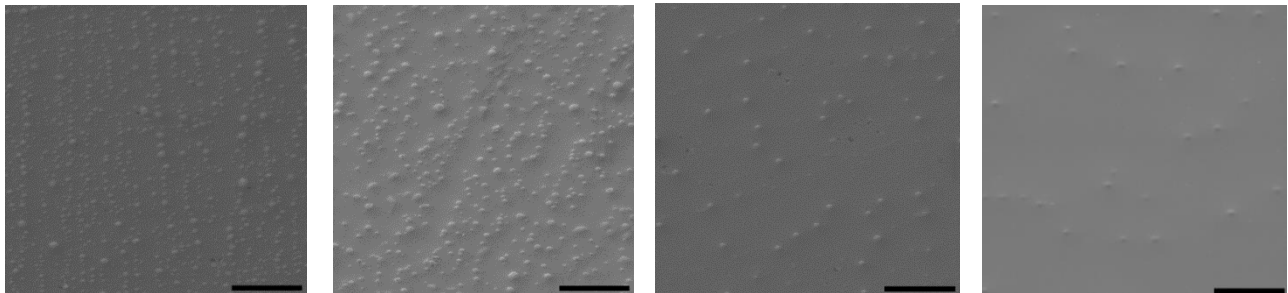
Kontsentratsiooni  $S$  mõju hindamiseks faasieralduse protsessile valmistati iga lahustiga 5 erineva kontsentratsiooniga lahust. Kõikide lahuste, mille  $S=1$ , pihustamisel tekkisid mitmekihilised kitsa suuruse jaotusega ümarate struktuuridega poorsed pinnad (joonis 4). Nende puhul võib arvata, et faasieraldus toimus spinodaalse lagunemise teel, ülejäänud pindade puhul võib eeldada nukleatsiooni ja kasvu mehhanismi. Kuna poorsete pindade valmistamine selliste struktuuride väiksemast uudsusest tingituna ei olnud selle töö eesmärgiks, siis väiksema kontsentratsiooniga lahuseid, kui  $S=1$ , pärast esmaseid katsetusi ei valmistatud ja otsustati kontsentratsiooni  $S$  suurendada.



Joonis 4. Näiteid pihustatud poorsetest struktuuridest, mille valmistamisel kasutati lahustina metanooli (a) ja etanooli (b). Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le.

Propanooli kontsentratsiooni  $S$  suurendamisel vahemikus 5-17 vähenes vurrkatmisel struktuuride arv pinnaühiku kohta (pindtihedus) (joonis 5). Kõige tihedamalt oli pind struktuuridega täidetud, kui  $S=5$ , aga kui  $S=17$ , siis on sama suurel pinnal vaid mõni üksik struktuur. Pindtihedus muutus kontsentratsiooni  $S$  varieerimise tulemusena vahemikus 5-200 struktuuri 100  $\mu\text{m}^2$  kohta.

Struktuuride arvu vähenemise põhjuseks on väiksem materjalikogus, mis pinnale vurrkatmisel jääb, kuna lahusti kontsentratsioon  $S$  kasvab ja TEOSi suhteline kogus väheneb. Struktuuride suurus on ligikaudu 200 nm ja seda kontsentratsiooni muutmine eriti ei mõjutanud. Kui  $S=1$ , siis on pindtihedus väiksem, kui  $S=5$  puhul, kuid struktuurid on veidi suuremad, umbes 500 nm suurusjärgus.  $S=1$  korral jõuab pinnale rohkem ainet, kuna TEOSi on rohkem. Samal ajal on lahustit vähem, kui suuremate  $S$ -ide korral ja selle aurustumiseks kulub seega vähem aega. Seetõttu ei ole geelistumisprotsess nii kaugale jõudnud, kui kõrgema lahusti kontsentratsiooniga pindadel ja veel vedelad tilgad võivad pinnal liituda ning moodustada suuremaid struktuure. Struktuuride liitumise käigus väheneb ka pindtihedus. Propanoolil on teiste kasutatud lahustitega võrreldes suhteliselt madal polaarsus. Selle tõttu võib oletada, et faasieraldus ei ole täielikult toimunud ja tekkinud pinnastruktuuride vahel on ka õhuke, elektronmikroskoobi lahutuse juures sile, mittepoorne kilekiht. Pihustamisel sarnast pindtiheduse muutust ei täheldatud, vaid pind on ühtlaselt tihedalt täidetud. Pihustamisega valmistatud struktuuride diameeter on ligikaudu 700 nm, kuid see veidi väheneb, kui kontsentratsioon  $S$  kasvab vahemikus 9-17.



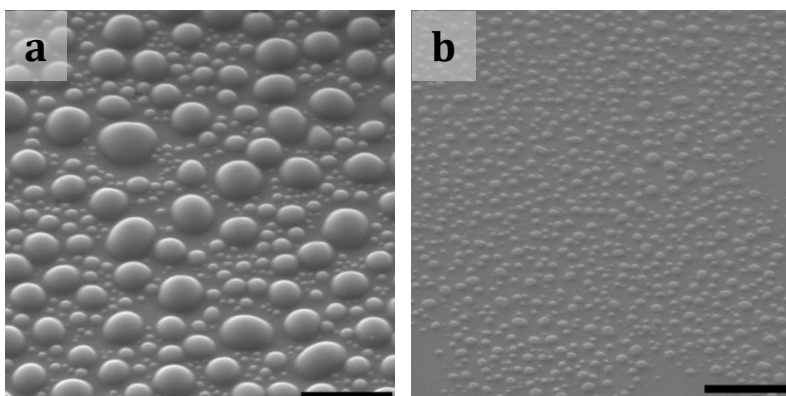
Joonis 5. Kontsentratsiooni varieerimine, kui lahustiks on propanool.  $S$  kasvab vasakult paremale. Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le.

Etanooli puhul vurrkatmisel kontsentratsiooni  $S$  kasvades pindtihedus suureneb. Struktuuride vahel on sama kaugus, kuid mida suurem on  $S$ , seda ühtlasem on struktuuride suuruse jaotus. Pinnal  $S=1$  on peamiselt suuremad 2  $\mu\text{m}$  struktuurid. Pinnal  $S=5$  on mõned suuremad 1-2  $\mu\text{m}$  struktuurid ja nende vahel väiksemad 200-500 nm struktuurid. Kontsentratsiooni  $S$  kasvades suurte struktuuride arv järjest kahaneb ja väga sarnastel pindadel  $S=9$  ning  $S=13$  on ainult 200-500 nm struktuurid. Jällegi võib arvata, et suuremad struktuurid on tekkinud väiksemate struktuuride liitumisel. Väiksemate  $S$ -ide puhul on suuri struktuure rohkem, sest siis on TEOSi komponenti rohkem ja lahustit vähem. Kogu lahusti on jõudnud enne ära aurustuda, kui materjal

geelistub ja nii saavad veel vedelad väiksemad tilgad liituda. Kui  $S$  on suurem, on TEOSE kogus väiksem ja lahustit on rohkem. Lahusti aurustumiseks kulub rohkem aega, mistõttu on geelistumisprotsess lahusti aurustumise lõpuks kaugemale jõudnud ja väiksemate tilkade liitumist suuremateks esineb oluliselt vähem. Etanooli puhul esineb väiksemate tilkade liitumist suuremateks rohkematel pindadel kui propanooli puhul, sest etanool aurustub kiiremini ja seepärast jõuab ka suurem kogus lahustit enne geelistumise lõppu ära aurustuda. Pindtihedus on 60-100 struktuuri  $100 \mu\text{m}^2$  kohta.  $S=17$  puhul pinnal struktuure näha ei ole, lähteainest on moodustunud vaid sile kile.

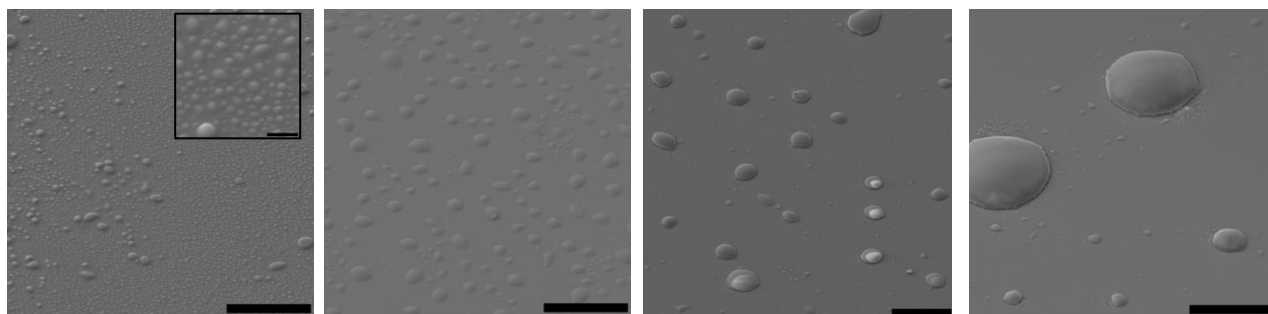
Kui lahustina kasutati etanooli, siis pihustatud pindadel kasvab struktuuride diameeter kontsentratsiooni  $S$  vahemikus 5-13. Kui  $S=17$ , siis on struktuurid jälle väiksemad. Samas vahemikus väheneb väikeste struktuuride hulk suurte vahel. Kui  $S=5$ , siis 500 nm struktuuride vahel on mõned suuremad  $2 \mu\text{m}$  struktuurid. Kui  $S=9$ , siis on  $2 \mu\text{m}$  diameetriga struktuure oluliselt rohkem, kui  $S=5$  puhul. Siiski on ka siin suuremate vahel 500 ja 200 nm diameetriga struktuure. Kontsentratsiooni  $S=13$  korral aga on  $2,5 \mu\text{m}$  struktuuride vahel mõned üksikud  $1 \mu\text{m}$  struktuurid.  $S=17$  juures on struktuuride diameeter kahanenud  $1 \mu\text{m}$ -ni ja nende kuju on muutunud lamedaks ja asümmeetriliseks. See viitab veel geelistumata tilkade ühinemisele pinnal, kuid kõrge viskoossuse tõttu ei ole nende sümmeetriline kuju taastunud. Ülejäänud pihustatud pindadel on struktuurid sfäärilisemad.

Kui lahustina kasutati etanooli, siis on kõige selgemini näha kahe katmismeetodi erinevused sama lahusti kontsentratsiooni ja vee-alkoksiidi moolsuhtega lahuste korral – pihustatud struktuurid on diameetrilt ja kõrguselt suuremad. Näiteks kahel pinnal, millel  $S=9$  ja  $R=1.2$ , on struktuuride suuruse erinevus umbes 10 korda (joonis 6).



Joonis 6. Pihustamisega (a) ja vurrkatturiga (b) valmistatud pinnastruktuuride suuruse ja geomeetria võrdlus. Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le.

Metanool on lahustitest kõige polaarsem ning see viib kiire ja täieliku faasieralduseni. Samal ajal on metanool ka kõige lendavam ja seetõttu ei ole TEOS jõudnud selleks hetkeks, kui kogu lahusti on aurustunud, eriti polümeriseeruda ja ikka veel vedelad tilgad võivad pinnal liituda ka suurte lahusti kontsentratsioonide korral. Selle tulemusel tekib pihustamisel suhteliselt vähe võrdlemisi suuri pinnadetaile või ainult sile kile. Kui metanooli kogust katsete käigus suurendati, siis vurrkatmisega valmistatud pindadel kasvas struktuuride diameeter (joonis 7). Seejuures ei ole struktuuride suuruse jaotus ühtlane ja ühel pinnal on vähemalt kahe erineva diameetriga struktuure. Kui  $S=1$ , siis esinevad mõned 2  $\mu\text{m}$  diameetriga struktuurid ja nende vahel asetseb palju umbes 500 nm diameetriga struktuure. Kontsentratsiooni  $S=5$  korral on pinnal 4  $\mu\text{m}$  diameetriga struktuurid ja nende vahel mõned alla 1  $\mu\text{m}$  struktuurid. Kui  $S=9$ , siis on suuremate struktuuride diameeter juba 8-10  $\mu\text{m}$ , kasvades  $S=13$  puhul 20  $\mu\text{m}$ -ni. Nende vahel on siiski ka mõned üksikud väiksemad struktuurid. Kontsentratsiooniga  $S=17$  tekkis pidev kile.



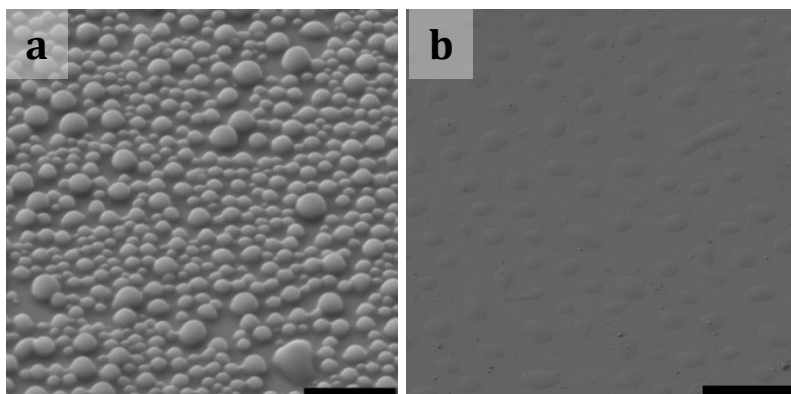
Joonis 7. Kontsentratsiooni varieerimine, kui lahustiks on metanool. Kontsentratsioon kasvab vasakult paremale. Skaala vastab 20  $\mu\text{m}$ -le. Vasakult esimest pinda on lähemalt näha väiksemal pildil, mille skaala vastab 2  $\mu\text{m}$ -le.

### 4.2.3 Vee ja alkoksiidi moolsuhte varieerimise katseseeria

Vee ja alkoksiidi moolsuhte mõju hindamiseks valmistati kõigi lahustitega 6 erineva R-iga lahust. Kui lahustina kasutati propanooli, tõi vee ja alkoksiidi moolsuhte varieerimine kaasa pindtiheduse muutumise nii vurrkatmisel kui pihustamisel. Mõlema katmismeetodi puhul suureneb pindtihedus veidi, kui moolsuhe kasvab vahemikus 0.4-2. Suurema R-i puhul on lahus polümeriseerunud ja tekkinud suurematest oligomeeridest saab tekkida rohkem pinnastrukture. Vurrkatmisel varieerus pindtihedus vahemikus 5-150 struktuuri  $100 \mu\text{m}^2$  kohta ja pihustamisel 30-200 struktuuri  $100 \mu\text{m}^2$  kohta. Kui vee ja alkoksiidi moolsuhe on 4, siis on pind kaetud ühtlase sileda kilega, sest faasieraldust ei toimu, kuna polümerisatsioon on lõpuni kulgenud juba algses lahuses ja elektronmikroskoobis ei ole näha ainult lahusti aurustumisest põhjustatud faasieralduse tõttu tekkinud struktuursust. Struktuuride suuruses, mis on vurrkatmisel 200 nm ja pihustamisel 500 nm, märgatavad muutused puuduvad.

Etanooli lahustina kasutades tõi R-i suurendamine kaasa väikese suurenemise pindtiheduses, mis muutus vurrkatmisel vahemikus 20-100 struktuuri  $100 \mu\text{m}^2$  kohta ja pihustamisel vahemikus 80-100 struktuuri  $100 \mu\text{m}^2$  kohta. Kui  $R=1.6$ , siis saadi pihustamisega kõige sfäärilisemad struktuurid (joonis 8a). Nii pihustamisel kui ka vurrkatmisel tekkis  $R=4$  puhul ainult sile kile.

Kasutades lahustina metanooli, tekib pindadel pidev kile pihustamisel juba  $R=1.6$ -st alates. Vee ja alkoksiidi moolsuhte R suurendamisel vahemikus 0.4-1.2 struktuuride suurus kasvab.  $R=0.4$  puhul leidub pinnal 10 ja  $20 \mu\text{m}$  struktuure, mille vahel on väikesed 500 nm struktuurid.  $R=0.8$  korral on struktuuride diameeter  $20 \mu\text{m}$  ja nende vahel mõned üksikud 500 nm struktuurid.  $R=1.2$  puhul on tekkinud pidevat kilet meenutav struktuur, mille sees on tühjad alad, kus on mõned väikesed struktuurid. Vurrkatmisel kasvab R-i suurendamisel samuti struktuuride diameeter, kuid suuremate R-ide puhul on struktuurid asümmeetrilise kujuga (joonis 8b). Vee ja alkoksiidi moolsuhte suurenemisel kasvab ka pindtihedus.



Joonis 8. a) Näide kõige sfäärilisemate struktuuridega pinnast. Lahustina kasutati etanooli, katmismeetodina pihustamist ning  $R=1.6$  ja  $S=9$ . Skaala vastab  $5\ \mu\text{m}$ -le. b) Näide asümmeetrilise kujuga struktuuridest. Lahustina kasutati metanooli, katmismeetodina vurrkatmist ning  $R=1.6$  ja  $S=9$ . Skaala vastab  $50\ \mu\text{m}$ -le.

#### 4.2.4 Õhuniiskuse mõju

Korduskatsetes oli õhuniiskus veidi erinev, seega saab välja tuua ka selle mõju struktuuride omadustele. Kui suhteline õhuniiskus on kõrgem, siis struktuurid on ümaramad ja pindtihedus on suurem. Kõrgema õhuniiskuse korral aurustub lahusti aeglasemalt ja veel geelistumata tilgad on piisavalt viskoossed, et säilitada ümarat kuju. Siiski tuleks õhuniiskuse mõju täpsemaks hindamiseks teostada veel katseid ja muuta suhtelist õhuniiskust süstemaatiliselt suuremas vahemikus ning seejuures hinnata ka temperatuuri mõju.

### 4.3 Vee kontaktnurga mõõtmised

Valmistatud pindade hüdrofoobsust hinnati vee kontaktnurga mõõtmiste kaudu. Saadud tulemused on toodud tabelites 3 ja 4. Fotod kõigist kontaktnurkadest on toodud lisas koos SEM-i piltidega. Enamikul juhtudel on pihustamise teel valmistatud pindadel vee kontaktnurk suurem kui vurrkatmisega valmistatud pindadel, sest pihustatud pindadel on valdavalt sfäärilisemad struktuurid. Kontaktnurgad on vahemikus  $50-130^\circ$ , kontsentratsioonide varieerimise katseseerias vahemikus  $60-130^\circ$  ning R-i varieerimise katseseerias vahemikus  $50-88^\circ$ . Suurimad kontaktnurgad saadi kõige kontsentreeritumate lahustega, mille  $S=1$ . Pihustamisega valmistatud pind, mille valmistamiseks kasutati lahustina etanooli ning mille  $S=1$  ja  $R=1.2$  (joonis 9c,f), osutus kõige hüdrofoobsemaks. Selle pinna vee kontaktnurk on  $131^\circ$ . Lahustest, mille  $S=1$ , on tekkinud pigem poorsed kiled, mitte uudsed ühekihilised poolsfäärilaadsete struktuuridega kaetud pinnad. Struktuuri põhimõtteline erinevus seletab seega seda, miks nende pindade kontaktnurgad on ülejäänud pindade kontaktnurkadest oluliselt suuremad. Kõige hüdrofiilsem on vurrkatturiga valmistatud pind, mille valmistamiseks kasutati lahustina etanooli ning mille  $R=1.2$  ja  $S=9$ , kontaktnurgaga  $49^\circ$  (joonis 9a,d). Kõige levinumad kontaktnurkade väärtused on  $70-80^\circ$  vahemikus (joonis 9b,e).

On oluline märkida, et pindade hüdrofoobsust mõjutab ainult struktuur, mitte pinnaenergia, mis valmistatud objektidel on suhteliselt suur. Selle demonstreerimiseks valmistati sarnasel moel pind, kasutades vanandatud TEOSE lahust, milles faasieraldust ei toimu. Tulemusena tekkis sile kile ilma märgatava pinnakareduseta. Sellel võrdluspinnal mõõdeti vee kontaktnurgaks  $25^\circ$ .

Vee kontaktnurga muutumise ja kontsentratsiooni  $S$  suurenemise vahel ei esine selget lineaarset sõltuvust. Siiski võib öelda, et kontsentratsioonide varieerimise katseseerias pihustamisel üldiselt kontaktnurk väheneb lahusti koguse suurenemisel. Kõige selgemini on see seos näha pihustatud pindadel, mille valmistamisel kasutati lahustina etanooli. Sellel juhul saadi pihustamisel ka kõige suuremad kontaktnurgad, sest tekkinud struktuurid on kõige sfäärilisemad. Propanooli ja metanooliga on struktuurid oluliselt lamedamad.

Vurrkatturiga valmistatud pindadel olid erinevate lahustitega läbiviidud seeriade puhul kontaktnurga muutused kvalitatiivselt erinevad. Kui lahustina kasutati etanooli, siis kontaktnurk

väheneb kontsentratsiooni S kasvades. Kui lahustiks on propanool, siis kontsentratsiooni S kasvamisel alguses kontaktnurk suureneb, kuid siis jälle väheneb. Siiski on muutused üsna väikesed ja samal ajal kui S suureneb 4 ühiku võrra, muutub kontaktnurk mõne kraadi võrra. Kasutades lahustina metanooli, kontaktnurk hoopis suureneb koos lahusti kontsentratsiooni S suurenemisega. Kasutatud kolmest lahustist saadi kõige suuremad kontaktnurgad vurrkatmisel propanooliga, millega saadakse järelkult suurima pinnakaredusega struktuursed kiled.

Tabel 3. Vee kontaktnurgad kontsentratsioonide varieerimisel.

Kontsentratsioon S	EtOH pihustamine	EtOH vurrkattur	MetOH pihustamine	MetOH vurrkattur	PrOH pihustamine	PrOH vurrkattur
1	131	76	119	69	119	76
5	85	75	80	69	87	81
9	85	75	62	73	79	80
13	83	71	55	76	80	76
17	77	80	72	71	77	79

Selget lineaarset sõltuvust ei ole ka kontaktnurga ja vee-alkoksiidi molaarsuhte vahel. R-i varieerimise katses on nii vurrkatmise kui pihustamise puhul kõige suuremad kontaktnurgad objektidel, mille valmistamisel on lahustina kasutatud propanooli. Ühtlasi on kontaktnurkade muutused kogu seeria piires nii pihustamisel kui vurrkatmisel kõige väiksemad propanooli puhul. Seda võib põhjendada propanooli raskema lenduvusega, mille tõttu struktuuride jaotus ja kuju väga palju ei erine R-i varieerides.

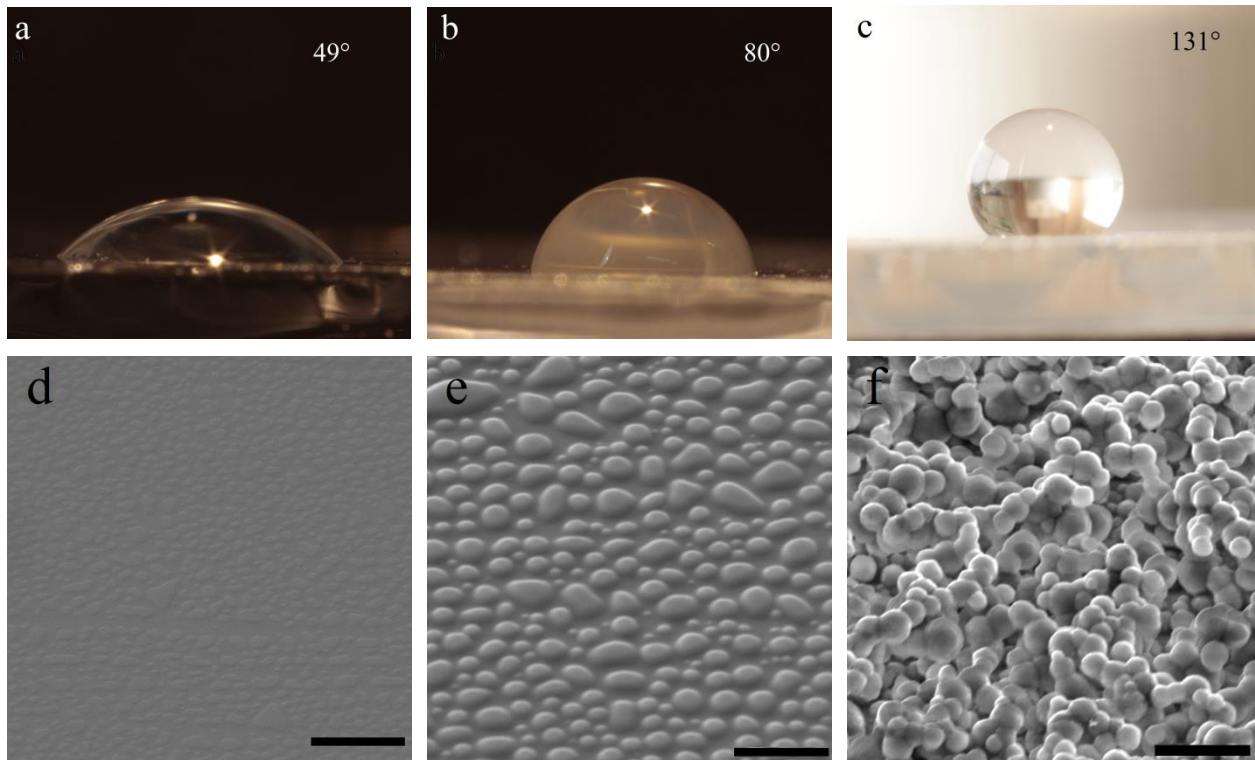
Tabel 4. Vee kontaktnurgad R-i varieerimise katsetes.

R	EtOH pihustamine	EtOH vurrkattur	MetOH pihustamine	MetOH vurrkattur	PrOH pihustamine	PrOH vurrkattur
0.4	55	62	69	52	86	83
0.8	75	63	64	75	85	82
1.2	80	49	71	61	84	83
1.6	88	70	77	65	83	82
2	74	69	64	64	84	82
4	59	57	68	61	80	77

Ühtegi pindadest ei saa mõõdetud kontaktnurkade põhjal nimetada superhüdrofoobseks (alates 150°), mis enamasti saavutatakse struktuuri ja madala pinnaenergia koosmõjus. Hüdrofoobsuse



tõstmiseks on võimalik kasutada fluoriid-, metüül- või muude funktsionaalrühmadega alkoksühendeid või katta struktuurid hiljem hüdrofoobse kilega.



Joonis 9. Näiteid kontaktnurkadest ja SEM-i pildid vastavate pindade struktuurist. a,d) vurrkatmisega valmistatud pind, millel vee kontaktnurk on 49°. Lahustina on kasutatud etanooli ning  $R=1.2$  ja  $S=9$ . b,e) pihustatud pind, millel vee kontaktnurk on 80°. Lahustina on kasutatud etanooli ning  $R=1.2$  ja  $S=9$ . c,f) pihustatud pind, millel vee kontaktnurk on 131°. Lahustina on kasutatud etanooli ning  $R=1.2$  ja  $S=1$ . Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le.

## 5 Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli sool-geel-meetodit mõjutavate parameetrite, nagu lahusti tüüp, lahusti kogus, vee ja alkoksiidi moolsuhe, katmismeetod, keskkonna õhuniiskus ja temperatuur, mõju hindamine uude sool-geel lahuses toimuva faasialdusel põhineva meetodiga valmistatud pinnastruktuuride suurusele, pindtihedusele ja geometriale. Valmistatud pindu iseloomustati skaneeriva elektronmikroskoobiga ja vee kontaktnurga mõõtmiste kaudu.

Põhilised tulemused ja järeldused on järgmised:

- Sool-geel faasialduse meetodiga saadi ümarad pinnastruktuurid. Lahuse kontsentratsiooni varieerimine ja vee-alkoksiidi moolsuhte muutmine toovad kaasa muutused pindtiheduses ja struktuuride geometrias. Struktuuride diameeter varieerus vahemikus 200 nm kuni 20  $\mu\text{m}$  ning pindtihedus vahemikus 5-200 struktuuri 100  $\mu\text{m}^2$  kohta.
- Erinevaid lahusteid kasutades saadi kontsentratsiooni ja vee-alkoksiidi moolsuhte muutest varieeruvad tulemused. Lahusti polaarsuse ja lenduvuse kasv toovad kaasa pinnastruktuuride suurenemise. Kõige suurema diameetriga struktuurid saadi käesolevas töös, kasutades lahustina metanooli ja kõige väiksemad kasutades propanooli.
- Metanooli lahustega läbiviidud katseseeria näitas, et tekkivate ümarate pinnadetailide suurus on varieeritav vähemalt vahemikus 500 nm kuni 20  $\mu\text{m}$ .
- Katseseeriates, mille puhul kasutati lahustina propanooli, täheldati selget pinnastruktuuride pindtiheduse ja kontsentratsiooni vahelist sõltuvust. Seejuures jäi struktuuride suurus samaks.
- Vurrkatmine on lähteaine koostise muutuste suhtes tundlikum ja pinnadetailide suurus varieerub erinevate seeriade puhul enam. Pihustamisega on võimalik valmistada suurema diameetri ja kõrgusega ning sfäärilisemaid struktuure.
- Vee kontaktnurkade väärtused jäid enamasti vahemikku 70-80°. Suurim leitud kontaktnurga väärtus oli 131°, mis määrati poorsel kilel. Kõige suuremad kontaktnurgad vee-alkoksiidi moolsuhte varieerimise katses määrati pindadel, mille valmistamisel kasutati lahustina propanooli.

Tulemuste põhjal võib öelda, et sool-geel faasieralduse meetodi esmased parameetrite varieerimise katsed võimaldavad teatud määral kontrollida pinnastruktuuride suurust, pindtihedust ja kuju. See annab võimaluse valmistatud pindu disainida vastavalt vajadusele. Näiteks võiksid valmistatud struktuurid edaspidi leida kasutust nii optiliselt funktsionaalsete kui ka superhüdrofoobsete pindade edasiarendamisel.

## 6 Summary

### Micro- and nanopatterned surfaces prepared by novel sol-gel phase separation method

The aim of this research was to study the effect of reaction parameters such as solvent type, solvent concentration, water-alkoxide molar ratio, coating method, humidity and temperature on the size, surface density and shape of surface structures prepared by sol-gel phase separation process. Surfaces were characterized by scanning electron microscope and water contact angle measurements.

The main experimental results and conclusions are as follows:

- Round surface structures were obtained by sol-gel phase separation method. Varying solvent concentration and water-alkoxide molar ratio resulted in change in the surface density and geometry of structures. Diameter ranged from 200 nm to 20  $\mu\text{m}$  and surface density from 5-200 structures per 100  $\mu\text{m}^2$ .
- Different solvents behaved differently in response to varying solvent concentration and water-alkoxide molar ratio. Increase in solvent polarity and volatility led to increase in size of structures. The largest structures were obtained by using methanol as a solvent and the smallest by using propanol.
- Using methanol as a solvent, it is possible to vary diameters of structures from 500nm to 2  $\mu\text{m}$ .
- When propanol is used, there is a direct correlation between surface density of obtained structures and solution concentration .
- Spin-coating is more sensitive to variations in parameters of stock solution, and size of surface structures varied most. Generally, structures via spraying were larger in diameter and height and more spherical.
- The highest obtained water contact angle was 131° in case of obtained porous films. Most of the WCAs obtained in case of surfaces covered by a single layer of surface features were between 70-80°. In general, the highest WCAs were achieved, when varying the water-alkoxide molar ratio using propanol as a solvent.

Based on the results, it can be concluded, that size, surface density and geometry of round structures can be controlled by varying parameters in sol-gel phase separation method. In order to design patterned surfaces for specific applications, further targeted studies will follow in order to optimize synthesis and coating parameters accordingly. For example, prepared structured surfaces might be good candidates for developing optically functional or superhydrophobic surfaces.

## 7 Kasutatud kirjanduse loetelu

- [1] C. Sanchez, B. Lebeau, F. Chaput and J.-P. Boilot, Optical Properties of Functional Hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites, *Advanced Materials*, 2003, 15, 1969.
- [2] P. C. A. Jerónimo, Alberto N. Araújo, M. Conceição, B.S.M. Montenegro, Optical sensors and biosensors based on sol-gel films, *Talanta*, 2007, 72, 13-27.
- [3] D. Avnir, T. Coradin, O. Lev and J. Livage, Recent bio-applications of sol-gel materials, *J. Mater Chem.*, 2006, 16, 1013-1030.
- [4] V. Purcar, I. Stamatina, O. Cinteza, C. Petcu, V. Raditoiu, M. Ghiurea, T. Miclaus, A. Andronie, Fabrication of hydrophobic and antireflective coatings based on hybrid silica films by sol-gel process, *Surface & Coatings Technology*, 2012, 206, 4440-4454.
- [5] T. Tätte, R. Talviste, A. Vorobjov, M. Part, M. Paalo, V. Kiisk, K. Saal, A. Lõhmus, I. Kink, Preparation and applications of transition metal oxide nanofibres and nanolines, *Technical Proceedings of the 2008 Nanotechnology Conference and Trade Show*, 2008, Nanotech.
- [6] T. Tätte, T. Avarmaa, R. Lõhmus, U. Mäeorg, M.-E. Pistol, R. Raid, I. Sildos, A. Lõhmus, Transparent and conductive Sb-doped tin oxide SPM tips prepared by sol-gel method, *Materials Science and Engineering C*, 2002, 19, 101-104.
- [7] V. Kiisk, I. Sildos, S. Lange, V. Reedo, T. Tätte, M. Kirm, J. Aarik, Photoluminescence characterization of pure and Sm<sup>3+</sup>-doped thin metaloxide films, *Applied Surface Science*, 2005, 247, 412-417.
- [8] V. Kiisk, V. Reedo, O. Sild, I. Sildos, Luminescence properties of sol-gel derived TiO<sub>2</sub>:Sm powder, *Optical Materials*, 2009, 31, 1376-1379.
- [9] M. Järvekülg, R. Välbe, J. Jõgi, A. Salundi, T. Kangur, V. Reedo, J. Kalda, U. Mäeorg, A. Lõhmus and A. E. Romanov, A sol-gel approach to self-formation of microtubular structures from metal alkoxide gel films, *Phys. Status Solidi A* 209, 2012, No.12, 2481-2486.

- [10] M. Timusk, Development and characterization of hybrid electro-optical materials, 2012 *doktoritöö*, Tartu Ülikool.
- [11] R. G. Flemming, C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman, P. F. Nealey, Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior, *Biomaterials*, 1999. 20, 573-588.
- [12] H. Jung, K.-H. Jeong, Monolithic polymer microlens arrays with antireflective nanostructures, *Applied Physics Letters*, 2012, 101.
- [13] Y. Y. Yan, N. Gao, W. Barthlott, Mimicking natural superhydrophobic surfaces and grasping the wetting process: A review on recent progress in preparing superhydrophobic surfaces, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2011, 169, 80-105.
- [14] V. V. Ganbavle, U. K. H. Bangi, S. S. Lathe, S. A. Mahadik, A. Venkateswara Rao, Self-cleaning silica coatings on glass by single step sol-gel route, *Surface & Coatings Technology*, 2011, 205, 5338-5344.
- [15] B. J. J. Zelinski, D. R. Uhlman, Gel technology in ceramics, *Phys. Chem. Solids*, 1984, 45, 1069-1090.
- [16] K. Saal, T. Tätte, M. Järvekülg, V. Reedo, A. Lõhmus and I. Kink, Micro- and nanoscale structures by sol-gel processing, *Int. J. Materials and Product Technology*, 2011, Vol. 40, Nos. 1/2, 2-14.
- [17] M. Kato, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, Silica sol-gel monolithic materials and their use in a variety of applications, *J. Sep. Sci.*, 2005, 28, 1893–1908.
- [18] A. Soleimani Dorcheh, M. H. Abbasi, Silica aerogel; synthesis, properties and characterization, *Journal of Materials Processing Technology*, 2008, 199, 10-26.
- [19] L. F. Francis, Sol-Gel Methods for Oxide Coatings, *Materials and Manufacturing Processes*, 1997, 12, 963-1015.
- [20] R. Pärna, U. Joost, E. Nõmmiste, T. Käämbre, A. Kikas, I. Kuusik, I. Kink, M. Hirsimäki and V. Kisand, „Effect of different annealing temperatures and SiO<sub>2</sub>/Si(100) substrate on the

properties of nickel containing titania thin sol-gel films, *Phys. Status Solidi A* 209, 2012, No. 5, 953–965.

[21] V. Kiisk, T. Kangur, M. Paalo, T. Tätte, S. Lange, S. Pikker, I. Sildos, Structural and luminescence characteristics of SnO<sub>2</sub>:Eu and SnO<sub>2</sub>:Eu,Sb nanophosphors upon annealing at high temperatures, *Materials Chemistry and Physics*, 2011, 130, 203-208.

[22] M. Timusk, M. Järvekülg, A. Salundi, R. Lõhmus, S. Leinberg, I. Kink and K. Saal, Optical properties of high-performance liquid crystal-xerogel microcomposite electro-optical film, *Journal of Materials Research*, 2012, Vol 27, 09, 1257-1264.

[23] M. R. N. Monton, E. M Forsberg and J. D. Brennan, Tailoring Sol-Gel Derived Silica Materials for Optical Biosensing, *Chemistry of Materials*, 2012, 24, 796-811.

[24] S. Sakka, H. Kozuka, *Handbook of Sol-Gel Science and Technology. Processing, Characterization and Applications. Volume I: Sol-Gel Processing*, Kluwer Academic Publishers, p. 405.

[25] Z. Ma, H. Ji, Y. Teng, G. Dong, J. Zhou, D. Tan, J. Qiu, Engineering and optimization of nano- and mesoporous silica fibers using sol-gel and electrospinning techniques for sorption of heavy metal ions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, 358, 547-553.

[26] K. Nakanishi and N. Tanaka, Sol-Gel with Phase Separation. Hierarchically Porous Materials Optimized for High-Performance Liquid Chromatography Separations, *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 863–873.

[27] K. Kajihara, S. Kuwatani, R. Maehana and K. Kanamura, Macroscopic Phase Separation in a Tetraethoxsilane-Water Binary Sol-Gel System, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2009, Vol. 82, No. 12, 1470–1476.

[28] N. J. Shirtcliffe, G. McHale, M. I. Newton and C. C. Perry, Intrinsically Superhydrophobic Organosilica Sol-Gel Foams, *Langmuir*, 2003, 19, 5626-5631.



- [29] M. Shinji, K. Mitsuhiro, Method of manufacturing light scattering article and article manufactured by same, 2006, rahvusvaheline G02B5/02 ja G02F1/1335. [Online] Espacenet (24.05.2013).
- [30] K. Nakanishi, Sol-Gel Process of Oxides Accompanied by Phase Separation, *The Chemical Society of Japan*, 2006, Vol. 19, No. 5, 673-691.
- [31] E. P. Favvas and A. Ch. Mitropoulos, What is spinodal decomposition?, *Journal of Engineerig Science and Technology Review 1*, 2008, 25-27.
- [32] S. Forster, H. Kolmar, S. Altmaier, Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 2012, 1265, 88– 94.
- [33] N. J. Shirtcliffe, G. McHale, M. I. Newton, G. Chabrol and C. C. Perry, Dual-Scale Roughness Produces Unusually Water-Repellent Surfaces, *Advanced Materials*, 2004, 16, No. 21, 1929-1932.
- [34] J. Drelich, E. Chibowski, D. D. Meng and K. Trepilowski, Hydrophilic and superhydrophilic surfaces and materials, *Soft Matter*, 2011, 7, 9804.
- [35] P. Roach, N. J. Shirtcliffe and M. I. Newton, Progress in superhydrophobic surface development, *Soft Matter*, 2008.
- [36] Z. Yoshimitsu, A. Nakajima, Y. Watanabe and K. Hashimoto, Effects of Surface Structure on the Hydrophobicity and Sliding Behavior of Water Droplets, *Langmuir*, 2002, 18, 5818-5822.
- [37] M. Nosonovsky, B. Bhushan, Superhydrophobic surfaces and emerging applications: Non-adhesion, energy, green engineering, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009, 14, 270-280.
- [38] A. Tuteja, W. Choi, M. Ma, J. M. Mabry, S. A. Mazzella, G. C. Rutledge, G. H. McKinley, R. E. Cohen, Designing Superoleophobic Surfaces, *Science*, 2007, Vol. 318.

- [39] V. Zorba, E. Stratakis, M. Barberoglou, E. Spanakis, P. Tzanetakis, S. H. Anastasiadis and C. Fotakis, Biomimetic Artificial Surfaces Quantitatively Reproduce the Water Repellency of a Lotus Leaf, *Adv. Mater.*, 2008, 20, 4049–4054.
- [40] Y. Xiu, L. Zhu, D. W. Hess and C.P. Wong, Hierarchical Silicon Etched Structures for Controlled Hydrophobicity/Superhydrophobicity, *Nano Letters*, 2007, Vol. 7, No. 11, 3388-3393.
- [41] R. Di Mundo, F. Palumbo and R. D’Agostino, Influence of Chemistry on Wetting Dynamics of Nanotextured Hydrophobic Surfaces, *Langmuir*, 2010, 26, 7, 5196-5201.
- [42] W. Geng, A. Hu, M. Li, Super-hydrophilicity to super-hydrophobicity, transition of a surface with Ni micro-nano cones array, *Applied Surface Science*, 2012, 263, 821-824.

## 8 Tänuavaldused

Soovin tänada kõiki, kes aitasid kaasa minu bakalaureusetöö valmimisele. Eelkõige tänan juhendajaid Triin Kangurit ja Martin Järvekülge. Suur tänu nõuannete ja soovitude ning kannatlikkuse eest töö valmimisel. Tänan ka Ene Voolaidu, kes aine „Eesti keele väljendusõpetus“ raames vaatas üle töö õigekeele. Lisaks tänan Laurits Puusti toetuse ja innustamise eest.

Tänan Eesti Nanotehnoloogiaste Arenduskeskust; Martin Timuskit, kes pani aluse sool-geel faasieraldusel põhinevale meetodile meie uurimisgrupis ja on disaininud töös kasutatud pihustusseadme; Fredrik Punga, kes ehitas valmis katmiseadmed. Samuti Paula Reemanni arstiteaduskonnast ja TÜMRI-st Viljar Jaksi ja Martin Pooki rakkudega läbiviidud katsete eest.

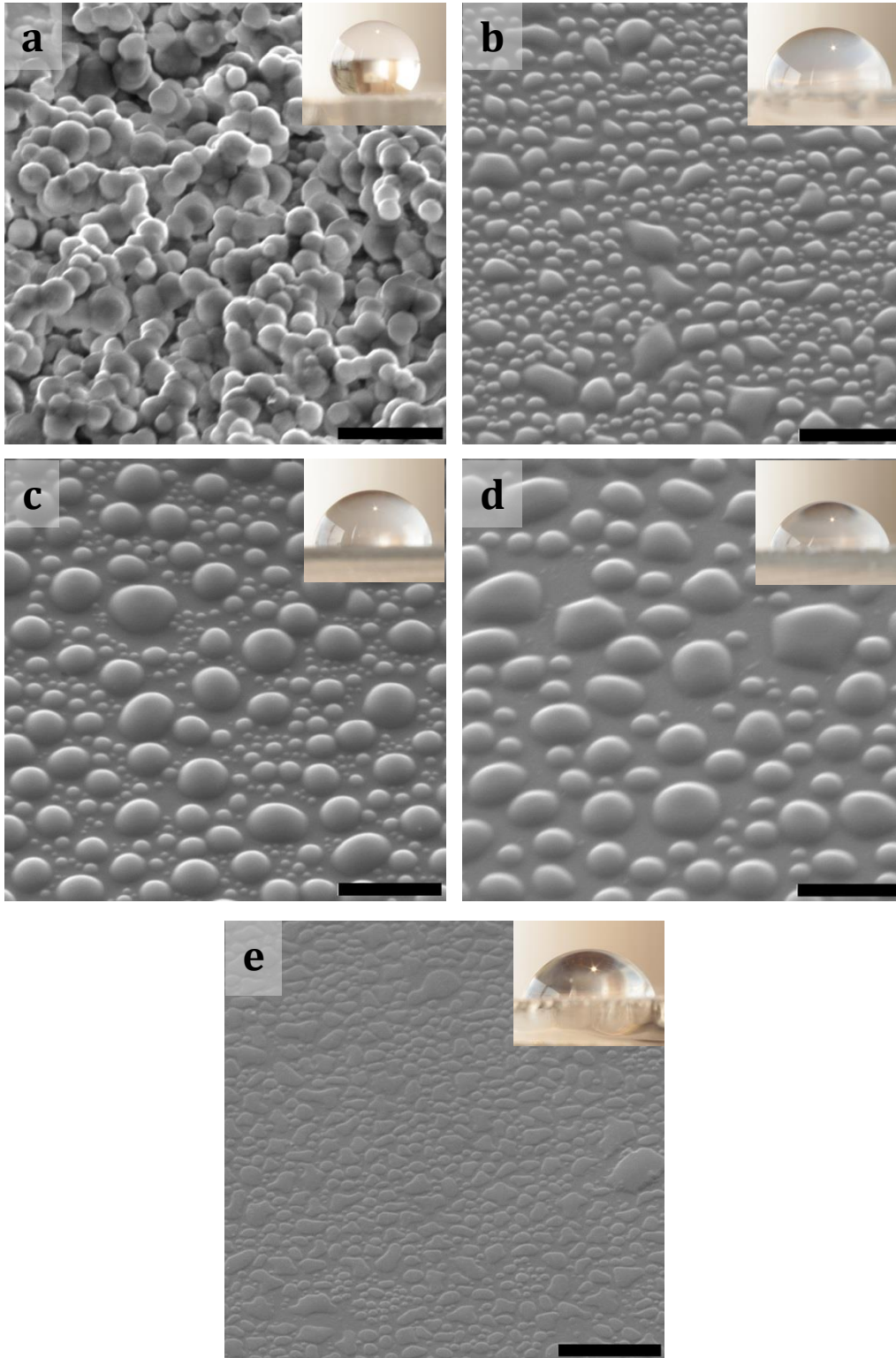
Töö teostamist on toetatud järgnevatest allikatest: ETF8377, ETF8428, IUT2-25, AR12138, tippkeskus “Mesosüsteemide teooria ja rakendused”.

## 9 Lisad

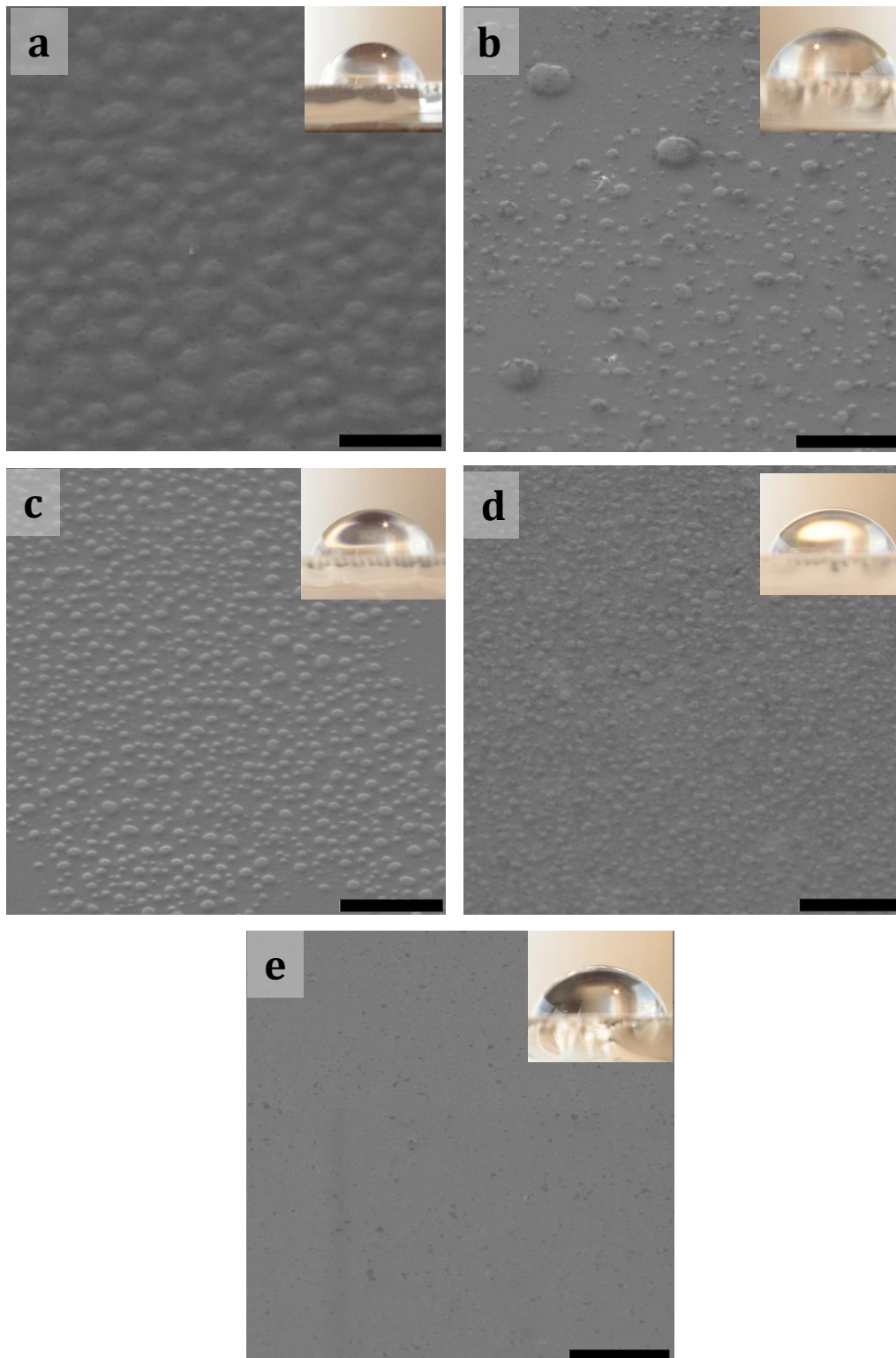
Lisa koosneb järgnevatest osadest:

- SEM-i pildid kõigist katseseeriade käigus valmistatud pindadest ja fotod nende pindade kontaktnurkadest;
- Lõputöö tulemuste põhjal kirjutatud FM&NT 2013 konverentsi toimetis, mis on saadetud avaldamiseks;
- Artikkel, mille valmimisel on kasutatud käesolevas töös tehtud pindu inimese naha fibroplastide talitluse uurimiseks. Artikkel on kirjutatud koostöös arstiteaduskonna ja TÜMRI kolleegidega.

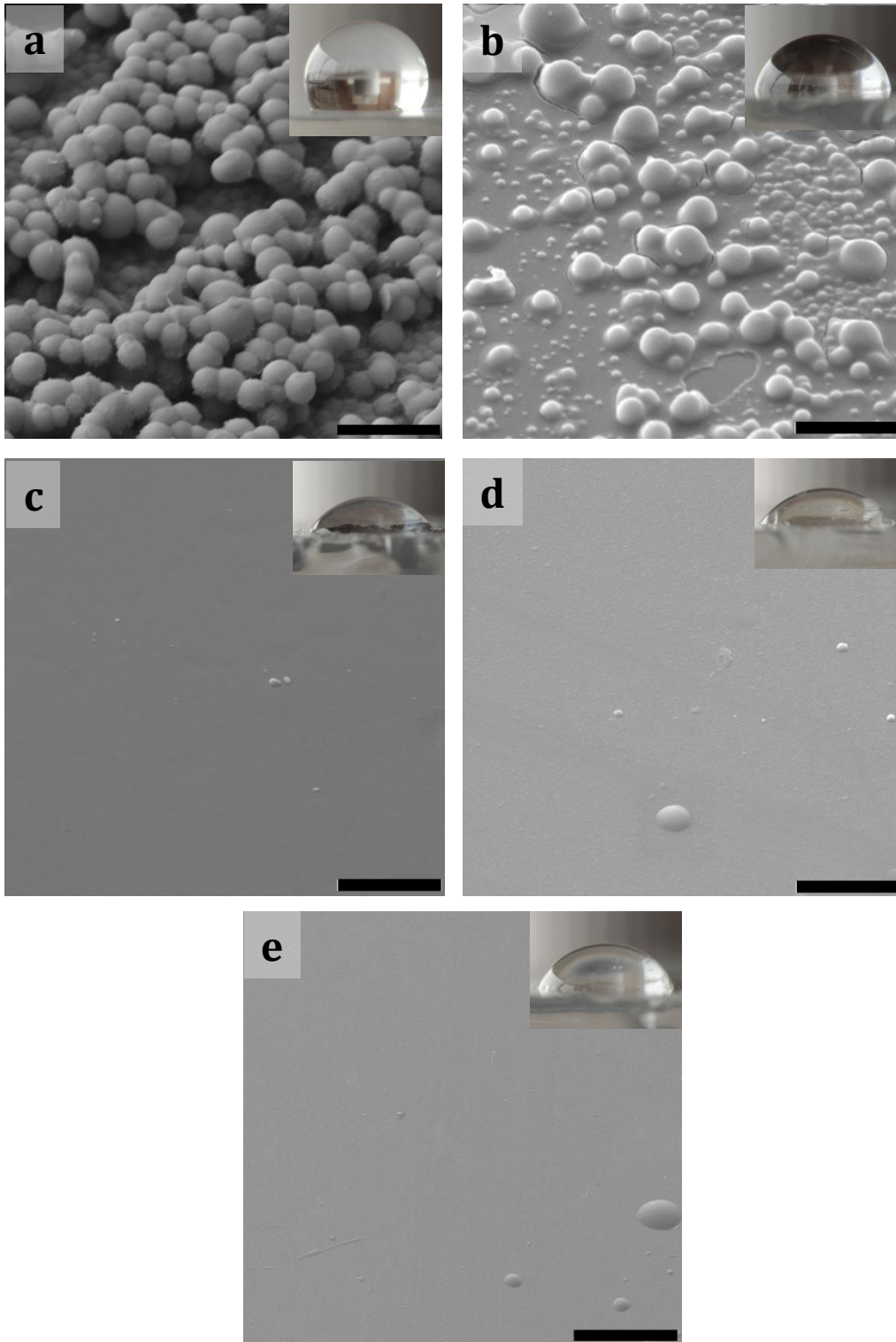
## SEM-i pildid ja fotod kontaktnurkadest



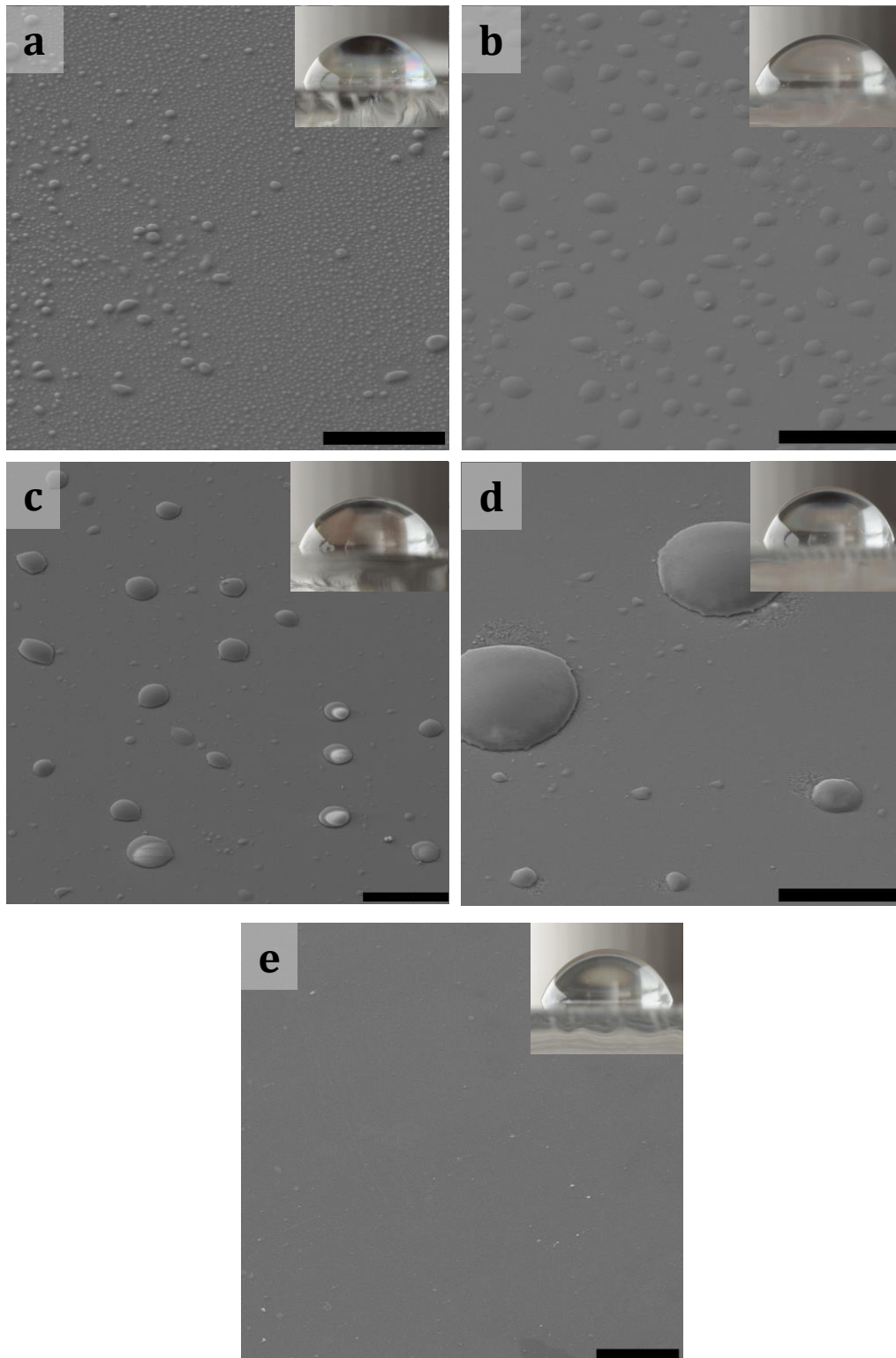
Joonis 10. SEM-i pildid etanooli kontsentratsiooni varieerimise katseseeria pihustatud pindadest. Etanooli kontsentratsioon kasvab reas a-e. Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel piltidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.



Joonis 11. SEM-i pildid etanooli kontsentratsiooni varieerimise katseseeria vurrkatturiga valmistatud pindadest. Etanooli kontsentratsioon kasvab reas a-e. Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel piltidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.

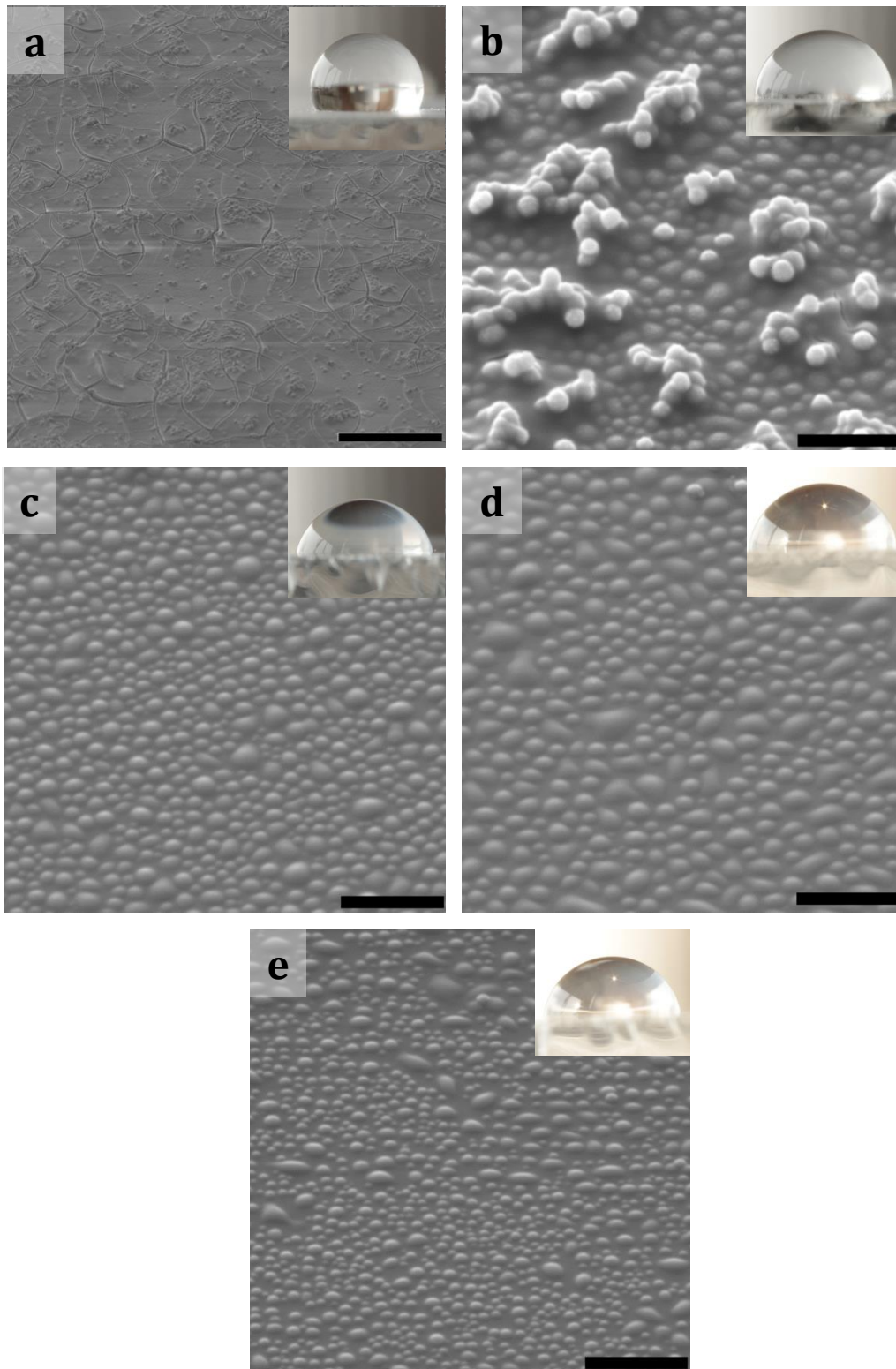


Joonis 12. SEM-i pildid metanooli kontsentratsiooni varieerimise katseseeria pihustatud pindadest. Metanooli kontsentratsioon kasvab reas a-e. Skaala vastab a-d) 5  $\mu\text{m}$ -le ja e) 50  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel piltidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.

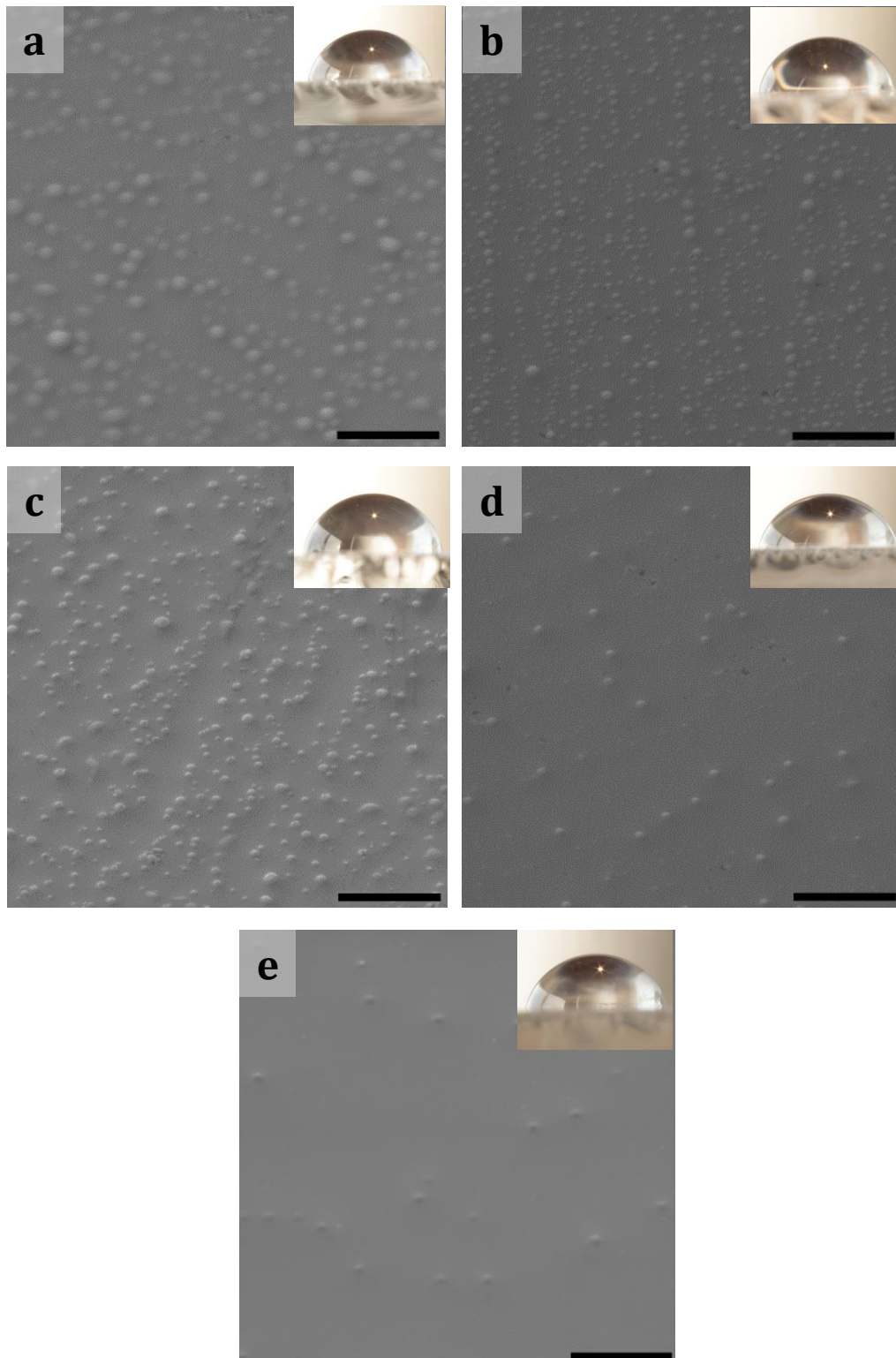


Joonis 13. SEM-i pildid metanooli kontsentratsiooni varieerimise katseseeria vurrkatturiga valmistatud pindadest. Metanooli kontsentratsioon kasvab reas a-e. Skaala vastab 20  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel pildidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.

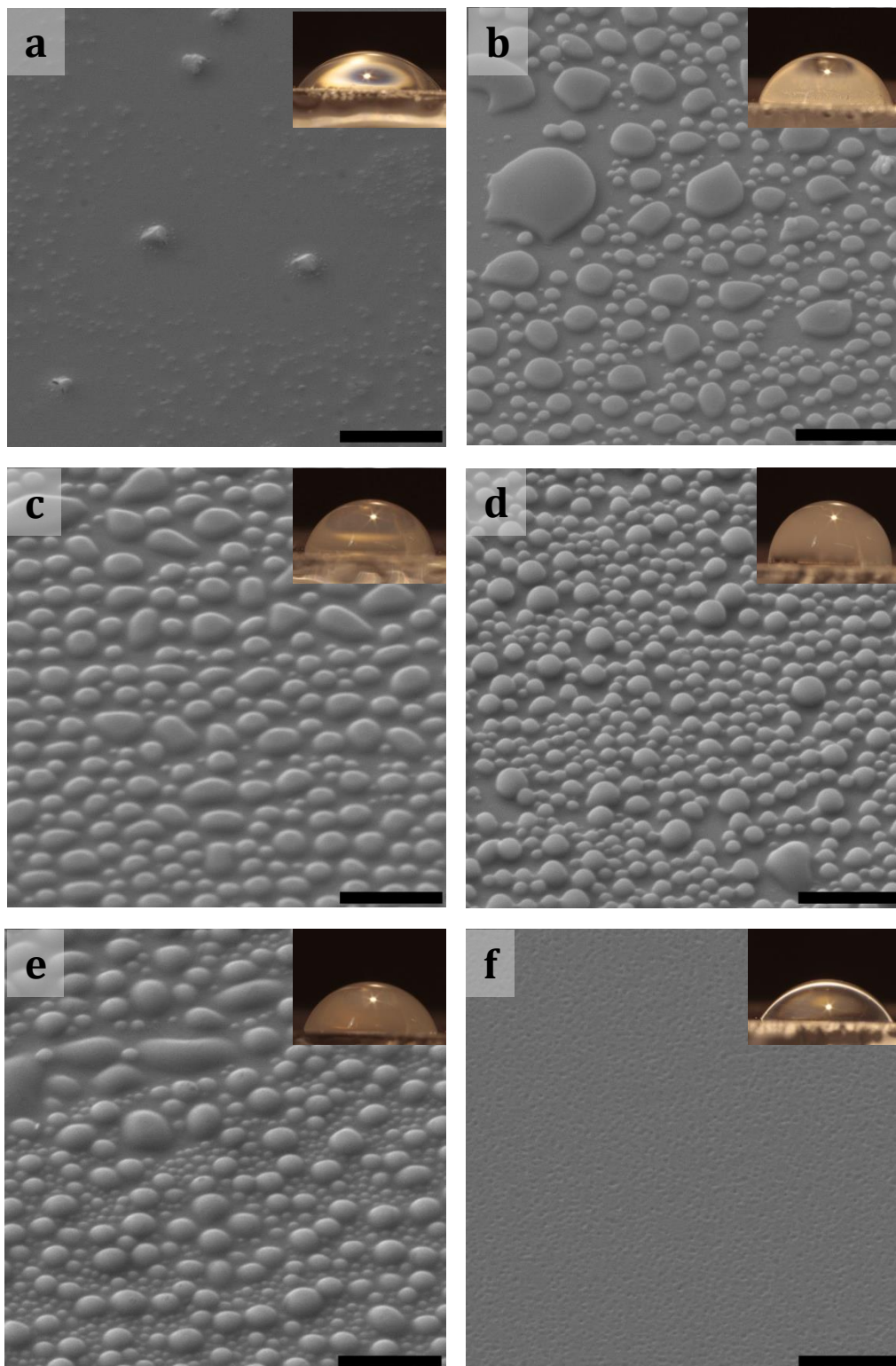




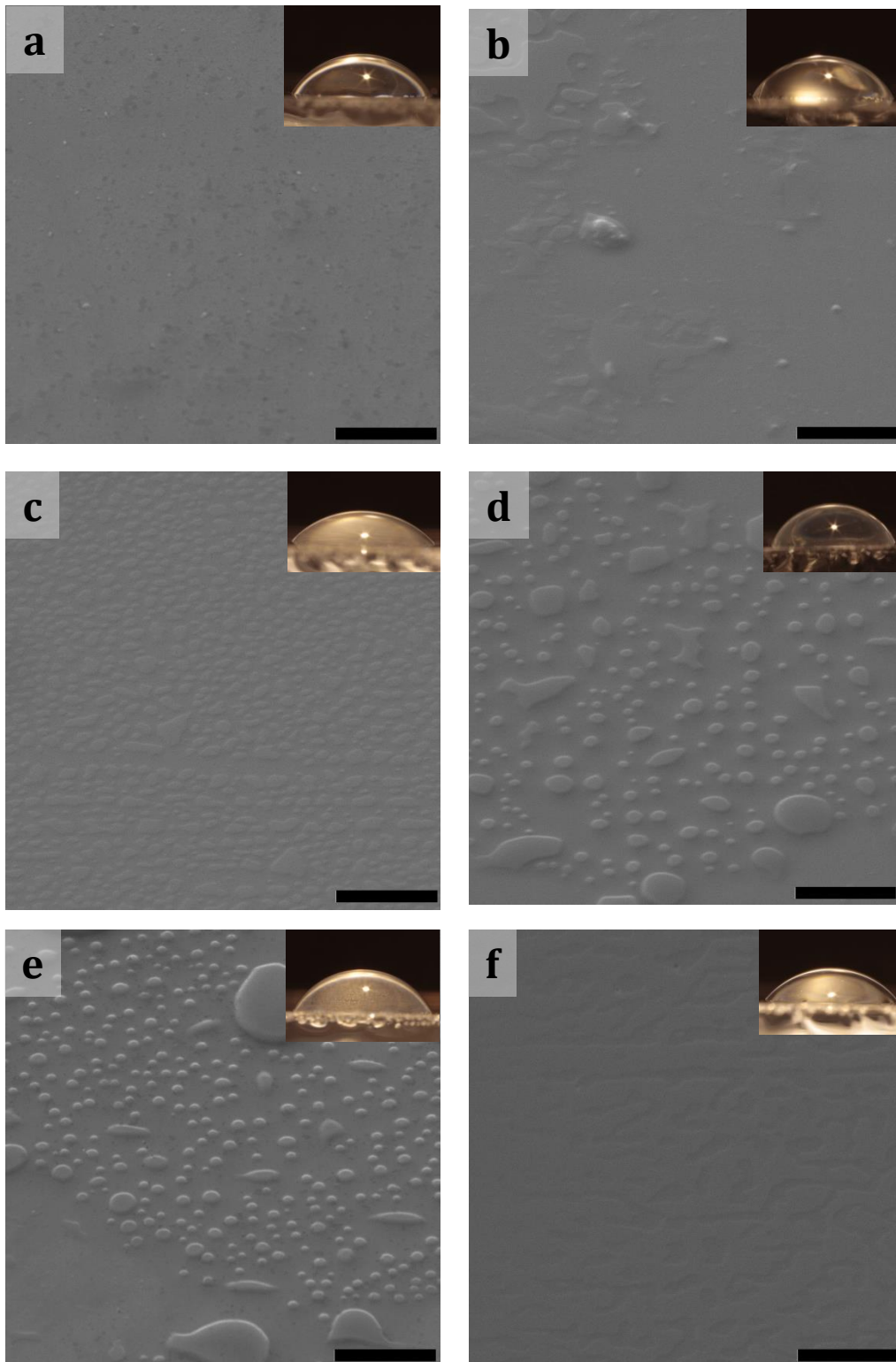
Joonis 14. SEM-i pildid propanooli kontsentratsiooni varieerimise katseseeria pihustatud pindadest. Propanooli kontsentratsioon kasvab reas a-e. Skaala vastab a) 50  $\mu\text{m}$ -le ja b-e) 5  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel piltidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.



Joonis 15. SEM-i pildid propanooli kontsentratsiooni varieerimise katseseeria vurrkatturiga valmistatud pindadest. Propanooli kontsentratsioon kasvab reas a-e. Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel piltidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.

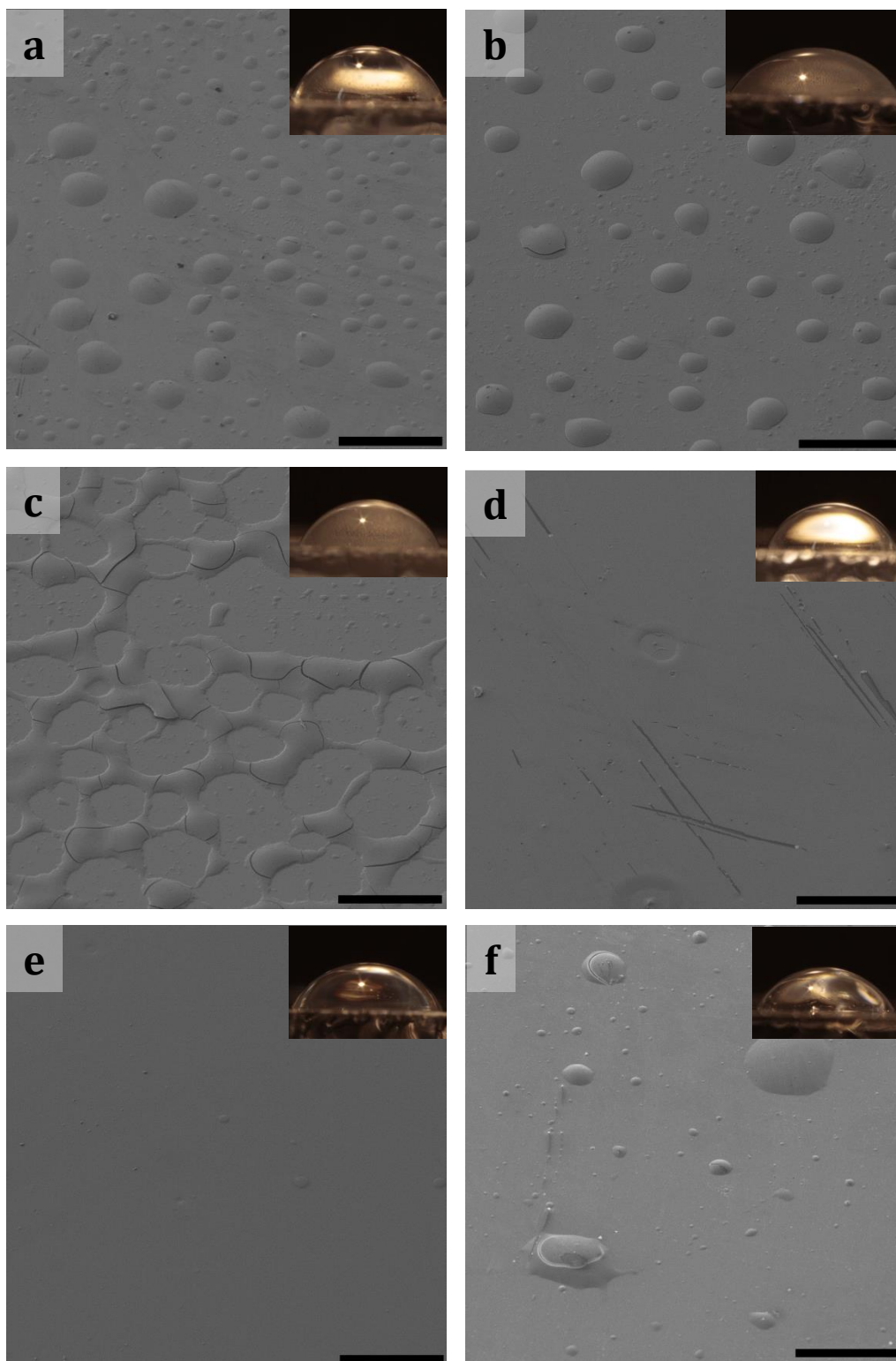


Joonis 16. SEM-i pildid vee ja alkoksiidi moolsuhte varieerimise katseseeria pihustatud pindadest, mille valmistamisel on kasutatud lahustina etanooli. Moolsuhe kasvab reas a-f. Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel piltidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.

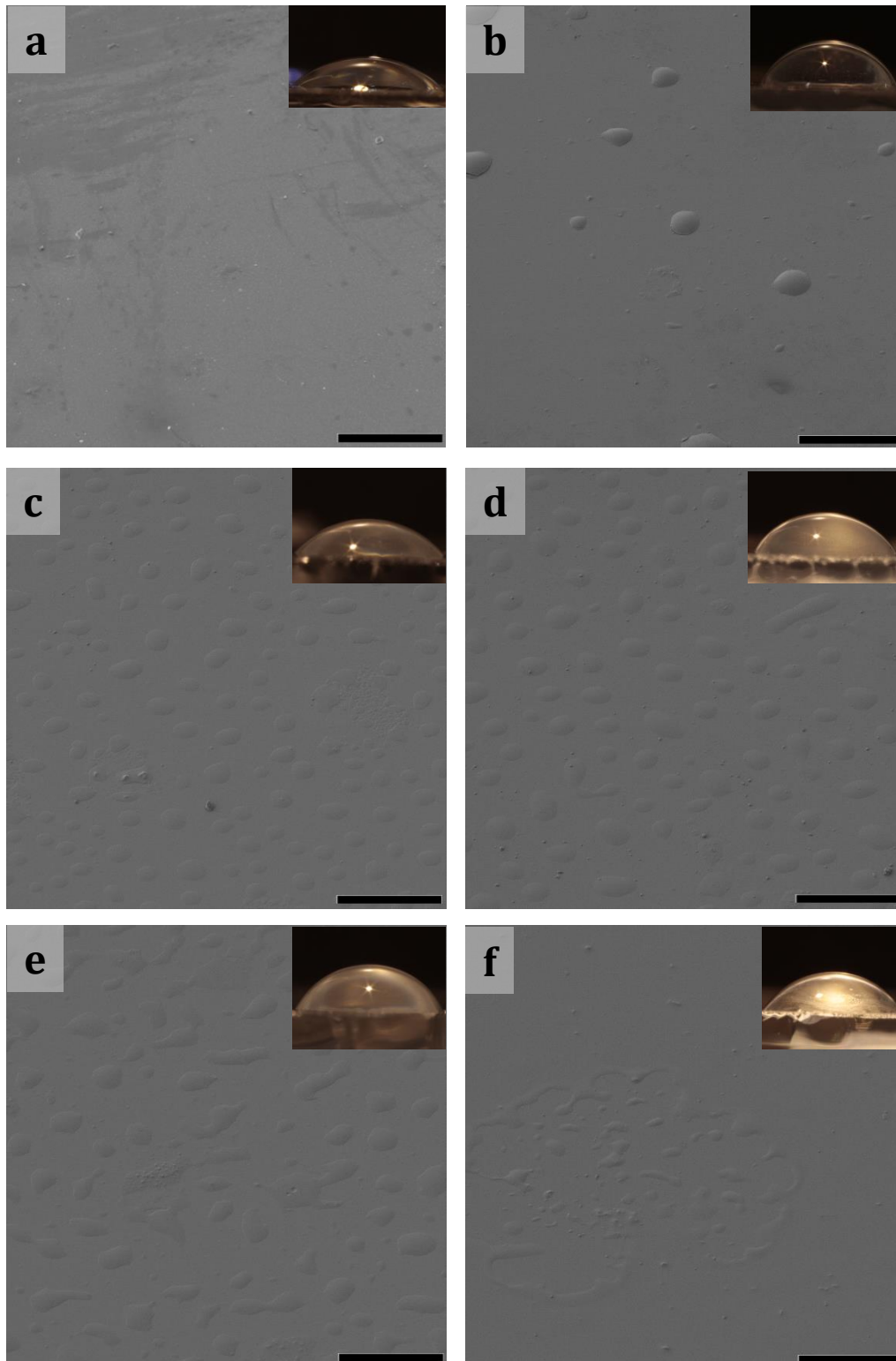


Joonis 17. SEM-i pildid vee ja alkoksiidi moolsuhte varieerimise katseseeria vurrkatmisega valmistatud pindadest, mille puhul on kasutatud lahustina etanooli. Moolsuhe kasvab reas a-f. Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel pildidel on toodud samade katsete kontakturjad.

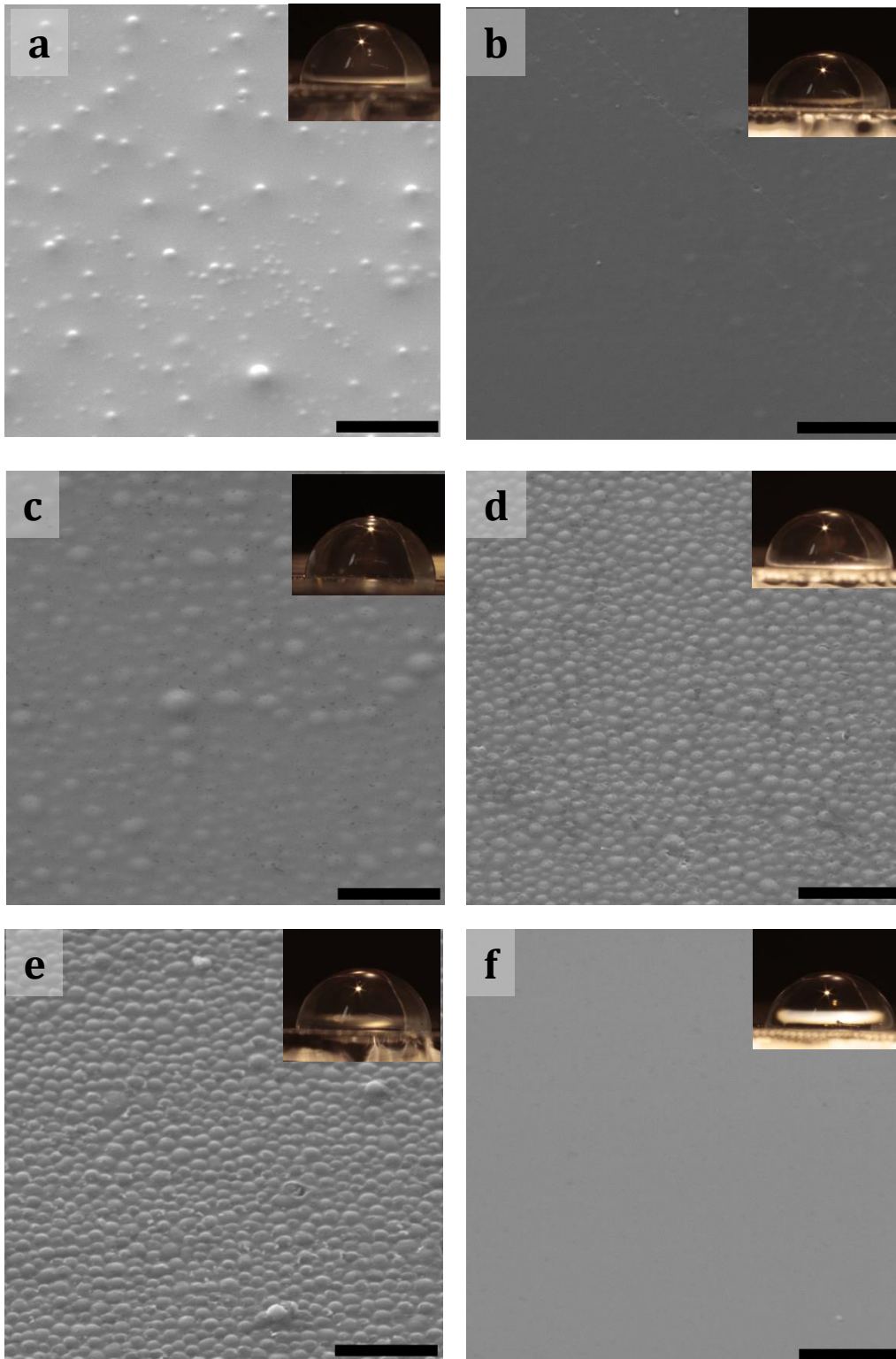




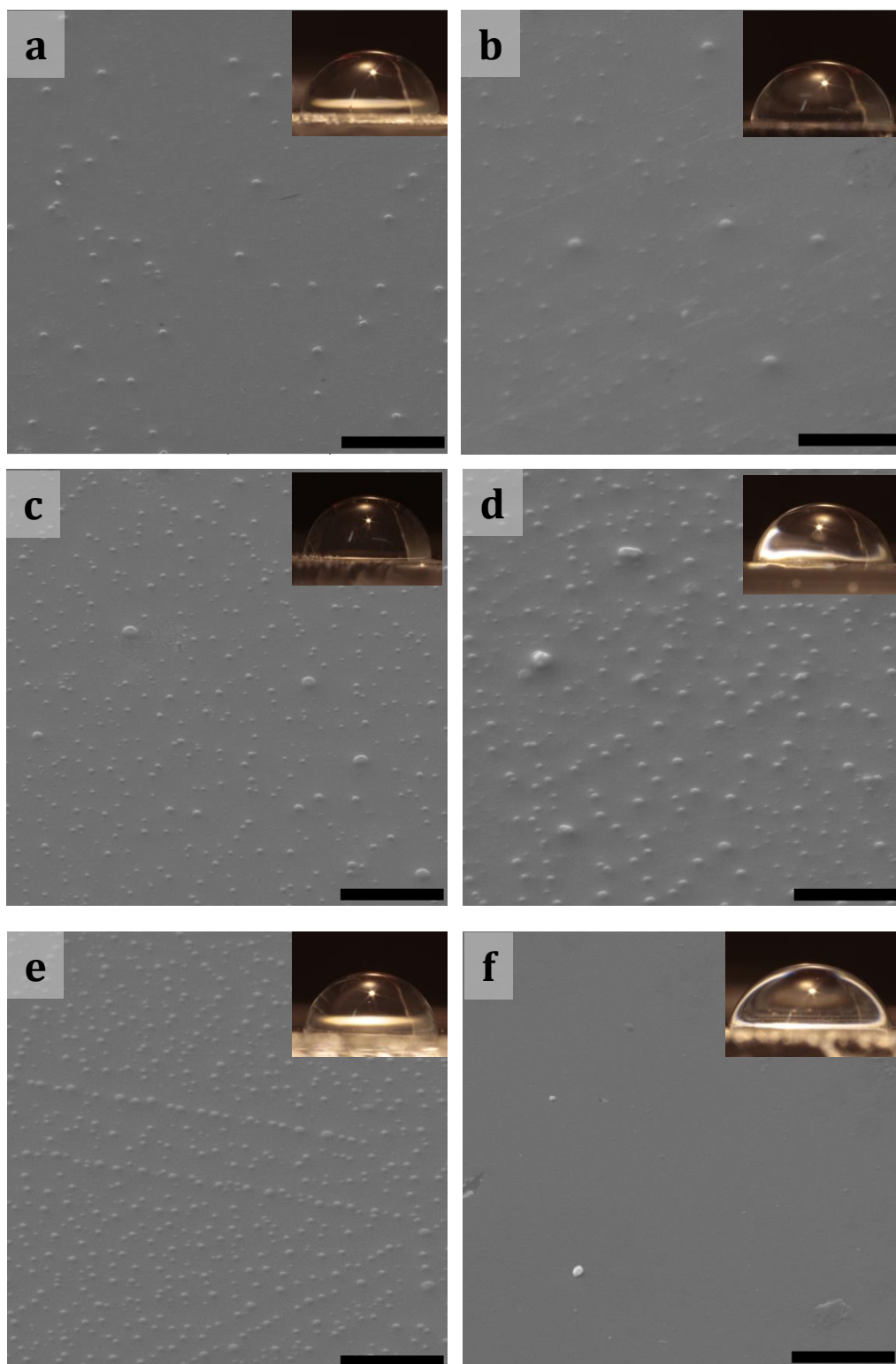
Joonis 18. SEM-i pildid vee ja alkoholi moolsuhte varieerimise katseseeria pihustatud pindadest, mille valmistamisel on kasutatud lahustina metanooli. Moolsuhe kasvab reas a-f. Skaala vastab 50  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel piltidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.



Joonis 19. SEM-i pildid vee ja alkoksiidi moolsuhte varieerimise katseseeria vurrkatmisega valmistatud pindadest, mille puhul on kasutatud lahustina metanooli. Moolsuhe kasvab reas a-f. Skaala vastab 50  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel pildidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.



Joonis 20. SEM-i pildid vee ja alkoksiidi moolsuhte varieerimise katseseeria pihustatud pindadest, mille valmistamisel on kasutatud lahustina propanooli. Moolsuhe kasvab reas a-f. Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel piltidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.



Joonis 21. SEM-i pildid vee ja aloksiidi moolsuhte varieerimise katseseeria vurrkatmisega valmistatud pindadest, mille puhul on kasutatud lahustina propanooli. Moolsuhe kasvab reas a-f. Skaala vastab 5  $\mu\text{m}$ -le. Väiksematel pildidel on toodud samade katsete kontaktnurgad.



# Influence of some system parameters on silica surface patterns by sol-gel phase separation method

T Kangur<sup>1,2</sup>, L Nurmis<sup>1,2</sup>, M Järvekülg<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Physics, University of Tartu, Riia 142, 51014 Tartu, Estonia

<sup>2</sup> Estonian Nanotechnology Competence Centre, Riia 142, 51014 Tartu, Estonia

E-mail: kangur@ut.ee

**Abstract.** We have studied the effect of different coating methods and precursor compositions on the size, surface density and shape of round surface structures prepared by phase separation-based surface patterning method with potential application in preparing superhydrophobic optically functional structural coatings. Increase in solvent polarity resulted in larger micro- and nanosize surface features. Variation in precursor concentration and extent of initial polymerization were shown to result in different surface densities and geometries of formed features. The effect of different surface patterns on wettability was evaluated by WCA measurements.

## 1. Introduction

Sol-gel method offers a variety of well established, facile and versatile technologies for flexible design of materials for a wide range of applications, including optical devices [1], sensors [2], biomaterials [3], coatings [4]. In addition to the possibility of preparing different pure [5], doped [6, 7], mixed oxides [8] and hybrids [8, 9] at relatively low temperatures, sol-gel also enables in-situ control over the nano- and microstructure of prepared materials during transition from sol to gel [10]. Micro- and nanostructure of surfaces has a critical role in the design of superhydrophobic coatings [11] and sol-gel has been applied in phase separation based strategies [12, 13] to achieve suitable micro- and nanoroughness. In the case of self-cleaning windows, optical properties of obtained hydrophobic surfaces are also a concern [14]. Sol-gel-based methods that are simple and can be applied on industrial scale have been used to prepare films that, when coupled with low-surface energy, can have water contact angles as high as  $167^\circ$  [15]. Nevertheless, such film coatings can compromise the transparency of the glass due to numerous reflections and refractive surfaces. We have reported a strategy based on phase separation in silicon alkoxide solutions that results in a single layer of round surface features [16]. This method also holds considerable potential in designing optically functional coatings, as each surface feature can be designed to act as a micro-lens. We hereby present our results on the variation of several system parameters such as extent of precursor concentration, pre-polymerization and solvent polarity on the formation of round silica surface features. The results demonstrate the potential of the method for the development of single-step coating technology for structural coatings with simultaneous optical and super-hydrophobic functionality.

## 2. Experimental

Patterned structures were prepared from solutions of partially hydrolyzed tetraethylorthosilicate (TEOS) in different solvents. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Conventional acid-

catalyzed hydrolysis and polymerization of TEOS was carried to prepare sols. TEOS was mixed with solvent on a magnetic stirrer, followed by the addition of water containing 3.5 % nitric acid to initiate hydrolysis. Obtained solution was stirred for 1 h before coating on glass slides (2,5 x 2,5 cm) by spin coating or spraying. For investigating the impact of solvent type, sol concentration and water-alkoxide molar ratio on silica structures, different process parameters were applied. Solvent ratios (solvent:TEOS) 1, 5, 9, 13 and 17 (S) as well as water-alkoxide molar ratios 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2 and 4 (R) were tested with solvents propanol, ethanol and methanol. All samples were subsequently heated at 200°C for 20 h to transform gel material into oxide.

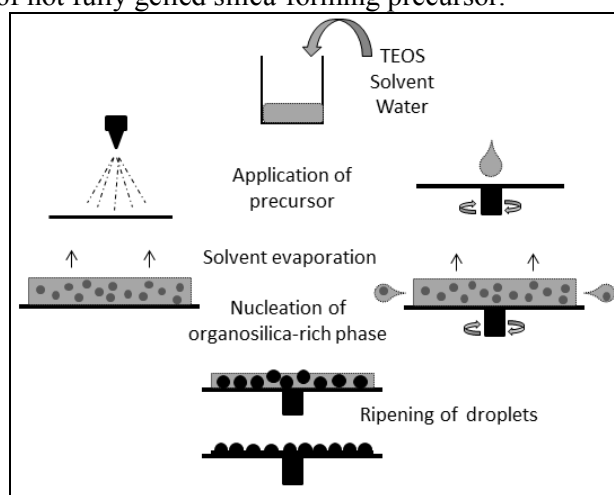
Scanning electron microscope (SEM) graphs of silica domes were acquired with Tescan VEGA II SBU with accelerating voltage of 10 kV. The samples were previously sputter coated with a 5 nm layer of gold using a SC7640 Auto/Manual High Resolution Sputter Coater. To estimate surface hydrophobicity water contact angle (WCA) measurements were performed.

### 3. Results and discussion

In this study we examined the influence of reaction parameters such as solvent type, sol concentration and water-alkoxide molar ratio on sol-gel phase separation process and subsequent formation of surface features. Mostly, we obtained symmetric round surface structures with diameter ranging from 200 nm to 20  $\mu$ m. Sol-gel phase is known to start with the nucleation of isolated domains of separated phase, droplets of either solvent-rich or solvent-poor phase inside continuous solution phase domain [12]. The process then proceeds to formation of bi-continuous two-phase system with a large phase interface. In most cases where porous oxides are prepared, this kind of structure is also preserved by optimized speed of solvent evaporation. In our case the volatile solvent is optimized to evaporate before the evolution of continuous organosilica-rich phase (explained in figure 1). Nucleation is followed by growth of the droplets and gradual diminishing of solvent-rich phase due to solvent evaporation. In most cases we observed the formation of isolated round surface features formed from the droplets on the surface after partial flattening of not fully gelled silica-forming precursor.

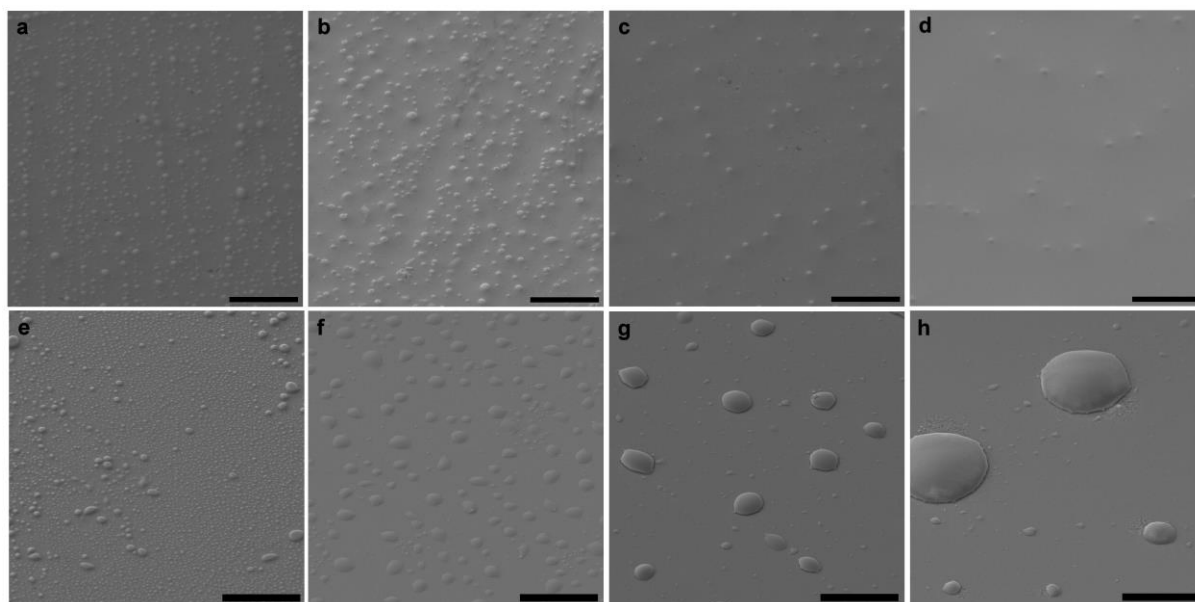
As expected, different coating methods, such as spin-coating and spraying, lead to qualitatively different results. Spin-coating is more sensitive to variations in precursor compositions, results in sharper change in the size of surface features. During the spin-coating most of the material, which is applied on the surface, spins off the surface, and the thickness of the precursor layer in which the phase separation occurs, depends on the viscosity. The latter is influenced by both solvent concentration and extent of precursor polymerization. With spraying, the domes tend to be larger in diameter and height due to the larger thickness of precursor left on the surface. The amount of precursor that stays on the substrate is also less influenced by the viscosity of the precursor. Additionally, as observed, some of the surface features formed in case of spray coating were less flattened, in some cases not even to half-sphere geometry. That is the result of solvent evaporation from the coated layer being slow enough compared to gelling, so that the viscosity of the silica-forming phase preserves the droplet shape once the solvent has fully evaporated.

Varying parameters did not lead to clear linear changes in size and shape. Nevertheless, increase in solvent polarity (propanol < ethanol < methanol) and volatility led to increase in the diameter of the surface features. At the same time, the used solvents acted differently in response to varying sol concentration and water-alkoxide molar ratio.



**Figure 1.** Schematic illustration of used coating processes and formation of surface patterns.

Varying propanol ratio resulted in decrease in the surface density of structures as propanol concentration increased due to the lower material amount, which has stayed on the substrate during spin-coating (figure 2a-d). However, dome diameter was not significantly affected. By spraying, there was no such variation in density. As propanol has comparatively low polarity among used solvents, phase separation has not occurred completely, resulting in formed surface featured being covered by thin film layer. As R was varied, there was not noticeable change in dome size or density.

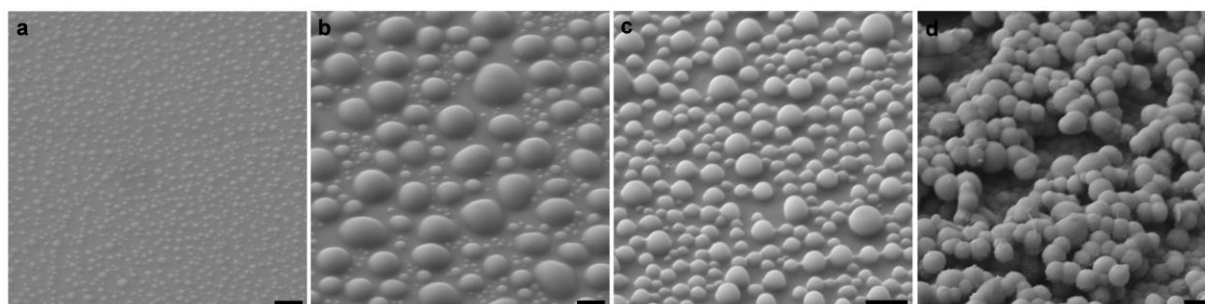


**Figure 2.** SEM images of series with variation of concentration in propanol (a – d) and methanol (e – h) solutions. Scale bars correspond to 5  $\mu\text{m}$  (a – d) and 20  $\mu\text{m}$  (e – h).

When using ethanol as a solvent, the difference in coating method was clearly seen. Silica structures via spraying were larger in diameter and height compared to the spun films. For example, TEOS:solvent ratio 1:9 with  $R = 1.2$  led to size change of about 10 times (figure 3a,b). Increasing R led to slight increase in the surface density of the structures. With  $R = 1.6$ , the most spherical shape features were observed (figure 3c).

Methanol behaved differently as a solvent compared to propanol and ethanol that were relatively similar tendencies. Methanol is the most polar of the three, leading to fast complete phase separation but is also the most volatile so TEOS component has not polymerized significantly by the time the solvent has fully evaporated and the still liquid droplets can merge on the substrate. For that reason relatively rather surface features or even films were formed by spraying. As TEOS:methanol ratio was varied, spin-coating led to increasing domes as solvent concentration increased (figure 2e-h). Solvent ratio  $S = 17$  also resulted in continuous film.

In most cases WCAs of samples prepared by spraying were higher compared to the spin-coated surfaces. Sprayed coatings with  $S = 1$  and  $R = 1.2$  in ethanol were estimated to have the highest hydrophobicity, with WCA about  $131^\circ$  (figure 3d). However, these cases may be classified as porous



**Figure 3.** SEM images of silica domes from different series: spin-coated (a) and sprayed (b) structures with ethanol,  $S = 9$ ,  $R = 1.2$ ; sprayed structures with ethanol,  $S = 9$ ,  $R = 1.6$  (c); sprayed structures with ethanol,  $S = 1$ ,  $R = 1.2$  (d). Scale bars correspond to 2  $\mu\text{m}$ .

films. In case of surfaces patterned with round surface features, 88° WCA was achieved in case of S=9, R=1.6 in ethanol. It is important to point out that the achieved shift towards hydrophobicity is the effect of surface structure only, the surface energy resulting from surface chemistry of prepared substrates is relatively high. To demonstrate that, a film was prepared in a similar fashion using aged TEOS solution in which no phase separation occurred and a smooth film with no detectable roughness was obtained. The WCA was estimated to be 25° in case of that reference sample.

#### 4. Conclusions

Using different coating methods and suitable precursor compositions in sol-gel phase separation surface patterning can be used for preparing round surface features with different size, surface density and geometry. Different solvents, concentrations and initial extent of precursor polymerization were used in spray- and spin-coating. Obtained results provide first proof of controllability and potential of phase separation-based surface patterning method in the development of optically functional superhydrophobic structural surface coatings.

#### Acknowledgments

This research was supported by ESA grant IUT2-25; ESF grants ETF8377, ETF8699, ETF9283, SF0180058s07; Estonian Nanotechnology Competence Center; Graduate School on Functional Materials and Technologies (GSFMT), University of Tartu and Tallinn University of Technology, EU Social Funds project 1.2.0401.09-0079; European Union through the European Regional Development Fund (Centre of Excellence "Mesosystems: Theory and Applications", TK114).

#### References

- [1] Sanchez C, Lebeau B, Chaput F and Boilot JP 2003 *Advanced Materials* **15** 1969.
- [2] Jeronimo PCA, Araujo AN and Montenegro MCBSM 2007 *Talanta* **72** 13.
- [3] Avnir D, Coradin T, Lev O and Livage J 2006 *Journal of Materials Chemistry* **16** 1013.
- [4] Purcar V, Stamatini I, Cinteza O, Petcu C, Raditoiu V, Ghiurea M, Miclaus T and Andronie A 2012 *Surface & Coatings Technology* **206** 4449.
- [5] Francis LF 1997 *Materials and Manufacturing Processes* **12** 963.
- [6] Paerna R, Joost U, Nommiste E, Kaeaeembre T, Kikas A, Kuusik I, Kink I, Hirsimaki M and Kisand V 2012 *Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science* **209** 953.
- [7] Kiisk V, Kangur T, Paalo M, Taette T, Lange S, Pikker S and Sildos I 2011 *Materials Chemistry and Physics* **130** 293.
- [8] Timusk M, Jaervekuelg M, Salundi A, Lohmus R, Leinberg S, Kink I and Saal K 2012 *Journal of Materials Research* **27** 1257.
- [9] Paalo M, Taette T, Hussainov M, Hanschmidt K, Lobjakas M, Lohmus A, Maeorg U, Kink I and Iop 2012. Preparation and Characterization of CNT/TiO<sub>2</sub> Based Transparent Fiber Electrodes. *International Conference on Functional Materials and Nanotechnologies*.
- [10] Saal K, Taette T, Jaervekuelg M, Reedo V, Lohmus A and Kink I 2011 *International Journal of Materials & Product Technology* **40** 2.
- [11] Yan YY, Gao N and Barthlott W 2011 *Advances in Colloid and Interface Science* **169** 80.
- [12] Nakanishi K and Tanaka N 2007 *Accounts of Chemical Research* **40** 863.
- [13] Kajihara K, Kuwatani S, Maehana R and Kanamura K 2009 *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **82** 1470.
- [14] Ganbavle VV, Bangi UKH, Latthe SS, Mahadik SA and Rao AV 2011 *Surface & Coatings Technology* **205** 5338.
- [15] Mahadik SA, Mahadik DB, Kavale MS, Parale VG, Wagh PB, Barshilia HC, Gupta SC, Hegde ND and Rao AV 2012 *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **63** 580.
- [16] Reemann P, Kangur T, Pook M, Paalo M, Nurmis L, Kink I, Porosaar O, Kingo K, Vasar E, Koks S, Jaks V and Jarvekulg M 2013 *Journal of materials science. Materials in medicine* **24** 783.

# Fibroblast growth on micro- and nanopatterned surfaces prepared by a novel sol–gel phase separation method

Paula Reemann · Triin Kangur · Martin Pook · Madis Paalo · Liis Nurmis · Ilmar Kink · Orm Porosaar · Külli Kingo · Eero Vasar · Sulev Kõks · Viljar Jaks · Martin Järvekülg

Received: 6 August 2012 / Accepted: 30 November 2012  
© Springer Science+Business Media New York 2012

**Abstract** Physical characteristics of the growth substrate including nano- and microstructure play crucial role in determining the behaviour of the cells in a given biological context. To test the effect of varying the supporting surface structure on cell growth we applied a novel sol–gel phase separation-based method to prepare micro- and nanopatterned surfaces with round surface structure features. Variation in the size of structural elements was achieved by solvent variation and adjustment of sol concentration. Growth characteristics and morphology of primary human dermal fibroblasts were

found to be significantly modulated by the microstructure of the substrate. The increase in the size of the structural elements, lead to increased inhibition of cell growth, altered morphology (increased cytoplasmic volume), enlarged cell shape, decrease in the number of filopodia) and enhancement of cell senescence. These effects are likely mediated by the decreased contact between the cell membrane and the growth substrate. However, in the case of large surface structural elements other factors like changes in the 3D topology of the cell's cytoplasm might also play a role.

---

Paula Reemann and Triin Kangur contributed equally to this study.

---

P. Reemann (✉) · E. Vasar · S. Kõks  
Department of Physiology, University of Tartu, Ravila 19,  
50411 Tartu, Estonia  
e-mail: paula.reemann@ut.ee

T. Kangur · M. Paalo · L. Nurmis · I. Kink · M. Järvekülg  
Institute of Physics, University of Tartu, Riia 142,  
51014 Tartu, Estonia

M. Pook · V. Jaks  
Institute of Molecular and Cell Biology, University of Tartu,  
Riia 23, 51010 Tartu, Estonia

M. Paalo · I. Kink · M. Järvekülg  
Estonian Nanotechnology Competence Centre, Riia 142,  
51014 Tartu, Estonia

O. Porosaar  
Department of Pediatric Surgery, Tallinn Children's Hospital,  
Tervise 28, 13419 Tallinn, Estonia

K. Kingo  
Clinic of Dermatology, Tartu University Hospital, Raja 31,  
50417 Tartu, Estonia

K. Kingo  
Department of Dermatology, University of Tartu, Raja 31,  
50417 Tartu, Estonia

E. Vasar · S. Kõks  
Centre of Translational Medicine, University of Tartu, Ravila 19,  
50411 Tartu, Estonia

S. Kõks  
Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences,  
Estonian University of Life Sciences, Kreutzwaldi 62,  
51014 Tartu, Estonia

V. Jaks  
Estonian Competence Centre for Cancer Research,  
Akadeemia tee 15, 12618 Tallinn, Estonia

V. Jaks  
Department of Biosciences and Nutrition,  
Center for Biosciences, Karolinska Institutet, Novum,  
141 83 Huddinge, Sweden

## 1 Introduction

Sol–gel, based on the hydrolysis and polymerization reactions of silicon and metal alkoxides, is a range of simple and flexible methods for preparing materials with a variety of properties and shapes [1]. It has also been shown to be suitable for tuning the nano- and microstructure of surfaces, mechanical properties as well as chemical composition and functionality of materials [2].

Recent studies in the field of biointerfaces and material–cell interactions have led to a common understanding that cell behaviour can be influenced and possibly directed by modifying properties of the environment surrounding the cells [3–5]. Nano- and micro-topographical features [6, 7], mechanical properties [8, 9] and chemical functionality [10] of substrates have been shown to affect cell proliferation, migration [11], differentiation and morphology [12, 13]. These studies have been different materials. However, sol–gel methods provide a platform for studying cell to substrate interactions by varying all the abovementioned properties of a system based on a single material. Furthermore, the feasibility of using sol–gel method is also supported by the fact that highly biocompatible [14] as well as biodegradable [15] materials can be prepared.

In addition to conventional sol–gel film, fibre and template-based material preparation methods covered in detailed by reviews [1, 15, 16] phase separation-based approach has received considerable attention. While complicated chemistry and physics is often involved and process optimization can be difficult, simple synthesis protocols have been developed for preparing unique micro- and nanostructured materials by phase separation in silicon and metal alkoxide solutions [16, 17]. Generally, such methods have been used to form a continuous solid phase with either isolated voids or a network of interconnected pores or depending on the nature and phase of the processes [18]. In the present work we have applied a novel sol–gel phase separation based method for designing micro- and nanopatterned surfaces. Alternatively, silicon alkoxide droplets are nucleated in continuous liquid phase, leading to the formation of dome-shape silica micro- and nanostructures on a substrate as the liquid phase is removed and silicon alkoxide precursor gels. Previous studies demonstrate the ability of silica to enhance differentiation and proliferation of cells [19]. Similar patterned surfaces prepared by more complicated lithographic methods have been used for optical and surface coating [20, 21] applications. However, such round patterns can also lead to interesting results in interaction with cells due to their round, physiological-like shape compared to edged nano- and micropatterns, which have been used in most of the previous studies.

To determine the effect of the nanopatterned surfaces on fibroblast growth, morphology and cytoskeletal organization,

we evaluated several markers of cell proliferation and differentiation.

The ability of cells to adopt a variety of shapes and to perform directed movements depends on the cytoskeleton, a mesh of filamentous proteins consisting of three main types of structures: actin filaments, microtubules and intermediate filaments [22]. They are localized at different sites within cells and they have different function. Together with beta-actin, gamma-actin is an essential component of the cytoskeleton in all non-muscle cells [23]. While beta-actin is mainly localized in intercellular contact filaments and stress fibers and is thought to have a substantial role in contraction and cell attachment, then gamma-actins are found inside lamellipodia, thereby being responsible for cell flexibility and movement [24]. On an irregular surface, cells respond to grooves with the actin cytoskeleton fibers oriented parallel to the eminences [25, 26].

To test the effect of variation in the surface structure on cell growth we applied a sol–gel phase separation-based method to prepare micro- and nanopatterned surfaces with round surface structure. Growth characteristics and morphology of primary human dermal fibroblasts were found to be significantly modulated by the microstructure of the substrate. The increase in the size of the structural elements, lead to the increased inhibition of cell growth, changes in the morphology (increased volume of cytoplasm, enlarged cell shape, decrease in the number of filopodia) and enhancement of cell senescence, leading us to the conclusion that the nanostructure of the local micro-environment affects the growth and differentiation program of normal fibroblasts.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Silica structures

Patterned substrates were prepared from solutions of partially hydrolyzed tetraethylorthosilicate (TEOS) in different solvents. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. Conventional acid-catalyzed hydrolysis and polymerization of TEOS was carried to prepare sols. TEOS was mixed with solvent on a magnetic stirrer, followed by the addition of water containing 3.5 % nitric acid to initiate hydrolysis and obtain sols with water to TEOS molar ratio 1.2. Obtained solution was stirred for 1 h before coating on 12 mm borosilicate glass cover slips by spin coating at 2,000 rpm. From a large number of different obtained samples, four were selected for subsequent cell seeding experiments. The corresponding used sols were: TEOS: propanol = 1:5 (resulting samples are referred to as S1 below); TEOS:ethanol = 1:5 (S2); TEOS:methanol = 1:2 (S3); TEOS:methanol = 1:5 (S4). Spin coating

resulted in the formation of patterns of different size nano- and micro-domes. For a reference sample, smooth silica surfaces were prepared from a sol: TEOS:hexane = 1:10 (Smooth). All samples were subsequently heated at 200 °C for 20 h to transform gel material into oxide.

## 2.2 Cell culture

We used 15 paediatric skin tissue samples for isolating skin cell cultures. Children were recruited from among elective patients present at the Department of Pediatric Surgery, Tallinn Children's Hospital, with no concurrent diseases and signs of infection. Skin tissues were normal skin margins discarded during surgical procedures. The skin pieces were transferred to the laboratory in 0.9 % NaCl solution at +4 °C. Existing protocols of isolating and growing fibroblasts were used. The tissue was rinsed in phosphate-buffered saline (PBS, w/o Ca, Mg; PAA Laboratories GmbH). Subcutaneous fat was removed with surgical blade and the remaining tissue was cut into 0.5 cm<sup>2</sup> pieces and incubated in dispase II (2.4 U/ml dispase II, Sigma-Aldrich Co.; diluted in PBS) at +4 °C overnight. After incubation the epidermis was peeled off from the dermis with needles. A piece of dermis was used for isolation of fibroblasts by migration method. The dermis was rinsed in PBS, cut into 4 × 4 mm pieces. These pieces were attached onto a 10 cm Petri dish and covered with 10 ml of DMEM (PAA Laboratories GmbH) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Sigma-Aldrich Co.), penicillin (100 UI/ml), streptomycin (100 µg/ml) (PAA Laboratories GmbH) and amphotericin B 250 ng/ml (Sigma-Aldrich Co.). The culture medium was changed every 2 days.

Subculture (passage) of cells was done at 90 % cellular confluence maximum three times. Primary human fibroblasts were cryopreserved upon on-demand usage in ice-cold 10 % dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich Co.) and fetal bovine serum freezing solution. Subsequently, the cells were resuspended in the culture medium and quantified using a hemocytometer counter. Before plating cells onto nanopatterned surfaces, their growth curve was determined at different densities. Finally the cells were seeded onto a flat glass and nanopatterned cover slips (12 mm diameter) in a 24-well plate at density of 3,000 cells/cm<sup>2</sup> for antibody and SA-β-gal staining and 10,000 cells/cm<sup>2</sup> for SEM.

## 2.3 Fluorescent microscopy

For actin antibody staining, cells on glass and nanopatterned coverslips were briefly washed with 1× PBS and fixed in cold methanol (Naxo) and acetone (POCH, Poland), both for 5 min. For Ki67 antibody staining the

cells were fixed with 3.7 % formaldehyde (Scharlab) in PBS for 7 min at room temperature. Staining was performed on the fifth day of culture. Fixed tissues were rehydrated, washed with PBS/0.25 % Triton X-100-PBS and blocked for 1 h with PBS/Triton X-100-PBS containing 5 % normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Inc.). Incubation with mouse monoclonal IgG<sub>1</sub> anti-γ-actin primary antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.; 1:200) and Ki67 rabbit monoclonal antibody (Epitomics Inc.; 1:500) was performed in 2 % blocking solution for 45 min at room temperature and overnight at +4 °C. After washing, the slides were incubated with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-labelled donkey anti-mouse IgG (H + L) secondary antibody and Alexa Fluor 594-labeled donkey anti-rabbit IgG (H + L) secondary antibody (both 1:500, Life Technologies<sup>™</sup>), respectively. Nuclei were counterstained with DAPI (AppliChem; 1 µg/ml), followed by washing in PBS and ultra pure water and mounting in fluorescence mounting medium (Dako). Immunofluorescence microscopy was carried out with an Olympus FluoView FV1000 microscope, with a 60 × objective and images were acquired with a Olympus FV10-ASW 1.6a software. For counting of adhered cells, Zeiss Axiovert S100 inverted microscope with a 5× and 10× objectives and AxioVision Rel. 4.8.2, software were used. Typically, data was collected from four randomly chosen fields from four cover slips. Images were analyzed with ImageJ 1.45s software. All graphs were gauged using Microsoft Excel Software.

## 2.4 Scanning electron microscopy

Cells on glass and nanopatterned cover slips were briefly washed with PBS and fixed in Karnovsky buffer for 30 min at room temperature on the third experimental day. After washing in PBS, the cells were dehydrated through alcohol gradient starting at 50 % ethanol up to 100 % ethanol. Cover slips with the cells were subsequently transferred to 100 % hexamethyldisilazane (AppliChem) for 3 min and air-dried at room temperature. The samples were previously sputter coated with a 5 nm layer of gold using a SC7640 Auto/Manual High Resolution Sputter Coater SEM micrographs were acquired with Helios NanoLab 600 FEI with an accelerating voltage of 5 kV and cross-sections of samples were previously cut using focused ion beam (FIB).

## 2.5 Atomic force microscopy

For investigating the morphology of structured surfaces atomic force microscope (AFM) images were obtained with Dimension<sup>®</sup> Edge<sup>™</sup> AFM System (Veeco Instruments Inc.) in tapping mode at room temperature. Height of the surface features was estimated by using the Gwyddion 2.30 software.



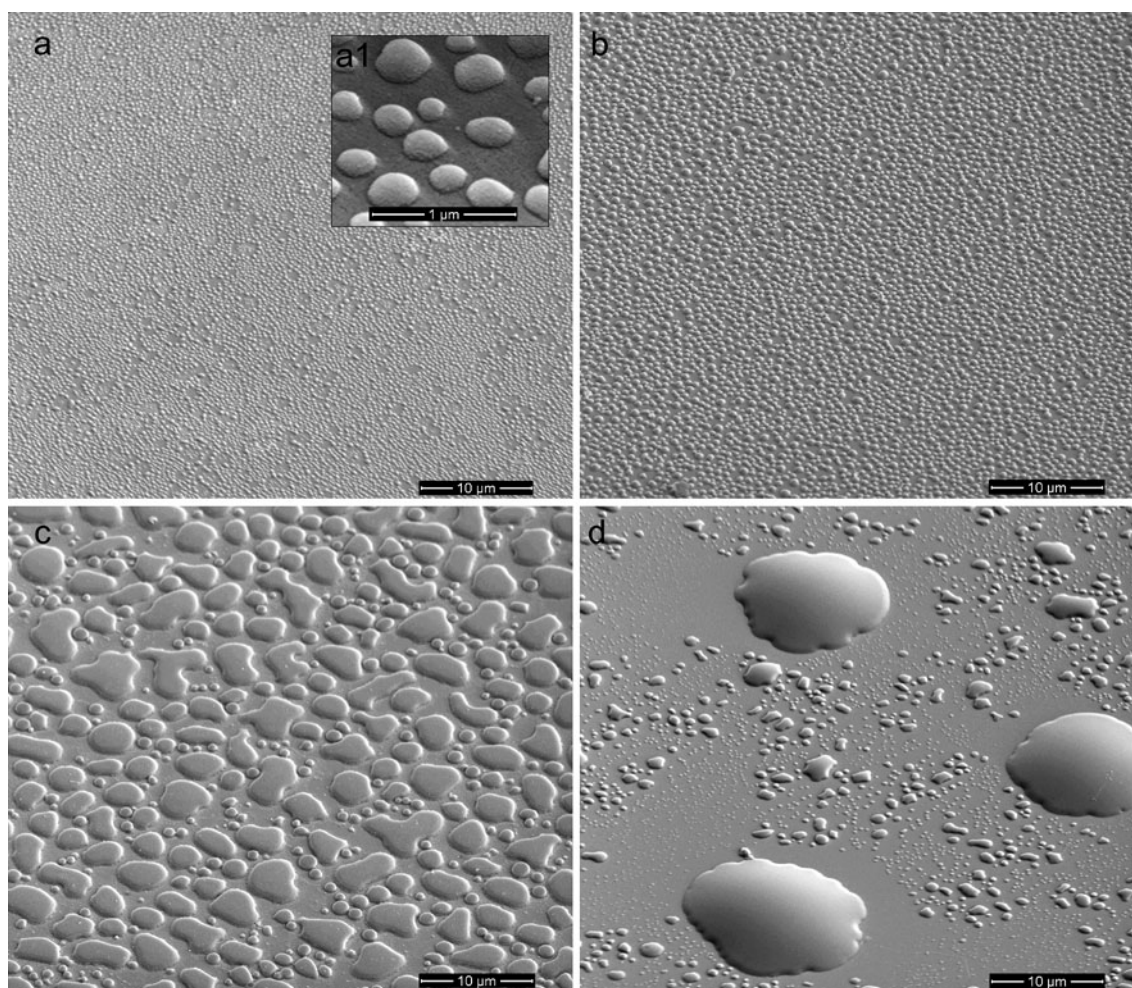
## 2.6 Histochemistry

Senescence associated  $\beta$ -galactosidase staining at pH 6.0 was performed according to [27]. To avoid confluence-induced SA- $\beta$ -gal activity, staining was carried out on subconfluent cell populations on the fifth experimental day. Subconfluent cells on glass and nanopatterned cover slips were washed with PBS and fixed with 2 % formaldehyde and 0.2 % glutaraldehyde (Naxo) in PBS buffer for 5 min at room temperature. Followed by washing, the cells were transferred into freshly prepared staining buffer for 16 h at 37 °C. After incubation the cover slips were washed with PBS and methanol and air-dried. For imaging we used an Olympus BX50 light microscope (Olympus Company Ltd) and the Cell Imaging System Software (Olympus Company Ltd).

## 3 Results

In this study we compared the growth properties of normal human primary fibroblasts on silica surfaces with round nano- and microstructural of different sizes to control cells grown on smooth sol-gel prepared silica surface and untreated borosilicate glass inserts commonly used for cell culturing.

Samples S1, S2, S3 and S4 were covered with round structures with estimated mean diameters of  $\sim 200$  nm,  $\sim 500$  nm,  $\sim 1$   $\mu$ m and  $\sim 10$   $\mu$ m (Fig. 1) and mean heights of  $\sim 90$ ,  $\sim 210$ ,  $\sim 200$  and  $\sim 920$  nm respectively. Thus, increase in solvent polarity and volatility resulted in decrease in the diameter of the TEOS phase droplets and resulting dome structures that were deposited on the substrates after solvent removal. Average height of structures



**Fig. 1** Scanning electron microscopy graphs of silica domes in different sizes: S1 (a), S2 (b), S3 (c) and S4 (d). The *inset a1* shows magnification of S1 surface

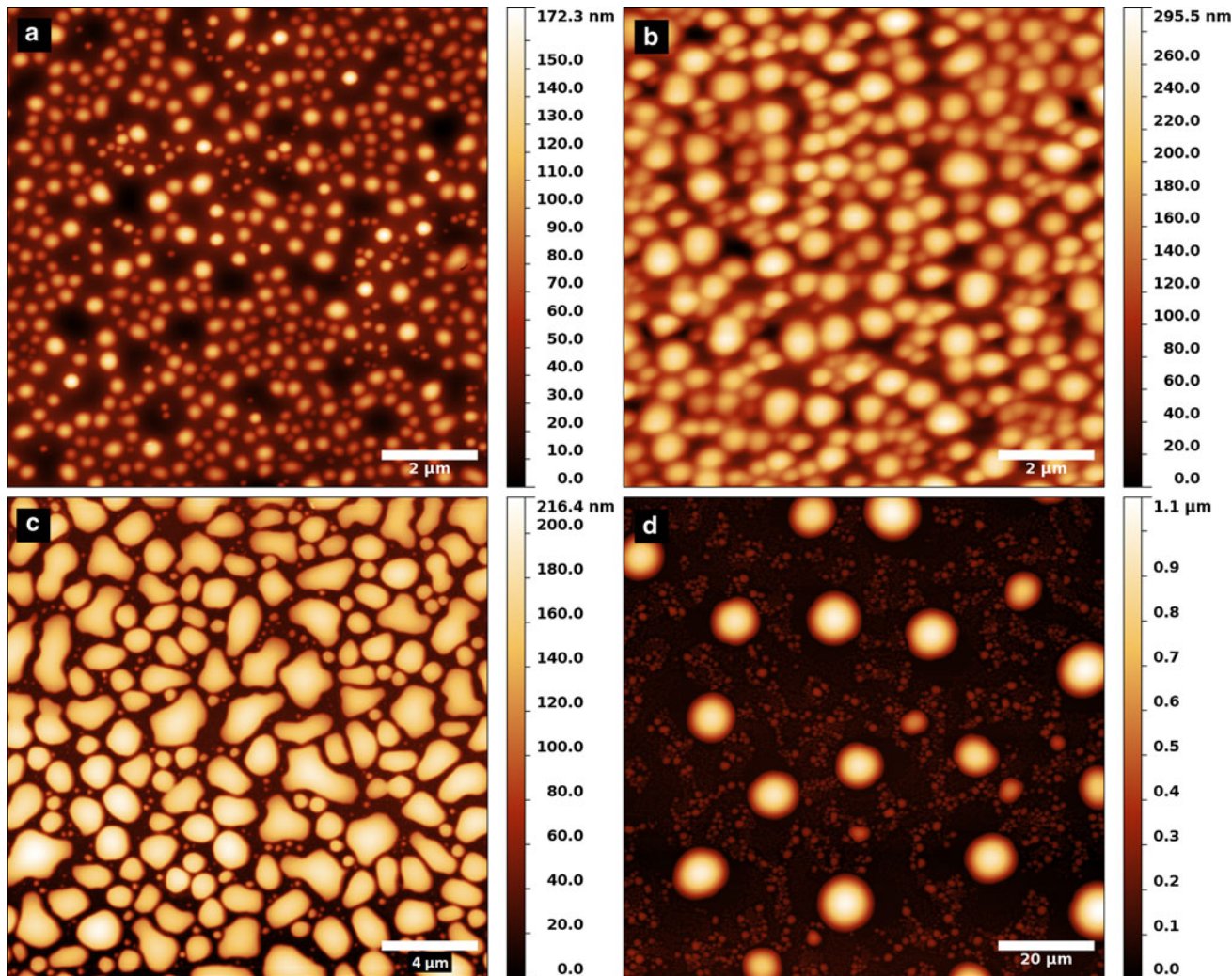


was evaluated from AFM images (Fig. 2), and approximate surface density of domes was visually estimable, too. Number of domes per  $10,000 \mu\text{m}^2$  was 51,000; 24,000; 4,300 and 18 on S1; S2; S3 and S4, respectively. As evident from the comparison of S3 and S4, the size of obtained bumps can also be influenced by the amount of solvent in the sol. The surface of smooth samples showed no observable roughness in SEM characterization.

Hydrophilicity of micro- and nanopatterned surfaces was evaluated via water droplet contact angle measurements resulting in contact angles about  $48^\circ$  (S1),  $54^\circ$  (S2),  $15^\circ$  (S3) and  $34^\circ$  (S4). Comparatively small contact angle of S3 is caused by its rather flat domes (Fig. 1c).

Cells readily adhere, grow and proliferate on all studied surfaces, indicating that the composition of the material is compatible with cells. But the difference in cell morphology on different topographic surfaces clearly shows the role of

surface roughness in cell growth (Fig. 3a–c, g–i). Pretreatment of glass with a thin layer of silica minimally increased the growth rate of cells (data not shown) when compared to cells grown on untreated glass inserts. When grown on flat surface, fibroblasts usually maintain their normal spindle shaped morphology (Fig. 3n). It has been shown previously that, if maximal cell spreading is achieved, the shape of cells changes from a more rounded form, associated with spreading, to a more elongated spindle shape, which is indicative of cell migration [28]. However, a portion of cells have acquired abnormal morphology with enlarged cytoplasmic area or, alternatively, have become stretched out and obtained a narrow cytoplasm and an oval nucleus (Fig. 3m, o). It has been shown that such cells do not proliferate and represent most probably either senescent or stressed cells, correspondingly [29]. Senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ -gal) activity allows to detect cells undergoing a limited number of



**Fig. 2** Atomic force microscopy images of silica domes S1–S4 (a–d). The image size of S1 (a) and S2 (b) is  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ , S3 (c) is  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ , and S4 (d) is  $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ . The altitude scale is shown at the *right* of each image (Color figure online)

doublings in culture before irreversibly arresting proliferation (i.e. becoming senescent) [27] and thereby can show, how different conditions or as in this case different nanopatterned surfaces can induce or inhibit the proliferation of cells.

The existence of senescent cells was confirmed by SA- $\beta$ -gal staining, a marker of senescence, where positive cells were significantly enlarged and occasionally had a surface up to 10 times larger than that of normal cells (data not shown).

The proportion of abnormal cells grown on S1 and S2 substrate was similar to the amount of atypical cells on the flat surfaces (Fig. 4a). In contrast cells grown on S3 and S4 substrates displayed increased proportion of enlarged cells and decreased proportion of cells with narrow cytoplasm (Fig. 4a). Furthermore, the amount of fibroblasts positive for SA- $\beta$ -gal staining was increased among cells grown on S3 and S4, suggesting that increasing the dome size of the surface increases the induction of cell senescence (Fig. 4b). Ki67 antibody staining recognizes a proliferation-specific nuclear antigen expressed by proliferating cells in late G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> and M phases, but not in resting cells [30, 31]. It has been used widely for the estimation of the growth fraction of normal cells in culture. Previous studies have shown that the level of Ki-67-positive cells decreased with time of culture and number of cell passages [32]. To avoid this tendency, cells from the third and fourth passage were used in our experiment.

In concordance with the enhanced cell senescence on S3 and S4 surfaces we found that the number of Ki67-positive nuclei was slightly decreased in the cells grown on S3 and S4 (Fig. 4c). To investigate the possible reasons behind these observations we performed SEM imaging of the cells grown on different surfaces (Fig. 3d–f, j–l). One striking difference between cells grown on S3 or S4 is the lack of filopodia (Fig. 3f, j). However, the cells grown on S4 stretch out long stress fibres instead (Fig. 3j).

Next we investigated the attachment of cells to the substrate by imaging the vertical cuts of the cell–substrate interface by FIB. The cells grown on S1 displayed tight attachment to the substrate with no gaps present between the cell membrane and the material (Fig. 5a). Cells grown on S2 attached incompletely to the substrate with occasional gaps present (Fig. 5b). These changes were more pronounced in cells grown on S3, where cells were attached only to the domes and contact with the substrate in between the domes was practically absent (Fig. 5c). Cells grown on S4 attached both to the domes and to the space between them (Fig. 5d) suggesting that both the presence of large domes and the ability of the cell to attach completely to its substrate modulate the behaviour of cells.

#### 4 Discussion

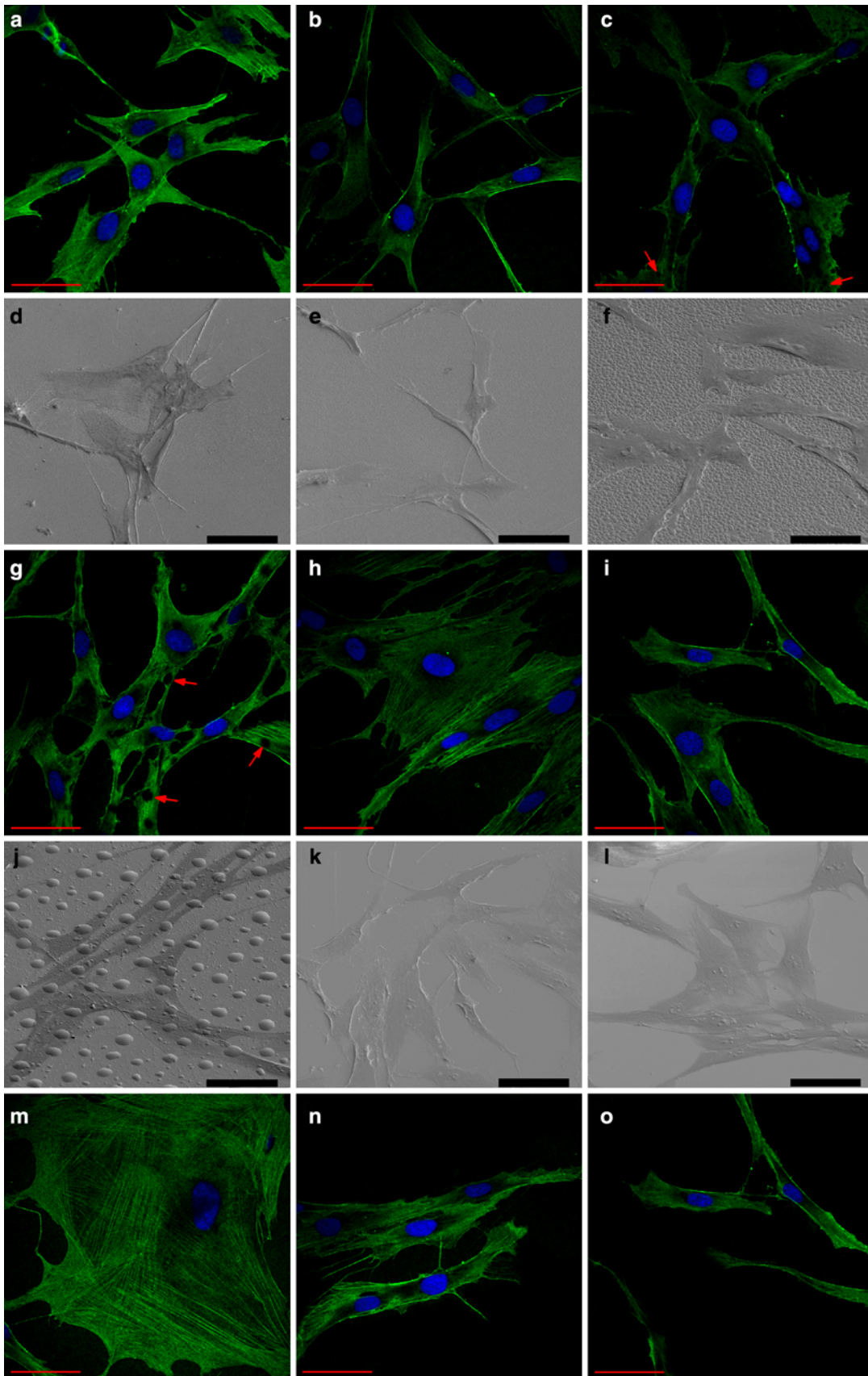
Conventionally, sol–gel phase separation methods are used for preparing porous solids, covering the substrates

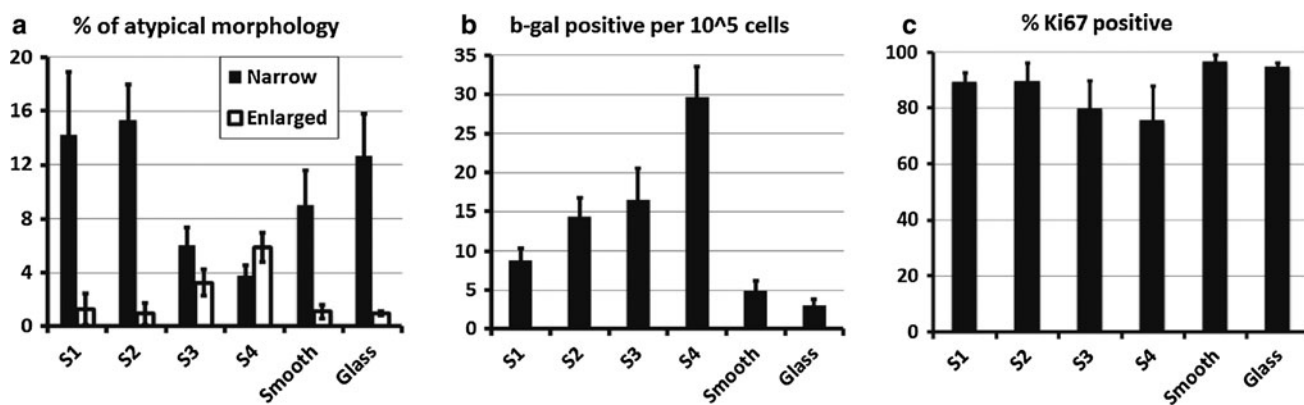
**Fig. 3** Confocal fluorescence microscopy images of normal human dermal fibroblasts cultured on silica domes S1–S4 (a–c, g), smooth surface (f), glass (i), with visible gamma-actin (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, green) and nuclei (DAPI, blue). Red arrows mark location of domes. SEM micrographs of cultured fibroblasts on silica domes S1–S4 (d–f, j) correspondingly and on smooth surface (k), glass (l). Confocal fluorescence images of fibroblasts with different morphology (m–o): m enlarged cell; n spindle shape (normal) cells; o narrow cells. Cells are labeled with anti-gamma actin (Alexa Fluor 488; green) and DAPI (blue). Scale bar corresponds to 50  $\mu$ m (Color figure online)

entirely. As demonstrated in the present paper, the process can also lead to the formation of defined surface pattern features, isolated solid structures on substrate, not altering the topography in the remaining area of the substrate. In the case described hereby, spherical domains of polymerized TEOS are nucleated in a sol layer. As a layer of sol is applied on a surface, solvent evaporation and further polymerization of TEOS lead to the decrease in system entropy, resulting in an increase in Gibbs energy and enabling phase separation thermodynamically. Nucleation is followed by droplet growth and gradual diminishing of solvent-rich phase due to solvent evaporation. The latter, accompanied by the progressive polymerization of silicon species continues to shift the thermodynamical balance between the two phases, resulting in further separation of partially hydrolyzed and polymerized TEOS. Nevertheless, due to the negligible solubility that still remains and affinity between TEOS and the glass substrate, a thin continuous film is still formed on the substrate as well. Therefore, the surface chemistry does not vary between the differently patterned silica surfaces, even in the flat portion of the substrates. While TEOS that is undergoing continuous polymerization and condensation is still liquid until gelation, the spherical droplets are deformed after setting on the glass substrate. Depending on the speed of TEOS condensation and solvent evaporation, it is also possible that nucleated droplets join to form larger phase domains by coming into contact during growth or movement on the substrate. Latter explains the observed deviations from spherical dome shape that appeared in some cases.

In order to effectively achieve variation in the size of obtained surface structures that would be sufficient to achieve the objectives of present paper, different alcohols were used as solvents. Volatility and molecule dipole moment increases in the direction propanol–ethanol–methanol. As the size of obtained structures increases in the same direction, it can be deduced that in case of propanol nucleation of domains of non-polar phase is preferred, as the methanol case supports the growth of already nucleated TEOS droplets. Alternatively, larger structures can also form from initial small TEOS domains after the solvent is removed and liquid droplets, that have increased mobility on dry substrate due to poor wettability, join to minimize surface energy before gelation. The size of

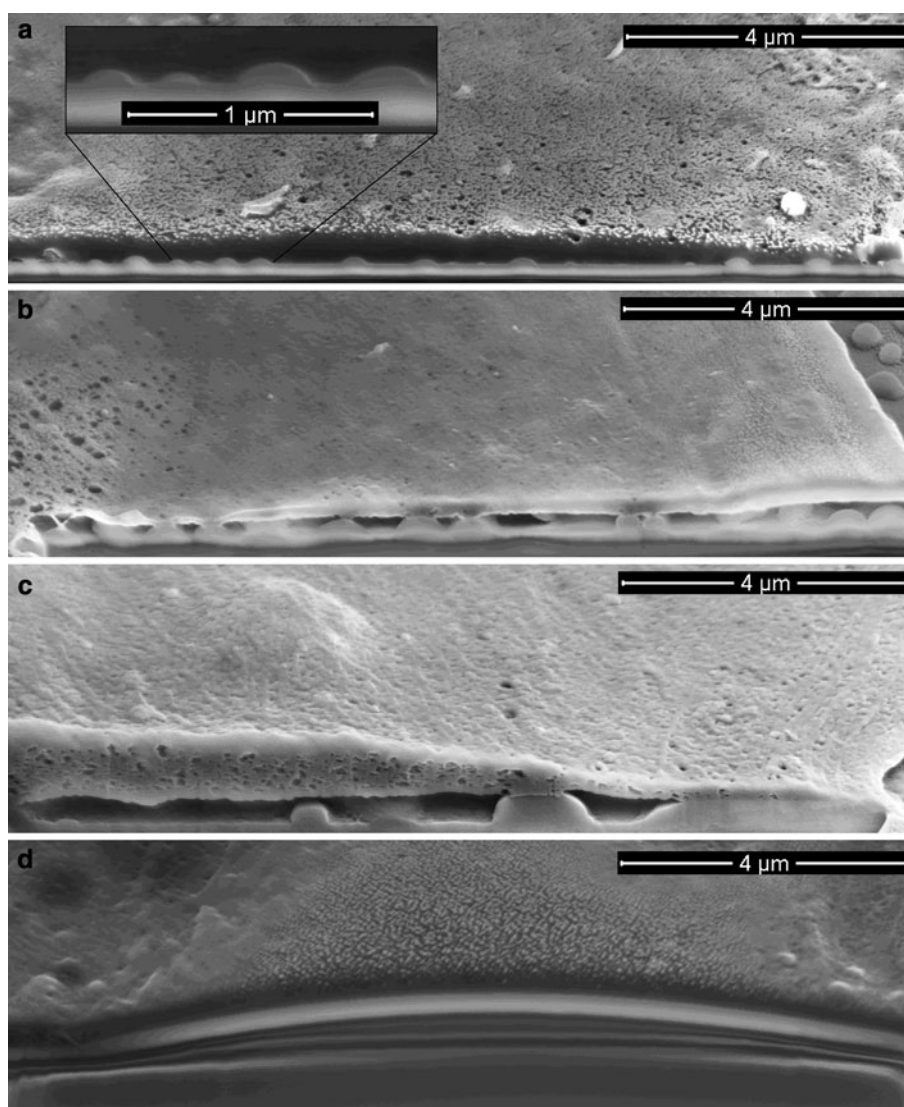






**Fig. 4** Graphs describe the percentage of cells with atypical morphology (a), ratio of SA-β-gal positive per 10<sup>5</sup> normal cells (b) and mean percentage of Ki-67-positive cells per total number of cells (c). Error bars ± SD

**Fig. 5** SEM micrographs of cross sections (performed with focused ion beam) of fibroblasts on silica domes S1 (a), S2 (b), S3 (c) and S4 (d) indicate cell-surface integration between different sizes of domes



obtained surface structures was also modified by sol concentration in case on S3 and S4. Lower TEOS concentration in sol increases the time of droplet growth and results in larger gel structures.

The contact angle and therefore also the height and geometry of vertical intersection of formed bumps is influenced by wettability of partially condensed TEOS on used substrate. Therefore, hydrophilicity of underlying substrate presents an additional tool in the design of desired surface structures. However, in present stage of studies, no effort was made in this direction.

Described novel method is adaptable to a wide range of different material compositions that can be prepared by sol–gel strategy and in addition to discussed means of modification and tuning of obtained surface structures, different extents of sol hydrolysis and condensation can also be applied.

The properties of a growth substrate are known to modulate the growth and behaviour of cells attached to it [33]. We studied the effect of the surface structure to the morphology and growth properties of primary human dermal fibroblasts and found that both the lack of complete attachment of a cell to its substrate and the presence of large irregularities on the substrate surface induce morphological changes characteristic to cell senescence. The attachment deficit is likely caused by the inability of the cell membrane to bend between the domes present in S3 and results in the increased distance between the cellular anchoring points. Most of the domes present in S1 and in S2 on the other hand were successfully integrated into the cell membrane due to their smaller size and did not markedly influence the attachment of the cell to the surface. These data are in good correlation with the observation that increase in the distances between cell's anchoring points results in enhanced differentiation of epidermal and mesenchymal stem cells [34]. In the case of S4, the cell was able to spread over the domes due to the wide bending angle and long distance between them. Although this resulted in the complete attachment of the cells to the substrate, the presence of protrusions, which affect the 3D organization of the cytoplasm, affected the cells ability to proliferate and induced senescence. We point out that the structure of the surface is of utmost importance for the regulation of the cells' behaviour, implying that while designing new biological surfaces for cell growth, the structure of the materials remains an important issue, which cannot be overlooked.

## 5 Conclusion

Silicon and metal alkoxide based sol–gel strategies enable the variation of surface structure, mechanical and chemical properties of materials, all of which are relevant in

designing biomaterials and investigating cell to material interactions. In present study we applied a novel sol–gel phase separation-based method for the preparation of patterned silica surfaces with round nano- and microscale features from simple TEOS–alcohol sol compositions. Tunability of the method was demonstrated by variation of solvent and sol concentration, resulting in the formation of dome-shape silica structures with diameters ranging from ~200 nm to ~10 µm on glass substrates.

Importance of this study is related to tissue engineering in purpose to provide the environment for cells, which would enhance viability, proliferation, and controlled differentiation into specific cells, meanwhile maintaining normal shape and functioning of the resultant tissue. Based on the first results obtained in this study, further studies are planned to investigate the influence of variation in chemical composition, mechanical properties as well as functionality of sol–gel material systems in order to compose a systematic library of cell–material interactions based on a single material system.

**Acknowledgments** The authors thank Dr. Tõnu Järveots, Veterinary Medicine and Animal Sciences, Estonian University of Life Sciences, for use of his Critical point dryer and Jürgen Innos, Department of Physiology, University of Tartu, for language correction of this article. This study was financially supported by the funding from the Estonian Ministry of Education and Research targeted financing SF0180148s08, SF0180058s07 by the Estonian Science Foundation research grant funding ETF6576, and ETF7479, ETF8428, ETF8420, ETF8377, ETF8932, ETF9282, by EMBO Installation Grant, by the European Union through the European Regional Development Fund via Estonia–Latvia Program and Developing Estonian–Latvian Medical Area project and Centre of Excellence “Mesosystems: Theory and Applications” and by European Social Fund project Functional Materials and Processes 1.2.0401.09-0079.

## References

1. Saal K, Tätte T, Järvekülg M, Reedo V, Lohmus A, Kink I. Micro- and nanoscale structures by sol–gel processing. *Int J Mater Prod Technol.* 2011;40:2–14.
2. Dirè S, Tagliazucca V, Callone E, Quaranta A. Effect of functional groups on condensation and properties of sol–gel silica nanoparticles prepared by direct synthesis from organoalkoxysilanes. *Mater Chem Phys.* 2011;126:909–17.
3. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 2011;209:139–51.
4. Wheelodon I, Farhadi A, Bick AG, Jabbari E, Khademhosseini A. Nanoscale tissue engineering: spatial control over cell–materials interactions. *Nanotechnology.* 2011;22:212001.
5. Choi CK, Breckenridge MT, Chen CS. Engineered materials and the cellular microenvironment: a strengthening interface between cell biology and bioengineering. *Trends Cell Biol.* 2010;20:705–14.
6. Yang Y, Leong KW. Nanoscale surfacing for regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010;2:478–95.

7. Verma S, Domb AJ, Kumar N. Nanomaterials for regenerative medicine. *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6:157–81.
8. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126:677–89.
9. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, et al. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2005;60:24–34.
10. Tirrell M, Kokkoli E, Biesalski M. The role of surface science in bioengineered materials. *Surf Sci*. 2002;500:61–83.
11. Ghibaudo M, Trichet L, Le Digabel J, Richert A, Hersen P, Ladoux B. Substrate topography induces a crossover from 2D to 3D behavior in fibroblast migration. *Biophys J*. 2009;97:357–68.
12. Poellmann MJ, Harrell PA, King WP, Wagoner Johnson AJ. Geometric microenvironment directs cell morphology on topographically patterned hydrogel substrates. *Acta Biomater*. 2010;6:3514–23.
13. Dolatshahi-Pirouz A, Nikkhah M, Kolind K, Dokmeci MR, Khademhosseini A. Micro- and nanoengineering approaches to control stem cell–biomaterial interactions. *J Funct Biomater*. 2011;2:88–106.
14. Smitha S, Shajesh P, Mukundan P, Warriar KGK. Sol–gel synthesis of biocompatible silica–chitosan hybrids and hydrophobic coatings. *J Mater Res*. 2008;23:2053–60.
15. Lee J-H, Kim H-E, Shin K-H, Koh Y-H. Electrodeposition of biodegradable sol–gel derived silica onto nanoporous TiO<sub>2</sub> surface formed on Ti substrate. *Mater Lett*. 2011;65:1519–21.
16. Kajihara K, Hirano M, Hosono H. Sol–gel synthesis of monolithic silica gels and glasses from phase-separating tetraethoxysilane–water binary system. *Chem Commun (Camb)*. 2009;2580–2. doi:10.1039/B900887J.
17. Timusk M, Järvekülg M, Salundi A, Löhmus R, Kink I, Saal K. Optical properties of high-performance liquid crystal–xerogel microcomposite electro-optical film. *J Mater Res*. 2012;27:1257–64.
18. Nakanishi K, Tanaka N. Sol–gel with phase separation. Hierarchically porous materials optimized for high-performance liquid chromatography separations. *Acc Chem Res*. 2007;40:863–73.
19. Brown JM, Swindle EJ, Kushnir-Sukhov NM, Holian A, Metcalfe DD. Silica-directed mast cell activation is enhanced by scavenger receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;36:43–52.
20. Ferry VE, Verschuuren MA, Lare MC, Schropp RE, Atwater HA, Polman A. Optimized spatial correlations for broadband light trapping nanopatterns in high efficiency ultrathin film a-Si:H solar cells. *Nano Lett*. 2011;11:4239–45.
21. Bhushan B, Jung YC, Koch K. Micro-, nano- and hierarchical structures for superhydrophobicity, self-cleaning and low adhesion. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2009;367:1631–72.
22. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010;463:485–92.
23. Belyantseva IA, Perrin BJ, Sonnemann KJ, Zhu M, Stepanyan R, McGee J, et al. Gamma-actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:9703–8.
24. Dugina V, Zwaenepoel I, Gabbiani G, Clement S, Chaponnier C. Beta and gamma-cytoplasmic actins display distinct distribution and functional diversity. *J Cell Sci*. 2009;122:2980–8.
25. Tsai IY, Kimura M, Stockton R, Green JA, Puig R, Jacobson B, et al. Fibroblast adhesion to micro- and nano-heterogeneous topography using diblock copolymers and homopolymers. *J Biomed Mater Res A*. 2004;71:462–9.
26. Hamilton DW, Riehle MO, Monaghan W, Curtis AS. Articular chondrocyte passage number: influence on adhesion, migration, cytoskeletal organisation and phenotype in response to nano- and micro-metric topography. *Cell Biol Int*. 2005;29:408–21.
27. Debaqç-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009;4:1798–806.
28. Stockton RA, Jacobson BS. Modulation of cell–substrate adhesion by arachidonic acid: lipoxygenase regulates cell spreading and ERK1/2-inducible cyclooxygenase regulates cell migration in NIH-3T3 fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2001;12:1937–56.
29. Khor HL, Kuan Y, Kukula H, Tamada K, Knoll W, Moeller M, et al. Response of cells on surface-induced nanopatterns: fibroblasts and mesenchymal progenitor cells. *Biomacromolecules*. 2007;8:1530–40.
30. Kill IR. Localisation of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci*. 1996;109(Pt 6):1253–63.
31. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984;133:1710–5.
32. Knuchel R, Hofstaedter F, Sutherland RM, Keng PC. Proliferation-associated antigens PCNA and Ki-67 in two- and three-dimensional experimental systems of human squamous epithelial carcinomas. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1990;74:275–8.
33. Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology*. 2008;47:1394–400.
34. Trappmann B, Gautrot JE, Connelly JT, Strange DG, Li Y, Oyen ML, et al. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nat Mater*. 2012;11:642–9.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Liis Nurmis,  
(sünnikuupäev: 12.01.1991.)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose  
„Mikro- ja nanostruktuursed pinnad uudsul faasialdusel põhineval sool-geel meetodil“,

mille juhendajad on Triin Kangur ja Martin Järvekülg,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2014** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus 29.05.2013