

POLITECNICO DI MILANO

Facoltà di Ingegneria dei Sistemi

Corso di laurea magistrale in Ingegneria Biomedica



*DISPOSITIVI MICROFLUIDICI PER LA GENERAZIONE DI CAMPI ELETTRICI:
PROCESSO DI FABBRICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI ELETTRODI
TRIDIMENSIONALI FLESSIBILI PER L'UTILIZZO IN AMBITO BIOLOGICO*

Relatore: Prof. Gianfranco Beniamino FIORE

Correlatori: Ing. Marco RASPONI

Ing. Francesco PIRAINO

Tesi di laurea di:

Nicola CAGOL

matricola n. 750160

Anno Accademico 2010-2011

SOMMARIO.....	I
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE.....	1
1.1 PRINCIPI DI MICROFLUIDICA	1
1.2 FABBRICAZIONE DI DISPOSITIVI MICROFLUIDICI	4
1.2.1 SOFT LITHOGRAPHY	4
1.2.2 PDMS: CARATTERISTICHE E PROPRIETÀ	8
1.3 APPLICAZIONI DELLA MICROFLUIDICA	10
1.3.1 APPLICAZIONI PER L'INGEGNERIA DEI TESSUTI	10
1.3.1.1 Utilizzo dei campi elettrici in ingegneria dei tessuti	12
1.3.2 DISPOSITIVI PER ANALISI BIOLOGICHE	14
1.4 MATERIALI ELETTRICAMENTE CONDUTTIVI IN MICRO-FLUIDICA	15
1.4.1 UTILIZZO DEI MATERIALI CONDUTTIVI IN MICRO-FLUIDICA	15
1.4.2 METODI PER L'INTEGRAZIONE DI COMPONENTI CONDUTTIVI IN MICROFLUIDICA	16
1.4.2.1 Metodi tradizionali per l'integrazione di componenti conduttivi	17
1.4.2.1 Esempi di metodi innovativi per l'integrazione di componenti conduttivi	19
1.4.3 COMPOSITI CONDUTTIVI A BASE DI PDMS	21
1.4.3.1 Applicazioni microfluidiche con compositi conduttivi a base di PDMS	23
1.5 SCOPO DEL LAVORO	25
2. MATERIALI E METODI	27
2.1 DISPOSITIVI MICROFLUIDICI.....	27

INDICE

2.1.1	PROGETTO E DISEGNO	28
2.1.2	REALIZZAZIONE DELLO STAMPO MEDIANTE FOTOLI- TOGRAFIA	29
2.1.3	OTTENIMENTO DEI DISPOSITIVI IN PDMS PER REPLICA MOLDING	29
2.1.4	INCOLLAGGIO DEI DISPOSITIVI SU SUPPORTO DI VE- TRO	31
2.2	REALIZZAZIONE DEGLI ELETTRODI	31
2.2.2	PREPARAZIONE DEI COMPOSITI CONDUTTIVI	32
2.2.2	INIEZIONE DEL COMPOSITO CONDUTTIVO E OTTENI- MENTO DEGLI ELETTRODI	33
2.3	CARATTERIZZAZIONE GEOMETRICA DEL DISPOSITIVO MICROFLUIDICO	37
2.4	CARATTERIZZAZIONE ELETTRICA	38
2.4.1	SET-UP PER LA CARATTERIZZAZIONE ELETTRICA	38
2.4.2	ANALISI DEI DATI	41
2.5	TEST DEL COMPORTAMENTO ELETTRICO SOTTO FLES- SIONE DEI MATERIALI CONDUTTIVI.....	42
2.5.1	SET-UP PER I TEST SOTTO FLESSIONE	43
2.5.2	ANALISI DEI DATI	44
2.6	ANALISI COMPUTAZIONALE DEL DISPOSITIVO	44
2.6.1	CREAZIONE DELLA GEOMETRIA DEL MODELLO	46
2.6.2	GENERAZIONE DELLA GRIGLIA DI CALCOLO	47
2.6.3	PROPRIETÀ DEI MATERIALI COSTITUTIVI	48
2.6.4	IMPOSTAZIONE DELLE CONDIZIONI AL CONTORNO DEL PROBLEMA	49
2.6.5	RISOLUZIONE DEL PROBLEMA	50

2.6.6 ANALISI DEI DATI	50
3. RISULTATI	52
3.1 DISPOSITIVI MICROFLUIDICI.....	52
3.2 REALIZZAZIONE DEGLI ELETTRODI	53
3.3 CARATTERIZZAZIONE ELETTRICA	60
3.3.1 SET-UP PER LA CARATTERIZZAZIONE ELETTRICA	60
3.3.2 ANALISI DEI DATI	62
3.3.2.1 Diagrammi di Bode degli elettrodi	63
3.3.2.2 Diagramma di Bode del dispositivo	66
3.4 COMPORTAMENTO ELETTRICO SOTTO FLESSIONE DEI MATERIALI CONDUTTIVI	68
3.5 ANALISI DEL MODELLO COMPUTAZIONALE DEL DISPOSITIVO	71
3.5.1 SIMULAZIONE DEL DISPOSITIVO CON ELETTRODI IN PDMS E ARGENTO	72
3.5.1.1 Intensità del potenziale elettrico	72
3.5.1.2 Distribuzione del campo elettrico	73
3.5.1.3 Distribuzione della densità di corrente	74
3.5.1.4 Resistenza elettrica del dispositivo	75
3.5.2. SIMULAZIONE DEL DISPOSITIVO CON ELETTRODI IN PDMS E GRAFITE+CNT	76
3.5.2.1 Intensità del potenziale elettrico	76
3.5.2.2 Distribuzione del campo elettrico	77
3.5.2.3 Distribuzione della densità di corrente	78
3.5.2.4 Resistenza elettrica del dispositivo	79
4. DISCUSSIONE	80
5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	88

6. APPENDICE.....	90
A. COMPORTAMENTO DI MATRICI POLIMERICHE CARICATE CON PARTICOLATI CONDUTTIVI.....	90
B. RISPOSTA IN FREQUENZA DI UN'IMPEDENZA.....	92
C. EQUAZIONI RISOLUTIVE DELL'INTERFACCIA FISICA CORRENTI ELETTRICHE.....	95
BIBLIOGRAFIA	97

SOMMARIO

Dispositivi microfluidici per la generazione di campi elettrici: processo di fabbricazione e caratterizzazione di elettrodi tridimensionali flessibili per l'utilizzo in ambito biologico.

I. INTRODUZIONE

La microfluidica rappresenta un'insieme di tecniche che permettono la manipolazione di fluidi in sistemi aventi dimensioni caratteristiche nell'ordine di 10-100 μm . Svariate sono le tecnologie di microfabbricazione usate per realizzare questo tipo di dispositivi. La più diffusa è probabilmente la soft-lithography; tramite questa tecnica è possibile riprodurre strutture micrometriche in materiali elastomerici (ad esempio il PDMS) a partire da uno stampo realizzato mediante fotolitografia, e successivamente ottenere un dispositivo microfluidico previo incollaggio dello strato polimerico su un substrato [1].

Oggi la microfluidica rappresenta un valido strumento per l'analisi e la manipolazione di materiale chimico e biologico, negli ambiti delle biotecnologie, dell'industria farmaceutica e della bioingegneria. Lo sviluppo di sistemi microfluidici complessi da utilizzare nel campo dell'ingegneria dei tessuti o per la realizzazione di sistemi μTAS per esperimenti biologici avanzati richiede la presenza di numerosi componenti che integrino le loro funzioni all'interno dello stesso microdispositivo [2]. Tra questi i componenti conduttivi

rivestono un'importanza particolare in numerose applicazioni, quali la stimolazione elettrica di costrutti cellulari [3, 4], la manipolazione e la classificazione di materiale biologico (proteine, frazioni di DNA, biomolecole) attraverso l'elettroforesi o l'elettroorientazione [5], la realizzazione di biosensori, microriscaldatori e sistemi di attuazione [6].

Numerosi approcci per integrare questo tipo di strutture all'interno dei dispositivi microfluidici sono stati proposti. Il più comune prevede la deposizione di un sottile film metallico su un substrato di vetro, che successivamente viene allineato al microdispositivo in PDMS [7]. Questa soluzione presenta alcuni svantaggi: (i) l'adesione tra metallo e PDMS è debole a causa della bassa energia superficiale del PDMS [8]; (ii) gli elettrodi generati risultano essere planari, e non permettono la generazione di un campo elettrico uniforme all'interno dei volumi fluidi. In particolare la generazione di campi elettrici uniformi è necessaria per applicazioni che prevedono di orientare e posizionare cellule e biomolecole [9] e per la stimolazione elettrica di costrutti cellulari [10]. Per ottenere questo risultato è necessario che

siano realizzate strutture tridimensionali (3D) nelle quali gli elettrodi si affacciano verticalmente su lati opposti dei canali. Alcuni metodi presentati in letteratura che prevedono la realizzazione di elettrodi 3D richiedono l'utilizzo di tecnologie laboriose e costose: numerosi processi fotolitografici, la realizzazione degli strati metallici tramite elettrodeposizione per evaporazione a cannone elettronico, la sovrapposizione di più strati di diverso materiale, ecc [11, 12]. Soluzioni più economiche prevedono l'utilizzo di leghe metalliche iniettabili per realizzare i componenti conduttivi a contatto con i microcanali [13]. Il limite di questo approccio risiede nell'instabilità fisica di questo tipo di materiali, che può determinare il fallimento del dispositivo; inoltre il processo di iniezione è difficilmente controllabile. È quindi necessario metodi innovativi per realizzare elementi conduttivi all'interno di dispositivi microfluidici.

In questo studio viene presentato un metodo per la realizzazione di elettrodi 3D flessibili affacciati verticalmente a canali microfluidici. Gli elettrodi sono costituiti da una miscela di PDMS e polvere conduttiva e vengono inseriti in un dispositivo paradigmatico, specificatamente progettato per poter caratterizzare i diversi step del processo. La procedura di fabbricazione è semplice ed economica, in quanto prevede un singolo processo fotolitografico e si basa sul concetto di cofabbricazione, ovvero la realizzazione in singolo passaggio di diverse strutture con diverse funzionalità.

Nello specifico, vengono realizzate due reti di canali, una per contenere fluidi e l'altra per alloggiare elettrodi iniettabili. Le reti, originariamente separate tra loro da sottili membrane di PDMS, vengono messe in comunicazione tramite un processo di erosione chimica. La conducibilità dei materiali conduttivi e il comportamento in frequenza degli elettrodi sono stati caratterizzati. È stato inoltre testato il comportamento elettrico sotto flessione dei materiali conduttivi: questa caratteristica permette l'utilizzo degli elettrodi in varie applicazioni che richiedono l'applicazione di deformazioni meccaniche [14, 15]. Sono state infine svolte simulazioni numeriche per interpretare il comportamento elettrico dei dispositivi.

II. MATERIALI E METODI

Il progetto del dispositivo prevede una geometria semplice: un canale fluidico centrale di larghezza 300 μm e lunghezza 5 mm collegato a ingressi e uscite attraverso due estensioni di larghezza 125 μm e lunghezza 5 mm. Gli elettrodi laterali sono posti a distanza 75 μm dal canale centrale: la larghezza degli elettrodi è pari a 225 μm nella regione confinante con il canale fluidico e aumenta fino a 800 μm allontanandosi da essa. L'altezza di tutti i componenti è pari a 75 μm

I dispositivi microfluidici sono stati fabbricati in PDMS mediante soft lithography [2]. Il disegno è stato utilizzato per produrre una fotomaschera; a partire da essa è stato realizzato il master mold tra-

mite fotolitografia, utilizzando SU-8 50 (MicroChem Corp.) come fotoresist. L'altezza delle microstrutture ($75\ \mu\text{m}$) è stata imposta in fase di deposizione dell'U-8 tramite spin coating. Il PDMS (Sylgard 184, Dow Corning Corp.) è stato preparato mescolando la soluzione di prepolimero e l'agente reticolante in rapporto 10:1 (w/w). Dopo averlo debollato, il PDMS è stato versato sul master mold e fatto reticolare in stufa a $70\ ^\circ\text{C}$ per 2 ore. I dispositivi sono stati staccati dal master mold e con una fustella sono stati realizzate le porte di accesso ai canali (diametro esterno di $0,5\ \text{mm}$ e $8\ \text{mm}$ rispettivamente per i canali degli elettrodi e il canale fluidico). I dispositivi sono infine stati incollati su un supporto di vetro previo trattamento al plasma in aria.

Gli elettrodi sono costituiti da una matrice di PDMS riempita alternativamente con tre diverse polveri conduttive: argento (scaglie da $10\ \mu\text{m}$), grafite (particelle da $20\ \mu\text{m}$), miscela di grafite e nanotubi di carbonio a parete multipla (MWCNT) in rapporto 3:1 (v/v). Le polveri state sono mescolate al PDMS in rapporti rispettivamente 4:1 (w/w), 2:3 (w/w) e 2:7 (w/w) fino ad ottenere delle miscele conduttive uniformi. Queste sono state iniettate manualmente nei canali degli elettrodi utilizzando una siringa, e fatte reticolare a $150\ ^\circ\text{C}$ per un'ora (fig. 1 a).

L'erosione chimica della parete ha permesso di mettere in comunicazione gli elettrodi e il canale fluidico. È stata utilizzata una soluzione di tetrabutylammonio-

fluoruro (TBAF) e N-metilpirrolidone (NMP) in rapporto 1:3 (w/w) [16], fatta scorrere nel canale sfruttando la differenza di pressione dovuta al battente idrostatico tra i due pozzetti ai suoi estremi (fig. 1 b).

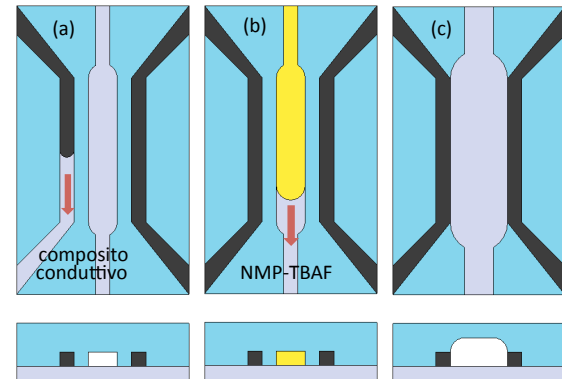


Fig. 1: Processo di realizzazione degli elettrodi. Il composito conduttivo viene iniettato nel dispositivo (a) e la soluzione erosiva viene fatta scorrere nel canale (b) per mettere in comunicazione elettrodi e canale fluidico (c).

Dopo 60 minuti la parete era del tutto erosa e il canale è stato lavato con NMP puro ed etanolo (fig. 1 c). L'erosione chimica ha alterato la geometria del canale: lo spessore e l'altezza finali del canale fluidico sono riportati in fig. 2, che mostra la sezione del dispositivo prima (sopra) e dopo (sotto) l'erosione della parete.

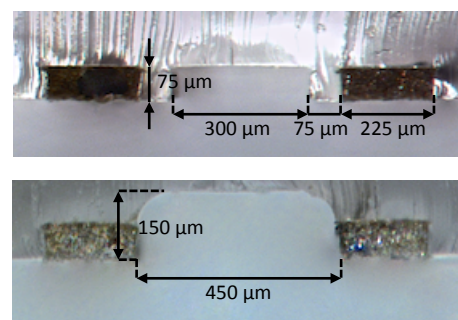


Fig. 2: sezione del dispositivo prima (sopra) e dopo (sotto) l'erosione chimica. Gli elettrodi in questo caso sono costituiti da PDMS e argento.

SOMMARIO

I tre materiali conduttivi sono poi stati caratterizzati elettricamente. A tale scopo sono stati realizzati specifici in PDMS che alloggiavano canali rettilinei con dimensioni $10 \times 0,18 \times 0,15$ mm. Dopo aver realizzato ingressi da 0,5 mm agli estremi dei canali e aver incollato i dispositivi a un supporto di vetro, i canali sono stati riempiti con i materiali conduttivi come descritto in precedenza. Aghi metallici tronchi inseriti negli ingressi hanno garantito la connessione a un circuito elettrico esterno. Il circuito, costituito da un elettrostimolatore e una scheda di acquisizione, è stato usato per stimolare gli elettrodi in frequenza (1 Hz e 10 kHz) per ricostruire la risposta in frequenza delle rispettive impedenze tra. Anche il dispositivo microfluidico prototipale è stato caratterizzato in questa maniera, previo riempimento del canale fluidico con PBS.

I test del comportamento elettrico sotto flessione hanno consentito di verificare se l'applicazione di una deformazione meccanica altera il comportamento elettrico dei materiali conduttivi. Per ognuno dei tre materiali sono stati realizzati dei sottili provini, la cui resistenza elettrica è stata misurata in corrispondenza di angoli di flessione di 90° e 180° o di torsione di 180° .

Le prove computazionali hanno permesso di interpretare il comportamento elettrico del dispositivo. È stato utilizzato il software Comsol Multiphysics, utilizzando un solutore tempo-stazionario, per analizzare i dispositivi con elettrodi in ar-

gento o in grafite+nanotubi. La geometria finale del dispositivo è stata usata per produrre il modello, e le proprietà dei materiali sono state imposte a partire dai risultati della caratterizzazione elettrica. Per le analisi è stata simulata una stimolazione elettrica in corrente di intensità pari a 1 mA (fig. 3).

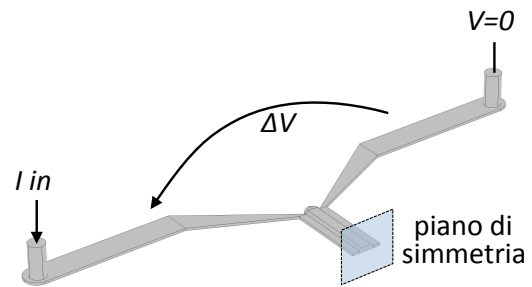


Fig. 3: modello computazionale. Sfruttando la simmetria viene considerato solo metà dispositivo.

Le prove hanno permesso il calcolo della distribuzione dell'intensità del potenziale, delle linee di campo elettrico e della densità di corrente all'interno del canale fluidico.

III. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il dispositivo microfluidico prototipale dotato di elettrodi è mostrato in fig. 4.

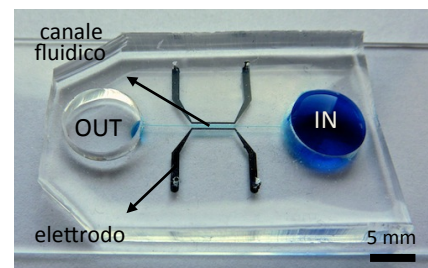


Fig. 4: dispositivo con elettrodi in grafite. Uno dei pozzetti è riempito con colorante per mostrare come avviene la movimentazione del fluido nel canale fluidico.

Il processo di realizzazione si è rivelato semplice, rapido ed economico. L'unica tecnologia di microfabbricazione utilizzata è stata la fotolitografia, con cui sono stati realizzati i master mold microstrutturati. Inoltre, tutte le tecniche presentate per la realizzazione del dispositivo (microfabbricazione, iniezione degli elettrodi, erosione della parete) possono venire modificate per essere adattate ad applicazioni differenti, modificando la geometria degli elettrodi o del canale fluidico e generando configurazioni più complesse.

La conducibilità elettrica misurata per i materiali compositi viene riportata nella seguente tabella:

COMPOSITO	$\sigma (=L/R \cdot A)$ [S/m]
PDMS/argento	$9,65 \pm 0,99 \cdot 10^5$
PDMS/grafite	$9,40 \pm 4,00$
PDMS/grafite+MWCNT	$13,34 \pm 2,55$

Tab.1: conducibilità dei materiali ricavata a partire dalle prove di conducibilità. SD con $n = 3$.

Il materiale maggiormente conduttivo è il composito a base di argento, la cui conduttività è 5 ordini di grandezza superiore a quella degli altri materiali. L'aggiunta di nanotubi di carbonio al composito di PDMS e grafite ha dimostrato come l'utilizzo di due particolati di diverse dimensioni migliori la conduttività rispetto all'utilizzo di un singolo riempitivo (per il composto di PDMS e nanotubi, in letteratura sono riportati valori di conduttività non superiori a 6 S/m [17]). L'analisi in frequenza degli elettrodi ha evidenziato un

comportamento generale del tipo filtro passa-basso, e mostrato come per tutti e tre i materiali testati la frequenza di taglio sia al di là dei 10 kHz. Per il dispositivo microfluidico prototipale l'analisi in frequenza ha invece permesso di identificare una frequenza di taglio pari a circa 1 kHz. In generale il contenuto in frequenza dei segnali elettrici utilizzati per la stimolazione di costrutti cellulari è limitato al di sotto di 1 kHz [18]. La tecnica proposta può quindi essere utilizzata per realizzare dispositivi utili per queste applicazioni. Gli elettrodi realizzati col composito di PDMS e argento non possono essere utilizzati a contatto con componenti cellulari in coltura, a causa del rilascio ionico [19]. Gli elettrodi realizzati con la miscela di grafite e nanotubi, invece, costituiscono una valida alternativa ai materiali compositi presentati finora in letteratura: entrambi i componenti sono biocompatibili e la conduttività elettrica del composito risulta inferiore rispetto a quello degli altri materiali considerati che non siano basati sull'argento stesso [8].

I test del comportamento elettrico sotto flessione hanno dimostrato che i materiali possono essere deformati ciclicamente senza andare incontro a rottura e che la resistenza elettrica non varia in presenza di deformazioni. Questo aspetto è importante ad esempio per realizzare sensori deformabili [14] o per abbinare lo stimolo elettrico alla deformazione meccanica nei sistemi di coltura cellulare miniaturizzati [15].

SOMMARIO

Le prove computazionali hanno evidenziato come, indipendentemente dal tipo di materiale utilizzato per realizzare gli elettrodi, nonostante l'alterazione geometrica introdotta dal processo di erosione il campo elettrico risulta uniforme in tutte le sezioni del canale (fig. 5).

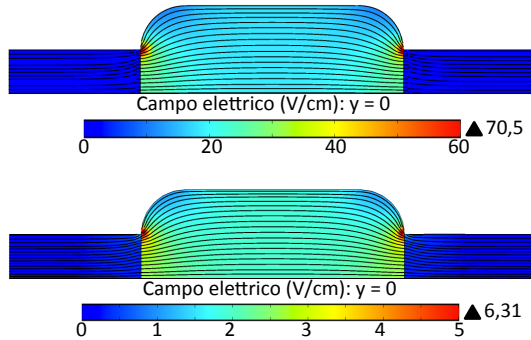


Fig. 5: intensità e linee del campo elettrico al centro del dispositivo con elettrodi in PDMS e argento (sopra) o in PDMS e grafite+nanotubi (sotto).

L'uniformità della densità di corrente è stata verificata lungo l'altezza di tutto il canale per entrambi i dispositivi analizzati. Nel caso della grafite+nanotubi, però, la maggiore resistività degli elettrodi provoca una concentrazione della corrente alle estremità del canale (fig. 6).

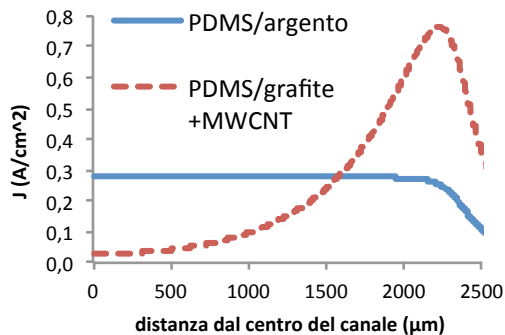


Fig. 6: densità di corrente lungo l'asse del canale passante per il centro del dispositivo. L'immagine rappresenta solo metà dispositivo.

IV. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Questo lavoro riporta un metodo semplice ed economico per produrre dispositivi microfluidici con elettrodi 3D flessibili a contatto coi canali fluidici, in grado di generare campi elettrici uniformi all'interno dei volumi fluidici.

Grazie alla modularità del processo di fabbricazione, questi dispositivi rappresentano una piattaforma economica e versatile per il futuro utilizzo in vari ambiti della microfluidica e della ricerca biologica.

I materiali caratterizzati potranno inoltre trovare impiego in vari ambiti della microfabbricazione che richiedano la presenza di elementi elettricamente conduttivi deformabili e integrabili in dispositivi in PDMS [6].

I dispositivi con elettrodi in PDMS e grafite+nanotubi potranno essere utilizzati per la stimolazione elettrica di costrutti cellulari. I dispositivi con elettrodi in PDMS e argento, grazie alle favorevoli proprietà elettriche di quest'ultimo, potranno trovare applicazione in vari ambiti della ricerca biologica (elettroforesi, dielettroforesi elettrofusione, realizzazione di sensori elettrochimici deformabili, ecc) [5, 12].

Gli sviluppi futuri, nell'ambito dell'ingegneria dei tessuti, si potranno concentrare sulla coltura e la stimolazione elettrica di cardiomiociti, proseguendo il lavoro iniziato da Pavesi et al. [20].

BIBLIOGRAFIA

1. Ng, J.M.K., et al., *Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(20): p. 3461-3473.
2. Whitesides, G.M., et al., *Soft Lithography In Biology And Biochemistry*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2001. **3**(1): p. 335-373.
3. Ghafar-Zadeh, E., J.R. Waldeisen, and L.P. Lee, *Engineered approaches to the stem cell microenvironment for cardiac tissue regeneration*. *Lab Chip*, 2011. **11**(18): p. 3031-48.
4. Burdick, J.A. and G. Vunjak-Novakovic, *Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation*. *Tissue engineering. Part A*, 2009. **15**(2): p. 205-19.
5. Marx, G.H., *The use of electric fields in tissue engineering*. *Organogenesis*, 2008. **4**(1): p. 11-17.
6. Gong, X. and W. Wen, *Polydimethylsiloxane-based conducting composites and their applications in microfluidic chip fabrication*. *Biomicrofluidics*, 2009. **3**(1): p. 12007.
7. Tandon, N., et al., *Surface-patterned electrode bioreactor for electrical stimulation*. *Lab Chip*, 2010. **10**(6): p. 692.
8. Niu, X.Z., et al., *Characterizing and Patterning of PDMS-Based Conducting Composites*. *Advanced Materials*, 2007. **19**(18): p. 2682-2686.
9. Wang, L., et al., *Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry*. *Lab Chip*, 2007. **7**(9): p. 1114-1120.
10. Barash, Y., et al., *Electric field stimulation integrated into perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010. **16**(6): p. 1417-1426.
11. Choi, J.W., et al., *3-dimensional electrode patterning within a microfluidic channel using metal ion implantation*. *Lab Chip*, 2010. **10**(6): p. 783-8.
12. Wang, L., L.A. Flanagan, and A.P. Lee, *Side-wall vertical electrodes for lateral field microfluidic applications*. Vol. 16. 2007, New York, NY, ETATS-UNIS: Institute of Electrical and Electronics Engineers. 8.
13. So, J.H. and M.D. Dickey, *Inherently aligned microfluidic electrodes composed of liquid metal*. *Lab Chip*, 2011. **11**(5): p. 905-11.
14. Wu, W.-Y., et al., *Flexible PDMS-based three-electrode sensor*. *Electrochemistry Communications*, 2010. **12**(11): p. 1600-1604.
15. Wang, J.H.C. and B.P. Thampatty, *An Introductory Review of Cell Mechanobiology*. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2006. **5**(1): p. 1-16.
16. Takayama, S., et al., *Topographical Micropatterning of Poly(dimethylsiloxane) Using Laminar Flows of Liquids in Capillaries*. *Advanced Materials*, 2001. **13**(8): p. 570-574.
17. Liu, C.-X. and J.-W. Choi, *Patterning conductive PDMS nanocomposite in an elastomer using microcontact printing*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2009. **19**(8): p. 085019.
18. Tandon, N., et al., *Optimization of electrical stimulation parameters for cardiac tissue engineering*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2011. **5**(6): p. e115-e125.
19. Merrill, D.R., M. Bikson, and J.G.R. Jefferys, *Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols*. *Journal of Neuroscience Methods*, 2005. **141**(2): p. 171-198.
20. Pavesi, A., et al., *How to embed three-dimensional flexible electrodes in microfluidic devices for cell culture applications*. *Lab Chip*, 2011. **11**(9): p. 1593.

ABSTRACT

Microfluidic devices for electric fields generation: fabrication and characterization process of tridimensional flexible electrodes for biological application

I. INTRODUCTION

Microfluidics is a set of techniques for manipulating fluids in systems having characteristic dimensions in the order of 10-100 μm . Many microfabrication technologies have been developed in order to realize this kind of devices. The most influential of these techniques is perhaps soft lithography, for molding elastomeric microchannels (for example in PDMS) using a microstructured master mold built with photolithography. Bonding of the PDMS layer on a substrate allows to obtain a microfluidic device [1].

Nowadays microfluidics represents a useful instrument for the analysis and manipulation of chemical and biological materials, in the field of biotechnology, pharmaceutical industry and bioengineering. The development of complex microfluidic instruments, in the field of tissue engineering and micro total analysis system (μTAS) demands the integration of numerous components on the same miniaturized device [2]. Among these, conductive components are of particular interest, because they support various application such as electrical stimulation of cells [3, 4], manipulation and classification of

biological materials (proteins, nucleotides and other biomolecules) through electrophoresis or electro-orientation [5], and building of biosensors, microheaters and micropumps [6].

Several methods for incorporating these structures in microfluidics devices have been proposed. The most common is the deposition of a thin metal pattern on a glass substrate, further aligned to a PDMS-based microfluidic device [7]. However this solution suffers from two major drawbacks: (i) metals poorly adhere to PDMS due to its low surface energy [8]; (ii) the electrodes are essentially planar, therefore a uniform distribution of the electric field in the fluid volumes can not be achieved. The generation of uniform electric fields is suitable for positioning and orientation of cells and biomolecules [9], and for cell stimulation purpose [10]. It can be achieved through 3D electrodes, vertically aligned with the microfluidic channels.

Vertical electrodes in the sidewall of rectangular microfluidic channels were obtained by means of techniques which proved to be expensive (multi-step optical lithography, electrodeposition of the metal layer by means of e-beam evaporation, su-

perposition of multiple layer of different materials, etc.) [11, 12]. Cost effective solutions to inject metal alloys in contact with the microchannels have been proposed recently [13]. These methods result limited as the metal alloys suffer from physical instability, which can lead to failure; in addition, the injection process is hard to control. Therefore, new methods for incorporating conductive structures in microfluidic devices are demanded.

In this work, a method to reliably obtain tridimensional (3D) flexible electrodes with vertical walls in a microfluidic device is presented. The electrodes consist of a composite of PDMS and conductive powder, and are inserted into a paradigmatic device, specifically designed to easily characterize the construction steps. The fabrication process is simple and cost effective because it requires a single photolithographic step. It is based on cofabrication, a strategy for fabricating multi-component microsystems in which all the components are formed in a single step. Specifically, two channel networks are realized: one to contain fluids and the other to contain the injectable electrodes. Contact between the two networks, originally kept separated by a thin PDMS wall, is achieved by means of a chemical etching process.

The electrical conductivity of the conductive materials was assessed, together with the dynamic behavior of the electrodes. Moreover, the effect of flexibility on the electrical behavior of the consti-

tutive material has been tested: this characteristic allows for the concomitant application of mechanical stimulations when demanded [14, 15]. Finally, a finite element model was set up in order to interpret the electrical behavior of the devices.

II. MATERIALS AND METHODS

The fluidic layout consisted of a simplified geometry, with a single fluidic region (300 μm wide and 5 mm long) connected to inlet and outlet channels (150 μm wide and 3 mm long). Laterally, two further channels (electrode channels) were designed so as to nearly intersect the cell fluidic channel, but kept separated from that by a 75 μm thick wall. The width of each electrode channel was set equal to 225 μm nearby the fluidic channel, and linearly increasing moving away from that, up to a final width of 800 μm . Height of each element is set to 75 μm .

Microfluidic devices were realized in PDMS by means of standard soft lithography techniques [2]. CAD design was used to produce the photomask; master molds were fabricated by replicating the photomask layouts with a patterned 75 μm thick layer of SU-8 50 (MicroChem Corp.) as photoresist. PDMS (Sylgard 184, Dow Corning Corp) was prepared by mixing prepolymer base solution and curing agent at a ratio of 10:1 (w/w). After degassing, PDMS was poured directly onto the master molds and cured in an oven at 70 $^{\circ}\text{C}$ for 2 hours. The PDMS was gently peeled from the mold, and the electrode ports were

ABSTRACT

punched with a 0,5 mm outer diameter puncher, while an 8 mm puncher was used to obtain input and output fluidic ports. After a 1 minute air plasma treatment (Harrick Plasma Inc), each device was permanently bonded to a histology glass slide.

Electrodes consist in a PDMS matrix filled with three different conductive powders, used alternatively: 10 μm silver flakes, 20 μm graphite particles or a mixture of graphite powder and multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) in a ratio of 3:1 (v/v). The electrically conductive mixture was prepared by adding the powder to PDMS in a ratio of respectively 4:1 (w/w), 2:3 (w/w), 2:7 (w/w) and mixing until uniform distribution was reached. The composite was then manually injected in the electrode channel, and allowed to cure at 150°C for 1 hour (fig. 1 a).

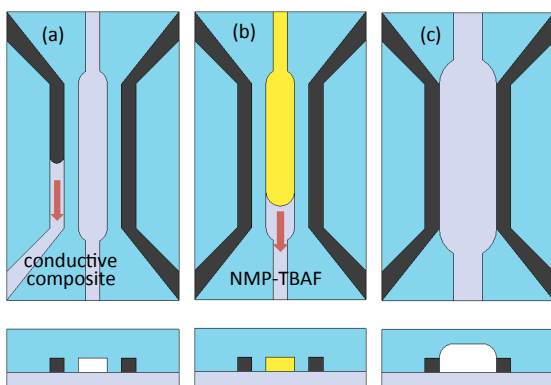


Fig. 1: embedding process of the electrodes. The composite is injected in the device (a) and the etchant solution is flowed in the channel (b) in order to bring in contact the electrodes with the fluidic channel (c).

Chemical etching of the wall was then performed to bring in contact the

electrodes to the culture chamber [4]. A PDMS etchant solution composed of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) and N-methylpyrrolidinone (NMP), in ratio 1:3 (w/w) [16], was allowed to flow in the fluidic channel by means of the hydrostatic pressure established between the inlet and the outlet ports of the channel (fig. 1 b). After 60 minutes, PDMS etchant completely dissolved the separation walls, and the channel was washed with pure NMP and ethanol (fig. 1 c). The chemical etching alters the geometry of the fluidic channel: fig. 2 shows the final width and height of the channel, depicting the cross section of the device before (top) and after (bottom) chemical etching.

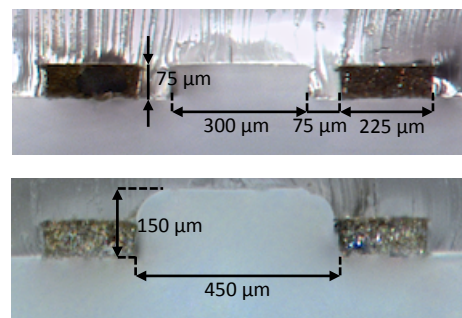


Fig. 2: cross section of the device before (top) and after (bottom) chemical etching. In this case, electrodes consist of PDMS and silver.

The electrical behavior of the conductive materials has been characterized. For this scope, specific devices were designed and fabricated in PDMS, consisting of independent and parallel straight channels (10 mm long, 200 mm wide and 150 mm high). Input and output ports were punched at each channel end, right before plasma bonding on a glass substrate; the

channel were then filled with the conductive composites as reported previously. Steel couplers were inserted in the device ports and used to achieve a physical connection with an external circuit. The circuit consists of a stimulus generator and a data acquisition system, and it serves to perform frequency electrical stimulation on the electrodes (from 1 Hz to 10 kHz) in order to construct the frequency response of the respective impedance. The prototype device was also characterized in this manner, after filling of the fluidic channel with PBS.

Electrical characterization under deformation allows to prove if the application of a mechanical stress can lead to an alteration of the electrical behavior of the conductive materials. Each material has been used to build up specimens, whose electrical resistance has been measured upon bending inward to angles of 90° , 180° , and twist for 180° .

Computational analysis have been performed in order to interpret the electrical behavior of the device. Comsol Multiphysics software has been used, by means of a time-stationary solver, to analyze the device with embedded silver or graphite+MWCNT electrodes. Final device geometry has been used to produce the model, and material properties have been defined starting from electrical characterization results. For analysis, a current stimulation, with intensity of 1 mA, has been simulated (fig. 3).

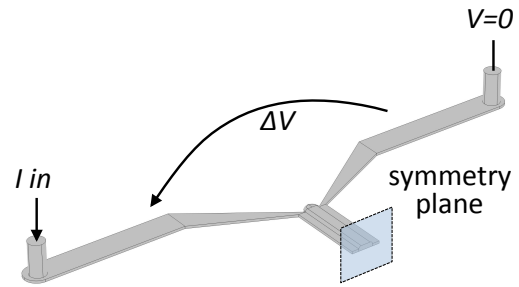


Fig. 3: computational model. Due to symmetry, only half of the device is considered.

Numerical study allowed the calculation of electrical potential, electric field line and electric current density distribution inside the device.

III. RESULTS AND DISCUSSION

The paradigmatic microfluidic device with embedded electrode is depicted in fig. 4.

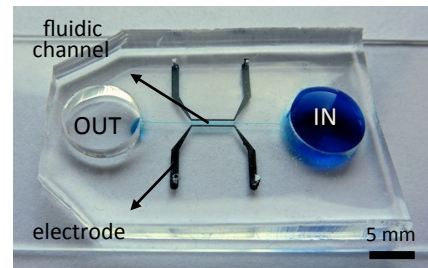


Fig. 4: device with graphite electrode. One of the inlet is filled with dye thus showing how fluid flows in the fluidic channel.

Fabrication process has demonstrated to be simple, rapid, and cost effective. It does not require further microfabrication steps other than photolithography, related to master mold realization. Moreover, all the techniques presented (microfabrication step, electrode injection, chemical etching) could be adapted to other applications, through modification

ABSTRACT

of electrodes or channel geometry thus leading to more complex configuration.

Measured electrical conductivity of the composites is reported in table 1.

COMPOSITE	$\sigma (=L/R \cdot A)$ [S/m]
PDMS/silver	$9,65 \pm 0,99 \cdot 10^5$
PDMS/graphite	$9,40 \pm 4,00$
PDMS/graphite+MWCNT	$13,34 \pm 2,55$

Table 1: electrical conductivity of composite materials, obtained from electrical characterization. Data represent mean \pm SD ($n = 3$).

The most conductive material is by far the composite of PDMS and silver, which conductivity is 5 orders of magnitude higher than the other materials.

Addition of carbon nanotubes to the composite of PDMS and graphite evidences that the use of two different size particulates increase the conductivity compared to the use of a single filler (indeed, for nanotube and PDMS alone, a conductivity not higher than 6 S/m is reported [17]).

Frequency characterization shows a general behavior alike a low-pass filter, with a cut frequency for the three conductive materials above 10 kHz. For the prototype device, frequency analysis evidenced a cut frequency of about 1 kHz. Signals commonly used for cellular stimulation purpose have a frequency content limited below 1 kHz [18]. Therefore, the device could be used for this kind of application. Silver electrode could not be used in contact with living biological components,

due to ionic release [19]. Electrodes made of graphite and nanotubes, on the other hand, represent a valid alternative to composed materials reported in literature: both the components are well known to be biocompatible, and the composite electrical conductivity is higher with respect to the considered Ag-free materials [8].

Electrical characterization of the specimens under deformation demonstrated that the materials can be deformed cyclically without causing cracking and the electrical resistance does not vary upon bending or twisting. This characteristic is important in order to realize flexible sensor [14] or for the concomitant application of electrical and mechanical stimulations in miniaturized cell culture systems [15].

Finite element analysis evidence that the electric field is uniform, along the channel's cross sections independently from the electrode materials, despite of geometric alteration of the fluidic channel due to chemical etching (fig. 5).

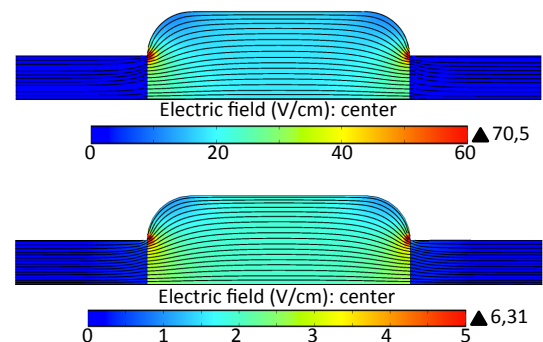


Fig. 5: electric field strength and electric field line in central cross section of the device with embedded silver electrode (top) or graphite+MWCNT electrodes (bottom).

Current density is verified to be uniform, with negligible variations, along the height of the channel for both the device considered. In the case of graphite+MWCNT, however, the higher resistivity of the electrode leads to a higher concentration of current at the edge of the channel (fig. 6).

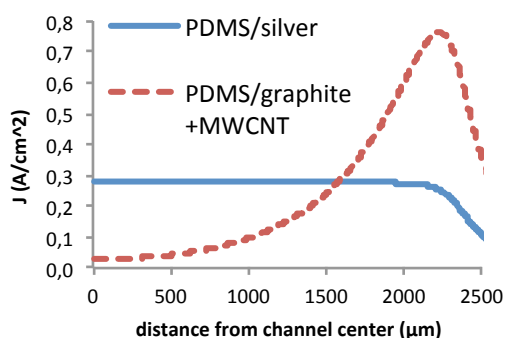


Fig. 6: current density along channel axis passing for its center. Only half of the device is considered.

The knowledge of these characteristic is very important in order to establish protocols for the electrical stimulation of cells and tissue [10] or for the manipulation of biological material [12].

IV. CONCLUSIONS AND FUTURE DEVELOPMENTS

In this work a simple and cost effective technique to realize microfluidic devices with embedded 3D flexible electrode in contact with fluidic channels, thus generating uniform electric field in the fluid volumes, is reported.

Thanks to the modularity of fabrication process, these devices represent an economic and versatile platform for future microfluidic and biological research.

Moreover, characterized materials could be used in various fields of micro-fabrication demanding for conductive and flexible elements, due to intrinsically ease of bonding into PDMS-based devices [6].

Devices with electrodes made of PDMS and graphite+MWCNT could be used for electrical stimulation of cells and tissues. Devices with silver electrodes, thanks to favorable electric properties, could be used for various purposes in biological research (electrophoresis and dielectrophoresis, electrofusion, construction of deformable electrochemical sensor, etc.) [5, 12].

Future development, in the field of tissue engineering, would focus on culture and electrical stimulation of cardiomyocytes, carrying on the study started by Pavesi et al. [20].

BIBLIOGRAPHY

1. Ng, J.M.K., et al., *Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(20): p. 3461-3473.
2. Whitesides, G.M., et al., *Soft Lithography In Biology And Biochemistry*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2001. **3**(1): p. 335-373.
3. Ghafar-Zadeh, E., J.R. Waldeisen, and L.P. Lee, *Engineered approaches to the stem cell microenvironment for cardiac tissue regeneration*. *Lab Chip*, 2011. **11**(18): p. 3031-48.
4. Burdick, J.A. and G. Vunjak-Novakovic, *Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation*. *Tissue engineering. Part A*, 2009. **15**(2): p. 205-19.
5. Markx, G.H., *The use of electric fields in tissue engineering*. *Organogenesis*, 2008. **4**(1): p. 11-17.

ABSTRACT

6. Gong, X. and W. Wen, *Polydimethylsiloxane-based conducting composites and their applications in microfluidic chip fabrication*. *Biomicrofluidics*, 2009. **3**(1): p. 12007.
7. Tandon, N., et al., *Surface-patterned electrode bioreactor for electrical stimulation*. *Lab Chip*, 2010. **10**(6): p. 692.
8. Niu, X.Z., et al., *Characterizing and Patterning of PDMS-Based Conducting Composites*. *Advanced Materials*, 2007. **19**(18): p. 2682-2686.
9. Wang, L., et al., *Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry*. *Lab Chip*, 2007. **7**(9): p. 1114-1120.
10. Barash, Y., et al., *Electric field stimulation integrated into perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010. **16**(6): p. 1417-1426.
11. Choi, J.W., et al., *3-dimensional electrode patterning within a microfluidic channel using metal ion implantation*. *Lab Chip*, 2010. **10**(6): p. 783-8.
12. Wang, L., L.A. Flanagan, and A.P. Lee, *Side-wall vertical electrodes for lateral field microfluidic applications*. Vol. 16. 2007, New York, NY, ETATS-UNIS: Institute of Electrical and Electronics Engineers. 8.
13. So, J.H. and M.D. Dickey, *Inherently aligned microfluidic electrodes composed of liquid metal*. *Lab Chip*, 2011. **11**(5): p. 905-11.
14. Wu, W.-Y., et al., *Flexible PDMS-based three-electrode sensor*. *Electrochemistry Communications*, 2010. **12**(11): p. 1600-1604.
15. Wang, J.H.C. and B.P. Thampatty, *An Introductory Review of Cell Mechanobiology*. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2006. **5**(1): p. 1-16.
16. Takayama, S., et al., *Topographical Micropatterning of Poly(dimethylsiloxane) Using Laminar Flows of Liquids in Capillaries*. *Advanced Materials*, 2001. **13**(8): p. 570-574.
17. Liu, C.-X. and J.-W. Choi, *Patterning conductive PDMS nanocomposite in an elastomer using microcontact printing*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2009. **19**(8): p. 085019.
18. Tandon, N., et al., *Optimization of electrical stimulation parameters for cardiac tissue engineering*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2011. **5**(6): p. e115-e125.
19. Merrill, D.R., M. Bikson, and J.G.R. Jefferys, *Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols*. *Journal of Neuroscience Methods*, 2005. **141**(2): p. 171-198.
20. Pavesi, A., et al., *How to embed three-dimensional flexible electrodes in microfluidic devices for cell culture applications*. *Lab Chip*, 2011. **11**(9): p. 1593.

1. INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE

In questo capitolo è introdotta la disciplina che va sotto il nome di microfluidica e ne vengono descritti i più comuni metodi di fabbricazione. Sono descritte le principali applicazioni della microfluidica, con particolare riferimento alla manipolazione di materiale biologico, all'ingegneria dei tessuti e all'utilizzo di campi elettrici alla microscala. Viene riportata una selezione dei metodi presenti in letteratura per la realizzazione di componenti conduttivi all'interno di dispositivi microfluidici. In particolare è descritto l'utilizzo dei materiali compositi, basati su matrici polimeriche e particolati conduttivi, per la fabbricazione di elettrodi.

1.1 PRINCIPI DI MICROFLUIDICA

La possibilità di realizzare dispositivi e strutture miniaturizzati è un aspetto molto importante nelle moderne scienze e tecnologie. Nel campo della microelettronica, lo sviluppo della fotolitografia ha permesso la realizzazione dei circuiti integrati, e grazie al successivo sviluppo di questa tecnica sono nati i sistemi microelettromeccanici (MEMS). I vantaggi rappresentati da queste tecnologie rispetto ai metodi di lavorazione tradizionali sono molti: possibilità di realizzare più componenti sullo stesso dispositivo, diminuzione degli ingombri, minori consumi energetici e in generale migliori performance degli strumenti [1].

La microfluidica è stata inizialmente elaborata per trasferire gli stessi metodi e gli stessi benefici delle tecnologie sviluppate per la microelettronica negli ambiti chimico e biologico, con la possibilità di realizzare dispositivi miniaturizzati e facili da maneggiare su cui operare più esperimenti in parallelo, in modo rapido ed economico, con un consumo ridotto di campioni e reagenti e con elevate risoluzione e sensibilità [2]. La microfluidica costituisce infatti un insieme di conoscenze scientifiche e tecnologiche utilizzate per manipolare e trattare piccole quantità di fluido (nell'ordine dei 10^{-9} litri) alla microscala, utilizzando cioè canali e altre strutture

con dimensioni caratteristiche comprese tra le decine e le centinaia di micrometri [3]. I dispositivi microfluidici sono chiamati anche lab-on-chip.

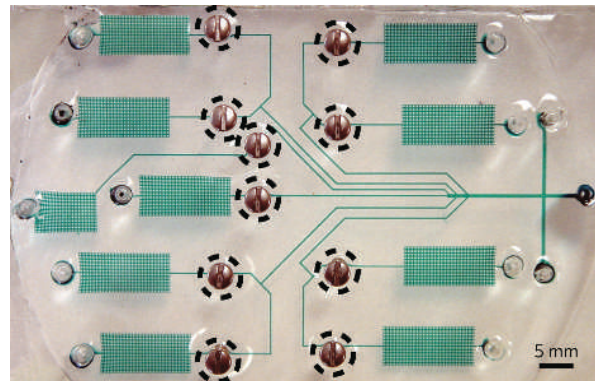


Fig. 1.1: esempio di dispositivo microfluidico utilizzato per analisi immunologiche. Le strutture cerchiato sono valvole che permettono di movimentare il fluido (in verde) all'interno dei canali.

Adattata da Weibel et al. [4].

Per poter lavorare con la microfluidica, è innanzitutto necessario comprendere i fenomeni fisici che dominano alla microscala, dove forze diverse diventano preponderanti rispetto a quelle sperimentate alla scale di grandezza superiori. Ad esempio, alla microscala diventa prevalente l'importanza relativa delle forze di superficie rispetto a quelle di volume. Anche i fenomeni diffusivi acquisiscono rilevanza su quelli convettivi, così come diventa significativo il ruolo della tensione superficiale [5, 6].

Una delle principali caratteristiche dei fluidi che scorrono in canali micrometrici è la laminarità del moto. Si definisce laminare (o irrotazionale) il moto di un fluido i cui filetti – dove per filetti fluidi si intendono le linee di corrente percorse da infinitesime particelle fluide – scorrono paralleli tra di loro. Alla macroscala generalmente i fenomeni inerziali sono dominanti su quelli viscosi, e il moto delle singole particelle è una funzione casuale del tempo. Ciò significa che due o più fluidi che scorrono nello stesso condotto si mischiano in modo convettivo e disordinato, dando origine a un moto di tipo turbolento. Nei sistemi miniaturizzati, dominati dalla laminarità, vale l'opposto: i filetti fluidi scorrono parallelamente l'uno all'altro, e non si mischiano se non per i fenomeni diffusivi all'interfaccia tra i liquidi. Questa caratteristica offre diversi vantaggi ed è stata sfruttata per varie ap-

1. INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE

plicazioni, tra cui la separazione di particelle in base alle dimensioni e la movimentazione controllata di pacchetti fluidi differenti [3, 5, 7].

Un indice utile per determinare se il moto di un fluido è laminare o turbolento è il numero di Reynolds. Questo parametro adimensionale descrive il regime di moto di un fluido, ed è pari al rapporto tra le forze inerziali (che quantificano la tendenza all'instaurarsi di moti disordinati all'interno di una massa fluida) e quelle viscosse (che quantificano la tendenza allo scorrimento ordinato del fluido) agenti su una particella fluida che si muove all'interno dello stesso fluido.

$$\text{Re} = \frac{F_i}{F_v} \quad (1.1)$$

Si consideri una velocità caratteristica del fluido considerata costante pari a U , una lunghezza caratteristica del sistema pari a L . La forza inerziale è quindi proporzionale a (detta ρ la densità del fluido):

$$F_i \propto \rho U^2 \quad (1.2)$$

Mentre quella viscosa è proporzionale a (detta μ la viscosità dinamica del fluido):

$$F_v \propto \mu \frac{U}{L} \quad (1.3)$$

Sostituendo le espressioni delle forze nell'equazione generale del numero di Reynolds (eq. 1.1) si ottiene quindi [8]:

$$\text{Re} = \frac{\rho U^2}{\mu U/L} = \frac{\rho U L}{\mu} \quad (1.4)$$

Nel caso specifico di un fluido in moto all'interno di un condotto, si assume per U la velocità media del fluido nella sezione del condotto, e per L il diametro idraulico del condotto. Numeri di Reynolds inferiori a 2100 identificano generalmente regimi di moto laminari, mentre per numeri di Reynolds superiori a 4000 si ha un moto turbolento. Quando il parametro è compreso tra 2100 e 4000 si ha un moto detto di transizione [9].

Per un generico canale microfluidico con $L = 50 \mu\text{m}$, all'interno le quale scorre dell'acqua (con $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ e $\mu = 0,01 \text{ g/(cm}\cdot\text{s)}$), il regime di moto è laminare per velocità inferiori alle decine di m/s. La velocità caratteristica in un dispositivo microfluidico è generalmente inferiore a 1 cm/s , e si è quindi sufficientemente certi di operare in regime di moto laminare [5, 10].

1.2 FABBRICAZIONE DI DISPOSITIVI MICROFLUIDICI

La progettazione e lo sviluppo di un sistema microfluidico devono tenere conto del materiale utilizzato per fabbricare il dispositivo. Questo deve essere compatibile con i metodi di analisi impiegati, permettere l'utilizzo di metodi di microfabbricazione e l'integrazione di componenti funzionali tra cui sistemi di attuazione e pompaggio, valvole e sistemi di miscelazione dei fluidi. I primi dispositivi microfluidici erano costruiti utilizzando silicio e vetro per poter sfruttare le metodologie sviluppate nell'ambito della microelettronica, e impiegavano la fotolitografia come procedura di realizzazione.

Nonostante questa tecnologia offra il vantaggio di poter realizzare strutture miniaturizzate, essa presenta dei limiti per quanto riguarda i settori della ricerca farmaceutica e delle biotecnologie. Infatti essa permette un controllo limitato delle proprietà superficiali dei dispositivi realizzati, e in generale i materiali utilizzati non permettono di costruire strumenti adatti all'utilizzo con cellule, proteine e altro materiale biologico. Inoltre, la tecnologia è di per sé inaccessibile per molti laboratori di biologia e farmacologia in quanto richiede l'utilizzo di macchinari molto costosi e di competenze specifiche [11].

1.2.1 SOFT LITHOGRAPHY

Il principale contributo allo sviluppo della microfluidica è stato l'introduzione, da parte del gruppo di Whitesides (ritenuto il fondatore di questa disciplina) di un insieme di tecnologie che vanno sotto il nome di soft-lithography, mutate dall'ambito della microelettronica (tecniche fotolitografie). La soft-lithography permette, a partire da uno stampo in rilievo, di riprodurre strutture micrometriche e na-

nometriche su un materiale elastomerico, basandosi su diverse tecnologie, delle quali la principale è quella di replica molding.

Tutte le tecniche di soft-lithography sfruttano come elemento centrale un substrato di materiale plastico elastomerico (ad esempio il PDMS, un polimero che verrà descritto nel par. 1.2.2) contenente una struttura micrometrica in bassorilievo, realizzato a partire da un master, utilizzato come stampo. Questo master è fabbricato impiegando la tecnica fotolitografia già sviluppata nell'ambito della microelettronica o una delle diverse tecniche di prototipazione rapida che permettono di lavorare materiali plastici da utilizzare come stampo (che saranno descritte più avanti). In seguito è possibile utilizzare il dispositivo elastomerico ottenuto a partire dal master mold per realizzare differenti strutture alla microscala. La fig. 2 riporta una schematizzazione del processo di realizzazione di un dispositivo in PDMS mediante soft-lithography [12, 13].

Per prima cosa, basandosi sulle specifiche di progetto, si realizza il modello del dispositivo tramite software CAD (Computer Aided Design). Il modello costituisce un layer che viene stampato ad altissima risoluzione su pellicole trasparenti, utilizzate come fotomaschere nei passaggi successivi. La risoluzione laterale massima che si può ottenere mediante questa tecnica dipende dal tipo di maschera utilizzato. Per maschere stampate su fogli di acetato, la risoluzione massima è di circa 8 μm [14]. Successivamente, su un wafer di silicio viene depositato uno strato di fotoresist (in genere SU-8, una resina epossidica fotosensibile utilizzata come fotoresist negativo) attraverso la tecnica dello spin coating. Questa tecnica consente di controllare lo spessore dello strato di resina depositata, che viene esposta a raggi ultravioletti, filtrati attraverso la fotomaschera creata in precedenza (e generalmente posta in contatto con il fotoresist). Le parti non mascherate durante l'esposizione polimerizzano nel caso si utilizzi un fotoresist di tipo negativo; nel caso opposto, ovvero qualora a polimerizzare siano le superfici non mascherate, si parla di fotoresist positivo (ad esempio AZ 9260). Si genera in questo modo una geometria microstrutturata identica a quella riportata sulla fotomaschera. Le aree non esposte – e dunque non polimerizzate – vengono rimosse mediante l'utilizzo di un solvente organico.

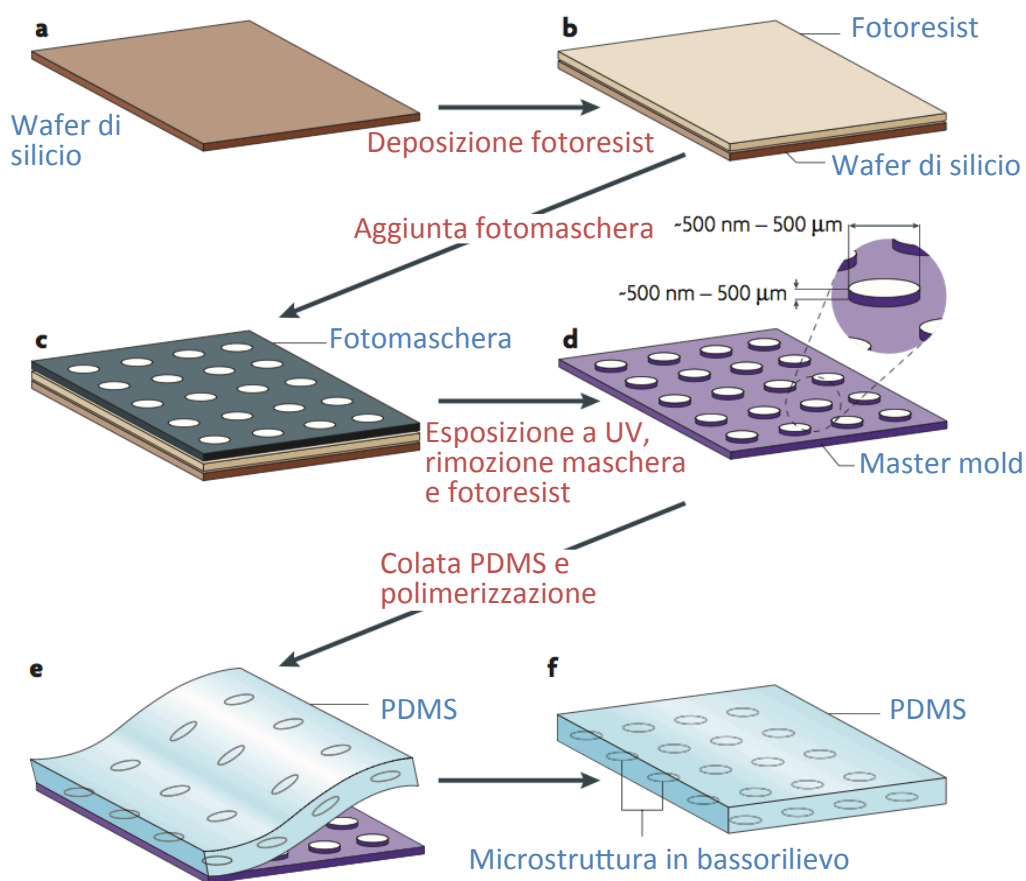


Fig. 1.2: procedura di fabbricazione di un substrato di PDMS microstrutturato tramite soft-lithography. Il fotoresist viene depositato su un wafer di silicio (a, b). La maschera è posta a contatto con il fotoresist (c), il cui sviluppo per mezzo dell'esposizione a raggi UV e la rimozione del materiale non polimerizzato permettono di ottenere il master mold (d). Il PDMS viene colato sul master e fatto reticolare (e) per ottenere un substrato microstrutturato (f).

Adattata da Weibel et al. [12].

L'altezza della struttura polimerica realizzata è determinata dallo spessore dello strato di fotoresist depositato sulla superficie del wafer (nell'ordine delle decine di micron), mentre la maschera controlla la geometria e le dimensioni del motivo micrometrico. Al termine di questo processo si ottiene il cosiddetto master mold, lo stampo da cui verranno ottenute le copie del chip da produrre [15].

Lo step finale consiste nella modellazione di un pre-polimero (generalmente PDMS) attraverso il master mold, in modo da ottenere una copia negativa del master. In questo processo, definito replica molding, il pre-polimero viene depositato sul master mold e scaldato, così da favorirne la polimerizzazione. Il master e la ba-

se in silicio, a questo punto, vengono rimossi, e il motivo micrometrico presente sul master viene riprodotto in maniera fedele anche sul polimero.

Una volta realizzato il master mold tramite fotolitografia, l'ottenimento di copie in materiale polimerico attraverso replica molding è un processo rapido e a singolo-step, che permette di realizzare dispositivi completi in poco tempo. Il principale vantaggio rispetto ad altre tecniche è che il processo non richiede l'utilizzo di una camera bianca o altre costose apparecchiature, e permette di riprodurre strutture con dimensioni caratteristiche di 20–100 μm [13].

Inoltre, sfruttando vari metodi di fabbricazione a prototipazione rapida, la soft-lithography consente di passare dalla fase di progettazione a quella di realizzazione e collaudo in tempi più brevi rispetto a quanto consentito dall'utilizzo della fotolitografia. Infatti, per costruire il master mold (fig. 1.2 f) è possibile, ad esempio, utilizzare tecniche di lavorazione alle macchine utensili, la tecnologia dell'ablazione laser o l'utilizzo di vari metodi per lo stampaggio di materiali polimerici. Si generano in questo modo topografie superficiali micrometriche su materiali plastici (ad esempio polimetilmetacrilato (PMMA)) la cui replica elastomerica può essere utilizzata per la realizzazione di dispositivi microfluidici. L'elevata definizione laterale e la complessità delle strutture ottenibili rende comunque la fotolitografia fondamentale per costruire i master mold per applicazioni avanzate [16].

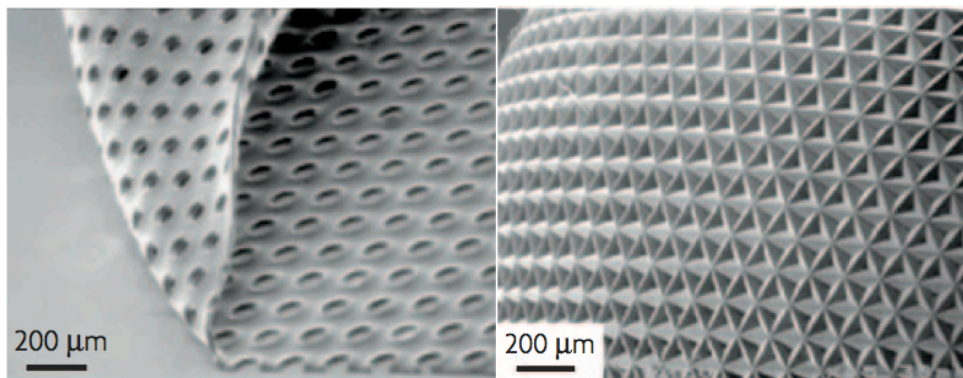


Fig 1.3: esempio di superficie microstrutturata di PDMS tramite soft-lithography. Adattate da Ostuni et al. [17] (sx) e da Xia et al. [1] (dx).

Esistono altre tecniche di soft-lithography, che a partire dalla realizzazione di uno stampo in materiale polimerico permettono di realizzare strutture micrometriche o funzionalizzare superfici alla microscala. Le principali sono [12]:

- i. microcontact printing, che permette di trasferire una configurazione di proteine o altre biomolecole su un substrato utilizzando la superficie microstrutturata del dispositivo in PDMS come fosse un timbro;
- ii. micromolding in capillaries, grazie alla quale è possibile realizzare reticoli polimerici iniettando il prepolimero all'interno di canali in PDMS a contatto con una superficie;
- iii. microtransfer molding, che consente di generare una struttura polimerica su di un substrato in PDMS e trasferirla poi su una superficie, dove avviene la reticolazione .

1.2.2 PDMS: CARATTERISTICHE E PROPRIETÀ

L'utilizzo dei polimeri introduce dei vantaggi rispetto ai materiali tradizionalmente impiegati dalla fotolitografia (vetro e silicio): minori costi di produzione, tecniche di fabbricazione più veloci e semplici (per stampaggio e impressione), differenti proprietà fisico-chimiche a disposizione. Tecniche di fabbricazione più rapide ed economiche permettono inoltre la produzione di dispositivi monouso.

Il polimero più utilizzato nelle applicazioni microfluidiche, in particolare quelle in ambito farmaceutico e biologico, è una gomma elastomerica, il polidimetilsilossano (PDMS). Tra i suoi principali aspetti di interesse: è otticamente trasparente; reticola a basse temperature (persino a temperatura ambiente, anche se temperature più elevate accelerano il processo di reticolazione); è biocompatibile e permeabile all'ossigeno; è un isolante elettrico e termico; possiede una bassa energia superficiale ed è impermeabile ai composti polari (quali ad esempio l'acqua); possiede caratteristiche meccaniche di elevata flessibilità e quindi può essere deformato in maniera reversibile; può essere fissato irreversibilmente a se stesso o ad altri materiali in seguito ad esposizione a plasma per la formazione di legami covalenti; è possibile modificarne le proprietà chimiche superficiali; è un materiale poco costoso [18, 19].

La struttura chimica del PDMS consiste nella ripetizione di unità – $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$ – in cui i gruppi metilici – CH_3 contribuiscono a rendere il polimero idrofobico [20]. Questa idrofobicità è responsabile della bassa bagnabilità in presenza di solventi acquosi, del fatto che la superficie dei dispositivi realizzati con

1. INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE

questo materiale risulta incline all'adsorbimento non specifico di proteine e cellule, e che i microcanali costruiti in PDMS tendono ad intrappolare le bolle d'aria eventualmente presenti nel liquido al loro interno.

Il PDMS può essere sigillato a se stesso o a materiali a base di silicio (vetro, wafer di silicio) in maniera reversibile o irreversibile. Un incollaggio reversibile a tenuta idraulica può essere ottenuto sovrapponendo le due strutture per l'instaurarsi di interazioni deboli di van der Waals. Per ottenere un fissaggio irreversibile (fig. 1.4), le superfici da far aderire vengono pretrattate con un'esposizione al plasma (aria o ossigeno). Questo trattamento genera sulla superficie del PDMS gruppi silanologici (Si-OH) a partire dall'ossidazione dei gruppi metilici; esponendo al plasma le superfici che si vogliono unire, si possono incollare al PDMS diversi materiali, tra cui ad esempio il PDMS, vetro, silicio, polistirene e polietilene. Il processo di sigillatura è semplice e riproducibile, ma deve essere eseguito rapidamente dopo l'ossidazione. La superficie esposta al plasma, infatti, rimane idrofilica indefinitamente se posta in contatto con una soluzione acquosa o con solventi polari, mentre in aria il riarrangiamento chimico riporta rapidamente in superficie i gruppi idrofobici, abbassando così l'energia libera superficiale. Le superfici da unire, inoltre, devono essere pulite e asciutte affinché il processo di sigillatura avvenga con successo. [20]

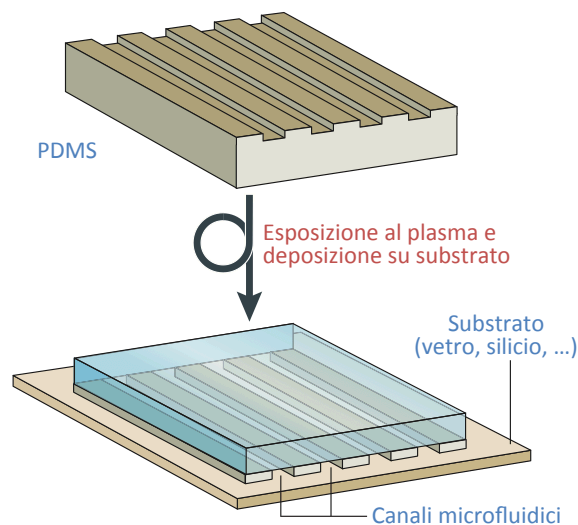


Fig. 1.4: fissaggio irreversibile di una struttura in PDMS a un substrato per ottenere un dispositivo microfluidico. Adattata da Weibel et al. [12].

La possibilità di far aderire diversi strati di PDMS tra loro o ad altri materiali permette di realizzare strutture multistrato, fondamentali per la realizzazione di elementi quali valvole o pompe e utilizzati come metodo tradizionale per integrare elettrodi metallici in dispositivi microfluidici (cfr. 1.4.2) [21]. Per poter ottenere queste strutture sovrapposte è necessario allineare tra loro i diversi componenti (substrati di PDMS o di altro materiale) in maniera precisa per garantire il contatto tra le diverse strutture micrometriche presenti sui vari strati.

1.3 APPLICAZIONI DELLA MICROFLUIDICA

L'utilizzo del PDMS per la realizzazione di dispositivi microfluidici ha trovato applicazione in numerosi ambiti della biologia, della bioingegneria e nell'industria farmaceutica. Alcune delle principali applicazioni sono la separazione di cellule, proteine, segmenti di DNA e altre biomolecole; l'utilizzo per test di genomica e proteomica; l'utilizzo per analisi e rilevamenti ambientali; la realizzazione di sistemi per il rilascio di farmaci; la creazione di strutture di materiale biologico (tra cui cellule e proteine) su substrati miniaturizzati; la realizzazione di strumenti per analisi biochimiche e immunologiche complesse; la coltura e la stimolazione di costrutti cellulari [18].

1.3.1 APPLICAZIONI PER L'INGEGNERIA DEI TESSUTI

Un ambito per il quale la microfluidica ha offerto e continua a offrire la possibilità di sviluppare soluzioni innovative è quello dell'ingegneria dei tessuti. Questa disciplina mette a punto strategie per ripristinare, mantenere o migliorare la funzionalità dei tessuti biologici *in vitro* o *in vivo* [22]. È noto che il comportamento delle cellule è regolato dal microambiente in cui esse vivono, proliferano ed esprimono il loro fenotipo.

Le cellule risiedono in un ambiente composto di fattori in soluzione, interazioni cellula-ECM (matrice extracellulare) e contatti cellula-cellula; inoltre esso è caratterizzato da specifiche proprietà fisico-chimiche (pH, tensione parziale dell'ossigeno, temperatura, osmolarità). Tutti questi elementi conferiscono all'ambiente cellulare distinte caratteristiche fisiologiche, e forniscono un insieme di se-

1. INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE

gnali che tutti insieme concorrono a regolare la struttura, la funzione e il comportamento delle cellule. L'insieme di questi fattori biochimici, fisici e fisico-chimici costituisce il cosiddetto microambiente cellulare (fig. 1.5) [22, 23].

Le caratteristiche del substrato su cui le cellule si trovano ad aderire e i segnali che ad esse vengono forniti, sia di tipo fisico (stimoli meccanici, elettrici, termici) che di tipo biochimico (presenza di biomolecole e vari fattori solubili) o fisico-chimico (osmolarità, gradienti di concentrazione di particolari soluti, pH), ne determinano l'adesione, l'organizzazione e il differenziamento. La natura di questo insieme di fattori influenza quindi la crescita, lo sviluppo e il rimodellamento del tessuto di cui i diversi tipi cellulari fanno parte.

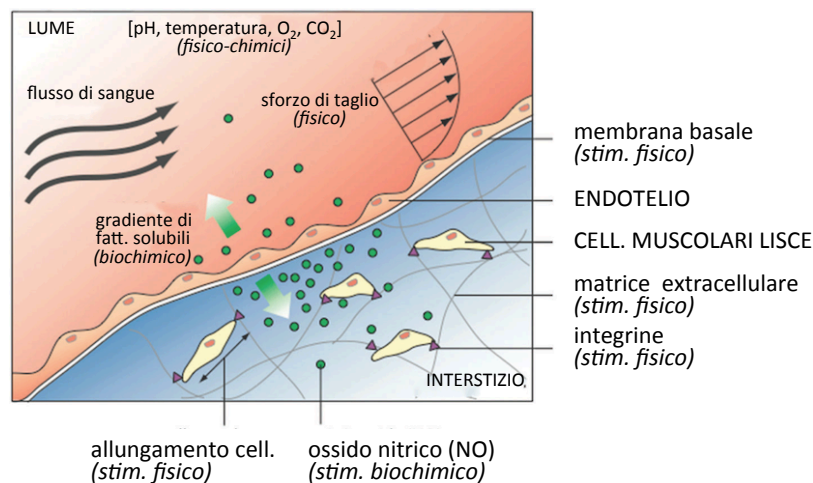


Fig. 1.5: rappresentazione schematica della complessa struttura dell'ECM e delle interazioni tra la cellula e i componenti dell'ambiente extracellulare. Questo consiste nell'insieme di fattori fisici, biochimici e fisioco-chimici che influenzano il comportamento di cellule e tessuti.

Adattata da Young et al. [23].

Lo scarso controllo che è possibile esercitare sulle variabili fisiche nei tradizionali sistemi di coltura impedisce la valutazione della risposta cellulare a stimoli di carattere meccanico ed elettrico. Alla microscala, invece, i fenomeni fisici che determinano il comportamento cellulare risultano maggiormente controllabili e riproducibili, ed è possibile confrontare esperimenti simultanei che investigano ciascuno una differente condizione. Per questo motivo, i sistemi di coltura tradizionali di cellule e tessuti in 2D sono stati talvolta sostituiti da strutture il cui scopo è quello di riprodurre più fedelmente l'ambiente fisiologico tridimensionale.

L'utilizzo delle microtecnologie, e in particolare della microfluidica, rappresenta un valido contributo nella comprensione dei fenomeni che influenzano la rigenerazione tissutale. Le tecnologie di microfabbricazione permettono di influenzare l'ambiente cellulare in modo preciso e riproducibile, e permettono di integrare i sistemi di coltura con strumenti di analisi che valutano i processi biochimici che governano il comportamento delle cellule. I dispositivi elastomerici fabbricati tramite soft-litography sono facili da realizzare e compatibili con la maggior parte delle analisi cellulari. Per questo vengono sempre più utilizzati nelle applicazioni biomediche per realizzare materiali ingegnerizzati che permettono di sfruttare i vantaggi dei fenomeni alla microscala – quali la laminarità, del moto dei fluidi e la possibilità di diminuire il valore dei potenziali elettrici utilizzati per la stimolazione cellulare [22, 24].

Il flusso laminare è sfruttato in microfluidica per stimolare meccanicamente i costrutti cellulari e per il rilascio e la rimozione di biomolecole solubili nell'ambiente extracellulare. Un canale di sezione rettangolare può essere utilizzato per stimolare le cellule che aderiscono alla sua base con uno sforzo di taglio. Grazie alla miniaturizzazione dell'ambiente di coltura è possibile controllare l'applicazione di questo stimolo, per riprodurre *in vitro* le forze sperimentate da cellule e tessuti *in vivo*. Inoltre, sfruttando l'immiscibilità dei filetti fluidi in moto laminare e il trasporto di massa, è possibile generare gradienti di concentrazione di varie specie chimiche che influenzano l'allineamento, la morfogenesi, la proliferazione e il differenziamento cellulari [25, 26].

Le microtecnologie permettono quindi di valutare i fenomeni fisici che stanno alla base di numerosi fenomeni cellulari, e senza l'elevato grado di controllo che queste permettono non sarebbe possibile investigare in modo approfondito l'influenza della stimolazione idrodinamica ed elettrica nella rigenerazione dei tessuti.

1.3.1.1 Utilizzo dei campi elettrici in ingegneria dei tessuti

L'utilizzo di campi elettrici per generare una risposta attiva da parte delle cellule riveste grande importanza nell'ingegneria dei tessuti. È noto che in vivo i fenomeni elettrici determinano la migrazione cellulare, e la presenza di gradienti elettrici durante lo sviluppo e la rigenerazione dei tessuti è ben documentata [27].

1. INTRODUZIONE E STATO DELL'ARTE

Lo studio dei meccanismi di risposta cellulare a questi stimoli endogeni è quindi importante per lo sviluppo di applicazioni cliniche che sfruttino i campi elettrici per la riparazione dei tessuti danneggiati. In particolare essi possono essere utilizzati per influenzare l'allineamento cellulare, la chemiotassi, l'angiogenesi, l'organizzazione morfologica di vari tessuti (ad esempio il tessuto epiteliale), la stimolazione neurale e il differenziamento delle cellule staminali verso particolari fenotipi [28-30].

Rappresentativo in questo ambito è il lavoro svolto da Tandon et al. per l'ingegnerizzazione del tessuto cardiaco (fig. 1.6) [31]. Il sistema di stimolazione sviluppato da questo gruppo utilizza campi elettrici pulsanti, che imitano quelli presenti *in vivo*, per generare costrutti cardiaci contrattili con caratteristiche del tessuto nativo quali l'allineamento cellulare e l'organizzazione ultrastrutturale. La loro ricerca si orienta ora verso l'ottimizzazione dei parametri elettrici per lo sviluppo dei tessuti e il tentativo di comprendere il meccanismo attraverso il quale questi parametri influenzano il comportamento cellulare [32]. Uno dei loro principali obiettivi consiste nel miniaturizzare l'ambiente di coltura così da poter controllare meglio la stimolazione elettrica dei costrutti e valutare più approfonditamente la risposta cellulare [33].

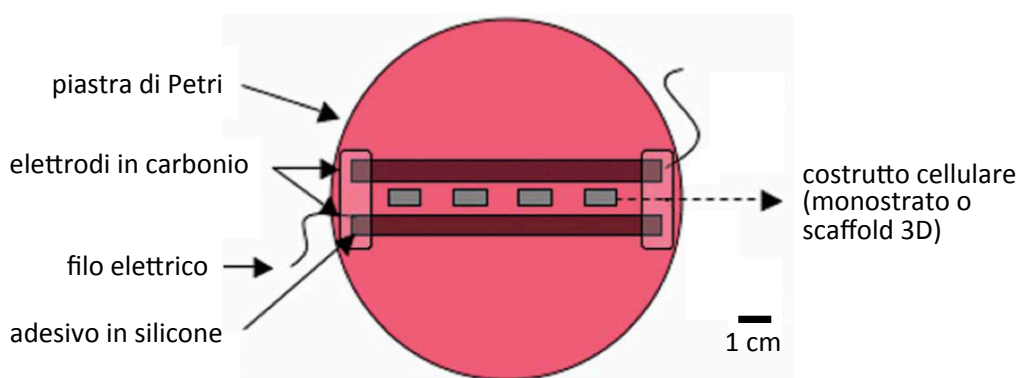


Fig.1.6 : set-up sperimentale per l'applicazione di stimoli elettrici ai costrutti cardiaci.
Adattata da Tandon et al. [31].

Altre applicazioni dei campi elettrici in ambito biologico includono l'orientazione, la migrazione e l'allungamento delle cellule indotti dalla presenza di campi elettrici [34]. Inoltre, l'applicazione di impulsi elettrici di breve durata e ampiezza adeguata può indurre la formazione temporanea di piccoli pori nelle membrane di

cellule e liposomi, fenomeno noto col nome di elettroporazione. Questo permette di fondere tra loro due diverse cellule per generarne una terza con caratteristiche ibride: la tecnica, chiamata elettrofusione, è di importanza crescente nell'ambito delle biotecnologie [35, 36].

1.3.2 DISPOSITIVI PER ANALISI BIOLOGICHE

Dispositivi miniaturizzati su cui è possibile eseguire esperimenti avanzati – come ad esempio la reazione a catena della polimerasi (PCR, che permette di amplificare frazioni di materiale genetico), l'elettroforesi capillare (CE, che permette la separazione di diverse cellule o biomolecole in base al bilanciamento tra forze di massa e forze coulombiane), il sequenziamento di frazioni del genoma, la coltura e la stimolazione di costrutti cellulari o altre analisi biochimiche e cellulari – sono classificati come micro total analysis systems (μ TAS).

Questi dispositivi microfluidici integrati permettono di eseguire più analisi in parallelo, in maniera rapida e riproducibile su piccoli volumi di campione, eliminando la necessità di ricorrere a procedure laboriose e costose. Grazie al livello di automazione reso possibile da questi strumenti, si limitano le potenziali cause di errore introdotte dalla manipolazione dei campioni da parte degli operatori. Inoltre, oltre a permettere una diminuzione dei costi e del consumo energetico, l'elevato grado di miniaturizzazione consente di aumentare il livello di portabilità degli strumenti di analisi per applicazioni *point-of-care* altrimenti possibili solo all'interno di laboratori [13, 24].

Perché un sistema μ TAS possa definirsi completo bisogna che si svolgano al suo interno tutte le fasi richieste dall'analisi, tra cui concentrazione delle cellule presenti nel campione, reazione di lisi per il rilascio degli acidi nucleici, separazione del DNA dal resto dei componenti biologici, amplificazione del DNA e suo sequenziamento, quantificazione del materiale ottenuto. Per fabbricare sistemi così complessi è necessario realizzare strutture funzionali che siano integrabili tra loro all'interno di dispositivi miniaturizzati: attuatori (pompe e valvole), sensori elettrochimici, connettori, miscelatori, unità di separazione, elementi conduttivi ed elettrodi, generatori di calore e sensori di temperatura [13, 21, 37].

1.4 MATERIALI ELETTRICAMENTE CONDUTTIVI IN MICROFLUIDICA

La realizzazione di sistemi microfluidici che integrano componenti complessi come negli esempi visti sopra non può prescindere dalla presenza di elementi conduttivi all'interno dei dispositivi. La conduzione del segnale elettrico viene sfruttata per il controllo e il rilevamento di segnali elettrici nel caso dei biosensori, per fornire energia ai sistemi di attuazione (micropompe e microvalvole), per generare calore nel caso di microriscaldatori, per iniettare corrente in cellule e tessuti nel caso di elettrodi di stimolazione, per trasportare e separare particelle, ecc [37, 38].

1.4.1 UTILIZZO DEI MATERIALI CONDUTTIVI IN MICROFLUIDICA

Le applicazioni degli elettrodi all'interno dei dispositivi microfluidici, nell'ambito della manipolazione di componenti biologici (cellule, proteine, frammenti di DNA e altre biomolecole), sono la movimentazione dei fluidi attraverso l'elettroosmosi [39]; la separazione e il posizionamento di particelle attraverso l'elettroforesi (fig. 1.7 a), l'elettro-orientazione, l'elettro-rotazione e la dielettroforesi (DEP – fig. 1.7 b) [34, 39]; la movimentazione di gocce liquide per applicazioni avanzate nell'ambito di analisi biologiche e del controllo di reazioni chimiche [40].

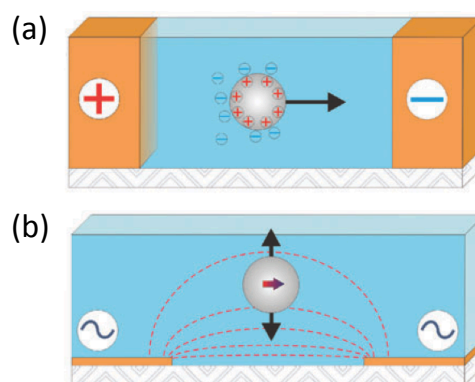


Fig.1.8: principio di funzionamento dell'elettroforesi (a) – particelle cariche migrano verso l'elettrodo di carica opposta quando viene applicato un campo elettrico continuo – e della dielettroforesi (b) – particelle elettricamente neutre migrano verso la regione di maggiore o minore intensità di un campo elettrico non uniforme per l'interazione tra il dipolo indotto e il campo stesso.

Adattata da Velev et al. [39].

Anche la realizzazione di biosensori richiede l'utilizzo di materiali conduttivi. I segnali elettrici prodotti dalle cellule forniscono infatti utili informazioni per la diagnosi di patologie, le indagini alimentari, il monitoraggio ambientale, il rilevamento di agenti patogeni, oltre a permettere lo studio dei meccanismi molecolari nell'ambito della biologia molecolare e delle neuroscienze [41, 42]. Il rilevamento elettrochimico di particolari specie chimiche o molecole (ad esempio amminoacidi e metaboliti), necessita l'utilizzo di elettrodi integrati all'interno dei microdispositivi, che abbiano la maggior sensibilità possibile [43, 44].

Nel paragrafo precedente (par. 1.3.1.1) è stata inoltre illustrata l'importanza della stimolazione elettrica per influenzare il comportamento delle cellule in coltura e dirigere il differenziamento delle linee staminali. Lo studio alla microscala dei meccanismi di risposta cellulare a questi stimoli rilevati nell'organismo è quindi importante per lo sviluppo di applicazioni cliniche che sfruttino i campi elettrici per la riparazione di tessuti danneggiati. Ciò richiede la presenza di elettrodi integrati in strutture miniaturizzate all'interno delle quali sia possibile realizzare colture cellulari e analisi biologiche [45].

Le proprietà elettromeccaniche del tessuto cardiaco ad esempio sono molto complesse e difficili da studiare alla macroscala. La microfluidica consente di combinare l'utilizzo di precisi stimoli meccanici ed elettrici con il controllo micrometrico della topografia superficiale; gioca quindi un ruolo importante nello sviluppo del tessuto cardiaco in vitro [33, 46].

1.4.2 METODI PER L'INTEGRAZIONE DI COMPONENTI CONDUTTIVI IN MICROFLUIDICA

Il PDMS è un materiale polimerico, a bassissima conducibilità elettrica ($\sigma = 10^{-11}$ S/m [47]), e come tale un isolante elettrico. È quindi necessario integrare strutture conduttive nei dispositivi miniaturizzati in PDMS che richiedono la presenza di elettrodi. Un aspetto di cui tenere conto è che gli elettrodi devono essere a contatto con il fluido o il campione all'interno del canale per poter svolgere correttamente la loro funzione.

1.4.2.1 Metodi tradizionali per l'integrazione di componenti conduttivi

Il metodo tradizionale per incorporare componenti conduttivi nei dispositivi microfluidici è quello di realizzare un circuito metallico su un substrato di vetro, silicio o PDMS prima che il dispositivo microfluidico in PDMS venga incollato al supporto (fig. 1.8) [48]. Questo approccio prevede la deposizione sul substrato di uno strato di metallo per evaporazione termica, elettrodeposizione, ablazione laser, modellazione mediante litografia ottica, ecc. I vari passaggi utilizzati nel processo produttivo richiedono l'impiego di tecnologie costose e laboriose. Il circuito metallico che ne deriva deve essere allineato ai canali microfluidici, e le dimensioni micrometriche dei dispositivi rendono l'operazione impegnativa e aumentano le possibilità di fallimento del processo produttivo.

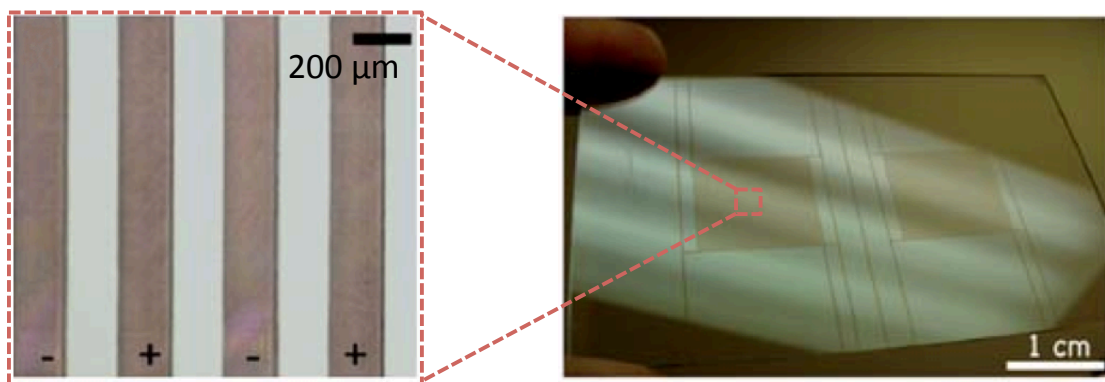


Fig. 1.8: substrato ricoperto di elettrodi planari microstrutturati realizzati in ossido di indio-stagno (ITO) attraverso ablazione laser. Adattata da Tandon et al. [48].

Altra possibilità è offerta dalla deposizione diretta di metallo su PDMS. Tuttavia, l'adesione tra materiali metallici e superfici di PDMS è piuttosto debole a causa della bassa energia superficiale di quest'ultimo, e per questo è necessario utilizzare mediatori chimici per accoppiare i due materiali. Lee et al., ad esempio, per realizzare delle microstrutture in oro su una superficie di PDMS hanno utilizzato un composto a base di silano come mediatore chimico [49]. Inoltre, data la fragilità delle strutture metalliche utilizzate come elettrodi, in genere molto sottili, esse sono suscettibili di fratture in presenza di deformazioni meccaniche o qualora il dispositivo sia sottoposto a sforzi e pressioni elevate [50].

Un'altra limitazione di questo approccio è che la geometria degli elettrodi metallici, essendo essi depositi in film sottili dello spessore massimo di poche centinaia di nm, risulta essere planare rispetto al canale microfluidico, in una configurazione bidimensionale. In questo modo il campo elettrico generato risulta non uniforme lungo l'altezza del canale e le linee di campo sono divergenti (fig. 1.9 a).

Questa configurazione può andar bene per alcune applicazioni che prevedono la manipolazione elettrica di particelle, ad esempio la dielettroforesi. Questa tecnica consiste nell'esercitare una forza coulombiana su particelle immerse in un fluido sfruttando la generazione di un dipolo indotto da parte di un campo elettrico non uniforme. La forza esercitata dipende dalle caratteristiche del campo elettrico e dalle proprietà fisiche, chimiche e morfologiche delle particelle che ne subiscono l'effetto. Questo permette di separare tra loro particelle e biomolecole con caratteristiche differenti [51, 52].

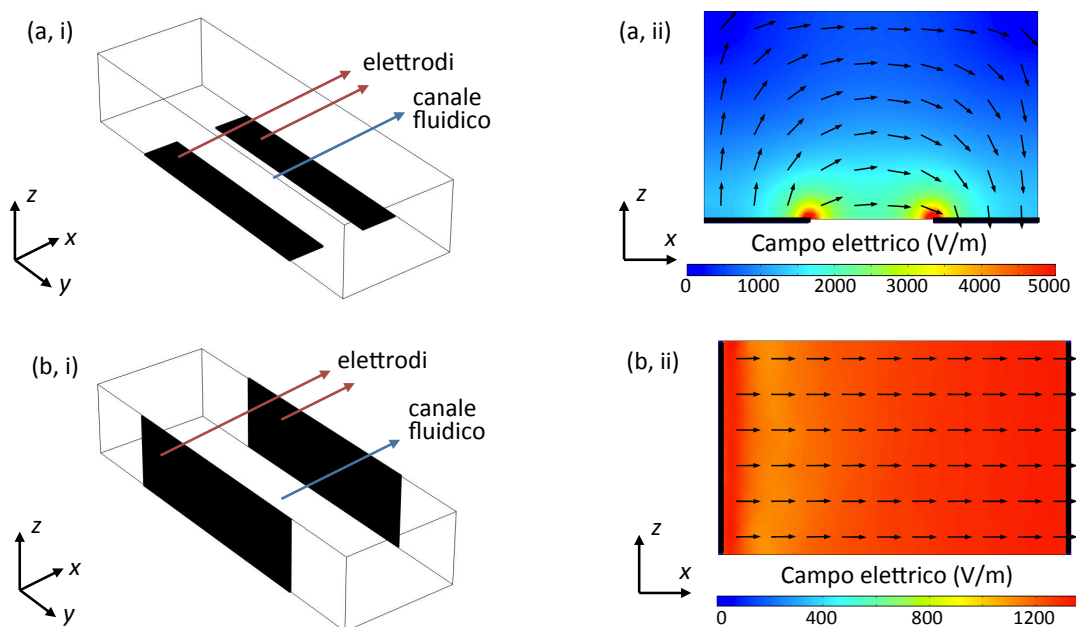


Fig. 1.9: Schematizzazione di due configurazioni di elettrodi (i) e sezione che riporta il modulo del campo elettrico e le linee di campo (ii). Elettrodi planari sul fondo del canale (A) ed elettrodi tridimensionali distribuiti lungo le pareti laterali del canale (B).

Altre applicazioni, quali l'elettroforesi, l'elettro-orientazione, e la stimolazione di costrutti cellulari [53], richiedono che il campo elettrico generato sia uniforme lungo la direzione verticale, e per questo è necessario sfruttare una configura-

zione nella quale gli elettrodi si affacciano verticalmente sui due lati opposti del canale [54]. In questo modo è possibile generare un campo elettrico distribuito uniformemente nel canale fluidico, perpendicolare alla direzione del flusso e parallelo al substrato alla base del dispositivo (fig. 1.9 b).

Nella configurazione con elettrodi planari, inoltre, il modulo del campo elettrico decresce in funzione della distanza dagli elettrodi, mentre nella configurazione con elettrodi verticali il campo elettrico possiede modulo costante e linee parallele tra loro. È quindi possibile ridurre la differenza di potenziale applicata ai capi del circuito a parità di campo elettrico richiesto. Una differenza di potenziale elevata può generare reazioni elettrochimiche indesiderate nel mezzo di coltura e danneggiare quindi le cellule o il materiale biologico presenti eventualmente nel dispositivo [55]. Nel caso di applicazioni che richiedono la manipolazione di cellule, proteine o altre molecole, la possibilità di generare un gradiente di potenziale elettrico uniforme all'interno del canale permette infine di controllare meglio l'efficienza di orientazione e il posizionamento delle particelle [56, 57].

1.4.2.1 Esempi di metodi innovativi per l'integrazione di componenti conduttivi

Numerosi esempi di realizzazione di componenti conduttivi all'interno di dispositivi microfluidici sono presenti in letteratura. In seguito sono riportati alcuni metodi di fabbricazione, che tengono conto delle seguenti specifiche di progetto:

- i. elettrodi a contatto con il canale fluidico;
- ii. elettrodi affacciati verticalmente su due lati opposti del canale per generare un campo elettrico uniforme nel volume fluido.

Choi et al. hanno realizzato elettrodi distribuiti lungo tutte le pareti di un canale di PDMS tramite impiantazione ionica, controllando l'angolo di deposizione di un film di oro [58] su un substrato di vetro. Questo metodo richiede però un elevato grado di precisione durante il successivo allineamento degli elettrodi con il supporto in vetro, a sua volta rivestito in ossido di indio-stagno (ITO) per poter realizzare le connessioni tra i componenti elettrici. Inoltre il dispositivo risulta piuttosto fragile, in quanto uno strato metallico è suscettibile di rottura quando viene depositato su un materiale elastomerico.

Wang et al. hanno sfruttato la tecnica dell'elettrodeposizione per realizzare elettrodi in oro che rivestono le pareti laterali di un canale microfluidico in SU-8 [54]. In questo modo il campo elettrico generato all'interno del dispositivo è uniforme lungo l'altezza del canale (fig. 1.10 a). Questo approccio prevede la sovrapposizione di tre strati di SU-8 per definire la geometria del canale e intrappolare gli elettrodi a contatto con esso; a loro volta gli elettrodi vengono depositati mediante l'utilizzo della tecnologia di evaporazione a cannone elettronico (e-beam evaporation). Il dispositivo è rivestito con uno strato di PDMS, che grazie alla sua flessibilità si conforma facilmente alla superficie rigida di SU-8.

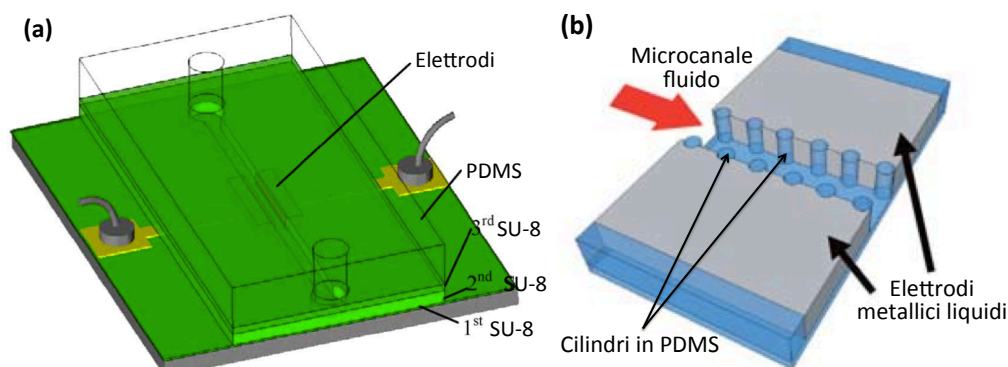


Fig. 1.10: esempi di dispositivi microfluidici con elettrodi allineati lungo le pareti laterali del canale fluido. Adattato da Wang et al. [54] (a) e So et al. [59] (b).

So et al. hanno realizzato un dispositivo microfluidico con elettrodi a contatto diretto col canale fluido, utilizzando una lega metallica eutettica iniettabile (costituita da gallio e indio) [59]. Questa strategia prevede di realizzare contemporaneamente il canale fluido e i canali in cui iniettare gli elettrodi in PDMS mediante fotolitografia. Il canale fluido è separato dal canale degli elettrodi da una serie di strutture cilindriche molto vicine tra loro anch'esse in PDMS, e sfruttando le proprietà reologiche della lega metallica è possibile iniettare gli elettrodi confinandoli lungo il loro percorso fluido. La lega di gallio e indio, infatti, a temperatura ambiente è un liquido poco viscoso. In questo modo si ottengono elettrodi allineati lungo tutto il canale, in contatto col fluido al suo interno (fig. 1.10 b). La realizzazione del dispositivo mediante un singolo processo fotolitografico rende la fabbricazione semplice e rapida. Il limite maggiore di questo strumento deriva dalla instabilità meccanica degli elettrodi. Lo strato di ossido che stabilizza il metallo, in-

fatti, si può rompere in presenza di pressioni elevate o di particolari condizioni elettrochimiche (pH, valore e frequenza della ddp applicata) determinando il fallimento del dispositivo. Inoltre il processo di iniezione del metallo è difficilmente controllabile ed è possibile generare efficacemente solo configurazioni semplici degli elettrodi. La presenza delle strutture di PDMS all'interfaccia tra canale ed elettrodi, infine, distorce l'uniformità del campo elettrico.

1.4.3 COMPOSITI CONDUTTIVI A BASE DI PDMS

Un approccio alternativo per la realizzazione di elementi conduttivi da integrare su dispositivi microfluidici è la realizzazione di compositi conduttivi a base di PDMS. Questi vengono ottenuti mescolando il prepolimero con particelle conduttive micrometriche prima che avvenga la polimerizzazione. Il primo tentativo di rendere conduttivo il PDMS è stato fatto da Unger et al. utilizzando nero di carbone come riempitivo [21].

Il nero di carbone, la polvere d'argento, i nanotubi di carbonio e la grafite sono riempitivi comunemente impiegati per la realizzazione di questi materiali, grazie alle loro favorevoli caratteristiche di bagnabilità. Presentano caratteristiche termiche ed elettriche differenti, che sono state indagate da diversi autori [60-63]. Per tutti i tre riempitivi si nota che esiste un valore minimo di concentrazione volumetrica del riempitivo sotto il quale il materiale non è conduttivo. La concentrazione volumetrica è intesa come:

$$\varphi = \frac{V_{part}}{V_{part} + V_{matrix}} \quad (6.1)$$

dove V_{part} e V_{matrix} indicano rispettivamente il volume occupato dal particolato e il volume occupato dalla matrice. Questo comportamento è dovuto al fatto che le particelle conduttive devono essere in contatto tra loro all'interno della matrice siliconica per poter trasmettere il segnale elettrico. Il valore di soglia è maggiore nel caso dell'argento in quanto il metallo ha una densità molto più elevata del carbonio e a parità di volume occupato la sua massa è maggiore. Sopra questo valore di soglia la conducibilità del composito aumenta esponenzialmente, mentre per concentrazioni troppo elevate il materiale perde le favorevoli caratteristiche meccaniche

proprie del PDMS e diventa difficilmente manipolabile. Per una trattazione più approfondita della conduttività delle matrici polimeriche caricate con particolati conduttivi si rimanda all'appendice A.

Il vantaggio dell'utilizzo di queste strutture conduttive è la facilità con cui esse possono essere integrate in dispositivi microfluidici di PDMS, essendo esse stesse costituite da una matrice di PDMS. L'adesione tra i due materiali è infatti irreversibile se vengono fatti polimerizzare l'uno sull'altro. Si eliminano inoltre i problemi legati alla fragilità degli elettrodi metallici, in quanto i compositi mantengono le caratteristiche di elasticità e flessibilità proprie del silicone. Con questi materiali si possono realizzare quindi elettrodi flessibili, facilmente integrabili con altri dispositivi microfluidici, da utilizzare per numerose applicazioni: micropompe, generatori di calore per effetto Joule, sensori di temperatura, valvole, oltre che ovviamente per la generazione e la rilevazione di segnali elettrici [38].

Una delle caratteristiche più importanti degli elettrodi fabbricati in materiale composito è quella di mantenere la capacità del PDMS di deformarsi reversibilmente se sottoposti a carico meccanico. La flessibilità degli elettrodi è importante per le applicazioni che prevedono la deformazione di canali fluidi in presenza di pressioni particolarmente elevate [64], nel caso si vogliano realizzare sensori elettrochimici deformabili o per la realizzazione di particolari dispositivi impiantabili [65, 66]. Inoltre rende possibile la realizzazione di sistemi di coltura cellulare in cui la stimolazione elettrica viene associata alla deformazione meccanica, che è fondamentale per guidare processi cellulari quali l'apoptosi, la deposizione di matrice extracellulare, l'espressione genica e proteica [67, 68] e la differenziazione delle linee staminali [69].

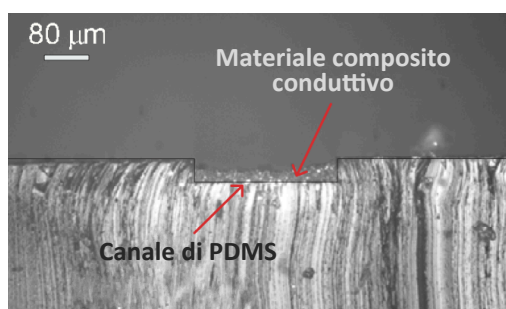


Fig.1.11: Sezione di canale in PDMS contenente un elettrodo in materiale composito PDMS/argento. Adattata da Chuang et al. [62].

1.4.3.1 Applicazioni microfluidiche con compositi conduttivi a base di PDMS

Nel dispositivo realizzato da Liu et al. il composito di PDMS e argento è usato per costruire un circuito termico miniaturizzato, che genera calore applicando una differenza di potenziale ai suoi capi [70]. Quando un conduttore è attraversato da una corrente elettrica, infatti, disperde energia sotto forma di calore in funzione dell'intensità della corrente, fenomeno che va sotto il nome di effetto Joule. Il materiale conduttivo è ottenuto mescolando PDMS con particelle di argento di dimensioni 1–2 μm a una concentrazione in peso di 86,3 %. Esso viene utilizzato per riempire, tramite spatolatura, un canale di PDMS ottenuto tramite soft-lithography, e fatto solidificare a 100 °C. I microriscaldatori sono applicabili nell'attivazione e nel controllo di bioprocessi, reazioni chimiche, e per il riscaldamento di liquidi per vari scopi.

Sfruttando lo stesso processo produttivo, Chuang et al. hanno realizzato un sistema costituito da un microriscaldatore e un microsensore di temperatura da integrare su sistemi lab-on-chip [62]. Entrambi sono realizzati tramite soft-lithography e integrati su un supporto siliconico. Il PDMS ha un elevato coefficiente di espansione termica: la resistività elettrica del sensore aumenta quindi in corrispondenza di un aumento di temperatura. L'aumento di resistività è dovuto all'effetto distruttivo che l'espansione della matrice di PDMS provoca sui reticoli conduttivi di particelle metalliche microscopiche a contatto tra loro.

Lewpiriyawong et al. hanno progettato e realizzato un dispositivo microfluidico per la classificazione e la separazione di particelle basato sul principio della dielettroforesi [71, 72]. Gli elettrodi, realizzati in materiale conduttivo ottenuto mescolando PDMS e polvere d'argento, sono distribuiti lungo tutta l'altezza del canale fluidico. In questo modo il campo dielettroforetico è generato uniformemente in tutto il dispositivo, incrementando l'efficienza di separazione (fig. 1.12). Per costruire il dispositivo sono stati utilizzati due diversi fotoresist (AZ9260 e SU8) ed è stato necessario impiegare due volte la tecnica della fotolitografia per realizzare il canale per gli elettrodi e successivamente quello per le particelle.

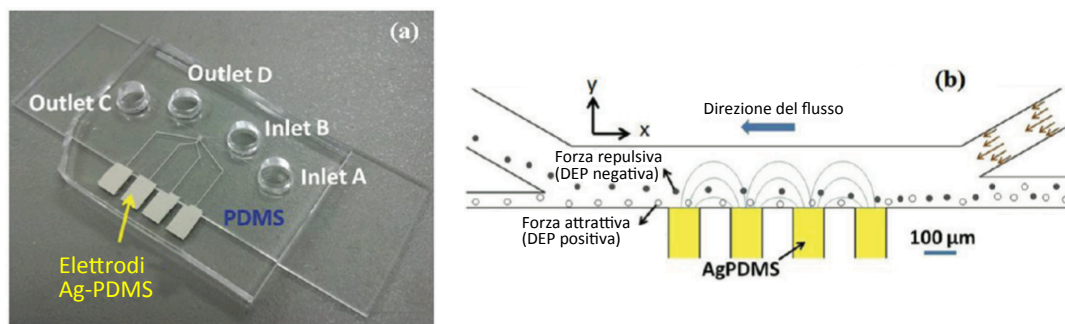


Fig. 1.12: dispositivo microfluidico con elettrodi laterali in PDMS/argento (a) e schema del principio di separazione di particelle di diverse dimensioni (b) [72].

1.5 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del presente lavoro è stato l'ottimizzazione del processo di realizzazione di elettrodi flessibili tridimensionali all'interno di dispositivi microfluidici in PDMS. La peculiarità del metodo proposto è la possibilità di ottenere elettrodi in configurazione tridimensionale, a contatto con canale fluidico e affacciati ad essi lateralmente. In tal modo il campo elettrico generato all'interno del canale risulta essere uniforme. Gli elettrodi, costituiti da un composito di PDMS e polvere conduttiva, sono stati inseriti in un dispositivo paradigmatico, progettato per poterne caratterizzare il metodo di realizzazione. Il dispositivo realizzato come prototipo è stato quindi progettato secondo le seguenti specifiche: semplicità di realizzazione; semplicità della geometria (un singolo canale fluidico al lato del quale sono stati alloggiati gli elettrodi); possibilità di applicare le tecniche di caratterizzazione del protocollo di inserimento degli elettrodi.

In base alle caratteristiche dei dispositivi realizzati e alla composizione degli elettrodi, questi possono trovare impiego per differenti applicazioni. In particolare il canale fluidico del dispositivo prototipale può venire utilizzato come supporto per la stimolazione elettrica del microambiente cellulare, o per la manipolazione di materiale biologico in ambiti che richiedano la presenza di microelettrodi. Inoltre, una volta ottimizzato il processo di realizzazione degli elettrodi nel dispositivo utilizzato come modello, è possibile estendere il protocollo per ottenere configurazioni fluidodinamiche ed elettriche più complesse.

La prima fase del lavoro è consistita nella messa a punto e nella caratterizzazione del protocollo di fabbricazione, che ha previsto un singolo processo fotolitografico per realizzare il dispositivo mediante soft lithography. Gli elettrodi sono stati invece iniettati in un secondo momento, prendendo in considerazione tre soluzioni alternative per rendere conduttivo il composito di PDMS. Un processo di erosione chimica ha poi permesso di mettere in comunicazione elettrodi e canale fluidico. Successivamente, mediante prove di conducibilità in frequenza, sono state caratterizzate le proprietà elettriche degli elettrodi e del dispositivo. È stato inoltre valutato il comportamento elettrico dei materiali conduttivi sottoposti a deforma-

zione meccanica. Parallelamente sono state svolte simulazioni numeriche per interpretare il comportamento elettrico dei dispositivi.

La fase di realizzazione, validazione e caratterizzazione è stata svolta presso il Politecnico di Milano (Dipartimento di Bioingegneria), Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica sperimentale (μ BS Lab).

2. MATERIALI E METODI

Nel presente capitolo vengono presentati i protocolli di fabbricazione dei dispositivi microfluidici in PDMS, utilizzati come casi paradigmatici per l'ottimizzazione del processo di ottenimento degli elettrodi. Sono poi descritte le procedure che permettono di realizzare gli elettrodi all'interno dei dispositivi e presentati i metodi di caratterizzazione elettrica sia del materiale composito che costituisce gli elettrodi che dell'intero dispositivo. Vengono descritte le prove per valutare il comportamento elettrico sotto deformazione dei materiali conduttivi. Viene infine riportata la procedura di valutazione del comportamento elettrico e interpretazione dei dati trovati mediante l'utilizzo di un software per la simulazione numerica.

2.1 DISPOSITIVI MICROFLUIDICI

La figura 2.1 riporta una schematizzazione delle fasi necessarie per produrre un dispositivo in PDMS (chip), ottenuto utilizzando la tecnica soft-lithography (par. 1.2) a partire da uno stampo ottenuto per fotolitografia. Il dispositivo viene successivamente sigillato a un supporto di vetro.

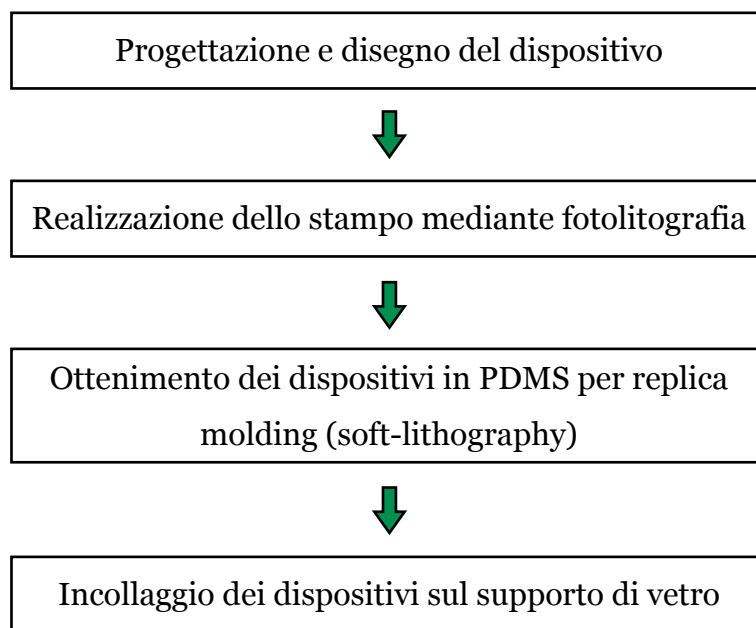


Fig. 2.1: fasi del processo di realizzazione dei dispositivi in PDMS.

2.1.1 PROGETTO E DISEGNO

Il progetto del dispositivo prevede una geometria composta da un canale centrale in cui far scorrere il fluido (definito in seguito canale fluidico) e due canali laterali a contatto con esso in cui siano presenti gli elettrodi in materiale composito (definiti in seguito per semplicità canali degli elettrodi). Le estensioni dei canali degli elettrodi sono state progettate secondo una configurazione a ferro di cavallo. La disposizione di queste estensioni è studiata in modo da massimizzare la distanza tra le estremità, che costituiscono gli ingressi e le uscite dei canali per l'iniezione del composito conduttivo (fig. 2.2).

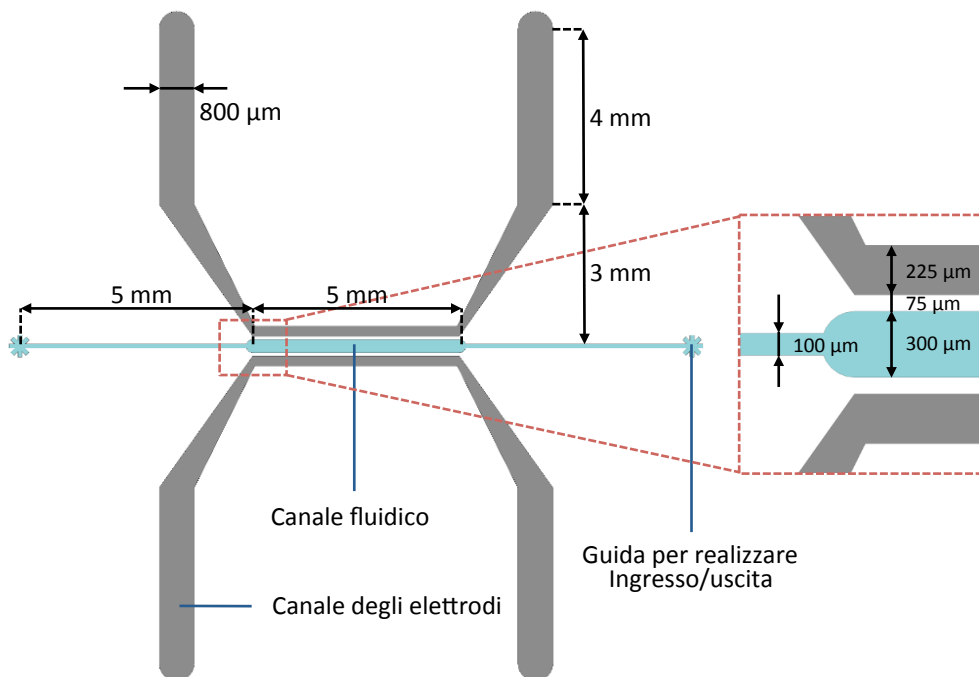


Fig. 2.2: disegno del dispositivo (sx) e ingrandimento (dx).

Il disegno è stato realizzato tramite il software commerciale AutoCAD (Autodesk Inc.). Il canale centrale ha lunghezza 5 mm e larghezza 300 μm, mentre le due connessioni di ingresso e uscita misurano 5 mm x 100 μm. I canali in cui alloggiare gli elettrodi, presenti ai lati del canale, lungo tutta la sua lunghezza, sono larghi 225 μm nella parte adiacente il canale fluido e si allargano fino a 800 μm verso le estremità. Sono posti a 75 μm dal canale fluido e questa distanza, che determinerà lo spessore dello strato di PDMS che divide il canale fluido dagli elettrodi, verrà definita nei paragrafi successivi. Alle estremità del canale fluido

vengono disegnati due piccole cavità fluidiche a forma di asterisco, che in seguito risulteranno utili come riferimenti per realizzare i pozzetti di ingresso e uscita.

2.1.2 REALIZZAZIONE DELLO STAMPO MEDIANTE FOTOLITOGRAFIA

Una volta realizzato il disegno mediante AutoCAD (fig. 2.3 a), esso viene usato per stampare la fotomaschera (fig. 2.3 b) ad alta risoluzione (32000 dpi). Come descritto in precedenza (par. 1.2.1), questa viene utilizzata per esporre parzialmente ai raggi UV un polimero fotosensibile (SU-8 50, Microchem) depositato uniformemente su un wafer di silicio da 4", in modo da ottenere il master mold (fig 2.3 c), lo stampo da cui verranno ottenute le copie del chip da produrre. Lo stampo su wafer di silicio è stato realizzato presso la camera bianca del L-NESS (Polo regionale di Como – Politecnico di Milano), depositando il fotoresist SU-8 50 con uno spessore di 75 μm tramite spin coating.

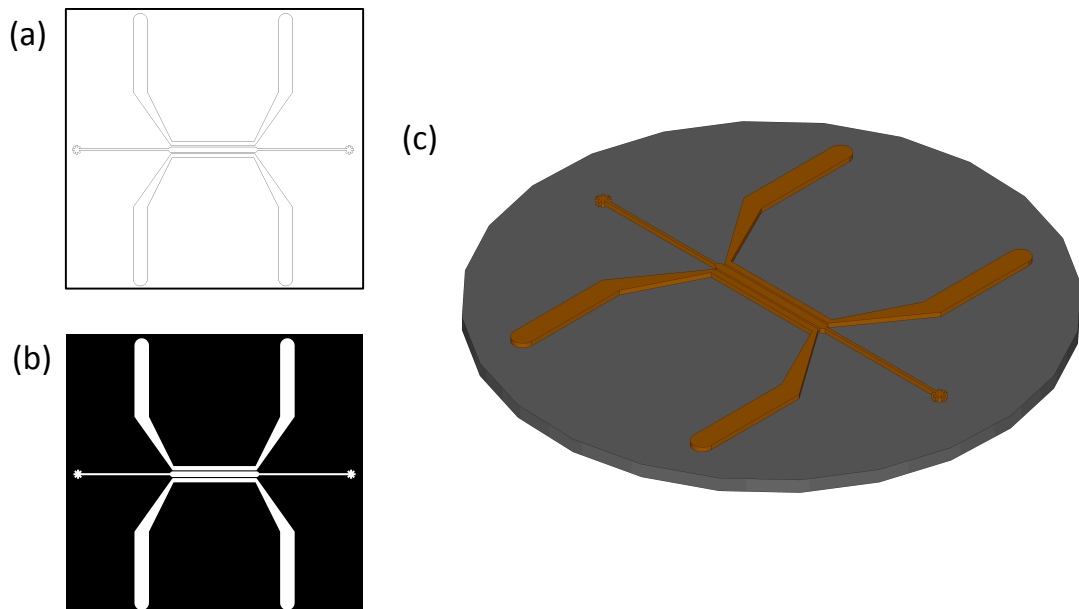


Fig. 2.3: disegno CAD del dispositivo (a); maschera fotolitografica (b) e master mold (c).

2.1.3 OTTENIMENTO DEI DISPOSITIVI IN PDMS PER REPLICA MOLDING

I chip sono ottenuti come repliche in silicone del master mold. Il PDMS si ottiene miscelando il prepolimero con un catalizzatore del processo di polimerizza-

zione (agente indurente) in un rapporto di peso 10:1 (Sylgard 184, Dow Corning Corporation). I gruppi di idruro di silicio presenti nell'agente indurente reagiscono con i gruppi vinilici presenti nella soluzione di base, formando il polimero in fase liquida. Dopo il mescolamento, la soluzione viene debollata sotto vuoto e versata sul master mold. Un ulteriore step di debollamento assicura l'assenza di bolle nel silicone, che viene infine fatto reticolare in stufa a 70 °C per 2 ore. Trascorso questo tempo si stacca il dispositivo indurito dal master mold (che può essere riutilizzato per una nuova colata). Si noti che l'altezza totale dei dispositivi è di circa 4 mm, e può essere controllata variando il volume di prepolimero colato sul master mold.

La fig. 2.4 riassume schematicamente i processi necessari per la realizzazione di un dispositivo in PDMS.

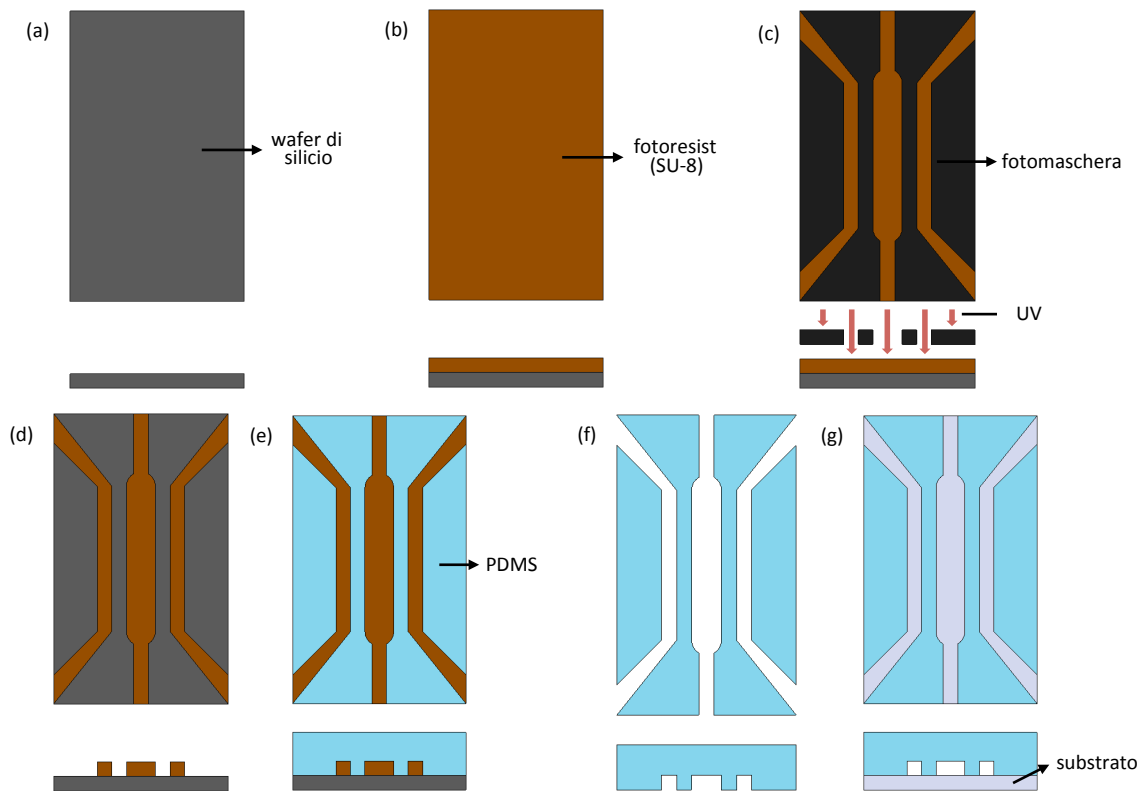


Fig. 2.4: schematizzazione del processo di realizzazione del dispositivo in PDMS. Su un wafer di silicio (a) viene depositato uno strato di SU-8 (b). I raggi UV filtrati attraverso la fotomaskera (c) permettono di ottenere il master mold microstrutturato (d), sul quale viene colato il PDMS (e). Il chip in PDMS viene tolto dallo stampo (f) e sigillato a un vetrino mediante plasma in aria (g).

Disegno non in scala.

2.1.4 INCOLLAGGIO DEI DISPOSITIVI SU SUPPORTO DI VETRO

Gli ingressi e le uscite dei canali degli elettrodi sono stati ottenuti realizzando dei fori alle estremità del canale stesso tramite una fustella da biopsia con diametro esterno pari a 0,5 mm (Harris, Uni-Core). Le estremità del canale fluidico vengono invece forate con una fustella del medesimo tipo ma con diametro esterno 8 mm. La superficie del chip microstrutturata viene pulita utilizzando del nastro adesivo semitrasparente, mentre il vetrino che costituirà la base del dispositivo (di spessore 1 mm) viene lavato con del detergente e lasciato asciugare in stufa. Le due superfici, dopo un trattamento al plasma (in aria) per 1 minuto (Harrick Plasma Inc.), sono posti uno sull'altro così da risultare uniti in maniera irreversibile.

2.2 REALIZZAZIONE DEGLI ELETTRODI

Il processo per la realizzazione degli elettrodi è riassunto nello schema di fig. 2.5, e prevede l'utilizzo alternativo di tre diversi compositi come materiale conduttivo. Dopo aver preparato uno dei compositi, questo viene iniettato all'interno del dispositivo nei canali degli elettrodi. Una volta fatto reticolare il materiale, gli elettrodi vengono posti in comunicazione col canale fluidico mediante un processo di erosione chimica della pareti di silicone.

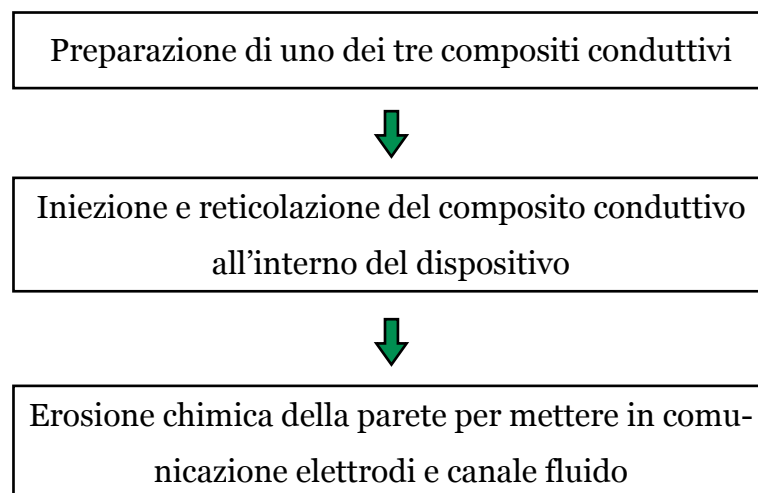


Fig. 2.5: schematizzazione del processo di realizzazione degli elettrodi all'interno del dispositivo di PDMS, a contatto col canale fluidico.

2.2.2 PREPARAZIONE DEI COMPOSITI CONDUTTIVI

Gli elettrodi all'interno del dispositivo sono realizzati in materiale composito, ottenuto mescolando PDMS e polvere conduttiva come riempitivo. Tre polveri sono state utilizzate in questo lavoro per realizzare tre distinte categorie di elettrodi:

- i. la prima polvere è costituita da argento (Ag) puro sotto forma di scaglie con dimensione controllata di 10 μm (Sigma-Aldrich Co. - cod. 327077). L'argento possiede una densità di 10,49 g/cm^3 e una conducibilità elettrica pari a $6,30 \cdot 10^7 \text{ S}/\text{m}$.
- ii. la seconda polvere è costituita da grafite, una forma allotropica del carbonio, con dimensione delle particelle inferiore a 20 μm (Sigma-Aldrich Co. - cod. 282863). La grafite possiede una densità di 2,09-2,23 g/cm^3 e una conducibilità elettrica che risente dell'anisotropia della sua struttura cristallina: varia tra $3,3 \cdot 10^2$ e $3 \cdot 10^5 \text{ S}/\text{m}$ [73].
- iii. la terza polvere è costituita da una miscela di grafite e nanotubi di carbonio (Nanostructured & Amorphous Materials Inc. – cod. 1233YJ), altra forma allotropica del carbonio i cui atomi si dispongono a formare strutture ordinate di forma cilindrica. I nanotubi utilizzati sono a parete multipla (MWCNT), ovvero formati da più fogli avvolti coassialmente uno sull'altro. Il diametro esterno dei nanotubi misura 50-80 nm, la lunghezza 10-20 μm e vengono mescolati alla grafite in rapporto 3:1 in volume. I nanotubi possiedono una conduttività elettrica estremamente variabile a seconda della loro struttura, geometria e organizzazione spaziale (possono comportarsi come semiconduttori o come superconduttori) [74]. La densità equivalente della polvere grafite/nanotubi è pari a (essendo quella dei nanotubi 1,35 g/cm^3):

$$\rho_{eq} = 0,75 \cdot \rho_{gra} + 0,25 \cdot \rho_{CNT} = 1,96 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$$

Le varie polveri vengono mescolate con il PDMS liquido, dopo aver unito prepolimero e agente reticolante, fino ad ottenere miscele uniformi. La viscosità del composito deve essere tale da poterlo iniettare all'interno dei canali del dispositivo. Sono state effettuate quindi delle prove qualitative preliminari per determinare la frazione volumetrica massima di particolato che è possibile caricare all'in-

2. MATERIALI E METODI

terno della matrice elastomerica affinché questa risulti iniettabile. Data la differenza tra le densità dei diversi materiali, è diversa la percentuale in peso di polvere che va aggiunta al composito. La polvere d'argento viene mescolata al silicone in rapporto 4:1 in peso. La polvere di grafite viene mescolata al silicone in rapporto 2:3 in peso. La polvere di grafite e nanotubi viene mescolata al silicone in rapporto 2:7 in peso. È possibile ricavare la frazione volumetrica di particolato nel composito a partire dal rapporto in peso tra la polvere e il polimero e dalla densità dei materiali (ricordando che quella del PDMS è pari 0,965 g/cm³) [47]:

$$\varphi = \frac{V_{part}}{V_{part} + V_{PDMS}} = \frac{1}{1 + \frac{m_{PDMS}}{m_{part}} \cdot \frac{\rho_{part}}{\rho_{PDMS}}} \quad (2.1)$$

I materiali compositi realizzati saranno in seguito denominati rispettivamente PDMS/argento, PDMS/grafite e PDMS/grafite+CNT.

2.2.2 INIEZIONE DEL COMPOSITO CONDUTTIVO E OTTENIMENTO DEGLI ELETTRODI

In tutti tre i casi, con il composito ottenuto si riempie una siringa e si inietta manualmente la miscela nei due canali degli elettrodi di ciascun chip. La presenza di due fori in ciascun canale permette all'aria di uscire facilitando il processo di iniezione. Terminato il riempimento, si procede a far reticolare il materiale conduttivo ponendo i dispositivi su una piastra riscaldante a 150 °C per un ora.

A questo punto gli elettrodi e il canale centrale fluidico sono divisi da una parete in PDMS spessa 75 μm che va eliminata per permettere il contatto diretto tra i due elementi. Si ricorda infatti che il PDMS è un materiale isolante che impedisce la propagazione del segnale elettrico (par. 1.2.2).

È noto che il tetrabuttilammoniofluoruro Bu₄N⁺F⁻ ((TBA)F) è una sostanza liquida in grado di corrodere il PMDS. Il (TBA)F è solubile in N-metil-2-pirrolidone (NMP), sostanza che quindi può dissolvere i prodotti dell'erosione. Per erodere la parete tra il canale fluido e gli elettrodi si utilizza una soluzione di (TBA)F e NMP in concentrazione di 1:3 in volume. Per bloccare la reazione si utilizza NMP puro (in cui è solubile la soluzione erosiva) [75].

Durante il processo di erosione, per evitare che i prodotti di scarto si accumulino nel canale, è importante garantire una condizione di continua perfusione. A tale scopo uno dei due pozzetti alle estremità del canale fluido viene riempito tramite una micropipetta con la sostanza erosiva (si osservi che essendo il dispositivo simmetrico i due pozzetti sono intercambiabili). Grazie alla differenza di pressione idrostatica dovuta all'altezza del battente fluido tra i due pozzetti, la soluzione scorre all'interno del canale fluidico (fig. 2.10). È importante che la soluzione continui a scorrere nel canale, per cui l'altezza del battente idrostatico viene mantenuta costante durante tutta la durata del processo, aggiungendo soluzione nel pozzetto di entrata e aspirandone da quello di uscita.

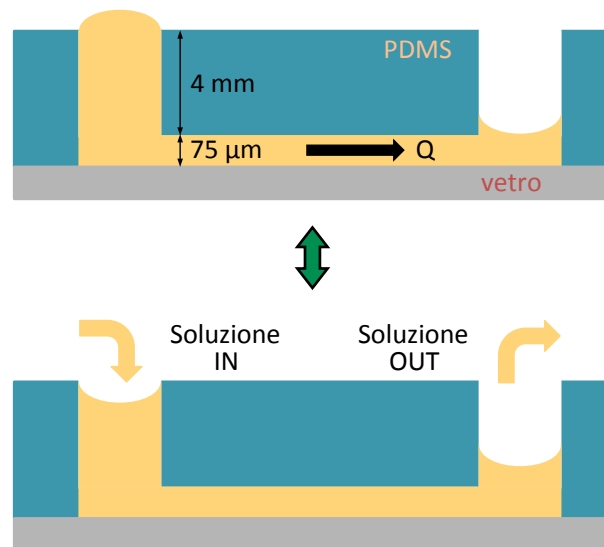


Fig. 2.10: processo di movimentazione del liquido all'interno del canale ad opera del gradiente idrostatico stabilito tra il pozzetto a sx e quello a dx. Disegno non in scala.

L'operazione viene eseguita sotto microscopio, in modo da poter monitorare lo svolgersi dell'operazione e stabilire quando gli elettrodi vengono a contatto col canale fluidico. In circa 60 minuti la parete di $75\ \mu\text{m}$ è completamente erosa. Al termine viene aspirata la soluzione presente nel pozzetto di ingresso e sostituita con NMP puro, che viene fatto scorrere nel canale per 20 minuti circa in modo da pulirlo del (TBA)F ancora presente all'interno del dispositivo. Ulteriori lavaggi vengono effettuati infine con etanolo, che dissolve a sua volta l'NMP.

La fig. 2.11 riassume schematicamente i processi necessari per la realizzazione degli elettrodi all'interno dei dispositivi in PDMS.

2. MATERIALI E METODI

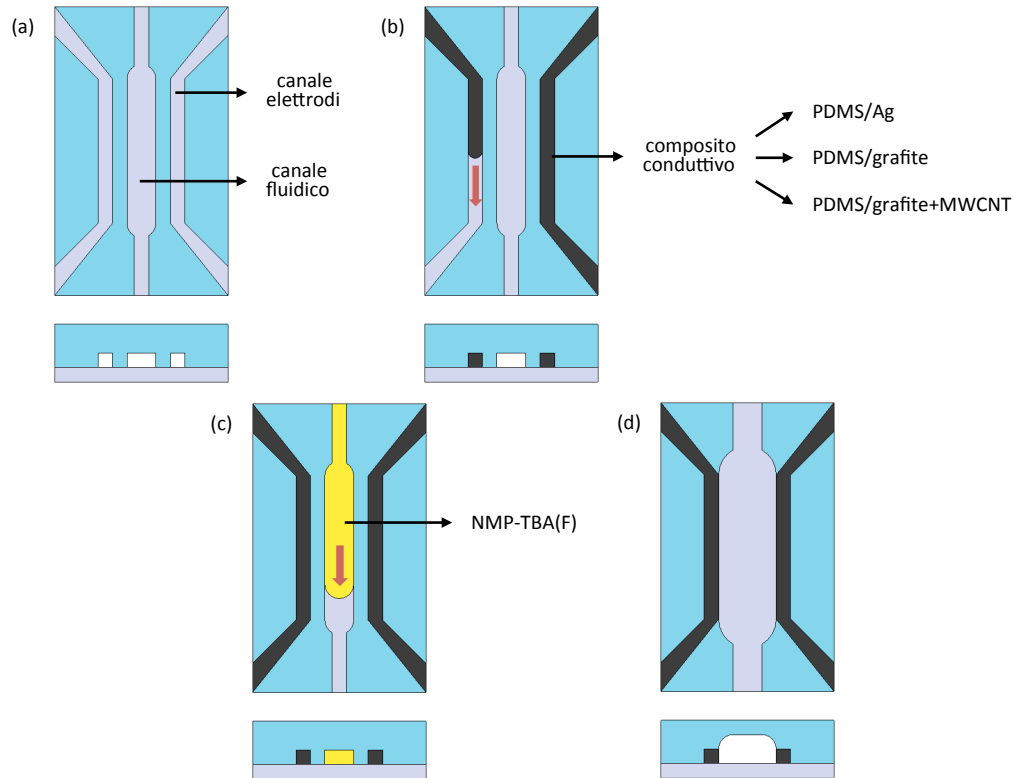


Fig. 2.11: schematizzazione del processo di realizzazione degli elettrodi. In un chip sigillato su vetrino (a), vengono iniettati gli elettrodi (b) e all'interno del canale fluidico viene fatta scorrere la soluzione che erode la parete tra elettrodi e canale (c). Quest'ultimo risulta allargato al termine dell'operazione (d). Disegno non in scala.

La portata dovuta a un battente idrostatico di 4 mm in un canale micrometrico è estremamente bassa, e in questo modo è assicurata la laminarità del moto del fluido, fondamentale affinché l'erosione sia uniforme all'interno del dispositivo. In particolare è possibile determinare la portata del fluido all'interno del canale in funzione dello spessore della parete. La legge di Poiseuille stabilisce infatti che la caduta di pressione di un fluido newtoniano che si muove in regime laminare e stazionario in un condotto a pareti rigide è pari a:

$$\Delta P = \frac{128\mu L}{\pi D_h^4} \cdot Q = R_h \cdot Q \quad (2.2)$$

con L lunghezza del condotto e μ viscosità dinamica del fluido che scorre al suo interno. Con R_h si identifica la resistenza idraulica approssimata di un condotto di sezione non circolare, ottenuta indicando con D_h il diametro idraulico, ovvero:

$$D_h = \frac{4A}{p} \quad (2.3)$$

dove A è l'area della sezione del canale e p il suo perimetro. Questa trattazione consente di stimare la portata nel condotto senza la necessità di ricavare in modo esatto il profilo del moto del fluido secondo l'equazione di Navier-Stokes. Per condotti di lunghezza non infinita e sezione non circolare la semplificazione introdotta consente infatti di calcolare la resistenza idraulica con un'approssimazione di circa il 20 % [76].

La pressione all'ingresso del canale può essere ricavata a partire dalla legge di Stevino, nota l'altezza del battente idrostatico che insiste sul fondo del pozzetto:

$$P = \rho gh \quad (2.4)$$

Nel pozzetto di uscita del canale la pressione è mantenuta costante e pari a quella atmosferica.

Note le proprietà geometriche del condotto (la sezione si considera rettangolare) e quelle fisiche dell'NMP ($\rho = 1,28 \text{ g/cm}^3$; $\mu = 1,7 \text{ cP}$), è possibile calcolare la resistenza idraulica considerando i 3 contributi alla resistenza derivanti dai diversi componenti del canale fluidico: il canale centrale a contatto con gli elettrodi (R_{centr}) e i due canali di collegamento ai pozzetti (R_{coll}).

Inoltre, sapendo che la parete di spessore $75 \text{ }\mu\text{m}$ viene erosa in 60 minuti ($\delta_{\text{parete}} = 1,25 \text{ }\mu\text{m/min}$), è possibile ricavare la portata in funzione del tempo. Valgono infatti le relazioni:

$$\delta_{\text{parete}} = 1,25 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}} \quad (2.5)$$

$$w_{\text{canale}} = w_0 + 2\delta_{\text{parete}} \cdot t \quad (2.6)$$

$$h_{\text{canale}} = h_0 + \delta_{\text{parete}} \cdot t \quad (2.7)$$

dove w_{canale} e h_{canale} indicano rispettivamente lo spessore e l'altezza del canale fluidico e δ_{parete} la velocità di diminuzione dello spessore della parete. Queste espressioni permettono di riscrivere l'espressione della resistenza idraulica in funzione

del tempo. A partire dalle relazioni 2.2 e 2.4, e considerando l'altezza del battente idrostatico costante e pari a 4 mm, è possibile infine ricavare la portata per diversi spessori della parete che corrispondono a diversi istanti:

$$Q(t) = \Delta P \cdot [R_{centr}(t) + 2R_{coll}(t)] \quad (2.8)$$

A partire dal valore di portata in funzione del tempo si può calcolare il volume totale di soluzione erosiva utilizzato, valutando il consumo a intervalli discreti di 5 minuti. Vale infatti la relazione:

$$V = \int Q(t) dt \quad (2.9)$$

È inoltre possibile verificare che il moto del fluido all'interno del canale sia effettivamente di tipo laminare utilizzando la relazione 1.4.

2.3 CARATTERIZZAZIONE GEOMETRICA DEL DISPOSITIVO MICROFLUIDICO

È importante caratterizzare la geometria del dispositivo, in quanto nelle analisi successive si dovranno utilizzare le misure dei canali. Vengono quindi verificate le dimensioni laterali e l'altezza delle microstrutture. Si ricorda che larghezza e lunghezza dei canali sono stabilite dalla geometria stampata sulla fotomaschera, mentre l'altezza è stata definita in fase di deposizione del fotoresist sul wafer di silicio tramite spin coating e risulta quindi essere uniforme per tutte le microstrutture presenti sul dispositivo..

A tale scopo una sezione del dispositivo viene tagliata e osservata sotto stereomicroscopio ottico (Nikon SMZ1000), sovrapponendo a questa sezione di PDMS un foglio di plastica trasparente con disegnata una griglia di dimensioni note. Le immagini vengono scattate a un ingrandimento di 80× mediante un sistema di acquisizione fotografico collegato al microscopio (Unibrain Fire-i 780c). Elaborando le immagini mediante il software ImageJ è possibile determinare l'altezza e la larghezza dei canali presenti nel dispositivo, che inizialmente (prima dell'erosione chimica) risulta essere pari a 75 μm.

Il processo di erosione procede nelle tre direzioni all'interno del canale fluidico, quindi introduce delle alterazioni geometriche nel canale stesso. Una volta ultimata la realizzazione degli elettrodi in un dispositivo, è possibile sezionare quest'ultimo per valutare le alterazioni geometriche, in termini di larghezza e altezza finali del canale fluidico al centro del dispositivo.

2.4 CARATTERIZZAZIONE ELETTRICA

Una volta realizzati i dispositivi, è necessario caratterizzare dal punto di vista elettrico i materiali conduttivi che costituiscono gli elettrodi. Bisogna cioè valutare l'impedenza di un singolo elettrodo in termini della sua risposta in frequenza a un segnale in ingresso. Ai fini pratici è vantaggioso eseguire delle valutazioni preliminari utilizzando degli elettrodi rettilinei e paralleli, realizzati in PDMS tramite soft lithography, sfruttando lo stesso procedimento utilizzato per realizzare i chip descritti in precedenza. I dispositivi realizzati a tale scopo contengono ognuno tre canali aventi lunghezza 10 mm, larghezza 180 μm e altezza 150 μm . Alle estremità vengono realizzati dei fori da 0,5 mm di diametro per l'iniezione del materiale conduttivo e il collegamento al circuito di acquisizione. Il chip viene incollato su un vetrino e all'interno dei canali viene iniettato manualmente il materiale conduttivo, che viene poi fatto reticolare.

Per valutare l'influenza di liquido nel canale fluidico (mezzo di coltura o altro liquido di supporto per la manipolazione di materiale biologico) sulle prestazioni del dispositivo, vengono successivamente condotte delle prove di caratterizzazione anche sui dispositivi microfluidici prototipali (descritti nel par. 2.1) con gli elettrodi inseriti. Ai fini pratici le prove sono condotte solamente sui dispositivi con elettrodi realizzati in PDMS/argento.

2.4.1 SET-UP PER LA CARATTERIZZAZIONE ELETTRICA

Il set-up di acquisizione è costituito da un circuito elettrico il cui schema è riportato in figura 2.13.

2. MATERIALI E METODI

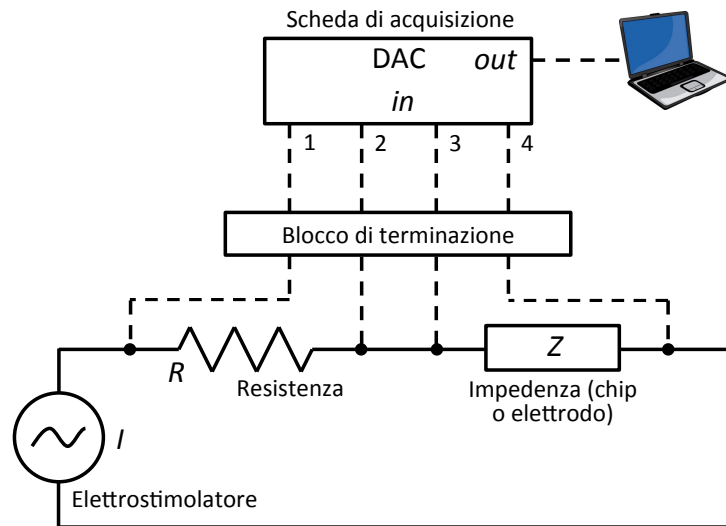


Fig. 2.13: schema del circuito per la caratterizzazione elettrica degli elettrodi e dei dispositivi.

L'elettrostimolatore (MCS GmbH) possiede 4 canali, ciascuno dei quali può fornire in uscita un segnale di tensione o di corrente nella forma di scalino, rampa, rettangolo, sinusoidale o combinazioni di questi a una frequenza massima di 25 kHz. Il segnale di corrente generato da uno dei canali viene utilizzato come ingresso al circuito costituito dalla serie dell'impedenza che si vuole caratterizzare (il singolo elettrodo o il dispositivo) e una resistenza di valore noto (ai fini pratici inserita in una basetta sperimentale o breadboard). La presenza della resistenza è fondamentale per poter ricostruire il valore istantaneo della corrente che attraversa il circuito e il suo valore è stabilito mediante prove preliminari effettuate sull'impedenza. Per migliorare la risoluzione dei segnali acquisiti la resistenza deve infatti avere valore paragonabile al modulo dell'impedenza: in questo modo la caduta di potenziale ai capi di entrambe ricade nello stesso ordine di grandezza. Il circuito viene chiuso alla massa dell'elettrostimolatore.

Per acquisire i segnali ai capi dell'impedenza e della resistenza si utilizza una scheda di acquisizione (NI PCI-6036E, National Instruments) a 16 bit con 16 ingressi di acquisizione (8 nel caso si acquisiscano segnali in modalità differenziale), che permette di campionare segnali analogici di tensione a una frequenza massima di 200 kS/s con un'accuratezza massima di 61 μV . La scheda di acquisizione si interfaccia con l'esterno tramite un blocco di terminazione a 68 ingressi (NI CB-68LPR). Due ingressi vengono usati per campionare un segnale di tensione diffe-

renziale ai capi della resistenza di valore noto in modo da poter ricostruire il segnale di corrente. Altri due ingressi sono utilizzati per campionare un segnale di tensione differenziale ai capi dell'impedenza.

Ogni elettrodo viene testato singolarmente, e l'interfaccia tra elettrodi e circuito è ottenuta inserendo in ogni ingresso del canale un ago metallico tronco di diametro esterno 0,5 mm. Mediante morsetti metallici vengono realizzate le connessioni ai capi dell'elettrostimolatore e ai due ingressi del blocco di terminazione della scheda di acquisizione.

- In serie agli elettrodi realizzati col composito PDMS/argento viene posta una resistenza di valore 10 Ω . Il segnale di corrente in ingresso al circuito, imposto dall'elettrostimolatore, è una sinusoide di ampiezza costante pari a 2 mA.
- In serie agli elettrodi realizzati col composito PDMS/grafite e a quelli realizzati col composito PDMS/grafite+CNT viene posta una resistenza di valore 10 k Ω . Il segnale di corrente in ingresso al circuito, imposto dall'elettrostimolatore, è una sinusoide di ampiezza costante pari a 0,1 mA.

Tramite la scheda di acquisizione si campionano i segnali di tensione ai capi di elettrodo e resistenza. Nella seguente tabella (tab. 2.1) sono riportati i valori della frequenza del segnale in ingresso e delle frequenze di campionamento corrispondenti.

freq. segnale ingresso	1 Hz	10 Hz	100 Hz	1 kHz	10 kHz
freq. campionamento	100 Hz	1 kHz	10 kHz	100 kHz	100 kHz

Tab 2.1: frequenza del segnale in ingresso al circuito e corrispondenti frequenze di campionamento dei due segnali differenziali ai capi dell'impedenza e della resistenza.

Le acquisizioni vengono ripetute, a ciascuna frequenza, su tre diversi elettrodi per ogni tipologia di materiale.

Per caratterizzare i dispositivi con gli elettrodi realizzati in PDMS/argento è necessario simulare la presenza del mezzo di coltura all'interno del canale fluido. Per fare questo esso viene riempito con un tampone fosfato salino (PBS) (GIBCO). La concentrazione di sali e l'osmolarità di questa soluzione sono infatti simili a quelle dei mezzi di coltura cellulare. L'interfacciamento al circuito avviene median-

2. MATERIALI E METODI

te due aghi metallici, inserendone le estremità nei due ingressi di ciascun canale degli elettrodi e collegandoli entrambi analogamente a quanto fatto nel caso dei singoli elettrodi. In serie al dispositivo si pone una resistenza di valore 2 k Ω ; il segnale di corrente in ingresso al circuito ha ampiezza 0,5 mA. Le frequenze del segnale in ingresso e di campionamento sono le stesse riportate in tab. 2.1.

Le acquisizioni vengono ripetute, per ciascuna frequenza, su tre dispositivi diversi.

2.4.2 ANALISI DEI DATI

Sia per gli elettrodi che per i dispositivi i segnali acquisiti dall'elettrostimolatore in un intervallo di 10 secondi (fino ad un massimo di 20.000 campioni per segnale) vengono esportati dal software di controllo della scheda di acquisizione ed elaborati in Microsoft Excel. I due segnali di tensione (ai capi della resistenza e ai capi dell'elettrodo/dispositivo) vengono interpolati da una relazione del tipo [77]:

$$V = |V| \cos(\omega t + \Phi_V) \quad (2.10)$$

minimizzando lo scarto quadratico tra il segnale reale e quello interpolante. Il segnale di tensione ai capi dell'impedenza assume quindi la forma:

$$V_Z = |V_Z| \cos \left[\omega (t + \delta t) + \Phi_{V_Z} \right] \quad (2.11)$$

Dove il fattore di correzione δt tiene conto del ritardo intercanale, ovvero il ritardo temporale tra ogni canale introdotto dalla scheda di acquisizione in fase di campionamento. È un parametro caratteristico della scheda, il cui valore assoluto è pari all'inverso della massima frequenza di acquisizione, ovvero, per il modello di scheda di acquisizione utilizzato, $1/200\text{kHZ} = 5 \mu\text{s}$. Alle basse frequenze l'influenza di questo fattore è limitata, a differenza di quanto accade alle frequenze più elevate, dove la differenza tra l'istante temporale della tensione ai capi dell'impedenza e ai capi della resistenza assume una maggiore importanza.

Il segnale di corrente che attraversa il circuito è ricostruito a partire dal segnale di tensione ai capi della resistenza, nota la relazione lineare data dalla prima legge di Ohm ($I = V/R$). Si ottiene una forma del tipo:

$$I = |I| \cos(\omega t + \Phi_I) \quad (2.12)$$

ricordando che il legame tra frequenza e pulsazione è $\omega = 2\pi f$.

Per ogni frequenza (o pulsazione) del segnale in ingresso si ricavano quindi modulo e fase dell'impedenza, note le relazioni [77]:

$$\text{modulo} \quad |Z| = \frac{|V_Z|}{|I|} \quad (2.13)$$

$$\text{fase} \quad \theta_Z = \Phi_{V_Z} - \Phi_I \quad (2.14)$$

Per ogni impedenza (elettrodi realizzati coi diversi materiali conduttivi o dispositivo con elettrodi in PDMS/argento) vengono acquisiti i dati relativi a 3 campioni e viene effettuata una media dei valori di modulo e fase ad ogni frequenza.

Questi due parametri vengono utilizzati per costruire i diagrammi di Bode, costituiti da due grafici:

- nel diagramma del modulo si rappresenta, in scala semilogaritmica, la pulsazione sull'asse delle ascisse, mentre su quello delle ordinate il modulo espresso in decibel, ovvero secondo la formula

$$|F(j\omega)|_{db} = 20 \log_{10} (|F(j\omega)|) \quad (2.15)$$

- nel diagramma della fase si rappresenta, in scala semilogaritmica, la pulsazione sull'asse delle ascisse, mentre su quello delle ordinate la fase espressa in gradi sessagesimali.

Per una trattazione più approfondita dell'analisi in frequenza di un'impedenza si rimanda all'appendice B.

2.5 TEST DEL COMPORTAMENTO ELETTRICO SOTTO FLESSIONE DEI MATERIALI CONDUTTIVI

Gli effetti della flessibilità dei materiali conduttivi vengono valutati mediante dei test sotto deformazione meccanica, verificando che la resistenza elettrica ri-

manga costante a diversi stati di sollecitazione. Inoltre è fondamentale verificare che il materiale non vada incontro a rottura durante la sollecitazione.

2.5.1 SET-UP PER I TEST SOTTO FLESSIONE

Vengono testati separatamente i compositi PDMS/argento, PDMS/grafite e PDMS/grafite+CNT, discussi nel par. 2.2.1. In tutti i casi si realizzano delle sottili strisce di materiale conduttivo spalmando il composito su un vetrino. Dopo aver fatto reticolare il materiale su una piastra a 150 °C per un'ora, si ritagliano dei provini di dimensioni $2 \times 0,5$ cm. L'altezza dei provini misurata al microscopio risulta essere pari a 0,25 mm. I provini vengono depositati sopra una membrana di PDMS di spessore 1 mm, e sopra ad essi viene colato un secondo strato di silicone, in modo da creare un sandwich con una striscia conduttiva al centro. Lo spessore finale dei dispositivi è di circa 2 mm. L'interfaccia del materiale conduttivo con l'esterno, per il collegamento al circuito elettrico di test, è garantita dalla presenza di aghi metallici posti a contatto con le estremità dei provini.

È possibile misurare la resistenza elettrica dei provini conduttivi a diversi stati deformativi in maniera analoga a quanto riportato da Wu et al [65]. Per misurare la resistenza si utilizza un multimetro di precisione (Thurlby Thandar Instruments) in grado di rilevare la resistenza in continua con l'accuratezza di 1 m Ω . Il multimetro viene connesso in serie all'elettrodo mediante gli aghi che fuoriescono da esso (il set-up è riportato in fig. 2.16).

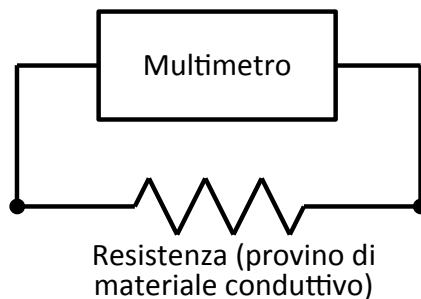


Fig. 2.16: schema del circuito per la misurazione della resistenza dei dispositivi.

La resistenza elettrica viene misurata in corrispondenza di angoli di flessione dei provini di 0, 90° e 180° e di un angolo di torsione di 180° (fig. 2.17), imposti manualmente utilizzando i morsetti del multimetro come afferraggi.

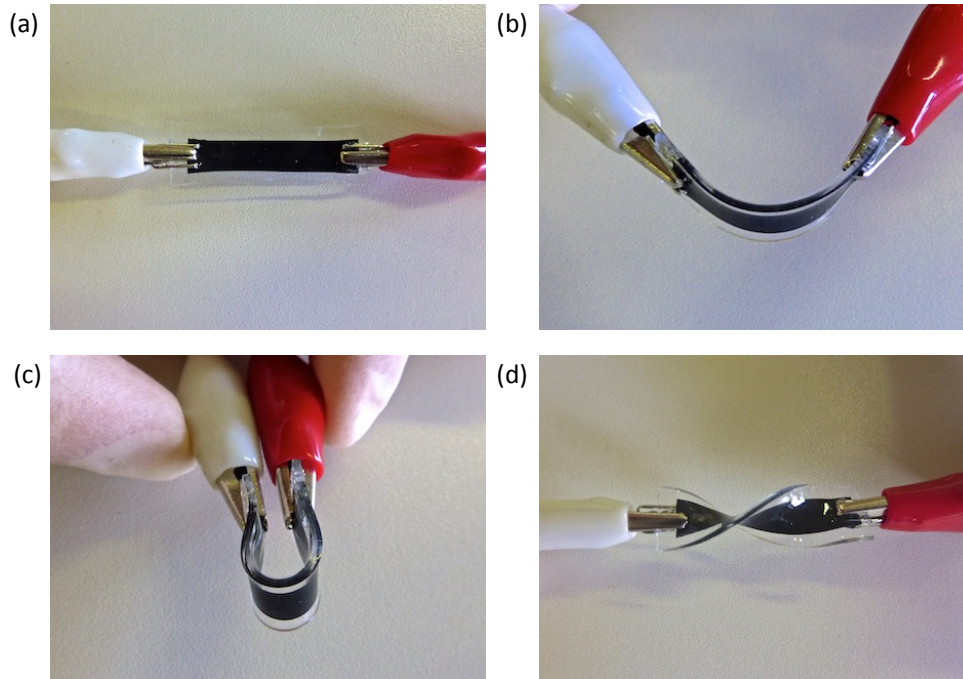


Fig 2.17: stati deformativi imposti alle strisce conduttive: condizione indeformata (a), flessione di 90° (b), flessione di 180° (c) e torsione di 180° (d)

Per ogni stato deformativo vengono effettuate 12 acquisizioni, e la procedura è ripetuta su 3 diversi provini per ciascun materiale.

2.5.2 ANALISI DEI DATI

Per valutare la significatività statistica della differenza di resistenza elettrica in corrispondenza dei diversi stati di sollecitazione, per tutti i tre materiali viene poi effettuato un test statistico di analisi delle varianze (ANOVA). Esso permette di verificare la variabilità tra i gruppi di dati: l'analisi, di tipo univariato con $p < 0,05$, serve a dimostrare se le differenze tra i gruppi sottoposti a differente stato di deformazione sono casuali o deterministiche. Per svolgere l'analisi statistica è stato utilizzato il software SigmaStat (Systat Software Inc.).

2.6 ANALISI COMPUTAZIONALE DEL DISPOSITIVO

Per avere una maggiore comprensione dei fenomeni elettrici all'interno dei dispositivi sono state effettuate delle simulazioni numeriche utilizzando il software commerciale COMSOL Multiphysics. I passi seguiti nella definizione e nella risoluzione del problema sono riassunti nello schema di fig. 2.18.

2. MATERIALI E METODI

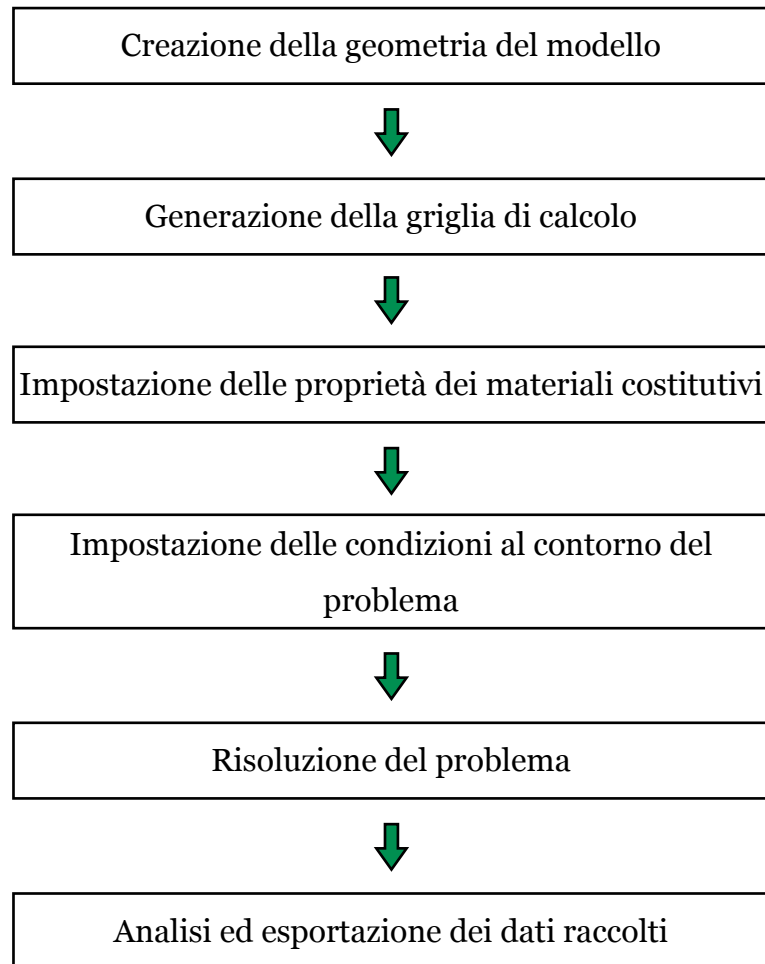


Fig. 2.18: fasi della simulazione del comportamento elettrico dei dispositivi.

Sono stati riprodotti i dispositivi all'interno del programma e sono state indagate le caratteristiche elettriche considerando solamente gli aspetti resistivi e tralasciando quelli tempo-dipendenti. In particolare si è voluto simulare il comportamento del dispositivo in regime di corrente continua, in presenza di liquido all'interno del canale fluidico (a tale scopo è stato scelto il PBS). La caratterizzazione elettrica dei dispositivi ha mostrato come l'aggiunta di nanotubi di carbonio al composito di grafite e PDMS non modifichi in maniera significativa il comportamento elettrico alle basse frequenze del materiale (par. 3.3.2.1). Per evitare di rendere ridondante la trattazione, le simulazioni sono state svolte solamente nel caso di utilizzo di PDMS/argento e di PDMS/grafite+CNT. I compositi conduttivi sono stati utilizzati per realizzare due diversi modelli, che condividono quindi geometria e condizioni al contorno; differiscono solamente per le proprietà dei materiali che vengono imposte. L'interfaccia fisica utilizzata è quella classificata come Correnti

Elettriche in regime stazionario, che fa parte del modulo Potenziale Elettrico presente in Comsol.

Al termine delle simulazioni è stato possibile monitorare la distribuzione delle linee di campo elettrico e valutare l'uniformità della densità di corrente all'interno del canale fluido. Inoltre, calcolando la caduta di potenziale ai capi del modello generato, è stato possibile valutare la resistenza in continua del dispositivo, e questo valore può essere confrontato con la componente continua dell'impedenza del dispositivo con elettrodi in PDMS/argento, ricavata sperimentalmente secondo quanto riportato nel paragrafo 2.4.2.

2.6.1 CREAZIONE DELLA GEOMETRIA DEL MODELLO

La geometria di riferimento è quella del dispositivo al termine del processo di erosione chimica delle pareti di PDMS. Gli elettrodi sono quindi a contatto con il canale fluidico, e la geometria di quest'ultimo risulta alterata a seguito dell'erosione, come riportato nel par. 3.2. Le dimensioni finali sono $450 \times 150 \mu\text{m}$. Il dispositivo è stato riprodotto in Comsol escludendo le estensioni e gli ingressi del canale fluidico, in quanto si può ragionevolmente ritenere che i fenomeni elettrici all'interno di questi componenti, data la posizione degli elettrodi, siano trascurabili. Il modello presenta quindi il canale fluidico e i 2 elettrodi a contatto con esso: queste entità costituiscono tre diversi domini, così come vengono definiti in Comsol. Alle estremità degli elettrodi sono presenti due cilindri che si sviluppano in altezza e rappresentano gli ingressi attraverso i quali si realizzano le connessioni col circuito elettrico. Per ragioni di simmetria è stata simulata la presenza solamente di metà dispositivo, prendendo come piano di simmetria quello passante perpendicolarmente al canale, per il centro di questo. È stato così possibile diminuire l'onere computazionale della simulazione, il che ha permesso di aumentare il numero di elementi della mesh gestiti dal calcolatore. In seguito è possibile estendere i risultati trovati all'intero dispositivo, rammentando la seconda legge di Ohm secondo la quale $R = \rho L/A$ e tenendo conto della seguente schematizzazione elettrica ricavata analiticamente:

2. MATERIALI E METODI

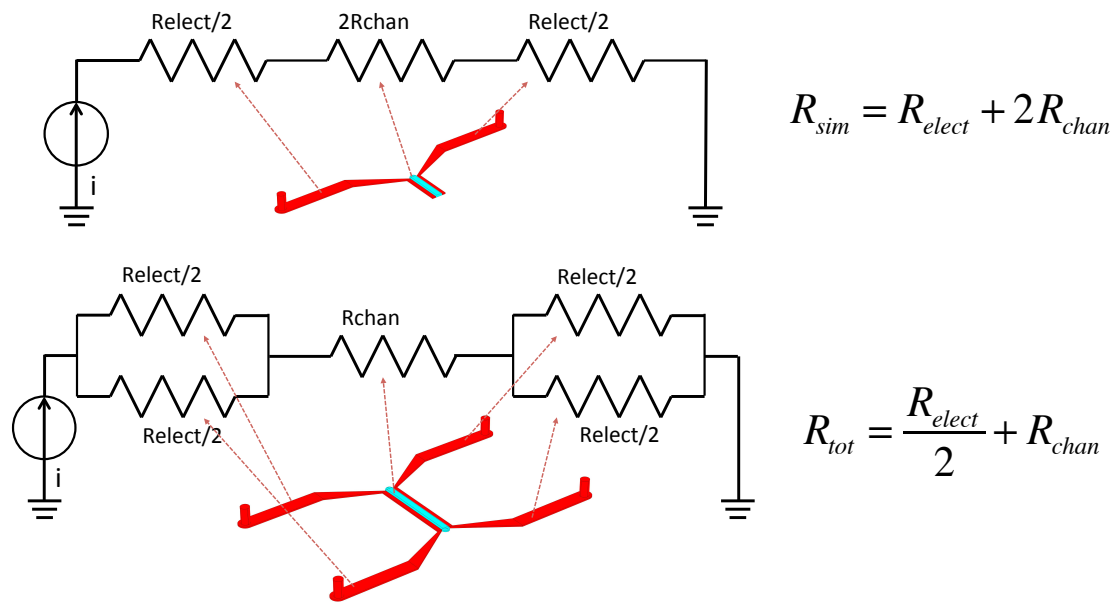


Fig. 2.19: modello elettrico implementato nella simulazione, che sfrutta la simmetria del dispositivo (sopra) e modello elettrico del dispositivo intero (sotto). Sono riportate per entrambi i circuiti le resistenze equivalenti.

È possibile quindi risalire alla resistenza dell'intero dispositivo a partire da quella del modello simulato. Infatti, dal confronto tra i due modelli elettrici emerge che:

$$R_{tot} = \frac{R_{sim}}{2} \quad (2.16)$$

2.6.2 GENERAZIONE DELLA GRIGLIA DI CALCOLO

La griglia di calcolo è stata definita in maniera diversa per gli elettrodi e per il canale fluidico. L'interesse della simulazione è infatti valutare ciò che accade all'interno del canale in presenza di un segnale elettrico applicato ai capi del dispositivo, e si è quindi preferito aumentare il numero di elementi che discretizzano questo dominio rispetto al resto del modello. Per il canale si impone una dimensione massima del singolo elemento di $25 \mu\text{m}$, mentre per gli elettrodi si arriva fino a $200 \mu\text{m}$. La dimensione minima del singolo elemento è imposta per tutto il modello pari a $15 \mu\text{m}$. La mesh viene generata automaticamente imponendo forma tetraedrica agli elementi. La generazione automatica della mesh permette di raccordare tra

loro gli elementi dei 3 diversi domini. La griglia di calcolo è in totale costituita da 336.507 elementi, e presenta un inaffittimento maggiore in corrispondenza delle zone di curvatura della geometria. La griglia è riportata in fig. 2.20, dove è presente anche un ingrandimento relativo al punto di maggiore inaffittimento degli elementi.

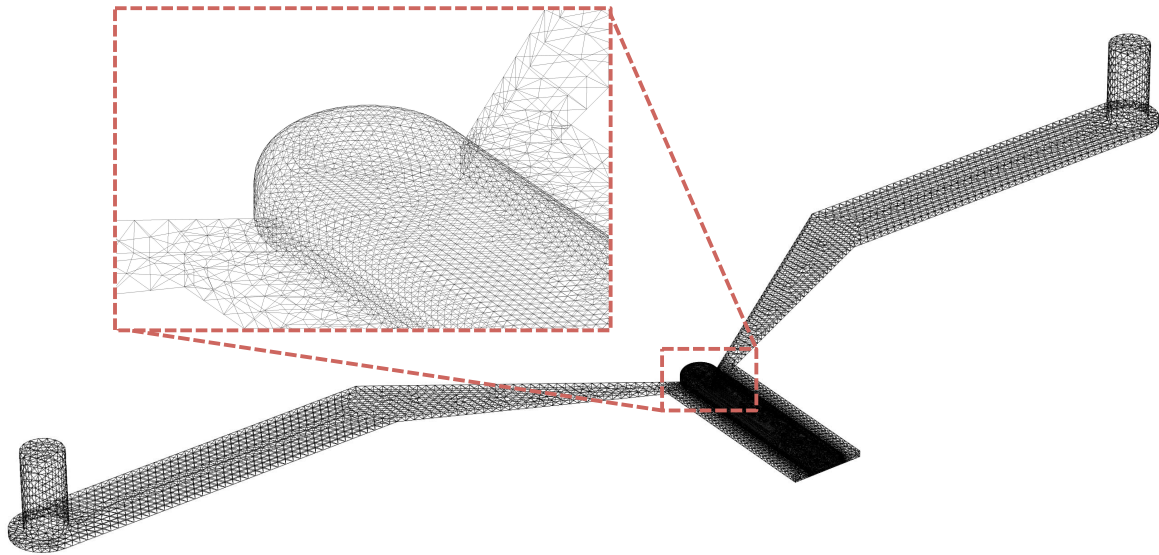


Fig. 2.20 : mesh di tipo tetraedrico usata per discretizzare il modello. Gli elementi visualizzati sono solamente quelli presenti sulla superficie del modello.

2.6.3 PROPRIETÀ DEI MATERIALI COSTITUTIVI

Il modello si compone di tre domini in contatto tra loro: 2 elettrodi e il canale centrale. I parametri richiesti dal modello fisico utilizzato per eseguire la simulazione sono la conduttività elettrica e la permittività elettrica relativa di ogni dominio.

- il materiale che costituisce il canale fluido è il PBS: la sua conduttività elettrica è nota dalla letteratura e pari a 1,5 S/m , mentre la permittività relativa è considerata uguale a quella dell'acqua, pari ad 80 [78];
- il materiale che costituisce gli elettrodi possiede ovviamente caratteristiche diverse a seconda del tipo di riempitivo utilizzato. La resistività elettrica dei tre compositi è ricavata dalla caratterizzazione degli elettrodi illustrata nel paragrafo precedente. Nota la relazione $R = \rho L/A$ che lega resistenza e resistività, è immediato calcolare quest'ultima a partire dal valore di impedenza a basse frequenze degli elettrodi (approssimabile al valore di resistenza in con-

2. MATERIALI E METODI

tinua secondo la trattazione svolta nel successivo par. 3.3.2.1) [77]. La conduttività imposta per il composito di argento e PDMS è quindi pari a $9,65 \cdot 10^5$ S/m; la conduttività imposta per il composito di grafite+CNT e PDMS è invece pari a 13,34 S/m. La permittività in entrambi i casi è considerata uguale a quella dei metalli, di valore unitario [79].

2.6.4 IMPOSTAZIONE DELLE CONDIZIONI AL CONTORNO DEL PROBLEMA

Le condizioni al contorno e iniziali imposte al modello per l'analisi computazionale sono le seguenti (fig. 2.21):

- corrente entrante costante in uno dei due elettrodi (attraverso la superficie superiore dell'ingresso cilindrico): ai fini pratici è stato imposto un valore pari ad 1 mA; messa a terra all'estremità dell'altro elettrodo;
- isolamento elettrico su tutte le altre superfici, comprese quelle che costituiscono il piano di simmetria;
- come valore iniziale (richiesto anche per la risoluzione di un problema stazionario) si imposta potenziale nullo in tutti i domini.

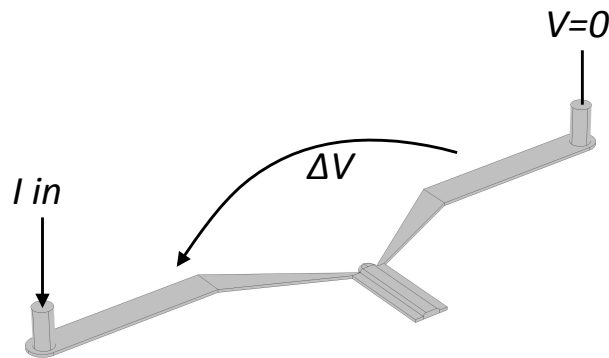


Fig. 2.21: condizioni in ingresso al modello numerico.

Le condizioni al contorno, così come vengono implementate dal software, sono riportate nella tabella 2.2.

CONDIZIONI AL CONTORNO

densità normale di corrente in uno degli ingressi	$-n \cdot J = J_n$ $J_n = I/S$
messa a terra all'altro ingresso	$V = 0$
isolamento elettrico su tutte le altre superfici	$-n \cdot J = 0$

Tab. 2.2: condizioni al contorno del problema computazionale.

2.6.5 RISOLUZIONE DEL PROBLEMA

L'interfaccia fisica utilizzata è quella classificata come Correnti elettriche, che permette di modellizzare il comportamento di correnti elettriche e potenziali elettrici all'interno di mezzi conduttivi. Le equazioni risolutive implementate dal software per risolvere questo tipo di problemi sono riportate in appendice C. Basandosi sulle equazioni risolutive dell'interfaccia fisica, le condizioni al contorno, le condizioni iniziali e le proprietà costitutive dei materiali definite in precedenza, il programma è ora in grado di generare la soluzione del problema.

2.6.6 ANALISI DEI DATI

Terminata l'elaborazione della soluzione da parte del calcolatore, è possibile analizzare i dati mediante immagini e grafici, sfruttando la simmetria del dispositivo. Inoltre, esportando tali dati in formato numerico è possibile effettuare elaborazioni successive. I dati ritenuti più interessanti sono:

- l'intensità del potenziale elettrico e la distribuzione delle linee di campo elettrico all'interno dei dispositivi, in particolare nelle sezioni passanti per diversi punti lungo l'asse dei canali fluidici. Si ricorda che le linee di campo sono le curve ideali che hanno come tangente in ogni punto la direzione del vettore del campo stesso. È possibile, in tal modo, verificare l'uniformità del campo elettrico all'interno del canale fluidico;
- il grafico che mostra la densità di corrente in un piano diretto parallelamente all'asse del canale fluidico, al centro di esso. La densità di corrente è il vettore il cui flusso attraverso una superficie rappresenta la corrente elettrica che attraversa tale superficie, e questa analisi permette quindi di valutare l'uniformità

2. MATERIALI E METODI

mità della corrente all'interno del canale. La densità di corrente è stata inoltre valutata in forma numerica, in corrispondenza di rette parallele all'asse del canale, esportando i dati ed elaborandoli in Excel. Questo permette la costruzione di un grafico che riporta in ordinata la densità di corrente e in ascissa la distanza dal centro del canale. Dal confronto di questi grafici è possibile verificare come la corrente vari lungo la lunghezza e l'altezza del canale;

- la resistenza elettrica del dispositivo, da confrontare con la componente continua dell'impedenza ricavata secondo quanto riportato nel par. 2.4.2. In questo modo è possibile determinare la consistenza dei dati trovati computazionalmente. Per calcolare il valore della resistenza è sufficiente valutare la caduta di potenziale ai loro capi e dividere il valore per la corrente imposta in ingresso: come stabilito dalla seconda legge di Ohm $R = V/I$ (fig. 2.22):

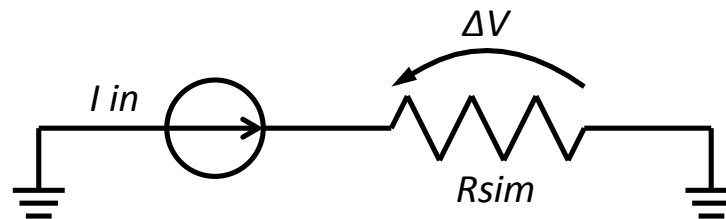


Fig. 2.22: equivalente elettrico del modello.

Il potenziale viene misurato all'estremità dell'elettrodo all'ingresso del quale si è imposta la corrente entrante. Il valore di resistenza trovato è relativo al modello che simula la presenza di metà dispositivo; per trovare la resistenza dell'intera struttura va considerato il rapporto tra le resistenze dei due modelli elettrici, ricavato analiticamente ed espresso dalla 2.15. Mediante questo procedimento è possibile ricavare la resistenza elettrica del singolo elettrodo, del canale fluidico o dell'intero dispositivo.

3. RISULTATI

In questo capitolo verranno presentati i risultati e analizzati i dati delle prove condotte secondo le metodologie presentate nel capitolo precedente.

3.1 DISPOSITIVI MICROFLUIDICI

In fig. 3.1 è riportata l'immagine del wafer, realizzato mediante fotolitografia e utilizzato come master mold secondo quanto riportato nel par. 3.1.



Fig. 3.1: wafer di silicio con microstrutture in rilievo ottenute per fotolitografia. Sono presenti 4 strutture, ciascuna delle quali permette di realizzare un dispositivo. Tra le strutture è presente del silicone, residuo di colate precedenti.

I dispositivi in PDMS sono stati ottenuti per soft lithography colando il prepolimero sul master mold e facendolo polimerizzare a 70 °C per 2 ore. L'altezza delle microstrutture presenti sul dispositivo viene misurata secondo quanto riportato nel par. 2.3. Si ricorda infatti che l'altezza dipende dallo spessore del fotoresist depositato sul wafer di silicio in fase di realizzazione del master mold mediante fotolitografia; va quindi verificata, insieme alle dimensioni laterali delle microstrutture che sono determinate dalla geometria stampata sulla fotomaschera. L'altezza delle microstrutture risulta essere pari a 75 μm . Una sezione del dispositivo è mostrata nella fig. 3.2.

3. RISULTATI

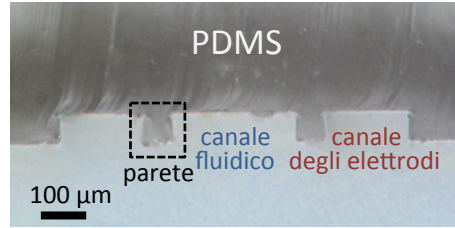


Fig. 3.2: sezione del dispositivo microfluidico con evidenziati i diversi canali.

In seguito i dispositivi sono stati sigillati a un supporto di vetro mediante esposizione al plasma in aria per un minuto. La figura 3.3 riporta l'immagine di un dispositivo microfluidico incollato al supporto di vetro.

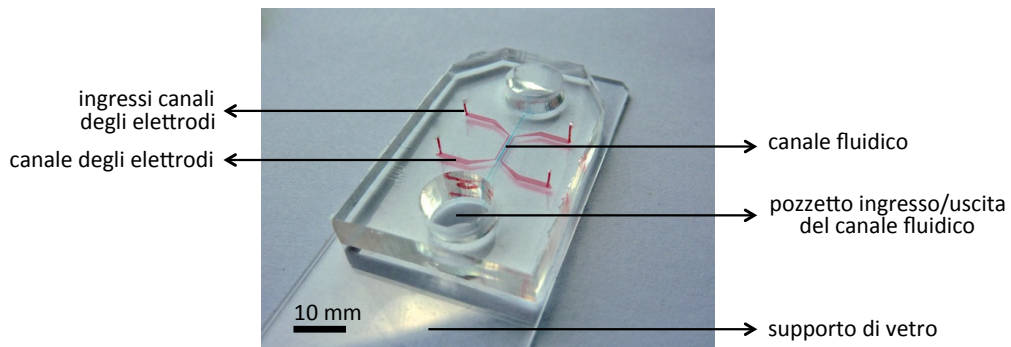


Fig. 3.3: dispositivo in PDMS incollato su supporto di vetro. Il colorante alimentare nei canali permette di individuarne più facilmente il profilo.

3.2 REALIZZAZIONE DEGLI ELETTRODI

Gli elettrodi sono costituiti da una miscela conduttiva a base di PDMS, che prevede di utilizzare come riempitivo alternativamente polvere d'argento (fig.3.4) in rapporto 4:1 in peso, polvere di grafite (fig. 3.5) in rapporto 2:3 in peso o una miscela di grafite e nanotubi di carbonio (fig. 3.6) in rapporto 2:7 in peso.

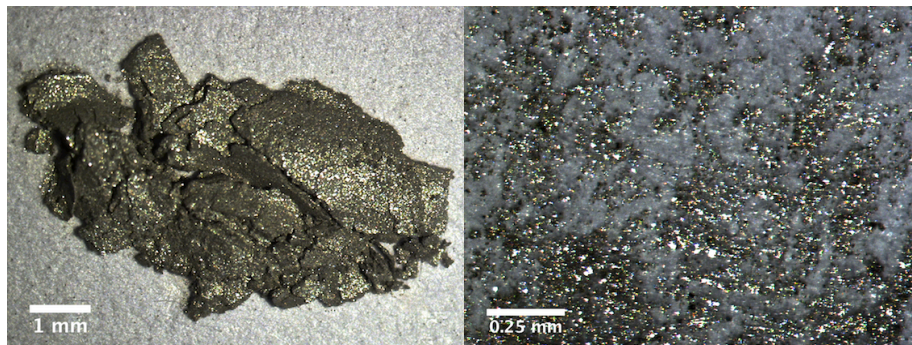


Fig. 3.4: polvere d'argento. Ingrandimento 10× (sx) e 60× (dx).

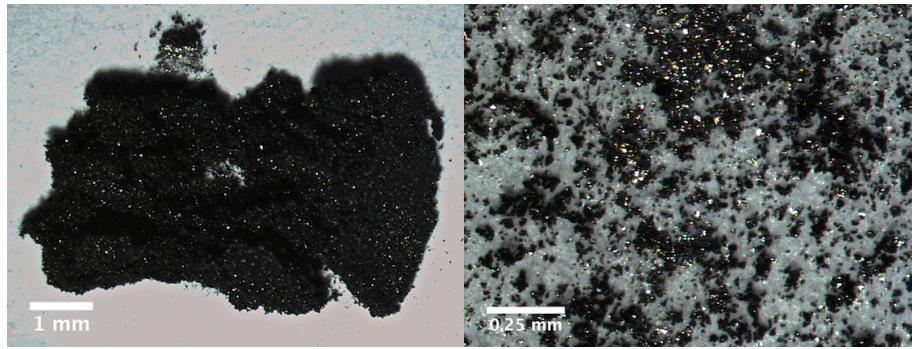


Fig. 3.5: polvere di grafite. Ingrandimento 10× (sx) e 60× (dx).

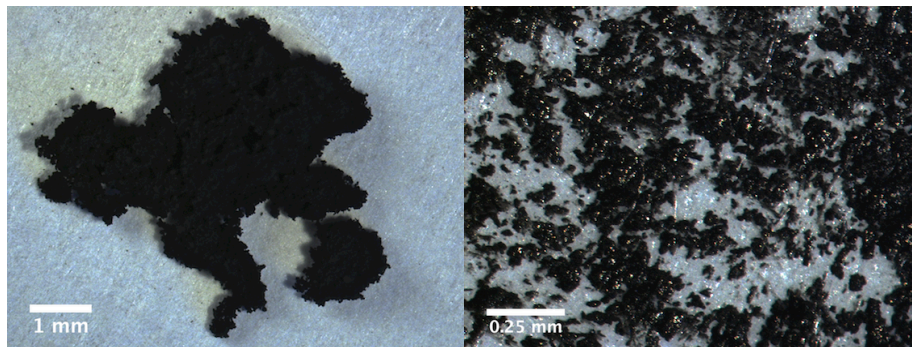


Fig. 3.6: polvere di nanotubi di carbonio. Ingrandimento 10×(sx) e 60× (dx).

La frazione volumetrica di particolato nel composito è stata ricavata a partire dal rapporto in peso tra la polvere e il polimero e dalla densità dei materiali. Utilizzando dunque la formula 2.1 si ottiene:

$$\varphi_{Ag} = \frac{1}{1 + \frac{1}{4} \cdot \frac{\rho_{Ag}}{\rho_{PDMS}}} = 0,27$$

$$\varphi_{graf} = \frac{1}{1 + \frac{3}{2} \cdot \frac{\rho_{graf}}{\rho_{PDMS}}} = 0,23$$

$$\varphi_{graf+CNT} = \frac{1}{1 + \frac{7}{2} \cdot \frac{\rho_{graf+CNT}}{\rho_{PDMS}}} = 0,12$$

3. RISULTATI

In ogni dispositivo viene iniettato manualmente uno dei materiali compositi utilizzando una siringa; viene poi fatto reticolare su una piastra a 150 °C per un'ora. I dispositivi dotati elettrodi sono mostrati in fig. 3.7.

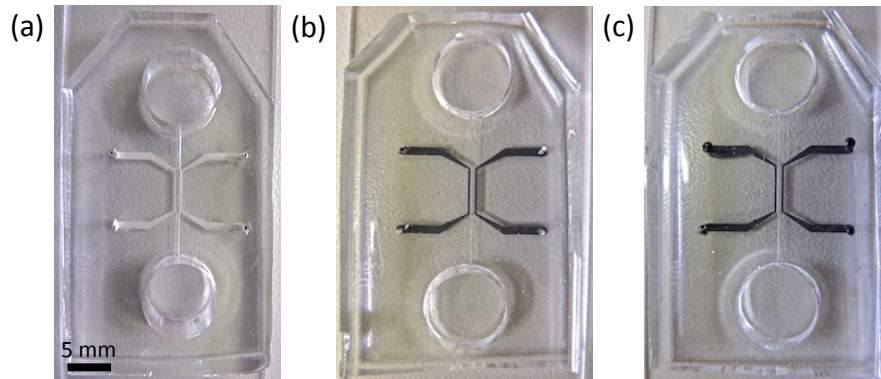


Fig.3.7: dispositivi su supporto di vetro con elettrodi iniettati di PDMS/argento (a), PDMS/grafite (b), PDMS/grafite+CNT (c).

Successivamente si elimina la parete di PDMS che divide il canale fluidico dagli elettrodi mediante un processo di erosione chimica. La soluzione erosiva viene fatta scorrere nel canale fluidico per circa 60 minuti sfruttando il battente idrostatico come mostrato in fig. 3.8, dove è stato utilizzato del colorante alimentare per facilitare la visualizzazione del fluido.

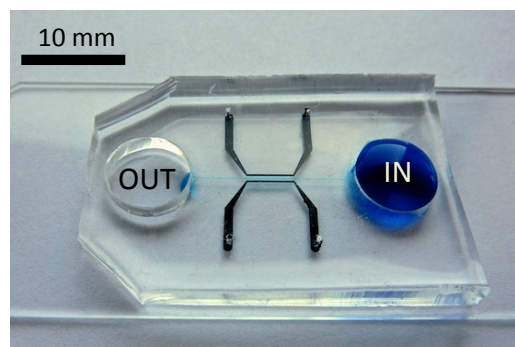


Fig. 3.8: movimentazione del fluido nel dispositivo. La soluzione presente nel pozzetto di destra scorre verso quello di sinistra sfruttando la pressione dovuta al battente idrostatico.

L'immagine successiva (fig. 3.9) mostra una sequenza di fotografie del dispositivo durante il processo di erosione, e si riferisce in particolare al caso in cui gli elettrodi siano costituiti dal composito di PDMS e argento: si può apprezzare il progressivo assottigliamento della parete, fino alla sua totale scomparsa.

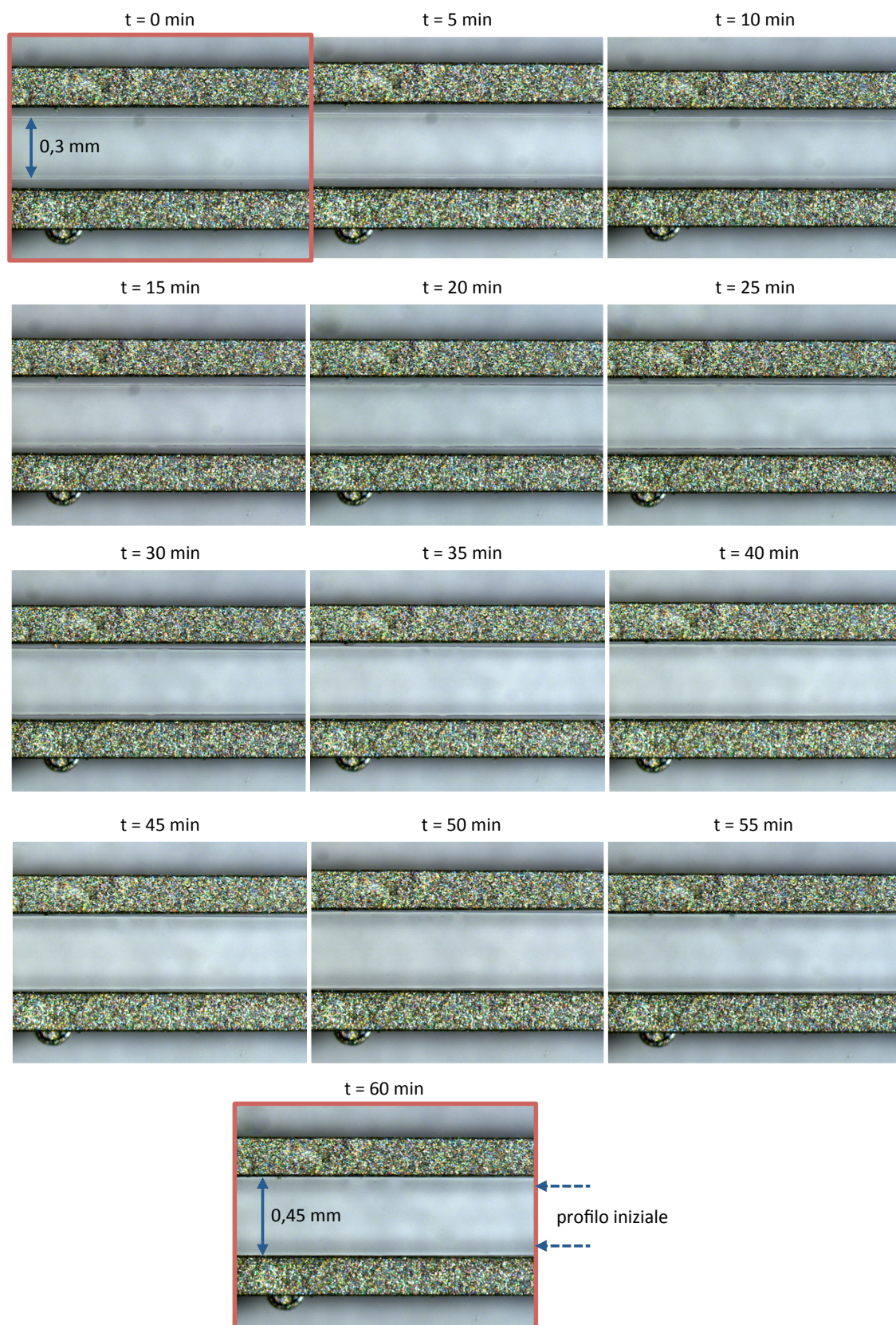


Fig. 3.9: sequenza di immagini acquisite durante il processo di erosione della parete. Si osserva il suo progressivo assottigliamento fino alla totale scomparsa dopo 60 minuti.

3. RISULTATI

Al termine del processo viene valutato l'effetto dell'erosione sulla geometria del canale fluidico. Questo introduce infatti un'alterazione della geometria originale. L'altezza finale risulta essere pari a $150\ \mu\text{m}$ nella parte centrale del canale, e dipende ovviamente dallo spessore della parete in PDMS presente inizialmente nel dispositivo. La fig. 3.10 mostra un confronto tra il dispositivo prima dell'iniezione degli elettrodi (a), dopo l'iniezione degli elettrodi di PDMS/argento (b) o PDMS/grafite (d) e al termine del processo di erosione della parete (c, e).

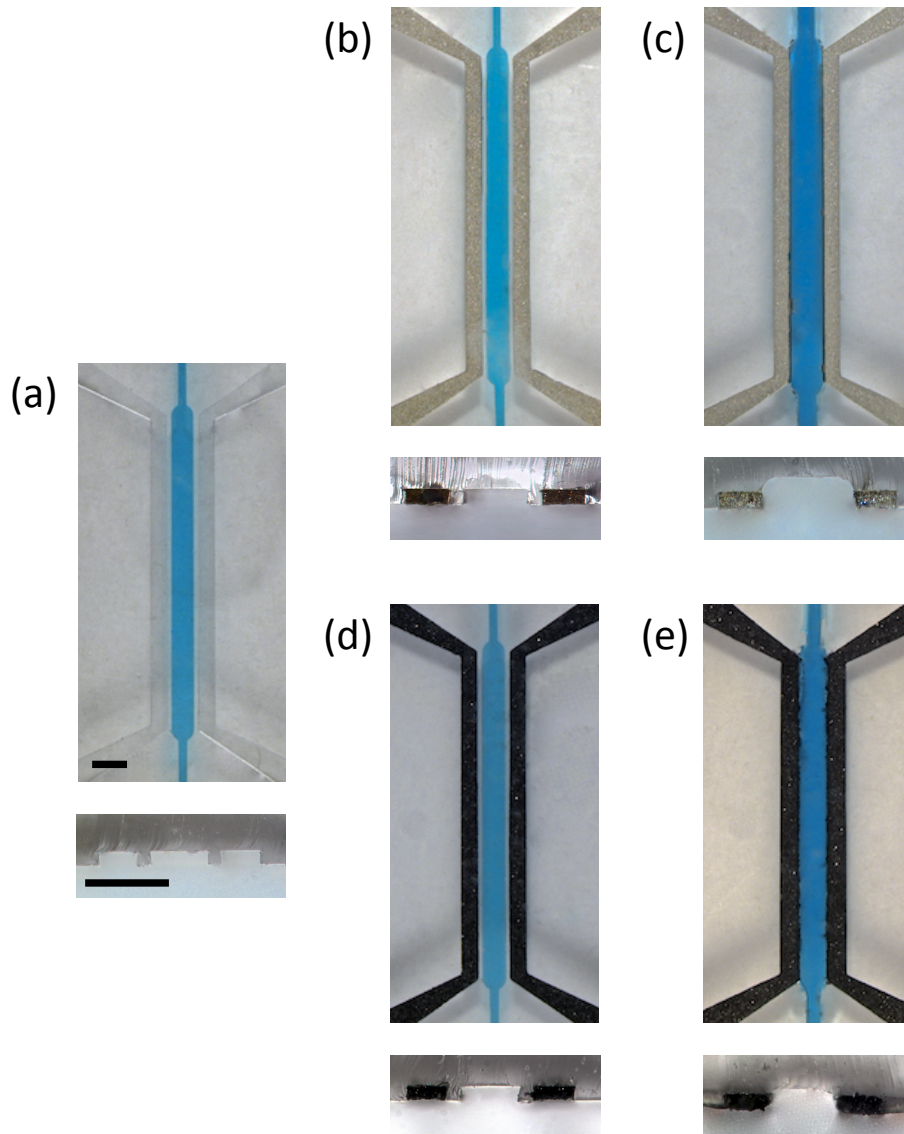


Fig. 3.10: vista dall'alto e sezione di: dispositivo incollato al substrato di vetro (a); dispositivo dopo aver iniettato gli elettrodi nei canali (b, d); dispositivo dopo aver rimosso la parete tra elettrodi e canale fluidico (c, e). Nel canale fluidico è stato iniettato del colorante alimentare in modo da poterne individuare più facilmente il profilo. Le barre di scala misurano entrambe $500\ \mu\text{m}$.

In figura 3.11 è mostrato un confronto tra le sezioni del dispositivo prima dell'iniezione degli elettrodi (a) e al termine del processo di erosione della parete (b), e riporta le dimensioni iniziali e finali dei canali. Si nota come la forma e la geometria del canale fluidico risultino alterate.

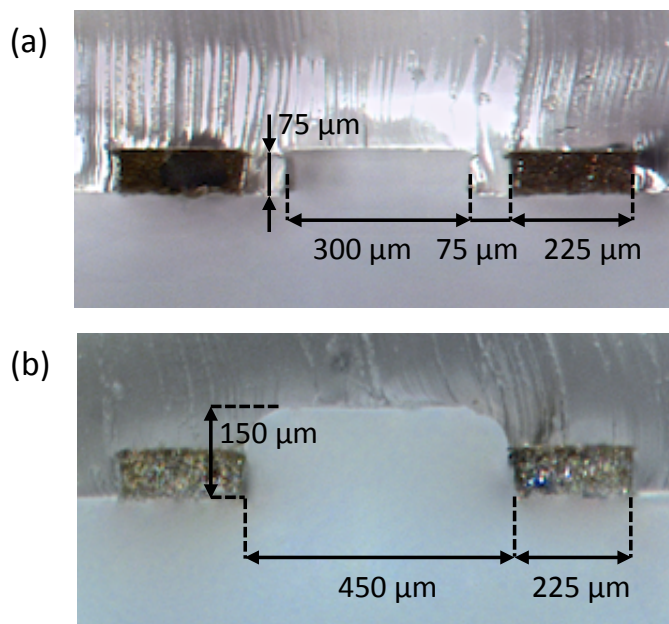


Fig. 3.11: confronto tra le sezioni del dispositivo. L'immagine (b) si riferisce al caso in cui siano stati iniettati elettrodi in PDMS/argento.

Secondo quanto riportato nel paragrafo 2.2.3, è possibile calcolare la resistenza idraulica dei canali in funzione dello spessore della parete, che nell'arco di 60 minuti diminuisce di 75 μm. Note quindi le dimensioni dei canali, la portata della soluzione erosiva all'interno del canale fluidico viene calcolata in funzione del tempo, imponendo che resti costante il battente idrostatico tra i pozzetti del dispositivo (il che equivale a mantenere costantemente un pozzetto pieno e l'altro vuoto). Si ottiene la curva di fig 3.12: il valore iniziale è pari a 0,17 μl/min, mentre al termine dell'erosione la portata vale 3,52 μl/min.

3. RISULTATI

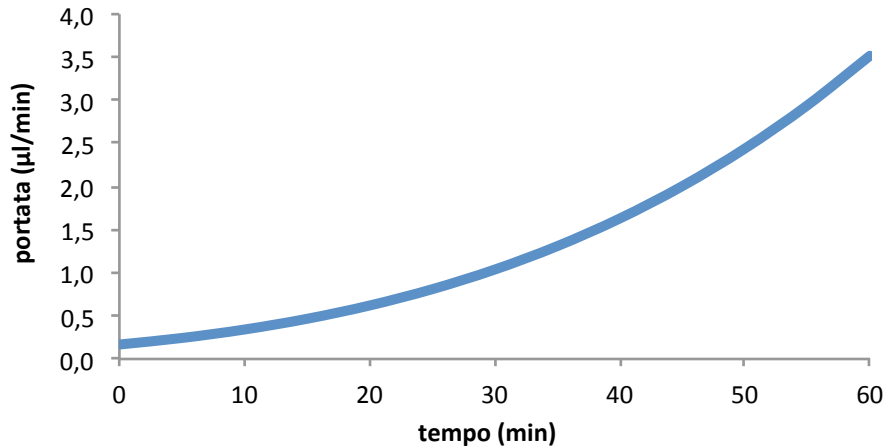


Fig. 3.12: portata della soluzione erosiva all'interno del dispositivo in funzione del tempo. I valori sono stati ricavati valutando lo spessore della parete a intervalli regolari di 5 minuti e calcolando la corrispondente portata a partire dalla legge di Poiseuille.

Per verificare la laminarità del moto del fluido all'interno del canale, requisito fondamentale perché l'erosione della parete avvenga in maniera uniforme lungo le pareti, si calcola il numero di Reynolds relativo al canale centrale e ai due canali di collegamento. I risultati in funzione del tempo sono riportati in fig. 3.13. Dato il valore del numero di Reynolds, sempre inferiore a 0,5, è confermata l'ipotesi iniziale circa la laminarità del moto, che ha consentito la trattazione fluidodinamica svolta.

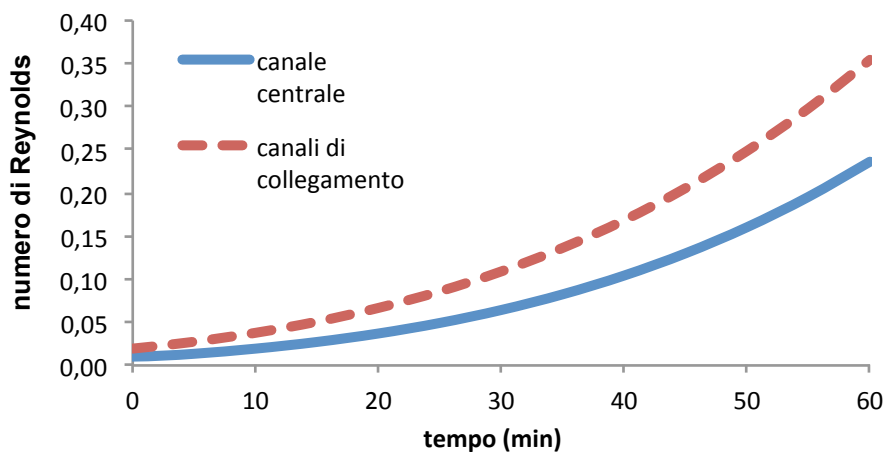


Fig. 3.13: numeri di Reynolds del fluido all'interno dei canali in funzione del tempo. I valori sono stati ricavati a partire dalla portata. Il valore massimo è 0,35 nel caso del canale di collegamento e 0,24 nel caso del canale centrale.

Dai valori di portata si ricava infine il volume di soluzione erosiva fatto scorrere all'interno del canale fluidico per abbattere la parete, che risulta essere pari a 88 μl . Per avere un confronto si consideri che il volume di riempimento di uno dei pozzetto di ingresso (di diametro 8 mm e altezza 4 mm) è pari a circa 200 μl .

3.3 CARATTERIZZAZIONE ELETTRICA

La caratterizzazione elettrica in frequenza è descritta nel paragrafo 2.4. Ogni impedenza (elettrodo o dispositivo realizzato con il composito PDMS/argento) è stata stimolata con segnali in corrente a varie frequenze. Sono state campionate le differenze di potenziale ai capi dell'impedenza e di una resistenza di valore noto in serie ad essa. Per ogni impedenza sono stati acquisiti dati su tre campioni.

3.3.1 SET-UP PER LA CARATTERIZZAZIONE ELETTRICA

Il set-up per condurre i test è riportato in fig. 3.13.

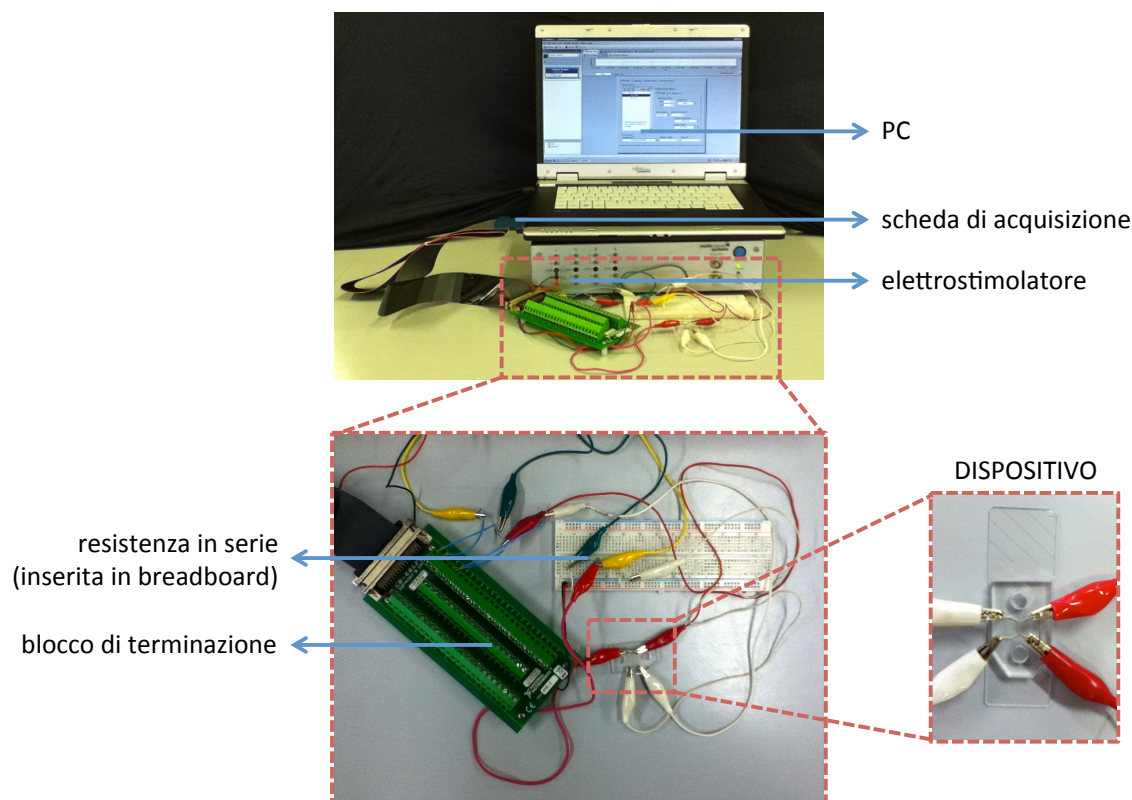


Fig 3.13: set-up per eseguire le prove di conduttività. I diversi componenti sono descritti nel par. 2.4.1. L'immagine si riferisce al caso in cui venga testato il dispositivo; lo stesso circuito viene utilizzato per caratterizzare gli elettrodi.

3. RISULTATI

Le prove sugli elettrodi vengono eseguite ai fini pratici su canali rettilinei (dimensioni $10 \times 0,18 \times 0,15$ mm), realizzati all'interno di dispositivi creati *ad hoc* mediante PDMS e riempiti coi diversi composti conduttivi (fig. 3.14).

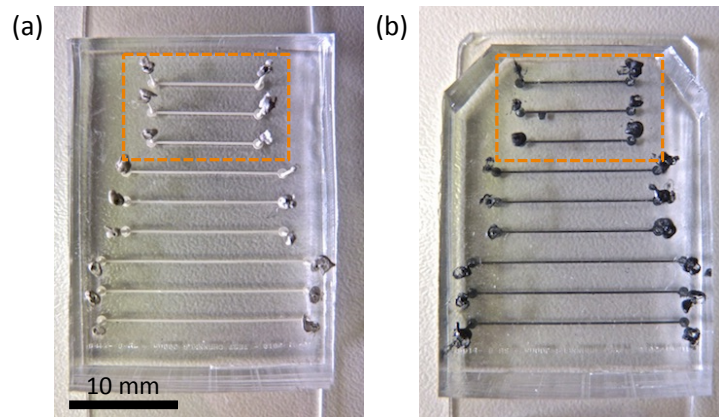


Fig. 3.14: elettrodi rettilinei utilizzati per la caratterizzazione elettrica del composito PDMS/argento (a) e PDMS/grafite (b). I canali utilizzati sono all'interno del rettangolo tratteggiato.

Le connessioni col circuito sono effettuate per mezzo di aghi metallici tronchi, di diametro 0,5 mm, inseriti negli ingressi del canale (fig. 3.15 a). In maniera analoga si effettuano le connessioni quando vengono testati i dispositivi interi (fig. 3.15 b), che si ricorda essere riempiti di PBS per simulare la presenza di mezzo di coltura cellulare. Entrambe le estremità di ogni elettrodo vengono connesse insieme e collegate al circuito di stimolazione e acquisizione.

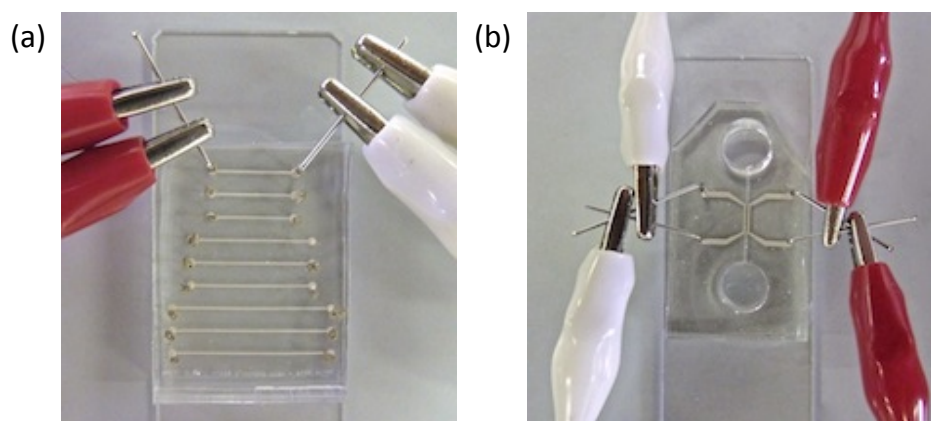


Fig 3.15: connessioni elettriche per la caratterizzazione degli elettrodi (a) e dei dispositivi (b). Una coppia di morsetti permette l'allacciamento al circuito di stimolazione, l'altra serve come collegamento alla scheda di acquisizione. In entrambi i casi, a titolo d'esempio, è stato utilizzato PDMS/argento come composito conduttivo.

3.3.2 ANALISI DEI DATI

La differenza di potenziale ai capi dell'impedenza e della resistenza è stata campionata e i dati sono stati esportati in Excel. A titolo di esempio è riportata l'acquisizione effettuata su uno degli elettrodi rettilinei realizzati col composito PDMS/argento, stimolato con una corrente di ampiezza nominale 2 mA alla frequenza 1 Hz (che equivale a una pulsazione di 6,28 rad/s). La frequenza di campionamento in questo caso si ricorda essere pari a 100 Hz per entrambi i segnali acquisiti. Di seguito è mostrato il grafico (fig. 3.16) che si riferisce alle acquisizioni: esso riporta le cadute di potenziale ai capi resistenza in serie (ddp R) e ai capi dell'elettrodo (ddp Z) in funzione del tempo e si riferisce a una durata temporale di 5 s. È riportato anche il segnale di corrente, ricavato a partire dalla caduta di potenziale ai capi della resistenza (in questo caso di valore 10 Ω).

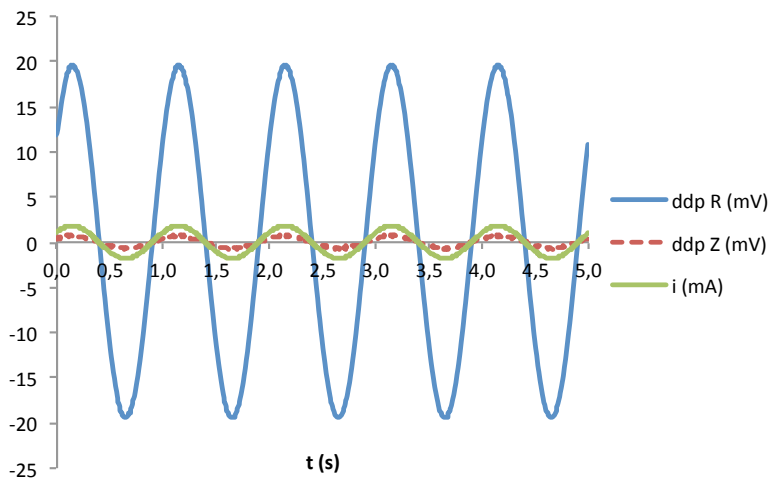


Fig. 3.16: segnali di tensione campionati ai capi della resistenza da 10 Ω e dell'elettrodo in PDMS/argento. La corrente è imposta dall'elettrostimolatore con ampiezza 2 mA e frequenza 1 Hz.

La caduta di potenziale ai capi dell'impedenza e la corrente che attraversa il circuito vengono interpolate nella modalità descritta nel par. 2.4.4, minimizzando lo scarto quadratico tra il segnale interpolato e quello reale. In questo caso specifico i due segnali possono essere scritti nella seguente forma:

$$\Delta V_z = 0,69 \text{ mV} \cdot \cos(6,28 \text{ rad/s} (t + \delta t) - 0,90 \text{ rad})$$

$$i = 1,80 \text{ mA} \cdot \cos(6,28 \text{ rad/s} t - 0,90 \text{ rad})$$

3. RISULTATI

Dove si ricorda che il fattore di correzione δt è dovuto al ritardo intercanale, pari in valore assoluto a $5 \mu s$. L'impedenza può essere quindi ricavata in termini di modulo e fase:

$$|Z|_{1Hz} = \frac{0,69mV}{1,80mA} = 0,38\Omega$$

$$\varphi_{1Hz} = (-0,90rad + 0,90rad) = 0$$

Dal grafico appare evidente come a questa frequenza la corrente e la caduta di tensione ai capi dell'elettrodo siano tra loro in fase; ciò è confermato dalla trattazione analitica.

Ripetendo la procedura per tutte le frequenze e mediando i risultati ottenuti sui tre campioni si ricava l'impedenza in funzione della frequenza, che viene utilizzata per costruire il diagramma di Bode. In questo modo vengono caratterizzati i tre diversi materiali conduttivi e il dispositivo con elettrodi in PDMS/argento.

3.3.2.1 Diagrammi di Bode degli elettrodi

La tabella 3.1 riporta, alle diverse frequenze di stimolazione, il modulo e la fase dell'impedenza dell'elettrodo realizzato in PDMS e argento. In fig. 3.17 sono rappresentati i diagrammi di Bode di modulo e fase dell'impedenza dell'elettrodo, ricostruiti a partire dai valori in tabella.

PDMS/ARGENTO			
f (Hz)	Z (kΩ)	Z (dB)	$\Delta\varphi$ (deg)
1	$3,87 \cdot 10^{-4}$	-68,25	-0,1
10	$3,86 \cdot 10^{-4}$	-68,27	0,0
100	$4,08 \cdot 10^{-4}$	-67,79	0,3
1000	$3,84 \cdot 10^{-4}$	-68,32	-0,4
10000	$3,65 \cdot 10^{-4}$	-68,74	-2,3

Tab 3.1: modulo e fase dell'impedenza elettrica di un elettrodo in PDMS/argento in funzione della frequenza del segnale in ingresso. I valori numerici sono ottenuti mediando i dati ottenuti dalla caratterizzazione di tre diversi elettrodi.

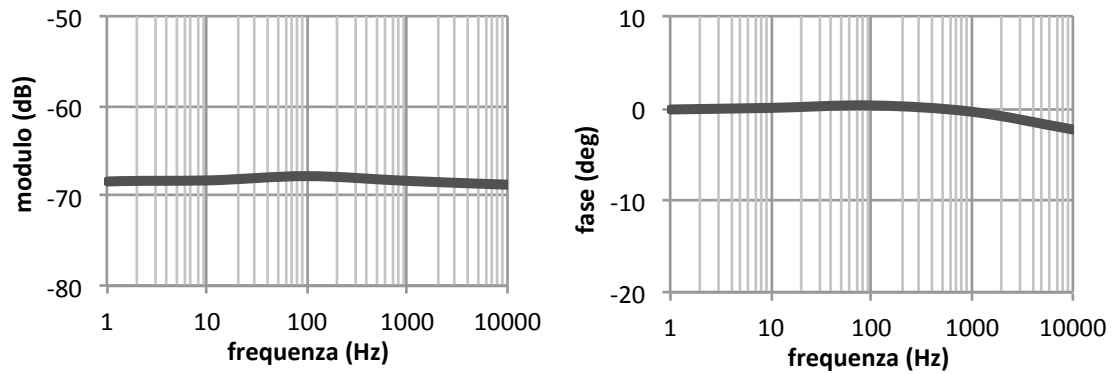


Fig. 3.17: diagrammi di Bode di un elettrodo in PDMS/argento.

La tabella 3.2 riporta, alle diverse frequenze di stimolazione, il modulo e la fase dell'impedenza dell'elettrodo realizzato in PDMS e grafite. In fig. 3.18 sono rappresentati i diagrammi di Bode di modulo e fase dell'impedenza dell'elettrodo, ricostruiti a partire dai valori in tabella.

<i>PDMS/GRAFITE</i>			
f (Hz)	$ Z $ (k Ω)	$ Z $ (dB)	$\Delta\varphi$ (deg)
1	45,10	33,08	0,0
10	44,22	32,91	0,0
100	45,31	33,12	-0,2
1000	39,88	32,02	-1,6
10000	41,28	32,32	-10,8

Tab 3.2: modulo e fase dell'impedenza elettrica di un elettrodo in PDMS/grafite in funzione della frequenza del segnale in ingresso. I valori numerici sono ottenuti mediando i dati ottenuti dalla caratterizzazione di tre diversi elettrodi.

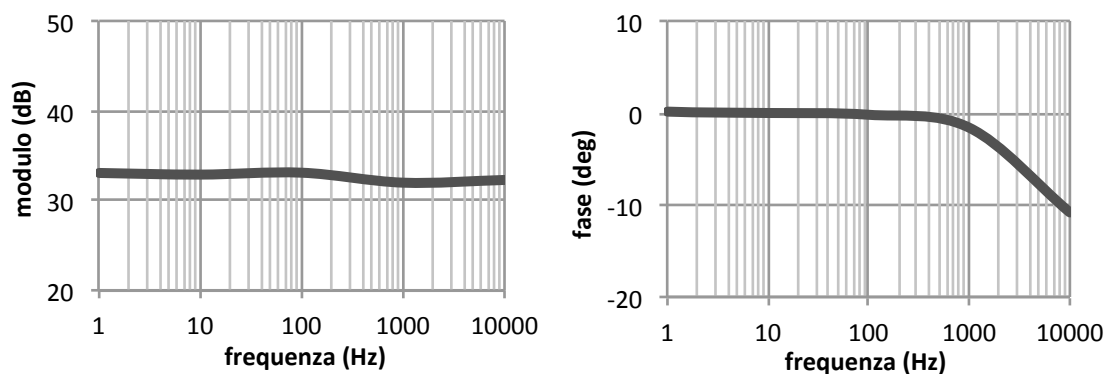


Fig. 3.18: diagrammi di Bode di un elettrodo in PDMS/grafite.

3. RISULTATI

La tabella 3.3 riporta, alle diverse frequenze di stimolazione, il modulo e la fase dell'impedenza dell'elettrodo realizzato in PDMS e grafite + nanotubi di carbonio. In fig. 3.19 sono rappresentati i diagrammi di Bode di modulo e fase dell'impedenza dell'elettrodo, ricostruiti a partire dai valori in tabella.

<i>PDMS/grafite+CNT</i>			
f (Hz)	$ Z $ (k Ω)	$ Z $ (dB)	$\Delta\varphi$ (deg)
1	28,42	29,07	0,0
10	27,59	28,82	0,0
100	27,29	28,72	0,1
1000	26,45	28,45	-1,6
10000	25,50	28,13	-5,2

Tab 3.3: modulo e fase dell'impedenza elettrica di un elettrodo in PDMS/grafite+CNT in funzione della frequenza del segnale in ingresso. I valori numerici sono ottenuti mediando i dati ottenuti dalla caratterizzazione di tre diversi elettrodi.

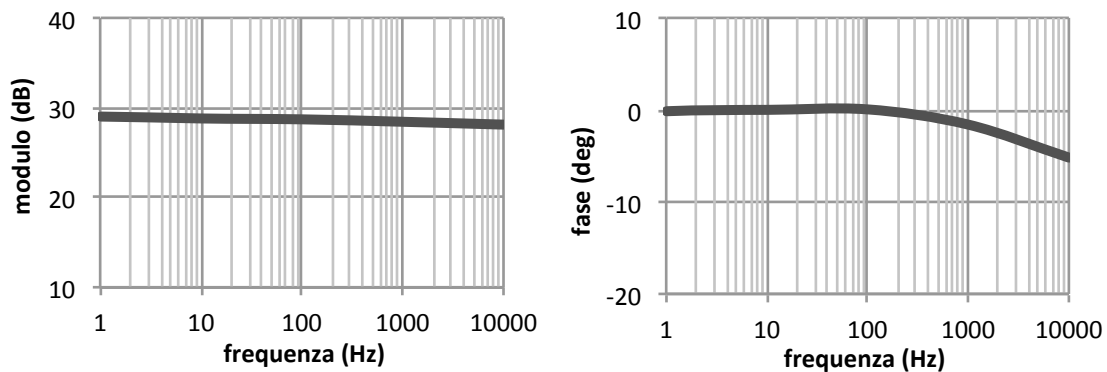


Fig. 3.19: diagrammi di Bode di un elettrodo in PDMS/grafite+CNT.

Per tutti e tre i materiali considerati la risposta in frequenza suggerisce un comportamento del tipo filtro passa-basso: infatti si nota come alle alte frequenze (oltre 1 kHz) lo sfasamento tra segnale in ingresso e in uscita tenda ad aumentare. Questo comportamento è più evidente nel caso degli elettrodi di PDMS/grafite rispetto agli altri due casi considerati. La limitata estensione in frequenza del diagramma di Bode impedisce la determinazione della frequenza di taglio: infatti il diagramma del modulo è una retta parallela all'asse delle ascisse. Questo permette però di affermare che per tutti i materiali considerati, la frequenza di taglio è cer-

tamente superiore a 10 kHz. Tutte le frequenze del segnale in ingresso contenute tra 0 e la frequenza di taglio vengono fatte passare; al di là di tale frequenza vengono eliminate i componenti del segnale. È possibile determinare il valore della resistenza elettrica in continua (un'impedenza si comporta infatti come una resistenza per frequenze tendenti a 0). Esso è pari al valore del modulo alla frequenza 1 Hz, espresso in Ω .

La conduttività elettrica di un materiale (σ) è l'inverso della resistività elettrica (ρ). La seconda legge di Ohm ($R = \rho L/A$) stabilisce che la resistività è a sua volta inversamente proporzionale alla resistenza elettrica, e dal momento che le dimensioni degli elettrodi sono note, è immediato risalire al suo valore in regime di corrente continua. Il valore di conduttività sarà poi utilizzato come proprietà costitutiva dei materiali per svolgere le simulazioni numeriche tramite Comsol.

I valori di resistenza di ogni elettrodo e i relativi valori di resistività e conduttività dei materiali costitutivi sono riportati nella tab. 3.4.

ELETTRODO	R	$\rho (=R \cdot A/L)$	$\sigma (=L/R \cdot A)$
PDMS/argento	$0,38 \pm 0,04 \Omega$	$1,04 \pm 0,11 10^{-6} \Omega m$	$9,65 \pm 0,99 10^5 S/m$
PDMS/grafite	$45,10 \pm 20,67 k\Omega$	$12,18 \pm 5,58 10^{-2} \Omega m$	$9,40 \pm 4,00 S/m$
PDMS/grafite+CNT	$28,42 \pm 5,25 k\Omega$	$7,67 \pm 1,42 10^{-2} \Omega m$	$13,34 \pm 2,55 S/m$

Tab. 3.4: resistenza, resistività e conduttività elettrica media dei materiali conduttivi in continua ($f = 0$). Deviazione standard su 3 campioni.

I valori riportati evidenziano come la conduttività degli elettrodi in PDMS e argento sia 5 ordini di grandezza superiore rispetto agli elettrodi in PDMS e grafite (con o senza aggiunta dei nanotubi). L'aggiunta di una percentuale di nanotubi pari al 33 % in volume alla polvere di grafite migliora le prestazioni degli elettrodi, in quanto la conduttività aumenta di circa il 50 %.

3.3.2.2 Diagramma di Bode del dispositivo

Anche nel caso del dispositivo con gli elettrodi in PDMS/argento la procedura utilizzata per costruire i diagrammi di Bode è analoga. La tabella 3.5 riporta, alle diverse frequenze di stimolazione, il modulo e la fase dell'impedenza del dispositi-

3. RISULTATI

vo. In fig. 3.20 sono rappresentati i diagrammi di Bode di modulo e fase dell'impedenza del dispositivo, ricostruiti a partire dai valori in tabella.

DISPOSITIVO CON ELETTRODI IN PDMS/argento

f (Hz)	A (k Ω)	A (dB)	$\Delta\varphi$ (deg)
1	0,87	-1,16	-5,6
10	0,85	-1,42	-4,5
100	0,85	-1,39	-9,5
1000	0,75	-2,52	-9,1
10000	0,64	-3,84	-24,4

Tab 3.5: modulo e fase dell'impedenza elettrica di un dispositivo con elettrodi in PDMS/argento in funzione della frequenza del segnale in ingresso. I valori numerici sono ottenuti mediando i dati ottenuti dalla caratterizzazione di tre diversi dispositivi.

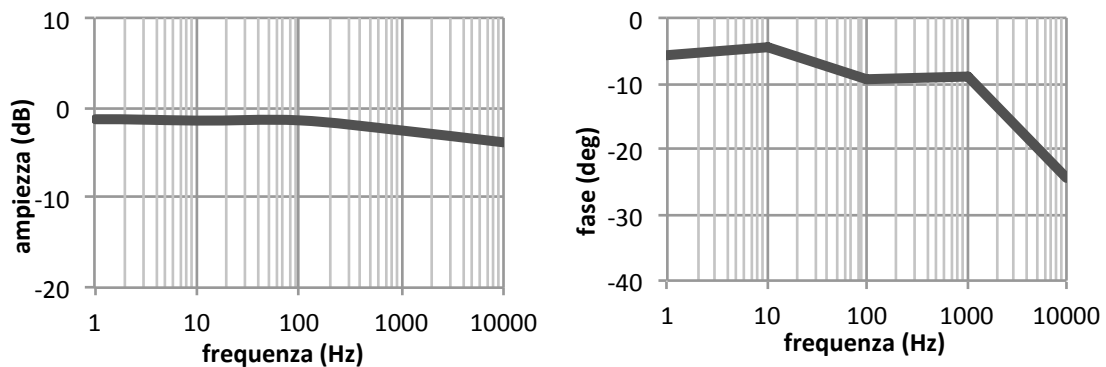


Fig. 3.20: diagrammi di Bode del dispositivo con elettrodi in PDMS/argento.

Si vede in questo caso come gli effetti capacitivi siano predominanti: questo è dovuto all'interfaccia elettrodo-elettrolita. Il diagramma del modulo mostra però come sia possibile applicare segnali in ingresso con contenuto in frequenza sino a 1 kHz senza che questi vengano smorzati. Il valore di resistenza a 1 Hz ricavato sperimentalmente (il modulo dell'impedenza espresso in Ω), considerato pari a quello in regime di corrente continua, risulta essere pari a 0,87 k Ω e verrà in seguito confrontato con il valore calcolato attraverso le simulazioni numeriche. In questo modo sarà possibile confermare la consistenza delle simulazioni stesse nell'analizzare il comportamento elettrico dei dispositivi.

3.4 COMPORTAMENTO ELETTRICO SOTTO FLESSIONE DEI MATERIALI CONDUTTIVI

Per ogni materiale conduttivo vengono effettuate delle prove di conduttività sotto flessione. Il procedimento prevede di realizzare dei provini di materiale (di dimensioni $20 \times 5 \times 0,25$ mm) tra due strati di silicone (fig. 3.21) e deformarli secondo angoli prestabiliti misurandone la resistenza mediante un multimetro di precisione

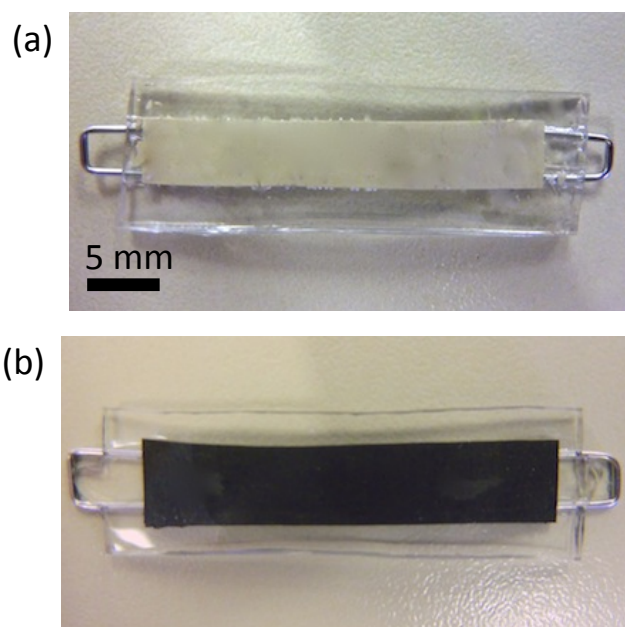


Fig. 3.21: provini di materiale conduttivo realizzati tra due strati di PDMS: PDMS/argento (a) e PDMS/grafite (b). Sono presenti anche gli aghi metallici per l'allacciamento al circuito elettrico.

Vengono realizzati 3 provini per ogni tipologia di materiale e vengono effettuate 12 misurazioni per ogni provino in corrispondenza di ciascuno stato deformativo. Durante le prove di conduttività sotto deformazione nessun provino è andato incontro a rottura. I dati riguardanti la resistenza elettrica sono stati raccolti in istogrammi e raggruppati in base al provino a cui si riferiscono. I colori identificano i 4 stati deformativi imposti: stato indeformato, flessione di 90° o 180° , torsione di 180° . I dati relativi ai tre provini vengono poi mediati e riportati in un quarto gruppo. Gli istogrammi sono riportati nelle figure seguenti (fig. 3.22, 3.23,

3. RISULTATI

3.24). Vengono inoltre riportati i valori di resistenza elettrica relativi ai dati medi di ogni stato deformativo nelle tabelle 3.6, 3.7 e 3.8.

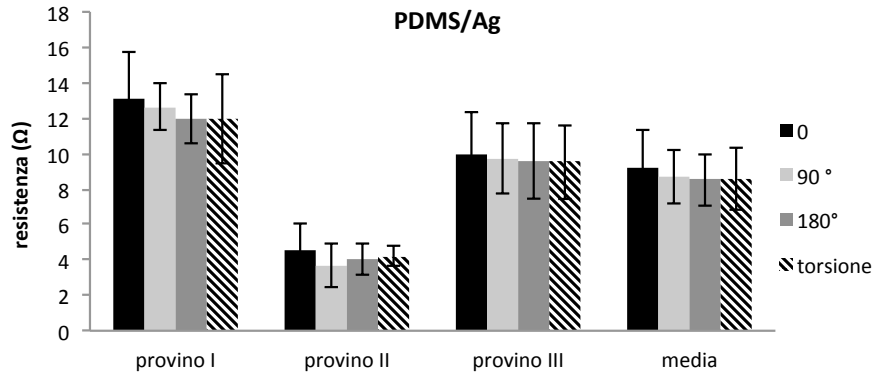


Fig. 3.22: istogramma della resistenza elettrica in corrispondenza di diversi stati deformativi per i 3 provini di PDMS/argento. Per ogni provino si acquisiscono 12 misure.

PDMS/argento	
CONDIZIONE	RESISTENZA
indeformato	$9,10 \pm 2,16 \Omega$
flessione 90°	$8,67 \pm 1,51 \Omega$
flessione 180°	$8,51 \pm 1,47 \Omega$
torsione 180°	$8,56 \pm 1,73 \Omega$

Tab. 3.6: valori medi e deviazione standard della resistenza elettrica di un provino di PDMS/argento sottoposto a diversi stati deformativi.

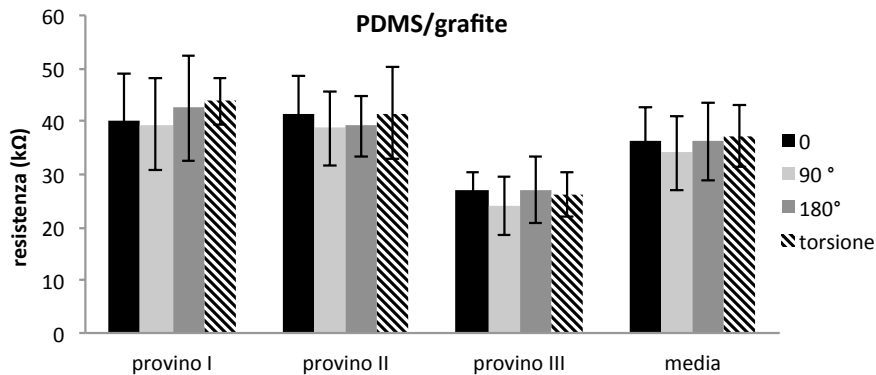


Fig. 3.23: istogramma della resistenza elettrica in corrispondenza di diversi stati deformativi per i 3 provini di PDMS/grafite. Per ogni provino si acquisiscono 12 misure.

PDMS/grafite	
CONDIZIONE	RESISTENZA
indeformato	36,10 ± 6,52 kΩ
flessione 90°	33,98 ± 7,08 kΩ
flessione 180°	36,20 ± 7,36 kΩ
torsione 180°	37,14 ± 5,74 kΩ

Tab. 3.6: valori medi e deviazione standard della resistenza elettrica di un provino di PDMS/grafite sottoposto a diversi stati deformativi.

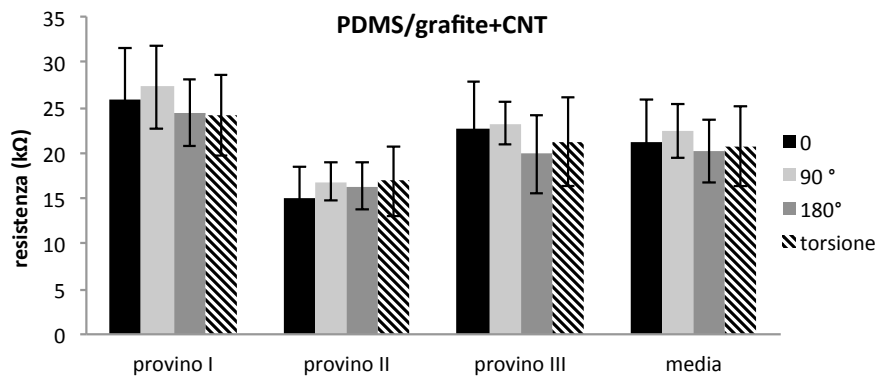


Fig. 3.24: istogramma della resistenza elettrica in corrispondenza di diversi stati deformativi per i 3 provini di PDMS/grafite+CNT. Per ogni provino si acquisiscono 12 misure.

PDMS/grafite+CNT	
CONDIZIONE	RESISTENZA
indeformato	21,17 ± 4,72 kΩ
flessione 90°	22,41 ± 3,00 kΩ
flessione 180°	20,22 ± 3,54 kΩ
torsione 180°	20,75 ± 4,42 kΩ

Fig. 3.19: valori medi e deviazione standard della resistenza elettrica di un provino di PDMS/grafite sottoposto a diversi stati deformativi.

Per tutti i tre materiali è stato effettuato un test statistico di analisi della varianza (ANOVA) per verificare la variabilità tra i gruppi di dati. L'analisi, di tipo univariato con $p < 0,05$ dimostra come, per ogni categoria di provini considerata, la differenza di resistenza elettrica tra i gruppi sottoposti a differente stato di sollecitazione meccanica sia casuale. Viene quindi dimostrato come lo stato deformativo

3. RISULTATI

dei materiali compositi, perlomeno nei termini in cui è stato analizzato, non comporta una variazione della conducibilità elettrica.

3.5 ANALISI DEL MODELLO COMPUTAZIONALE DEL DISPOSITIVO

Le simulazioni numeriche in regime stazionario consentono di indagare le caratteristiche elettriche dei dispositivi realizzati alternativamente con elettrodi in PDMS/argento o in PDMS/grafite+CNT. Le proprietà costitutive dei materiali conduttivi sono ricavate attraverso la caratterizzazione elettrica (par. 3.3.2.1): per il PDMS/argento $\sigma = 9,65 \cdot 10^5$ S/m; per il PDMS/grafite+CNT $\sigma = 13,34$ S/m. Il modello è stato sviluppato nella modalità descritta nel paragrafo 2.6: la corrente entrante in uno degli elettrodi è pari a 1 mA; all'altro capo del dispositivo si impone la messa a terra elettrica. Dopo la generazione della soluzione da parte del programma, è stata analizzata l'intensità del potenziale elettrico, la distribuzione delle linee di campo e della densità di corrente ed è stato ricavato il valore di resistenza elettrica in corrente continua del dispositivo. Il modello sfrutta la simmetria del dispositivo lungo il piano perpendicolare al canale fluidico e passante per il suo centro. La geometria del dispositivo implementata nella simulazione compare in fig. 3.25, dove viene evidenziato inoltre il piano di simmetria.

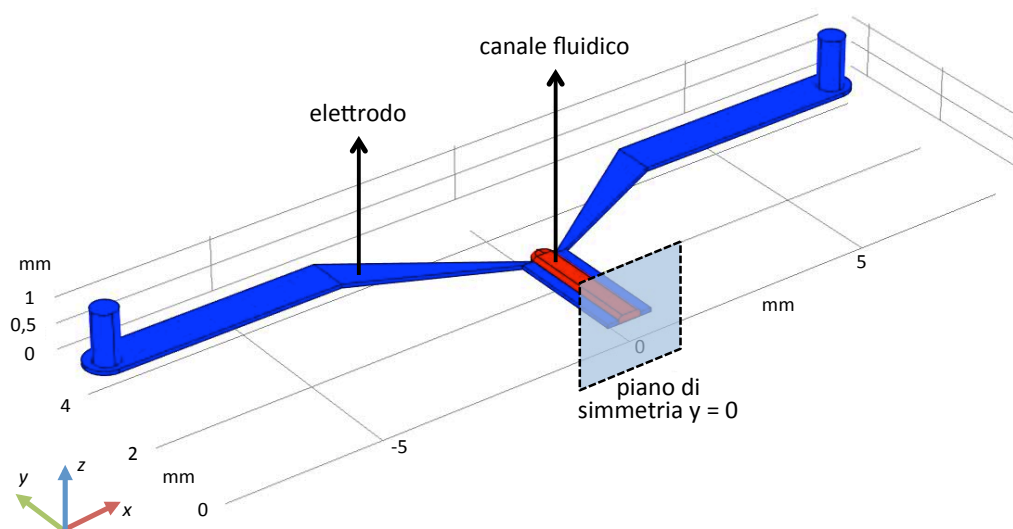


Fig. 3.25: geometria del dispositivo utilizzata nella simulazione. Le misure sono espresse in mm.

In fig. 3.26 sono riportate le proiezioni lungo gli assi cartesiani della geometria del dispositivo, in modo da avere un riferimento per le immagini successive.

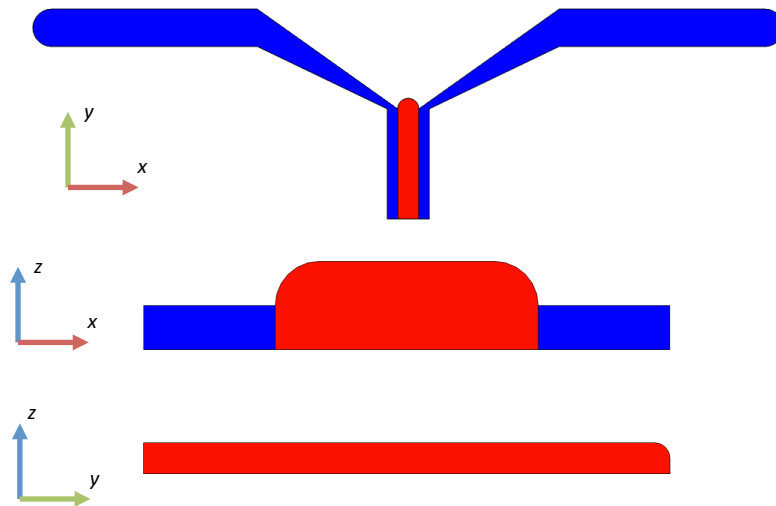


Fig. 3.26: proiezioni della geometria lungo gli assi cartesiani. Dall'alto verso il basso: piano $z = 37,5 \mu\text{m}$, piano $y = 0$; piano $x = 0$.

3.5.1 SIMULAZIONE DEL DISPOSITIVO CON ELETTRODI IN PDMS E ARGENTO

Verranno ora analizzati e discussi i risultati della simulazione per quanto riguarda il dispositivo i cui elettrodi sono costituiti dal composito di PDMS/argento.

3.5.1.1 Intensità del potenziale elettrico

La figura seguente (fig. 3.27) riporta l'intensità del potenziale elettrico nei piani $z = h_{el}/2$ (ovvero metà altezza degli elettrodi, pari a $37,5 \mu\text{m}$) e $y = 0$. Nel piano $x = 0$ il potenziale elettrico è costante, pari a $0,47 \text{ V}$. Da un capo all'altro del dispositivo il potenziale diminuisce: si noti come la caduta di potenziale sia quasi del tutto a carico del canale fluidico: ciò è dovuto all'elevata conduttività del composito PDMS/argento rispetto al PBS.

3. RISULTATI

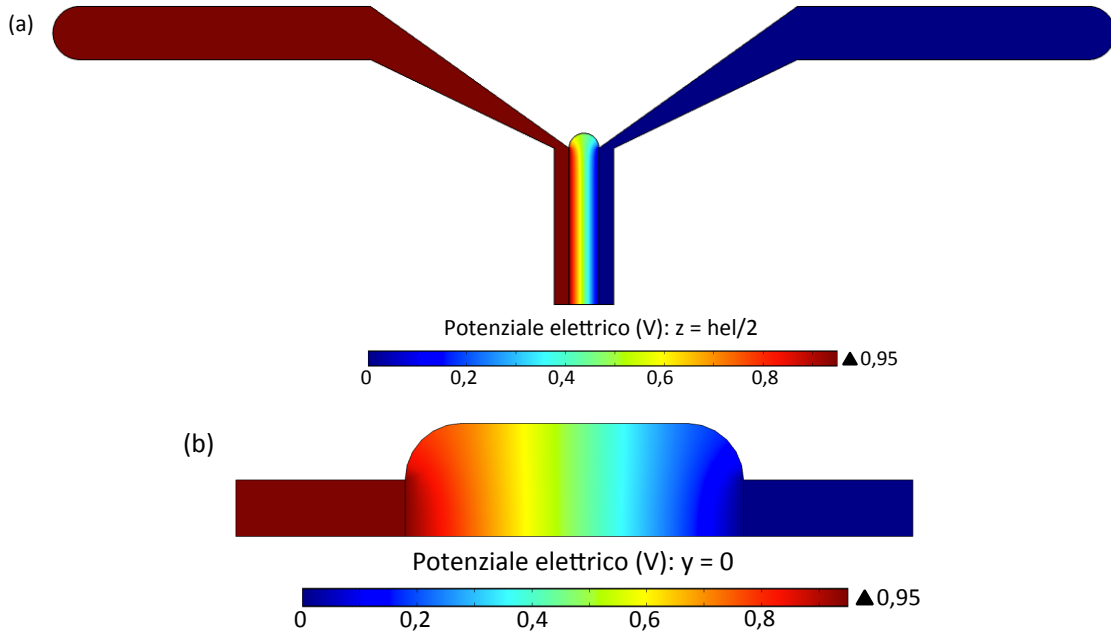
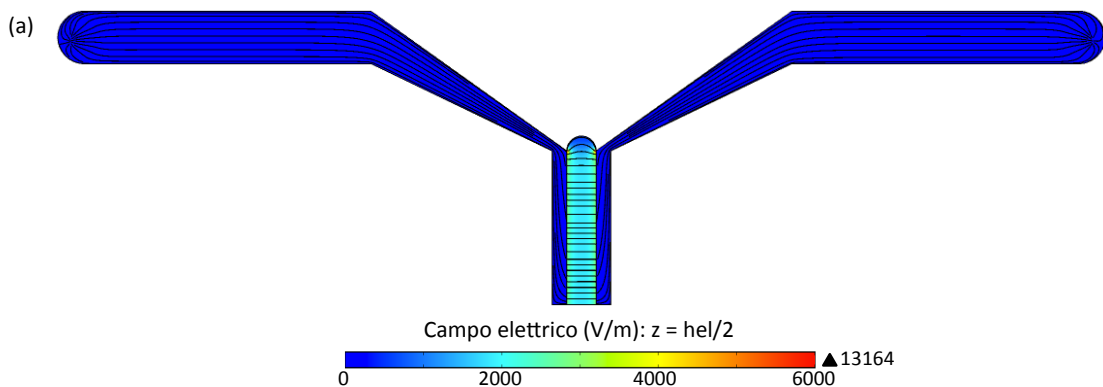


Fig. 3.27: potenziale elettrico nei piani $z = \text{hel}/2$ (a) e $y = 0$ (b).

3.5.1.2 Distribuzione del campo elettrico

La fig. 3.28 riporta l'intensità del campo elettrico e la distribuzione delle linee di campo nei piani $z = \text{hel}/2$ e in vari piani lungo l'asse del canale: $y = 0$, $y = L_{\text{chan}}/4$ (1175 μm), $y = L_{\text{chan}}/2$ (2350 μm), dove con L_{chan} si indica la lunghezza del canale. In questo modo è possibile mappare il comportamento del campo elettrico lungo tutto il canale. Le linee di campo sono parallele tra loro considerando le sezioni del canale fluidico e l'intensità è costante lungo l'asse del canale, se si escludono le estremità del canale, nei pressi dell'imbocco dei canali di ingresso o uscita. Quindi, nonostante l'irregolarità geometrica introdotta dal processo erosivo il campo elettrico risulta essere pressoché uniforme all'interno del canale fluidico.



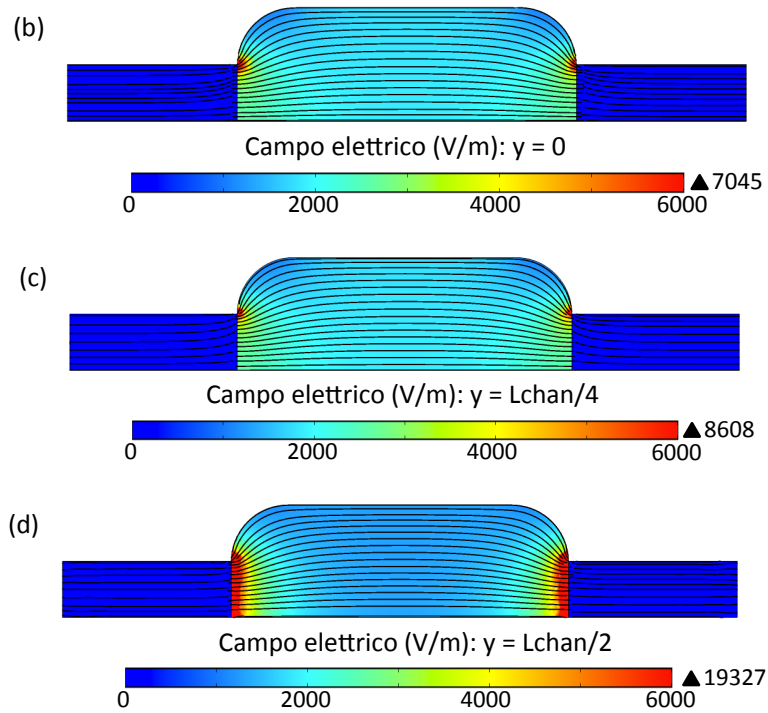


Fig. 3.28: intensità e linee di campo elettrico nei piani $z = h_{el}/2 \mu m$ (a) e $y = 0$ (b), $Lchan/4$ (c), $Lchan/2$ (d). La scala colorimetrica è stata modificata per permettere una migliore comprensione delle immagini.

3.5.1.3 Distribuzione della densità di corrente

La densità di corrente viene valutata lungo linee rette nel piano $x = 0$, equidistanti tra loro $30 \mu m$. In questo modo è possibile mappare interamente il piano che passa al centro del canale. I dati sono raccolti nel grafico di fig. 3.29, che ai fini pratici riporta la densità di corrente lungo tutte le linee. La rappresentazione grafica della densità di corrente è riportata in fig. 3.30. Si vede come la densità di corrente è ragionevolmente uniforme all'interno del canale, sia lungo z (in tutta l'altezza del canale, anche oltre l'estensione degli elettrodi) che lungo y (se si esclude la parte terminale non a contatto con gli elettrodi, oltre la quale il valore decade).

3. RISULTATI

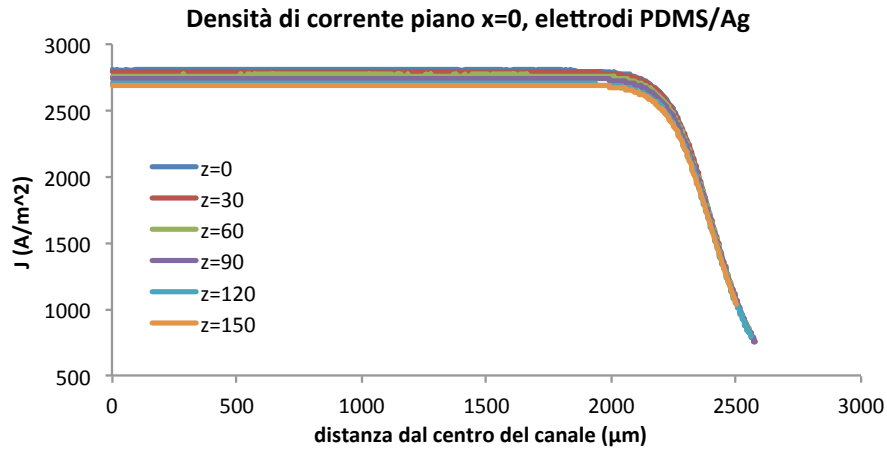


Fig. 3.29: densità di corrente nel piano $x = 0$. In ascissa la distanza dal centro del canale fluidico.

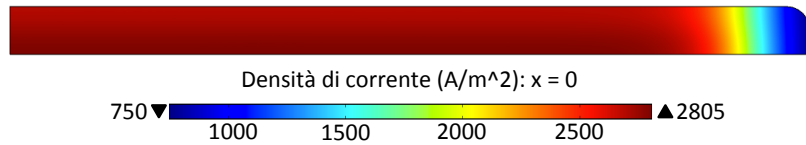


Fig. 3.29: densità di corrente nel piano $x = 0$ rappresentata con una mappa colorimetrica.

3.5.1.4 Resistenza elettrica del dispositivo

Come illustrato in precedenza è possibile calcolare la resistenza elettrica dell'intero dispositivo e degli elettrodi valutando la caduta di potenziale ai capi dei diversi domini. Il potenziale viene calcolato all'estremità dell'elettrodo in cui è stata imposta la corrente entrante e ai capi del canale fluidico. Nota la corrente che attraversa il dispositivo (1 mA), è immediato risalire ai valori della resistenza tenendo conto della relazione che lega la resistenza del modello simulato e del dispositivo intero. Si confrontino a tale proposito i modelli circuitali del par. 2.6.1.

$$R_{disp-tot} = \frac{R_{disp-sim}}{2} \quad (3.1)$$

$$R_{chan-tot} = \frac{R_{chan-sim}}{2} \quad (3.2)$$

$$R_{elect-tot} = 2R_{elect-sim} \quad (3.3)$$

Risulta una resistenza per il canale fluidico pari a 0,47 kΩ, per un singolo elettrodo pari a 0,98 Ω e per l'intero dispositivo pari a 0,48 kΩ. La caduta di po-

tenziale è quindi prevalentemente a carico del fluido all'interno del canale, aspetto già emerso dall'analisi dell'intensità del potenziale. Si ricorda che la resistenza in continua del dispositivo con elettrodi in PDMS/argento era stata misurata sperimentalmente e risulta pari a $0,87 \text{ k}\Omega$ (par. 3.3.2.2) Questo valore ricade nello stesso ordine di grandezza di quello risultante dalla simulazione; questo dimostra come la simulazione numerica sia uno strumento valido per valutare il comportamento elettrico di questo tipo di dispositivi.

3.5.2. SIMULAZIONE DEL DISPOSITIVO CON ELETTRODI IN PDMS E GRAFITE+CNT

Verranno ora analizzati e discussi i risultati della simulazione per quanto riguarda il dispositivo i cui elettrodi sono costituiti dal composito di PDMS/grafite+CNT. Si rammenta che, dal momento che l'aggiunta di nanotubi di carbonio al composito PDMS/grafite non altera in maniera sostanziale la conducibilità elettrica, si omette la trattazione del caso in cui gli elettrodi siano costituiti dalla sola grafite.

3.5.2.1 Intensità del potenziale elettrico

La figura seguente (fig. 3.31) riporta l'intensità del potenziale elettrico nei piani $z = 37,5 \mu\text{m}$ e $y = 0$. Nel piano $x = 0$ il potenziale elettrico è costante, pari a $18,53 \text{ V}$. Da un capo all'altro del dispositivo il potenziale diminuisce: si noti come in questo caso la caduta di potenziale sia quasi del tutto a carico degli elettrodi: ciò è dovuto alla conduttività del composito PDMS/grafite+CNT, il cui ordine di grandezza è paragonabile a quello del PBS.

3. RISULTATI

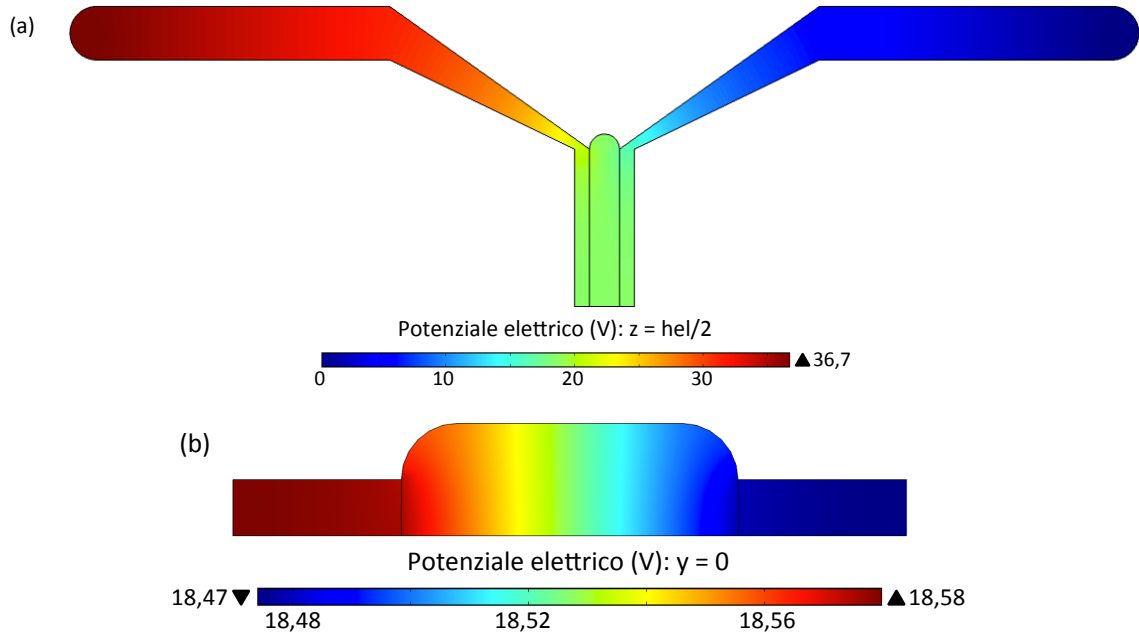
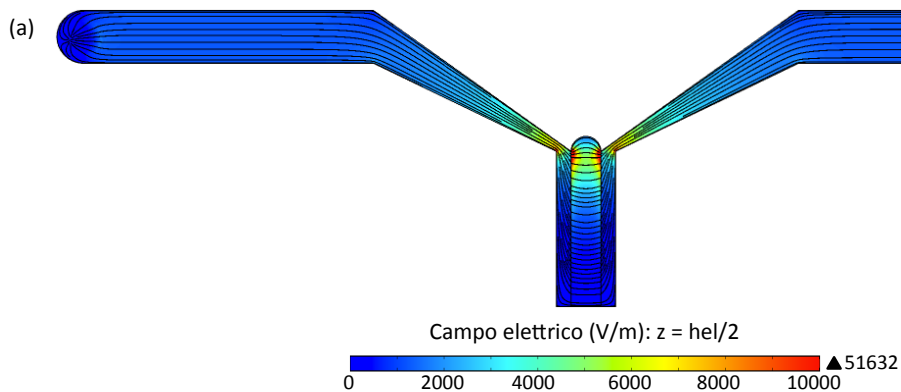


Fig. 3.31: potenziale elettrico nei piani $z = \text{hel}/2$ (a) e $y = 0$ (b).

3.5.2.2 Distribuzione del campo elettrico

La fig. 3.32 riporta l'intensità del campo elettrico e la distribuzione delle linee di campo nei piani $z = \text{hel}/2$, $y = \text{Lchan}/4$ (1175 μm), $y = \text{Lchan}/2$ (2350 μm). Anche in questo caso le linee di campo sono parallele tra loro all'interno del canale fluidico tra i capi degli elettrodi, in tutte le sezioni considerate. L'intensità del campo elettrico aumenta però muovendosi dalla mezzeria verso le estremità del canale fluidico.



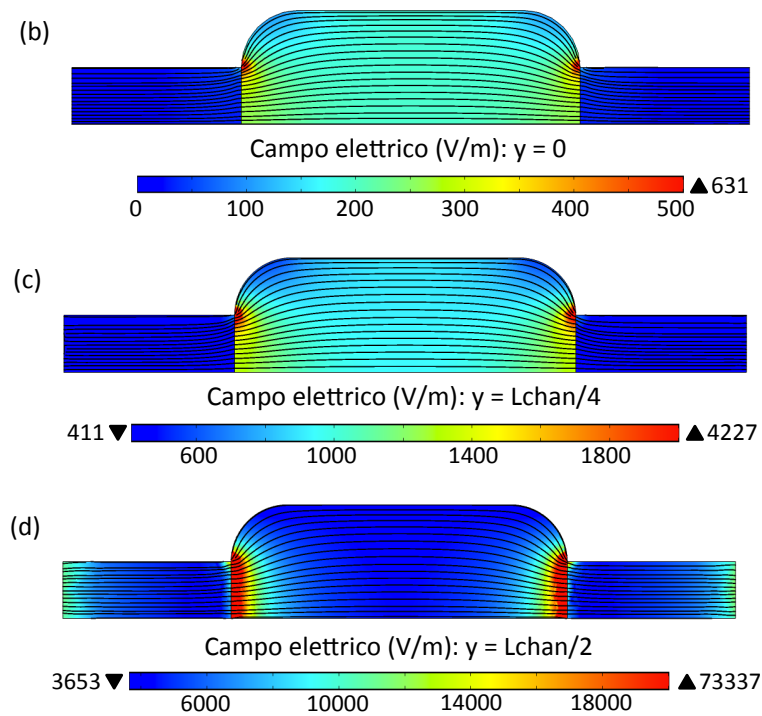


Fig. 3.32: intensità e linee di campo elettrico nei piani $z = hel/2 \mu m$ (a) e $y = 0$ (b), $Lchan/4$ (c), $Lchan/2$ (d). La scala colorimetrica è stata modificata per permettere una migliore comprensione delle immagini.

3.5.2.3 Distribuzione della densità di corrente

La densità di corrente viene calcolata lungo linee nel piano $x = 0$, equidistanti tra loro $30 \mu m$. I dati sono raccolti nel grafico di fig. 3.33, mentre la rappresentazione grafica è riportata in fig. 3.34.

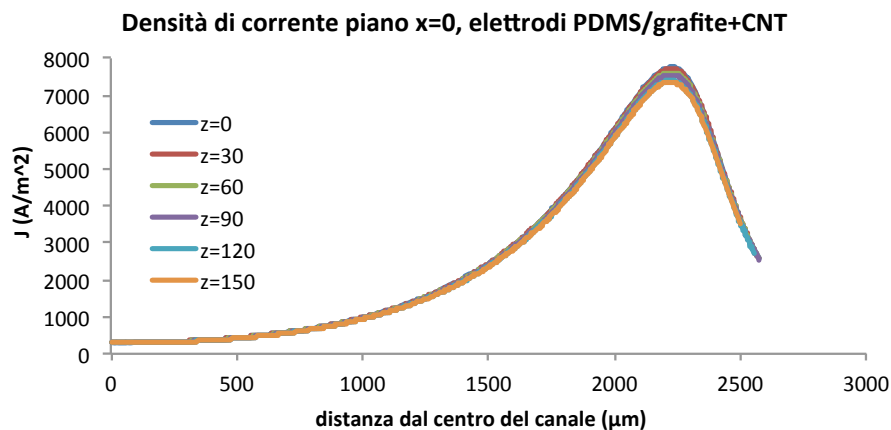


Fig. 3.33: densità di corrente nel piano $x = 0$. In ascissa la distanza dal centro del canale fluidico.

3. RISULTATI

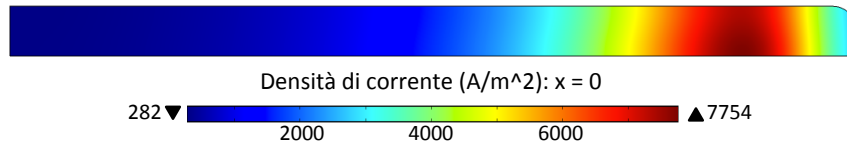


Fig. 3.34: densità di corrente nel piano $x = 0$ rappresentata con una mappa colorimetrica.

In questo caso la densità di corrente è costante solamente lungo z , mentre lungo l'asse longitudinale del canale è presente un picco verso le estremità, nel punto in cui gli elettrodi entrano a contatto con esso, e in corrispondenza del quale anche il valore del campo elettrico è massimo (fig. 3.32 a). Essendo direttamente proporzionale alla differenza di potenziale infatti, la corrente è massima nelle regioni dove essa si concentra maggiormente.

3.5.2.4 Resistenza elettrica del dispositivo

La resistenza elettrica del dispositivo viene ricavata nella stessa maniera del caso precedente. Risulta una resistenza per il canale fluidico pari a $0,44 \text{ k}\Omega$, per un singolo elettrodo pari a $72,34 \text{ k}\Omega$ e per l'intero dispositivo pari a $18,35 \text{ k}\Omega$. La caduta di potenziale è quindi per la maggior parte a carico degli elettrodi, aspetto già emerso dall'analisi dell'intensità del potenziale.

4. DISCUSSIONE

Lo sviluppo di sistemi microfluidici complessi da utilizzare nel campo dell'ingegneria dei tessuti o di micro total analysis system (μ TAS) per esperimenti biologici e farmaceutici avanzati richiede la presenza di numerosi componenti che integrino le loro funzioni all'interno dello stesso microdispositivo [13]. Tra questi i componenti conduttivi rivestono un'importanza particolare e supportano numerose applicazioni, quali la stimolazione elettrica di costrutti cellulari [27, 28], la manipolazione e la classificazione di materiale biologico attraverso varie tecniche (elettroforesi [80], dielettroforesi [52, 81], elettrorotazione [82]), la realizzazione di biosensori, microriscaldatori e sistemi di attuazione [38]. È quindi necessario avere a disposizione delle strategie per integrare questo tipo di strutture all'interno di dispositivi microfluidici.

In questo lavoro è stato proposto un metodo per la realizzazione di elettrodi tridimensionali, che si affacciano verticalmente a canali microfluidici in PDMS. Avere a disposizione elettrodi allineati verticalmente ai canali è importante per tutte quelle applicazioni che richiedono la generazione di un campo elettrico uniforme all'interno dei volumi fluidi [53, 54, 58]. È stato specificatamente progettato un dispositivo prototipale con una geometria semplice, in modo da potersi concentrare sulla caratterizzazione del processo di realizzazione degli elettrodi. Il canale fluidico centrale è stato previsto per poter alloggiare costrutti cellulari in coltura o altri campioni biologici. I canali degli elettrodi sono stati disegnati secondo una geometria a ferro di cavallo per rendere più semplice l'iniezione manuale del composto conduttivo all'interno dei canali.

La complessità del metodo di fabbricazione proposto è limitata. Tutti i passaggi descritti, infatti, non richiedono l'utilizzo di tecnologie complesse in aggiunta all'unica tecnologia di microfabbricazione utilizzata, la fotolitografia, con cui sono stati realizzati i master mold microstrutturati. I dispositivi microfluidici sono stati ottenuti a partire dal master mold mediante soft lithography, e sfruttano il concetto di cofabbricazione. Mediante un singolo passaggio, infatti, sono stati realizzati tutti gli elementi funzionali: il canale che contiene il fluido e i canali in cui alloggia-

4. DISCUSSIONE

re gli elettrodi iniettabili. Questa strategia ha evitato la necessità di allineare successivamente le diverse strutture funzionali, a differenza di quanto richiedono le tecniche di microfabbricazione multistrato [59, 83].

Gli elettrodi sono costituiti da una miscela di PDMS e polvere conduttiva e sono stati iniettati manualmente nel dispositivo. La presenza di due ingressi in ogni canale permette all'aria di fuoriuscire durante il processo, determinando una minore difficoltà di iniezione rispetto a dispositivi analoghi prodotti in passato che sfruttavano invece la permeabilità all'aria del PDMS [84]. Una volta iniettati gli elettrodi nel dispositivo, essi vengono messi in comunicazione con il canale fluidico mediante un processo di erosione della parete in silicone che li separa, ad opera di un agente chimico che viene fatto scorrere nel canale fluidico. Questo processo è stato dettagliatamente caratterizzato e risulta essere altamente riproducibile. Il protocollo presentato prevede la perfusione continua del canale con la soluzione erosiva senza che sia necessario l'impiego di pompe o altri sistemi di attuazione come descritto in letteratura [75, 84]. Si sfrutta infatti la differenza di pressione dovuta al battente idrostatico tra i due pozzetti posti agli estremi del canale. Il procedimento è quindi trasferibile ad altre geometrie e altri scopi, a patto di modificare i tempi di reazione che sono riportati nel presente lavoro.

I tempi di produzione di un dispositivo sono piuttosto contenuti una volta realizzato lo stampo: tenuto conto del tempo di polimerizzazione del PDMS e del tempo necessario a erodere chimicamente la parete tra elettrodi e canale fluidico, un dispositivo può essere realizzato in circa 5 ore. Si consideri inoltre che più dispositivi possono essere prodotti in parallelo, senza che per questo aumentino sensibilmente i tempi di produzione. La maggior parte delle tecniche presentate in letteratura richiede invece numerosi step di microfabbricazione e l'utilizzo di tecnologie complesse per produrre dispositivi microfluidici con elettrodi tridimensionali allineati al canale fluidico [54, 58, 85]. Le soluzioni che prevedono l'iniezione di leghe metalliche eutettiche per realizzare elementi conduttivi risentono invece dell'instabilità di questi stessi materiali [59].

Sono state prese in considerazione tre soluzioni alternative per rendere conduttivo il PDMS. Le prime sono la polvere d'argento e quella di grafite. La terza, una miscela di grafite e nanotubi di carbonio, è stata messa a punto per verificare il

comportamento di matrici polimeriche caricate con due particolati diversi. Questo può essere utile per permettere alle particelle con differenti dimensioni di occupare meglio lo spazio all'interno della matrice e trasmettere meglio il segnale elettrico. In particolare ci si aspetta che le particelle con dimensioni inferiori riempiano gli spazi vuoti tra le particelle più grandi consentendo la trasmissione del segnale elettrico [86]. Per stimolare elettricamente cellule o altro materiale biologico è necessario stabilire la densità della corrente elettrica in ingresso ai costrutti. In questo modo, in relazione all'impedenza degli elettrodi e del dispositivo, è possibile determinare un protocollo per l'ampiezza e la durata della forma d'onda del segnale elettrico in ingresso [32]. A parità di corrente generata, un'impedenza elevata si traduce nella necessità di applicare un'elevata differenza di potenziale, che può generare reazioni elettrochimiche indesiderate o danneggiare le cellule in coltura e il materiale biologico [55]. Da qui la necessità di limitare il valore dell'impedenza e utilizzare quindi materiali caratterizzati da una conduttività elevata.

In letteratura sono stati svolti degli studi per determinare la conduttività dei materiali compositi in funzione della frazione volumetrica di particolato caricata nella matrice polimerica [60, 62]. Nel presente lavoro, oltre a massimizzare la conduttività del composito, si è reso necessario limitare il contenuto di particolato in modo che la viscosità del materiale sia tale da poterlo iniettare manualmente all'interno dei canali del dispositivo. La frazione volumetrica massima di particolato è stata quindi determinata mediante prove preliminari di iniezione nei canali. Tutti e tre i materiali ottenuti mescolando le polveri con il PDMS (in differenti rapporti di peso) sono stati caratterizzati dal punto di vista elettrico mediante l'utilizzo di un elettrostimolatore e di una scheda di acquisizione. In aggiunta a quanto fatto in precedenza dagli autori che si sono occupati di questo tipo di materiali [60, 62], che ne avevano misurato la resistività, sono stati costruiti i diagrammi di Bode dell'impedenza a partire dall'analisi in frequenza del comportamento elettrico. Il materiale maggiormente conduttivo è il composito a base di argento, la cui conduttività ($\sigma = 9,65 \cdot 10^5 \text{ S/m}$) è 5 ordini di grandezza superiore a quella degli altri materiali (per la grafite $\sigma = 9,40 \text{ S/m}$, per la grafite+CNT $\sigma = 13,34 \text{ S/m}$). Per quanto riguarda l'aggiunta di nanotubi al composito di PDMS e grafite, è confermata l'ipotesi che l'utilizzo di due particolati di diverse dimensioni migliori la conduttività.

4. DISCUSSIONE

La caratterizzazione effettuata per il materiale a base di soli nanotubi, difatti, aveva fatto emergere valori di conduttività non superiori a 6 S/m [61], mentre il materiale a base di grafite è stato caratterizzato nel presente lavoro.

La caratterizzazione elettrica ha evidenziato un comportamento generale del tipo filtro passa-basso, tuttavia, data la limitata estensione in frequenza del diagramma di Bode, non consente l'individuazione della frequenza di taglio. Fino alla frequenza di 10 kHz i diagrammi del modulo dei tre materiali sono rette parallele all'asse delle ascisse, indicando che entro quella frequenza il comportamento degli elettrodi non risente di effetti capacitivi. Sono stati caratterizzati anche i dispositivi microfluidici con gli elettrodi di PDMS e argento, per verificare come si comporta il materiale a contatto con il fluido presente nel canale e in seguito al processo di erosione della parete. In questo caso gli effetti capacitivi sono prevalenti a causa dell'interfaccia tra elettrodo ed elettrolita. Tramite spettroscopia di impedenza elettrochimica alcuni lavori presenti in letteratura hanno indagato in dettaglio i meccanismi di trasferimenti di carica e ricostruito il circuito elettrico equivalente dei dispositivi analizzati [55, 87]. In questo lavoro vengono invece indagati gli aspetti fenomenologici legati all'utilizzo di questo tipo di dispositivi. Emerge come sia possibile applicare segnali in ingresso con contenuto in frequenza sino a 1 kHz senza che questi vengano smorzati. Il contenuto in frequenza dei segnali elettrici utilizzati per la stimolazione di costrutti cellulari è generalmente limitato al di sotto di 1 kHz [32, 88]. La tecnica presentata può dunque essere sfruttata per realizzare dispositivi utili per questo tipo di applicazioni.

Un'ulteriore indagine ha permesso di verificare il comportamento elettrico dei materiali conduttivi sottoposti a flessione. Difatti è necessario verificare l'ipotesi secondo cui i compositi del PDMS mantengono le caratteristiche di elasticità e deformabilità proprie degli elastomeri, senza indurre effetti indesiderati nelle caratteristiche elettriche. La flessibilità degli elettrodi è importante per le applicazioni che prevedono la deformazione di canali fluidi in presenza di pressioni elevate [64], per realizzare sensori deformabili o particolari dispositivi impiantabili [65] o per abbinare lo stimolo elettrico alla deformazione meccanica nei sistemi di coltura cellulare miniaturizzati [68]. È emerso come dei provini realizzati in materiale composito possano essere deformati ciclicamente senza rompersi e come la resi-

stenza elettrica dei materiali non vari in presenza di una flessione di 90° o 180° o di una torsione di 180° dei provini rispetto alla condizione indeformata.

Parallelamente alla realizzazione dei dispositivi e alla caratterizzazione sperimentale dei materiali sono state svolte delle simulazioni computazionali per interpretare il comportamento elettrico dei microdispositivi e verificare la distribuzione del campo elettrico all'interno del canale. I modelli realizzati in precedenza si limitavano a valutare graficamente la densità di corrente all'interno dei dispositivi realizzati [53]. In questo lavoro la densità di corrente è stata valutata in maniera più approfondita e sono state analizzate altre caratteristiche quali l'uniformità del campo elettrico e la distribuzione dell'intensità del potenziale. All'interno del software è stata riprodotta la geometria del dispositivo ed è stata svolta una simulazione in condizioni stazionarie utilizzando alternativamente PDMS/argento o PDMS/grafite+CNT come materiali costitutivi degli elettrodi. Gli elettrodi in PDMS/grafite non sono stati riprodotti in quanto dalla caratterizzazione elettrica è emerso come l'aggiunta dei nanotubi migliori le proprietà di questo composito.

La mappatura del campo elettrico in diverse sezioni del canale dimostra come in entrambi i dispositivi le linee di campo siano parallele tra loro in ogni sezione considerata. Questo conferma dunque l'uniformità del campo elettrico nel volume fluido, nonostante l'alterazione geometrica introdotta inevitabilmente dal processo erosivo. Nel caso venga utilizzata la polvere di grafite e nanotubi per realizzare gli elettrodi però, l'elevata resistività di questi ultimi fa sì che l'intensità del campo elettrico aumenti verso le estremità del canale. Ciò si traduce anche in una maggiore variabilità dell'intensità di corrente lungo l'asse longitudinale del canale. Nel caso sia utilizzata la polvere di argento, invece, la densità di corrente è costante lungo tutto il dispositivo. L'uniformità della corrente è invece confermata lungo tutta l'altezza del canale per entrambi i dispositivi. Questo aspetto è molto importante per progettare campagne di stimolazione elettrica di costrutti cellulari [53] o per sfruttare i campi elettrici per la separazione, la manipolazione e il trasporto di particelle mediante le varie tecniche proposte in precedenza. Infine, per verificare la consistenza dei risultati computazionali è stata confrontata la resistenza elettrica totale del dispositivo con elettrodi in argento ricavata dalle simulazioni con quella trovata nell'ambito dei test sperimentali. Il valore trovato ($0,48 \text{ k}\Omega$) ricade nello stesso

4. DISCUSSIONE

ordine di grandezza di quello ricavato tramite le prove di caratterizzazione elettrica (0,87 k Ω). È quindi possibile affermare che la simulazione numerica è uno strumento valido per valutare il comportamento elettrico di questi dispositivi. La resistenza elettrica del dispositivo con elettrodi in grafite+CNT ricavata mediante le prove numeriche risulta invece pari a 18,35 k Ω .

I dispositivi e i materiali che li costituiscono sono dunque stati approfonditamente caratterizzati e possono essere utilizzati per la stimolazione elettrica di costrutti cellulari, ad esempio cardiomiociti, nella modalità riportata da Pavesi et al. [84]. Il dispositivo realizzato nel presente lavoro di tesi, oltre ad offrire una scelta più ampia di materiali utilizzabili, prevede un metodo di erosione della parete tra elettrodi e canale fluidico semplificato ed è stato caratterizzato dal punto di vista computazionale. Gli elettrodi realizzati con PDMS e grafite o PDMS, grafite e nanotubi di carbonio possono essere utilizzati a contatto con componenti cellulari in coltura, in quanto ne è riportata la biocompatibilità dei componenti [84, 89, 90]. La conduttività elettrica del composito risulta inferiore rispetto a quello degli altri materiali considerati in letteratura non basati sull'argento [60, 61]. Gli elettrodi realizzati con il composito di grafite e nanotubi di carbonio costituiscono quindi una valida alternativa ai materiali compositi presentati finora in letteratura per l'utilizzo nell'ambito dell'ingegneria tissutale.

Gli elettrodi realizzati con PDMS e argento non potranno invece essere utilizzati direttamente a contatto con ambienti di coltura cellulare, in quanto è noto che l'argento è un materiale citotossico a causa del rilascio ionico [91, 92]. Tuttavia i risultati ottenuti in questo lavoro saranno estendibili ad altri compositi ottenuti includendo polveri metalliche di stessa granulometria ma diversa composizione chimica all'interno della matrice di PDMS, a patto di valutare le proprietà elettriche così ottenute. Sfruttando il protocollo presentato in questo lavoro, si potranno utilizzare i nuovi compositi per realizzare gli elettrodi all'interno dei dispositivi microfluidici. In questo modo, utilizzando metalli biocompatibili, sarà possibile ottenere elettrodi ad elevata conducibilità da utilizzare a contatto con cellule in coltura. Tra questi, l'oro e il platino rappresentano delle valide alternative [91]. Nel lavoro condotto, l'argento è stato scelto in quanto risulta essere uno dei metalli più elettricamente conduttivi ed è un materiale che consente rispetto ad altre soluzioni un

ragionevole contenimento dei costi, nell'ottica di un lavoro orientato alla prototipazione e alla caratterizzazione.

I dispositivi realizzati con gli elettrodi in argento possono invece essere utilizzati in altri ambiti che non prevedano l'utilizzo di materiale biologico in coltura. Possono ad esempio trovare impiego nell'ambito dell'elettroforesi, per il controllo e l'identificazione in tempo reale di microgocce fluide [93], per l'elettrofusione [35, 36] o come sensori di temperatura per il monitoraggio di reazioni chimiche e altri fenomeni termo-dipendenti [94]. In aggiunta, l'elevata conducibilità elettrica del composito di PDMS e argento (inferiore di appena un ordine di grandezza ai metalli comuni), lo rende adatto alla realizzazione di microsensori elettrochimici ad elevata sensibilità per l'individuazione di specie chimiche [95], il monitoraggio dell'attività cellulare [41, 96] e il monitoraggio ambientale [42].

Inoltre, tutte le tecniche presentate per la realizzazione del dispositivo (microfabbricazione del master mold, soft lithography, iniezione degli elettrodi, erosione della parete) possono essere modificate per adattarsi ad applicazioni differenti. Variando in fase di progettazione la geometria delle microstrutture presenti sul master mold, infatti, è possibile realizzare dispositivi microfluidici in PDMS con reti fluidiche e configurazioni elettriche più complesse. È possibile ad esempio modificare la geometria degli elettrodi e dei canali fluidici per generare campi elettrici non uniformi lungo l'asse del canale, utilizzabili per lo sviluppo di applicazioni quali la dielettroforesi. Rispetto ai dispositivi analoghi presenti in letteratura il processo di realizzazione risulterà in questo caso semplificato [71], grazie all'utilizzo della tecnica di cofabbricazione che consente di ottenere tutte le strutture funzionali con un singolo passaggio di microfabbricazione. Proprio grazie alla versatilità e alla modularità della procedura di fabbricazione proposta, essa offre una piattaforma economica e di facile realizzazione, adattabile ai vari ambiti della microfluidica che richiedono l'utilizzo di campi elettrici o la presenza di elementi conduttivi deformabili. Un esempio è offerto dal lavoro svolto da Pesce et al. [97] Il protocollo da loro messo a punto, che prevede la presenza di microelettrodi e l'utilizzo di trappole ottiche, può essere adattato al dispositivo per determinare la carica elettrica di particelle e biomolecole sospese in un fluido.

4. DISCUSSIONE

È inoltre possibile adattare il metodo di realizzazione proposto per creare componenti miniaturizzati da integrare in sistemi μ TAS più complessi. Potrebbero ad esempio essere utilizzati come unità riscaldanti nei dispositivi miniaturizzati per la PCR [38]. Non va infatti dimenticato che l'aggiunta di particelle metalliche in una matrice polimerica provoca un aumento della conduttività termica oltre che di quella elettrica [86].

5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

In questo lavoro è stato proposto un metodo per realizzare dispositivi microfluidici in PDMS con elettrodi tridimensionali flessibili affacciati verticalmente ai canali fluidici. A tale scopo è stato fabbricato un dispositivo paradigmatico per caratterizzare i diversi step di processo. La procedura di realizzazione si basa sulla soft-lithography e su un processo di erosione chimica del silicone. Gli elettrodi sono costituiti da un composito di PDMS e polvere conduttiva. Il processo di realizzazione si è dimostrato rapido, economico e altamente ripetibile. Gli elettrodi e i dispositivi sono stati caratterizzati dal punto di vista elettrico in termini di conducibilità e risposta in frequenza. Sono state effettuate di caratterizzazione elettrica sotto flessione che hanno accertato la possibilità di deformare i materiali conduttivi senza che ne vengano alterate le proprietà elettriche. Prove computazionali in regime stazionario hanno dimostrato come il campo elettrico generato all'interno del volume fluido sia uniforme in un'ampia regione adiacente il centro del canale, nonostante l'alterazione geometrica causata dal processo di erosione. Inoltre i risultati numerici e quelli computazionali sono ragionevolmente confrontabili in termini di resistenza elettrica totale dei dispositivi.

Gli sviluppi futuri, nell'ottica di un ulteriore approfondimento delle caratteristiche elettriche, si dovranno concentrare sull'estensione dell'analisi in frequenza del comportamento degli elettrodi e dei dispositivi, utilizzando tecniche quali la spettroscopia di impedenza elettrochimica. Potranno poi essere svolte delle simulazioni numeriche tempo-dipendenti per valutare il comportamento del campo elettrico e della corrente all'interno del canale fluidico in funzione della forma d'onda del segnale in ingresso. Le proprietà degli elettrodi dovranno inoltre essere valutate sotto trazione, per verificare se sia possibile realizzare dei sensori di deformazione da integrare in particolari dispositivi. Potranno poi essere prodotti dei nuovi dispositivi che abbiano uno spessore inferiore della parte di PDMS tra canale fluidico ed elettrodi. In questo modo il processo di erosione della parete stessa ri-

5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

sulterà più rapido, e il canale fluidico subirà una deformazione geometrica minore. Questo comporterà un ulteriore miglioramento dell'uniformità del campo elettrico, visto che una porzione maggiore del canale sarà a contatto con gli elettrodi.

Per quanto riguarda la stimolazione elettrica di costrutti cellulari, si potrebbe inizialmente proseguire il lavoro svolto da Pavesi et al, estendendo l'utilizzo del dispositivo alla coltura di cardiomiociti. Avendo a disposizione una piattaforma ben caratterizzata dal punto di vista elettrico, si potranno indagare le proprietà e il comportamento del tessuto cardiaco in coltura e ottimizzare i parametri elettrici per lo sviluppo di tessuti in vitro. Data la configurazione degli elettrodi nel dispositivo, sarà utile far assumere alle cellule una disposizione tridimensionale all'interno del canale (ad esempio mediante l'inclusione in un gel [98-100]) per sfruttare l'uniformità del campo elettrico generato.

Grazie alla modularità del metodo di fabbricazione proposto, esso risulta adattabile a diverse necessità. Sarà possibile cambiare la geometria dei canali fluidici o degli elettrodi per generare configurazioni fluidodinamiche ed elettriche più complesse, e modificare le caratteristiche del substrato su cui è montato il dispositivo per adattarlo a specifiche esigenze. Infine, sarà possibile variare la composizione stessa degli elettrodi. Potrà essere indagato l'utilizzo di nuovi particolati che consentano l'aumento ulteriore della conducibilità elettrica del composito o conferiscano al materiale proprietà fisiche e bio-chimiche differenti da quelle studiate finora: proprietà magnetiche, controllo dell'adesione cellulare, rilascio e localizzazione di biomolecole, ecc [101, 102]. In questo modo, utilizzando il protocollo di fabbricazione riportato in questo lavoro, potranno essere sviluppate nuove applicazioni nel campo della ricerca biologica e delle microtecnologie in generale.

6. APPENDICE

A. COMPORTAMENTO DI MATRICI POLIMERICHE CARICATE CON PARTICOLATI CONDUTTIVI

I materiali compositi costituiti da matrici polimeriche caricate con particolati conduttivi possiedono caratteristiche elettriche e termiche vicine a quelle dei materiali conduttori e proprietà meccaniche e lavorabilità tipiche dei materiali plastici [103]. Le proprietà elettriche dei compositi dipendono da diversi fattori: il tipo di riempitivo utilizzato, la distribuzione spaziale delle particelle all'interno della matrice, l'interazione tra polimero e riempitivo e i contatti instaurati tra le particelle [104].

In letteratura sono presenti diversi modelli teorici per interpretare il comportamento elettrico di questa classe di materiali [47, 86, 105]. Acquisendo immagini da microscopia elettronica a scansione viene valutata la forma delle particelle conduttive e la loro distribuzione spaziale e il grado di impaccamento all'interno della matrice. Vengono considerati inoltre parametri quali la porosità delle particelle usate come riempitivo, la composizione chimica e la viscosità del polimero utilizzato, i legami che si instaurano tra le particelle conduttive e i monomeri della matrice, la modalità di aggregazione dei monomeri durante la reticolazione.

Sperimentalmente è possibile stabilire una relazione analitica tra la frazione volumetrica di riempitivo utilizzata e la conduttività elettrica del materiale composito [86]. La frazione volumetrica è definita come:

$$\varphi = \frac{V_{part}}{V_{part} + V_{matrix}} \quad (6.1)$$

dove V_{part} e V_{matrix} rappresentano rispettivamente il volume occupato dal particolato e il volume occupato dalla matrice polimerica.

La soglia di conduttività (φ_c) rappresenta la frazione volumetrica di riempitivo al di sotto della quale il composito si comporta come un isolante (con il valore di conduttività del polimero, σ_p). È stato determinato che oltre il valore di soglia la

6. APPENDICE

conduttività elettrica aumenta esponenzialmente all'aumentare della frazione volumetrica di riempitivo, da un valore iniziale (σ_c) fino ad un valore massimo (σ_m) oltre il quale non è più possibile aumentare il contenuto di particelle (corrispondente alla frazione volumetrica massima, F) (fig 1.14).

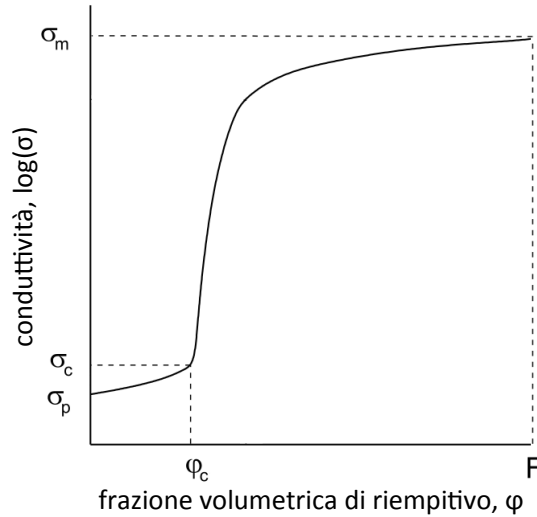


Fig. 1.14: Andamento tipico della conduttività elettrica (in forma logaritmica) in funzione della frazione volumetrica di riempitivo conduttivo all'interno di una matrice polimerica. Il significato dei simboli è illustrato nel testo. Adattata da Mamunya et al. [86].

Il valore di F dipende dalla forma e dalle dimensioni delle particelle e dalla disposizione che esse assumono all'interno della matrice (determinata a sua volta dal tipo di legami tra le particelle e le catene polimeriche). Per un ammasso monodisperso di particelle sferiche, a prescindere dalla loro dimensione, è stato ricavato sperimentalmente un valore di F pari a 0,64. Questo valore diminuisce se la forma delle particelle si discosta dalla sfericità, e aumenta nel caso si utilizzi un ammasso di particelle polidisperso [86].

Una forma analitica per descrivere il comportamento sperimentale tenendo conto di tutti i parametri citati in precedenza è stata proposta da Mamunya et al:

$$\sigma = \sigma_c + (\sigma_m - \sigma_c) \left(\frac{\varphi - \varphi_c}{F - \varphi_c} \right)^t \quad (6.2)$$

dove t è un esponente che determina l'incremento di σ oltre il valore di soglia e tiene conto di vari aspetti fenomenologici tra cui le interazioni tra polimero e riempitivo [86].

La conduttività elettrica all'interno del composito è dovuta all'instaurarsi di contatti tra le particelle conduttive. La forma e le dimensioni delle particelle sono responsabili dell'impaccamento all'interno della matrice, e di conseguenza determinano il valore della soglia di conduttività. Particelle con forma non sferica (ad esempio scaglie o strutture allungate) occupano un volume maggiore a parità di peso e hanno quindi maggiori possibilità di essere a contatto tra loro una volta disperse nella matrice polimerica (fig. 1.15). Un materiale che utilizza questo tipo di particelle ha quindi una minore soglia di conduttività, in quanto sono maggiori i punti di interazione tra le particelle che permettono la trasmissione del segnale elettrico [106, 107].

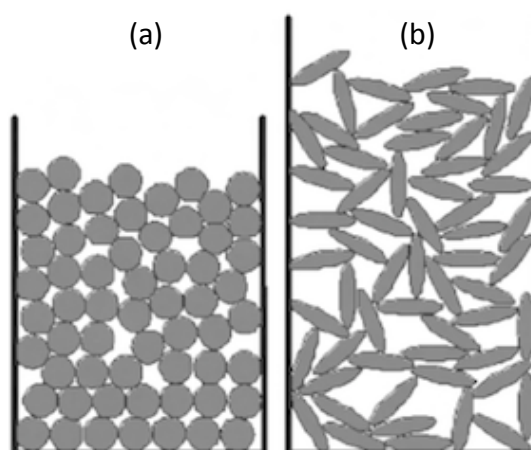


Fig. 1.15: particelle con la stessa densità e la stessa massa ma con forma diversa: sferica (a) e allungata (b). A parità di peso le seconde occupano un volume maggiore, e possono quindi essere utilizzate per rendere conduttiva una maggiore quantità di matrice polimerica. Adattata da Callen et al. [107].

B. RISPOSTA IN FREQUENZA DI UN'IMPEDENZA

Una funzione di trasferimento rappresenta matematicamente la relazione tra ingresso e uscita di un sistema dinamico lineare tempo invariante (ovvero i cui parametri sono costanti nel tempo come nel caso di un'impedenza). Si parla di risposta in frequenza quando la funzione di trasferimento di un sistema viene sollecitata

6. APPENDICE

da un ingresso di tipo sinusoidale con frequenza f variabile. La risposta in frequenza di un sistema consiste quindi nella relazione tra ingresso e uscita del sistema quando la sollecitazione applicata e la risposta sono variabili nel tempo. Qualsiasi segnale periodico può essere scomposto in una serie di sinusoidi di frequenze diverse; è dunque possibile ricostruire il segnale d'uscita a un sistema a partire dalle risposte a tale segnale alle varie frequenze in ampiezza e fase. Una rappresentazione grafica della risposta in frequenza è data dal diagramma di Bode: esso consiste in due grafici che rappresentano rispettivamente il modulo (o ampiezza) e la fase della funzione complessa di risposta in frequenza.

L'impedenza è una grandezza fisica vettoriale che rappresenta la forza di opposizione di un bipolo al passaggio di corrente elettrica alternata (AC). Essa tiene conto dei fenomeni di consumo di energia elettrica e dei fenomeni di accumulo di energia elettromagnetica. È esprimibile come numero complesso ed è data dal rapporto tra il fasore della tensione e il fasore della corrente.

Indicando con V e I i numeri complessi che rappresentano i fasori di tensione e corrente, l'impedenza è quindi esprimibile secondo la legge di Ohm:

$$Z = \frac{V}{I} \quad (6.3)$$

I segnali di tensione e corrente in regime sinusoidali sono comunemente rappresentati da funzioni complesse del tempo:

$$V = |V| e^{j(\omega t + \Phi_V)} \quad (6.4)$$

$$I = |I| e^{j(\omega t + \Phi_I)} \quad (6.5)$$

Sostituendo queste espressioni nella legge di Ohm 2.1:

$$Z = \frac{|V|}{|I|} e^{j(\Phi_V - \Phi_I)} \quad (6.6)$$

In notazione polare, o esponenziale, l'impedenza si rappresenta come:

$$Z = |Z| e^{j\theta} \quad (6.7)$$

Il modulo dell'impedenza $|Z|$ corrisponde al rapporto dei valori efficaci di tensione e corrente e rappresenta la caduta di potenziale V dovuta a una corrente I che attraversa l'impedenza (analogamente alla resistenza elettrica R in regime di corrente continua). Lo sfasamento θ rappresenta invece il ritardo tra la tensione e la corrente (nel dominio del tempo indica che la corrente è in ritardo di un fattore $(\theta/2\pi)T$ rispetto alla tensione).

La formula di Eulero è una relazione che permette di rappresentare numeri complessi in coordinate polari:

$$e^{jx} = \cos x + j \sin x \quad (6.8)$$

La parte reale di una funzione esponenziale complessa può essere usata per rappresentare una tensione o una corrente in regime alternato, che dunque possono essere scritte come:

$$V = |V| \cos(\omega t + \Phi_V) \quad (6.9)$$

$$I = |I| \cos(\omega t + \Phi_I) \quad (6.10)$$

In questa forma è possibile interpretare i segnali di tensione e corrente come sinusoidi. Dopo averne determinato i parametri caratteristici, è possibile risalire al modulo e allo sfasamento dell'impedenza, che permettono di caratterizzarne la funzione di trasferimento a una data frequenza.

Per caratterizzare in frequenza l'impedenza (sia che si tratti del singolo elettrodo che dell'intero dispositivo), infatti, si misura ai suoi capi la tensione dovuta a una corrente sinusoidale, di pulsazione nota, in ingresso al circuito. La tensione avrà la stessa pulsazione della corrente, ma sarà in ritardo rispetto a questa a causa dei fenomeni dissipativi dovuti alla presenza dell'impedenza stessa. Per tensione e corrente è possibile ricostruire i valori di fase e ampiezza mediante interpolazione, scrivendo entrambi i segnali come nelle equazioni 6.9 e 6.10 e campionandoli a una frequenza adeguata. È importante infatti ricordare il teorema di Shannon: per ricostruire correttamente un segnale senza perdita di informazione, esso va campionato a una frequenza pari almeno al doppio della frequenza massima contenuta nel segnale.

Dalla ricostruzione dei segnali è possibile calcolare i parametri caratteristici dell'impedenza. Confrontando tensione e corrente con le equazioni 6.6 e 6.7, infine, modulo e fase si possono scrivere rispettivamente:

$$\text{modulo} \quad |Z| = \frac{|V|}{|I|} \quad (6.11)$$

$$\text{fase} \quad \theta_Z = \Phi_V - \Phi_I \quad (6.12)$$

Ripetendo l'operazione per frequenze diverse si può ricostruire la risposta in frequenza dell'impedenza, esprimibile graficamente mediante il diagramma di Bode.

C. EQUAZIONI RISOLUTIVE DELL'INTERFACCIA FISICA CORRENTI ELETTRICHE

L'interfaccia fisica Correnti Elettriche, che fa parte del modulo Campi Elettrici, è utilizzata in Comsol per modellizzare il comportamento di correnti elettriche in regime continuo (DC) o alternato (AC) all'interno di mezzi conduttivi e capacitivi. L'interfaccia ricava il potenziale elettrico a partire dall'equazione di conservazione della corrente. Di seguito sono riportate le equazioni implementate da Comsol per risolvere un problema con l'interfaccia Correnti Elettriche.

La legge di Ohm generalizzata stabilisce la relazione tra la densità di corrente J e il campo elettrico E :

$$J = \sigma E + J_e \quad (6.13)$$

dove σ è la conduttività elettrica del mezzo e J_e una corrente elettrica generata esternamente. L'equazione di continuità della carica elettrica stabilisce che, considerando una sorgente di carica elettrica pari a Q_j :

$$\nabla \cdot J = Q_j \quad (6.14)$$

Il campo elettrico è esprimibile come gradiente del potenziale elettrico:

$$E = -\nabla V \quad (6.16)$$

Confrontando le equazioni precedenti, la relazione tra la densità di corrente e il potenziale elettrico assume quindi la forma:

$$\nabla \cdot J = -\nabla \cdot (\sigma \nabla V - J_e) = Q_j \quad (6.14)$$

Bisogna infine tenere conto dell'equazione costitutiva dei mezzi materiali. Nel caso di mezzi lineari, stazionari, omogenei, non dispersivi e isotropi, stabilisce che l'induzione elettrica D è direttamente proporzionale al campo elettrico secondo la relazione:

$$D = \varepsilon_0 \varepsilon_r E \quad (6.17)$$

indicando con ε_0 la permittività elettrica nel vuoto e con ε_r la permittività elettrica relativa.

BIBLIOGRAFIA

1. Xia, Y. and G.M. Whitesides, *Soft Lithography*. Angewandte Chemie International Edition, 1998. 37(5): p. 550-575.
2. Squires, T.M. and S.R. Quake, *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*. Reviews of Modern Physics, 2005. 77(3): p. 977-1026.
3. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. 442(7101): p. 368-73.
4. Weibel, D.B., et al., *Torque-Actuated Valves for Microfluidics*. Anal Chem, 2005. 77(15): p. 4726-4733.
5. Beebe, D.J., G.A. Mensing, and G.M. Walker, *Physics and applications of microfluidics in biology*. Annu Rev Biomed Eng, 2002. 4: p. 261-86.
6. Stone, H.A., A.D. Stroock, and A. Ajdari, *Engineering Flows in Small Devices*. Annual Review of Fluid Mechanics, 2004. 36(1): p. 381-411.
7. Bhagat, A.A., et al., *Microfluidics for cell separation*. Med Biol Eng Comput, 2010. 48(10): p. 999-1014.
8. Fung, Y.C., *Biomechanics: Motion, Flow, Stress, and Growth*1990: Springer-Verlag.
9. Chandran, K.B., S.E. Rittgers, and A.P. Yoganathan, *Biofluid Mechanics: The Human Circulation*2007: CRC/Taylor & Francis.
10. Whitesides, G.M. and A.D. Stroock, *Flexible Methods for Microfluidics*. Physics Today, 2001. 54(6): p. 42-48.
11. Ng, J.M.K., et al., *Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems*. Electrophoresis, 2002. 23(20): p. 3461-3473.
12. Weibel, D.B., W.R. Diluzio, and G.M. Whitesides, *Microfabrication meets microbiology*. Nat Rev Microbiol, 2007. 5(3): p. 209-18.
13. Whitesides, G.M., et al., *SOFT LITHOGRAPHY IN BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY*. Annu Rev Biomed Eng, 2001. 3(1): p. 335-373.
14. Linder, V., et al., *Rapid Prototyping of 2D Structures with Feature Sizes Larger than 8 μm* . Anal Chem, 2003. 75(10): p. 2522-2527.
15. Menolascina, F. and C. Ciminelli, *Microfluidica: Teoria ed Applicazioni*.
16. Becker, H. and C. Gartner, *Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems*. Anal Bioanal Chem, 2008. 390(1): p. 89-111.
17. Ostuni, E., et al., *Patterning Mammalian Cells Using Elastomeric Membranes*. Langmuir, 2000. 16(20): p. 7811-7819.
18. McDonald, J.C., et al., *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. Electrophoresis, 2000. 21(1): p. 27-40.
19. McDonald, J.C. and G.M. Whitesides, *Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices*. Accounts of Chemical Research, 2002. 35(7): p. 491-499.

20. Sia, S.K. and G.M. Whitesides, *Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies*. *Electrophoresis*, 2003. 24(21): p. 3563-76.
21. Unger, M.A., et al., *Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography*. *Science*, 2000. 288(5463): p. 113-116.
22. Gauvin, R., et al., *Hydrogels and microtechnologies for engineering the cellular microenvironment*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2012. 4(3): p. 235-46.
23. Young, E.W. and D.J. Beebe, *Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments*. *Chem Soc Rev*, 2010. 39(3): p. 1036-48.
24. El-Ali, J., P.K. Sorger, and K.F. Jensen, *Cells on chips*. *Nature*, 2006. 442(7101): p. 403-11.
25. Kim, L., et al., *A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells*. *Lab Chip*, 2007. 7(6): p. 681-94.
26. Park, J.Y., et al., *Simultaneous generation of chemical concentration and mechanical shear stress gradients using microfluidic osmotic flow comparable to interstitial flow*. *Lab Chip*, 2009. 9(15): p. 2194-202.
27. McCaig, C.D., et al., *Controlling Cell Behavior Electrically: Current Views and Future Potential*. *Physiological Reviews*, 2005. 85(3): p. 943-978.
28. Ghafar-Zadeh, E., J.R. Waldeisen, and L.P. Lee, *Engineered approaches to the stem cell microenvironment for cardiac tissue regeneration*. *Lab Chip*, 2011. 11(18): p. 3031-48.
29. Nguyen-Vu, T.D.B., et al., *Vertically Aligned Carbon Nanofiber Architecture as a Multifunctional 3-D Neural Electrical Interface*. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 2007. 54(6): p. 1121-1128.
30. Burdick, J.A. and G. Vunjak-Novakovic, *Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation*. *Tissue engineering. Part A*, 2009. 15(2): p. 205-19.
31. Tandon, N., et al., *Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering*. *Nature Protocols*, 2009. 4(2): p. 155-173.
32. Tandon, N., et al., *Optimization of electrical stimulation parameters for cardiac tissue engineering*. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2011. 5(6): p. e115-e125.
33. Zhang, B., et al., *Micro- and nanotechnology in cardiovascular tissue engineering*. *Nanotechnology*, 2011. 22(49): p. 494003.
34. Markx, G.H., *The use of electric fields in tissue engineering*. *Organogenesis*, 2008. 4(1): p. 11-17.
35. Chiu, D.T., *A microfluidics platform for cell fusion*. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001. 5(5): p. 609-612.
36. Tresset, G. and S. Takeuchi, *A Microfluidic Device for Electrofusion of Biological Vesicles*. *Biomedical Microdevices*, 2004. 6(3): p. 213-218.
37. Kovarik, M.L., et al., *Micro Total Analysis Systems for Cell Biology and Biochemical Assays*. *Anal Chem*, 2011. 84(2): p. 516-540.
38. Gong, X. and W. Wen, *Polydimethylsiloxane-based conducting composites and their applications in microfluidic chip fabrication*. *Biomicrofluidics*, 2009. 3(1): p. 12007.

BIBLIOGRAFIA

39. Velev, O.D., S. Gangwal, and D.N. Petsev, *Particle-localized AC and DC manipulation and electrokinetics*. Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry), 2009. 105: p. 213.
40. Jebrail, M.J. and A.R. Wheeler, *Let's get digital: digitizing chemical biology with microfluidics*. Current Opinion in Chemical Biology, 2010. 14(5): p. 574-581.
41. Bao, N., J. Wang, and C. Lu, *Recent advances in electric analysis of cells in microfluidic systems*. Anal Bioanal Chem, 2008. 391(3): p. 933-942.
42. Li, H.-F. and J.-M. Lin, *Applications of microfluidic systems in environmental analysis*. Anal Bioanal Chem, 2009. 393(2): p. 555-567.
43. Moraes, F.C., et al., *Glass/PDMS hybrid microfluidic device integrating vertically aligned SWCNTs to ultrasensitive electrochemical determinations*. Lab Chip, 2012. 12(11): p. 1959-1962.
44. Qiang, L., et al., *Highly sensitive and reusable Pt-black microfluidic electrodes for long-term electrochemical sensing*. Biosensors and Bioelectronics, 2010. 26(2): p. 682-688.
45. T., D., et al., *Nanotechnological strategies for engineering complex tissues*. Nature Nanotechnology, 2011. 6(1): p. 9.
46. Iyer, R.K., et al., *Engineered cardiac tissues*. Current Opinion in Biotechnology, 2011. 22(5): p. 706-714.
47. Maaroufi, A., et al., *Electrical resistivity of polymeric matrix loaded with nickel and cobalt powders*. Journal of Materials Science, 2004. 39(1): p. 265-270.
48. Tandon, N., et al., *Surface-patterned electrode bioreactor for electrical stimulation*. Lab Chip, 2010. 10(6): p. 692.
49. Lee, K.J., K.A. Fossier, and R.G. Nuzzo, *Fabrication of Stable Metallic Patterns Embedded in Poly(dimethylsiloxane) and Model Applications in Non-Planar Electronic and Lab-on-a-Chip Device Patterning*. Advanced Functional Materials, 2005. 15(4): p. 557-566.
50. Lim, K.S., et al., *Reliable fabrication method of transferable micron scale metal pattern for poly(dimethylsiloxane) metallization*. Lab Chip, 2006. 6(4): p. 578-580.
51. Khoshmanesh, K., et al., *Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. 26(5): p. 1800-1814.
52. Gascoyne, P.R.C. and J.V. Vykoukal, *Dielectrophoresis-Based Sample Handling in General-Purpose Programmable Diagnostic Instruments*. Proceedings of the IEEE, 2004. 92(1): p. 22-42.
53. Barash, Y., et al., *Electric field stimulation integrated into perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering*. Tissue Eng Part C Methods, 2010. 16(6): p. 1417-1426.
54. WANG, L., et al., *Side-wall vertical electrodes for lateral field microfluidic applications*. Vol. 16. 2007, New York, NY, ETATS-UNIS: Institute of Electrical and Electronics Engineers. 8.
55. FRANKS, W., et al., *Impedance characterization and modeling of electrodes for biomedical applications*. Vol. 52. 2005, New York, NY, ETATS-UNIS: Institute of Electrical and Electronics Engineers. 8.
56. Park, B.Y. and M.J. Madou, *3-D electrode designs for flow-through dielectrophoretic systems*. Electrophoresis, 2005. 26(19): p. 3745-57.

57. Wang, L., et al., *Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry*. Lab Chip, 2007. 7(9): p. 1114-1120.
58. Choi, J.W., et al., *3-dimensional electrode patterning within a microfluidic channel using metal ion implantation*. Lab Chip, 2010. 10(6): p. 783-8.
59. So, J.H. and M.D. Dickey, *Inherently aligned microfluidic electrodes composed of liquid metal*. Lab Chip, 2011. 11(5): p. 905-11.
60. Niu, X.Z., et al., *Characterizing and Patterning of PDMS-Based Conducting Composites*. Advanced Materials, 2007. 19(18): p. 2682-2686.
61. Liu, C.-X. and J.-W. Choi, *Patterning conductive PDMS nanocomposite in an elastomer using microcontact printing*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2009. 19(8): p. 085019.
62. Chuang, H.-S. and S. Wereley, *Design, fabrication and characterization of a conducting PDMS for microheaters and temperature sensors*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2009. 19(4): p. 045010.
63. Zou, J.-F., et al., *Conductive mechanism of polymer/graphite conducting composites with low percolation threshold*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2002. 40(10): p. 954-963.
64. Hardy, B.S., et al., *The deformation of flexible PDMS microchannels under a pressure driven flow*. Lab Chip, 2009. 9(7): p. 935-938.
65. Wu, W.-Y., et al., *Flexible PDMS-based three-electrode sensor*. Electrochemistry Communications, 2010. 12(11): p. 1600-1604.
66. Namsun, C., Y. Soonki, and K. Sohee. *Fabrication of stretchable and flexible electrodes based on PDMS substrate*. in *Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 2012 IEEE 25th International Conference on*. 2012.
67. Simmons, C.A., et al., *Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway*. Journal of Biomechanics, 2003. 36(8): p. 1087-1096.
68. Wang, J.H.C. and B.P. Thampatty, *An Introductory Review of Cell Mechanobiology*. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 2006. 5(1): p. 1-16.
69. McBeath, R., et al., *Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment*. Developmental Cell, 2004. 6(4): p. 483-495.
70. Liu, L., et al., *Microheaters fabricated from a conducting composite*. Applied Physics Letters, 2006. 89(22): p. 223521.
71. Lewpiriyawong, N., C. Yang, and Y.C. Lam, *Continuous sorting and separation of microparticles by size using AC dielectrophoresis in a PDMS microfluidic device with 3-D conducting PDMS composite electrodes*. Electrophoresis, 2010. 31(15): p. 2622-31.
72. Lewpiriyawong, N., et al., *Microfluidic characterization and continuous separation of cells and particles using conducting poly(dimethyl siloxane) electrode induced alternating current-dielectrophoresis*. Anal Chem, 2011. 83(24): p. 9579-85.
73. Pierson, H.O., *Handbook of Carbon, Graphite, Diamond and Fullerenes - Properties, Processing and Applications*, 1993, William Andrew Publishing/Noyes.

BIBLIOGRAFIA

74. Bandaru, P.R., *Electrical Properties and Applications of Carbon Nanotube Structures*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2007. 7(4): p. 1239-1267.
75. Takayama, S., et al., *Topographical Micropatterning of Poly(dimethylsiloxane) Using Laminar Flows of Liquids in Capillaries*. Advanced Materials, 2001. 13(8): p. 570-574.
76. Kirby, B., *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics - Transport in Microfluidic Devices*2010: Cambridge University Press.
77. Dorf, R.C., J.A. Svoboda, and D. D'Amore, *Circuiti Elettrici*2001: Apogeo.
78. Cannizzaro, C., et al., *Practical Aspects of Cardiac Tissue Engineering With Electrical Stimulation*, 2007. p. 291-307.
79. Lourtioz, J.M., et al., *Photonic Crystals: Towards Nanoscale Photonic Devices*2008: Springer.
80. Lichtenberg, J., N.F. de Rooij, and E. Verpoorte, *A microchip electrophoresis system with integrated in-plane electrodes for contactless conductivity detection*. Electrophoresis, 2002. 23(21): p. 3769-3780.
81. Green, N.G., H. Morgan, and J.J. Milner, *Manipulation and trapping of sub-micron bio-particles using dielectrophoresis*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 1997. 35(2): p. 89-102.
82. Huang, Y., et al., *Electrorotational studies of the cytoplasmic dielectric properties of Friend murine erythroleukaemia cells*. Physics in Medicine and Biology, 1995. 40(11): p. 1789.
83. Siegel, A.C., et al., *Cofabrication: A Strategy for Building Multicomponent Microsystems*. Accounts of Chemical Research, 2010. 43(4): p. 518-528.
84. Pavesi, A., et al., *How to embed three-dimensional flexible electrodes in microfluidic devices for cell culture applications*. Lab Chip, 2011. 11(9): p. 1593.
85. Nichols, K.P., J.C.T. Eijkel, and H.J.G.E. Gardeniers, *Nanochannels in SU-8 with floor and ceiling metal electrodes and integrated microchannels*. Lab Chip, 2008. 8(1): p. 173-175.
86. Mamunya, Y.P., et al., *Electrical and thermal conductivity of polymers filled with metal powders*. European Polymer Journal, 2002. 38(9): p. 1887-1897.
87. Cannizzaro, C., et al., *Characterization of Electrical Stimulation Electrodes for Cardiac Tissue Engineering*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2006. 1(1): p. 845-848.
88. HP., S. and M. SA., *Baseband Modulation Using Rectangular Pulses and Binary Pulse Amplitude Modulation Communication Systems: Analysis and Design*. Prentice Hall 2006(Communications Systems: Analysis and Design).
89. Jelínek, M., et al., *Diamond/graphite content and biocompatibility of DLC films fabricated by PLD*. Applied Physics A: Materials Science & Processing, 2010. 101(4): p. 579-583.
90. Harrison, B.S. and A. Atala, *Carbon nanotube applications for tissue engineering*. Biomaterials, 2007. 28(2): p. 344-353.
91. Merrill, D.R., M. Bikson, and J.G.R. Jefferys, *Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols*. Journal of Neuroscience Methods, 2005. 141(2): p. 171-198.

92. Cheng, W., et al., *Microfluidic cell arrays for metabolic monitoring of stimulated cardiomyocytes*. *Electrophoresis*, 2010. 31(8): p. 1405-1413.
93. Niu, X., et al., *Real-time detection, control, and sorting of microfluidic droplets*. *Biomicrofluidics*, 2007. 1(4): p. 44101.
94. Liu, L., et al., *Micro thermoindicators and optical-electronic temperature control for microfluidic applications*. *Applied Physics Letters*, 2007. 91(9): p. 093513.
95. Bakker, E., *Electrochemical Sensors*. *Anal Chem*, 2004. 76(12): p. 3285-3298.
96. Park, T.H. and M.L. Shuler, *Integration of Cell Culture and Microfabrication Technology*. *Biotechnology Progress*, 2003. 19(2): p. 243-253.
97. Pesce, G., et al., *Mapping electric fields generated by microelectrodes using optically trapped charged microspheres*. *Lab Chip*, 2011. 11(23): p. 4113.
98. Aubin, H., et al., *Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels*. *Biomaterials*, 2010. 31(27): p. 6941-6951.
99. Nichol, J.W., et al., *Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels*. *Biomaterials*, 2010. 31(21): p. 5536-5544.
100. Qi, H., et al., *Patterned Differentiation of Individual Embryoid Bodies in Spatially Organized 3D Hybrid Microgels*. *Advanced Materials*, 2010. 22(46): p. 5276-5281.
101. T., D., et al., *Nanotechnological strategies for engineering complex tissues*. *Nature Nanotechnology*, 2011. 6(1): p. 13-22.
102. McCullen, S.D., et al., *Nanofibrous composites for tissue engineering applications*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2009. 1(4): p. 369-390.
103. Bhattacharya, S.K., *Metal-Filled Polymers: Properties and Applications*1986: M. Dekker.
104. Mamunya, E.P., V.V. Davidenko, and E.V. Lebedev, *Effect of polymer-filler interface interactions on percolation conductivity of thermoplastics filled with carbon black*. *Composite Interfaces*, 1996. 4(4): p. 169-176.
105. Mamunya, Y.P., et al., *Percolation phenomena in polymers containing dispersed iron*. *Polymer Engineering & Science*, 2002. 42(1): p. 90-100.
106. Sichel, E.K., *Carbon black-polymer composites : the physics of electrically conducting composites*1982, New York :: M. Dekker.
107. Callen, B.W.M.J., *Practical considerations for loading conductive fillers into shielding elastomers*; http://www.conductivefillers.com/papers/callen_article_13.pdf. 2002.